

## 新キノロン系抗菌剤Fleroxacinの変異原性試験

前田明利・鈴木 博・村山 淳・中川一平

笠原 靖・阿部泰夫

杏林製薬株式会社 中央研究所\*

新キノロン系抗菌剤fleroxacinの変異原性の有無を検討する目的で、微生物あるいは哺乳動物細胞の遺伝子あるいは染色体に対する影響を調べ、以下の結果を得た。

1) DNA修復試験(rec-assay) : *Bacillus subtilis*の組換え修復能欠損株(M45)と正常株(H17)において、0.4~3.2  $\mu\text{g}/\text{disk}$ の用量で発育阻止帯に差(5~8mm)が認められた。

2) 微生物を用いる復帰変異誘発試験(Ames test) : *Salmonella typhimurium* TA系列や*Escherichia coli* WP2uvrAの検定菌株において、0.0005~0.1  $\mu\text{g}/\text{plate}$ の用量でS-9による代謝活性化の有無にかかわらず、復帰変異コロニー数の増加は見られなかった。

3) 哺乳類の培養細胞(V-79細胞)を用いる遺伝子突然変異試験・V-79細胞に対して63~499  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の用量で3時間暴露させても、代謝活性化の有無にかかわらず、6-チオグアニン抵抗性変異体の出現頻度は増加しなかった。

4) 哺乳類の培養細胞(CHL細胞)を用いる染色体異常誘発試験 : CHL細胞に対して50~400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の用量で24時間あるいは48時間暴露させても、染色体異常出現頻度に有意な増加は認められなかった。また、代謝活性化させた場合でも同様に、3時間同用量で暴露させても出現頻度は増加しなかった。

5) マウスを用いる小核試験 : ICR系マウスにfleroxacinを1000~4000mg/kg投与しても、投与24時間後の小核出現頻度は雌雄とも増加しなかった。

以上の結果から、fleroxacinは*B. subtilis*に対してDNA障害性を示したものの、微生物や哺乳動物細胞に対して変異原性を示すことはなく、染色体異常を誘発することもなかった。

**Key words** : Fleroxacin, 変異原性, DNA傷害性

6, 8-Difluoro-1-(2-fluoroethyl)-1, 4-dihydro-7-(4-methyl-1-piperazinyl)-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid (fleroxacin)は杏林製薬株式会社で開発された新キノロン系抗菌剤で、グラム陽性菌並びにグラム陰性菌に対し高い抗菌活性を有することが認められている<sup>1)</sup>。

今回、fleroxacinについて変異原性の有無を検討する目的で、遺伝子傷害性を検出するrec-assay、遺伝子突然変異原性を検出するAmes test並びにV-79細胞での遺伝子突然変異試験、さらに染色体異常を検出するCHL細胞での染色体異常試験並びにマウスでの小核試験を実施したので、その結果を報告する。

### I. 実験材料及び方法

#### 1. 被験物質

*In vitro*の試験では、fleroxacinを0.1N-NaOH溶液に溶解し、0.1N-塩酸を加えてpH11~12付近に調整した。これを滅菌蒸留水で希釈し、各試験に用いる濃度溶液を調製した。

マウスに投与する*in vivo*の試験では、fleroxacinを

0.3%カルボキシメチルセルロースナトリウム(CMC)に懸濁して用いた。

#### 2. DNA修復試験(rec-assay)

試験菌株として、*Bacillus subtilis*の組換え修復能が正常であるH17株(Rec<sup>+</sup>)とそれが欠損したM45株(Rec<sup>-</sup>)を用いた。

Fleroxacin(杏林製薬 Lot No.830316)は、3.2~0.0125  $\mu\text{g}/\text{disk}$ (公比2)の9用量を設定し、また、対照物質としてはカナマイシン(KM: 万有製薬)および4-ニトロキノリン-1-オキシド(4-NQO: 東京化成)を用いた。

両株をそれぞれ液体ブロス [肉エキス(ディフコ) 10g/l, 酵母抽出物(大五栄養化学) 10g/l, NaCl 5g/l, pH7.0] に接種し、37℃、一夜振盪培養した。この菌液を固型ブロス培地 [液体ブロス培地にバクトアガー(ディフコ) 15g/l添加] 上に八字型に画線し、その頂点を覆うように検体溶液20  $\mu\text{l}$ を浸み込ませた円型ろ紙を置いた。

これを4℃で24時間放置した後、さらに37℃で一夜培

\* 〒329-01 栃木県下都賀郡野木町御手洗2399-1

養した。ろ紙端を起点として生じた生育阻止帯の長さを測定し、両菌株での阻止帯の長さを比較した。

### 3. 微生物を用いる復帰変異誘発試験(Ames test)

試験菌株として、*Salmonella typhimurium*のヒスチジン要求性変異株であるTA98, TA100, TA1535, TA1537及び*Escherichia coli*のトリプトファン要求性変異株であるWP2uvrAを用いた。

