哺乳動物細胞の染色体に及ぼす clindamycin の作用

関 さ ち 子

日本歯科大学 薬理学教室 (指導: 真泉平治教授)*

[受付: 昭和51年9月20日]

抄録: clindamycin (CLM) の哺乳動物細胞の染色体に及ぼす影響について, チャイニーズハムスター肺臓由来の Don 株細胞, ヒトの末梢白血球, 及びラットの骨髓細胞を用いて観察した。陽性対照として, mitomycin C (MMC) を使用した。

Don 株細胞では, CLM 10 µg/ml~500 µg/ml の濃度で染色体異常発現率は, 6%~20% を示し, MMC 作用群では, 83%の出現率であった。

ヒト末梢白血球を使用した時の出現率は, CLM で10~20%の細胞に, gap, break が, MMC では, 72%の細胞に異常が観察され, gap, break の他に chromatid translocation が観察された。ラット骨髓細胞においては, MMC 作用群が8.4%~20.8%であったのに対し, CLM ではきわめて少数であった。

すべてにおいて陽性対照の MMC よりも染色体異常出現率はるかに低い値を示したが, Don 株細胞を用いた実験では発育を抑制する濃度以下でも, 対照にくらべて異常発現率が高いことから, CLM が, 染色体異常を起こす可能性をまったく否定できないように思われる。

I 結 論

clindamycin は, *Streptomyces lincolnensis* var. *lincolnensis* の培養液中で生産された抗生物質 lincomycin から誘導されたものであり, 化学的には, 7-deoxy-7-chloro-lincomycin である。抗菌力は, lincomycin よりも強力で, 溶血レンサ球菌, 肺炎球菌のすべて, 嫌気性菌の大部分, 黄色ブドウ球菌の約60%は, clindamycin (以下 CLM とする) に感受性であり¹⁾, このような作用は生体内においても認められている²⁾。体内で代謝されて, 一部が N-demethyl-CLM に変化するが, この代謝物の抗菌力は, CLM と同等あるいはその2倍であると報告されている³⁾。

口腔領域の感染症は, グラム陽性菌に起因する場合が多いので, CLM の口腔領域における評価は高く^{4), 5)}, 口腔組織への移行は極めてすぐれている^{6), 7), 8)}。ただ, 本剤の大きな短所として, 高齢

者において, 偽膜性大腸炎による死亡例が報告されている^{9), 10), 11), 12), 13), 14), 15)}。また, 催奇性については, J. E. Gray, R. N. Weaver によって Sprague-Dawley ラットを用いて検索され, そのおそれが無いものと報告されたが¹⁶⁾, 胎仔に対する安全性が確立されていないという理由から妊婦に対する投与は, 望ましくないということになっている。

著者は, 動物細胞の染色体に対する, 本剤の影響を検索することにより, 胎仔に対する安全性についての新知見を得ることを目的に, 本研究を行った。

II 実験材料および実験方法

実験 1

A 実験材料

a) 細胞

クローニングを2回おこなったチャイニーズハム

Effect of clindamycin on chromosome of mammalian cells.

Sachiko SEKI (Department of Pharmacology, Nippon Dental College, Tokyo) (Director: Prof. Heiji MAIZUMI)

* 東京都千代田区富士見 1-9-20 (〒 102)

Jap. J. oral Biol., 18: 476-496, 1976.

ムスター肺臓由来の Don 株細胞を使用した。

細胞の継代培養は、次のようにしておこなった。培養瓶または、シャーレにて48時間培養後、培養液を捨て、シート状に附着している細胞を、0.05%トリプシンにて、剝離浮遊し新しい培養液を加え、トリプシンの作用を停止させる。ピペット操作により、細胞浮遊液を作り、新しい培養液をいれた培養瓶または、プラスチックシャーレに数滴植込み、37°C、5%炭酸ガス恒温器にて培養し、2日おきに培養液を全量交換して継代培養をおこなった。

b) 培養液

Eagle MEM 培地 (ニッサン) に、L-glutamin, L-serin, sodium pyruvate を加え、これを Na-HCO₃ で pH を 7.2 に調整し、20% 仔牛血清を加えたものを使用した。

c) 培養器具

継代培養には角型培養瓶 (T-tube)、細胞数算定には、角型培養管 (small square tube) を使用し、染色体標本作製及びクローニングには、プラスチックシャーレ (Lux 社製) を使用した。

d) 使用薬物

clindamycin hydrochloride (Dalacin—日本アップジョン社)、mitomycin C—以下MMC とする—(MITOMYCIN-S-三共) を上記培養液に所定の濃度に希釈し、実験に供した。

B 実験方法

a) 細胞の増殖ならびに形態的変化の観察

i) 細胞増殖に対する CLM 及び MMC の作用の観察

角型培養瓶より、トリプシンを使用して剝離浮遊させた細胞を、トリパン青にて染色し、生きている細胞を約 10,000cells/ml の細胞浮遊液とし、角型培養管 (small square tube) に 1 ml ずつ正確に植込み、37°C、5%炭酸ガス恒温器の中で培養した。培養24時間後、CLM および MMC を所定の濃度を含む培養液と交換し、さらに培養を続行した。対照は、薬物を含まない培養液をこれにあてた。培養中一定時間毎に、次のような方法で、細胞数算定を行なうとともに、位相差顕微鏡による形態的変化の観察を経時的に行なった。細胞数は、次のようにして算定した。

