

Cephem 系経口抗生物質 7432-S の変異原性試験：第 2 報

—ヒトリンパ球培養細胞およびマウス
骨髄細胞を用いる染色体異常試験—

高瀬史朗・近藤耕治・白取 治
塩野義製薬株式会社研究所*

7432-S の突然変異誘発性を調べるため、ヒト末梢血由来リンパ球培養細胞および Jcl : ICR 系雄マウス骨髄細胞を用いる染色体異常試験を行なった。

ヒト末梢血由来リンパ球に対する *in vitro* 染色体異常試験では、染色体異常細胞の出現頻度に用量作用関係を認めず、また最高用量の 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (ED_{50}) の作用群においても、対照群と比べて染色体異常細胞の出現頻度に有意差がみられなかった。

Jcl : ICR 系雄マウスに、最高用量として 7432-S 500 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ 単回および 5 日間連続経口投与を行ない、骨髄細胞の染色体を観察したが、7432-S 投与に起因すると考えられる染色体異常は認められなかった。

これに対して、陽性対照として用いた Mitomycin C は *in vitro* および *in vivo* 染色体異常試験において chromatid break や exchange などの染色体異常細胞が高頻度に出現した。

Key words : 染色体異常試験, セフェム系抗生物質, 経口剤, ヒトリンパ球, マウス骨髄細胞

7432-S は塩野義製薬研究所で合成された経口用セフェム系抗生物質である。今回、7432-S の突然変異誘発性試験として、ヒト末梢血リンパ球による *in vitro* 染色体異常試験およびマウス骨髄細胞による *in vivo* 染色体異常試験を行なったので、その成績を報告する。

I. 実験材料および方法

1. 試験物質

7432-S (ナトリウム塩) は白色～淡灰黄白色の結晶性粉末であり、試験には当社製造の凍結乾燥品 (Lot No. 56812, 696 μg (力価)/mg) を使用した。陽性対照として Mitomycin C (MMC) と略, Lot No. 228 AEC, 協和醗酵) を使用した^{1, 2)}。

2. *In vitro* 染色体異常試験

In vitro 染色体異常試験として、ヒト由来の末梢血リンパ球に対する染色体異常誘発性を検討した^{3, 4)}。本試験には特に代謝活性化法は併用していない。

ヒトリンパ球に作用させる 7432-S の用量設定のため、マウス白血病培養細胞 L1210 に対する細胞毒性を調べて ED_{50} 値を算出した。7432-S は RPMI-1640 培地に溶解し、同培地に 20% 牛胎仔血清を加えた培養液で段階希釈を行ない細胞毒性を測定した。

ヘパリン処理をした注射器で献血者から末梢血を採血

し、等量の培養液を加えて倍量に希釈した。この血液希釈液の 4 容量を Lymphoprep® の 3 容量に注意深く重層し、400×G で 30 分間室温で比重遠心後、中間層に集まったリンパ球をパスツール・ピペットで採取した。リンパ球は培養液で 2 回洗浄後、培養液中に $1 \sim 2 \times 10^6$ cells/ml になるように調整し、リンパ球の幼若化をはかるため Phytohemagglutinin-P® を 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の割合で添加した。37°C で 48 時間培養後、予備試験の結果から 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($2 \times \text{ED}_{50}$) を最高濃度として、以下公比 2 で段階希釈した 7432-S を加え 21 時間培養した。その後 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のコルセミドを添加し、更に 3 時間培養を続け (検体との接触時間は合計 24 時間)、空気乾燥法で染色体標本を作製した。

陽性対照である MMC の作用濃度は、我々が用いる染色体異常試験の常用量である 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の 1 用量を設定し、上述と同様な方法で染色体標本を作製し、観察した。

In vitro および *in vivo* 染色体異常試験ともに、gap (s) は染色体異常とは区別し、gap (s) のみを示す染色体は、異常な染色体として取り扱わなかった。

3. *In vivo* 染色体異常試験

1) 実験動物および飼育条件

日本クレアより Jcl : ICR 系雄マウスを 7 週齢で購入

Table 1. Mitotic indices in human lymphocytes after treatment with 7432-S*

Compound	Dose ($\mu\text{g/ml}$)	Mitotic Index(% of cells in division)		
		Volunteer A**	Volunteer B**	Mean
Control (solvent)	0	3.3	3.7	3.5
7432-S	25	3.3	3.6	3.45
	50	3.0	3.6	3.3
	100	3.0	4.4	3.7
	200	2.2	2.9	2.55
	400	0.3	0.4	0.35
Mitomycin C	0.05	2.4	2.4	2.4

* 0.2 $\mu\text{g/ml}$ colcemid was added 3 hr before the termination of the culture.