代謝活性化処理には、ラット(Crj:SD, 雄, 8週齢)にフェノバルビタール(60mg/kg×4days, i.p.)とβ-ナフトフラボン(80mg/kg×1day, i.p.)を投与して得られた、ラット肝ホモジネートのS-9画分を用いた。試験には、8mM MgCl<sub>2</sub>, 33mM KCl, 5mM グルコース-6-リン酸, 4mM NADPH及び4mM NADH添加0.1Mナトリウムリン酸緩衝液(pH7.4)1ml中にS-9を0.1ml含むS-9mixを用時に調製して用いた。

Fleroxacin (Lot No.830316)は、0.1, 0.05, 0.01, 0.005, 0.001, 0.0005 µg/plateの6用量を設定し、また、対照物質としてはナトリウムアジド(NaN<sub>3</sub>:関東化学)、塩酸9-アミノアクリジン(9-AA:東京化成)4-NQO, 2-アミノアントラセン(2-AA:半井化学)及びベンゾ[a]ピレン(BP:東京化成)を用いた。

試験は以下のごとくプレインキュベーション法で行った。

それぞれの菌株をニュートリエントブロス(ディフコ, 0.5% NaCl添加)に接種し、37℃, 一夜振盪培養して菌懸濁液を得た。検体溶液0.1ml, 0.1Mナトリウムリン酸緩衝液(pH7.4)0.5ml及び菌懸濁液0.1mlを混合し、37℃, 20分間振盪培養した(プレインキュベーション)。代謝活性化処理する場合は、緩衝液の代わりにS-9mixを0.5ml加えた。

その後、*S. typhimurium*用には、L-ヒスチジン及びD-ビオチン、*E. coli*用には、L-トリプトファンをそれぞれ0.05mM含むソフトアガー2mlを混和し、Vogel-Bonnerの最少グルコース寒天平板培地上に広げた。37℃, 48時間培養後、生育した復帰変異体コロニー数を計測し、溶媒対照群と比較した。

### 4. 哺乳類の培養細胞(V-79細胞)を用いる遺伝子突然変異試験

試験細胞として、東京大学医科学研究所癌細胞研究室より分与され当社で継代したチャイニーズ・ハムスター肺由来のV-79細胞を使用した。

V-79細胞の培養には、イーグルMEM(ハンクス塩)培地(フローラボラトリー)11に5%ゲンタマイシン(シグマ)溶液1ml, 200mM L-グルタミン溶液(ギブコ)5ml, MEM非必須アミノ酸溶液(100倍液:ギブコ)10ml, MEMビルビン酸ナトリウム溶液(ギブコ)10ml, 牛胎仔

血清(ギブコ)50ml, 1MHEPES緩衝液(ギブコ)25mlの割合でそれぞれ添加したもの(α-MEM)を使用した。培養は常に、37℃, 5%CO<sub>2</sub>, 95%airを通気したインキュベーターで行った。

薬物を代謝活性化させるためのS-9は、I-3のごとく調製したものをオリエンタル酵母工業(株)から購入した。試験にはハンクス平衡塩類溶液(ギブコ)12mlにイソクエン酸・3ナトリウム(半井化学)0.69g及びNADP・2ナトリウム(ペーリンガー・マンハイム)0.36gの割合で溶解し、1N-NaOHでpH6~8に調整したものにS-9を18mlの割合で加えたS-9mixを用時に調製して用いた。

#### 1) 細胞毒性試験

この試験は遺伝子突然変異試験での用量を設定するために行った。

Fleroxacin(Lot No.830530)は、溶解度限界の49.9mg/ml(135mM)を最高濃度溶液として、以下等比的に滅菌蒸留水で希釈し、24.9, 12.6, 6.3, 3.1mg/ml溶液を調製した。

V-79細胞を300cells/10ml(径10cm, プラスチックシャーレ)で播種し、3時間後にfleroxacinの各濃度溶液を0.1mlずつ添加した(最終濃度499, 249, 126, 63, 31 µg/ml)。また、S-9により代謝活性化させる場合には1mlの培地をシャーレから除き、1mlのS-9mixを加え、直ちにfleroxacin溶液0.1mlを添加した。検体暴露は3時間とし、その後培地を交換して7日間培養した。

増殖したコロニーを0.1%メチレンブルー-95%エタノール溶液で固定、染色し、各シャーレについてコロニー数を計測した。

コロニー形成率(絶対値)=

$$\frac{\text{増殖したコロニー数(2枚の平均値)}}{300}$$

コロニー形成率(相対値)=

$$\frac{\text{検体添加でのコロニー形成率(絶対値)}}{\text{溶媒対照のコロニー形成率(絶対値)}}$$

細胞毒性試験の結果から、fleroxacinの最終濃度は、499, 249, 126, 63 µg/mlの4用量を設定した。また、対照物質としては、3-メチルコラントレン(3-MC:東京化成)、N-メチル-N-ニトロソウレア(MNU:シグマ)を用いた。

