

キノロン系抗菌剤の哺乳動物に対する
遺伝毒性・発癌性に関する研究

伊 藤 格

【 目 次 】

序 論	-----	3
第 1 章 キノロン剤の <i>in vitro</i> 遺伝毒性の検討	-----	5
緒言	-----	6
材料及び方法	-----	8
結果	-----	12
考察	-----	15
小括	-----	18
第 2 章 キノロン剤の <i>in vivo</i> 肝イニシエーション活性の検討	-----	19
緒言	-----	20
材料及び方法	-----	21
結果	-----	24
考察	-----	25
小括	-----	28
第 3 章 ノルフロキサシン (NFLX) の肝腫瘍誘発性の検討	-----	29
緒言	-----	30
材料及び方法	-----	31
結果	-----	34
考察	-----	36
小括	-----	39
結 論	-----	40
謝 辞	-----	42
参考文献	-----	43
要 旨	-----	49
Abstract	-----	52
図 表	-----	56

序 論

キノロン系抗菌剤(キノロン剤)は, DNA gyrase 及び topoisomerase IV の活性を阻害し, 細菌の DNA 合成を阻害する合成抗菌剤であり, 医薬品あるいは動物用医薬品として広く用いられている。一方, 哺乳動物においても DNA gyrase の機能に類似する topoisomerase II が存在し, キノロン系抗菌剤は topoisomerase II も阻害することが報告されている[1]。キノロン剤は, オールドキノロン剤と, ノルフロキサシン(NFLX)以降に合成された塩基性環の6位にフッ素, 7位に環状塩基性基を有するニューキノロン剤に分類される。ニューキノロン剤はオールドキノロン剤と比較して, 細菌の DNA gyrase と真核細胞の topoisomerase II 阻害能の比, すなわち選択毒性が高く[17], 安全性が高いと考えられてきた。topoisomerase II 阻害剤は, topoisomerase II の DNA を切断及び再結合する作用を阻害することにより, DNA の一本鎖切断(SSBs)及び二本鎖切断(DSBs)を生じることが報告されている[7]。したがって, キノロン剤は遺伝毒性及び発癌性を有する可能性がある。これまでに, いくつかのキノロン剤において, 哺乳動物に対する遺伝毒性及び発癌性を示唆する研究が報告されてきた。ナリジクス酸(NA)[6], ピペミド酸(PPA)[19], オキシリン酸(OA)[6], フルメキン(FL)[17], オフロキサシン(OFLX)[2, 6], シプロフロキサシン(CPFX)[2, 6, 23], NFLX[6, 29], レボフロキサシン[34], 及びロメフロキサシン[35]では, 真核細胞における遺伝毒性試験で陽性結果が報告されている。さらに NA[22], OA[42], 及び FL[41]では, げっ歯類に対する発癌性が報告されている。しかしながら, キノロン剤はヒトの臨床領域での使用期間が短期間であることから, 承認申請時に発癌性試験のデータは, 要求されていない。一方, 感染症対策のためにキノロン剤を投与された畜産動物を材料とした食品中にキノロン剤が残

留していた場合，それを摂取した消費者は，慢性的にキノロン剤に曝露されることになり，近年その危険性が注目されている。

上述したように，いくつかのキノロン剤は真核細胞において遺伝毒性が示されている。しかしながら，ニューキノロン剤は主に医薬品として，オールドキノロン剤は主に動物用医薬品として広く用いられている。したがって，ニューキノロン剤及びオールドキノロン剤の遺伝毒性及び発癌性の有無を明らかにする必要がある。そこで，本研究ではニューキノロン剤及びオールドキノロン剤の哺乳動物に対する遺伝毒性の有無，さらにその遺伝毒性が腫瘍を誘発するか否かを検討した。まず，第1章では，キノロン剤の *in vitro* 遺伝毒性の有無について検索した。第2章では，キノロン剤の *in vivo* 肝イニシエーション活性の有無について検索し，第1章で検索されたキノロン剤の *in vitro* 遺伝毒性が，*in vivo* で発癌イニシエーションに導かれるか否かを検討した。第3章では，第2章で検索された NFLX の *in vivo* 肝イニシエーション活性が，肝腫瘍を誘発するか否かを検索し，ヒトへの発癌リスクの可能性について考察を加えた。

第 1 章

キノロン剤の *in vitro* 遺伝毒性の検討

緒 言

キノロン剤の遺伝毒性は、キノロン剤と DNA の化学反応による DNA 付加体の形成によるものか、DNA 合成の酵素的阻害による DNA 鎖切断によるものかを明らかにする必要がある。しかしながら、キノロン剤の遺伝毒性メカニズムは未だ明らかにされていない。single-cell gel electrophoresis assay (コメットアッセイ) は、電気泳動の条件が pH 12.1 では DNA 鎖切断を、pH > 13 では DNA 鎖切断及びアルカリ脆弱部位を検出可能である[20]。したがって、コメットアッセイは、DNA 損傷を DNA 鎖切断か否かを明確にできるため、この目的に適している。そこで本章では、まず 4 種類のオールドキノロン剤 [NA , PPA , OA , 及びピロミド酸 (PA)] 及び 4 種類のニューキノロン剤 [エノキサシン (ENX) , OFLX , CPEX , 及び NFLX] に対して *in vitro* コメットアッセイを実施し、キノロン剤による DNA 損傷を検索した。

化学物質の発癌性の有無を考察する際、コメットアッセイで検出された DNA 損傷が、修復されるのか、あるいは染色体異常となるのか、あるいは細胞死へとつながるのかを明らかにする必要がある。DSBs は染色体異常を形成する初期の損傷であることが報告されている[14]。しかしながら、多くの化学発癌物質は DSBs を直接的には生じず、他の DNA 損傷を生じ、その損傷が、DNA の修復や合成過程において DSBs となり、染色体異常となる。ところで、ミクロフィラメントの合成阻害物質である cytochalasin B を用いて、細胞質分裂を阻害することにより、化学物質の処理後に分裂期を経た細胞か否かを区別することが可能であり、*in vitro* 小核試験は、染色体異常の形成の有無を検出する正確で効率的な方法である[5]。したがって、コメットアッセイは DNA 損傷がその後どうなるかを示すことができないが、小核試験と組み合わせることにより、DNA 損傷が染

色体異常となるか否かを示すことが可能となる。そこで本章では，キノロン剤によって生じた，コメットアッセイで検出された DNA 損傷が，小核を形成するか否かを検討した。

材 料 及 び 方 法

化学物質

NA 及び OA は和光純薬工業から，PPA，OFLX，及び NFLX はシグマ アルドリッチ ジャパンから，PA，ENX，及び CPFEX は MP Biochemicals Inc.から購入した。8 剤のキノロン剤はそれぞれ，和光純薬工業から購入した DMSO に，最終濃度の 200 倍の濃度で溶解あるいは懸濁した。

細胞及び培地

WTK-1 細胞は，p53 の遺伝子に変異を持つヒトリンパ腫由来の細胞であり[9]，遺伝毒性の感受性が高く，ヒト由来の細胞であるためヒトへの外挿性が高いと考えられるため，本実験に用いた。10%でウシ胎児血清を含み，200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ でピルビン酸ナトリウム及び 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ でストレプトマイシンを添加した RPMI1640 培地で，37°C，5%CO₂ 条件下で 2 日間培養後用いた。

処理

8 剤のキノロン剤は，それぞれ 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では，キノロン剤と考えられる沈渣が認められたため，コメットアッセイの最高濃度を 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とした。処理に際して，細胞を遠心分離し， 5×10^5 細胞/ml の濃度に懸濁した。20 ml の培地中の 1×10^7 細胞を 10 cm の培養皿に移し，それぞれのキノロン剤を添加し，2，4，及び 20 時間培養した。それぞれの処理時間後，コメットアッセイ (pH > 13) を実施した。また，20 時間処理直後の細胞を用いて，トリパンブルー染色により生存率が 70%以上であることを確認した。

次に，NA，PPA，CPFEX，及び NFLX の 4 剤のキノロン剤について，20 時間

処理後，キノロン剤が添加されていない培地で 2 回洗浄後培養し，回復期間とした。0，2，4，24 時間回復期間後，コメットアッセイ（pH > 13）及びハロアッセイを実施した。また，20 時間処理直後の細胞を用いて，小核試験を実施した。

さらに，CPFEX 及び NFLX の 2 剤のキノロン剤について，20 時間の処理後，コメットアッセイ（pH 10 及び pH 12.1）を実施した。

コメットアッセイ，ハロアッセイ，及び小核試験は，結果の再現性を確認するため，各 3 回実験を実施した。

コメットアッセイ

処理した細胞をスライドグラス上で，生理食塩水で 1%の濃度に溶解したアガロース GP42（ナカライテスク）に包埋した。このスライドを氷冷した核溶解液（2.5M NaCl，100mM Na₄EDTA，10mM Tris，1% sarkosyl，10% DMSO，1% Triton X-100，pH 10）に入れ，0°C で 1 時間以上暗所に静置した。コメットアッセイは，電気泳動の条件が pH 10 で DSBs を，pH 12.1 で DSBs 及び SSBs を，pH > 13 で DSBs，SSBs，及びアルカリ脆弱部位を検出する。

コメットアッセイ(pH 10)では，スライドを電気泳動液(300mM sodium acetate，100mM Tris，pH 10) に 0°C で 20 分暗所に静置後，0°C で 30 分暗所にて 25V (0.96V/cm)，約 100mA の条件で，電気泳動を実施した。電気泳動後，RNA を破壊するため，氷冷したアルカリ溶液(300mM NaOH，1mM Na₂EDTA，pH > 13) に 5 分静置した。

コメットアッセイ(pH 12.1 あるいは pH > 13)では，電気泳動液(300mM NaOH，1mM Na₂EDTA，pH 12.1 : HCl を用いて調整あるいは pH > 13) に 0°C で 20 分暗所に静置後，0°C で 15 分暗所にて 25V (0.96V/cm)，約 250mA の条件で電気泳

動を実施した。

電気泳動を実施した後のスライドは、中和液(400mM Tris ,pH 7.5)に静置後、50 μ L の 20 μ g/ml エチジウムブロマイドで染色した。それぞれの濃度において、各 50 細胞の核の移動長を計測し、平均の移動長を算出した。

対照試験として、bleomycin hydrochloride (BLM) を 2 時間あるいは 4-nitroquinoline N-oxide (4NQO) を 2 時間処理した WTK-1 細胞についてコメットアッセイ (pH 12.1 及び pH > 13) を実施した。

ハロアッセイ

ハロアッセイはコメットアッセイの電気泳動を省略した方法で、細胞死を検出する[8]。細胞死に至った細胞の DNA は、断片化し、強アルカリ下で細胞周囲にハロとして観察される。一方、生存率の確認に用いたトリパンブルー染色では、トリパンブルーの排出能の有無により、細胞膜の機能消失を検出する。

スライドを、アルカリ溶液 (300mM NaOH, 1mM Na₂EDTA, pH > 13) に 0°C で 20 分暗所に静置後、電気泳動を行わず、中和液 (400mM Tris, pH 7.5) に静置した。ランダムに選択した 100 細胞についてハロの有無を判定した。

小核試験

処理後、 5×10^5 細胞/ml に cytochalasin B を 3 μ g/ml で添加し、24 時間培養した。遠心分離により集めた細胞を 0.075M KCl 低張液に再懸濁し、さらに遠心分離し細胞を集め、10%で DMSO を含む 0.075M KCl 低張液中に -80°C で保存した。凍結保存した細胞懸濁液は、解析直前に融解し、細胞懸濁液を acridine orange でコートされたスライドに滴下した。Hayashi 等により報告された抹消血液を用いた *in vivo* 小核試験[11]に従い染色後、カバーガラスで封入し観察した。1000 個

の 2 核の細胞; Bi-nuclei cells(BNC)における ,小核を持った 2 核の細胞; Bi-nuclei cells with micronuclei (MNBNC) の数 , 1000 個の細胞における BNC の数を , B フィルターを装着した蛍光顕微鏡下 (600 倍) で計測した。

統計解析

コメットアッセイでは , 1 回の実験毎に , one-way ANOVA 実施後 , Dunnett 検定を用いて , 各濃度 50 細胞平均の核の移動長を , 対照と比較した。ハロアッセイでは , 1 回の実験毎に , χ^2 test を用いて , 各濃度 100 個の細胞中のハロを持つ細胞の数を , 対照と比較した。小核試験では , 1 回の実験毎に , χ^2 test を用いて , 各濃度 1000 個の BNC 中の MNBNC の数を , 対照と比較した。

コメットアッセイ , ハロアッセイ , 及び小核試験は , 結果の再現性を確認するため , 各 3 回実験を実施した。再現性が確認できた後 , 各濃度 3 回の実験で得られたデータの平均値及び標準偏差を算出し , one-way ANOVA 実施後 , Dunnett 検定を用いて , 対照と比較した。

いずれの解析結果も , 有意水準 5% 未満をもって有意な差があるとした。

結 果

コメットアッセイ

3 回の実験とも、コメットアッセイ (pH > 13) では、CPFX 及び NFLX のみが 50 細胞平均の核の移動長が、有意に、濃度依存的に、そして時間依存的に増加した。一方、他の 6 剤 (NA, PPA, OA, PA, ENX, 及び OFLX) では、50 細胞平均の核の移動長の増加は認められなかった。さらに、CPFX 及び NFLX の 20 時間処理後の回復期間においては、50 細胞平均の核の移動長の増加は消失した。したがって、コメットアッセイ (pH > 13) の結果の再現性は確認された。

コメットアッセイ (pH > 13) における、3 回の実験で得られた 50 細胞平均の核の移動長の平均値を Fig. 1-1 から 1-4 に示した。Fig. 1-1 及び 1-2 で示すように、2 時間処理後では、どのキノロン剤も核の移動長の増加は認められなかった。有意な核の移動長の増加は、CPFX 及び NFLX を 20 及び 4 時間処理後に認められた。核の移動長は処理時間の長さに比例し、20 時間処理後、有意な核の移動長の増加が認められた最低濃度は、CPFX 250 µg/ml, NFLX 125 µg/ml であった。

これらの結果を踏まえて、2 剤のニューキノロン剤 (CPFX 及び NFLX) について、回復期間におけるコメットアッセイ、ハロアッセイ、さらに小核試験を実施した。また、2 剤のオールドキノロン剤 (NA 及び PPA) を比較対照に用いた。

Fig. 1-3 及び 1-4 で示すように、4 剤の 20 時間処理後、2, 4, 及び 24 時間回復期間後において、CPFX 1000 µg/ml 濃度における 2 時間回復期間後を除いて、有意な核の移動長の増加は認められなかった。

次に、CPFX 及び NFLX を 20 時間処理した細胞に対して、コメットアッセイの核の移動長を、pH 10, pH 12.1, 及び pH > 13 で比較した。3 回の実験とも、

コメットアッセイ (pH 12.1) では, CPFX 及び NFLX を 20 時間処理後, 50 細胞平均の核の移動長が, 有意にそして濃度依存的に増加した。一方, コメットアッセイ (pH 10) では, 50 細胞平均の核の移動長の増加は認められなかった。したがって, コメットアッセイ (pH 10 及び pH 12.1) の結果の再現性は確認された。

コメットアッセイ (pH 10, pH 12.1, 及び pH > 13) における, 3 回の実験で得られた 50 細胞平均の核の移動長の平均値を Fig. 1-5 に示した。コメットアッセイ (pH 12.1, 及び pH > 13) ではともに, CPFX 及び NFLX を 20 時間処理後, 核の移動長の増加が認められ, その値はほぼ同等であった。一方, コメットアッセイ (pH 10) では, 核の移動長の増加は認められなかった。

