

【原著・基礎】

Garenoxacin の遺伝毒性試験

守田 禎一¹⁾・望月 清一¹⁾・能島 康幸¹⁾・荒木 春美²⁾
鬼頭 暢子¹⁾・中嶋 圓³⁾・三善 隆広¹⁾・藤堂 洋三¹⁾

¹⁾ 富山化学工業株式会社総合研究所*

²⁾ 同 クオリティーアシュアランスセンター

³⁾ 財団法人 食品農医薬品安全性評価センター

(平成 19 年 5 月 11 日受付・平成 19 年 7 月 6 日受理)

Garenoxacin mesilate hydrate (GRNX) の遺伝毒性を検討するために、細菌を用いる復帰突然変異試験、ほ乳類培養細胞を用いる遺伝子突然変異試験、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験、マウスを用いる小核試験およびラット肝細胞を用いる *in vivo* 不定期 DNA 合成試験を実施し、以下の結果を得た。

- ①細菌を用いる復帰突然変異試験では、代謝活性化系 (S9 mix) の有無にかかわらず、いずれの試験菌株 (ネズミチフス菌 TA98, TA100, TA1535 および TA1537 株ならびに大腸菌 WP2*uvrA* 株) でも復帰変異コロニー数の増加はみられなかった。
- ②ほ乳類培養細胞 (V79 細胞) を用いる遺伝子突然変異試験では、S9 mix の有無にかかわらず、6-チオグアニン抵抗性突然変異体コロニーの出現頻度は増加しなかった。
- ③ほ乳類培養細胞 (CHL/IU 細胞) を用いる染色体異常試験では、S9 mix の非存在下および存在下で染色体異常を有する細胞の出現率が増加した。
- ④マウスを用いる小核試験では、骨髓細胞における小核出現頻度は増加しなかった。
- ⑤ラット肝細胞を用いる *in vivo* 不定期 DNA 合成試験では、ネット核グレイン数および修復細胞数は増加しなかった。

以上のように、GRNX は、ほ乳類培養細胞に対してトポイソメラーゼ阻害に関連すると考えられる染色体異常誘発作用を示したが、*in vivo* で染色体異常誘発性を調べるマウス小核試験では陰性であった。また、その他の *in vitro* および *in vivo* の試験でも陰性の結果が得られたことから、GRNX が生体内で遺伝毒性を示す懸念は低いと考えられた。

Key words: garenoxacin, des-fluoro(6)-quinolone, genotoxicity

Garenoxacin mesilate hydrate (GRNX) は富山化学工業株式会社で創製された新規な des-F(6)-quinolone 系抗菌薬である。GRNX には従来のフルオロキノロン系抗菌薬に必須とされていた 6 位フッ素置換基がなく、同系抗菌薬とは異なった新規な化学構造を有している。GRNX は広範な抗菌スペクトルを有しており、非定型菌を含む呼吸器感染症の多くの起因菌に優れた抗菌活性を示すとともに、グラム陽性菌に対して従来のフルオロキノロン系抗菌薬よりも強い活性を保有することが報告されている^{1,2)}。今回、GRNX の遺伝毒性を検討する目的で、細菌を用いる復帰突然変異試験、ほ乳類培養細胞を用いる遺伝子突然変異試験および染色体異常試験、マウスを用いる小核試験ならびにラット肝細胞を用いる *in vivo* 不定期 DNA 合成試験を実施したので報告する。

I. 材料と方法

1. 被験物質

GRNX は富山化学工業株式会社合成品を用いた。なお、細菌および細胞の処理濃度ならびに動物の投与量については、すべて活性本体で換算して表記した。

2. 細菌を用いる復帰突然変異試験

1) 対照物質

陽性対照物質として 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド (AF-2: 和光純薬工業)、アジ化ナトリウム (NaN₃: ナカライテスク)、9-アミノアクリジン塩酸塩一水和物 (9-AA: ナカライテスク) および 2-アミノアントラセン (2-AA: 和光純薬工業) を用いた。陰性対照物質としてジメチルスルホキシド (DMSO: 同仁化学) を用いた。

*富山県富山市下奥井 2-4-1

2) 試験菌株

日本バイオアッセイ研究センターより分与されたネズミチフス菌の TA98, TA100, TA1535 および TA1537 株ならびに大腸菌の WP2*uvrA* 株を使用した。

3) 代謝活性化系

ラット肝ホモジネート S9 分画 (オリエンタル酵母工業) およびコファクター I (オリエンタル酵母工業) を用いて代謝活性化系 (S9 mix) を調製した。