同型培養法を使用し、培養後 24時間、48時間、72時間、96時間毎に、クリスタル紫にて核染色を行った。検体数は、各検体ごとに3本を取り、Tatai (萱垣医理工工業製) の血球計算盤を使用して、1本につき3回数え、その平均値をもって各時間の細胞数とした。

ii) 形態的変化の観察

薬物作用後、24時間より、72時間目まで、位相差顕微鏡にて観察を行うとともに、必要に応じて、固定後、May-Grünwald Giemsa 染色標本作製し、顕微鏡写真撮影を行った。

b) 染色体標本の作製および観察法

クローニングを行った細胞を直径 6 cm のプラスチックシャーレに植込み、培養液交換後 24時間経過してから、CLM, MMC を含む培養液と交換して、4時間、24時間、48時間毎に染色体標本作製した。

i) 染色体標本作製法

観察時間約1時間前に、0.05μg/ml の colcemid を作用させる。観察時間の来たものは、培養液を別の容器に移し、シート状に硝子面に付着している細胞に対し、0.05%トリプシンを作用させ、細胞を剝離する。位相差顕微鏡で細胞の形態を観察し、その形態が円形に近くなったとき、元の培養液を加え、トリプシンの作用を停止させる。ピペット操作により均一な細胞浮遊液をつくり、ポリエチレン製の遠沈管に移し、1300 r.p.m. にて5分間遠沈する。遠沈後、上澄を捨て、1%クエン酸ナトリウム液約 2 ml を加え、20分室温に静置することにより低張処理を行う。20分経過後、メタノール3量、氷酢酸1量の固定液を 6 ml 加え固定する。固定液は使用の都度作成する。遠沈 1300 r.p.m. 5分後、上澄を捨て、再度固定液を加え固定する。固定後遠沈し、上澄を捨て、最終的に 1~1.5 ml の固定液に細胞を浮遊させる。

99.5%アルコール中に浸しておいたスライドガラスをガーゼでよくふき、細胞浮遊液をガラス上に滴下して自然乾燥させる。場合によっては、ドライヤーなどで温風を送り乾燥固定する air dry 法又は、スライドガラス上に2、3滴滴下し、ただちにガスバーナーの焰に近づけて、アルコールを燃やし、乾燥させる flame dry 法で作製し、10

倍～20倍に希釈した Giemsa 氏液で約15分間染色して、検鏡標本とする。

染色体の異常は、chromatid gap (gap), chromatid break (break), dicentric chromosome, chromatid translocation, ring chromosome などについて 200 個の細胞を観察し、分類した。

実験 2

A 実験材料

a) ヒト末梢白血球培養法

i) 血液採取法

採血部をアルコールで消毒したのち、ヘパリンで内壁をぬらした、滅菌注射筒にて、静脈血約 10ml を採取し実験に供した。

ii) 培養液

RPMI 1640 (ニッスイ) に NaHCO_3 を加え、pH を約 7.2 に調整したものを用い、使用直前に、phytohemagglutinin M (PHA-M) を加え培養を行なった。

iii) 培養器具

角型培養瓶 (T-tube) を使用した。

iv) 使用薬物

実験 1 の結果を参考とし、CLM 及び MMC を所定の濃度になるように培養液に加えた。

B 実験方法

採血した注射筒を、針を上にして垂直にし 1～2 時間放置後、plasma 層を分離させた。

PHA-M を所定の濃度で含む RPMI 1640 に、plasma が 1, RPMI 1640 が 4 の割合になるように混ぜて血球浮遊液をつくり、1.8ml ずつ T-tube に分注し、37°C, 5%炭酸ガス恒温器にて培養した。これに所定の濃度に培養液で希釈した CLM 及び MMC を加え、4 時間、24 時間、48 時間後に、染色体標本作製した。

C 染色体標本作製法

標本作製の 2～3 時間前に、colcemid 0.05 μg /ml を作用させ、観察時間のきたものは、実験 1 と同様に、低張処理、固定を行ない、flame dry 法により、染色体標本作製した。

D 染色体標本観察法

実験 1 と同様に、分裂中期の細胞で、よく広がり染色体の形と数が明瞭に識別できるものを 50 個数え、その中に染色体異常をもつ細胞がどの程度

あるかを実数で数え、1000 倍 (油浸法) にて顕微鏡写真撮影を行なった。又同じ標本で、無差別に、2,000 個の細胞中分裂期の細胞がいくつあるかを数え、mitotic index とした。

実験 3

A 実験材料

a) ラット骨髓細胞

3 週齢から 4 週齢の SD ラットを実験に使用した。

b) 使用薬物

実験 1 と同様である。

B 実験方法

薬物は 1 回 (急性試験)、および 24 時間間隔で 5 回 (亜急性試験) の 2 群について各々 5 匹ずつ腹腔内投与した。1 回投与群は、投与後、6 時間、24 時間、48 時間に、エーテル麻酔下で、大腿骨を取り出し、注射針を骨髓に挿入して生理食塩水で、遠沈管に洗い出し採取した。5 回投与群では、最終投与の 6 時間後に、上記と同様の方法で骨髓細胞を採取した。染色体標本作製にあたり、1 時間 30 分前に、約 4 mg/kg の colcemid を腹腔内投与した。

i) 染色体標本作製および観察法

遠沈管に採取された骨髓細胞は、ピペットを用いてよく懸濁させ、直ちに 1500 r.p.m. で 5 分間遠沈し、上澄を捨て、1%クエン酸ナトリウム液を 1 ml 加え、ピペットで攪拌後室温に 20 分間静置し、低張処理を行った。20 分経過後、メタノール 1 量、氷酢酸 1 量の固定液を静かに加え固定する。遠沈後、上澄をすて再度固定液を加え、固定遠沈し、最終的に 1～1.5ml の固定液に細胞を浮遊させる。以下は実験 1 と同様である。

ii) 染色体観察法

実験 2 と同様である。

III 実験結果

1. 実験 1

A Don 株細胞の増殖および形態におよぼす影響

a) 対照

細胞の増殖は、同一条件下でほぼ一定で、その倍加時間は、16 時間から 18 時間前後であった。形

図 1 対照, 培養24時間
位相差顕微鏡 ×200

図 2 対照, 培養72時間
位相差顕微鏡 ×200

態的には、ほぼ紡錘形で線維芽細胞様の形態を示し、外形、核、核小体は、明瞭に認められ、細胞質内とくに核の周辺には、顆粒が認められた(図1, 2)。

b) CLM 作用群 (表1, 図3)