V-79細胞を1×10<sup>6</sup>cells/40ml(150cm<sup>2</sup>, プラスチックフラスコ)で播種し、これを2日間培養した後、fleroxacin溶液, 対照物質溶液あるいは溶媒を0.4mlずつ各フラスコに添加した。また、S-9によって代謝活性化させる場合には、各フラスコから培地4mlを除き、4mlの

S-9mixを加え、その後直ちに検体溶液等を0.4ml添加した。3時間暴露させた後、さらに培養を続け、2~3日毎に2回継代して細胞を採取した。ただし、MNUについては2回目の継代培養は行わず培地交換のみ行った。この細胞をコロニー形成率を求めるために、150cells/シャーレで3枚に播種し、また、変異体を選別するために、6-チオグアニン(6-TG：和光純薬工業)を加えた $\alpha$ -MEM(6-TG最終濃度11  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )を用いて $3 \times 10^5$ cells/シャーレで9枚に播種した。全てのシャーレは7日間培養した後、固定、染色した。

各シャーレについて増殖したコロニー数を計測し、コロニー形成率、変異体出現頻度を下式より算出した。溶媒対照の値と比較して、変異体出現頻度が3倍以上の値を示すものについて陽性と判定した。

コロニー形成率(絶対値) =

$$\frac{\text{増殖したコロニー数(3枚の平均値)}}{150}$$

変異体出現頻度 =

$$\frac{9 \text{枚のシャーレのコロニー数の合計}}{9 \times 3 \times 10^5 \times \text{コロニー形成率(絶対値)}}$$

#### 5. 哺乳類の培養細胞(CHL細胞)を用いる染色体異常誘発試験

試験細胞として、国立衛生試験所安全性生物試験研究センターより分与され当社で継代したチャイニーズハムスター肺由来のCHL細胞を使用した。

CHL細胞の培養には、11のイーグルMEM(日水製薬)に200mM L-グルタミンを10ml、10%  $\text{NaHCO}_3$ を12~15ml及び仔牛血清(ギブコ)を110~120mlの割合で添加したもの(csMEM)を使用した。培養は常に37°C、5%  $\text{CO}_2$ 、95%airを通気したインキュベーターで行った。

Fleroxacin(Lot No.830316)は、最高濃度溶液を20mg/mlとし、以下滅菌蒸留水を用いて希釈し、使用した。また、染色体異常誘発試験での対照物質としては $\beta$ -プロピオラクトン(BPL：東京化成)およびBPを用いた。

##### 1) 細胞毒性試験

この試験は染色体異常誘発試験での用量を設定するために行った。

CHL細胞をプラスチックシャーレ(6cm)に、 $1 \times 10^5$  cells/5mlで播種し、24時間培養後、fleroxacin溶液を0.1mlずつ添加した(最終濃度：25, 50, 100, 200, 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )。その後さらに培養を続け、24時間目、48時間目に生細胞数を測定し、溶媒対照と比較した。

##### 2) 染色体異常誘発試験

###### a. 直接法

CHL細胞をプラスチックシャーレ(6cm)に $2 \times 10^4$

cells/5mlで播種した。培養3日目にfleroxacin溶液を0.1mlずつ添加(最終濃度：50, 100, 200, 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )し、さらに培養を続け、24時間目、48時間目に染色体標本作製した。

###### b. 代謝活性化法

薬物を代謝活性化させるための酵素液(S-9)はI-3のごとく調製した。試験には、4mM HEPES, 5mM  $\text{MgCl}_2$ , 33mM  $\text{MKCl}$ , 5mM グルコース-6-リン酸, 4mM NADP溶液1ml中にS-9を0.3ml含むS-9mixを用時に調製して用いた。

試験管にS-9mix 0.5ml,  $1 \times 10^6$ 個のCHL細胞を含む細胞液0.1ml及びfleroxacin溶液0.1ml(最終濃度：50, 100, 200, 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )を入れ、振盪しながら37°Cで3時間インキュベーションした。その後、csMEMで洗浄して細胞を2枚のシャーレに播種した(5ml/dish)。これをさらに24時間培養し、染色体標本作製した。

###### c. 染色体標本作製及び観察

培養終了2時間前にコルセミド(1.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ：半井化学)を各シャーレに加えた。培養終了時に細胞を採取し、0.075M  $\text{KCl}$ 溶液で低張処理し、冷メタノール酢酸混液(3:1v/v)で固定後、スライドガラス上に滴下し風乾した。ギムザ染色を施した後、顕微鏡下(400~1000倍)でよく拡がった中期分裂像を各用量200個観察し、染色体異常の出現頻度を計測した。検体添加による染色体異常の出現頻度については、溶媒対照に対し $\chi^2$ 検定を行った。