対照試験では, BLM を 2 時間処理後のコメットアッセイ (pH 12.1, 及び pH > 13) では, ともに, 核の移動長の増加が認められた。一方, 4NQO を 2 時間処理後のコメットアッセイ (pH > 13) では, 核の移動長の増加が認められたが, コメットアッセイ (pH 12.1) では, 核の移動長の増加が認められなかった。

ハロアッセイ

3 回の実験とも, ハロアッセイでは, 4 剤のキノロン剤 (NA, PPA, CPFX, 及び NFLX) を 20 時間処理後, 2, 4, 及び 24 時間の回復期間後, 有意にそして濃度依存的に, 100 細胞中のハロを有する細胞の数が増加した。したがって, ハロアッセイの結果の再現性は確認された。

ハロアッセイにおける, 3 回の実験で得られた 100 細胞中のハロを有する細胞数の平均値を Fig. 1-3 及び 1-4 に示した。CPFX 及び NFLX を 20 時間処理直後では, ハロを有する細胞数の増加は認められないものの, CPFX では 24 時間回復期間後から, NFLX では 2 時間回復期間後から, 増加が認められた。NA 及び PPA

を 20 時間処理した細胞では , コメットアッセイの結果は陰性であったが , CPFEX と同様に 24 時間回復期間後から , 増加が認められた。

小核試験

3 回の実験とも , 小核試験では , NFLX のみが MNBNC が , 有意にそして濃度依存的に増加した。一方 , 他の 3 剤 (NA , PPA , 及び CPFEX) では , MNBNC の増加は認められなかった。したがって , 小核試験の結果の再現性は確認された。

小核試験における , 3 回の実験で得られた MNBNC 及び BNC の平均値を Fig. 1-6 に示した。NFLX では , 15.63–125 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で , MNBNC の有意な増加が認められた。一方 , 他の 3 剤 (NA , PPA , 及び CPFEX) では 125 $\mu\text{g/ml}$ 以下の濃度では , MNBNC の有意な増加は認められなかった。また 4 剤全てで , 250 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度では , BNC の明らかな減少が認められた。

考 察

コメットアッセイは、DNA 鎖切断やアルカリ脆弱部位を高感度に検出する実験方法である[4, 36]。本章では、2 剤のニューキノロン剤（CPFX 及び NFLX）が、処理直後に、コメットアッセイ（pH 12.1 及び pH > 13）で陽性結果を示した。コメットアッセイは、電気泳動の条件が pH 10 で DSBs を、pH 12.1 で DSBs 及び SSBs を、pH > 13 で DSBs, SSBs, 及びアルカリ脆弱部位を検出する。したがって、コメットアッセイで検出された NFLX 及び CPFX による DNA 損傷は、主にアルカリ脆弱部位ではなく、SSBs であると考えられる。今回の結果は、抗菌剤ではないキノロン剤が、真核細胞の topoisomerase II を阻害し、SSBs を生じたという報告[3]と一致する。対照試験では、SSBs を生じる BLM[24]では、コメットアッセイ（pH 12.1, 及び pH > 13）で陽性結果を示した。一方、DNA 付加体を生じる 4NQO[37]では、コメットアッセイ（pH > 13）で陽性結果を示したが、コメットアッセイ（pH 12.1）では陰性であった。すなわち、今回の実験の条件下では、コメットアッセイ（pH 12.1）では SSBs を、コメットアッセイ（pH > 13）では DNA 鎖切断及びアルカリ脆弱部位を検出することが確認された。CPFX 及び NFLX を 20 あるいは 4 時間処理後に、核の移動長の増加が認められたが、2 時間処理後では、核の移動長の増加は認められなかった。CPFX 及び NFLX は、DNA 複製期において、topoisomerase II を阻害し、SSBs を生じると考えられるため、2 時間処理後では、まだ陰性であったと考えられる。核の移動長の増加は、2 から 24 時間の回復期間において減少したため、CPFX 及び NFLX による SSBs は、培地から除去されると再結合することが示された。すなわち、CPFX 及び NFLX は、標的となる真核細胞の近くに存在する時に、DNA 複製を阻害することにより、SSBs を生じたと考えられる。また核の移動長の減少とともに、細胞

死が増加しているため、再結合されなかった SSBs が細胞死の引き金になっていると考えられる。

一方、他のキノロン剤では、核の移動長の増加は認められなかった。いくつかのキノロン剤の topoisomerase II 阻害能が、HeLa 細胞の topoisomerase II に対する ID50 を用いて示され[25]、CPFX 及び NFLX の真核細胞の topoisomerase II に対する阻害能が、NA 及び OFLX より強いことが報告されている。他にも、CPFX の真核細胞の topoisomerase II に対する阻害能が、NA 及び OFLX より強いこと [21]、OFLX より強いことが報告されている [1]。他の 4 剤の topoisomerase II 阻害能は不明ではあるが、キノロン剤の中には、topoisomerase II 阻害能が強く、コメットアッセイで検出される SSBs を生じる可能性がある。そして、キノロン剤の遺伝毒性には、細菌の DNA gyrase と真核細胞の topoisomerase II 阻害の比である選択毒性は影響しないと考えられる。今回の実験において、2 剤のオールドキノロン剤 (NA 及び PPA) は、コメットアッセイが陰性であるにも関わらず、細胞死が増加していた。したがって、NA 及び PPA は、DNA 複製を阻害しないのではなく、コメットアッセイの検出限界以下で、SSBs を生じていたと考えられる。

化学物質の遺伝毒性と発癌性について考察する際には、初期の DNA 損傷が、修復されるのか、あるいは染色体異常となるのか、あるいは細胞死へとつながるのかを明らかにする必要がある。Pfau 等は、コメットアッセイ及び小核試験を含む、MCL-5 細胞を用いた様々な実験方法を実施した結果、heterocyclic amines の遺伝毒性は、コメットアッセイの 2000 倍低濃度で、小核試験で検出されたことを報告した [27]。一方、lipophilic compounds の遺伝毒性が検出された最低濃度は、小核試験より、コメットアッセイの方が低濃度であったことが報告された [40]。Hartmann 等は、36 薬剤について、チャイニーズハムスター V79 細胞を用

いたコメットアッセイと小核試験で比較し、小核試験の方がコメットアッセイより感度が高いことを報告した[10]。Pfau 等の実験では、コメットアッセイでは 30 分、小核試験では 24 時間処理したように[27]、これら過去の研究では、処理条件がコメットアッセイと小核試験で異なっていた。したがって、これら過去の結果を基に、コメットアッセイで検出された初期の DNA 損傷が、どうなるのか考察することは困難である。そこで今回の実験では、コメットアッセイと小核試験の処理条件を同一とし、コメットアッセイで検出された、キノロン剤によって生じた初期の DNA 損傷が、小核を形成するか否かを明確にした。

今回の実験では、CPF_X は、BNC の明らかな減少が認められた 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上でコメットアッセイが陽性となった。したがって、250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の CPF_X による SSBs のレベルが高すぎるため、修復できずに細胞毒性につながったと考えられる。NFLX は、コメットアッセイでは 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上で陽性となり、小核試験では 15.63–125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で陽性となり、250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上では、BNC の明らかな減少が認められた。よって、250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上では、NFLX による SSBs のレベルが高すぎるため、修復できずに細胞毒性につながったと考えられる。また、125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では、NFLX による SSBs が小核を形成したと考えられる。さらに、15.63–125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では、コメットアッセイの感受性以下のレベルの、NFLX による SSBs が小核を形成したと考えられる。

以上の結果から、2 剤のニューキノロン剤 (CPF_X 及び NFLX) が、SSBs を生じており、NFLX による SSBs が染色体異常を生じていると判断された。また、CPF_X 及び NFLX による *in vitro* 遺伝毒性は、DNA 付加体を形成するのではなく、topoisomerase II を阻害することにより、DNA 複製を阻害するため生じたと考えられた。

小 括

キノロン剤の *in vitro* 遺伝毒性を検索するため、4 種類のオールドキノロン剤 (NA, PPA, OA, 及び PA) 及び 4 種類のニューキノロン剤 (ENX, OFLX, CPFX, 及び NFLX) に対して *in vitro* コメットアッセイを実施し、キノロン剤による DNA 損傷を検索した。その結果、2 剤のニューキノロン剤 (CPFX 及び NFLX) が、*in vitro* コメットアッセイ (pH 12.1 及び pH > 13) で陽性結果を示した。

次に、コメットアッセイで検出された DNA 損傷が、染色体異常を形成するかどうかを検討するため、CPFX 及び NFLX, 比較対照として NA 及び PPA に対して *in vitro* 小核試験を実施した。その結果、NFLX が陽性結果を示した。

以上の結果から、CPFX 及び NFLX が SSBs を生じており、NFLX による SSBs が染色体異常を生じていると判断された。また、CPFX 及び NFLX による *in vitro* 遺伝毒性は、DNA 付加体を形成するのではなく、topoisomerase II を阻害することにより、DNA 複製を阻害するため生じたと考えられた。

第2章

キノロン剤の *in vivo* 肝イニシエーション活性の検討

緒 言

ラット肝臓における胎盤型グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST-P)陽性細胞巣は、前腫瘍性病変であると考えられている。そして、長期発癌性試験に代わり、*in vivo* 遺伝毒性発癌物質を検出するために、GST-P 陽性細胞巣を指標とした中期発癌性試験が検討されてきた[30~33, 38]。本章で用いた *in vivo* 肝イニシエーション活性検索法では、肝臓を標的とする遺伝毒性発癌物質のみでなく、肝臓を標的としない遺伝毒性発癌物質も、GST-P 陽性細胞巣を発生することが報告されている[33]。よって、この *in vivo* 肝イニシエーション活性検索法では、長期発癌性試験の標的臓器に関わらず、遺伝毒性発癌物質を検出することが可能であると考えられている。したがって、キノロン剤による DNA 損傷の結果生じた、染色体異常や遺伝子変異が GST-P 陽性細胞巣を発生するか否かを検索するのに有効な検索法である。本章では 2 剤のオールドキノロン剤(NA 及び PPA) 及び 2 剤のニューキノロン剤(CPFX 及び NFLX) について、肝イニシエーション活性を検索した。そして、第 1 章で検索されたキノロン剤による *in vitro* 遺伝毒性が、*in vivo* で発癌イニシエーションに導かれるか否かを検討した。

材 料 及 び 方 法

供試動物

日本チャールズ・リバーから購入した雄の F344 ラットを，明暗各 12 時間，湿度 40–70%，室温 20–26°C に維持された飼育室内で，ステンレス製ケージで個別飼育した。基礎飼料は，日本クレアから購入した CA-1 を，飲料水は，水道水を自由に摂取させた。実験開始前に 1 週間の順化期間を設け，実験開始時は 7 週齢であった。

動物の取り扱いについては，東京農工大学の実験動物指針を遵守した。

化学物質

NA 及び四塩化炭素 (CCl_4) は和光純薬工業から，PPA 及び NFLX はシグマ アルドリッチ ジャパンから，CPFX は MP Biochemicals Inc. から，2-acetylaminofluorene (2-AAF) 及び 1,2-dimethylhydrazine (DMH) は東京化成工業から購入した。

NA，PPA，及び NFLX は，ナカライテスクから購入したトウモロコシ油で，CPFX は大塚製薬工場から購入した注射用水で懸濁した。4 剤の投与量を決定するため，予備実験を実施した。4 剤のインタビューフォームにおいて，各々の LD_{50} は，NA は 1160 mg/kg，PPA は > 5000 mg/kg，CPFX は > 5000 mg/kg，NFLX は > 4000mg/kg と報告されているため，NA は 1000 及び 500 mg/kg，PPA は 5000 及び 2500 mg/kg，CPFX は 5000 及び 2500 mg/kg，NFLX は 4000 及び 2000 mg/kg を，2/3 肝部分切除 (PH) 12 時間後に単回強制経口投与を実施した。その結果，NA を 1000 mg/kg 投与した群及び NFLX を 4000 mg/kg 投与した群のほぼ全例が，投与後数日で死亡した (データは示さず)。この結果より，本実験の投与量は，

NA は 750 , 375 , 187.5 mg/kg , PPA は 5000 , 2500 , 1250 mg/kg , CPFEX は 5000 , 2500 , 1250 mg/kg , NFLX は 3000 , 1500 , 750 mg/kg とした。

肝イニシエーション活性検索法

本章では , Sakai 等の方法[33]を少し変更して実施した。

各キノロン剤について実施した実験毎に , ラットに PH を実施し , 各群 8 例 (PPA 低用量群は 7 例) 4 群に群分けした。PH 実施 12 時間後に , 各キノロン剤の高用量 , 中用量 , 低用量 , あるいは媒体を単回強制経口投与した。キノロン剤の懸濁液及び媒体の投与液量は , 10ml/kg に設定した。

14 日後から , プロモーション処置として , 2-AAF を 0.015% の濃度で含む飼料 (日本クレアにて調製) を 10 日間自由に摂取させ , 混餌投与した。その間 19 日後に , CCl₄ を 0.8ml/kg で単回強制経口投与した。そして 34 日後に , 全生存動物をエーテル深麻酔下で放血屠殺して肝臓を摘出した。摘出直後に尾状葉頭部・尾状葉尾部・外側右葉・尾側右葉の 4 葉より採材し 10% 中性緩衝ホルマリンに固定した。

固定臓器をパラフィン包埋後 , 薄切し , GST-P 一次抗体 (医学生物学研究所) を用いた免疫染色を ABC 法にて実施した。画像解析装置 (Win ROOF ; 三谷商事) を用いて , GST-P 陽性細胞巢 (直径 > 0.1 mm) の数及び面積 , 切片上の肝臓面積を計測した。そして , 肝細胞単位面積あたりの GST-P 陽性細胞巢の数及び面積を算出した。

統計処理

肝細胞単位面積あたりの GST-P 陽性細胞巢の数及び面積は , 各群で平均値及び標準偏差を算出し , 実験毎にキノロン剤投与群と媒体対照群で多重比較検定

を行った。多重比較検定では、Bartlett 法による等分散の検定を行い、等分散の場合は Dunnett 検定を用いた。等分散と認められなかった場合は、順位を利用した Dunnett 型の検定法を用いた。

さらに、各実験の媒体対照群の計4群についてそれぞれ2群間検定を行った。2群間検定では、 F -検定による等分散の検定を行い、等分散の場合は Student's t -検定を用いた。等分散と認められなかった場合は、Aspin-Welch's t -検定を用いた。

いずれの解析結果も、有意水準5%未満をもって有意な差があるとした。

陽性対照試験

陽性対照試験として、注射用水に溶解した DMH を 4 mg/kg の投与量で、今回の実験条件と同じ条件下で4匹のラットに投与した。

結 果

実験期間中，NA 高用量群の 4 例，中用量群の 1 例が NA 投与後 2 日以内に死亡した。一方，NFLX 中用量群の 2 例が NFLX 投与後 23 日に，NFLX 低用量群の 1 例が NFLX 投与後 32 日に死亡した。GST-P 陽性細胞巢の数及び面積の結果を Fig. 2-1 から 2-4 に示した。

Fig. 2-1 から 2-3 で示すように，NA 投与群，PPA 投与群，CPFX 投与群では，媒体対照群と比較して，GST-P 陽性細胞巢の数及び面積に有意な変化は認められなかった。