4) 用量設定試験

GRNX の処理濃度を 0.234 ng/plate~3,937 $\mu\text{g}/\text{plate}$ に設定し、用量設定試験を実施した。その結果、S9 mix の有無にかかわらず、TA100 および TA1535 株では 7.5 ng/plate 以上、TA98 および TA1537 株では 15 ng/plate 以上、WP2*uvrA* 株では 120 ng/plate 以上の処理濃度で試験菌株の生育阻害がみられた。これらの結果を基に、本試験での GRNX の処理濃度範囲を、生育阻害がみられた用量を最高用量として、S9 mix 非存在下および存在下ともに 0.234~120 ng/plate に設定した。

5) 本試験

それぞれの試験菌株を 2.5% ニュートリエントブロス No.2 (Oxoid Limited) に接種し、37°C でネズミチフス菌株は 8 時間、大腸菌株は 6 時間振盪培養して菌懸濁液を得た。GRNX の DMSO 溶液、0.1 mol/L ナトリウムリン酸緩衝液 (pH7.4) および菌懸濁液を混合し、37°C で 20 分間振盪培養した。S9 mix 存在下での評価の場合、0.1 mol/L ナトリウムリン酸緩衝液 (pH7.4) の代わりに S9 mix を添加した。その後、ネズミチフス菌株には、L-ヒスチジン (和光純薬工業) および D-ビオチン (和光純薬工業)、大腸菌株には、L-トリプトファン (和光純薬工業) を含むソフトアガーを混和し、これらの混合液を最少グルコース寒天平板培地 (テスメディア AN 培地: オリエンタル酵母工業) 上に広げた。この培地を 37°C で 42 時間培養し、培地上に生育した復帰変異コロニー数を計測して陰性対照群と比較した。

復帰変異コロニー数が、陰性対照値の 2 倍以上に増加し、かつ被験物質の用量に依存して増加する場合に復帰突然変異誘発性が陽性と判定した。

3. ほ乳類培養細胞を用いる遺伝子突然変異試験

1) 対照物質

陽性対照物質として、メタンスルホン酸メチル (MMS: アルドリッチ・ケミカル) およびジメチルニトロソアミン (DMN: 和光純薬工業) を用いた。陰性対照物質として注射用水 (大塚製薬) を用いた。

2) 使用細胞および培養条件

大日本製薬より購入し、富山化学工業株式会社総合研究所で継代培養したチャイニーズハムスター肺由来線維芽細胞 (V79 細胞) を試験に使用した。V79 細胞は、10% 牛胎児血清 (GIBCO BRL) および 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ペニシリン・ストレプトマイシン (GIBCO BRL) を含むダルベッ

コ変法イーグル培地 (日水製薬) を用いて培養した。培養は 37°C、5% 二酸化炭素を通気した炭酸ガス培養器 (CPD-170W: ヒラサワ) で行った。

3) 代謝活性化系

染色体異常試験用 S9/コファクター C セット (オリエンタル酵母工業) を用い、S9 mix を調製した。

4) 用量設定試験

GRNX の処理濃度範囲を 63~2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に設定して用量設定試験を実施した。その結果、S9 mix 非存在下では 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の処理濃度で、S9 mix 存在下では 2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において細胞の相対生存率の低下がみられた。また 2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では培地中に被験物質の沈殿が観察された。これらの結果を基に、本試験における GRNX の処理濃度範囲を、S9 mix 非存在下では 296~1,500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に、S9 mix 存在下では 356~1,800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に設定した。

5) 本試験

シャーレあたり 4×10^5 個の V79 細胞を播種し、一晚培養した後、GRNX の水溶液を培地に添加した。S9 mix 存在下の評価では、GRNX 水溶液とともに S9 mix を培地に加えた。その後、3 時間培養して細胞数を測定した。この一部を培地に播種し、被験物質処理後に生育するコロニー数を測定した。残りの細胞を 6-チオグアニン (6-TG: シグマ・ケミカル) を添加した培地に播種し、6 日間の発現期間 (突然変異体の出現に要する期間) の後に 6-TG 抵抗性の突然変異体のコロニー数を測定した。同時に、6-TG を含まない培地で、発現期間後に生育するコロニー数を求めた。