#### 6. マウスを用いる小核試験

9週齢のICR系マウス(静岡実験動物農業協同組合)を1週間予備飼育した後、試験に供した。

Fleroxacin(Lot No.830316)の用量は、マウスの $\text{LD}_{50}$ 値(p.o.：4000mg/kg以上)<sup>2)</sup>で設定した4000mg/kgを最高用量とし、以下2000, 1000mg/kgの3用量とした。これらに対照群と陽性対照群を加えた5群を設け、各群雌雄6匹とした。

Fleroxacinは1回経口投与した。対照群には0.3% CMCのみ1回経口投与した。また、陽性対照群にはマイトマイシンC(MMC：協和発酵)を4mg/kg 1回腹腔内投与した。それぞれ投与24時間後にマウスから大腿骨を摘出し、牛胎仔血清(ギブコ)を用いて骨髓細胞を洗い出した。これを遠心し、上清液除去後、骨髓細胞をスライドガラスに塗抹した。風乾の後メイ-ギムザ染色を施した。1個体あたり1000個の多染性赤血球を観察し、その中の小核を有する細胞を計測した。同時に多染性赤血球の全赤血球に対する比率を求めた。

投与群の小核を有する細胞数についてはKASTENBAUMの方法<sup>3)</sup>により対照群と比較し、多染性赤血球の比較についてはStudentのt検定を行った。

## II. 実験結果

### 1. DNA修復試験(rec-assay)

結果をTable 1に示した。

蛋白合成阻害剤であるKMがH17(Rec<sup>+</sup>)とM45(Rec<sup>-</sup>)の両株を同程度に生育阻害したのに対し、変異原として知られる4-NQOはM45をより強く生育阻害した。

一方、fleroxacinは検定菌に対し強い抗菌活性を有し(MIC: H17 0.39  $\mu\text{g/ml}$ , M45 0.1  $\mu\text{g/ml}$ )、抗菌活性が発現しないような低用量では両株ともに生育阻止帯はみられなかった。更に用量を上げると0.4  $\mu\text{g/disk}$ でM45のみに、0.8  $\mu\text{g/disk}$ 以上では両株に生育阻止帯が出現した。両株での生育阻止帯の差は0.8  $\mu\text{g/disk}$ で8mmと最も大きく、それ以上の用量ではむしろ減少した。

### 2. 微生物を用いる復帰変異誘発試験(Ames test)

S. typhimuriumヒスチジン要求株及びE. coliトリプトファン要求株を用いて、ヒスチジン非要求性あるいはトリプトファン非要求性への復帰変異誘発能を調べた。試験結果はTable 2に示した。

変異原として知られる4-NQO, NaN<sub>3</sub>, 9-AAには顕著な復帰変異誘発能が認められ、BP, 2-AAはS-9との反応により同様な活性を示した。一方、fleroxacinは検定菌に対し強い抗菌活性を有するため、抗菌活性を発現する濃度以下の低用量で試験した。その結果Table 2から明らかなように、0.0005~0.1  $\mu\text{g/plate}$ の各用量でS-9

添加の有無にかかわらず、いずれの検定菌株に対しても復帰変異を誘発することはなかった。0.05  $\mu\text{g/plate}$ 以上では検定菌株によっては復帰変異コロニー数がやや減少したが、これはfleroxacinの抗菌作用によるものと思われる。

### 3. 哺乳類の培養細胞(V-79)を用いる遺伝子突然変異試験

#### 1) 細胞毒性試験

結果をTable 3に示した。Fleroxacinの各用量において、S-9の有無にかかわらず、絶対値、相対値共にコロニー形成率は溶媒対照を含め各用量間で差がなく、fleroxacinによる細胞毒性は認められなかった。

なお、溶媒対照を含め各用量ともS-9を用いた場合の方がコロニー形成率の絶対値が低かった。

#### 2) 遺伝子突然変異試験

結果をTable 4に示した。溶媒対照を含め各用量ともS-9の有無にかかわらずコロニー形成率(絶対値)が低かった。特にfleroxacin 63  $\mu\text{g/ml}$ (S-9添加), 249  $\mu\text{g/ml}$ (S-9無添加), MNU 52  $\mu\text{g/ml}$ (S-9無添加)において低値であった。

一方、変異体出現頻度は、S-9により代謝活性化させなかった場合、fleroxacinの各用量で $1.46 \times 10^{-5} \sim 4.27 \times 10^{-6}$ であり、溶媒対照の値( $1.78 \times 10^{-5}$ ,  $7.53 \times 10^{-6}$ )の3倍には達していなかった。MNUは52  $\mu\text{g/ml}$ において