CLM については、10 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 250 μ g/ml, 500 μ g/ml の各濃度のものの細胞増殖に対する影響がしらべられた。まず、薬物作用後24時間では、100 μ g/ml 以下の濃度では、対照とほぼ同じ増殖率を示したが、250 μ g/ml になると発育抑制の傾向を示し、24時間、48時間、72時間目では、対照が、33,200cells/ml, 96,800cells/ml, 454,700cells/ml となるのに対し、18,500cells/ml, 31,100cells/ml, 80,200cells/ml と減少していた。500 μ g/ml では、細胞数の減少がさらに著明で、各時点における細胞数は、16,100cells/ml, 21,100cells/ml, 19,700cells/ml で、作用後48時間目より、増殖は停止し、発育が完全に抑制された。

位相差顕微鏡観察によると、50 μ g/ml 以下の濃

図 3 Don 株細胞の発育に対する clindamycin の影響

表 1 Don 株細胞の発育に対する clindamycin の影響

培養時間 CLM 濃 度	24	48	72	96 時間
対 照	13,700	33,200	96,800	454,700
10 μ g/ml		33,100	93,700	315,400
50 μ g/ml		33,700	76,400	197,000
100 μ g/ml		28,800	63,700	136,500
250 μ g/ml		18,500	31,100	80,200
500 μ g/ml		16,100	21,100	19,700

度では、対照と変わらなかったが、100 μ g/ml では、作用後48時間で、形態的に変化が認められるようになり、外形が円形化あるいは、単純化の傾向を示す細胞が見られた(図4)。

250 μ g/ml では、作用後24時間目から、紡錘形ないしは単純化する傾向があり、細胞質内に、顆粒、空胞が多数認められ、48時間、72時間目では、細胞の形態変化はさらに明らかとなり、多核細胞が多くみられ、核周辺には、顆粒や、空胞が多数認められた(図5, 6)。

500 μ g/ml では、培養24時間より、すでに形態は円形化した細胞が多く、核は不明瞭で、核周辺

図 4 100 μ g/ml clindamycin 作用後48時間
位相差顕微鏡 $\times 200$

図 7 500 μ g/ml clindamycin 作用後24時間
位相差顕微鏡 $\times 200$

図 5 250 μ g/ml clindamycin 作用後48時間
位相差顕微鏡 $\times 200$

図 8 500 μ g/ml clindamycin 作用後72時間
位相差顕微鏡 $\times 200$

図 6 250 μ g/ml clindamycin 作用後72時間
位相差顕微鏡 $\times 200$

図 9 250 μ g/ml clindamycin 作用後24時間
May-Grünwald Giemsa 染色 $\times 400$

には、空胞が多数出現しているのが認められ、48時間、72時間では、細胞への障害がさらに著しかった(図7、8)。

May-Grünwald Giemsa 染色では、250 μ g/ml作用24時間後において、核が濃染するもの、多核となるものなどが認められた(図9)。また、500 μ g/mlを作用させたものでは、障害がさらに著明

となって、核濃縮を呈する細胞が多数にのぼっていた(図10)。

c) MMC 作用群(表2、図11)

MMC 0.00001 μ g/ml, 0.0001 μ g/ml, 0.001 μ g/ml, 0.01 μ g/ml, 0.05 μ g/ml, 0.1 μ g/ml, 1 μ g/mlを作用させると、0.0001 μ g/ml以下の濃度では、対照とほぼ同程度の増殖率を示し、0.001 μ g/ml

図 10 500µg/ml clindamycin 作用後24時間
May-Grünwald Giemsa 染色 ×400

図 11 Don 株細胞の発育に対する mitomycin C
の影響

の作用後 48 時間, 72 時間目では, 対照が 209,300 cells/ml, 466,100 cells/ml であるのに対し, 115,800 cells/ml, 272,700 cells/ml となり, 対照の約 50% に減少していた。

0.1 µg/ml では, 各時間で, 26,500 cells/ml, 32,700 cells/ml, 20,700 cells/ml で, 24 時間, 48 時間とわずかに, 増加の傾向であったが, 作用後 48 時間, 72 時間では, 増殖は停止し細胞数の減少がみられた。1 µg/ml では, 24 時間目より, 著明な

表 2 Don 株細胞の発育に対する mitomycin C
の影響

培養時間 MMC 濃 度	24	48	72	96 時間
対 照	22,400	59,400	209,300	466,100
0.00001 µg/ml		51,300	196,800	452,300
0.0001 µg/ml		49,700	182,800	433,900
0.001 µg/ml		43,600	115,800	272,700
0.01 µg/ml		34,000	58,100	115,700
0.05 µg/ml		29,800	57,100	98,300
0.1 µg/ml		26,500	32,700	20,700
1 µg/ml		15,800	9,300	8,000

図 12 0.001µg/ml mitomycin C 作用後48時間
位相差顕微鏡 ×200

図 13 0.01µg/ml mitomycin C 作用後72時間
位相差顕微鏡 ×200

細胞数の減少が認められた。

位相差顕微鏡による形態観察では, 0.001 µg/ml 以下の濃度においては 比較的变化は認められなかったが (図 12), 0.01 µg/ml では, 48 時間目より細胞形態が円形化する傾向を示すようになり, 細胞質内に顆粒を認め (図 13), 0.1 µg/ml では, 24 時間目より細胞質内に多くの 空胞が観察され, 48 時間, 72 時間では, 細胞が円形化し, 崩壊して

図 14 0.1 µg/ml mitomycin C 作用後72時間
位相差顕微鏡 ×200

図 17 1 µg/ml mitomycin C 作用後72時間
位相差顕微鏡 ×200

図 15 1 µg/ml mitomycin C 作用後24時間
位相差顕微鏡 ×200

図 18 0.01 µg/ml mitomycin C 作用後48時間
May-Grünwald Giemsa 染色 ×400

図 16 1 µg/ml mitomycin C 作用後48時間
位相差顕微鏡 ×200

図 19 0.1 µg/ml mitomycin C 作用後72時間
May-Grünwald Giemsa 染色 ×400

いるものも認められた(図14)。1 µg/ml では、24時間ですでに著明な変化が認められ、核は不明瞭となり、細胞は円形化あるいは崩壊していた(図15, 16, 17)。