被験物質処理後のコロニー形成率 (PE0)、被験物質処理後の相対生存率 (RS0)、発現期間後のコロニー形成率 (PE6)、生細胞 10^6 個あたりの 6-TG 抵抗性突然変異体コロニーの出現頻度 (MF) および突然変異誘発率 (Inductivity) を以下の計算式により算出した。

$$PE0 (\%) = (\text{被験物質処理後に生育するコロニー数}) / 200 \times 100$$

$$RS0 (\%) = (\text{被験物質処理群の PE0}) / (\text{陰性対照群の PE0}) \times 100$$

$$PE6 (\%) = (\text{発現期間後に生育するコロニー数}) / 200 \times 100$$

$$MF = (6\text{-TG 抵抗性突然変異体コロニー数}) \times [10^6 / (3 \times 10^5)] \times (100 / PE6)$$

$$\text{Inductivity} = (\text{被験物質処理群の MF}) / (\text{陰性対照群の MF})$$

Gene-Tox Program³⁾ および Rajah ら⁴⁾ の方法を参考に、MF が陰性対照群の 3 倍以上に増加する場合に遺伝子突然変異誘発性が陽性と判定した。

4. ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

1) 対照物質

陽性対照物質として、マイトマイシン C (MMC: 協和

発酵工業)およびシクロホスファミド(CP:塩野義製薬)を用いた。陰性対照物質として注射用蒸留水(大塚製薬)を用いた。

2) 使用細胞および培養条件

試験には大日本製薬より購入し、富山化学工業株式会社総合研究所で継代培養したチャイニーズハムスター肺由来線維芽細胞(CHL/IU細胞)を使用した。培養は、2 mmol/L L-グルタミン、0.1% 炭酸水素ナトリウムおよび10% 牛胎児血清(GIBCO BRL)を含むイーグルMEM培地(日水製薬)を用い、37°C、5% 二酸化炭素を通気した炭酸ガス培養器(CPD-170W:ヒラサワ)で行った。

3) 代謝活性化系の調製

染色体異常試験用S9/コファクターCセット(オリエンタル酵母工業)を用い、S9 mixを調製した。

4) 細胞増殖抑制試験(用量設定試験)

本試験におけるGRNXの処理濃度を決定する目的で細胞増殖抑制試験を実施した。その結果、GRNXのCHL/IU細胞に対する50%細胞増殖抑制濃度(IC₅₀)は、S9 mix非存在下6時間処理で456 μg/mL、24時間処理で171 μg/mLおよび48時間処理で64 μg/mLであった。また、S9 mix存在下6時間処理で678 μg/mLであった。これらの結果を基に、本試験でのGRNXの処理濃度を、IC₅₀値付近の処理濃度を最高用量とする濃度範囲として、S9 mix非存在下6時間処理で62.5~500 μg/mL、24時間処理で25~200 μg/mL、48時間処理で8.8~70 μg/mLに設定した。また、S9 mix存在下6時間処理で87.5~700 μg/mLに設定した。

5) 本試験

シャーレあたり4×10³個のCHL/IU細胞を播種し、3日間の前培養を行った。S9 mix非存在下24および48時間処理では、GRNXの水溶液を培地に添加して24および48時間培養した。S9 mix非存在下6時間処理では、GRNXの水溶液を添加し、6時間培養した後に培地を交換し、さらに18時間培養した。S9 mix存在下6時間処理では、GRNX水溶液とともにS9 mixを加えた。

各処理群とも培養終了2時間前にコルセミド(和光純薬工業)を培地に添加(終濃度0.1 μg/mL)した。培養終了後、トリプシン溶液を用いて細胞を剥離し、低張処理後に固定液(メタノール3容:酢酸1容)で固定した。その一部をスライドガラスに滴下し、風乾の後にギムザ染色を施した。染色体標本の観察は、各処理群あたり200個の分裂中期像について行い、染色体の構造異常および数異常を調べた。染色体異常をもつ細胞を異常細胞として計数し、各処理群あたりの異常細胞の出現率を算出した。

染色体異常を有する細胞数について、GRNX処理群と陰性対照群の間でFISHERの直接確率計算法による有意差検定を実施し、統計学的に有意な高値がみられる場合に染色体異常誘発性が陽性と判定した。

5. マウスを用いる小核試験

1) 対照物質

陽性対照物質としてCP(塩野義製薬)を、陰性対照物質としてメチルセルロース(MC:和光純薬工業)を使用した。

2) 使用動物

日本チャールスリバーからICR系マウス(雄性、4週齢)を購入し、4週間の検疫・馴化期間の後に試験に使用した。

3) 用量設定試験

本試験の投与量を設定するために、マウスにGRNXを125、250、500および1,000 mg/kg単回腹腔内投与し、一般状態、体重ならびに投与後24、48および72時間の小核を有する多染性赤血球(MNPCE)の出現頻度を調べた。その結果、1,000 mg/kgを投与した全動物が投与翌日に死亡した。また、500 mg/kgにおける投与後24、48および72時間のMNPCEの出現頻度に差はみられなかった。これらの結果を基に、500 mg/kgを本試験の最高投与量とし、以下、250、125および62.5 mg/kg群を設定した。また、骨髓標本の作製時期は投与後24時間とした。