Table 1. Rec-assay of fleroxacin

Compound	Dose ( $\mu\text{g/disk}$ )	Growth inhibition zone (mm)		Difference of inhibition (mm)
		H17	M45	
H <sub>2</sub> O		0	0	0
DMSO		0	0	0
Fleroxacin	0.0125	0	0	0
	0.025	0	0	0
	0.05	0	0	0
	0.1	0	0	0
	0.2	0	0	0
	0.4	0	5	5
	0.8	2	10	8
	1.6	4	9	5
	3.2	11	16	5
	40	14	14	0
KM <sup>1)</sup> 4-NQO <sup>2)</sup>	0.1	1	10	9
	0.2	3	10	7
	2	12	18	6

<sup>1)</sup>kanamycin <sup>2)</sup>4-nitroquinoline-1-oxide  
DMSO: dimethyl sulfoxide

Table 2. Reverse mutagenesis test of fleroxacin in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	S-9	Number of revertants/plate				
			TA100	TA1535	TA98	TA1537	WP2uvrA
H <sub>2</sub> O		—	106	46	37	6	82
DMSO		—	83	41	30	7	80
Fleroxacin	0.0005	—	97	44	33	7	88
	0.001	—	104	45	27	6	74
	0.005	—	100	41	25	8	75
	0.01	—	113	44	26	6	72
	0.05	—	73	30	27	8	66
	0.1	—	61	26	29	7	55
4-NQO <sup>1)</sup>	0.025	—	191	NT	NT	NT	NT
	0.1	—	421	NT	NT	NT	NT
	0.2	—	NT	NT	262	NT	NT
	1	—	NT	NT	NT	NT	309
NaN <sub>3</sub>	0.5	—	NT	404	NT	NT	NT
9-AA <sup>2)</sup>	80	—	NT	NT	NT	393	NT
H <sub>2</sub> O		+	107	28	65	9	105
DMSO		+	77	30	59	11	94
Fleroxacin	0.0005	+	110	33	62	11	76
	0.001	+	112	27	62	7	101
	0.005	+	116	26	42	9	103
	0.01	+	95	26	51	10	100
	0.05	+	87	20	52	9	67
	0.1	+	81	16	56	13	76
BP <sup>3)</sup>	5	+	361	NT	238	NT	NT
2-AA <sup>4)</sup>	2	+	NT	118	NT	32	NT
	5	+	NT	NT	NT	NT	217

<sup>1)</sup>4-nitroquinoline-1-oxide    <sup>2)</sup>9-aminoacridine HCl    <sup>3)</sup>benzo [a] pyrene    <sup>4)</sup>2-aminoanthracene

DMSO: dimethyl sulfoxide

NT : not tested

Table 3. Cytotoxicity test of fleroxacin in V-79 cells

Compound	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	S-9	Number of colonies/dish	Relative plating efficiency	Absolute plating efficiency
H <sub>2</sub> O		—	260	1.00	0.87
Fleroxacin	31	—	256	0.98	0.85
	63	—	267	1.03	0.89
	126	—	256	0.98	0.85
	249	—	250	0.96	0.83
	499	—	248	0.95	0.83
H <sub>2</sub> O		+	217	1.00	0.72
Fleroxacin	31	+	248	1.14	0.83
	63	+	237	1.09	0.79
	126	+	225	1.04	0.75
	249	+	231	1.06	0.77
	499	+	217	1.00	0.72

変異体出現頻度が $1.13 \times 10^{-3}$ と高く、明らかに変異体の出現を誘発した。

また、S-9により代謝活性化させた場合においても、fleroxacinの各用量で $1.64 \times 10^{-5} \sim 6.54 \times 10^{-6}$ であり、いずれも溶媒対照の値( $8.68 \times 10^{-6}$ ,  $6.99 \times 10^{-6}$ )の3倍には達していなかった。3-MCは $10 \mu\text{g/ml}$ において変異体出現頻度が $4.26 \times 10^{-4}$ と高く、明らかに変異体の出現を誘発した。

4. 哺乳類の培養細胞(CHL細胞)を用いる染色体異常誘発試験

1) 細胞毒性試験

Fleroxacinを細胞に暴露後24時間目では、25, 50,

100, 200, 400  $\mu\text{g/ml}$ でそれぞれ-20.6%, -19.0%, 4.8%, 25.4%, 47.6%の増殖抑制が認められた。また、48時間目では25, 50, 100, 200, 400  $\mu\text{g/ml}$ でそれぞれ5.9%, 17.6%, 29.4%, 41.2%, 65.9%の増殖抑制が認められた。本実験の細胞増殖用量反応関係をFig.1に示した。以上の結果が示すようにfleroxacinはCHL細胞に対して比較的細胞毒性が弱かったため、染色体異常誘発試験における本薬物の暴露濃度を50, 100, 200, 400  $\mu\text{g/ml}$ とした。