May-Grünwald Giemsa 染色標本の観察では、0.01 µg/ml 以上の濃度が、48時間以上作用したものは、多核の細胞が多く認められた(図18, 19)。

B Don 株細胞の染色体の観察(図20, 21)

a) 対照

チャイニーズハムスター肺臓由来の Don 株細胞の染色体数は、 $2n=22$ 本を示し、図20に見られるような核型である。染色体異常は、gap が認められたが、各作用時間で、200個中2~3個の発現であった。

図 20 対照, Don 株細胞染色体核型

表 3 clindamycin による Don 株細胞の染色体異常

作用時間 CLM 濃度 異常の種類	4時間					24時間					48時間				
	対照	10	50	250	500	対照	10	50	250	500	対照	10	50	250	500
G	2	10	18	17	37	3	8	5	15	25	2	12	20	16	20
B	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
G+B	0	1	0	1	3	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
D	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3	3
D+G	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
O	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
総計 (%)	2 1	11 5.5	18 9	18 9	40 20	3 1.5	9 4.5	5 2.5	17 8.5	27 13.5	2 1	12 6	20 10	21 10.5	25 12.5

G, chromatid gap; B, chromatid break; D, dicentric chromosome; O, o-ring.
CLM の濃度は $\mu\text{g/ml}$

b) CLM 作用群 (表 3)

細胞の発育に障害を与えない程度の、 $10\mu\text{g/ml}$, $50\mu\text{g/ml}$ の濃度、及び細胞の発育を抑制する濃度 $250\mu\text{g/ml}$, $500\mu\text{g/ml}$ の濃度を作用させ、作用後

4時間、24時間、48時間毎に染色体標本を作製し、観察を行い、染色体異常を持つ細胞の数を示したものである。

薬物作用後 4時間では、各濃度において、200

- a : chromatid gap
b : chromatid break
c : dicentric chromosome
d : ring chromosome

図 21 clindamycin 作用による培養 Don 株細胞の染色体異常

個中, 10 μ g/ml では, gap が10個, gap+break が1個, 50 μ g/ml では, gap が18個, 250 μ g/ml では, gap が17個, gap+braek が1個観察され, 異常発現率は, 5.5 %, 9 %, 9 % と濃度のちがいによる異常発現率の差は認められなかったが, 500 μ g/ml では, gap が37個, gap+break が3個, 計40個と異常発現率は, 20 % に増加していた。作用後24時間では, dicentric chromosome が250 μ g/ml で1個, 500 μ g/ml で dicentric chromosome+gap が1個観察された。また48時間ではさらに, ring chromosome が, 250 μ g/ml 及び 500 μ g/ml で1個ずつ観察された。

小括

250 μ g/ml が作用したとき, 作用時間による染色体異常発現率の差はきわめて僅かであった。500 μ g/ml では, 4時間作用の時のほうが, 24時間, 48時間作用の時よりも, 異常発現率が明らかに大きかった。

総体的に, 10 μ g/ml でも, 対照にくらべて, 異

常の発現率が大きく, また薬物濃度の増加に比例して, 異常発現率も大となっていた。

c) MMC 作用群 (表4, 図22)

0.0001 μ g/ml, 0.01 μ g/ml, 0.05 μ g/ml, 0.1 μ g/ml の濃度について観察を行った。4時間では, 対照で, 2個 (1 %) gap が見られたが, MMC 作用群では, 発現率が, 0.0001 μ g/ml, 0.01 μ g/ml, 0.05 μ g/ml で, 6 %, 6.5 %, 7 % であって, 0.1 μ g/ml では14%を示した。24時間では, 異常の発現率が, 対照の1 % に対し, 0.01 μ g/ml, 0.05 μ g/ml, 0.1 μ g/ml で31.5%, 51.5%, 83%と著明に増加しており, gap や break の他に, dicentric chromosome や chromatid translocation, ring chromosome, fragment などが出現し, 0.1 μ g/ml では83%の高い値を示した。

48時間目では, 対照は, 1.5 % であつたが, 0.0001 μ g/ml, 0.01 μ g/ml で20.5%, 29.5%で0.1 μ g/ml, 0.05 μ g/ml の濃度では, 細胞の増殖が抑制され, 分裂期の細胞を観察することが不可能で

表 4 mitomycin C による Don 株細胞の染色体異常

作用時間 MMC 濃度 異常の種類	4 時 間					24 時 間					48 時 間				
	対照	0.0001	0.01	0.05	0.1	対照	0.0001	0.01	0.05	0.1	対照	0.0001	0.01	0.05	0.1
G	2	10	11	12	25	2	11	51	54	72	3	27	34	—	—
B	0	0	1	0	2	0	0	5	3	4	0	2	5	—	—
G+B	0	0	0	0	1	0	0	2	19	29	0	1	0	—	—
D	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	8	8	—	—
T	0	0	1	2	0	0	0	2	3	6	0	0	5	—	—
F	0	0	0	0	0	0	0	2	12	17	0	0	2	—	—
O	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	—	—
G+T	0	0	0	0	0	0	0	0	4	6	0	0	0	—	—
G+D	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	—	—
G+O	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	—	—
B+T	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	—	—
B+O	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	—	—
T+D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	—	—
G+B+O	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	—	—
G+B+T	0	0	0	0	0	0	0	0	4	12	0	0	1	—	—
G+B+F	0	0	0	0	0	0	2	0	0	16	0	0	0	—	—
総 計 (%)	2 1	12 6	13 6.5	14 7	28 14	2 1	13 6.5	63 31.5	103 51.5	166 83	3 1.5	41 20.5	59 29.5	—	—

G, chromatid gap ; B, chromatid break ; D, dicentric chromosome ; O, o-ring ; F, fragments ; T, chromatid translocation. MMC の濃度は μ g/ml.

a : chromatid gap
b : dicentric chromosome
c : ring chromosome
d : chromatid translocation

