

Cephem系経口抗生物質7432-Sの変異原性試験：第1報

-細菌を用いた復帰変異試験-

脇阪義治・泉 晶子・西本洋司

塩野義製薬株式会社研究所*

7432-Sの変異原性を検討するため、*Salmonella*, *Escherichia coli*/Microsome系を用いた復帰変異試験(プレート法および誘発突然変異頻度試験)を実施した。

その結果、プレート法で0.0156~0.5 μ g/plateの用量、また誘発突然変異頻度試験で8~5,000 μ g/mlの用量において、7432-Sの復帰変異原性は全く認められなかった。

Key words: 復帰変異試験, IMFテスト, セフェム系抗生物質, 経口剤

7432-Sは塩野義製薬研究所で新しく合成された経口セフェム系抗生物質である。

7432-Sの変異原性の有無を検討するため、*Salmonella* および *Escherichia coli*/Microsome系を用いた復帰変異試験¹⁾を実施した。7432-Sは強い抗菌性を示すので、誘発突然変異頻度試験²⁾(IMF-test)を併せて実施した。

I. 実験材料および方法

1. 被験物質および試験溶液調製法

復帰変異試験(プレート法)に用いた7432-S原末(Lot No. 48801, 838.7 μ g(力価)/mg)は、水に溶けにくい弱アルカリ性条件下では溶けやすい。7432-S原末約3mgとその1.5モル等量のNaHCO₃を約5mlの蒸留水に溶解(pH 7.4)したのち蒸留水に希釈して実験に用いた。このようにして調製した7432-S溶液は、室温で2時間以上安定である。

IMF-testには当社製造の7432-Sナトリウム塩、凍結乾燥品[Lot No. 50914, 800.3 μ g(力価)/mg]を、用時にSørensenリン酸緩衝液(SBS, pH 7.2)で溶解し、同液に希釈して用いた。

本実験の陽性対照としては下記の化合物を使用した。

Methylmethanesulfonate (MMS, 東京化成)

Sodium azide (NaN₃, 半井化学)

N-Ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(ENNG, Aldrich Chem.)

2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF2, 和光純薬)

9-Aminoacridine hydrochloride (9AA, 半井化学)

Mitomycin C (MMC, 協和醸酵)

2-Aminoanthracene (2AA, 半井化学)

Hydrogen peroxide (H₂O₂, 三徳化学)

陽性対照化合物は滅菌蒸留水またはdimethyl sulfoxide (DMSO)に溶解して用いた。対照化合物の溶媒および試験用量についてはTables 1~4に示した。

陰性対照としては滅菌蒸留水およびDMSOを用いた。

2. 指標菌株

復帰変異試験には、*Salmonella typhimurium* TA 100, TA1535, TA98, TA1537, TA102 および *Escherichia coli* WP2uvrA の6菌株、またIMF-testにはTA100およびTA98の2菌株を用いた。*Salmonella* 菌はB. N. Ames教授(カリフォルニア大学)より、*E. coli* 株は品川日出夫博士(大阪大学微生物病研究所)より分与を受けた。各菌株は、そのgenotypeを確認後、試験に用いた。使用に際しては、-80°Cで凍結保存された菌株を融解し、その0.05 mlを7 mlのnutrient broth No.2 (Oxoid)に接種し、37°C、16時間振盪培養したものを指標菌液とした。

3. S9 Mixの調製

*In vitro*代謝活性化のためラット肝ホモジネート、(S9)を主成分とするS9 Mixを調製した。S9としては市販のラットS9を用いたが、復帰変異試験(プレート法)ではAroclor 1254を投与したラット肝臓より調製されたもの(和光純薬, Lot No. 03449), またIMF-testではフェノバルビタールおよび5, 6-ベンゾフラボンを投与したラット肝臓より調製されたもの(オリエンタル酵母, Lot No. 86060604)を用いた。S9は凍結状態で購入したのち、使用直前まで-80°Cで保存した。使用に際しては、これを融解し、水冷下、下記の組成に調製し

Table 1. Reverse mutation assay of 7432-S in *S. typhimurium* and *Escherichia coli* without metabolic activation