Fig. 2-4 で示すように，NFLX 高用量群及び中用量群で，媒体対照群と比較して，GST-P 陽性細胞巢の数及び面積に有意な増加が認められた。そこで，同一のパラフィン包埋された組織からさらにもう 1 枚を薄切し，GST-P 一次抗体を用いた免疫染色を実施した結果，同様の結果となった。したがって，この結果の再現性が確認された。NFLX 低用量群では，GST-P 陽性細胞巢の面積が，高用量群及び中用量群より高値であったが，媒体対照群と比較して有意な変化ではなかった。この用量と矛盾する結果は，NFLX 低用量群の 1 例の GST-P 陽性細胞巢の面積が，非常に大きかったことによると考えられる。この個体のパラフィン包埋された組織からさらにもう 1 枚を薄切し，HE 染色による病理組織学的検査を実施した結果，肝細胞腺腫が認められた。

陽性対照試験では，DMH 投与により，GST-P 陽性細胞巢の数及び面積に著明な増加が認められた（数の平均値: 35.62 ± 7.57 No./ cm^2 ，面積の平均値: 11.00 ± 6.12 mm^2/cm^2 ）。

考 察

本章では、NFLX 投与により、GST-P 陽性細胞巢の数及び面積に有意な増加が認められた。第 1 章では、WTK-1 細胞を用いた *in vitro* コメットアッセイ及び小核試験の結果、NFLX により SSBs が、さらに NFLX による SSBs により、染色体異常が生じていることが明らかとなった[15]。また、Pino 等は、*in vivo* において、NFLX は胎児組織に DNA 鎖切断を生じることを報告している[29]。そして、DNA 損傷は、2 段階発癌説におけるイニシエーション活性と密接につながっていると考えられている[17]。したがって、*in vitro* コメットアッセイ及び小核試験で検出された NFLX の遺伝毒性が、PH を受けたラットに対して、単回強制経口投与により DNA 損傷を生じ、肝臓にイニシエーション作用を生じたと考えられる。

NA による真核細胞における遺伝毒性が報告されている[6]が、第 1 章では、WTK-1 細胞を用いた *in vitro* コメットアッセイ及び小核試験の結果は陰性であった[15]。本章では、NA 投与により、GST-P 陽性細胞巢の数及び面積に有意な増加は認められなかった。したがって、この実験条件下では、NA はラットに対してイニシエーション活性を有していないと考えられる。またこの実験条件下では、NA 高用量群の 4 例、中用量群の 1 例が NA 投与後 2 日以内に死亡した。これらの死亡は、PH 後に NA を投与したことによると考えられる。PH は身体、特に肝臓に重篤な障害を生じることが報告されている[26, 38]。したがって、NA 投与により、PH による肝臓の障害が悪化したことにより死亡したと考えられる。よって、他の条件下では、異なった結果になる可能性があるものの、今回の実験で用いた NA の用量は、イニシエーション活性があるか否かを判断するのに、十分な用量であったと考えられる。Morrissey 等は、NA 投与により雄ラットで

包皮腺腫瘍が、雌ラットで陰核腺腫瘍が増加したと報告している[22]が、今回の結果から、NA はイニシエーション活性を有しておらず、非遺伝毒性発癌物質であると考えられる。

PPA による真核細胞における遺伝毒性が報告されている[19]が、第 1 章では、WTK-1 細胞を用いた *in vitro* コメットアッセイ及び小核試験の結果は陰性であった[15]。また本章では、PPA 投与により、GST-P 陽性細胞巢の数及び面積に有意な増加は認められなかった。一方、CPFEX は第 1 章では、WTK-1 細胞を用いた *in vitro* コメットアッセイの結果は陽性であり[15]、CPFEX による真核細胞における遺伝毒性が報告されている[2, 6, 23]。しかしながら、第 1 章では、WTK-1 細胞を用いた *in vitro* 小核試験の結果は陰性であった[15]。そして本章では、CPFEX 投与により、GST-P 陽性細胞巢の数及び面積に有意な増加は認められなかった。さらに Herbold 等は、CPFEX は *in vivo* の条件下では、topoisomerase II を抑制する濃度に達し得ないと提唱している[12]。したがって、この実験条件下では、PPA 及び CPFEX はラットに対してイニシエーション活性を有していないと考えられる。今回の実験では、PPA 及び CPFEX の高用量は、一般に反復毒性試験の最高用量に設定される 5000 mg/kg とした。よって、他の条件下では、異なった結果になる可能性があるものの、今回の実験で用いた PPA 及び CPFEX の用量は、イニシエーション活性があるか否かを判断するのに、十分な用量であったと考えられる。今回の結果から、PPA 及び CPFEX はイニシエーション活性を有していないと考えられる。

今回行った *in vivo* 短期間イニシエーション活性検索法は、Sakai 等の方法[33]を少し変更して実施した。予備実験において、Sakai 等の方法[33]に従って実施したところ、媒体対照群も含めて多くのラットが、2-AAF を 0.015%の濃度で 14 日間混餌投与し、その間に CCl₄ を 0.8ml/kg で経口投与した後、死亡した（デー

タは示さず)。PH 実施及び被験物質の投与後 29 日以上経過してからの死亡であることより、これらの死亡は、主に 2-AAF 及び CCl₄ の強い毒性によると考えられた。よって、0.015%の濃度での 2-AAF 混餌投与を 10 日間に短縮し、CCl₄ の投与実施日を PH 後 19 日に変更して、今回の実験を実施した。それにも関わらず、NFLX 中用量群あるいは低用量群の計 3 例が、PH 実施及び NFLX の投与後 23 日以上経過してから死亡した。NFLX 高用量群では死亡が認められなかったことより、これらの死亡は、主に NFLX の投与ではなく、2-AAF 及び CCl₄ の強い毒性によると考えられる。一方、陽性対照試験では、DMH 投与により、GST-P 陽性細胞巢の数及び面積に著明な増加が認められた。したがって、10 日間の 0.015%の濃度での 2-AAF 混餌投与は、*in vivo* 短期間イニシエーション活性検索法のプロモーション処置として十分であると判断される。さらに、各媒体対照群の計 4 群における GST-P 陽性細胞巢の数及び面積について、それぞれ 2 群間検定を行った。その結果、各媒体対照群間に有意な差は認められなかった。したがって、今回の実験条件は、*in vivo* 短期間イニシエーション活性検索法に適していると判断される。

以上の結果から、*in vitro* コメットアッセイ及び小核試験で検出された NFLX の遺伝毒性が、PH を受けたラットに対して、単回強制経口投与により DNA 損傷を生じ、肝臓でイニシエーションとして成立し、プロモーション処置との組み合わせにより前腫瘍性病変を形成したと考えられた。また、第 1 章及び第 2 章の結果から、同じキノロン剤でもその遺伝毒性ポテンシャルが異なることが示唆された。

小 括

第 1 章で検索されたキノロン剤による *in vitro* 遺伝毒性が, *in vivo* で発癌イニシエーションに導かれるか否かを検討するため, 2 剤のオールドキノロン剤(NA 及び PPA) 及び 2 剤のニューキノロン剤(CPMX 及び NFLX) について, 肝イニシエーション活性を検索した。その結果, NFLX により, 肝臓の前腫瘍性病変である GST-P 陽性細胞巢の数及び面積に有意な増加が認められた。

以上の結果から, *in vitro* コメットアッセイ及び小核試験で検出された NFLX の遺伝毒性が, PH を受けたラットに対して, 単回強制経口投与により DNA 損傷を生じ, 肝臓でイニシエーションとして成立し, プロモーション処置との組み合わせにより前腫瘍性病変を形成したと考えられた。また, 第 1 章及び第 2 章の結果から, 同じキノロン剤でもその遺伝毒性ポテンシャルが異なることが示唆された。

第 3 章

ノルフロキサシン (NFLX) の肝腫瘍誘発性の検討

緒 言

第1章及び第2章の結果から、NFLXの遺伝毒性が、肝臓でイニシエーションとして成立し、プロモーション処置との組み合わせにより前腫瘍性病変を形成したと考えられた[15, 16]。NFLXは、小児領域も含む医薬品及び動物用医薬品として広く用いられている。すなわち、NFLXを投与された患者及びNFLXが残留した動物由来の食品を摂取した消費者が、遺伝毒性物質に曝露されている可能性が推測される。

しかしながら、NFLX投与によって生じた前腫瘍性病変が、肝細胞腺腫及び肝細胞癌に進行するか否かはまだ不明である。そこで本章では、NFLXのイニシエーション活性が肝腫瘍を誘発するか否かを明確にするため、PH実施後NFLXを投与し、フェノバルビタール(PB)による長期間のプロモーション処置を実施し、NFLXの肝腫瘍誘発性を検討した。

材 料 及 び 方 法

供試動物

日本チャールズ・リバーから購入した雄の F344 ラットを，明暗各 12 時間，湿度 40–70%，室温 20–26°C に維持された飼育室内で，ステンレス製ケージを用いて 1 ケージあたり 5 匹まで飼育した。飼料は，オリエンタル酵母工業から購入した CRF-1 を，基礎飲料水は，水道水を自由に摂取させた。実験開始前に 1 週間の順化期間を設け，実験開始時は 7 週齢であった。

動物の取り扱いについては，東京農工大学の実験動物指針を遵守した。

化学物質

NFLX は和光純薬工業から，PB 及び DMH は東京化成工業から購入した。NFLX はナカライテスクから購入したトウモロコシ油で懸濁した。

実験方法

本章では，Kitagawa 等の方法[18]を少し変更して実施した。プロモーション処置のための PB 投与期間を，実験 1 では 17 週間，実験 2 では 34 週間，実験 3 では 51 週間に設定した。

第 1 日目に，ラットに PH を実施し，実験 1 では各群 10 例の 3 群に，実験 2 及び 3 では各群 15 例の 3 群に群分けした。その後，それぞれ NFLX 1500，750 mg/kg，あるいは媒体を 1 日 1 回 3 週間強制経口投与した。なお，最初の投与は PH 実施後 12 時間に，2 回目の投与は PH 実施後 30 時間に，3 回目以降の投与は約 24 時間間隔で投与した。NFLX 及び媒体の投与液量は 5ml/kg とした。NFLX 投与終了後 2 週間から 51 週間，飲料水に PB を 500 ppm の濃度で溶解し，自由

に摂取させ、飲水投与した。

NFLX 投与期間中（第 1 日から 21 日）は 1 週間に 2 回、NFLX 投与終了後の無処置期間中（第 22 日から 35 日）及び初期の PB プロモーション期間中（第 36 日から 85 日、第 85 日は投与開始後 3 か月）は 1 週間に 1 回、残りの PB プロモーション期間中は 1 か月に 1 回、体重を測定した。

17、34、あるいは 51 週間の PB プロモーション終了時に、全生存動物をエーテル深麻酔下で放血屠殺して肝臓を摘出した。肝臓重量を測定後、5 mm 間隔で横断し、肉眼的検索において直径 2 mm 以上の肝腫瘍を観察した。検索された肝腫瘍は、10%中性緩衝ホルマリンで固定し、パラフィン包埋後、薄切し、HE 染色による病理組織学的検査を実施した。

尾状葉頭部・尾状葉尾部・外側右葉・尾側右葉の 4 葉より各 1 断片を、10%中性緩衝ホルマリンに固定した。固定臓器をパラフィン包埋後、薄切し、GST-P 一次抗体(医学生物学研究所)を用いた免疫染色を ENVISION 法にて実施した。画像解析装置 (Win ROOF; 三谷商事) を用いて、GST-P 陽性細胞巢 (直径 > 0.15 mm) の数及び面積、切片上の肝臓面積を計測した。そして、肝細胞単位面積あたりの GST-P 陽性細胞巢の数及び面積を算出した。

統計処理

得られたデータは、各群で平均値及び標準偏差を算出し、実験毎に NFLX 投与群と媒体対照群で多重比較検定を行った。多重比較検定では、Bartlett 法による等分散の検定を行い、等分散の場合は Dunnett 検定を用いた。等分散と認められなかった場合は、順位を利用した Dunnett 型の検定法を用いた。

いずれの解析結果も、有意水準 5% 未満をもって有意な差があったとした。

陽性対照試験

陽性対照試験として、大塚製薬工場から購入した注射用水に溶解した DMH を 1 mg/kg の投与量で、今回の実験条件と同じ条件下で、実験 1 では 2 例のラットに、実験 2 及び 3 では 3 例のラットに投与した。

結 果

実験 2 では、1500 mg/kg 投与群の 1 例が NFLX 投与期間中（第 10 日）に、1 例が無処置期間中（第 35 日）に死亡した。実験 3 では、1500 mg/kg 投与群の 2 例が NFLX 投与期間中（第 3 日及び 4 日）に死亡した。これらの 1500 mg/kg 投与群の死亡例では、肉眼観察で異常は認められなかった。一方、実験 3 で、媒体対照群の 1 例が PB プロモーション期間中（第 80 日）に死亡した。この媒体対照群の死亡例では、消化管の肝臓及び横隔膜との癒着、消化管の拡張が認められたため、この死亡は、PH 手技の過失によると判断した。

Table 3-1 から 3-3 で示すように、NFLX 投与群の平均体重は、媒体対照群と比較して、無処置期間中及びごく初期の PB プロモーション期間中に有意に減少した。しかしながら、以降の PB プロモーション期間中は、媒体対照群と同様の推移を示した。

Table 3-4 から 3-6 で示すように、NFLX 投与群の肝臓の絶対重量及び相対重量は、媒体対照群と比較して、有意な差は認められなかった。肉眼的検索において、実験 3 の 750 mg/kg 投与群の 1 例において 1 つの肝腫瘍（ $2 \times 3 \times 5$ mm）のみが認められた。この肝腫瘍は、病理組織学的検査の結果、肝細胞腺腫と診断された。

Fig. 3-1 から 3-3 で示すように、NFLX 投与群と媒体対照群を比較して、GST-P 陽性細胞巢の数及び面積に有意な変化は認められなかった。

陽性対照試験では、実験 3 の肉眼的検索において、2 例のラットに 2 つの肝腫瘍（ $16 \times 23 \times 30$ mm 及び $5 \times 5 \times 5$ mm）及び（ $5 \times 5 \times 5$ mm 及び $3 \times 3 \times 3$ mm）がそれぞれに認められた。さらに、DMH 投与により、GST-P 陽性細胞巢の数及び面積に著明な増加が認められた（実験 1, 2, 3 における数の平均値: 1.57, 9.87

± 1.73 , 17.89 ± 3.22 No./cm² , 面積の平均値: 0.06 , 0.82 ± 0.38 , 3.16 ± 0.78 mm²/cm²)

考 察

本章では、NFLX 投与により、肉眼的検索による肝腫瘍、GST-P 陽性細胞巢の数及び面積の有意な増加は認められなかった。したがって、この実験条件下では、NFLX のイニシエーション活性による肝腫瘍誘発性は認められず、NFLX のイニシエーション活性は非常に弱いことが示唆された。実験 3 の肉眼的検索において、750 mg/kg 投与群の 1 例において 1 つの腫瘍が認められたが、1500 mg/kg 投与群において腫瘍が認められなかったことより、この腫瘍は NFLX 投与の影響ではないと判断した。