図 22 mitomycin C 作用による培養 Don 株細胞の染色体異常

図 23 対照, ヒト染色体核型

あった。

2. 実験 2

A ヒト末梢白血球培養による染色体の観察

a) 対照

ヒトの染色体数は、 $2n=46$ 本を示し(図23), 染色体異常は、50個中、2~4個の細胞に、gap の出現を認める程度であった。

b) CLM 作用群(図24, 表5)

Don 株細胞で発育を抑制する濃度、すなわち $250\mu\text{g/ml}$ と $500\mu\text{g/ml}$ を作用させ、細胞50個中染色体異常を認めるものの数を記録した。

認められた染色体異常はすべて、gap あるいは break であった。4時間作用のとき、対照での異常の発現は、gap が2個(4%)であって、 $250\mu\text{g/ml}$ では、gap が5個(10%)、 $500\mu\text{g/ml}$ では、

gap が6個(12%)であった。

24時間作用では、対照は gap が2個(4%)、 $250\mu\text{g/ml}$ では、gap が6個(12%)と break が1個(2%)、 $500\mu\text{g/ml}$ では gap が7個(14%)、break が2個(4%)であった。

48時間作用では、対照は gap が2個(4%)、 $250\mu\text{g/ml}$ は gap が10個(20%)、 $500\mu\text{g/ml}$ は gap が8個(16%)であった。

mitotic index は、4時間作用のときは対照(40/2000)とほとんど同じであったが、24時間作用で、対照の42/2000に対し、 $250\mu\text{g/ml}$ は15/2000、 $500\mu\text{g/ml}$ は11/2000となりかなり低下していた。

しかし、48時間作用では、対照も低下して22/2000となっており、これに対し、 $250\mu\text{g/ml}$ は20/

表 5 clindamycin によるヒト末梢白血球の染色体異常

作用時間	4時間			24時間			48時間		
MMC 濃度	対照	250	500	対照	250	500	対照	250	500
異常の種類									
chromatid gap	2	5	6	2	6	7	2	10	8
chromatid break	0	0	0	0	1	2	0	0	0
総計 (%)	2 (4)	5 (10)	6 (12)	2 (4)	7 (14)	9 (18)	2 (4)	10 (20)	8 (16)
mitotic index	$\frac{40}{2000}$	$\frac{42}{2000}$	$\frac{39}{2000}$	$\frac{42}{2000}$	$\frac{15}{2000}$	$\frac{11}{2000}$	$\frac{22}{2000}$	$\frac{20}{2000}$	$\frac{19}{2000}$

clindamycin の濃度は $\mu\text{g/ml}$

表 6 mitomycin C によるヒト末梢白血球の染色体異常

作用時間	4時間			24時間			48時間		
MMC 濃度	対照	0.01	0.1	対照	0.01	0.1	対照	0.01	0.1
異常の種類									
G	2	5	8	2	6	13	4	17	19
B	0	0	0	0	0	1	0	0	2
G+B	0	0	0	0	0	3	0	4	5
T	0	0	0	0	0	0	0	3	5
G+T	0	0	0	0	0	0	0	1	5
総計 (%)	2 (4)	5 (10)	8 (16)	2 (4)	6 (12)	17 (34)	4 (8)	25 (50)	36 (72)
mitotic index	$\frac{36}{2000}$	$\frac{30}{2000}$	$\frac{26}{2000}$	$\frac{47}{2000}$	$\frac{22}{2000}$	$\frac{12}{2000}$	$\frac{16}{2000}$	$\frac{8}{2000}$	$\frac{4}{2000}$

G, chromatid gap; B, chromatid break; T, chromatid translocation.

MMC の濃度は $\mu\text{g/ml}$.

上段 clindamycin 作用 a : chromatid gap
下段 mitomycin C 作用 b : chromatid gap
 chromatid break
 c : chromatid translocation
図 24 clindamycin, mitomycin C 作用による染色体異常

2000, 500 μ g/ml は19/2000で対照とほぼ同じ値を示し, 24時間作用の場合よりも多少高くなっていた。

c) MMC 作用群 (表 6, 図24)

0.01 μ g/ml, 0.1 μ g/ml の各々の濃度について, 染色体標本を作製し観察を行った。染色体異常の数は, 4時間作用ですでに, 0.01 μ g/ml の濃度で, gap が 5 個 (10%), 0.1 μ g/ml の濃度で gap が 8 個 (16 %) であったが, 24時間作用では, 0.01 μ g/ml で, gap が 6 個 (12%), 0.1 μ g/ml で, gap が 13個 (26%), break 1 個 (2 %), gap+break が 3 個 (6 %), 計17個 (34%) 見られた。4時間作用した場合よりも増加していた。

48時間作用では, 0.01 μ g/ml で gap 17 個 (34 %), gap+break が 4 個 (8 %), chromatid translocation が 3 個 (6 %), gap+translocation が 1 個 (2 %), 計 25 個(50%)に増加し, 又 0.1 μ g/ml

では, gap が19個 (38%), break が 2 個 (4 %), gap+baeak が 5 個 (10%), chromatid translocation 5 個 (10%), gap+translocation が 5 個 (10%), 計 36 個 (72%) であって, 24時間作用よりもさらに多くなっていた。また, 0.1 μ g/ml では, 24時間作用, 48時間作用とも, gap, break 以外の異常が認められ, とくに, 48時間作用の場合に高率であった。

mitotic index は, 対照も 48時間作用では, 低下していたが, MMC 作用群では, 薬剤濃度が高くなり, 作用時間が長くなるほど mitotic index が低下していた。

3. 実験 3 の結果

A ラット骨髓細胞染色体の観察

a) 対照

SD ラットの染色体数は, 2n=42 本を示し, 図 25 に見られるような核型である。染色体異常

表 7 ラット骨髓細胞に対する clindamycin の作用 (in vivo)