4) 本試験

GRNXをMCの0.5%水溶液に懸濁し、マウスに腹腔内投与した。投与後24時間に、マウスから大腿骨を採取し、常法⁵⁾に従い骨髓塗抹標本を作製した。1個体あたり2,000個の多染性赤血球(PCE)を観察し、そのなかのMNPCE数を計測した。同時に、PCEの全赤血球に対する比率を求めた。

MNPCE頻度についてKastenbaumらの表⁶⁾に基づく二項検定を実施した。その結果、陰性対照群と比較して統計学的に有意な高値がみられる場合に、マウス骨髓細胞に対する小核誘発能は陽性と判定した。また、PCEの全赤血球に対する比率については、等分散性の検定を行った後、陰性対照群との間でAspin-welch(不等分散の場合)またはStudentのt検定(等分散の場合)を行った。

6. ラット肝細胞を用いる *in vivo* 不定期DNA合成試験

1) 対照物質

陽性対照物質として、DMN(ナカライテスク)および2-アセチルアミノフルオレン(2AAF:ナカライテスク)を、陰性対照物質としてMC(信越化学工業)を使用した。

2) 使用動物

日本チャールスリバー株式会社からSD系ラット(雄性、7週齢)を購入し、9日間の検疫・馴化期間の後に試験に使用した。

3) 用量設定

GRNXのラットにおける単回経口投与毒性試験では、技術的に投与可能な最大量である2,000 mg/kgでも死亡例はみられなかったことから(未発表データ)、本試験

Table 1. Results of bacterial reverse mutation test on garenoxacin without metabolic activation

Metabolic activation	Compound	Dose (ng/plate)	Revertant colonies/plate (Mean \pm S.D.) n = 3				
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2 _{avrA}
Without S9 mix	DMSO	0	27 \pm 3	126 \pm 9	7 \pm 3	8 \pm 1	22 \pm 4
	Garenoxacin	0.234	N.T.	131 \pm 33	9 \pm 4	N.T.	N.T.
		0.469	38 \pm 8	124 \pm 14	7 \pm 2	9 \pm 3	N.T.
		0.938	29 \pm 12	137 \pm 4	5 \pm 3	11 \pm 3	N.T.
		1.87	33 \pm 9	166 \pm 28	6 \pm 3	8 \pm 5	24 \pm 9
		3.75	32 \pm 6	158 \pm 6	5 \pm 3	9 \pm 2	28 \pm 3
		7.5	22 \pm 3	116* \pm 8	4 \pm 1	9 \pm 4	32 \pm 6
		15	10* \pm 1	19* \pm 4	3* \pm 2	13 \pm 2	29 \pm 8
		30	1* \pm 1	N.T.	N.T.	3* \pm 1	28 \pm 4
		60	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	9 \pm 3
	120	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	0* \pm 0	
	AF-2	10	N.T.	597 \pm 37	N.T.	N.T.	179 \pm 17
		100	533 \pm 32	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	NaN ₃	500	N.T.	N.T.	377 \pm 8	N.T.	N.T.
	9AA	80,000	N.T.	N.T.	N.T.	2,077 \pm 248	N.T.

* Growth inhibition.

DMSO: Dimethyl sulfoxide, AF-2: 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, NaN₃: sodium azide.

9AA: 9-aminoacridine hydrochloride monohydrate.

N.T.: Not tested.

でも 2,000 mg/kg を最高投与量とし、以下 1,000 および 500 mg/kg 群を設定した。

4) 本試験

GRNX を MC の 0.5% 水溶液に懸濁し、単回経口投与した。投与後 2 および 16 時間に、動物をネブタール麻酔下で開腹し、コラゲナーゼ溶液 (pH7.5) を用いて肝臓を灌流した。その後、シャーレ内で肝細胞を分散させ、セルストレーナー (径 40 μ m: ベクトン・デッキンソン) で濾過して単離肝細胞を回収した。これらの肝細胞をチャンバースライド (LAB-TEK 4 Chamber: ヌンク) に播種 (細胞濃度: 1×10^5 細胞/mL) して 2 時間培養後、培地を [メチル-³H] チミジン (370 kBq/mL: アマシャム) を含む Williams' E (WE) 培養液と交換して 4 時間培養し、その後、[メチル-³H] チミジンを含まない WE 培養液と交換してさらに 18 時間培養した。低張処理後に固定液 (メタノール 3 容: 酢酸 1 容) で肝細胞を固定し、スライドを写真乳剤 (NR-M2: コニカ) に浸漬後、-20°C の暗所にて 10 日間露光してオートラジオグラフを作製した。動物 1 匹あたり 150 個の肝細胞について、顕微鏡およびコロニーアナライザー (PCA-11: システムサイエンス) を用いて核グレイン数 (NG; nuclear grain) および細胞質グレイン数 (CG; cytoplasmic grain) を計数し、ネット核グレイン数 (NNG; net nuclear grain, NG から CG を引いた値) を算出した。また、修復細胞数 (NNG が 5 以上を示す細胞数) を計数した。