第 2 章では、*in vivo* 短期間イニシエーション活性検索法の結果、NFLX の 1500 mg/kg 以上の単回強制経口投与で、GST-P 陽性細胞巢の数及び面積の有意な増加が認められた[16]。その結果を踏まえて、今回の実験では、NFLX の投与量は高用量を 1500 mg/kg に設定した。今回の実験では、NFLX 投与期間中あるいは無処置期間中に 1500 mg/kg 投与群の 4 例が死亡した。これらの死亡は、PH 後に NFLX を投与したことによると考えられる。第 2 章で述べたように、PH 実施後、NFLX を 4000 mg/kg を単回強制経口投与した結果、ほぼ全例が肝臓の障害により、投与後数日で死亡した[16]。PH は身体、特に肝臓に重篤な障害を生じることが報告されている[26, 38]。したがって、NFLX 投与により、PH による肝臓の障害が悪化したことにより死亡したと考えられる。さらに今回の実験では、NFLX 投与群の平均体重は、媒体対照群と比較して、無処置期間中及びごく初期の PB プロモーション期間中に有意に減少した。したがって、今回の実験で用いた NFLX の用量は、イニシエーション活性が肝腫瘍を誘発するか否かを判断するのに、十分な用量であったと考えられる。

NFLX を投与された患者及び NFLX が残留した動物由来の食品を摂取した消

費者の危険性を考察することを目的に、今回の実験は、Kitagawa 等の方法[18]を少し変更して実施した。今回の実験条件は、その目的に適していたと考えられる。第一の理由は、PH は肝細胞の増殖を誘導するため、PH 後に NFLX を投与することにより、NFLX のイニシエーション活性が増強されたことである。なぜなら、第 1 章で示したように、NFLX を含むキノロン剤の遺伝毒性は、topoisomerase II を阻害することにより、DNA 複製を阻害するため生じるからである[15]。さらに、Sakai 等により DNA 合成がピークとなる 6 時間前である PH 実施後 12 時間あるいは 30 時間に、DMH を投与すると、GST-P 陽性細胞巢の数及び面積がより高値になると報告されているので[31]、最初の投与は PH 実施後 12 時間に、2 回目の投与は PH 実施後 30 時間に投与した。なお、第 2 章の *in vivo* 短期間イニシエーション活性検索法では、PH 実施後 12 時間の投与により、GST-P 陽性細胞巢の数及び面積が有意に増加した[16]。第二の理由は、3 週間の NFLX 投与期間は、ヒトの臨床領域での NFLX 投与期間とほぼ同じか、あるいは長いことである。第三の理由は、今回の実験の 51 週に及ぶ長期間の PB によるプロモーション処置は、ヒトの生活における何らかのプロモーション作用に代替できると考えられることである。一方、ラットにおいて、NFLX を通常のヒトの臨床領域での投与量の 8 から 9 倍の用量で 96 週間投与した結果、腫瘍発生の増加は認められなかったと報告されている[28]。これらの結果から、NFLX のイニシエーション活性は非常に弱く、NFLX のイニシエーション活性により腫瘍を誘発する可能性は、非常に低いと考えられる。

第 2 章では、*in vivo* 短期間イニシエーション活性検索法の結果、NFLX の 1500 mg/kg 以上の単回強制経口投与で、GST-P 陽性細胞巢の数及び面積の有意な増加が認められた[16]。一方、今回の実験では、NFLX の 1500 及び 750 mg/kg の 3 週間の反復強制経口投与で、GST-P 陽性細胞巢の数及び面積の有意な増加が認

められなかった。この矛盾は、主にプロモーション処置の違いによると考えられる。第 2 章では、*in vivo* 短期間イニシエーション活性検索法において、プロモーション処置として、2-AAF を 0.015%の濃度で 10 日間混餌投与し、CCl₄ を 0.8ml/kg で単回強制経口投与した[16]。一方、今回の実験では、PB を 500 ppm の濃度で飲水投与した。一般的に、2-AAF と CCl₄ のプロモーション作用は、PB より強いと言われている。しかし、2-AAF と CCl₄ は、強い肝毒性を持ち、2-AAF は強いイニシエーション作用を有していると言われている。実際に、第 2 章では、*in vivo* 短期間イニシエーション活性検索法において、2-AAF と CCl₄ の強い毒性よると考えられる死亡が発生した[16]。今回の実験の陽性対照試験では、実験 3 の肉眼的検索において、複数の肝腫瘍が認められ、さらに、各実験において DMH 投与により、GST-P 陽性細胞巢の数及び面積に著明な増加が認められた。したがって、NFLX 投与による GST-P 陽性細胞巢の数及び面積の有意な増加が認められなかったが、PB を 500 ppm の濃度で飲水投与することは、プロモーション処置として十分であると判断される。

以上の結果から、NFLX のイニシエーション活性は非常に弱く、NFLX のイニシエーション活性により肝腫瘍を誘発する可能性は、非常に低いと考えられた。これまで、遺伝毒性発癌物質は、腫瘍誘発において閾値が存在しないと考えられてきた。しかし近年、低用量の遺伝毒性発癌物質にも、非遺伝毒性発癌物質と同様に閾値が存在することが報告されている[13, 39]。この新しい観点によると、NFLX を投与された患者あるいは NFLX が残留した食品を摂取した消費者に肝腫瘍を誘発される可能性はまずあり得ないと推察される。

小 括

第1章及び第2章の結果から、NFLXの遺伝毒性が、肝臓でイニシエーションとして成立し、プロモーション処置との組み合わせにより前腫瘍性病変を形成したと考えられた[15, 16]。しかしながら、NFLX投与によって生じた前腫瘍性病変が、肝細胞腺腫及び肝細胞癌に進行するか否かは不明であった。そこで本章では、NFLXのイニシエーション活性が肝腫瘍を誘発するか否かを明確にするため、PH実施後NFLXを投与し、フェノバルビタール(PB)による長期間のプロモーション処置を実施し、NFLXの肝腫瘍誘発性を検討した。その結果、NFLX投与により、肉眼的検索による肝腫瘍の増加及びGST-P陽性細胞巢の数及び面積の有意な増加は認められなかった。

以上の結果から、NFLXのイニシエーション活性は非常に弱く、NFLXのイニシエーション活性により肝腫瘍を誘発する可能性は非常に低いと考えられた。

結 論

本研究では、キノロン剤の哺乳動物に対する遺伝毒性の有無、さらにその遺伝毒性が腫瘍を誘発するか否かを検討した。

キノロン剤の *in vitro* 遺伝毒性では、コメットアッセイ及び小核試験の結果から、CPFX 及び NFLX が SSBs を生じており、NFLX による SSBs が染色体異常を生じていると判断された。また、CPFX 及び NFLX による *in vitro* 遺伝毒性は、DNA 付加体を形成するのではなく、topoisomerase II を阻害することにより、DNA 複製を阻害するため生じたと考えられた。

キノロン剤の *in vivo* 肝イニシエーション活性では、NFLX 投与により、肝臓の前腫瘍性病変である GST-P 陽性細胞巢の数及び面積に有意な増加が認められた。よって、*in vitro* コメットアッセイ及び小核試験で検出された NFLX の遺伝毒性が、PH を受けたラットに対して、単回強制経口投与により DNA 損傷を生じ、肝臓でイニシエーションとして成立し、プロモーション処置との組み合わせにより前腫瘍性病変を形成したと考えられた。また、*in vitro* 遺伝毒性及び *in vivo* 肝イニシエーション活性の結果から、同じキノロン剤でもその遺伝毒性ポテンシャルが異なることが示唆された。

in vivo 肝イニシエーション活性が認められた NFLX について、そのイニシエーション活性が肝腫瘍を誘発するか否かを検討した。その結果、NFLX 投与により、肉眼的検索による肝腫瘍の増加及び GST-P 陽性細胞巢の数及び面積の有意な増加は認められなかった。よって、NFLX のイニシエーション活性は非常に弱く、NFLX のイニシエーション活性により肝腫瘍を誘発する可能性は非常に低いと考えられた。

しかしながら、本研究において、同じキノロン剤でもその遺伝毒性ポテンシ

ヤルが異なることが示唆されたため、いくつかのキノロン剤は、遺伝毒性ポテンシャルが強く、腫瘍を誘発する可能性が懸念される。したがって、キノロン剤の哺乳動物に対する遺伝毒性の有無、さらにその遺伝毒性が腫瘍を誘発するか否かについて、更なる研究が必要である。

謝 辞

本稿を終えるにあたり，本研究の遂行に際して終始御指導，御鞭撻を賜りました東京農工大学大学院共生科学技術研究院動物生命科学部門 三森国敏 教授に深甚たる謝意を表します。

本稿作成に際し，懇篤な御指導，御助言を賜りました，帯広畜産大学畜産学部獣医学科病態獣医学講座 松井高峯 教授，岩手大学農学部獣医学科応用獣医学講座 津田修治 教授，東京農工大学大学院共生科学技術研究院動物生命科学部門 下田実 教授，岐阜大学応用生物科学部獣医病理学分野 柵木利昭 教授に謹んで深謝の意を表します。

研究に際し，御指導・御協力賜り，実験にご協力くださりました，八戸工業高等専門学校物質工学科 佐々木有 教授，岐阜大学応用生物科学部獣医病理学分野 酒井洋樹 助手，東京農工大学農学部獣医病理学教室 高橋(岡村)美和 博士，本光喜 博士，黒岩有一 修士，はじめ同教室諸子の皆様に心から感謝いたします。

参 考 文 献

1. Akasaka, T., Kurosaka, S., Uchida, Y., Tanaka, M., Sato, K. and Hayakawa, I. (1998). Antibacterial activities and inhibitory effects of sitafloxacin (DU-6859a) and its optical isomers against type II topoisomerases. *Antimicrob Agents Chemother.* 42, 1284~1287.
2. Albertini, S., Chetelat, A. A., Miller, B., Muster, W., Pujadas, E., Strobel, R. and Gocke, E. (1995). Genotoxicity of 17 gyrase- and four mammalian topoisomerase II-poisons in prokaryotic and eukaryotic test systems. *Mutagenesis.* 10, 343~351.
3. Coughlin, S. A., Danz, D. W., Robinson, R. G., Klingbeil, K. M., Wentland, M. P., Corbett, T. H., Waud, W. R., Zwelling, L. A., Altschuler, E., Bales, E. and Rake, J. B. (1995). Mechanism of action and antitumor activity of (S)-10-(2,6-dimethyl-4-pyridinyl)-9-fluoro-3-methyl-7-oxo-2,3-dihydro-7H-pyridol[1,2,3-de]-[1,4]benzothiazine-6-carboxylic acid (WIN 58161). *Biochem Pharmacol.* 50, 111~122.
4. Fairbairn, D. W., Olive, P. L. and O'Neill, K. L. (1995). The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res.* 339, 37~59.
5. Fenech, M. and Morley, A. A. (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res.* 147, 29~36.
6. Fort, F. L. (1992). Mutagenicity of quinolone antibacterials. *Drug Saf.* 7, 214~222.
7. Fukuda, M., Inomata, M., Nishio, K., Fukuoka, K., Kanzawa, F., Arioka, H., Ishida, T., Fukumoto, H., Kurokawa, H., Oka, M. and Saijo, N. (1996). A topoisomerase II inhibitor, NK109, induces DNA single- and double-strand breaks and apoptosis. *Jpn J Cancer Res.* 87, 1086~1091.

8. Godard, T., Deslandes, E., Lebailly, P., Vigreux, C., Sichel, F., Poul, J. M. and Gauduchon, P. (1999). Early detection of staurosporine-induced apoptosis by comet and annexin V assays. *Histochem Cell Biol.* 112, 155~161.
9. Greenwood, S. K., Armstrong, M. J., Hill, R. B., Bradt, C. I., Johnson, T. E., Hilliard, C. A. and Galloway, S. M. (1998). Fewer chromosome aberrations and earlier apoptosis induced by DNA synthesis inhibitors, a topoisomerase II inhibitor or alkylating agents in human cells with normal compared with mutant p53. *Mutat Res.* 401, 39~53.
10. Hartmann, A., Elhajouji, A., Kiskinis, E., Poetter, F., Martus, H., Fjallman, A., Frieauff, W. and Suter, W. (2001). Use of the alkaline comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test. *Food Chem Toxicol.* 39, 843~858.
11. Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T. and Ishidate, M., Jr. (1990). The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat Res.* 245, 245~249.
12. Herbold, B. A., Brendler-Schwaab, S. Y. and Ahr, H. J. (2001). Ciprofloxacin: in vivo genotoxicity studies. *Mutat Res.* 498, 193~205.
13. Hoshi, M., Morimura, K., Wanibuchi, H., Wei, M., Okochi, E., Ushijima, T., Takaoka, K. and Fukushima, S. (2004). No-observed effect levels for carcinogenicity and for in vivo mutagenicity of a genotoxic carcinogen. *Toxicol Sci.* 81, 273~279.
14. Iliakis, G., Wang, H., Perrault, A. R., Boecker, W., Rosidi, B., Windhofer, F., Wu, W., Guan, J., Terzoudi, G. and Pantelias, G. (2004). Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation. *Cytogenet Genome Res.* 104,

- 14~20.
15. Itoh, T., Mitsumori, K., Kawaguchi, S. and Sasaki, Y. F. (2006). Genotoxic potential of quinolone antimicrobials in the in vitro comet assay and micronucleus test. *Mutat Res.* 603, 135~144.
 16. Itoh, T., Moto, M., Takahashi, M., Sakai, H. and Mitsumori, K. (2006). Liver initiation activity of norfloxacin but not nalidixic acid, pipemidic acid, and ciprofloxacin on in vivo short-term liver initiation assay in rats. *Toxicology.* 222, 240~246.
 17. Kashida, Y., Sasaki, Y. F., Ohsawa, K., Yokohama, N., Takahashi, A., Watanabe, T. and Mitsumori, K. (2002). Mechanistic study on flumequine hepatocarcinogenicity focusing on DNA damage in mice. *Toxicol Sci.* 69, 317~321.
 18. Kitagawa, T., Pitot, H. C., Miller, E. C. and Miller, J. A. (1979). Promotion by dietary phenobarbital of hepatocarcinogenesis by 2-methyl-N,N-dimethyl-4-aminoazobenzene in the rat. *Cancer Res.* 39, 112~115.
 19. Maura, A. and Pino, A. (1988). Evaluation of the DNA-damaging and mutagenic activity of oxolinic and pipemidic acids by the granuloma pouch assay. *Mutagenesis.* 3, 397~401.
 20. Miyamae, Y., Iwasaki, K., Kinae, N., Tsuda, S., Murakami, M., Tanaka, M. and Sasaki, Y. F. (1997). Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens using the single-cell gel electrophoresis (comet) assay. 2. Relationship between DNA migration and alkaline condition. *Mutat Res.* 393, 107~113.
 21. Moreau, N. J., Robaux, H., Baron, L. and Tabary, X. (1990). Inhibitory effects of quinolones on pro- and eucaryotic DNA topoisomerases I and II. *Antimicrob Agents Chemother.* 34, 1955~1960.