作用時間		急性試験												亜急性試験				
		6 時間				24 時間				48 時間								
CLM 投与量 mg/kg	対照	100	150	200	対照	100	150	200	対照	100	150	200	対照	50	100	150	200	
異常の種類																		
chromatid gap	0.2	1	0.8	0.2	0.4	0	0.2	0.4	0.2	0.2	0.8	2	0.6	1.2	0.2	1.2	0.6	
chromatid break	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
総 計 (%)	0.2 (0.4)	1 (2)	0.8 (1.6)	0.2 (0.4)	0.4 (0.8)	0 (0)	0.2 (0.4)	0.4 (0.8)	0.2 (0.4)	0.2 (0.4)	0.8 (1.6)	2 (4)	0.6 (1.2)	1.2 (2.4)	0.2 (0.4)	1.2 (2.4)	0.6 (1.2)	

表 8 ラット骨髓細胞に対する mitomycin C の作用 (in vivo)

作用時間		急性試験															亜急性試験					
		6 時 間					24 時 間					48 時 間										
MMC 投与量 mg/kg	対照	0.5	1	2	3	対照	0.5	1	2	3	対照	0.5	1	2	3	対照	0.5	1	1.5	2	3	
異常 の種類																						
chromatid gap	0.2	3.2	3.2	3.4	4.2	0.8	1.4	0.2	1.8	3.2	0.8	2	0.4	0.2	0.6	0.2	4.2	2.6	4.8	9	9.4	
chromatid break	0	1.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.2	0	0.8	0	
gap+break	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.2	1	
総 計 (%)	0.2 (0.4)	4.4 (8.8)	3.2 (6.4)	3.4 (6.8)	4.2 (8.4)	0.8 (1.6)	1.4 (2.8)	0.2 (0.4)	1.8 (3.6)	3.2 (6.4)	0.8 (1.6)	2 (4)	0.4 (0.8)	0.2 (0.4)	0.6 (1.2)	0.2 (0.4)	4.2 (8.4)	2.8 (5.6)	4.8 (9.6)	10 (20)	10.4 (20.8)

図 25 対照, ラット染色体核型

chromatid gap

図 26 clindamycin, mitomycin C 作用による染色体異常

は、50個中、gap が0.4%~1.2%であった。

b) CLM 作用群 (表7)

1回投与群では、100mg/kg, 150 mg/kg, 200 mg/kg, 連続5回投与群は、50mg/kg, 100mg/kg, 150mg/kg, 200mg/kg の濃度を腹腔内投与した。投与後6時間では、150mg/kg, 100mg/kg で gap が0.8個(1.6%), 1個(2%), 24時間目では、0.2個(0.4%), 0個, 48時間目で、200mg/kg, 150mg/kg の濃度では、2個(4%), 0.8個(1.6%) 認められた。5回投与群では、150 mg/kg, 100 mg/kg, 50 mg/kg で、それぞれ1.2個(2.4%), 0.2個(0.4%), 1.2個(2.4%) 認められた。

c) MMC 作用群 (表8)

1回投与群の投与量は、0.5mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg であった。投与後6時間の骨髓細胞の染色体異常は、対照では、0.2個(0.4%), 3 mg/kg, 2 mg/kg, 1 mg/kg で gap が4.2個(8.4%), 3.4個(6.8%), 3.2個(6.4%) で、0.5mg/kg では、gap が3.2個, break が1.2個, 計4.4個(8.8%) であった。

投与後24時間では、対照で、gap が0.8個(1.6%), 3 mg/kg で gap が3.2個(6.4%), 2 mg/kg で1.8個(3.6%), 1 mg/kg で0.2個(0.4%), 0.5mg/kg で1.4個(2.8%) であった。

投与後48時間では、対照で gap が0.8個(1.6%), 3 mg/kg で gap が0.6個(1.2%), 2 mg/kg で0.2個(0.4%), 1 mg/kg で0.4個(0.8%), 0.5mg/kg で gap が2個(4%) であった。5日間投与では、3 mg/kg で gap が9.4個, gap と break 両方が見られたものが1個, 合計10.4個(20.8%) であった。この1例は1個の細胞中に gap が2個, break が2個認められたものである。

2 mg/kg では gap が9個, break が0.8個, gap+break が0.2個, 合計10個(20%) で、1.5mg/kg では gap が4.8個(9.6%), 1 mg/kg では gap が2.6個, break が0.2個, 計2.8個(5.6%), 0.5 mg/kg では gap が4.2個(8.4%) であった(図26)。

IV 総括ならびに考察

本実験において、哺乳動物細胞に対する CLM の影響を判定するために、薬物を作用させない対照の他に、抗悪性腫瘍抗生物質の MMC を陽性

対照として用いた。

MMC は東京渋谷区上智町の土壌から分離された *Streptomyces caespitosus* V-621株の培養液中に産生された抗生物質である¹⁷⁾。MMC が染色体異常を惹起することはよく知られており、またその作用は、chromatid type であると言われている¹⁸⁾。

著者はさきに、Don 株細胞を用いて、tetracycline による染色体異常を探索したが¹⁹⁾、その成績も参考とすることにした。

CLM は、Don 株細胞の発育を、250 μ g/ml において明らかに抑制し、500 μ g/ml では、発育の阻止がみられた。またこの濃度で細胞が重大な打撃を受けていることが染色体標本によって認められた。染色体の観察において、500 μ g/ml を作用させた時に、染色体異常の認められた細胞は、4時間作用群において最も多く、48時間作用群において最も少なかった。これは、作用時間が長くなると共に細胞の障害が一層大となり、それが染色体の観察結果に影響したものと考えられる。

tetracycline について観察した時も同じような現象がみられたが、この時には、薬物の濃度が、細胞の発育にほとんど影響しない程度であったので、tetracycline に対して特に強い感受性を持つ細胞が淘汰されたためであると解釈した。

今回の実験では、一般に高い薬物濃度で作用させてはいるが、10 μ g/ml でも、対照にくらべて、染色体異常発現率が明らかに高いことから、Don 株細胞にかんする限り、CLM は、染色体異常を起す可能性を否定できない。

MMC は、きわめて低濃度で、Don 株細胞の発育を抑制したが、ほとんど抑制を示さない濃度(0.0001 μ g/ml) から、明らかに抑制を示す濃度(0.01 μ g/ml) 及びそれよりさらに高い濃度で、染色体に対する影響を観察した。

