

# 枯草菌を用いた Rec-assay による解熱性鎮痛剤の 突然変異原性に関する研究

住田 導彦

Michihiko SUMIDA

## Studies on the mutagenicity of analgesic antipyretics by Rec-assay system with *Bacillus subtilis*.

近年、多くのすぐれた医薬品の導入により、かつて治癒が不可能とされていた疾患も、これら医薬品により可能となってきた。我々の日常生活にとって医薬品は不可欠のものとなり、治療薬、保健薬として常備され服用されてきた。しかし医薬品の安全性については、食品添加物や農薬などの場合と同様に、解明されていないものが多くある、薬物の催奇形性、発癌性、突然変異原性に関する領域については、近年になり多くの研究がなされている。

最近、Ames ら<sup>1,2)</sup>によって、既知の発癌物質の大部分は突然変異誘発性を有し、発癌性と突然変異性とはきわめて高い相関があることが報告された。白須ら<sup>3)</sup>は種々の農薬について、西岡<sup>4)</sup>は金属化合物について、Ames ら<sup>5)</sup>は抗生物質の Adrinomycin-HCl, Daunorubicin-HCl について、それらの変異原性のあることを発表しており、Kada<sup>6)</sup>は AF-2 について Rec-assay では陽性であることを報告している。しかし常用されている医薬品に関する報告は数少ない。今回は日頃、かぜ薬、頭痛薬として服用する機会の多い解熱性鎮痛薬について、変異原性試験のうち枯草菌を用いての組み換え修復試験を行ったので、その成績について報告する。

### 材料と方法

#### 1. 材料

鳥取大学医学部附属病院薬剤部より供与を受けた Sodium Salicylate (Sl), Aspyrin (Ap), Phena-

cetin (Ph), Acetaminophen (Ac), Antipyrine (An), Aminopyrine (Am), Sulpyrine (Sp), Sulfinpyrazone (Sf), Oxyphenbutazone (Op) および Mefenamic acid (Ma) を実験材料とした。

増菌用液体培地：極東肉エキス 10 g, 大伍ポリペプトン 10 g, 塩化ナトリウム 5 g を水 1000 ml に溶かし、pH 7.0 に調製した。

Streak 用平板培地：上記液体ブロスに 1.5% の割合に寒天を加えて調製した。

Spore 用寒天培地：8 g の Difco nutrient broth を 1000 ml の水に溶解し、15 g の Difco agar を加えて調製した。

孢子形成用寒天培地：Difco nutrient broth 16 g, KCl 2 g, MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 0.5 g, MnCl · 4 H<sub>2</sub>O 19.8 mg, FeSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 278 μg, Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 4 H<sub>2</sub>O 236 mg, Glucose 1 g, Difco agar 15 g を 1000 ml に溶解して調製した。

#### 2. 方法

Streak 法は賀田ら<sup>6,7)</sup>の方法により、*B. subtilis* H 17 (Rec<sup>+</sup>) および M 45 (Rec<sup>-</sup>) を使用し、各々を液体ブロス中で 37°C, 16 時間振盪培養のものをを用いた。培地は 1.5% 寒天ブロス を 20 ml ずつシャーレに入れ、固化させたものの表面を乾燥させ用いた。菌液は 0.1 ml 用のピペットを用いて、各々 2 つの菌が混ざり合わないよう、ハの字型に Streak し、直径 8 mm の濾紙ディスクを Streak の起点をおおうように置いた。実験医薬品は水、Dimethylsulfoxide