22. Morrissey, R. E., Eustis, S., Haseman, J. K., Huff, J. and Bucher, J. R. (1991). Toxicity and carcinogenicity studies of nalidixic acid in rodents. *Drug Chem Toxicol.* 14, 45~66.
23. Mukherjee, A., Sen, S. and Agarwal, K. (1993). Ciprofloxacin: mammalian DNA topoisomerase type II poison in vivo. *Mutat Res.* 301, 87~92.
24. Natarajan, A. T. (1984) Origin and significance of chromosomal alterations, *Mutation in man*, 1st ed., pp. 156~176. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
25. Oomori, Y., Yasue, T., Aoyama, H., Hirai, K., Suzue, S. and Yokota, T. (1988). Effects of fleroxacin on HeLa cell functions and topoisomerase II. *J Antimicrob Chemother.* 22, 91~97.
26. Okamura, M., Sakai, H., Takahashi, N., Inagami A., Tsukamoto, T., Yamamoto, M., Shirai, N., Iidaka, T., Yanai, T., Masegi, T. and Tatematsu, M. (2002). The effects of allyl alcohol-induced cell proliferation for detection of initiation activities of chemicals in rat liver. *J. Toxicol. Pathol.* 15, 95~102.
27. Pfau, W., Martin, F. L., Cole, K. J., Venitt, S., Phillips, D. H., Grover, P. L. and Marquardt, H. (1999). Heterocyclic aromatic amines induce DNA strand breaks and cell transformation. *Carcinogenesis.* 20, 545~551.
28. Physicians' Desk Reference. (1991). 45th ed., pp. 1474~1476. Medical Economics, New Jersey.
29. Pino, A., Maura, A., Villa, F. and Masciangelo, L. (1991). Evaluation of DNA damage induced by norfloxacin in liver and kidney of adult rats and in fetal tissues after transplacental exposure. *Mutat Res.* 264, 81~85.
30. Sakai, H., Tsukamoto, T., Yamamoto, M., Yanai, T., Masegi, T., Inada, K., Nakanishi, H. and Tatematsu, M. (2000). Summation of initiation activities of low doses of the

- non-hepatocarcinogen 1,2-dimethylhydrazine in the liver after carbon tetrachloride administration. *Cancer Lett.* 148, 59~63.
31. Sakai, H., Tsukamoto, T., Yamamoto, M., Shirai, N., Iidaka, T., Yanai, T., Masegi, T. and Tatematsu, M. (2001). Differential effects of partial hepatectomy and carbon tetrachloride administration on induction of liver cell foci in a model for detection of initiation activity. *Jpn J Cancer Res.* 92, 1018~1025.
 32. Sakai, H., Tsukamoto, T., Yamamoto, M., Hirata, A., Inagami, A., Shirai, N., Iidaka, T., Yanai, T., Masegi, T. and Tatematsu, M. (2002). Summation of initiation activities in the liver after partial hepatectomy. *Cancer Lett.* 176, 1~5.
 33. Sakai, H., Tsukamoto, T., Yamamoto, M., Kobayashi, K., Yuasa, H., Imai, T., Yanai, T., Masegi, T. and Tatematsu, M. (2002). Distinction of carcinogens from mutagens by induction of liver cell foci in a model for detection of initiation activity. *Cancer Lett.* 188, 33~38.
 34. Shimada, H., Itoh, S., Hattori, C., Tada, S. and Matsuura, Y. (1992). Mutagenicity of the new quinolone antibacterial agent levofloxacin. *Arzneimittelforschung.* 43, 378~385.
 35. Singh, A. C., Kumar, M. and Jha, A. M. (2003). Genotoxicity of lomefloxacin--an antibacterial drug in somatic and germ cells of Swiss albino mice in vivo. *Mutat Res.* 535, 35~42.
 36. Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R. and Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 175, 184~91.
 37. Thomas, D. C., Husain, I., Chaney, S. G., Panigrahi, G. B. and Walker, I. G. (1991). Sequence effect on incision by (A)BC excinuclease of 4NQO adducts and UV

- photoproducts. *Nucleic Acids Res.* 19, 365~370.
38. Tsuda, H., Lee, G. and Farber, E. (1980). Induction of resistant hepatocytes as a new principle for a possible short-term in vivo test for carcinogens. *Cancer Res.* 40, 1157~1164.
 39. Tsuda, H., Fukushima, S., Wanibuchi, H., Morimura, K., Nakae, D., Imaida, K., Tatematsu, M., Hirose, M., Wakabayashi, K. and Moore, M. A. (2003). Value of GST-P positive preneoplastic hepatic foci in dose-response studies of hepatocarcinogenesis: evidence for practical thresholds with both genotoxic and nongenotoxic carcinogens. A review of recent work. *Toxicol Pathol.* 31, 80~86.
 40. Van Goethem, F., Lison, D. and Kirsch-Volders, M. (1997). Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis assay for the detection of DNA damaging agents: genotoxic effects of cobalt powder, tungsten carbide and cobalt-tungsten carbide. *Mutat Res.* 392, 31~43.
 41. WHO. (1995). Evaluation of certain veterinary drug residues in food. Forty-second report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 851, 1~42.
 42. Yamada, T., Maita, K., Nakamura, J., Murakami, M., Okuno, Y., Hosokawa, S., Matsuo, M. and Yamada, H. (1994). Carcinogenicity studies of oxolinic acid in rats and mice. *Food Chem Toxicol.* 32, 397~408.

要 旨

キノロン系抗菌剤は、DNA gyrase 及び topoisomerase IV の活性を阻害し、細菌の DNA 合成を阻害する合成抗菌剤であり、医薬品あるいは動物用医薬品として広く用いられている。一方、哺乳動物においても DNA gyrase の機能に類似する topoisomerase II が存在し、キノロン系抗菌剤は topoisomerase II も阻害することが報告されているが、キノロン系抗菌剤の哺乳動物に対する遺伝毒性及び発癌性については、未だ明らかではない。そこで、本研究ではキノロン系抗菌剤の哺乳動物に対する遺伝毒性の有無、さらにその遺伝毒性が発癌につながるか否かを検討した。

まず、オールドキノロン剤であるナリジクス酸 (NA)、ピペミド酸 (PPA)、オキシリン酸 (OA)、ピロミド酸 (PA) 及びニューキノロン剤であるエノキサシン (ENX)、オフロキサシン (OFLX)、シプロフロキサシン (CPFX)、ノルフロキサシン (NFLX) について、*in vitro* 遺伝毒性の有無を確認するため、*in vitro* コメットアッセイを実施した。ヒトリンパ腫由来である WTK-1 細胞を 2 日間培養後、キノロン系抗菌剤を培地中に添加して 2、4、20 時間処理後、*in vitro* コメットアッセイ (pH > 13) を実施した。その結果、CPFX 及び NFLX のみが陽性結果を示した。CPFX 及び NFLX については、20 時間処理後、*in vitro* コメットアッセイを pH 10、pH 12.1、及び pH > 13 で実施し、比較した結果、pH 12.1 及び pH > 13 ではほぼ同様の陽性結果を示し、pH 10 では陰性結果を示した。コメットアッセイは、pH 10 で DNA の二本鎖切断を、pH 12.1 で DNA の一本鎖切断及び二本鎖切断を、pH > 13 で DNA のアルカリ脆弱部位、一本鎖及び二本鎖鎖切断を検出することが報告されている。したがって、CPFX 及び NFLX は、主に DNA の一本鎖切断を生じたと考えられた。つぎに、NA、PPA、CPFX、及び NFLX

について、20 時間処理後、キノロン系抗菌剤が添加されていない培地で培養し回復期間とし、2、4、24 時間回復期間後、*in vitro* コメットアッセイ (pH > 13) を実施した。その結果、20 時間処理直後に認められた CPFEX 及び NFLX による陽性反応は、回復期間において陰性となった。したがって、CPFEX 及び NFLX による DNA 損傷の大部分が、回復性であると考えられた。一方、NA 及び PPA は、回復期間も陰性であった。さらに、NA、PPA、CPFEX、及び NFLX について、20 時間処理後、cytochalasin B を含むキノロン系抗菌剤が添加されていない培地で 24 時間培養し、*in vitro* 小核試験を実施した。その結果、NFLX のみが陽性結果を示した。以上の成績から、コメットアッセイで検出された NFLX による DNA の一本鎖切断の一部が、染色体異常となり、小核として固定されたと考えられた (第 1 章)。

第 2 章では、NA、PPA、CPFEX、及び NFLX について、*in vivo* におけるイニシエーション活性の有無について検討した。雄の F344 ラットに 3 分の 2 肝部分切除を実施し、その 12 時間後にキノロン系抗菌剤を単回強制経口投与した。その 14 日後から 10 日間 2-acetylaminofluorene の混餌投与を行い、その間に四塩化炭素を単回強制経口投与した。さらに 11 日間の休薬期間後、肝臓を摘出し、胎盤型グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST-P) 一次抗体を用いて免疫染色を実施し、肝イニシエーション活性検索法を行った。その結果、ラットの肝臓の前腫瘍性病変である GST-P 陽性細胞巢の数及び面積の有意な増加が、NFLX 投与でのみ認められた。以上の成績から、*in vitro* コメットアッセイ及び小核試験で検出された NFLX の遺伝毒性が *in vivo* においてイニシエーションとして成立し、プロモーション処置との組み合わせにより、前腫瘍性病変を形成したと考えられた。第 1 章及び第 2 章の結果より、同じキノロン剤でもその遺伝毒性ポテンシャルが異なることが示唆された (第 2 章)。

第1章及び第2章の結果をうけ、NFLXについて、*in vivo*におけるイニシエーション活性が、長期間のプロモーション処置との組み合わせにより発癌につながるか否かを検討した。雄のF344ラットに3分の2肝部分切除を実施し、その後3週間NFLXを1日1回経口投与した。2週間の休薬期間後、フェノバルビタールを0.05%の濃度で飲水投与した。フェノバルビタールを17, 34, 51週間投与後、エーテル麻酔下で放血致死させ、肝臓を摘出し、肉眼的検索及びGST-P一次抗体を用いて免疫染色を実施した。その結果、GST-P陽性細胞巣及び腫瘍性病変の有意な増加は認められなかった。以上の成績から、本実験条件下では、NFLXによる肝腫瘍誘発性は認められず、NFLXのイニシエーション活性は非常に弱いことが示唆された(第3章)。

Abstract

Quinolone antimicrobial agents (quinolones), which have been widely used for clinical and veterinary therapies, inhibit DNA synthesis in bacteria. They act by inhibiting DNA gyrase (bacterial topoisomerase II) or topoisomerase IV and are known to have slight inhibitory effects on eukaryotic topoisomerase II, which is homologous to DNA gyrase in mammals. However, neither the *in vivo* genotoxicity nor carcinogenicity of quinolones in mammals has been clarified. Thus, the present study was conducted in order to examine whether any quinolones have genotoxicity and whether their genotoxicity results in carcinogenicity.

To investigate the *in vitro* genotoxicity of quinolones, 4 old quinolones [nalidixic acid (NA), piperimidic acid (PPA), oxolinic acid (OA), and piromidic acid (PA)] and 4 new quinolones [enoxacin (ENX), ofloxacin (OFLX), ciprofloxacin (CPFX), and norfloxacin (NFLX)] were selected. A WTK1 human lymphoma cell line, which had been incubated for 2 days, was used. The cells in medium were placed in dishes, each quinolone was added, and the cell culture dishes were incubated for 2, 4, or 20 h. At the end of each treatment period, the cell cultures were used for the comet assay at pH > 13. In this assay, CPFX and NFLX produced a significant concentration-dependent and time-dependent increase in the DNA migration. Furthermore, the cell cultures that were treated with each of the 2 quinolones (CPFX and NFLX) for 20 h were used for the comet assay at pH 10 and 12.1. DNA migration in these cells treated with CPFX and NFLX for 20 h was compared at pH 10, 12.1, and > 13. Increased DNA migration was observed in the comet assay at pH 12.1 and > 13 after 20-h treatment with CPFX and NFLX, and no differences were observed in the DNA migration values. On the

other hand, the comet assay at pH 10 did not show any positive responses. Since the comet assay detects double strand breaks (DSBs) at pH 10, DSBs and single strand breaks (SSBs) at pH 12.1, and strand breaks and alkali-labile lesions derived from AP-sites at pH > 13, primary DNA damage caused by CPFEX and NFLX that was detected in the comet assay is SSBs but not alkali-labile sites. Furthermore, 4 quinolones (NA, PPA, CPFEX, and NFLX) were selected to examine the fate of the DNA lesions caused. After the treatment with each quinolone for 20 h, the cell cultures were washed with fresh medium and incubated for 0, 2, 4, or 24 h. They were used for the comet assay at pH > 13. The significant increase in DNA migration disappeared after the recovery period following the 20-h treatment with CPFEX and NFLX. DNA migration decreased rapidly during the 2 to 24-h recovery periods, suggesting that almost all the SSBs caused by CPFEX and NFLX were rejoined after they were removed from the culture medium. Further, no increase in DNA migration during the recovery periods was noted for the other 2 quinolones (NA and PPA). Subsequent to treatment with the 4 quinolones for 20 h, the cell cultures were used for the micronucleus (MN) test. The cell cultures were washed with fresh medium, treated with cytochalasin B was added, and incubated for 24 h. NFLX produced a significant concentration-dependent increase in the incidence of MN. Based on these findings, it can be concluded that the 2 new quinolones (NFLX and CPFEX) caused SSBs, and NFLX-induced SSBs resulted in chromosome aberrations (Chapter I).

In order to examine the *in vivo* initiation activity of the quinolones NA, PPA, CPFEX, and NFLX, an *in vivo* short-term liver initiation assay was performed. Male F344 rats were subjected to a two-thirds partial hepatectomy on day 0 and treated once orally with each quinolone or vehicle 12 h after completion of the partial hepatectomy.

Subsequently, they were fed a basal diet for 14 days and a diet containing 0.015% 2-acetylaminofluorene for the next 10 days. On day 19, a single oral dose of 0.8 ml/kg carbon tetrachloride was administered to the rats. On day 34, they were euthanized under ether anesthesia, and liver slices, one each from all liver lobes, were fixed in 10% neutral buffered formalin for immunohistochemical examination of glutathione *S*-transferase placental form (GST-P) positive foci that are regarded as hepatocellular preneoplastic lesion in rats. Administration of NFLX increased the mean number and area of GST-P positive foci. These results suggest that under the present study conditions, only NFLX has an initiation activity in rats, and that the genotoxic potential of NFLX, which was detected by the *in vitro* comet assay and MN test, causes DNA damage and tumor initiation in the liver of the partially hepatectomized rats by administration of a single oral dose. Therefore, administration of NFLX along with tumor promoters caused hepatocellular preneoplastic lesions. The results in Chapters I and II suggest that the genotoxic potentials are different among quinolones (Chapter II).

To examine whether or not the *in vivo* initiation activity of NFLX results in carcinogenicity, male F344 rats were subjected to a two-thirds partial hepatectomy and treated with NFLX or the vehicle once daily for 3 weeks. From 2 weeks after the completion of NFLX treatment, the rats were given 500 ppm PB in their drinking water for 51 weeks. After promotion treatment by PB for 17, 34, or 51 weeks, the rats were euthanized under ether anesthesia, and the macroscopic hepatic tumors were counted. Liver slices, one each from all liver lobes, were fixed in 10% neutral buffered formalin for immunohistochemical examinations of GST-P positive foci. Administration of NFLX did not increase the mean number or area of GST-P positive foci as well as hepatocellular tumors. These results suggest that under the present study conditions, the initiation

activity of NFLX does not result in the induction of hepatocellular tumors and that the initiation activity of NFLX is extremely weak (Chapter III).