平均 NNG が 5 以上を示し、かつ、修復細胞の出現頻度が 20% 以上を示した場合に不定期 DNA 合成誘導能が陽性と判断した⁷⁾。

II. 結 果

1. 細菌を用いる復帰突然変異試験

試験結果を Tables 1, 2 に示す。S9 mix の非存在下および存在下で、いずれの試験菌株および用量においても GRNX 処理群の復帰変異コロニー数は陰性対照値の 2 倍未満であり、GRNX の復帰突然変異誘発性は陰性と判定した。

2. ほ乳類培養細胞を用いる遺伝子突然変異試験

試験結果を Table 3 に示す。S9 mix の非存在下および存在下で、いずれの用量においても 6-TG 抵抗性突然変異体コロニーの出現頻度 (MF) が陰性対照群の 3 倍未満であったことから、GRNX のほ乳類培養細胞に対する遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

3. ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験結果を Table 4 に示す。S9 mix 非存在下 6 時間処理の 250 μ g/mL 以上、24 時間処理の 100 μ g/mL 以上、および S9 mix 存在下 6 時間処理の 350 μ g/mL 以上で染色体構造異常を有する細胞の出現頻度が増加 ($p < 0.01$) した。以上の結果から、GRNX のほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性は、S9 mix の有無にかかわらず陽性と判定した。

4. マウスを用いる小核試験

試験結果を Table 5 に示す。いずれの投与群でも MNPCE 出現頻度の増加はみられなかったことから、GRNX のマウス骨髄細胞に対する小核誘発性は陰性と判定した。PCE 比率については、500 mg/kg 群において統計学的に有意な低値 ($P < 0.05$) がみられたが、陰性対照値の背景データの範囲内の変動であった。

Table 2. Result of bacterial reverse mutation test on garenoxacin with metabolic activation

Metabolic activation	Compound	Dose (ng/plate)	Revertant colonies/plate (Mean \pm S.D.) n = 3					
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2uvrA	
With S9 mix	DMSO	0	37 \pm 9	149 \pm 7	8 \pm 5	10 \pm 3	22 \pm 3	
		Garenoxacin	0.234	N.T.	216 \pm 6	9 \pm 1	N.T.	N.T.
		0.469	35 \pm 7	224 \pm 8	8 \pm 4	9 \pm 7	N.T.	
		0.938	37 \pm 4	233 \pm 18	5 \pm 2	10 \pm 4	N.T.	
		1.87	40 \pm 5	233 \pm 18	6 \pm 2	13 \pm 5	27 \pm 6	
		3.75	40 \pm 3	155 \pm 10	7 \pm 3	10 \pm 1	33 \pm 1	
		7.5	35 \pm 4	83* \pm 9	4 \pm 2	10 \pm 3	33 \pm 8	
		15	10* \pm 4	35* \pm 2	2* \pm 2	9 \pm 2	40 \pm 3	
		30	2* \pm 2	N.T.	N.T.	2* \pm 1	32 \pm 6	
		60	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	15 \pm 7	
		120	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	2* \pm 2	
		2AA	500	365 \pm 10	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
			1,000	N.T.	797 \pm 14	N.T.	N.T.	N.T.
			2,000	N.T.	N.T.	241 \pm 17	151 \pm 7	N.T.
			10,000	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	814 \pm 56

* Growth inhibition.

DMSO: Dimethyl sulfoxide, 2AA: 2-aminoanthracene.

N.T.: Not tested.