Material $\mu\text{g}/\text{plate}$	Revertant Colonies per Plate (Mean)					
	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	TA102
Control (H ₂ O)	141 161 (151)	34 29 (32)	12 15 (14)	58 58 (58)	8 10 (8)	322 306 (314)
Control (DMSO)	99 102 (101)	28 27 (28)	10 11 (11)	48 59 (54)	8 11 (10)	299 282 (281)
7432-S (H ₂ O) 0.0156	161 122 (142)	19 27 (23)	10 11 (11)	51 59 (55)	8 12 (10)	330 400 (365)
0.0313	137 145 (141)	37 29 (33)	14 16 (15)	58 52 (55)	14 8 (11)	412 363 (388)
0.0625	96 107 (102)	29 28 (29)	16 16 (16)	38 55 (47)	8 6 (7)	352 300 (326)
0.125	41 25 (33)	11 18 (15)	5 10 (8)	39 32 (36)	3 7 (5)	320 342 (331)
0.25	0* 0* (0)	5* 3* (4)	3* 2* (3)	23 10 (17)	2* 2* (2)	245 283 (264)
0.5	0* 0* (0)	1* 0* (1)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	84 103 (94)
Positive Controls $\mu\text{g}/\text{plate}$ (Solvent)	MMS 200 (H ₂ O)	NaN ₃ 0.5 (H ₂ O)	ENNG 2 (DMSO)	AF2 0.1 (DMSO)	9AA 80 (DMSO)	MMC 0.1 (H ₂ O)
Revertants/Plate	479 441 (460)	371 344 (358)	457 477 (467)	594 546 (570)	556 690 (623)	1484 1436 (1460)

*: Diminution of background lawn. *: Partial diminution of background lawn.

た。

S9 1 ml
 20 mM MgCl₂および 82.5 mM KCl を含有
 する水溶液 4 ml
 50 mM 2 Na-グルコース-6-リン酸溶液
 (半井化学) 1 ml
 40 mM NADPH (興人) 1 ml
 40 mM NADH (興人) 1 ml
 1 M Na-リン酸緩衝液 (pH 7.4) 1 ml
 滅菌蒸留水 1 ml

計 10 ml

4. 培地

1) 最少グルコース寒天培地

グルコース 2% および Bacto-agar (Difco) 1.5% を含む Vogel-Bonner E 培地³⁾ を直径 86 mm の γ 線滅

菌プラスチックシャーレ (和光純薬) に 30 ml ずつ分注し、固化させた平板を復帰変異コロニーの計数に用いた。

2) 生存菌数測定用寒天培地

Bacto-agar 1.5% 含有の nutrient broth No. 2 を γ 線滅菌プラスチックシャーレに 30 ml ずつ分注して固化させたものを用いた。

3) 重層用軟寒天

(1) *Salmonella* 用軟寒天

精製寒天 (Difco) 0.6% および塩化ナトリウム 0.5% を含む水溶液 100 容量に、5 mM L-ヒスチジン溶液を 1 容量および 1 mM D-ビオチン溶液を 5 容量の容量比に混合し調製した。

(2) *E. coli* 用軟寒天

精製寒天 0.6% および塩化ナトリウム 0.5% を含む水溶液 100 容量に、5 mM L-トリプトファン溶液を 1

Table 2. Reverse mutation assay of 7432-S in *S. typhimurium* and *Escherichia coli* with metabolic activation

Material μg/plate	Revertant Colonies per Plate (Average)					
	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	TA102
Control (H ₂ O)	110 129 (120)	16 11 (14)	18 11 (15)	65 60 (63)	14 11 (13)	434 415 (425)
Control (DMSO)	92 135 (114)	15 10 (13)	13 10 (12)	70 61 (66)	12 18 (15)	358 376 (367)
7432-S (H ₂ O) 0.0156	152 95 (124)	14 9 (12)	18 21 (20)	69 69 (69)	11 28 (20)	416 463 (440)
0.0313	121 144 (133)	15 12 (14)	21 14 (18)	78 81 (80)	18 16 (17)	427 438 (433)
0.0625	103 113 (108)	14 13 (14)	15 15 (15)	72 63 (68)	17 21 (19)	412 439 (426)
0.125	37 44 (41)	12 10 (11)	5 12 (9)	55 56 (56)	14 14 (14)	413 411 (412)
0.25	0* 1* (1)	3* 2* (3)	6* 1* (4)	12 15 (14)	6* 3* (5)	301 337 (319)
0.5	0* 0* (0)	0* 0* (0)	1* 1* (1)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	77* 79* (78)
Positive Controls μg/plate (Solvent)	2AA 0.5 (DMSO)	2AA 2.0 (DMSO)	2AA 80 (DMSO)	2AA 0.5 (DMSO)	2AA 2.0 (DMSO)	2AA 2.0 (DMSO)
Revertants/Plate	728 564 (646)	369 383 (376)	1018 1016 (1017)	898 762 (830)	488 522 (505)	1370 1402 (1386)

*: Diminution of background lawn. *: Partial diminution of background lawn.