Table 3-1. Body weights of rats in Experiment 1

Group	Control	NFLX	
mg/kg	0	750	1500
Number of rats	10	10	10
Day or month			
Day 1	136 ± 7	138 ± 8	139 ± 7
Day 5	146 ± 7	147 ± 9	151 ± 8
Day 8	157 ± 6	157 ± 7	156 ± 11
Day 12	176 ± 6	175 ± 7	176 ± 10
Day 15	184 ± 7	180 ± 7	180 ± 12
Day 19	194 ± 7	190 ± 8	185 ± 15
Day 22	200 ± 8	194 ± 10	187 ± 18
Day 29	217 ± 10	203 ± 16	200 ± 18 *
Day 36	227 ± 11	218 ± 12	215 ± 16
Day 43	243 ± 12	236 ± 11	232 ± 20
Day 50	250 ± 12	245 ± 13	241 ± 21
Day 57	256 ± 12	254 ± 16	250 ± 22
Day 64	263 ± 12	265 ± 14	259 ± 21
Day 71	267 ± 12	270 ± 17	267 ± 22
Day 78	272 ± 12	276 ± 17	272 ± 22
Day 85	273 ± 13	278 ± 17	274 ± 25
Month 4	288 ± 13	293 ± 19	291 ± 26
Day of euthanasia	295 ± 18	307 ± 20	308 ± 31

Each value shows mean (g) ± S.D.

Significantly different from control group (*: P < 0.05).

Table 3-2. Body weights of rats in Experiment 2

Group	Control	NFLX	
mg/kg	0	750	1500
Number of rats	15	15	15
Day or month			
Day 1	134 ± 6	135 ± 6	135 ± 5
Day 4	128 ± 9	131 ± 7	131 ± 6
Day 8	140 ± 10	145 ± 7	141 ± 10
Day 11	153 ± 10	154 ± 7	156 ± 6 (14)
Day 15	169 ± 10	168 ± 8	168 ± 7 (14)
Day 18	182 ± 8	177 ± 9	177 ± 9 (14)
Day 22	189 ± 10	185 ± 11	185 ± 10 (14)
Day 29	209 ± 12	197 ± 14 *	196 ± 11 * (14)
Day 36	225 ± 12	213 ± 14 *	216 ± 12 (13)
Day 43	238 ± 13	226 ± 15 *	231 ± 12 (13)
Day 50	253 ± 15	240 ± 15 *	245 ± 12 (13)
Day 57	261 ± 17	249 ± 15	256 ± 15 (13)
Day 64	271 ± 16	261 ± 16	268 ± 14 (13)
Day 71	279 ± 16	271 ± 16	280 ± 14 (13)
Day 78	284 ± 16	277 ± 17	287 ± 15 (13)
Day 85	291 ± 16	285 ± 17	294 ± 13 (13)
Month 4	318 ± 20	312 ± 20	324 ± 17 (13)
Month 5	330 ± 27	325 ± 25	339 ± 21 (13)
Month 6	346 ± 24	342 ± 25	357 ± 21 (13)
Month 7	357 ± 26	352 ± 25	366 ± 18 (13)
Month 8	367 ± 29	362 ± 26	376 ± 22 (13)
Day of euthanasia	383 ± 28	376 ± 24	398 ± 20 (13)

Each value shows mean (g) ± S.D.

Significantly different from control group (*: P < 0.05).

Figures in parentheses indicate number of rats.

Table 3-3. Body weights of rats in Experiment 3

Group	Control		NFLX	
	0		750	1500
mg/kg	0		750	1500
Number of rats	15		15	15
Day or month				
Day 1	139 ± 6		140 ± 6	141 ± 6
Day 4	130 ± 5		133 ± 8	132 ± 6 (13)
Day 8	142 ± 6		147 ± 9	141 ± 10 (13)
Day 11	156 ± 8		159 ± 9	155 ± 9 (13)
Day 15	174 ± 8		174 ± 10	172 ± 8 (13)
Day 18	183 ± 9		184 ± 11	185 ± 7 (13)
Day 22	197 ± 10		194 ± 11	197 ± 8 (13)
Day 29	216 ± 10		205 ± 13	199 ± 17 * (13)
Day 36	231 ± 10		220 ± 12 *	220 ± 10 * (13)
Day 43	247 ± 11		238 ± 11 *	239 ± 8 (13)
Day 50	259 ± 11		252 ± 12	254 ± 9 (13)
Day 57	271 ± 11		265 ± 14	266 ± 10 (13)
Day 64	277 ± 11		270 ± 15	271 ± 12 (13)
Day 71	288 ± 12		282 ± 15	284 ± 15 (13)
Day 78	296 ± 11		292 ± 15	292 ± 14 (13)
Day 85	302 ± 13		297 ± 16	297 ± 14 (13)
Month 4	334 ± 15 (14)		326 ± 18	327 ± 17 (13)
Month 5	348 ± 15 (14)		342 ± 19	344 ± 21 (13)
Month 6	362 ± 16 (14)		356 ± 18	363 ± 19 (13)
Month 7	374 ± 14 (14)		367 ± 18	370 ± 19 (13)
Month 8	386 ± 17 (14)		375 ± 19	381 ± 22 (13)
Month 9	397 ± 15 (14)		391 ± 19	392 ± 23 (13)
Month 10	404 ± 16 (14)		399 ± 20	403 ± 22 (13)
Month 11	410 ± 16 (14)		401 ± 20	410 ± 23 (13)
Month 12	414 ± 17 (14)		407 ± 19	411 ± 24 (13)
Day of euthanasia	427 ± 19 (14)		418 ± 20	422 ± 22 (13)

Each value shows mean (g) ± S.D.

Significantly different from control group (*: P < 0.05).

Figures in parentheses indicate number of rats.

Table 3-4. Liver weights of rats in Experiment 1

Group	Control	NFLX	
mg/kg	0	750	1500
Number of rats	10	10	10
Body weight (g)	295 ± 18	307 ± 20	308 ± 31
Liver (g)	10.87 ± 0.86	11.28 ± 1.05	11.15 ± 1.07
(g%)	3.70 ± 0.25	3.68 ± 0.23	3.62 ± 0.13

Each value shows mean ± S.D.

Table 3-5. Liver weights of rats in Experiment 2

Group	Control	NFLX	
mg/kg	0	750	1500
Number of rats	15	15	13
Body weight (g)	383 ± 28	376 ± 24	398 ± 20
Liver (g)	13.38 ± 1.41	12.71 ± 1.10	13.73 ± 1.29
(g%)	3.49 ± 0.20	3.38 ± 0.14	3.45 ± 0.18

Each value shows mean ± S.D.

Table 3-6. Liver weights of rats in Experiment 3

Group	Control	NFLX	
mg/kg	0	750	1500
Number of rats	14	15	13
Body weight (g)	427 ± 19	418 ± 20	422 ± 22
Liver (g)	13.94 ± 0.99	14.43 ± 0.91	14.61 ± 1.49
(g%)	3.27 ± 0.32	3.45 ± 0.11	3.46 ± 0.23

Each value shows mean ± S.D.

Fig. 1-1

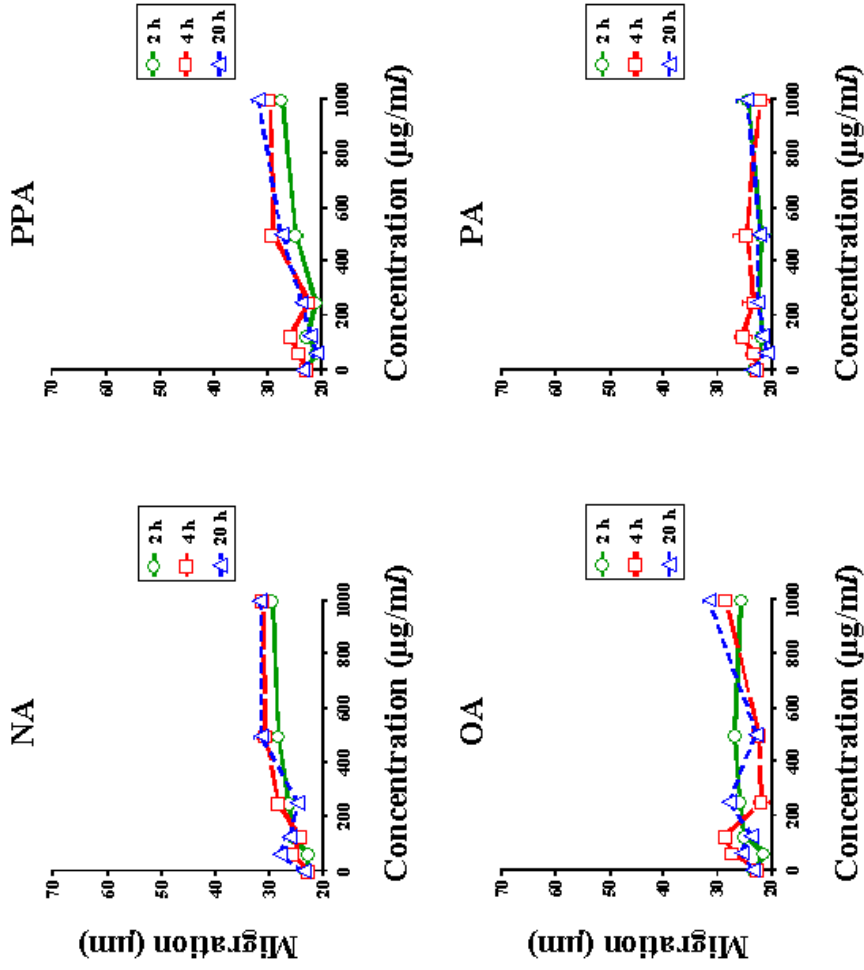


Fig. 1-1. The migration of nuclear DNA from the cells treated with old quinolones. The mean migration (µm) of 50 cells in the comet assay at pH > 13. Mean ± S.D. of 3 independent trials.

Fig. 1-2

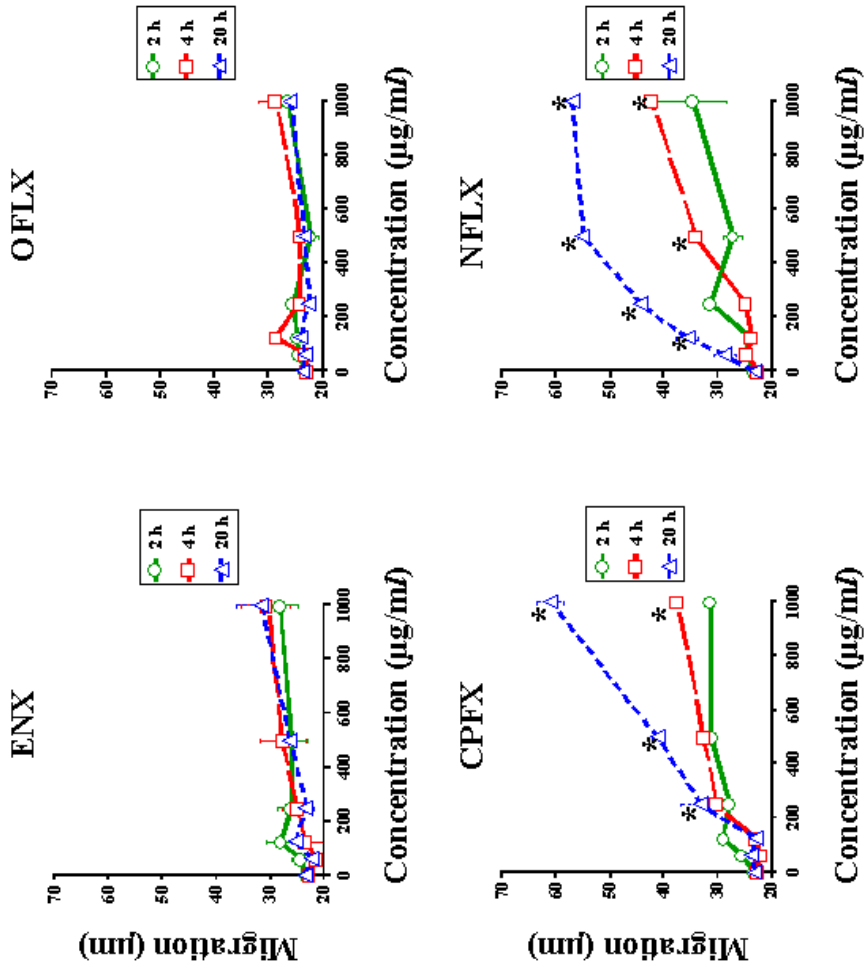


Fig. 1-2. The migration of nuclear DNA from the cells treated with new quinolones. The mean migration (µm) of 50 cells in the comet assay at pH > 13. Mean ± S.D. of 3 independent trials; * $p < 0.05$.

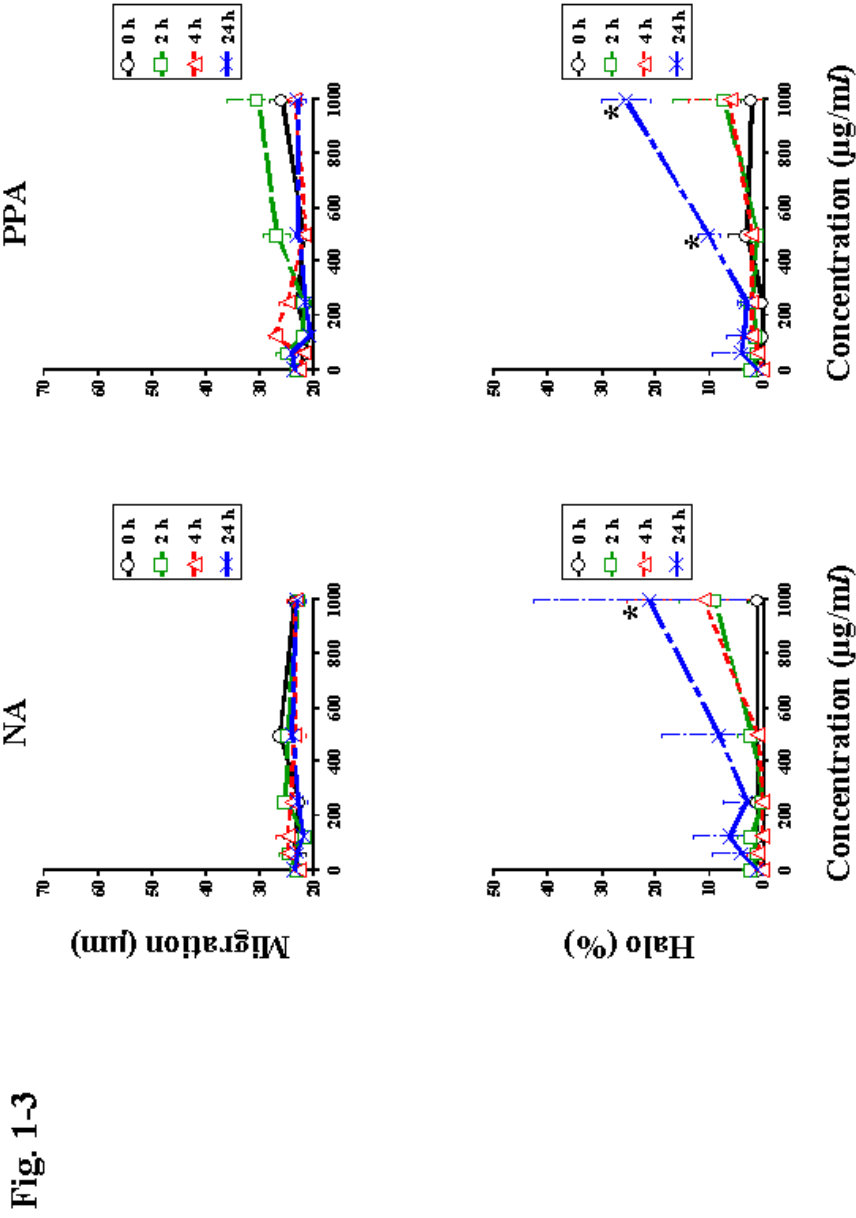


Fig. 1-3

Fig. 1-3. The migration of nuclear DNA from the cells and the incidence of halo in recovery period after treatment with old quinolones for 20 h. The mean migration (μm) of 50 cells in the comet assay at $\text{pH} > 13$ and the number of cells having halo per 100 individual cells selected at random in the halo assay. Mean \pm S.D. of 3 independent trials; * $p < 0.05$.