(DMSO) 又は  $\text{CHCl}_3$  に溶解させ、500-1000  $\mu\text{g}/30 \mu\text{l}$  になるように浸し、37°C、18時間培養後に生じた薬物に対する生育阻止帯の径を測定した。対照薬品として Kanamycin, Mitomycin C について測定した。

spore 法は平野<sup>9)</sup>の方法により *B. subtilis* H 17 (Rec<sup>+</sup>) および M 45 (Rec<sup>-</sup>) の各菌株の胞子を形成させ、H 17 については  $1 \times 10^6$  spores/ml, M 45 については  $1 \times 10^7$  spores/ml の濃度の保存液をつくり実験に用いた。spore 法の実施に際しては、spore 用寒天培地に上記胞子保存液を 1ℓ あたり 10 ml 加え、シャーレに 10 ml ずつ分注し、固化させ、直径 8 mm の濾紙ディスクを置き、それに 500-1000  $\mu\text{g}/30 \mu\text{l}$  の薬品を浸し、37°C、24時間培養後に生育阻止帯の距離を測定した。

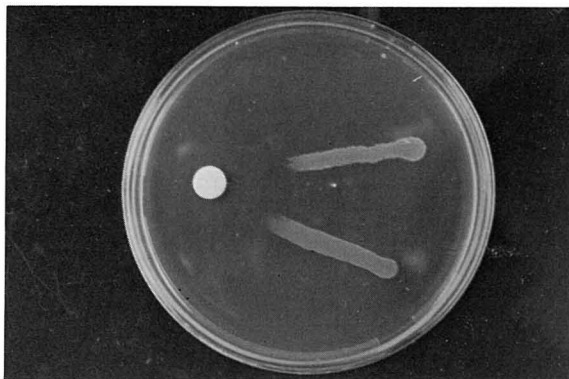
S-9 併用法<sup>7)</sup>はラット肝ホモジネート (オリエンタ

ル酵母株式会社) の 0.3 ml をシャーレに注入し、溶解させた上記寒天培地を 10 ml 分注、固化させ、直径 8 mm の濾紙ディスクに 500-1000  $\mu\text{g}/30 \mu\text{l}$  の薬品と cofactor (G-6-P, NADPH, NADH 等, オリエンタル酵母株式会社) を浸し、37°C、24時間培養後に生育阻止帯の径を測定した。

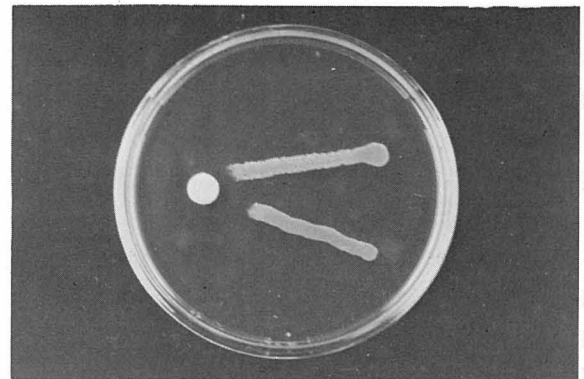
## 結 果

1. Rec-assay による実験結果は表 1 および図 1 に示した。Sl, Ap, Ph, Sf, Op については H 17 (Rec<sup>+</sup>), M 45 (Rec<sup>-</sup>) 共にわずかの生育阻止帯を認めた。Sp については Rec<sup>+</sup> 2 mm, Rec<sup>-</sup> 8 mm であり、その差 6 mm を示した。

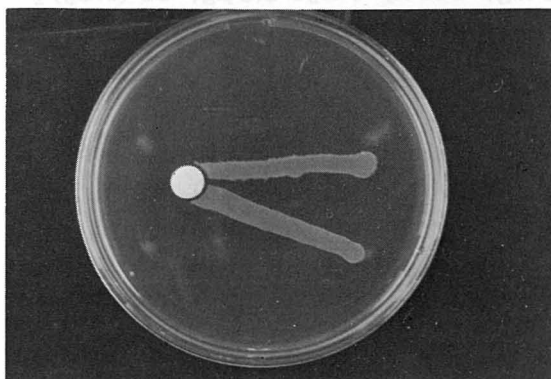
2. Spore Rec-assay による実験結果は表 2 および図 2 に示した。S-9 mix の無添加では Ph, An, Am, Sf, Op については生育阻止帯を認めなかった。