容量の容量比に混合し調製した。

5. 試験方法

1) 復帰変異試験 (プレート法)

S9 Mix 添加による代謝活性化の有無につき実験を行った。

本実験に先立ち、7432-S の指標菌に対する増殖阻害作用を調べ、試験用量を設定するための予備実験を行った。その結果、S9 Mix 添加の有無にかかわらず、菌の顕著な生育阻害のみられた最低濃度 0.5 μg/plate を最高用量とし、以下公比 2 で減じた 6 段階の用量を設定した。

約 45°C に保温した軟寒天溶液 2.0 ml に、指標菌液 0.1 ml、被験物質溶液 0.1 ml および 0.1 M Na-リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 ml (代謝活性化の場合は S9 Mix 0.5 ml) を混和し、速やかに、最少グルコース平板上に重層した。固化後、平板を 37°C で 2 日間培養し

た。各実験群はそれぞれ 2 枚の平板を使用し、復帰変異コロニーを計数した。

2) IMF-test

指標菌はプレート法で使用した TA100 および TA98 の 2 菌株を用い、S9 Mix 存在下および非存在下の実験をした。プレート法の場合と同様に、nutrient broth No. 2 培地で 16 時間振盪培養された菌液を、同培地で 10 倍希釈し、さらに 37°C で 3 時間ゆるく振盪培養して得られた指標菌液を使用した。7432-S の最高用量として 5,000 μg/ml を設定したが、この用量は、IMF-test の最高限度の用量とされているものであり、以下公比 5 で減じた 5 段階の用量を設定した。

(1) 被験物質の処理

Sørensen のリン酸緩衝液 1.0 ml (代謝活性化の場合は S9 Mix 1.0 ml) に 20% グルコース溶液、1 mg/ml の L-ヒスチジン溶液および 0.1 mg/ml の D-ビオ

Table 3. Mutation frequency test on 7432-S in *Salmonella typhimurium* TA100

Compound μg/ml	☆	Revertant Colonies (cfu/ml)		Rt-Rd (cfu/ml)	Survived Colonies (×10 ⁷ cfu/ml)		Mean	Survived %	ST (×10 ⁷ /ml)	IMF (×10 ⁻⁷)
			Mean			Mean				
Control (SBS)	-	795, 825, 770,	808	~	576, 580, 594,	568	~	~	~	~
		840			524, 566					
Control (DMSO)	-	840, 760, 800,	798	~	450, 446, 408,	434	~	~	~	~
		790			394, 472					
7432-S (SBS)	8	770, 840, 725,	778	-30	388, 336, 396	373	65.7	37.3	<0	
	40	800, 735, 760	765	-43	278, 344, 290	304	53.5	30.4	<0	
	200	680, 805, 730	738	-70	262, 224, 280	255	44.9	25.5	<0	
	1000	715, 755, 725	732	-76	190, 218, 196	201	35.4	20.1	<0	
	5000	700, 675, 705	693	-115	130, 112, 146	129	22.7	12.9	<0	
H ₂ O ₂ (SBS)	12.5	935, 995, 1025	985	177	408, 458, 476	447	78.7	44.7	3.96	
	25	1175, 1250, 1195	1207	399	380, 370, 374	375	66.0	37.5	10.6	
	50	1500, 1555, 1530	1528	720	264, 286, 300	283	49.8	28.3	25.4	
AF2 (DMSO)	0.1	3400, 3680, 3560	3547	2749	320, 352, 362,	345	79.5	34.5	79.7	
Control (SBS)	+	810, 835, 750,	790	~	560, 552, 526,	556	~	~	~	~
		765			566, 576					
Control (DMSO)	+	610, 685, 620,	635	~	356, 368, 416,	390	~	~	~	~
		625			404, 408					
7432-S (SBS)	8	640, 720, 745	702	-88	322, 294, 304	307	55.2	30.7	<0	
	40	725, 755, 690,	723	-67	276, 270, 254	267	48.0	26.7	<0	
	200	530, 595, 655	593	-197	170, 178, 174	174	31.3	17.4	<0	
	1000	490, 475, 510	492	-298	102, 78, 108	96	17.3	9.6	<0	
	5000	385, 405, 445	412	-378	58, 66, 56	60	10.8	6.0	<0	
2AA (DMSO)	0.25	1400, 1280, 1420	1367	732	376, 404, 390	390	100.0	39.0	18.8	
	0.5	2040, 2120, 1975	2045	1410	330, 356, 362	349	89.5	34.9	40.4	
	1.0	2890, 2910, 2800	2867	2232	320, 282, 312	305	78.2	30.5	73.2	

☆: -; Without metabolic activation. +; With metabolic activation
(SBS): Sørensen's phosphate buffer solution (pH 7.2).

