

## 結語

ヒトにおけるOFLXのCおよび $C_{CSF}$ 推移の予測に関する本研究の結論を以下に記した。

- (1) ヒトにおけるC推移は、各種動物における体重と体内動態パラメータとのアロメトリックな相関関係に基づき動物からヒトへ外挿されたVおよび $CL_p$ を用いて予測することができた。
- (2) ヒトにおける血液からCSFへの移行性は、各種動物における脳重量と中枢移行性に関するパラメータとのアロメトリックな相関関係に基づき動物からヒトへ外挿されたPSおよび $CL_{eff}$ を用いて予測することができた。
- (3) ヒトにおける $C_{CSF}$ の解析には、ヒトのCSFは腰椎穿刺によって採取されるため、脳室内CSFと腰椎内CSFとの間における薬物濃度の相違を考慮する必要があることが分かった。
- (4) ヒトにおける $C_{CSF}$ 推移は、(1)において予測したC推移を入力関数とし、(2)において外挿したPSおよび $CL_{eff}$ と(3)における脳室内CSFと腰椎内CSFからなるCSFの生理学的なコンパートメント-モデルを用いることによって、予測することができた。
- (5) 以上の予測方法により、ヒトにおける薬物のCSF移行性は、動物における体内動態に関するデータとヒトにおける $f_u$ 、投与量および体重だけの限られた情報だけから予測することが可能になると考えられた。

## 引用文献

1. E. E. Adolph. Quantitative relations in the physiological constitutions of mammals. *Science*, **109**: 579-585 (1949).
2. R. L. Dedrick, D. D. Forester, J. N. Cannon, S. M. ElDareen and L. B. Mellett.  
Pharmacokinetics of 1- $\beta$ -D-arbino-furanoslycytocine (Ara-C) deamination in several species.  
*Biochem. Pharmacol.*, **22**: 2405-2417 (1973).
3. R. L. Dedrick, K. B. Bischoff and D. S. Zaharko. Interspecies correlation of plasma concentration history of methotrexate (NSC-740). *Cancer Chemother. Rep.* **54**: 95-101 (1970).
4. R. L. Dedrick. Animal scale-up. *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **1**: 435-461 (1973).
5. H. Boxenbaum. Interspecies scaling, allometry, physiological time, and the ground plan of pharmacokinetics. *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **10**: 201-227 (1982).
6. H. Boxenbaum. Comparative pharmacokinetics of benzodiazepines in dog and man. *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **10**: 411-426 (1982).
7. Y. Sawada, M. Hanano, Y. Sugiyama, and T. Iga. Prediction of the disposition of  $\beta$ -lactam antibiotics in humans from pharmacokinetic parameters in animals. *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **12**: 241-261 (1984).
8. Y. Sawada, M. Hanano, Y. Sugiyama, H. Harashima, and T. Iga. Prediction of the volumes of distribution of basic drugs in human based on data from animals. *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **12**: 587-596 (1984).
9. Y. Sawada, H. Harashima, M. Hanano, Y. Sugiyama, and T. Iga. Prediction of the plasma concentration time courses of various drugs in humans based on data from rats. *J. Pharmacobio-Dyn.*, **8**: 757-766 (1985).
10. Y. Sawada, M. Hanano, Y. Sugiyama, and T. Iga. Prediction of the disposition of nine weakly acidic and six weakly basic drugs in humans from pharmacokinetic parameters in rats. *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **13**: 477-492 (1985).
11. R. L. Dedrick, E. H. Oldfield, and J. M. Collins. Arterial drug infusion with particular reference

- to the brain. *Cancer Treat. Rep.*, **68**: 373-380 (1984).
12. R. L. Dedrick. Interspecies scaling of regional drug delivery. *J. Pharm. Sci.*, **75**: 1047-1052 (1986).
  13. A. Ito, K. Hirai, M. Inoue, H. Koga, S. Suzue and S. Mitsuhashi. *In vitro* antibacterial activity of AM-715, a new nalidixic analog. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **17**: 103-108 (1980).
  14. J. Matsumoto, T. Miyamoto, A. Minamida, Y. Nishimura, H. Egawa and H. Nishimura. Structure-activity relationships of 4-oxo-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acids including AT-2266, a new oral antipseudomonal agent. *Current Chemotherapy and Infectious Disease*, Ed. by J. D. Nelson and C. Grassi, 1980, American Society of Microbiology, Washington, D.C., p.454-456.
  15. K. Sato, Y. Matsuura, M. Inoue, T. Une, Y. Osada, H. Ogawa and S. Mitsuhashi. *In vitro* and *in vivo* activity of DL-8280, a new oxazine derivative. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **22**: 548-553 (1982).
  16. R. Wise, J. M. Andrews and L. J. Edwards. *In vitro* activity of BAY o 9867, a new quinolone derivative, compared with those of other antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **23**: 559-564 (1983).
  17. R. Malinverni and M. P. Glauser. Comparative studies of fluoroquinolones in the treatment of urinary tract infections. *Rev. Infect. Dis.*, **10** (Suppl.1): S153-S163 (1988).
  18. J.-P. Thys. Quinolones in the treatment of bronchopulmonary infections. *Rev. Infect. Dis.*, **10** (Suppl.1): S212-S217 (1988).
  19. J. H. Paton and D. S. Reeves. Clinical features and management of adverse effects of quinolone antibacterials. *Drug Safety*, **6**: 8-27 (1991).
  20. W. Christ, T. Lehnert, and B. Ulbrich. Specific toxicologic aspects of the quinolones. *Rev. Infect. Dis.*, **10** (Suppl.1): S141-S146 (1988).
  21. G. Takeo, N. Shibuya, M. Motomura, H. Kanazawa and H. Shishido. A new DNA gyrase inhibitor induces convulsions: A case report and animal experiments. *Chemotherapy* (Tokyo), **37**: 1154-1159 (1989).
  22. J. H. Paton, and D. S. Reeves. Clinical features and management of adverse effects of quinolone antibacterials. *Drug Safety*, **6**: 8-27 (1991).