** 1,000 cells were counted at each concentration.

し、約2週間飼育環境に馴化させて、体重が32g以上に達してから実験に使用した。マウスは温度 $24 \pm 3^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 15\%$ 、午前8時から12時間照明に調節された飼育室で、金属ケージに1ケージ当たり5匹収容して、固型飼料(CA-1, 日本クレア)および市水道水を自由摂取させて飼育した。

2) 試験方法

In vivo 染色体異常試験方法^{3,4)}に従い、7432-Sを単回投与あるいは5日間連続経口投与したときの骨髓細胞の染色体異常誘発性を検討した。

7432-Sは投与直前に5%アラビアゴム溶液に懸濁し胃ゾンデを用いて経口投与した。投与経路は臨床適用ルートに準じた。7432-S 500 mg/mlの濃度では、溶液の粘性が高いため250 mg/mlの溶液を用意し、5,000 mg/kg/dayの用量群は20 ml/kgと投与液量を増量して投与濃度を調整した。それ以外の用量群では、いずれの実験群においても投与液量が10 ml/kgとなるように薬剤濃度を調整して投与を行なった。陰性対照群は5%アラビアゴム溶液20 ml/kgを5日間連続経口投与した。その他MMC 3 mg/kgを腹腔内単回投与した陽性対照群を設けた。

7432-S単回投与実験では検体投与24時間後に、また5日間連続投与実験では最終検体投与6時間後にそれぞれマウスを屠殺した。分裂中期の細胞を集めるため、屠殺1時間前にコルヒチン1 mg/kgを腹腔内投与した。標本作製のため大腿骨を取り出して両端を鉗で切断し、RPMI-1640培地を入れた注射器を用いて液と一緒に骨髓細胞をスピッツ遠心管に洗いだし、0.075M KCl溶液で15分間低張処理をした。その後、Acetic-alcohol (Acetic acid : Methanol = 1 : 3)で固定した。染色

体標本は空気乾燥法で作製し、ギムザ染色の後検鏡した。

4. 有意差検定

Fisherの直接確率計算法を用いて、各検体作用群と陰性対照群における染色体異常細胞出現率を比較した。

II. 成績

A. *In vitro* 染色体異常試験

1. ED₅₀

マウス白血病培養細胞L1210を用いて算出した7432-SのED₅₀値は200 $\mu\text{g/ml}$ であった。

2. ヒトリンパ球培養細胞を用いる *in vitro* 染色体異常試験

1) 染色体標本の Mitotic Index

7432-Sは400 $\mu\text{g/ml}$ ($2 \times \text{ED}_{50}$)を最高濃度として、以下公比2で段階希釈した5段階の用量を用いて実験した。陽性対照MMCは0.05 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で作用させた。これらの薬剤作用群および陰性対照を、1人の献血者から得られたリンパ球を用いて1系列として設定した。薬剤感受性の個人差を考慮して、献血者は5名準備し、5系列の実験群を設けた。そのうち任意の2系列の実験群を選び、各作用群とも1,000個の細胞を観察し、分裂中期細胞を計数した。結果はTable 1に示した。

無処置対照群ではMitotic Index (MI)が3.5%に対して、7432-Sの最高作用濃度400 $\mu\text{g/ml}$ ($2 \times \text{ED}_{50}$)では分裂中期細胞が極端に少なく、染色体標本の観察が出来なかった。7432-Sの他の作用群ではMIが2.55%~3.7%の頻度で認められた。一方、陽性対照のMMC 0.05 $\mu\text{g/ml}$ の作用群では、MIが2.4%であった。

2) 染色体異常細胞の出現頻度

MIの結果から、7432-Sは200 $\mu\text{g/ml}$ (ED₅₀)を

Table 2. *In vitro* chromosome studies of human lymphocytes after treatment with 7432-S