チン溶液をそれぞれ 20 μl ずつ混和し、次に 0.2 ml の各濃度の被験物質溶液を加え、最後に指標菌液 0.8 ml を加えて 37°C で 60 分間緩やかに振盪させながらブレインキュベーションを行った。終了後、遠沈 (2,270×g, 20 分) した沈渣を Sørensen のリン酸緩衝液 5 ml で 2 回遠沈洗浄し、同緩衝液 1 ml に再懸濁して試験用の菌懸濁液とした。

(2) 復帰変異コロニーおよび生存菌の測定

約 45°C に保温した軟寒天溶液 2.0 ml に菌懸濁液 0.2 ml を混和し、速やかに、最少グルコース平板上に重層した。固化後、平板を 37°C で 2 日間培養し、復帰変異コロニー数を測定した。

一方、生存菌数については、菌懸濁液 0.1 ml を 2 ×

10⁵ 倍希釈し、その 0.1 ml を軟寒天溶液 (約 45°C) 2 ml と混和し生存菌数測定用平板上に重層した。固化後、平板を 37°C で 1 日間培養し生存菌数を測定した。

各実験群は、それぞれ 3 枚の平板を使用した。溶媒対照は復帰変異コロニー測定では 4 枚の平板、また生存菌数測定では 5 枚の平板を使用した。

6. 判定基準

1) 復帰変異試験

被験物質処理平板において溶媒対照平板の 2 倍以上の復帰変異コロニーを生じ、かつ用量依存性が認められたとき陽性とした。

2) IMF-test

菌懸濁液 1 ml 当りの生存菌数および復帰変異コロ

Table 4. Mutation frequency test on 7432-S in *Salmonella typhimurium* TA98

Compound μg/ml	☆	Revertant Colonies		Rt-Rc (cfu/ml)	Survived Colonies			ST (×10 ⁷ / ml)	IMF (×10 ⁻⁷)
		(cfu/ml)	Mean		(×10 ⁶ cfu/ml)	Mean	Survived %		
Control (SBS)	-	125, 145, 105, 110	121	~	1018, 1016, 980, 1052, 932	1000	~	~	~
Control (DMSO)	-	135, 130, 125, 135	131	~	546, 558, 556, 602, 588	570	~	~	~
7432-S (SBS) 8	-	100, 100, 75	92	-29	594, 606, 566	589	58.9	58.9	<0
40	-	115, 110, 115	113	-8	566, 562, 610	579	57.9	57.9	<0
200	-	110, 115, 140	122	1	530, 524, 508	521	52.1	52.1	0.019
1000	-	120, 95, 135	117	-4	340, 394, 470	401	40.1	40.1	<0
5000	-	110, 130, 70	103	-18	370, 400, 352	374	37.4	37.4	<0
H ₂ O ₂ (SBS) 50	-	115, 145, 115	125	4	912, 830, 830	857	85.7	85.7	0.05
100	-	155, 105, 145	135	14	824, 864, 878	855	85.5	85.5	0.16
150	-	185, 220, 230	212	91	278, 246, 204	243	24.3	24.3	3.7
AF2 (DMSO) 0.1	-	1075, 1070, 905	1017	886	274, 300, 326, 300	300	52.6	30.0	29.5
Control (SBS)	+	185, 160, 170, 230	186	~	274, 254, 288, 312, 316	289	~	~	
Control (DMSO)	+	245, 175, 150, 205	194	~	132, 138, 140, 158, 158	145	~	~	
7432-S (SBS) 8	+	155, 135, 125	138	-48	194, 218, 160	191	66.1	19.1	<0
40	+	185, 225, 155, 188	188	2	180, 168, 180	176	60.9	17.6	0.114
200	+	200, 170, 185	185	-1	148, 154, 152	151	52.2	15.1	<0
1000	+	185, 145, 165	165	-21	86, 72, 88	82	28.4	8.2	<0
5000	+	140, 125, 100	122	-64	42, 66, 50	53	18.3	5.3	<0
2AA (DMSO) 0.25	+	1050, 1055, 1075	1060	866	128, 136, 132	132	91.0	13.2	65.61
0.5	+	1635, 1625, 1580	1613	1419	102, 150, 140	131	90.3	13.1	108.32
1.0	+	2625, 2515, 2480	2540	2346	188, 216, 188	197	135.9	19.7	119.09

☆: - ; Without metabolic activation. + ; With metabolic activation
(SBS) : Sørensen's phosphate buffer solution (pH 7.2).