23. H. Sato, E. Okezaki, S. Yamamoto, O. Nagata, H. Kato, and A. Tsuji. Entry of the new quinolone antibacterial agents of ofloxacin and NY-198 into the central nervous system in rats. *J. Pharmacobio-Dyn.*, **11**: 386-394 (1988).
24. G. Valanis, D. Thomas, and G. Pankey. Penetration of ciprofloxacin into cerebrospinal fluid. *Eur. J. Clin. Microbiol.*, **5**: 206-207 (1986).
25. J. B. McClain, J. Rhoads, and G. Krol. Cerebrospinal fluid concentrations of ciprofloxacin in subjects with uninflamed meninges. *J. Antimicrob. Chemother.*, **21**: 808-809 (1988).
26. D. N. Gerding and J. A. Hitt. Tissue penetration of the new quinolones in humans. *Rev. Infect. Dis.*, **11** (suppl. 5): S1046-S1057 (1989).
27. W. M. Scheld. Quinolone therapy for infections of the central nervous system. *Rev. Infect. Dis.*, **11** (suppl.5): S1194-S1202 (1989).
28. K. Kawahara. Penetration of fluoroquinolones into human cerebrospinal fluid. *Chemotherapy* (Tokyo), **38**: 461-476 (1990).
29. K. Kawahara, M. Kawahara, T. Goto and Y. Ohi. Penetration of sparfloxacin into the human spinal fluid: a comparative study with 5 other fluoroquinolones. *Chemotherapy* (Tokyo), **39** (Suppl.4): 149-157 (1991).
30. T. V. Tho, A. Armengaud, and B. Davet. Diffusion of enoxacin into the cerebrospinal fluid in dogs with healthy meninges and with experimental meningitis. *J. Antimicrob. Chemother.*, **14** (suppl. C): 57-62 (1984).
31. F. Taga, F. Kobayashi, S. Saito, T. Ooie, F. Kawahara, H. Uchida, J. Shimada, S. Hori and O. Sakai. Possibility for induction of convulsion by fleroxacin and its disposition in the central nervous system. *Arzneim. Forsch.*, **40**: 900-904 (1990).
32. N. Bitar, R. Claes, and P. V. der Auwera. Concentration of ofloxacin in serum and cerebrospinal fluid of patients without meningitis receiving the drug intravenously and orally. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **33**: 1686-1690 (1989).
33. M. Drancourt, H. Gallais, D. Raoult, E. Estrangin, M. N. Mallet, and P. de Micco. Ofloxacin penetration into cerebrospinal fluid. *J. Antimicrob. Chemother.*, **22**: 263-265 (1988).
34. A. M. Shibl, C. J. Hackbarth, and M. A. Sande. Evaluation of pefloxacin in experimental

- Escherichia coli* meningitis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **29**: 409-411 (1986).
35. M. Neuman. Clinical pharmacokinetics of the newer antibacterial 4-quinolones. *Clin. Pharmacokin.*, **14**: 96-121 (1988).
  36. J. Dow, J. Chazal, A. M. Frydman, R. Woehrlé, F. Djebbar, and J. Gaillot. Transfer kinetics of pefloxacin into cerebro-spinal fluid after one hour iv infusion of 400 mg in man. *J. Antimicrob. Chemother.*, **17** (suppl. B): 81-87 (1986).
  37. K. Yamaoka, Y. Tanigawara, T. Nakagawa and T. Uno. A pharmacokinetic analysis program (MULTI) for microcomputer. *J. Pharmacobio Dyn.*, **4**: 879-885 (1981).
  38. M. Gibaldi and D. Perrier, "Drugs and the Pharmaceutical Sciences, vol. 1., Pharmacokinetics", ed. by J.Swarbrick, Marcel Dekker, Inc., New York, 1975.
  39. M. D. Karol, P. V.-Pedersen, and R. E. Brashear. Diffusion and flow transfer of theophylline across the blood-brain barrier: pharmacokinetic analysis. *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **11**: 273-287 (1983).
  40. J. M. Collins and L. Dedrick. Distributed model for drug delivery to CSF and brain tissue. *Am. J. Physiol.*, **245**: R303-R310 (1983).
  41. R. G. Blasberg, C. S. Patlak, and W. R. Shapiro. Distribution of methotrexate in the cerebrospinal fluid and brain after intraventricular administration. *Cancer Treat. Rep.*, **61**: 633-641 (1977).
  42. W. R. Shapiro, D. F. Young, and B. M. Mehta. Methotrexate: Distribution in cerebrospinal fluid after intravenous, ventricular and lumbar injections. *N. Engl. J. Med.*, **293**: 161-166 (1975).
  43. H. F. Cserr and B. J. Berman. Iodide and thiocyanate efflux from brain following injection into rat caudate nucleus. *Am. J. Physiol.*, **235**: F331-F337 (1978).
  44. H. Cserr. Potassium exchange between cerebrospinal fluid, plasma, and brain. *Am. J. Physiol.*, **209**: 1219-1226 (1965).
  45. R. E. Harbut and C. E. Johanson. Third ventricle choroid plexus function and its response to acute perturbations in plasma chemistry. *Brain Res.*, **374**: 137-146 (1986).
  46. M. Pollay and H. Davson. The passage of certain substances out of the cerebrospinal fluid. *Brain*, **86**: 137-150 (1963).

47. K. Welch. Secretion of cerebrospinal fluid by choroid plexus of the rabbit. *Am. J. Physiol.*, **205**: 617-624 (1963).
48. A. V. Lorenzo and S. R. Snodgrass. Leucine transport from the ventricles and the cranial subarachnoid space in the cat. *J. Neurochem.*, **19**: 1287-1298 (1972).
49. R. Spector and A. V. Lorenzo. The transport and metabolism of salicylate in the central nervous system: in vivo studies. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **185**: 276-286 (1973).
50. S.R. Heisey, D. Held, and J. R. Pappenheimer. Bulk flow and diffusion in the cerebrospinal fluid system of the goat. *Am. J. Physiol.*, **203**: 775-781 (1962).
51. E. A. Bering Jr. Circulation of the cerebrospinal fluid; demonstration of the choroid plexuses as the generator of the force for flow of fluid and ventricular enlargement. *J. Neurosurg.*, **19**: 405-413 (1962).
52. A. Sahar. The effect of pressure on the production of cerebrospinal fluid by the choroid plexus. *J. Neurol. Sci.*, **16**: 49-58 (1972).
53. W. W. Oppelt, T. H. Maren, E. S. Owens, and D. P. Rall. Effects of acid-base alterations on cerebrospinal fluid production. *Proc. Soc. Exp. Biol. (N. Y.)*, **114**: 86-89 (1963).
54. E. A. Bering Jr. Cerebrospinal fluid production and its relationship to cerebral metabolism and cerebral blood flow. *Am. J. Physiol.*, **197**: 825-828 (1959).
55. "Biology Data Book, 2nd ed., vol. 3", ed. by P. L. Alyman and D. S. Dittmer, Federation of American Societies for Experimental Biology, Bethesda, Maryland, 1974.
56. A. Tuji, H. Sato, Y. Kume, I. Tamai, E. Okezaki, O. Nagata and H. Kato. Inhibitory effects of quinolone antibacterial agents on  $\gamma$ -aminobutyric acid binding to receptor sites in rat brain membranes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **32**: 190-194 (1988).
57. S. Nakamura, N. Kurobe, S. Kashimoto, T. Ohue, Y. Takase, and M. Shimizu. Absorption, distribution, excretion and metabolism of AT-2266 in experimental animals. *Chemotherapy (Tokyo)*, **32** (suppl. 3): 86-94 (1984).
58. M. Kawai, M. Nakanishi, and N. Maekawa. Phase I study of AT-2266. *Chemotherapy (Tokyo)*, **32** (suppl. 3): 334-358 (1984).
59. E. Okezaki, K. Ohmishi, S. Koike, Y. Takahashi, and E. Makino. Disposition and metabolism of