Table 3. Result of gene mutation test on garenoxacin in V79 cells

Metabolic activation	Compound	Dose (μ g/mL)	PE0 (%)	RS0 (%)	PE6 (%)	MF ($\times 10^{-6}$)	Inductivity
Without S9 mix	H ₂ O	0	97.2	100	92.2	25.2	1.0
	Garenoxacin	296	75.8	78.0	85.8	25.0	1.0
		444	70.3	72.3	88.7	20.6	0.8
		667	85.1	87.6	83.3	18.1	0.7
		1,000	42.6	43.8	66.0	48.9	1.9
		1,500*	0.0	0.0	cytotoxic	cytotoxic	cytotoxic
	MMS	30	91.3	93.9	83.0	90.8	3.6
60		30.9	31.8	80.1	173.9	6.9	
With S9 mix	H ₂ O	0	84.9	100	88.3	17.9	1.0
	Garenoxacin	356	77.3	91.0	78.1	29.1	1.6
		533	70.8	83.4	82.0	31.9	1.8
		800	76.9	90.6	79.3	20.7	1.2
		1,200	26.0	30.6	74.3	27.2	1.5
		1,800*	0.0	0.0	cytotoxic	cytotoxic	cytotoxic
	DMN	100	81.8	96.4	79.6	86.9	4.8

* Precipitation.

MMS: Methyl methanesulfonate, DMN: dimethylnitrosamine.

PE0: Plating efficiency at the treatment with compound, RS0: relative survival, PE6: plating efficiency after expression period.

MF: Mutation frequency.

5. ラット肝細胞を用いる *in vivo* 不定期 DNA 合成試験

試験結果を Table 6 に示す。2 時間処理および 16 時間処理のいずれにおいても、1,000 および 2,000 mg/kg 群の NNG 数は 5 未満、修復細胞の出現頻度は 20% 未満であったことから、GRNX のラット肝細胞に対する *in vivo* 不定期 DNA 合成誘導能は陰性と判定した。

III. 考 察

GRNX の遺伝毒性を調べる目的で、細菌を用いる復帰

突然変異試験、ほ乳類培養細胞を用いる遺伝子突然変異試験、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験、マウスを用いる小核試験およびラット肝細胞を用いる *in vivo* 不定期 DNA 合成試験を実施した。

GRNX は強い抗菌活性を示すため、細菌を用いる復帰突然変異試験では試験菌株を高濃度で処理することができなかつた。しかし、生育阻害がみられない濃度 (0.234~120 ng/plate) では、S9 mix の有無にかかわらず GRNX は復帰突然変異を誘発しなかつた。強い抗菌活性を示す

Table 4. Result of chromosomal aberration test on garenoxacin in CHL/IU cells

Metabolic activation	Duration of treatment	Compound	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Cells with chromosome aberrations (%)	
				Structural aberrations	Polyploid cells
Without S9 mix	6 hours	H ₂ O	0	0.5	0.0
		Garenoxacin	62.5	0.0	0.0
			125	0.0	0.5
			250	6.0 **	0.5
			500	17.5 **	3.5 **
	CP	12	1.0	0.0	
	24 hours	H ₂ O	0	0.5	0.0
		Garenoxacin	25	0.0	0.0
			50	0.5	1.0
			100	11.5 **	1.0
			200	96.5 **	0.0
	MMC	0.04	51.0 **	0.0	
	48 hours	H ₂ O	0	0.5	0.0
		Garenoxacin	8.8	0.0	0.0
			17.5	1.0	0.0
			35	0.0	0.0
70			0.5	0.0	
MMC	0.04	66.0 **	1.0		
With S9 mix	6 hours	H ₂ O	0	0.5	0.0
		Garenoxacin	87.5	1.5	0.0
			175	0.0	0.0
			350	5.5 **	2.0
			700	12.5 **	3.0
CP	12	66.0 **	0.0		

MMC: Mitomycin C, CP: cyclophosphamide.

Significant difference from control: **, $p < 0.01$ (Fisher's exact test).

Table 5. Result of micronucleus test on garenoxacin in mice

Compound	Dose (mg/kg)	Number of animals	Frequency of MNPCE ^a (%)	Ratio of PCE ^b (%)
MC (0.5% solution)	0	6	0.22 \pm 0.06	51.2 \pm 6.9
Garenoxacin	62.5	6	0.25 \pm 0.12	46.6 \pm 5.1
	125	6	0.15 \pm 0.03	46.1 \pm 4.2
	250	6	0.16 \pm 0.07	45.5 \pm 5.2
	500	6	0.14 \pm 0.05	44.8 \pm 5.2 [#]
CP	50	6	7.73 \pm 1.07**	29.9 \pm 6.5 [#]

MC: Methyl cellulose, CP: cyclophosphamide.

MNPCE: Micronucleated polychromatic erythrocytes, PCE: polychromatic erythrocytes.

^a Percentage of MNPCE per 2,000 PCE. ^b Percentage of PCE per 200 erythrocytes.