2) 染色体異常誘発試験

試験結果をTable 5に示した。

Fleroxacinを各濃度で24, 48時間接触させても溶媒対

Table 4. Mutation frequency of fleroxacin in V-79 cells

Compound	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	S-9	Plating efficiency		Total number of 6-TG resistant colonies (9 dishes)	Mutation frequency
			number of colonies/dish	absolute plating efficiency		
H <sub>2</sub> O		—	88	0.59	12	$7.53 \times 10^{-6}$
			75	0.50	24	$1.78 \times 10^{-5}$
Fleroxacin	63	—	84	0.56	22	$1.46 \times 10^{-5}$
	126	—	90	0.60	22	$1.36 \times 10^{-5}$
	249	—	57	0.38	12	$1.17 \times 10^{-5}$
	499	—	78	0.52	6	$4.27 \times 10^{-6}$
MNU <sup>1)</sup>	52	—	61	0.41	1080	$1.13 \times 10^{-3}$
H <sub>2</sub> O		+	79	0.53	10	$6.99 \times 10^{-6}$
			96	0.64	15	$8.68 \times 10^{-6}$
Fleroxacin	63	+	37	0.25	5	$7.41 \times 10^{-6}$
	126	+	67	0.45	13	$1.07 \times 10^{-5}$
	249	+	76	0.51	9	$6.54 \times 10^{-6}$
	499	+	78	0.52	23	$1.64 \times 10^{-5}$
3-MC <sup>2)</sup>	10	+	83	0.55	632	$4.26 \times 10^{-4}$

<sup>1)</sup>N-methyl-N-nitrosourea    <sup>2)</sup>3-methylcholanthrene

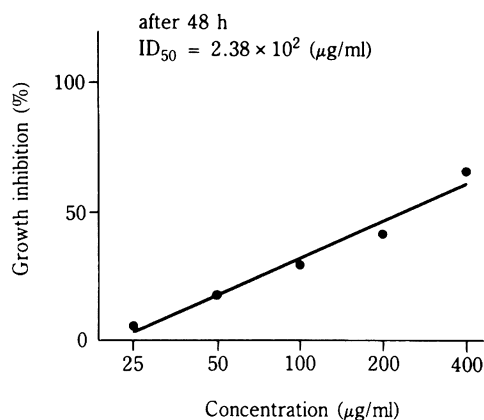
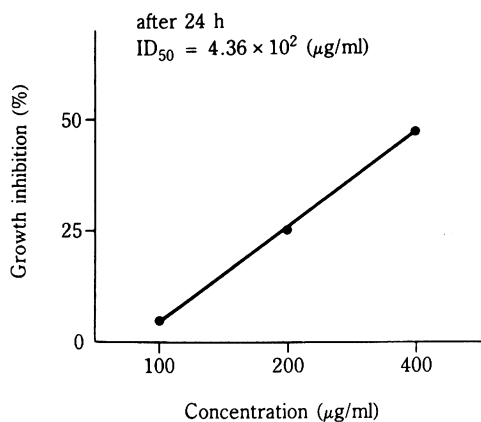


Fig. 1. Dose-response relationships of fleroxacin in growth inhibition test on CHL cells.

照に比べて有意な染色体異常の出現は認められなかった。S-9を添加した代謝活性化法においても同様にいずれの濃度でも有意な染色体異常の出現は認められなかった。

陽性対照として用いたBPLは30 µg/mlの濃度で24時間接触させると有意に染色体異常の出現を誘発した。同様にBPはS-9の存在下で有意に染色体異常を誘発した。

#### 5. マウスを用いる小核試験

試験結果をTable 6に示した。

雄マウスにおける小核出現頻度は対照群の0.15%に対し、floxacin 1000, 2000及び4000mg/kg投与群ではそれぞれ0.27, 0.27及び0.08%であり、対照群との間に有意な差はみられなかった。MMC投与群は7.62%と対照群より有意な増加を示した。全赤血球に対する多染性赤血球の比率は対照群の0.50に対し、floxacin 1000, 2000及び4000mg/kg投与群ではそれぞれ0.48, 0.52及び0.50であり、対照群との間に差はみられなかった。MMC投与群は0.30で対照群に比べ有意な低下を示した。

一方、雌マウスにおいても小核出現頻度は対照群の0.15%に対し、floxacin 1000, 2000及び4000mg/kg投与群ではそれぞれ0.17, 0.10及び0.15%であり、対照群との間に差はみられなかった。MMC投与群は7.65%

で対照群より有意な増加を示した。全赤血球に対する多染性赤血球の比率は対照群の0.49に対し、floxacin 1000, 2000及び4000mg/kg投与群ではそれぞれ0.54, 0.52及び0.51であり、対照群との間に差はみられなかった。MMC投与群は0.38で対照群に比べ有意な低下を示した。