- NY-198 I: bioassay study of absorption, distribution and excretion in various animals. *Chemotherapy* (Tokyo), **36** (suppl. 2): 132-137 (1988).
60. E. Okezaki, E. Makino, K. Ohmishi, O. Nagata, T. Yamada and K. Takahashi. Disposition and metabolism of NY-198 II: HPLC and bioassay studies of absorption and excretion in dog. *Chemotherapy* (Tokyo), **36** (suppl. 2): 138-143 (1988).
61. O. Nagata, T. Yamada, K. Takahashi, E. Okezaki, T. Yanagida and H. Nakanishi. Disposition and metabolism of NY-198 III: absorption, metabolism and excretion of NY-198 in monkeys by high-performance liquid chromatography. *Chemotherapy* (Tokyo), **36** (suppl. 2): 144-150 (1988).
62. O. Nagata, T. Yamada, T. Yamaguchi, E. Okezaki, T. Terasaki, and A. Tsuji. Disposition and metabolism of NY-198 IV: absorption, distribution and excretion of  $^{14}\text{C}$ -NY-198 in rats and dogs. *Chemotherapy* (Tokyo), **36** (suppl. 2): 151-173 (1988).
63. M. Nakashima, T. Uematsu, Y. Takiguchi, A. Mizuno, and M. Kanamaru. Phase I study on NY-198. *Chemotherapy* (Tokyo), **36** (suppl. 2): 201-239 (1988).
64. S. Murayama, K. Hirai, A. Ito, Y. Abe, and T. Irikura. Studies on absorption, distribution and excretion of AM-715 in animals by bioassay method. *Chemotherapy* (Tokyo), **29** (suppl. 4): 98-104 (1981).
65. Y. Nagatsu, K. Endo, and T. Irikura. Studies on the fate of  $^{14}\text{C}$ -labelled AM-715. *Chemotherapy* (Tokyo), **29** (suppl. 4): 105-118 (1981).
66. T. Abiko and A. Ishihama. Phase I study on AM-715. *Chemotherapy* (Tokyo), **29** (suppl. 4): 136-145 (1981).
67. M. Tsumura, K. Sato, T. Une, and H. Tachizawa. Metabolic disposition of DL-8280. The first report: comparison between absorption and excretion of DL-8280 in the dog and monkey by bioassay and HPLC methods. *Chemotherapy* (Tokyo), **32** (suppl. 1): 1179-1184 (1984).
68. O. Okazaki, T. Kurata, K. Hashimoto, K. Sudo, M. Tsumura and H. Tachizawa. Metabolic disposition of DL-8280: the second report: absorption, distribution and excretion of  $^{14}\text{C}$ -DL-8280 in various animal species. *Chemotherapy* (Tokyo), **32** (suppl. 1): 1185-1202

- (1984).
69. N. Ichihara. Phase I study on DL-8280. *Chemotherapy* (Tokyo), **32** (suppl. 1): 118-149 (1984).
  70. G. Montay, Y. Goueffon, and F. Roquet. Absorption, distribution, metabolic fate, and elimination of pefloxacin mesylate in mice, rats, dogs, monkeys, and humans. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **25**: 463-472 (1984).
  71. T. Yasuda, Y. Watanabe, T. Hayashi, and R. Kitayama. Serum protein binding of T-3262. *Chemotherapy* (Tokyo), **36** (suppl. 9): 143-148 (1988).
  72. T. Yasuda, Y. Watanabe, S. Minami, K. Kumano, S. Takagi, R. Tsuneda, and J. Kanayama. Absorption, distribution, metabolism and excretion of T-3262 in experimental animals. *Chemotherapy* (Tokyo), **36** (suppl. 9): 149-157 (1988).
  73. M. Nakashima, T. Uematsu, and M. Kanamaru. Phase I study of T-3262, a new pyridonecarboxylic acid derivative. *Chemotherapy* (Tokyo), **36** (suppl. 9): 158-180 (1988).
  74. H. Lode, G. Hoffken, K. Borner and P. Koeppe. Unique aspects of quinolone pharmacokinetics. *Clin. Pharmacokin.*, **16** (Suppl. 1): 1-4 (1989).
  75. A. M. Korinek, G. Montay, A. Bianchi, M. Guggiari, R. Grob and P. Viars. Penetration of pefloxacin into human brain tissue. *Rev. Infect. Dis.*, **10** (suppl.1): S257 (1988).

## 第2章

### 2-2

ニューキノロン系抗菌剤と非ステロイド性抗炎症剤による  $\text{GABA}_A$   
受容体応答の抑制作用に関する動物種差・脳部位差

## 要約

GABA<sub>A</sub>受容体介在性応答に対するニューキノロン系抗菌剤 (NQs) であるエノキサシン (ENX) と非ステロイド性抗炎症剤 (NSAIDs) であるフェルピナク (FLB) との抑制作用を動物種および脳部位間において比較した。マウスの全脳とラット・ウサギ・イヌ及びサルの大脳・脳幹及び小脳から抽出したmRNAをそれぞれアフリカツメガエル卵母細胞に注入し、ENXとFLBの存在・非存在下におけるGABA誘発電流を膜電位固定により記録した。全ての動物種において、ENXはGABA (10 μM) 応答を濃度依存的に抑制し、更にFLB (10 μM) はそのENXの抑制作用を増強した。ENX非存在下ではFLBはGABA応答を変化させなかった。ラット・ウサギ・イヌおよびサルの4動物種間における比較では、各脳部位でのGABA応答に対するENXのIC<sub>50</sub>には有意な差は見られなかった。しかし脳部位間における比較では、各動物種における小脳でのIC<sub>50</sub>は大脳・脳幹でのIC<sub>50</sub>よりも有意に大きかった。マウスの全脳におけるIC<sub>50</sub>は、他の4動物種における小脳でのIC<sub>50</sub>と大脳・脳幹でのIC<sub>50</sub>の中間の値であった。これらのIC<sub>50</sub>に関する結果は10 μM FLB共存・非共存下両方において観測された。10 μM FLBによるENXの増強比 (FLB非存在下でのIC<sub>50</sub>/FLB存在下でのIC<sub>50</sub>) は動物種・脳部位間を通じてほぼ100と一定の値であった。この小脳においてGABA (10 μM) 誘発電流に対するENXのIC<sub>50</sub>が他の部位におけるIC<sub>50</sub>よりも高かった理由を明らかにするために、マウスの全脳とラットの大脳・小脳におけるGABA応答の濃度依存性を調べた。GABAのEC<sub>50</sub>の順序は小脳(ラット) < 全脳(マウス) < 大脳(ラット)であった。GABAのEC<sub>50</sub>、GABA (10 μM) 応答に対するENXのIC<sub>50</sub>およびGABA濃度 (10 μM) から算出されるENXのKiはこれら3群間でFLB共存・非共存下それぞれにおいて等しかった。従って小脳におけるENXのGABA応答に対する抑制作用が小さく見積もられたことは脳部位間におけるGABAの受容体に対する親和性の相違に起因することが示唆された。以上より、アフリカツメガエル卵母細胞外来遺伝子発現系は動物種・脳部位間における薬効薬理や毒性作用の比較検討に極めて有用な手法であると考えられる。