Significant difference from control: **, $p < 0.01$ (Conditional binomial test using Kastenbaum and Bowman's table).

Significant difference from control: #, $p < 0.05$; ##, $p < 0.01$ (t-test).

化合物については、細菌を用いる試験では十分な遺伝毒性情報が得られないことから、ほ乳類培養細胞を用いる遺伝子突然変異試験を実施することが推奨されている⁸⁾。GRNX については、V79 細胞を用いて遺伝子突然変異誘発性を検討した。その結果、GRNX は S9 mix 非存在下および存在下のいずれにおいても 6-TG 抵抗性突然変異体コロニーの出現頻度を増加させなかった。したがって、GRNX はほ乳類培養細胞に対して遺伝子突然変異誘発性を示さないと考えられた。

ほ乳類培養細胞 (CHL/IU 細胞) を用いる染色体異常試験の結果、GRNX はヒトに GRNX の 400 mg を 7 日間反復経口投与した時の最高血漿中濃度 (C_{max}) 11.06 $\mu\text{g/mL}$ (未発表データ) の約 9 倍の濃度である 100 $\mu\text{g/mL}$ 以上で染色体異常を誘発したが、約 4.5 倍濃度の 50 $\mu\text{g/mL}$ では染色体異常誘発性は示さなかった。マウス小核試験では、投与可能な最大量である 500 mg/kg まで小核の誘発はみられず、その時の C_{max} はヒト臨床使用での C_{max} の約 6.3 倍濃度の 69.2 $\mu\text{g/mL}$ であった (未発表

Table 6. Result of *in vivo* unscheduled DNA synthesis test on garenoxacin in rat hepatocytes

Duration of treatment	Compound	Dose (mg/kg)	Number of animals	Nuclear grains	Cytoplasmic grains	Net nuclear grains	Cells in repair* (%)
2 hours	MC (0.5% solution)	0	3	6.7 ± 0.4	7.8 ± 0.2	-1.1 ± 0.3	0.4 ± 0.4
	Garenoxacin	1,000	3	6.5 ± 0.7	7.9 ± 0.9	-1.4 ± 1.0	1.8 ± 0.8
		2,000	3	7.1 ± 0.5	8.7 ± 1.6	-1.6 ± 1.2	2.9 ± 0.8
	DMN	5	3	34.6 ± 0.9	6.3 ± 1.2	28.3 ± 1.9	99.6 ± 0.8
16 hours	MC (0.5% solution)	0	3	6.8 ± 0.7	8.3 ± 1.3	-1.4 ± 0.8	0.7 ± 0.7
	Garenoxacin	1,000	3	5.7 ± 0.4	5.9 ± 0.4	-0.2 ± 0.2	1.8 ± 0.4
		2,000	3	6.6 ± 1.0	7.0 ± 1.6	-0.4 ± 1.0	3.3 ± 1.2
	2AAF	100	3	36.3 ± 0.9	5.6 ± 0.3	30.7 ± 1.1	100.0 ± 0.0

MC: Methyl cellulose, DMN: dimethylnitrosamine, 2AAF: 2-acetylaminofluorene.

* Percent of cells having 5 or greater net nuclear grains.

データ)。以上のことから、GRNXは生体内で遺伝毒性を示す可能性は低いと考えられた。

多くのフルオロキノロン系合成抗菌薬が *in vitro* において染色体異常を誘発する⁹⁾ことが報告されている。フルオロキノロン系合成抗菌薬の染色体異常誘発機序については、DNAに対する直接的な作用に基づくものではなく、抗菌作用に関連するトポイソメラーゼの阻害作用を介したものであると考えられている^{10,11)}。GRNXの抗菌活性はトポイソメラーゼ阻害に基づくものである¹²⁾ことから、GRNXの *in vitro* における染色体異常誘発性は、フルオロキノロン系合成抗菌薬と同様にトポイソメラーゼ阻害に関連する二次的な作用に基づくものと考えられる。なお、GRNXの細菌およびヒト由来のトポイソメラーゼ阻害活性を調べた結果、その選択比はフルオロキノロン系抗菌薬のシプロフロキサシンよりも約10~46倍大きいことが報告されている(未発表データ)。

以上、GRNXは *in vitro* においてトポイソメラーゼ阻害に基づくと考えられる染色体異常誘発性を示すが、*in vivo* で染色体異常誘発性を調べるマウス小核試験では陰性であったこと、また、その他の *in vitro* および *in vivo* の試験ではいずれも陰性の結果が得られたことから、GRNXが生体内で遺伝毒性を示す懸念は低いと考えられる。