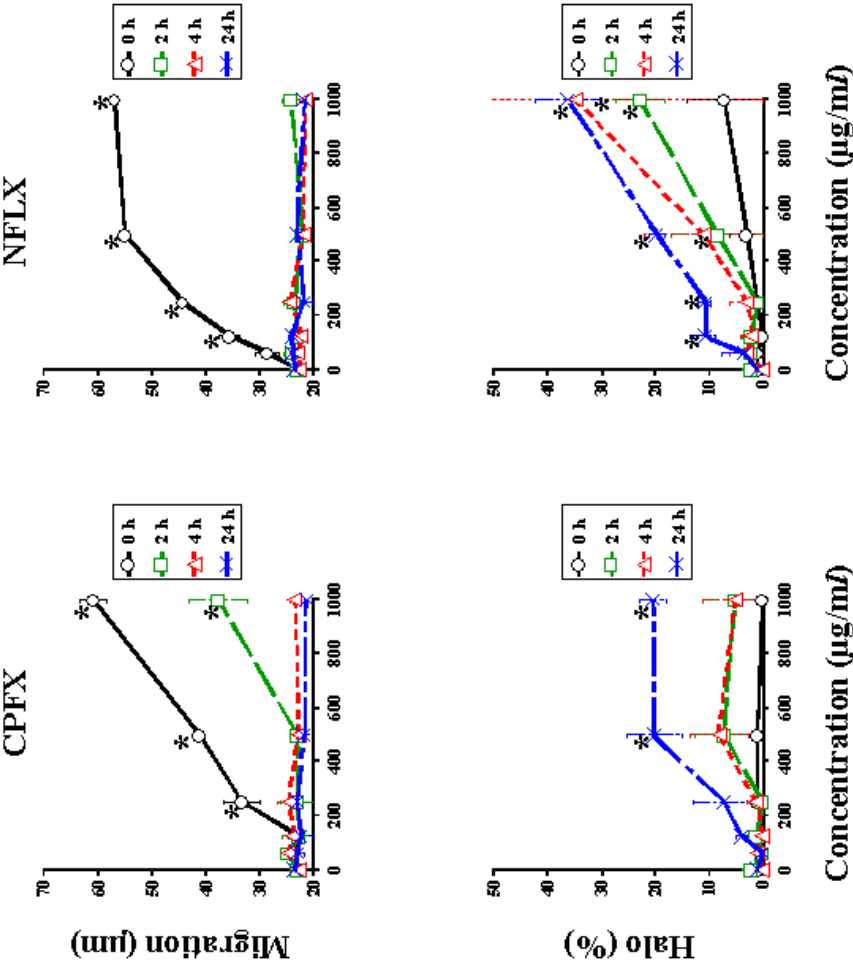


Fig. 1-4

Fig. 1-4. The migration of nuclear DNA from the cells and the incidence of halo in recovery period after treatment with new quinolones for 20 h. The mean migration (µm) of 50 cells in the comet assay at pH > 13 and the number of cells having halo per 100 individual cells selected at random in the halo assay. Mean ± S.D. of 3 independent trials; * $p < 0.05$.

Fig. 1-5

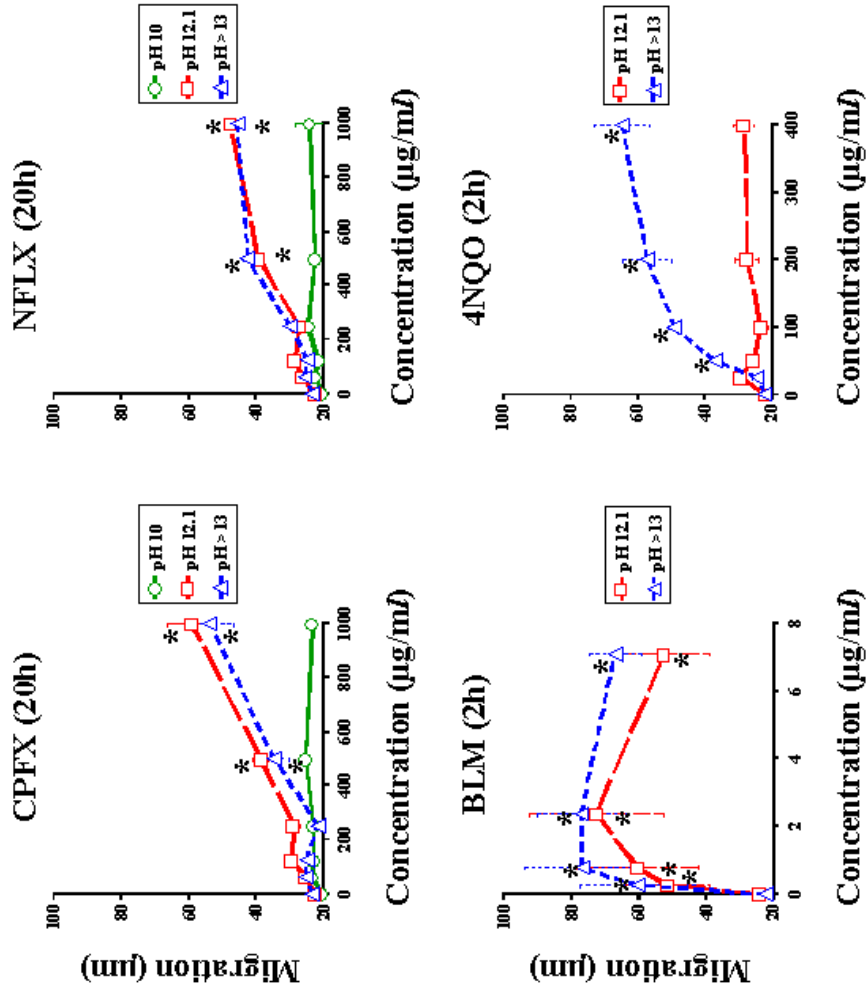


Fig. 1-5. The migration of nuclear DNA from the cells treated with new quinolones. The mean migration (µm) of 50 cells in the comet assay at pH 10, 12.1, and > 13. Mean ± S.D. of 3 independent trials; * $p < 0.05$. The lower section shows the results of the control study.

Fig. 1-6

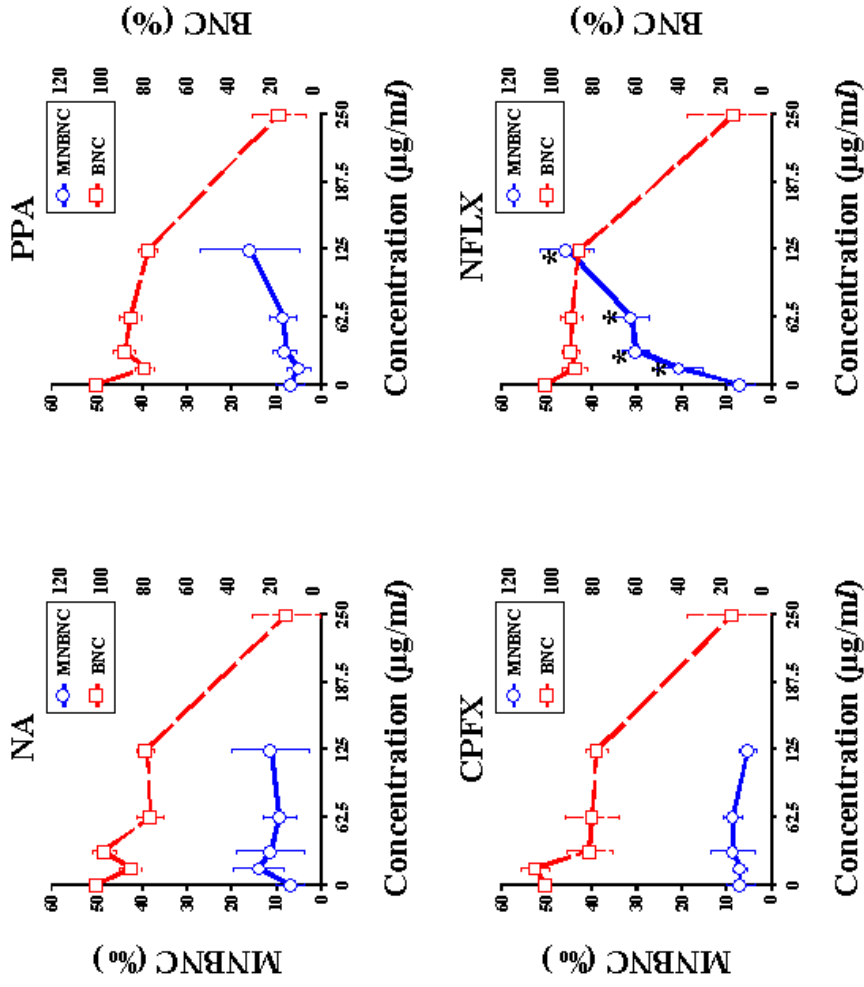


Fig. 1-6. The ratio (%) of incidence of BNC to control incidence and the incidence of MNBNC recorded by scoring 1000 BNC with intact cytoplasm in the micronucleus test. Mean \pm S.D. of 3 independent trials; * $p < 0.05$.

Fig. 2-1

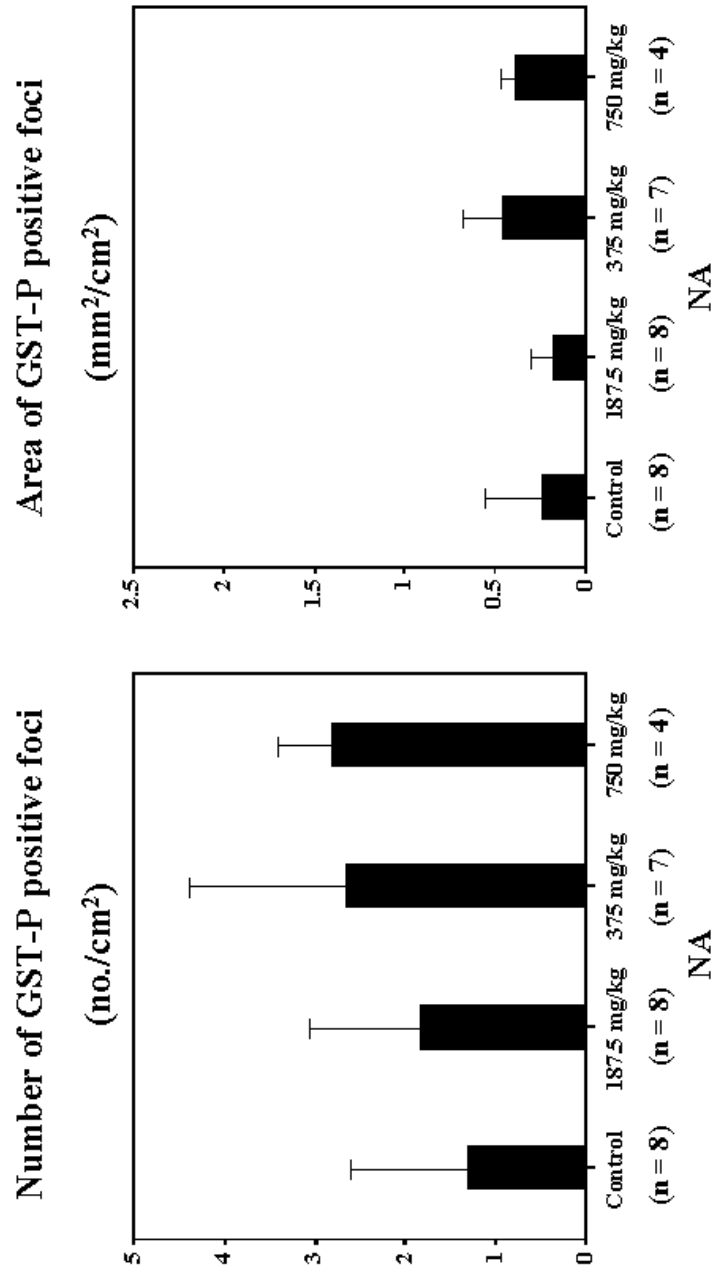


Fig. 2-1. Number and area of GST-P positive liver cell foci (≥ 0.1 mm in diameter) in partially hepatectomized rats treated with vehicle or nalidixic acid. Data are expressed as the mean \pm S.D. of each group.

Fig. 2-2

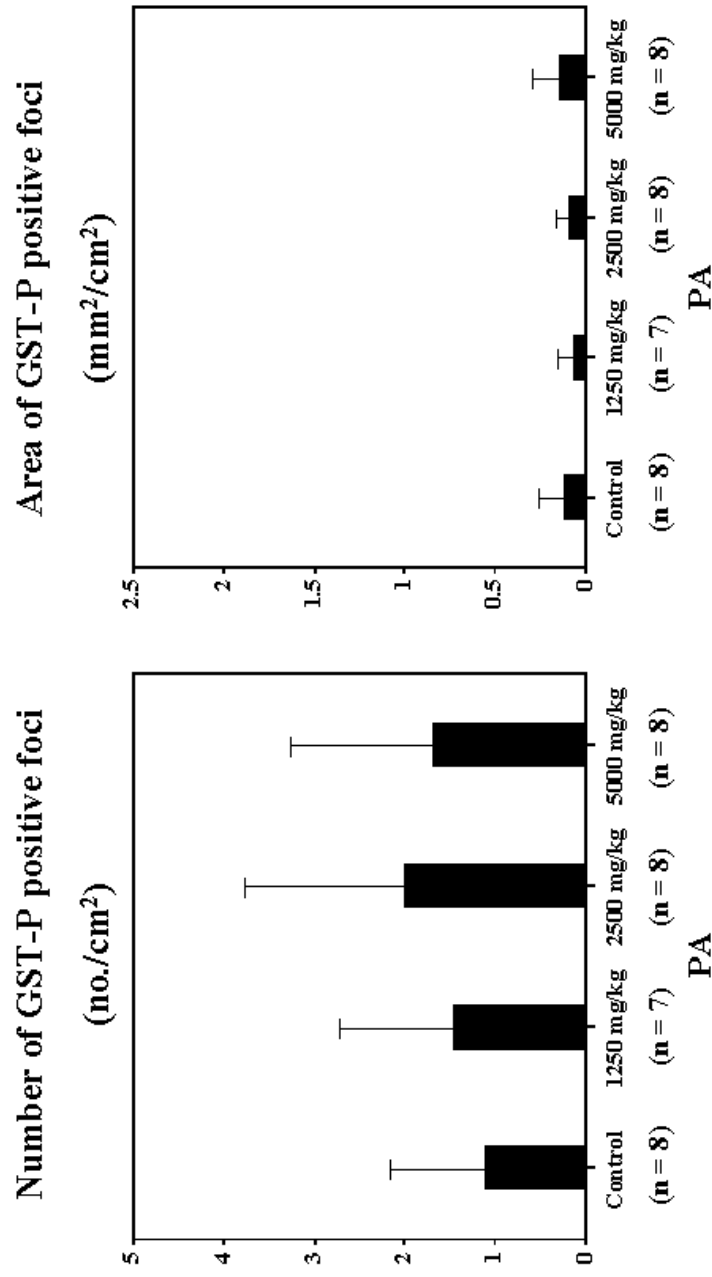


Fig. 2-2. Number and area of GST-P positive liver cell foci (> 0.1 mm in diameter) in partially hepatectomized rats treated with vehicle or pipemidic acid. Data are expressed as the mean \pm S.D. of each group.