## 緒言

医薬品の中枢神経系 (central nervous system; CNS) への副作用は臨床上の最も深刻な問題の一つであり、特に末梢作用を目的とした各種薬剤がCNSに対して悪影響を与えて患者のクオリティ・オブ・ライフを妨げている。従って、中枢性副作用をスクリーニング出来る新規方法論及びその回避のための適切な治療指針の早急な開発は極めて重要である。

ニューキノロン系抗菌剤 (new quinolone antimicrobial agents; NQs) は種々の精神神経症状 (頭痛・めまい・眠気及び振戦など) を有し、重篤な症例では間代性・強直性痙攣を誘発する (Simpson and Brodie, 1985; Anastasio et al., 1988; Christ et al., 1988; Slavich et al., 1989; Takeo et al., 1989; Schwarts and Calvert, 1990; Paton and Reeves, 1991)。更にNQsの痙攣誘発性は非ステロイド性抗炎症剤 (non-steroidal anti-inflammatory drugs; NSAIDs) との併用により増大する (Christ et al., 1988; Takeo et al., 1989; Paton and Reeves, 1991)。これらの報告されている症例や *in vivo* での動物実験データから、NQsであるエノキサシン (enoxacin; ENX) とNSAIDsであるフェルビナク (felbinac; FLB) との併用投与が最も危険性の高い組み合わせであると考えられる。この相互作用に関する可能性の高い機序の一つとして、脳膜標品へのGABA<sub>A</sub>受容体アゴニスト (agonist; <sup>3</sup>H-GABAまたはムシモール) の結合に対するNQsの抑制作用とNSAIDsによるその増強効果が報告されている (Tsuji et al., 1988ab; Akahane et al., 1989; Hori et al., 1989)。我々はマウス脳mRNAを注入したアフリカツメガエル卵母細胞 (*Xenopus oocytes*) におけるGABA誘発電流に対するNQsの競合阻害様式の抑制作用とNSAIDsによるその増強を第1章において検討し、二つの重要な知見を得た。それは *in vitro* におけるGABA応答に対するNQsのIC<sub>50</sub>と *in vivo* におけるNQsのマウス脳室内定速注入による痙攣発現投与量との間に高い相関性があること、そして *in vitro* におけるGABA応答に対するNQsのIC<sub>50</sub>と *in vivo* におけるNQsのマウス静脈内投与後における痙攣発現時の脳組織中濃度との間にも高い相関性があることである。したがって、NQsとNSAIDsによるGABA神経伝達の遮断が両薬剤の相互作用に基づく痙攣発現の主たる発現機序であると考えられ、更に *in vivo* におけるNQsの痙攣誘発性は *in vitro* におけるGABA応答に対する抑制作用から

予測可能であることを示した。

アフリカツメガエル卵母細胞外来遺伝子発現系は各種の受容体やチャネルを再構築することが可能である (Aoshima et al., 1987; Asanuma et al., 1987; Horikoshi et al., 1988)。我々は既にこの系が薬剤のCNSに対する副作用の*in vitro*スクリーニング法として利用できることを示した (Kawakami et al., 1993)。この系は、多数の実験動物を犠牲にする*in vivo*での毒性試験を代替できる可能性と、卵母細胞が大きく球形であることによる電気生理学的測定の簡便性を有している。更に、ヒト脳mRNAの使用によりヒト由来の各種受容体を発現できることから、この系はヒトにおける薬効薬理や毒性作用の直接的評価に応用することが可能であると考えられる (Gundersen et al., 1984*ab*; Tomaselli et al., 1989)。

本研究では、我々はマウス全脳とラット・ウサギ・イヌ及びサルの大脳・脳幹及び小脳から抽出したmRNAをそれぞれ注入したアフリカツメガエル卵母細胞におけるGABA誘発電流に対するENXの抑制作用をFLB共存・非共存下において測定した。我々はまたGABA<sub>A</sub>受容体に対するENXの抑制活性とそれに対するFLBの増強効果に関する動物種・脳部位間における相違について評価し、このアフリカツメガエル卵母細胞外来遺伝子発現系の動物種差および脳部位差の*in vitro*スクリーニング法としての有用性を確立した。

## 材料と方法

### 実験材料

#### 使用動物

雄性のddY系マウス (体重: 28–32 g)、SD系ラット (280–300 g)、日本白色在来種ウサギ (2.7 kg)、ビーグル犬 (10–13 kg) およびカニクイザル (3.7–4.1 kg) を使用した。これらの哺乳類には市販飼料と水を自由に与え、1週間以上予備飼育し健康状態の良い物を使用した。雌性アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の飼育は第1章に記述した方法に従った。

#### 使用薬物

NQsであるENXは大日本製薬 (株) (大阪) より、NSAIDsであるFLBは日本レダリー (株) (東京) より提供された。GABAと細胞分散用コラゲナーゼ (collagenase) は和光純薬工業 (株) より、局方生理食塩液は大塚製薬 (株) (東京) より購入した。その他の総ての試薬は、通常市販の特級品を購入して使用した。

### In vitro受容体応答実験

第1章においては、マウス脳mRNAを注入したアフリカツメガエル卵母細胞におけるGABA応答に対するNQsの抑制作用から、マウスにおけるNQsによる間代性痙攣誘発時の脳組織中濃度が定量的に予測できることを示した。そこで本章では、この外来遺伝情報発現系を用いて、GABA応答に対するENXの抑制作用とFLBによるその増強効果に関して動物種間における比較を行った。更に将来的にヒト脳検体由来のmRNAの利用が可能になった場合、通常全脳組織を提供されることは考えられず、おそらくはその一部であることが想定される。従ってこれら薬物作用の脳部位間における比較についても検討した。全RNA (total RNA) の脳組織からの抽出とmRNAの単離、mRNAのアフリカツメガエルへの注

入および受容体応答の電気生理学測定は第1章に記述した方法に従った。

#### 脳組織の摘出および各脳部位への分離

マウスは頸椎脱臼後に断頭して脳組織を摘出し、全脳を全RNAの抽出に使用した。ラットはエーテル (ether) 吸入麻酔し放血死させた後に断頭して脳組織を摘出した。ウサギ、ビーグル犬およびカニクイザルはペントバルビタールナトリウム (pentobarbital sodium) 注射液の静脈内投与により麻酔し放血死させた後に開頭して脳組織を摘出した。ラット、ウサギ、ビーグル犬およびカニクイザルの脳組織は、大脳・脳幹・小脳の3部位に分離して全RNAの抽出に使用した。