### Ⅲ. 考 察

化学発癌物質として知られるものは、変異原性物質、つまり、微生物や真核細胞に対して突然変異を誘発させる物質(mutagen)、真核細胞の染色体に異常を起こさせる物質(clastogen)あるいはDNAに障害を与えるような物質であることが多い。そのため、化学物質の発癌性の短期スクリーニング試験としての変異原性試験が重要視され、各種の試験法が開発されている。

そこでfloxacinの変異原性の有無に関して、より多くの情報を得る目的で、rec-assay, Ames test, V-79細胞での遺伝子突然変異試験、CHL細胞での染色体異常誘発試験及びマウスでの小核試験を実施した。

Floxacinは哺乳動物に対する毒性は低いが、細菌(感受性菌)に対する抗菌作用が強く、その抗菌作用の作用点はDNA代謝に関与するDNA gyraseに対するもので

Table 5. Chromosomal aberration test of floxacin in CHL cells

Compound	Concentration (µg/ml)	S-9	Time of exposure (h)	NC <sup>1)</sup>	Cells with chromosomal aberrations	
					%	type
H <sub>2</sub> O		—	24	200	0	
Floxacin	50	—	24	200	0.5	g
	100	—	24	200	0	
	200	—	24	200	0	
	400	—	24	200	0	
BPL <sup>2)</sup>	30	—	24	159	89.3*	g, b, t, f
Intact		—	24	200	0.5	b, t
H <sub>2</sub> O		—	48	200	0.5	b
Floxacin	50	—	48	200	0	
	100	—	48	200	0.5	r
	200	—	48	200	0	
	400	—	48	200	0.5	t
Intact		—	48	200	0	
H <sub>2</sub> O		+	3	200	0	
Floxacin	50	+	3	200	1.5	g, b
	100	+	3	200	0.5	g
	200	+	3	200	0.5	g
	400	+	3	200	0	
BP <sup>3)</sup>	5	+	3	200	9*	g, b

g: chromatid gaps, b: chromatid or chromosomal breaks, t: translocation, r: ring formation, f: fragmentation

<sup>1)</sup>no. of observed cells <sup>2)</sup>β-propiolactone <sup>3)</sup>benzo [a] pyrene

\* Significant difference from each control (H<sub>2</sub>O) at p<0.05 (χ<sup>2</sup> test)

Table 6. Micronucleus test on bone marrow in mice at 24 h after single treatment with fleroxacin (p.o.) or mitomycin C (i.p.)

Sex	Dose (mg/kg)	Number of animals	Number of polychromatic erythrocytes	Polychromatic erythrocyte with micronuclei		Ratio of polychromatic erythrocytes <sup>1)</sup>
				number	frequency (%)	
Male	control	6	6000	9	0.15 ± 0.10 <sup>2)</sup>	0.50 ± 0.03
	fleroxacin 1000	6	6000	16	0.27 ± 0.15	0.48 ± 0.11
	2000	6	6000	16	0.27 ± 0.15	0.52 ± 0.05
	4000	6	6000	5	0.08 ± 0.08	0.50 ± 0.05
	mitomycin C 4	6	6000	457*	7.62 ± 3.17*	0.30 ± 0.04*
Female	control	6	6000	9	0.15 ± 0.12	0.49 ± 0.08
	fleroxacin 1000	6	6000	10	0.17 ± 0.15	0.54 ± 0.04
	2000	6	6000	6	0.10 ± 0.11	0.52 ± 0.05
	4000	6	6000	9	0.15 ± 0.08	0.51 ± 0.08
	mitomycin C 4	6	6000	459*	7.65 ± 2.36*	0.38 ± 0.04*

\* Significant difference from the control ( $P < 0.05$ )

<sup>1)</sup> number of polychromatic erythrocytes/number of polychromatic and normochromatic erythrocytes

<sup>2)</sup> mean ± SD

あると考えられている<sup>4)</sup>。このようなDNA代謝に関与する薬物は、rec-assayで陽性を示すことが予想され、また、fleroxacinに類似の構造を有し、同様な作用機構により抗菌作用を示すnorfloxacinあるいはnalidixic acidは既にrec-assayにおいて陽性であることが報告されている<sup>5)</sup>。今回の実験でも、fleroxacinの0.4 µg/disk以上でH17株(Rec<sup>+</sup>)とM45株(Rec<sup>-</sup>)との間に5~8mmの生育阻止帯の差が生じ、fleroxacinのDNA傷害性が示唆された。

一方、Ames testの結果、抗菌活性が発現される濃度以下の低用量では、いずれの検定菌株においても代謝活性化の有無にかかわらず復帰変異コロニー数の増加はみられなかった。