Fig. 2-3

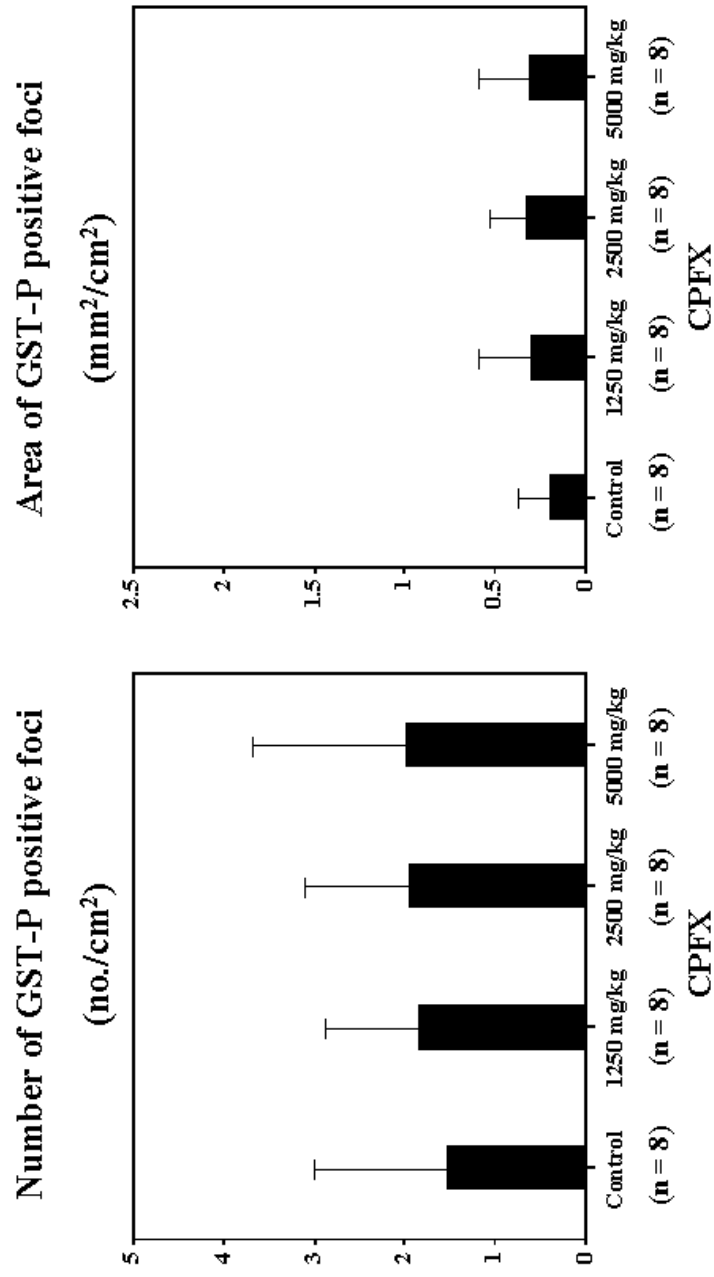


Fig. 2-3. Number and area of GST-P positive liver cell foci (> 0.1 mm in diameter) in partially hepatectomized rats treated with vehicle or ciprofloxacin. Data are expressed as the mean \pm S.D. of each group.

Fig. 2-4

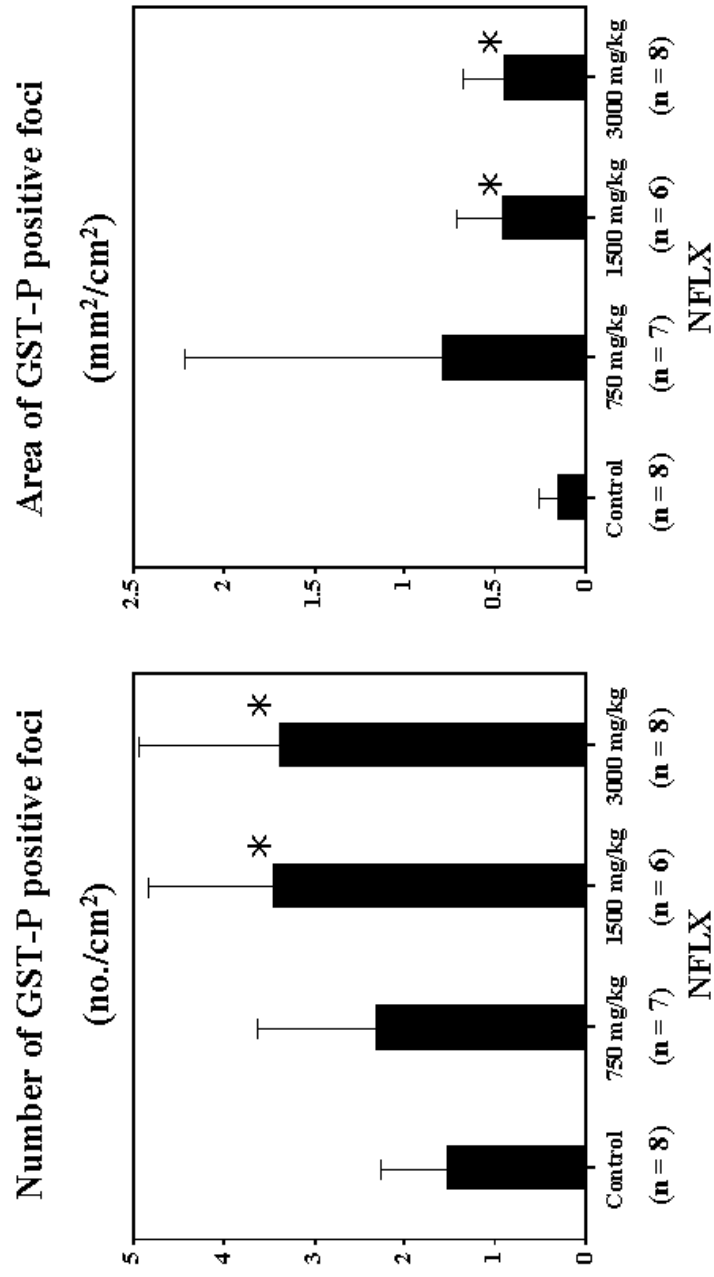


Fig. 2-4. Number and area of GST-P positive liver cell foci (> 0.1 mm in diameter) in partially hepatectomized rats treated with vehicle or norfloxacin. Data are expressed as the mean \pm S.D. of each group. *: Significantly different from control group at $p < 0.05$.

Fig. 3-1

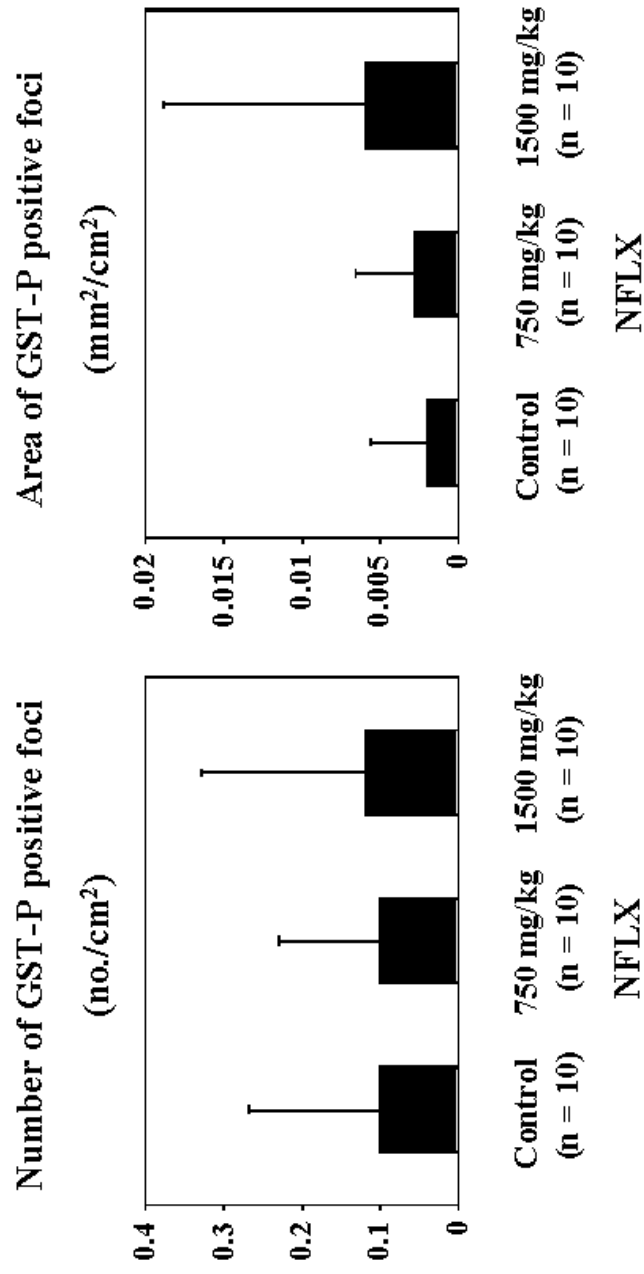


Fig. 3-1-1. Number and area of GST-P positive liver cell foci (≥ 0.15 mm in diameter) of rats in Experiment 1 (PB treatment for 17 weeks). Data are expressed as the mean \pm S.D. of each group.

Fig. 3-2

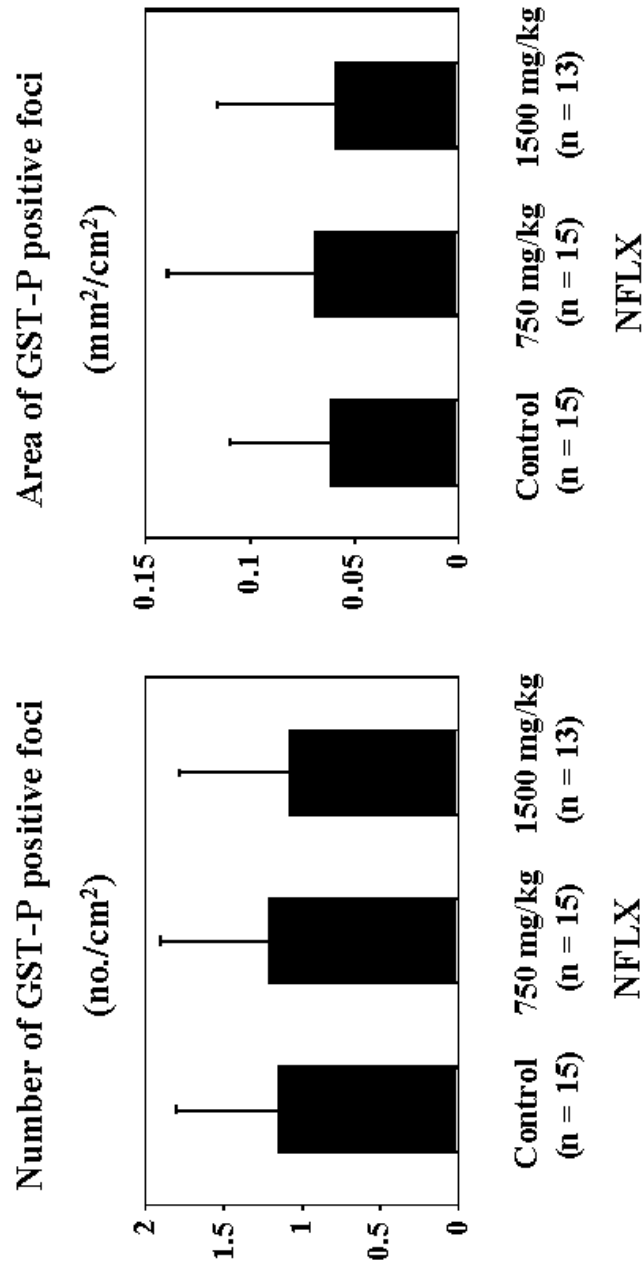


Fig. 3-2. Number and area of GST-P positive liver cell foci (≥ 0.15 mm in diameter) of rats in Experiment 2 (PB treatment for 34 weeks). Data are expressed as the mean \pm S.D. of each group.

Fig. 3-3

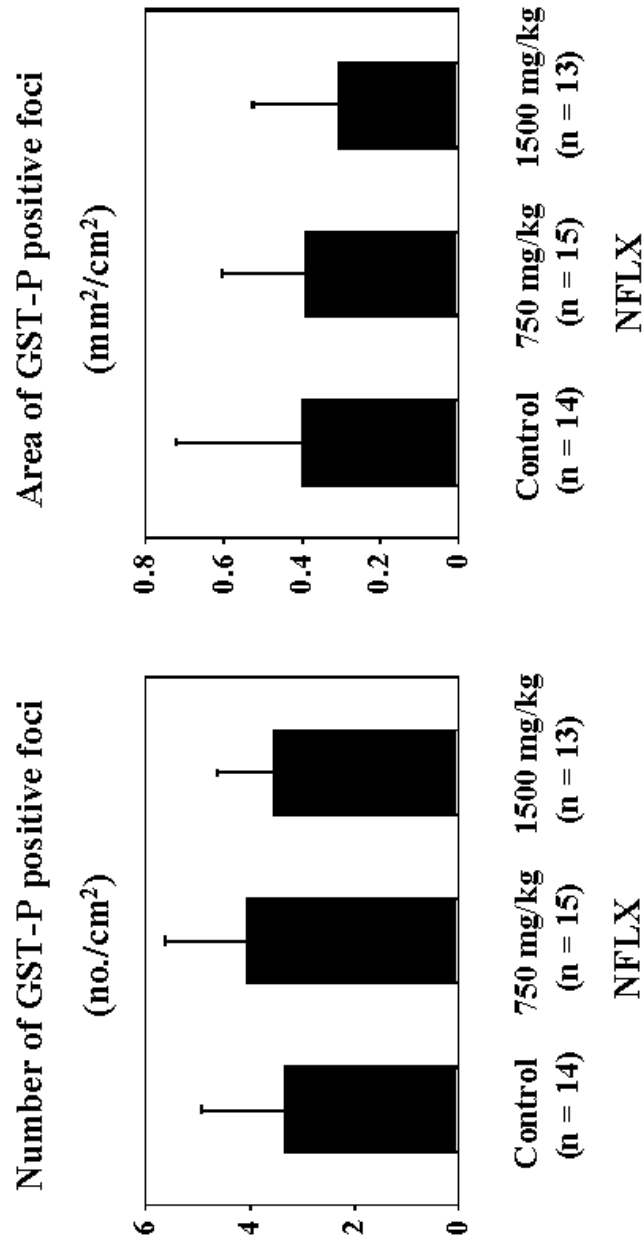


Fig. 3-2. Number and area of GST-P positive liver cell foci (≥ 0.15 mm in diameter) of rats in Experiment 3 (PB treatment for 51 weeks). Data are expressed as the mean \pm S.D. of each group.