Agent	Dose ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Observed cells	Achromatic		Type of aberrations					Aberrant cell (%)		
			Gap		Break		Fragment	Exchange	Others		Total	
			Chromatid	Isochromatid	Chromatid	Isochromatid						
Control (solvent)	-	250	6	0	3	0	0	0	0	0	3	3 (1.2)
7432-S	50	250	13	0	3	0	0	0	0	0	3	3 (1.2)
	100	250	8	2	1	0	0	0	0	0	1	1 (0.4)
	200	250	18	0	6	0	0	0	0	0	6	6 (2.4)
Mitomycin C	0.05	250	40	0	47	6	5	21	1	80	71	(28.4)*

Significant difference from control is marked : * $p < 0.05$

最高用量として、以下公比 2 で段階希釈した 100 および 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、計 3 用量段階の染色体標本を観察した。各作用群は 1 系列当たり 50 個の分裂像を観察した。上述のように 5 系列の実験群を設定したので、各薬剤濃度作用群とも合計 250 個の分裂中期像について染色体異常と achromatic gap の有無を調べ、結果は Table 2 に示した。

無処置対照群では、chromatid break が 3 個の細胞に観察され、染色体異常細胞の出現頻度は 3/250 (1.2%) であった。Achromatic gap は 6/250 の細胞に認められた。7432-S の作用群では chromatid break のみが観察され、染色体異常細胞の出現頻度は 1/250~6/250 (0.4~2.4%) で、いずれの作用群においても用量作用関係を示さず、無処置対照群の染色体異常細胞の出現頻度と比較して有意差が認められなかった。Achromatic gap は 10/250~18/250 の頻度で認められた。これに対して陽性検体 MMC 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の作用群では、染色体異常細胞が 71/250 (28.4%) と高率に出現した。これらの異常は chromatid break を主とし、他に isochromatid break, fragment, exchange 等が観察された。Achromatic gap は 40/250 の頻度で観察された。

B. *In vivo* 染色体異常試験

1. マウス経口投与の用量設定

In vivo 染色体異常試験の投与用量を設定するため、5 日間連続経口投与をしたときの平均体重の経時的推移を調べた。7432-S 5 日間連続経口投与実験では、最高投与量 5,000 mg/kg/day の用量でも全例生存し、また著しい体重減少も認められなかった。以上の成績から、7432-S の最高投与量は単回および 5 日間連続経口投与ともに 5,000 mg/kg/day とした⁹⁾。

2. マウス骨髄細胞を用いる *in vivo* 染色体異常試験
7432-S の単回および 5 日間連続経口投与実験ともに、

最高投与量 5,000 mg/kg/day、以下その 1/2、1/4 量の 2,500 および 1,250 mg/kg/day の投与用量群を設定した。

各用量群とも 1 群 5 匹のマウスを用い、マウス 1 匹当たり 50 個、合計 250 個の分裂中期像について染色体異常と achromatic gap の有無を調べ、結果を Table 3 に示した。

Vehicle 対照群 (5% Arabic gum) では、chromatid break が 2 個認められ、染色体異常細胞の出現頻度は 2/250 (0.8%) であった。Achromatic gap は 6/250 の細胞に認められた。

7432-S 経口投与群では、単回および 5 日間連続投与群の染色体異常細胞の出現頻度は 0/250~2/250 (0~0.8%) の値を示し、vehicle 対照群の染色体異常細胞の出現頻度と比べて有意差が認められなかった。観察された染色体異常像は chromatid break と isochromatid break である。Achromatic gap は 3/250~7/270 の頻度で認められた。これに対して、陽性対照 MMC 3 mg/kg 腹腔内単回投与群 (約 1/2 LD₅₀ に相当) では、染色体異常細胞が 92/250 (36.8%) と高率に出現した。これらの異常は chromatid break を主として他に isochromatid break, fragment, exchange 等が観察された。また achromatic gap は 74/250 観察され、vehicle 対照群と比べ著しい増加を示した。

III. 考 察

ヒト由来リンパ球培養細胞を用いる *in vitro* 染色体異常試験で染色体異常細胞の出現率は陽性対照である MMC が 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の作用群で 71/250 (28.4%) と高率に出現し対照群 3/250 (1.2%) と比較して有意の値 ($P < 0.05$) を示したのに対して、7432-S 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (ED₅₀)、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (1/2 × ED₅₀) および 50

Table 3. *In vivo* chromosome studies of bone marrow cells in male mice after treatment with 7432-S