#### GABA応答に対するNQsの抑制作用とNSAIDsによるその増強効果

各動物種の各脳部位由来のmRNAをそれぞれ注入したアフリカツメガエル卵母細胞において、10  $\mu$ M FLBの共存・非共存下における10  $\mu$ M GABA応答に対するENXの抑制作用に関する濃度作用曲線を求めた。ENXの $IC_{50}$ の算出およびENXの抑制作用とFLBの増強効果の評価は第1章に記述した方法に従った。またマウスの全脳およびラットの大脳と小脳のmRNAをそれぞれ注入したアフリカツメガエル卵母細胞を用いて、GABA応答の濃度依存性を検討した。GABAの $EC_{50}$ の算出は第1章に記述した方法に従った。

#### データ解析

ENXの $K_i$ は次の式により算出した。

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + C_{GABA}/EC_{50}} \quad (1)$$

なおENXの $IC_{50}$ を求めた際の $C_{GABA}$ は10  $\mu$ Mであった。全ての結果は3例の平均値と標準偏差により表示した。

## 結果

マウス全脳と他の4動物種(ラット・ウサギ・イヌ及びサル)の脳におけるGABA (10  $\mu$ M) 誘発電流の抑制に関するENXの10  $\mu$ M FLB共存・非共存下での濃度作用曲線を Fig. 1に図示した。全ての動物種においてENXはGABA (10  $\mu$ M) 誘発電流を濃度依存的に抑制した。ENX非存在下ではFLBはGABA (10  $\mu$ M) 誘発電流を変化させなかった(データ示さず)。FLBの共存によりENXの濃度作用曲線はFLB非共存下の時よりも左側に移動した。

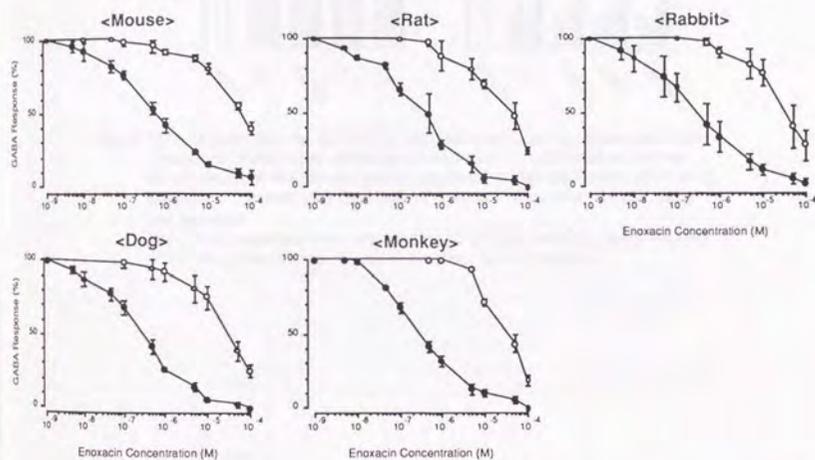


Fig. 1. Inhibitory Effect of Enoxacin on GABA (10  $\mu$ M)-induced Current Response in the Presence (●) or Absence (○) of 10  $\mu$ M Felbinac in the Mouse, Rat, Rabbit, Dog and Monkey Brain Using *Xenopus* Oocytes. (n = 3, mean  $\pm$  S.D.)

Fig. 2には10  $\mu$ M FLB共存・非共存下におけるGABA (10  $\mu$ M) 誘発電流に対するENXの $IC_{50}$ を示した。マウス以外の4動物種間での比較では、各脳部位において $IC_{50}$ には有意な差は認められなかった。しかし4動物種全てにおいて小脳での $IC_{50}$ は他の部位(大脳・脳幹)での $IC_{50}$ よりも有意に大きかった。全脳を用いたマウスに関しては、その $IC_{50}$ は他の動物種における小脳での $IC_{50}$ と大脳・脳幹での $IC_{50}$ との中間の値であった。これら全ての $IC_{50}$

に関する結果は、10  $\mu$ M FLB共存・非共存下それぞれにおいて観測された。Fig. 3には GABA (10  $\mu$ M) 誘発電流の抑制に関するENXの10  $\mu$ M FLBによる増強比を示した。ENXの増強比の値は全ての動物種・脳部位を通じてほぼ100であった。

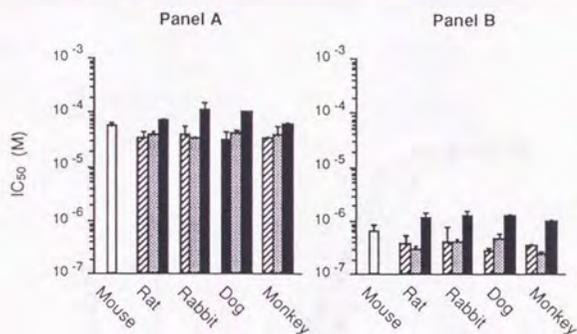


Fig. 2.  $IC_{50}$  of Enoxacin for GABA (10  $\mu$ M)-Induced Current Response in the Presence (Panel B) or Absence (Panel A) of 10  $\mu$ M Felbinac in the Whole Brain of the Mouse (open column) and the Cerebrum (hatched), Brainstem (dotted) and Cerebellum (closed) of the Rat, Rabbit, Dog and Monkey.

The GABA response were recorded by an ordinary voltage-clamp method at a holding potential of -60 mV in modified Barth's medium.

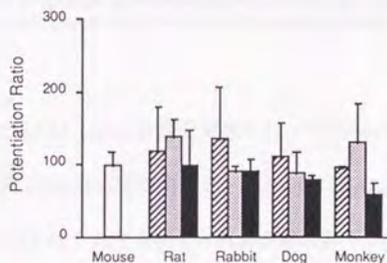


Fig. 3. Potentiated Ratio of Enoxacin for Inhibition of GABA (10  $\mu$ M)-Induced Current Response by 10  $\mu$ M Felbinac in the Whole Brain of the Mouse (open column) and the Cerebrum (hatched), Brainstem (dotted) and Cerebellum (closed) of the Rat, Rabbit, Dog and Monkey.

The GABA response were recorded by an ordinary voltage-clamp method at a holding potential of -60 mV in modified Barth's medium. Potentiated ratio of enoxacin was calculated by dividing  $IC_{50}$  of enoxacin in the absence of felbinac by that in the presence of felbinac.