この場合は、0.0001 μ g/ml ですでに異常を発現しており、48時間作用させたものでは、gap や break のみでなく、dicentric chromosome, ring chromosome が見られた。0.1 μ g/ml では、異常の発現が著しく、24時間目に、36%の細胞に gap がみられた。又24時間作用群では、gap や break のほか、exchange が0.1 μ g/ml はもちろん 0.01

$\mu\text{g/ml}$ にもみられた。このような所見は、MMC が chromosome type の染色体異常をもおこしうることを示している。

ヒト末梢白血球 染色体に対する CLM の影響は、ほとんど gap として現われ、break はわずかであった。しかし、4時間作用群ですでに $250 \mu\text{g/ml}$ において、gap が生じていた。

この傾向は、作用時間を24時間、48時間と延長するにつれて高率となった。

著者らが行った tetracycline に関する実験では²⁰⁾、ヒト末梢血に染色体異常を認めなかった。ただし、この場合は、 $10 \mu\text{g/ml}$ から $50 \mu\text{g/ml}$ までの間で実験を行ったので、今回の実験よりも低濃度である。これは絶対量が少ないばかりでなく $50 \mu\text{g/ml}$ の tetracycline でも、Don 株細胞の発育にわずかの影響しか与えることができなかった。

Westrand は、ヒトリリンパ球に tetracycline を作用させた時、低濃度において、gap, break, chromatid translocation などの染色体異常の出現を報告し、このことから、催奇性の存在を心配している²¹⁾。

著者の成績は、かなり、苛酷な濃度で行った実験によるものであるから、これをもって催奇性の有無を判定することは無理である。ヒトリリンパ球に対する MMC の作用は、きわめて強く、著者の実験において、 $0.001 \mu\text{g/ml}$ で、明らかな発育の抑制がみられた。Cohen らは、 $5 \mu\text{g/ml}$ で細胞の完全な崩壊をみ、 $1.0 \mu\text{g/ml}$ で著明な分裂の抑制と染色体異常を、 $0.1 \mu\text{g/ml}$ では細胞のこうむる障害がそれよりも少なくなっていたと報告している。これらの数字は、著者の得た成績に近い²²⁾。

本実験において、MMC は、 $0.01 \mu\text{g/ml}$ で4時間作用させた場合にも gap が認められ、作用時間が長くなれば異常の出現率も増大した。特に48時間作用群において、 $0.01 \mu\text{g/ml}$ から $0.1 \mu\text{g/ml}$ の両者において、chromatid translocation が前者で8%、後者で20%認められた。

MMC の作用を受けた人リンパ球における exchange は、多くの研究者によって報告されており、相同染色体の場合は、1-1, 9-9, の組合せが特に多い^{23,24,25,26)}。

著者の実験では、mitotic index が対照においても実験開始してから48時間後において、著明に小さくなっていた。これは、培養開始してから、96時間経過している事を意味しており培養条件が低下していたためと思われる。この場合 mitotic index は、時間の経過と共に小さくなっていたが、染色体異常の発現はますます高率となっていた。

P. C. Nowell は、cell cycle を構成する各時期に、MMC $1 \mu\text{g/ml}$ を1時間作用させており、実験開始後、62時間までの間に、MMC を作用させると、mitotic index が著明に低下するが、68~72時間の時期に作用させると、mitotic index の低下はわずかであったと報告している。また同時に染色体異常もしらべているが、cell cycle の過程がすすむにつれてその発生率が低下し、68~72時間の時点では、わずかに2%であった。

著者は、MMC を連続して作用させたので、Nowell とは異った成績をえている²⁶⁾。

CLM をラットに注射して、骨髓細胞の染色体におよぼす影響を調べたが、異常の発現はきわめてわずかであって、 200 mg/kg 1回投与48時間後に、gap が4%の細胞に認められた程度である。5日連続投与の場合は、 150 mg/kg の注射を行った時、gap が2.4%認められたにすぎない。この投与量は、一般に LD_{50} とされている値（一回投与 273 mg/kg ）に近いものであって、成人の標準投与量（1回 150 mg 、1日 600 mg ）に比較すれば、かなりの大量である。したがって、CLM によるラット骨髓細胞染色体の変化は、まったく否定する事はできないが、異常を生ずる言うには、あまりにその発現が低率であった。

MMC の作用は、 3 mg/kg ならびに 2 mg/kg で明らかに、gap と break が見られたが、投与後48時間には、その様な異常が、きわめてわずかとなっており、注射後時間の経過するにつれて、異常の発現率が減少する傾向を示した。これは正常状態への回復を意味しているものと考えられる。5日間連続投与した場合には、染色体異常の発現が一層著明となり、 0.5 mg/kg 投与群でも、異常が8.4%の細胞においてみられた。

V 結 論

CLM ならびに MMC を、哺乳動物細胞に作用させて、染色体異常を検索した結果、次のような成績をえた。

1. CLM は、Don 株細胞の発育を、10 μ g/ml でわずかに、50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 250 μ g/ml で中等度に抑制し、500 μ g/ml で著明な抑制を示した。

2. MMC は、0.001 μ g/ml, 0.01 μ g/ml, 0.05 μ g/ml で、Don 株細胞の発育を中等度に抑制し、0.1 μ g/ml で著明な抑制を示した。1 μ g/ml では、細胞数の減少が認められた。

3. 培養 Don 株細胞に、CLM 10 μ g/ml, 50 μ g/ml, 250 μ g/ml, 500 μ g/ml を作用させて、染色体に及ぼす影響を観察したところ、作用時間に関係なく、chromatid gap を主とする異常を認めた。又その異常発現率は、CLM の濃度が増すとともに大となっていた。

4. MMC の培養 Don 株細胞染色体に対する作用は、0.0001 μ g/ml から 0.1 μ g/ml までの濃度において観察されたが、この場合は、gap の他、break, dicentric chromosome, chromatid translocation, fragment, ring chromosome などの異常が見られた。特に、48時間後は、細胞の障害が大であると共に、異常の発現率も大であった。