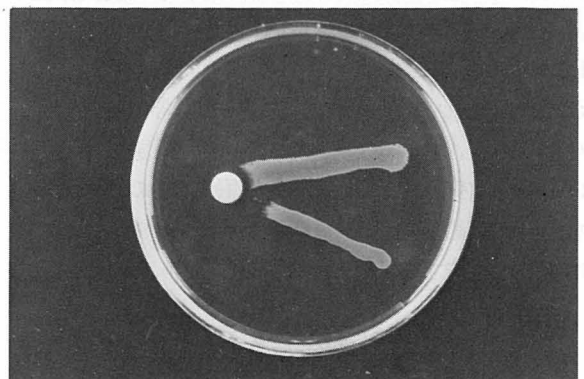
Kanamycin



Mitomycin C



Antipyrine



Sulpyrine

図 1. Rec-assay プレート  
上段 Rec<sup>+</sup>, 下段 Rec<sup>-</sup>

表 1. Spore Rec-assay による生育阻止帯の距離

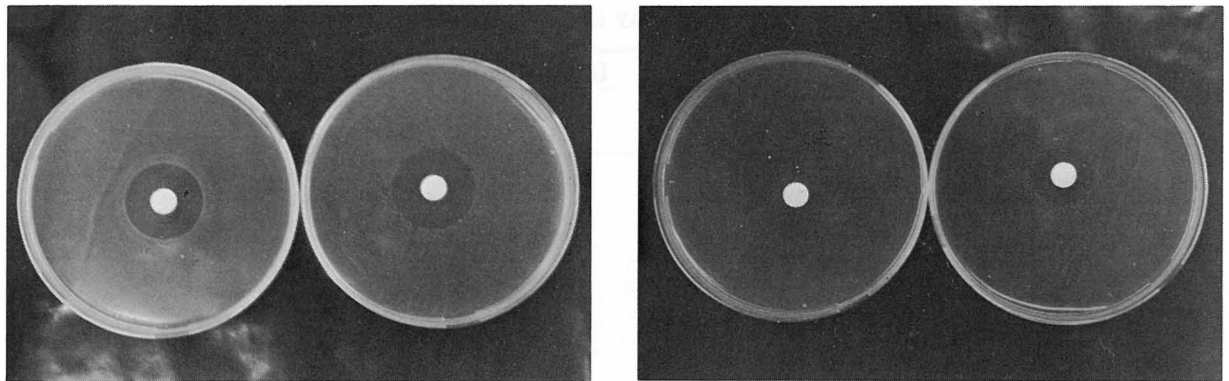
Drug	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{disk}$ )	Inhibition length (mm)		Difference
		H17 (Rec <sup>+</sup> )	M45 (Rec <sup>-</sup> )	
Sodium Salicylate	500	2	2	0
Aspyrin	1000	1	1	0
Phenacetin	500	3	2	—
Acetaminophen	1000	0	0	0
Antipyrine	1000	0	0	0
Aminopyrine	1000	0	0	0
Sulpyrine	500	2	8	6
Sulfinpyrazone	500	3	2	—
Oxyphenbutazone	500	2	2	0
Mefenamic acid	1000	0	0	0

表 2. Spore Rec-assay による生育阻止帯の距離

Drug	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{disk}$ )	Inhibition zone (mm)					Difference
		S-9 mix absence		Difference	S-9 mix presence		
		H17 (Rec <sup>+</sup> )	M45 (Rec <sup>-</sup> )		H17 (Rec <sup>+</sup> )	H45 (Rec <sup>-</sup> )	
Sodium Salicylate	500	25	27	2	17	20	3
Aspyrin	500	21	22	1	19	23	4
Phenacetin	1000	0	0	0	0	0	0
Acetaminophen	500	13	14	1	13	15	2
Antipyrine	1000	0	0	0	0	0	0
Aminopyrine	1000	0	0	0	0	0	0
Sulpyrine	500	0	19	19	0	29	29
Sulfinpyrazone	1000	0	0	0	0	0	0
Oxyphenbutazone	1000	0	0	0	0	0	0
Mefenamic acid	500	8	11	3	18	20	2