文 献

- 1) Takahata M, Mitsuyama J, Yamashiro Y, Yonezawa M, Araki H, Todo Y, et al: *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activities of T-3811 ME, a novel des-F(6)-quinolone. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1077-84
- 2) Fung-Tomc J C, Minassian B, Kolek B, Huczko E, Aleksunes L, Stickle T, et al: Antibacterial spectrum of a novel des-fluoro(6) quinolone, BMS-284756. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 3351-6
- 3) Bradley M O, Bhuyan B, Francis M C, Langenbach R, Peterson A, Huberman E: Mutagenesis by chemical agents in V79 chinese hamster cells: a review and analysis of the literature. A report of the Gene-Tox Program. *Mutat Res* 1981; 87: 81-142
- 4) Rajah T T, Pento J T: The mutagenic potential of antiestrogens at the HPRT locus in V79 cells. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1995; 89: 85-92
- 5) 林 真: 第4章 標本の作製法。小核試験 実験法からデータの評価まで, 初版, サイエントリスト社, 東京, 1991; 44-55
- 6) Kastenbaum M A, Bowman K O: Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat Res* 1970; 9: 527-49
- 7) Butterworth B E, Ashby J, Bermudez E, Casciano D, Mirsalis J, Probst G, et al: A protocol and guide for the *in vitro* rat hepatocyte DNA-repair assay. *Mutat Res* 1987; 189: 113-21
- 8) II. 細菌を用いる復帰突然変異試験。日本製薬工業協会医薬品評価委員会基礎研究部会変異原性試験検討グループ 編, 厚生省医薬品毒性試験法ガイドラインに基づく変異原性試験 Q&A, 初版, サイエントリスト社, 東京, 1992; 6-30
- 9) 前川健郎, 井上喜雅, 田口雅裕: キノロン系合成抗菌薬の染色体異常誘発性。変異原性試験 1993; 2: 154-61
- 10) Shimada H, Itoh S, Hattori C, Tada S, Matsuura Y: Mutagenicity of the new quinolone antibacterial agent levofloxacin. *Arzneimittelforschung* 1992; 43: 378-85
- 11) Shimada H, Itoh S: Effects of new quinolone antibacterial agents on mammalian chromosomes. *J Toxicol Environ Health* 1996; 47: 115-23
- 12) Ince D, Zhang X, Silver L C, Hooper D C: Dual targeting of DNA gyrase and topoisomerase IV: target interactions of garenoxacin (BMS-284756, T-3811ME), a new desfluoroquinolone. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 3370-80

Genotoxicity study of garenoxacin

Teiichi Morita¹⁾, Seiichi Mochizuki¹⁾, Yasuyuki Nojima¹⁾, Harumi Araki²⁾,
Nobuko Kito¹⁾, Madoka Nakajima³⁾, Takahiro Sanzen¹⁾ and Yozo Todo¹⁾

¹⁾ Research Laboratories, Toyama Chemical Co., Ltd., 2-4-1 Shimookui, Toyama, Japan

²⁾ Quality Assurance Center, Toyama Chemical Co., Ltd.

³⁾ Biosafety Research Center, Foods, Drugs and Pesticides

A bacterial reverse mutation test, a gene mutation test in mammalian cultured cells, a chromosome aberration test in mammalian cultured cells, a micronucleus test in mice, and an *in vivo* unscheduled DNA synthesis test in rat hepatocytes were conducted to investigate the genotoxicity of garenoxacin mesilate hydrate (GRNX).

1. In the bacterial reverse mutation test, GRNX did not show mutagenic activity against tester strains (*Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537, and *Escherichia coli* WP2*uvrA*) in the absence and presence of metabolic activation (S9 mix).

2. In the gene mutation test with cultured mammalian cells (V79 cells), no increase in 6-thioguanine-resistant mutant colonies was observed in the absence and presence of the S9 mix.

3. In the chromosomal aberration test with cultured mammalian cells (CHL/IU cells), increases in the frequency of cells with chromosomal aberration were observed in the absence and presence of the S9 mix.

4. In the micronucleus test in mice, no increase was observed in the frequency of micronuclei.

5. In the *in vivo* unscheduled DNA synthesis test in rat hepatocytes, no increase of the number was observed with net nuclear grain and repair cells.

These results indicated that GRNX showed mutagenic activity against cultured mammalian cells based on its topoisomerase inhibitory activity, but not in the mice micronucleus test or other *in vitro* and *in vivo* studies. The GRNX is thus not considered to show the mutagenic activity *in vivo*.