5. ヒト末梢白血球染色体に対する、CLM の作用は、250 μ g/ml, 500 μ g/ml で観察したが、10~20%の細胞において、gap あるいは、break が認められた。異常の発現率は、作用時間を長くすると、多少増加していた。

6. ヒト末梢白血球染色体に対する MMC の作用は、0.01 μ g/ml から 0.1 μ g/ml で検索したところ、異常の発現率は、作用時間が長いほど大きくなり、0.1 μ g/ml 48時間作用で、72%の細胞で異常がみられた。また、その内容も gap, break のみでなく、translocation もかなりみられた。

7. CLM 50mg/kg, 100mg/kg, 150mg/kg, 200mg/kg を注射したラットの骨髓細胞において、染色体異常が認められたが、きわめて小数であった。

8. MMC 0.5mg/kg, 1mg/kg, 1.5mg/kg, 2mg/kg, 3mg/kg を注射したラットの骨髓細胞

において、異常が認められ、とくに5日間連続投与したものでは、20.8%の細胞において異常が観察された。

9. 以上の知見と、著者らが前におこなった tetracycline に関する実験を比較した結果、LCM の胎仔に対する安全性は tetracycline のそれよりも、かなり高いものであることがわかった。

本論文作成にあたり、終始御指導をいただいた、真泉平治教授、大森庸講師をはじめ、御協力くださった、日本歯科大学薬理学教室教室員の皆様に深謝の意を表します。

文 献

- 1) 小酒井望, 猪狩 淳, 小栗豊子: 最近分離した各種病原細菌の Clindamycin および Lincomycin に対する感受性について. *Chemotherapy*, 17: 758-762, 1969.
- 2) 中沢昭三, 小野尚子, 目片 勇, 堯天昱枝, 窪地純子: Clindamycin に関する細菌学的研究. *Chemotherapy*, 17: 752-757, 1969.
- 3) 松井克彦: Clindamycin の代謝に関する研究. *Chemotherapy*, 18: 1025-1030, 1970.
- 4) 白川正順, 関口洋介, 引間 功, 福田敏雄: 口腔感染症に対する Clindamycin の基礎的ならびに臨床的検討. 歯界展望, 43 (3): 461-466, 1974.
- 5) 服部孝範ほか: 口腔外科領域における Clindamycin の臨床的研究. 口外誌, 17(4): 317-318 1971.
- 6) 続益展ほか: 口腔外科領域における Clindamycin (7-chlorolincomycin) の基礎的ならびに臨床的検討. 口外誌, 17 (2): 165-171, 1971.
- 7) 玉井健三ほか: 歯科口腔外科領域における抗生剤の組織内濃度について (第2報) Clindamycin の基礎実験, 特に顎骨内濃度と臨床効果. 口外誌, 20 (4): 742-749, 1971.
- 8) 佐々木次郎ほか: Clindamycin の組織内濃度測定ならびに臨床的検討. 口外誌, 17 (2): 163-164, 1971.
- 9) SCOTT, A. J., et al.: Lincomycin as a cause of Pseudomembranous Colitis. *Lancet*, 1973, ii, 1232-1234.
- 10) TEDESCO, F. J., et al.: Diagnostic Features of Clindamycin-Associated Pseudomembranous Colitis. *New England Journal of Medicine*, 290: 841-843, 1974.
- 11) TEDESCO, F. J., et al.: Clindamycin-Associated Colitis. A Prospective Study. *Annals of Internal Medicine*, 81: 429-433, 1974.
- 12) WELLS, R. F.: Clindamycin-Associated Colitis. *Annals of Internal Medicine*, 81: 547-548, 1974.

- 13) TEDESCO, F. J., and ALPERS, D. H.: Pseudomembranous Colitis. *The Western Journal of Medicine*, 121 : 499-500, 1974.
- 14) 高杉益充 : リンコマイシンによる偽膜性大腸炎. 医薬ジャーナル, 11 (3) : 43-45, 1975.
- 15) 竹本忠良 : 消化器病学. Clindamycin in Colitis. 日本医事新報, No. 2653, 3-15, 1975.
- 16) GRAY, J. E., and WEAVER, R. N.: U-21251 F; Teratogenic (Wilson) and Reproductive Study in the Sprague-Dawley Rat. The Upjohn Company: 1-8, 1967.
- 17) 日本抗生物質 医薬品基準 解説. 1971. p. 792-794, 薬業時報社.
- 18) KIHLMAN, B. A.: Actions of Chemicals on Dividing Cells. *Prentice-Hall, Inc.*: p. 132-134, 1965.
- 19) 大森 庸, 鈴木蓉子, 関さち子, 前山博子 : Tetracycline の催奇形作用に関する研究. 第一報, Tetracycline による Don 株細胞の染色体異常. 神奈川歯科大学機関誌, 9 : 25-35, 1974.
- 20) SEKI, S., et al.: Teratological studies on tetracycline. *Jap. J. Pharmacol.*, 25, Suppl., 150P-151P, 1975.
- 21) WESTRAND, M. M.: Effects of tetracycline on chromosomes cultured from human lymphocytes. *J.A.M.W.A.*, 22 : 719-724, 1967.
- 22) COHEN, M. M., and SHAW, M. W.: Effects of mitomycin C on human chromosomes. *J. Cell Biol.*, 23 : 386-395, 1964.
- 23) MORAD, M., JONASSON, J., and LINDSTEN, J.: Distribution of mitomycin C induced breaks on human chromosomes. *Hereditas*, 74 : 273-281, 1973.
- 24) BRØGGER, A., and JOHANSON, J.: A model for the production of chromosome damage by mitomycin C. *Chromosoma (Berl.)*, 38 : 95-104, 1972.
- 25) SHAW, M. W., and COHEN, M. M.: Chromosome exchanges in human leukocytes induced by mitomycin C. *Genetics*, 51 : 181-190, 1965.
- 26) NOWELL, P. C.: Mitotic inhibition and chromosome damage by mitomycin in human leukocyte cultures. *Experimental Cell Research*, 33 : 445-449, 1964.