Sl, Ap, Ac, Ma については Rec<sup>+</sup>, Rec<sup>-</sup> 共に阻止帯を認め、その差 1-3 mm であった。Sp については 19 mm の差を示した。S-9 添加によるものは無添加の場合に認められたものと同様の薬品でも認めら

れ、その差 2-4 mm であり有意の差を認めなかった。Sp については 29 mm の生育阻止帯の差を示し明らかに代謝活性化が認められた。



Acetaminophen

Sulpyrine

図 2. 胞子を用いた Rec-assay プレート

左 Rec<sup>+</sup>, 右 Rec<sup>-</sup>

## 考 察

ある化学物質に変異原性があるということは、その化学物質と DNA との反応の結果、突然変異として説明されることであり、高等動物でも微生物においても基本的には共通の性質である。しかし微生物は、高等動物に比べて取り扱いが簡単で、ライフサイクルが短時間であるため、多数の検体を同時に迅速に試験でき、更に経費が安価であるという利点もある。これらの点から、微生物を用いた化学物質の変異原性試験が発癌物質のスクリーニングテストとして供されてきた<sup>9)</sup>。変異原性試験は修復試験 (repair test) と復帰変異試験 (reversion test) に分けられている。前者の DNA 修復機構には組み換え修復 (recombination repair) と除去修復 (excision repair) が知られている<sup>10)</sup>。此度は枯草菌類の DNA 修復欠損株および野生株に同時に薬品を作用させることによって生育感受性を測定・比較し、DNA 修復欠損株に特異的に阻害を生ずる度合を観察した。この突然変異株に高い阻害を示す物質はこの菌の DNA に損傷を起こし、その修復されない結果、菌を死滅させ生育阻止帯をつくることになる。そこで Kada ら<sup>6)</sup>の方法により *B. subtilis* の野生株 (H 17 Rec<sup>+</sup>) と修復機構の欠損した変異株 M 45 (Rec<sup>-</sup>) を用いて、基本化学構造式の同一の解熱性鎮痛薬数品種ずつについて検討した。即ちサリチル酸誘導体として Sl, Ap, アニリン誘導体として Ph, Ac, ピラゾロン誘導体として An, Am, Sp, ピラゾリン誘導体として Op, Sf, 非ステロイド性抗炎症薬として Ma について生育阻害の程度を観察した。

これらの結果は基本化学構造式による特異的な変異原性を示すような阻害は認められなかったことになる。生育阻止帯の長さを比較すると Sl, Ap, Ph, Sf, Op については Rec<sup>-</sup> ≒ Rec<sup>+</sup> であり、DNA に傷害を起こすことなく生育阻害をしたことを示し、Kanamycin の抗菌作用が蛋白質合成阻害をおもな原因とする<sup>11)</sup>のと類似した阻害があるものと考えられた。Ac, An, Am, Ma は Rec<sup>+</sup>, Rec<sup>-</sup> の両者に対して生育阻止を示さなかった薬品であることがわかった。Sp については強い変異原性のある Mitomycin C と同様の様式で Rec<sup>-</sup> > Rec<sup>+</sup> の生育阻止を示したため、DNA に損傷を起こす物質であることが示唆された。

Spore Rec-assay は胞子を 4°C で浮遊液の状態できわめて安定に長期間保存でき、常に一定な生菌数の条件で実験できる特性があり、Rec-assay の利用にきわめて有用であった。また哺乳動物の肝臓マイクロゾームと上清分画 (S-9 分画) を加えることにより変異原性物質の代謝活性化試験も行うことができる<sup>7,10)</sup>。本実験においては、Ph, An, Am, Sf, Op について、S-9 添加ならびに無添加で生育阻止を示さなかったが、Yahagi ら<sup>12)</sup>は Ph の変異原性を復帰変異試験菌である *Salmonella typhimurium* TA 100 を使用し、PCB で誘導したラット肝マイクロゾーム酵素で活性化処理させても検出できず、PCB 処理したハムスター肝酵素で活性化することによって弱いながら検出している。砂川ら<sup>13)</sup>も同様の方法で Ph を検出している。Sl, Ap, Ac, Ma については S-9 添加、無添加ともに生育阻止域のあることを示したが、Rec<sup>-</sup> ≒ Rec<sup>+</sup> でほとんど差は認められなかった。Ap, Ac に