以上の結果から、fleroxacinの感受性菌に対するDNA傷害性は変異原性と直接結びつくものではないと考えられた。

しかし、抗菌剤であるfleroxacinについて感受性細菌を用いて変異原性を検索することより、哺乳動物細胞を用いて遺伝子あるいは染色体に対する作用を検討することに重点を置くべきであると考え、以後の試験を実施した。

V-79細胞はチャイニーズハムスターの肺由来の株化細胞で、HGPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) 遺伝子座での突然変異をプリンアナログ(6-TG)に対する耐性をもって検出することができる。これを用い、fleroxacinの変異原性を検討したところ、代謝活性化の有無にかかわらず、6-TG抵抗性変異体の出現頻度は溶媒対照のそれに比べ差を認めなかった。

さらに、V-79細胞と同様にチャイニーズハムスターの肺由来の株化細胞であるCHL細胞を用いて、fleroxacinの染色体への影響を検討した。CHL細胞にfleroxacinを50~400 µg/mlの濃度で接触させても、代謝活性化の有無にかかわらず染色体異常の出現率は自然発生的な出現率に比べ、同程度かそれ以下であった。

*In vivo*で行ったマウスを用いる小核試験では、fleroxacinを1000~4000mg/kg投与しても投与24時間後の小核出現頻度は雌雄とも対照群に比べて差を認めず、fleroxacinはマウス骨髄細胞染色体に影響を及ぼさないことが示された。

以上の結果から、fleroxacinは哺乳動物細胞の遺伝子や染色体に対して変異原性作用を示さないと考えられ、しかも、V-79細胞やCHL細胞を用いた細胞毒性試験から、哺乳動物細胞に対しては低毒性であることが確認された。

これらのことから、fleroxacinのDNA傷害性は、キノロン系抗菌剤共通の作用機序により感受性菌に対してのみ選択的に生じるものであり、この傷害性が変異原性に結びつくことはないものと考えられた。

## 文 献

- HIRAI K, AOYAMA H, HOSAKA M, OOMORI Y, NIWATA Y, SUZUE S, IRIKURA T: *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of AM-833, a new quinolone derivative. *Antimicrob Agents Chemother* 29 : 1059~1066, 1986
- 新キノロン系抗菌剤Fleroxacinのマウス、ラット



- 及びイヌにおける急性毒性試験。Chemotherapy 38(S-2) : 135-144, 1990
- 3) KASTENBAUM M A, BOWMAN K O : Table for determining the statistical significance of mutation frequencies. Mutation Res 9 : 527-549, 1970
- 4) 新キノロン系抗菌剤Fleroxacinの*in vitro*の抗菌力。Chemotherapy 38(S-2) : 1-10, 1990
- 5) 入倉 勉, 細見次郎 : AM-715の*in vitro* 変異原性試験。Chemotherapy 29(S-4) : 938-944, 1981

## MUTAGENICITY OF FLEROXACIN

AKITOSHI MAEDA, HIROSHI SUZUKI, ATSUSHI MURAYAMA, IPPEI NAKAGAWA, YASUSHI KASAHARA and YASUO ABE

Central Research Laboratories, Kyorin Pharmaceutical Co., Ltd.

2399-1 Mitarai, Nogi-machi, Shimotsuga-gun, Tochigi 329-01, Japan

Using various short-term assays, we tested the mutagenicity of fleroxacin in bacteria, mammalian cells and mice, and obtained the following results.

1. DNA-repair test (rec-assay): at levels from 0.4-3.2  $\mu\text{g}/\text{disk}$ , fleroxacin showed a difference in inhibition zone between the two strains of *Bacillus subtilis*; the DNA-repair-deficient strain (M45) and the wild type strain (H17).
2. Reverse mutation test with bacteria (Ames' test): fleroxacin exhibited no mutagenicity against *Salmonella typhimurium* TA-strains and *Escherichia coli* WP2uvrA at levels from 0.0005-0.1  $\mu\text{g}/\text{plate}$ , in the absence and presence of a microsomal preparation (S-9) derived from rat liver.
3. Mutagenicity test with cultured mammalian cells (V-79 cells): no mutagenicity shown by the increase in 6-thioguanine resistant mutants was observed at levels from 63-499  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of fleroxacin for 3 h in the absence and presence of S-9.
4. Chromosomal aberration test with cultured mammalian cells (CHL cells): the chromosomal aberrations of cells treated with 50-400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of fleroxacin for 24 or 48 h were not significantly different from those of untreated cells. In the presence of S-9, negative results were also obtained from cells treated with the same levels of fleroxacin for 3 h.
5. Micronucleus test with mice: male and female ICR-mice were given a single oral dose of fleroxacin from 1000-4000 mg/kg. No statistically significant differences in the frequency of micronuclei 24 h after administration were found between fleroxacin and control groups.

In the rec-assay, fleroxacin caused DNA damage to *B. subtilis*, but mutagenicity nor clastogenicity were neither observed in bacteria, mammalian cells or mice.