小脳におけるGABA (10  $\mu$ M) 誘発電流に対するENXの $IC_{50}$ が他の部位における $IC_{50}$ よりも大きかった理由を明かにするためにマウスの全脳とラットの脳・小脳におけるGABA応答の濃度依存性を検討した。Fig. 4にはGABAの濃度作用曲線を図示した。これら3群における $EC_{50}$  ( $\mu$ M) の値は、マウス全脳:  $29 \pm 3$ 、ラット大脳:  $86 \pm 7$ そしてラット小脳:  $12 \pm 3$ であった。

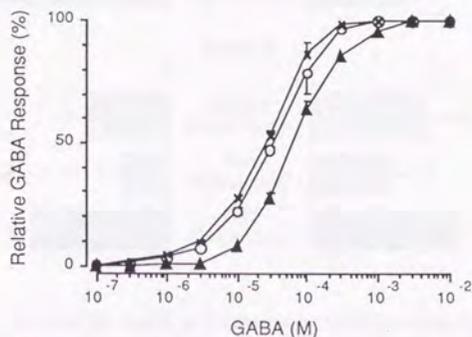


Fig. 4. Concentration-response Curve of GABA for GABA-induced Current Response in *Xenopus* Oocytes Injected with mRNA Extracted from the Whole Brain of the Mouse (○) and the Cerebrum (▲) and Cerebellum (×) of the Rat. GABA response were recorded by an ordinary voltage-clamp method at a holding potential of  $-60$  mV in modified Barth's medium.

GABAの $EC_{50}$ とGABA (10  $\mu$ M) 誘発電流に対するENXの $IC_{50}$ に基づき、GABA応答に対するENXの $K_i$ を式(1)を用いて算出した。Fig. 5にはGABA応答に対するENXの $IC_{50}$ と $K_i$ を示した。パネルAとBはそれぞれ10  $\mu$ M FLBの非共存下と共存下での結果である。ラット小脳の $IC_{50}$ はラット大脳の $IC_{50}$ よりも有意に大きかったが、 $K_i$ の値にはこれら3群間で有意な差は認められなかった。この $K_i$ に関する結果は10  $\mu$ M FLBの非共存・共存下それぞれにおいて観測された。

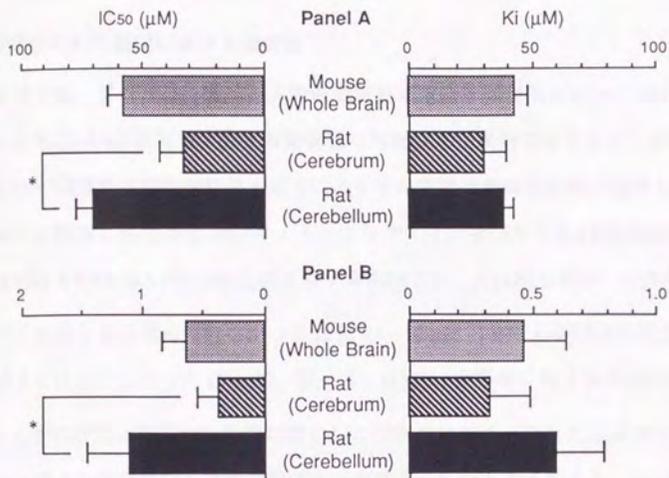


Fig. 5. IC<sub>50</sub> for 10 μM GABA and Ki of Enoxacin on GABA-induced Current Response in the Presence (Panel B) or Absence (Panel A) of 10 μM Felbinac in *Xenopus* Oocytes Injected with mRNA Extracted from the Whole Brain of the Mouse and the Cerebrum and Cerebellum of the Rat. GABA response were recorded by an ordinary voltage-clamp method at a holding potential of -60 mV in modified Barth's medium.

## 考察

### GABA応答抑制の動物種間における類似性

本研究では、アフリカツメガエル卵母細胞外来遺伝子発現系をNQsとNSAIDsとの相互作用によるGABA応答抑制に関する動物種・脳部位差の検討に応用した。GABA応答に対するENXの濃度依存的抑制作用とFLBによるその増強効果は本研究に使用した全ての動物種において観測された (Fig. 1)。ラット・ウサギ・イヌ及びサルとの4動物種間での比較では、各脳部位でのGABA (10  $\mu$ M) 応答に対するENXの $IC_{50}$ にはFLB共存・非共存下それぞれにおいて有意な差は認められなかった (Fig. 2)。10  $\mu$ M FLBによるENXの増強比も動物種間を通じてほぼ等しかった (Fig. 3)。従って、GABA<sub>A</sub>受容体に対するENXの拮抗作用とFLBによるその増強は特定の動物種に限定した作用ではなく、そして各脳部位におけるこれらENXとFLBの作用強度も動物種間で大きな相違はないと考えられる。*In vivo*におけるNQsとNSAIDsとの相互作用による痙攣発現はヒト以外のマウス・ラット・ネコ・イヌ及びカエルなどの多様な動物種において再現可能である (Kawakami et al., 1993)。更にGABA<sub>A</sub>受容体に関する分子生物学的研究により、GABA<sub>A</sub>受容体のサブユニットはアミノ酸配列の相同性に基づいて $\alpha$ 1-6,  $\beta$ 1-4,  $\gamma$ 1-3,  $\delta$ 及び $\rho$ 1-2のサブタイプ群に分類されており、これらのサブユニットは動物種を越えて高い相同性を維持している (Burt and Kamatchi, 1991, Olsen, 1994)。本研究において我々が得た*in vitro*におけるENXによるGABA応答抑制とFLBによるその増強に関する動物種間での類似性は、*in vivo*におけるENXとFLBとの相互作用による毒性作用発現の様相と一致し、またGABA<sub>A</sub>受容体の分子生物学的特徴によっても支持される。

### GABA応答抑制の脳部位間における相違

Fig. 2に示したように、FLB共存・非共存下それぞれにおいて脳部位差の検討に使用した4動物種の小脳での $IC_{50}$ は大脳・脳幹での $IC_{50}$ よりも有意に大きかった。すなわち、

小脳でのGABA (10  $\mu$ M) 誘発電流に対するENXの抑制作用が他の部位でのそれよりも見かけ上弱く、またこのことは特定の動物種に限定されなかった。このGABA (10  $\mu$ M) 誘発電流に対するENXの抑制作用に関する小脳での脳部位差を明かにするために、マウスの全脳とラットの大脳・小脳から抽出したmRNAを用いてGABA応答の濃度依存性を検討した (Fig. 4)。これら3群におけるGABAの $EC_{50}$ の順序は、ラット小脳 < マウス全脳 < ラット大脳であった。この知見は大脳におけるGABA<sub>A</sub>受容体に対するGABAのアゴニスト活性が小脳におけるそれよりも劣ることを示唆している。GABA<sub>A</sub>受容体に対する親和性に関してはWoodwardら (1994) が、アフリカツメガエル卵母細胞を用いてラット大脳皮質のmRNAから発現させたGABA<sub>A</sub>受容体では神経細胞 (ただし部位については言及せず) の受容体と比較して相対的に親和性が低いこと ( $EC_{50}$ はそれぞれ50-100  $\mu$ Mと1-10  $\mu$ M) を報告している。彼らが報告したラット大脳皮質から発現させたGABA<sub>A</sub>受容体におけるGABAの $EC_{50}$ は $81 \pm 10 \mu$ Mであり、我々のラット大脳についての結果である $86 \pm 7 \mu$ Mとほぼ等しい。彼らはこの発現させた受容体と神経細胞の受容体との間における親和性の不一致について、翻訳後修飾やサブユニット構築の相違および卵母細胞のタンパク質や外的脂質環境との相互作用などによって説明している。しかし彼らはこの大脳のGABA<sub>A</sub>受容体における低親和性についてGABA<sub>A</sub>受容体サブユニットのサブタイプに関する生理学・組織化学的側面に基づいては考察していない。例えば $\alpha$ -サブユニットによる生理学的変動として、アフリカツメガエル卵母細胞を用いて発現させたラット由来の $\alpha 1 \cdot \beta 2$ 及び $\gamma 2$ -サブユニットの単一な分子構造からなるGABA<sub>A</sub>受容体におけるGABAの $EC_{50}$ は $45.8 \pm 3.6 \mu$ Mであり (Amin and Weiss, 1993)、ヒト胎芽腎細胞にトランスフェクトしたラット由来の $\alpha 3 \cdot \beta 2$ 及び $\gamma 2$ -サブユニットまたは $\alpha 5 \cdot \beta 2$ 及び $\gamma 2$ -サブユニットからなるGABA<sub>A</sub>受容体ではそれぞれ $130 \pm 16 \mu$ Mと $5.8 \pm 0.2 \mu$ Mである (Knoflach et al., 1993)。また、特定のサブユニットあるいはmRNAに対するプローブを用いた*in situ*ハイブリダイゼーションによる検討から、脳組織においてはGABA<sub>A</sub>受容体サブユニットのサブタイプあるいはそれをコードするmRNAが部位特異