ついて石館ら<sup>14)</sup>は Ames test で本実験の結果と同様に陰性の成績を得ている。Sp については Rec-assay の結果と同様に Rec<sup>-</sup>>Rec<sup>+</sup> と阻止域に大きな差を示した。石館ら<sup>14)</sup>は復帰変異試験に属する Ames test で Sp に陽性を示しているが、Rec-assay system で Sp に陽性を検出した報告はいまだない。Sp については栄養型細胞ならびに S-9 添加、無添加の胞子を用いたすべての組み換え修復試験で Rec<sup>-</sup>>Rec<sup>+</sup> を示し、その程度に大きな差を示したことは、Sp により DNA の塩基に変化をきたし、産生される蛋白質の構造を変え、それにより致命的な効果をもたらしたことが予想される。更に代謝活性化処理により、その程度の差を大きくしたことは、Sp を服用することにより哺乳動物の体内で Sp が代謝活性化され、突然変異性を強める可能性があり、遺伝子突然変異を誘発したり、細胞染色体異常を誘発するものと考えられ、ひいては発癌性のあることも示唆される。

#### 要 約

10種類の解熱性鎮痛剤について枯草菌による組み換え修復試験を行った結果、Sulpyrine に突然変異原性のあることがわかった。

本研究にあたり薬品の提供をいただいた鳥取大学医学部附属病院薬剤部大谷元美先生に深謝いたします。

#### 文 献

1) Mc Cann, J., Choi, E., Yamasaki, E. and Ames, B. N., Proc. Natl. Acad. Sci., U.

S., **72**, 5135-5139, 1975.  
 2) Mc Cann, J. and Ames, B. N., Proc. Natl. Acad. Sci., U. S., **73**, 950-954, 1976.  
 3) Shirasu, Y., Moriya, M., Kato, K., Furuhashi, A. and Kada, T., Mutation Res., **40**, 19-30, 1976.  
 4) Nishioka, H., Mutation Res., **31**, 185-189, 1975.  
 5) Kada, T., Jpn. J. Genetics, **48**, 301, 1973.  
 6) Kada, T., Sadaie, Y. and Tutikawa, K., Mutation Res., **16**, 156-174, 1972.  
 7) 田島弥太郎, 賀田恒夫, 近藤宗平, 外村 晶編, 環境変異原実験法, 講談社サイエンティフィック, pp. 47-56, 1980.  
 8) 平野光一, 変異原と毒性, 第2集, pp. 54-57, 1978.  
 9) 賀田恒夫, ファルマシア, **10**, 502-508, 1974.  
 10) 小田嶋成和, 橋本嘉幸編, 化学物質と癌の発生, 学会出版センター, 東京, pp. 11-23, 1978.  
 11) 白須泰彦, 松岡 理編, 新しい毒性試験と安全性の評価, ソフトサイエンス社, 東京, pp. 343-347, 1975.  
 12) Yahagi, T., Nagao, M., Matsushima, Y., Sugimura, T. and Okada, T., Mutation Res., **48**, 121, 1977.  
 13) 砂川 隆, 井上邦夫, 岡本暉公彦, 衛生化学 **27**, 204-211, 1981.  
 14) 石館 基, 吉川邦衛, 祖父尼俊雄, 衛生試験所報告 **98**, 1-9, 1980.

#### SUMMARY

Ten kinds of analgesic antipyretics were tested for mutagenicity by Rec-assay system with *Bacillus subtilis*. Among them, Sulpyrine was revealed to have a significant mutagenic activity.

(受付 1983. 11. 16)