Agent	Dose (mg/kg/day)	Route	No. of Observed mice cells	Achromatic							Aberrant cell (%)			
				Gap			Break							
				Chromatid	Isochromatid	Chromatid	Ischromatid	Fragment	Exchange	Others		Total		
Vehicle Control (5% Arabic gum)	0 × 5	p.o.	5	250	6	0	0	2	0	0	0	0	2	2 (0.8)
7432-S	1,250 × 1	p.o.	5	250	7	0	0	1	0	0	0	0	1	1 (0.4)
	2,500 × 1	p.o.	5	250	6	0	0	1	1	0	0	0	2	2 (0.8)
	5,000 × 1	p.o.	5	250	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0)
	1,250 × 5	p.o.	5	250	5	0	0	1	0	0	0	0	1	1 (0.4)
	2,500 × 5	p.o.	5	250	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0)
	5,000 × 5	p.o.	5	250	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0)
Mitomycin C	3 × 1	i.p.	5	250	73	1	1	70	3	8	35	1	117	92 (36.8)*

Significant difference from control is marked : * p < 0.05

$\mu\text{g/ml}$ ($1/4 \times \text{ED}_{50}$) の作用群において、染色体異常細胞の出現頻度は各々 $6/250$ (2.4%), $1/250$ (0.4%) および $3/250$ (1.2%) の値を示し、用量作用関係は認められず、対照群との間に有意差が認められなかった。

次に、*in vivo* 染色体異常試験の結果についてみると、陽性対照として用いた MMC 3 mg/ml 腹腔内投与群 ($1/2 \times \text{LD}_{50}$ に相当) では、染色体異常細胞が $92/250$ (36.8%) と高率に出現し、染色体異常像は chromatid break, isochromatid break, fragment および exchange 等が観察された。1 個の細胞に複数の染色体異常のみられる例が 25 個あった。

これに対して、7432-S 単回あるいは 5 日間連続経口投与群ともに、いずれの投与群においても用量作用関係はみられず染色体異常細胞の出現頻度は vehicle 対照群との間に有意差が認められなかった ($0/250 \sim 2/250$, $0 \sim 0.8\%$)。

今回の *in vitro* および *in vivo* 染色体異常試験の結果からみて、本実験条件下では、7432-S はなんら染色体異常誘発性を示さないものと結論される。

(実験実施期間：1986 年 4 月～1986 年 12 月)

文 献

- 1) COHEN, M. M. & M. W. SHAW : Effect of mitomycin C on human chromosomes. *J. Cell Biol.* 23 : 386~395, 1964
- 2) MANYAK, A. & E. SCHLEIERMACHER : Action of mitomycin C on mouse spermatogonia. *Mutat. Res.* 19 : 99~108, 1973
- 3) 薬審第 118 号 (昭和 59 年 2 月 15 日) 厚生省薬務局審査課長および厚生省薬務局生物製剤課長通達：医薬品の製造 (輸入) 承認申請に必要な毒性試験のガイドラインについて (その 1)。
- 4) Report of The Ad Hoc Committee of The Environmental Mutagen Society and The Institute for Medical Research : Chromosome methodologies in mutation testing. *Toxicol Appl. Pharmacol.* 22 : 269~275, 1972
- 5) SHIRATORI, O. Growth inhibitory effect of cardiac glycosides and aglycones on neoplastic cells : *In vitro* and *in vivo* studies : *Gann* 58 : 521~528, 1967
- 6) 厚生省薬務局審査課監修 : GLP 基準および毒性試験法ガイドライン解説 284, 330, 331, 薬事日報社, 1984

MUTAGENICITY TESTS OF 7432-S, AN ORAL CEPHEM ANTIBIOTICS (II) - CHROMOSOME ABERRATION TEST WITH HUMAN LYMPHOCYTE CELLS AND MOUSE BONE MARROW CELLS -

SHIRO TAKASE, KOJI KONDO and OSAMU SHIRATORI
Shionogi Research Laboratories, Shionogi & Co., Ltd.
5-12-4, Sagisu, Fukushima-ku, Osaka 553, Japan

Cytogenetic studies on 7432-S were carried out using cultured human peripheral lymphocytes (without metabolic activation) and bone marrow cells of male Jcl : ICR mice.

The agent showed no clastogenic effects on the human lymphocytes *in vitro* at the dose up to $200 \mu\text{g/ml}$, nor in the mouse bone marrow when the agent was given by gavage, once or 5 times consecutively for 5 days, at the maximum dose, $5,000 \text{ mg/kg/day}$.

Those results indicate that 7432-S was no clastogenic effects on mammalian cells *in vitro* as well as *in vivo*.