的に分布していることが明かにされている (Burt and Kamatchi, 1991; Gambarana et al., 1991; Luddens and Wisden, 1991). 従って、本研究において小脳との比較により見いだした大脳のGABA<sub>A</sub>受容体における低親和性は、脳組織におけるGABA<sub>A</sub>受容体サブユニットのサブタイプに関する部位特異的な分布と、各部位でのGABA<sub>A</sub>受容体を構成するサブユニットのサブタイプ間での親和性の生理学的相違に起因することが考えられる。

マウスの全脳とラットの脳・小脳の3群間において、ENXのIC<sub>50</sub>とGABAのEC<sub>50</sub>から算出されるENXのKiに基づきGABA<sub>A</sub>受容体応答に対するENXの抑制活性を評価した。Fig. 5に示すように、大脳でのIC<sub>50</sub>は小脳でのIC<sub>50</sub>よりも有意に低かったが、3群間においてKiの値はFLB共存・非共存下それぞれにおいてほぼ等しかった。10 μM FLBによるENXの増強比の値も動物種・脳部位間両方においてほぼ100と等しかった (Fig. 3)。従って、GABA<sub>A</sub>受容体に対するENXの抑制活性とFLBによるその増強効果は動物種・脳部位間において類似していると考えられる。この知見は、先に考察したアゴニストであるGABAや既報のベンゾジアゼピン類と比較して、ENXやFLBのGABA<sub>A</sub>受容体に対する親和性のサブタイプ選択性が、相対的に低いことを示唆している可能性がある (Puia et al., 1991; Knoflach et al., 1993)。今後は、GABA<sub>A</sub>受容体に対するENXの抑制とFLBによるその増強の機構を分子生物学的に解明するためには、クローニングしたmRNAから発現させた単一な分子構造のGABA<sub>A</sub>受容体を用いた検討が必要であろう。

#### まとめ

アフリカツメガエル卵母細胞外来遺伝子発現系をENXとFLBとの相互作用によるGABA<sub>A</sub>受容体に対する拮抗作用についての動物種・脳部位差の検討に応用した。GABA (10 μM) 誘発電流に対するENXの抑制作用と10 μM FLBによるその増強は、マウス・ラット・ウサギ・イヌ及びサルそれぞれの脳mRNAから発現させたGABA<sub>A</sub>受容体において観測できた。各動物種において小脳でのGABA (10 μM) 応答に対するENXのIC<sub>50</sub>は大脳・脳幹でのそれよりも大きかった。FLBによるENXの抑制作用の増強に関しては動物種・脳部

位間で類似性が認められた。更にGABA応答の濃度依存性に関する検討から、ラットの小脳におけるGABAのEC<sub>50</sub>は大腦におけるそれよりも有意に小さかった。従って、小脳におけるGABA応答に対するENXの抑制作用が見かけ上弱かったことは、GABAの受容体に対する親和性の脳部位特異性に起因すると考えられた。以上の検討から、アフリカツメガエル卵母細胞外来遺伝子発現系は、CNSにおける医薬品による受容体介在性の薬効薬理や毒性作用の動物種差および脳部位差に関する*in vitro*スクリーニング法として極めて有用な方法論であろう。

## 引用文献

- Akahane, K., Sekiguchi, M., Une, T. and Osada, Y. (1989) Structure-epileptogenicity relationship of quinolones with special reference to their interaction with  $\gamma$ -aminobutyric acid receptor sites. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**, 1704-1708.
- Amin, J. and Weiss, D.S. (1993) GABA<sub>A</sub> receptor needs two homologous domains of the  $\beta$ -subunit for activation by GABA but not by pentobarbital. *Nature* **366**, 565-569.
- Anastasio, G.D., Menscer, D. and Little, J.M. (1988) Norfloxacin and seizures. *Ann. Intern. Med.* **109**, 169-170.
- Aoshima, H., Anan, M., Ishii, H., Iio, H. and Kobayashi, S. (1987) Minimal model to account for the membrane conductance increase and desensitization of  $\gamma$ -aminobutyric acid receptors synthesized in the *Xenopus* oocytes injected with rat brain mRNA. *Biochem.* **26**, 4811-4816.
- Asanuma, A., Horikoshi, T., Yanagisawa, K., Anzai, K. and Goto, S. (1987) The distribution of GABA and glycine response in the mouse brain using *Xenopus* oocytes. *Neurosci. Lett.* **76**, 87-90.
- Burt D.R. and Kamatchi, G.L. (1991) GABA<sub>A</sub> receptor subtypes: from pharmacology to molecular biology. *FASEB J.* **5**, 2916-2923.
- Christ, W., Lehnert, T. and Ulbrich, B. (1988) Specific toxicologic aspects of the quinolones. *Rev. Infect. Dis.* **10** (Suppl.1), S141-S146.
- Gambarana, C., Beattie, C.E., Rodriguez, Z.R. and Siegel, R.E. (1991) Region-specific expression of messenger RNAs encoding GABA<sub>A</sub> receptor subunits in the developing rat brain. *Neurosci.* **45**, 423-432.
- Gundersen, C.B., Miledi, R. and Parker, I. (1984a) Messenger RNA from human brain induces drug- and voltage-operated channels in *Xenopus* oocytes. *Nature* **308**, 421-424.
- Gundersen, C.B., Miledi, R., F.R.S. and Parker, I. (1984b) Properties of human glycine receptor expressed in *Xenopus* oocytes. *Proc. R. Soc. Lond. B* **221**, 235-244.