ニ-数から、次式により誘発突然変異頻度 (IMF 値) を算出した。

$$IMF = (Rt - Rc) / St$$

Rt: 被験物質処理の菌懸濁液 1 ml 当りの復帰変異コロニー数

Rc: 溶媒対照の菌懸濁液 1 ml 当りの復帰変異コロニー数

St: 被験物質処理の菌懸濁液 1 ml 当りの生存菌数
被験物質処理群で溶媒対照群よりも復帰変異菌数が明らかに増加し、IMF 値が用量依存性を示しているとき陽性とした。

II. 実験成績

1. 復帰変異試験

プレート法による 7432-S の実験結果は Table 1 と Table 2 に示した。

7432-S 処理群は、S9 Mix 添加による代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの指標菌株においても、溶媒対照 (滅菌蒸留水) に比較して復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また TA102 株以外の菌株において、0.5 μg/plate 群では、background lawn の抑制が認められた。TA100 株では、0.25 μg/plate でも同様の現象が認められた。一方、陽性対照化合物は S9 Mix を添加した代謝活性化の場合を含め、一部またはすべての指標菌株に対し復帰変異コロニー数を著しく増加させ、本実験が適正に行なわれたことを示した。

2. IMF-test

7432-S の IMF-test の実験結果は Table 3 と

Table 4 に示した。

7432-S で処理した場合、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても、TA100 および TA98 の復帰変異コロニー数は溶媒対照と同等または以下の値で差がなく、IMF 値は用量依存性の増加も認められなかった。

一方、各陽性対照物質で処理した場合の平板当りの復帰変異コロニー数および IMF 値は用量依存性をもって増加した。

III. 考 察

新しい経口セフェム系抗生物質 7432-S について、遺伝子突然変異を検出する系として細菌を用いる復帰変異試験（プレート法および IMF-test）を実施した。

異なる genotype を有する 6 菌株を用いた復帰変異試験において、7432-S は代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株およびいずれの用量においても復帰変異コロニーの増加を示さず、復帰変異原性は陰性であった。

しかし、7432-S は強い抗菌性を示すため、0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以下の低い濃度域に限って試験が実施された。そこで、高濃度域での変異原性を調べるため IMF-test を実施した。その結果、7432-S の 8~5,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の

用量において、代謝活性化の有無にかかわらず、復帰変異コロニー数はいずれの指標菌株においても溶媒対照に比して差がなく、算出された IMF 値もすべて陰性を示した。

以上の結果より、7432-S は本実験条件下で、細菌に対して突然変異を誘発しなかった。

試験実施期間：復帰変異試験 1984 年 9 月~11 月

IMF-test 1986 年 8 月~9 月

文 献

- 1) MARON, D. M. and B. N. AMES : Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113 : 173~215, 1983
- 2) 日本製薬工業協会・医薬品評価委員会・基礎研究部会・第 3 分科会・変異原性試験検討グループ・MF テスト検討サブグループ：II. 細菌を用いる誘発突然変異頻度試験, IMF テスト。
トキシコロジフォーラム 9 : 531~539, 1986
- 3) VOGEL, H. J. and D. M. BONNER : Acetylornithinase of *Escherichia coli* : Partial purification and some properties. *J. Biol. Chem.* 218 : 97~106, 1956

MUTAGENICITY TESTS OF 7432-S, AN ORAL CEPHEM ANTIBIOTICS (I) -REVERSION TEST ON BACTERIA-

YOSHIHARU WAKISAKA, AKIKO IZUMI and YOUZI NISHIMOTO
Shionogi Research Laboratories, Shionogi & Co., Ltd.
5-12-4, Sagisu, Fukushima-ku, Osaka 553, Japan

Mutagenicity of an oral cephem antibiotics, 7432-S was tested in reverse mutation assays in bacteria with and without metabolic activation.

The agent showed no mutagenic activity in the plate test using *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* at the dose up to 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$, nor in the induced mutation frequency test using *S. typhimurium* at the dose up to 5,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$.