- Hori, S., Shimada, J., Saito, A., Matsuda, M. and Miyahara, T. (1989) Comparison of the inhibitory effects of new quinolones on  $\gamma$ -aminobutyric acid receptor binding in the presence of antiinflammatory drugs. *Rev. Infect. Dis.* **11** (Suppl. 5), S1397-S1398.
- Horikoshi, T., Asanuma, A., Yanagisawa, K., Anzai, K. and Goto, S. (1988) Taurine and  $\beta$ -alanine act on both GABA and glycine receptors in *Xenopus* oocyte injected with mouse messenger RNA. *Mol. Brain Res.* **4**, 97-105.
- Kawakami, J., Shimokawa, M., Yamamoto, K., Sawada, Y., Asanuma, A., Yanagisawa, K. and Iga, T. (1993) Inhibition of GABA<sub>A</sub> receptor-mediated current responses by enoxacin (new quinolone) and felbinac (non-steroidal anti-inflammatory drugs) in *Xenopus* oocytes injected with mouse-brain messenger RNA. *Biol. Pharm. Bull.* **16**, 726-728.
- Knoflach, F., Drescher, U., Scheurer, L., Malherbe, P. and Mohler, H. (1993) Full and partial agonism displayed by benzodiazepine receptor ligands at recombinant  $\gamma$ -aminobutyric acid<sub>A</sub> receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **266**, 385-391.
- Luddens, H. and Wisden, W. (1991) Function and pharmacology of multiple GABA<sub>A</sub> receptor subunits. *TiPS* **12**, 49-51.
- Olsen, R.W. (1994) GABA<sub>A</sub> receptor channels. *Ann. Rev. Neurosci.* **17**, 569-602.
- Paton, J.H. and Reeves, D.S. (1991) Clinical features and management of adverse effects of quinolone antibacterials. *Drug Safety* **6**, 8-27.
- Puia, G., Vicini, S., Seeburg, P.H. and Costa, E. (1991) Influence of recombinant  $\gamma$ -aminobutyric acid<sub>A</sub> receptor subunit composition on the action of allosteric modulators of  $\gamma$ -aminobutyric acid-gated Cl<sup>-</sup> currents. *Mol. Pharmacol.* **39**, 691-696.
- Schwartz, M.T. and Calvert, J.F. (1990) Potential neurologic toxicity related to ciprofloxacin. *DICP* **24**, 138-140.
- Simpson, K.J. and Brodie, M.J. (1985) Convulsion related to enoxacin. *Lancet* **II**, 161.
- Slavich, I.L., Gleffe, R.F. and Haas, E.J. (1989) Grand mal epileptic seizures during ciprofloxacin therapy. *JAMA* **261**, 558-559.

- Takeo, G., Shibuya, N., Motomura, M., Kanazawa, H. and Shishido, H. (1989) A new DNA gyrase inhibitor induces convulsions: A case report and animal experiments. *Chemotherapy* (Tokyo) **37**, 1154-1159.
- Tomaselli, G.F., Marban, E. and Yellen, G. (1989) Sodium channels from human brain RNA expressed in *Xenopus* oocytes: Basic electrophysiologic characteristics and their modification by diphenylhydantoin. *J. Clin. Invest.*, **83**, 1724-1732.
- Tsuji, A., Sato, H., Kume, Y., Tamai, I., Okezaki, E., Nagata, O. and Kato, H. (1988a) Inhibitory effects of quinolone antibacterial agents on  $\gamma$ -aminobutyric acid binding to receptor sites on rat brain membranes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**, 190-194.
- Tsuji, A., Sato, H., Okezaki, E., Nagata, O. and Kato, H. (1988b) Effect of the anti-inflammatory agent fenbufen on the quinolone-induced inhibition of  $\gamma$ -aminobutyric acid binding to rat brain membranes *in vitro*. *Biochem. Pharmacol.* **37**, 4408-4411.
- R. M. Woodward, L. Polenzani and R. Miledi: Effect of fenamates and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs on rat brain GABA<sub>A</sub> receptor expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **268**: 806-817 (1994).

## 第2章

### 2-3

#### ニューキノロン系抗菌剤の臨床使用時における痙攣誘発性の評価

## 要約

臨床においてニューキノロン系抗菌剤 (NQs) を単独あるいはNQsと非ステロイド性  
抗炎症剤 (NSAIDs) とを併用して投与した場合における中枢性痙攣の誘発性を、臨床使用  
時の体内薬物レベルに基づいて評価した。NQsの痙攣発現に関する濃度依存性としては、  
マウス脳mRNAを注入したアフリカツメガエル卵母細胞におけるフェルビナク (FLB) 共  
存・非共存下におけるエノキサシン (ENX)、シプロフロキサシン (CPFX)、ノルフロキサ  
シン (NFLX) およびオフロキサシン (OFLX) のGABA応答抑制に関する濃度作用曲線を用  
いた。その際のFLB濃度はFLB臨床使用時の予測脳組織中濃度とした。またNQsの臨床使  
用時の体内薬物レベルとしては、既報の常用量連続投与後における脳脊髄液中濃度 ( $C_{CSF}$ )  
を用い、それを先のNQsの濃度作用曲線と直接比較した。FLB非共存下においては、  
GABA応答は4種のNQsの $C_{CSF}$ 範囲内において抑制されず、NQsを単独で投与することは比  
較的安全であることが示唆された。しかしFLB共存下においては、NQsの濃度作用曲線は  
FLB非共存下のそれよりも低濃度側にシフトし、特にENXとNFLXにおいては $C_{CSF}$ 範囲内  
においてGABA応答が強く抑制された。従ってNQsとFLBを併用した場合は痙攣誘発性が  
増大すること、そしてENXとNFLXはCPFXあるいはOFLXよりも痙攣誘発の危険性が高い  
ことが示唆された。またENXについては腎不全患者における痙攣誘発時の $C_{CSF}$ がENX単  
独でもGABA応答を抑制する濃度にまで上昇していたことが分かった。そこで、腎機能障  
害患者におけるENXの用法用量を個々の患者情報 (血清クレアチニン値・体重・年齢・性  
別) に基づいて設定する方法を確立した。更にその方法を先のENX単独投与により中枢性  
痙攣を発現した腎不全患者の症例に適用した結果、血漿中ENX濃度を通常使用時と同程  
度に維持するためにはその用法用量を1/8-1/9に変更するべきであったと算定された。以上  
より、本研究で使用した臨床使用時の副作用発現部位における濃度に基づく評価方法は、  
臨床におけるNQs単独あるいはNQsとNSAIDsとの併用による中枢性痙攣の誘発性の評価  
に有用であった。また、腎機能障害患者におけるNQsによる中枢性副作用回避のための処  
方設計の変更方法が提示できた。

## 緒言

ニューキノロン系抗菌剤 (new quinolone antimicrobial agents; NQs) は痙攣を含む種々の中枢性副作用を誘発し、その誘発性は非ステロイド性抗炎症剤 (non-steroidal anti-inflammatory drugs; NSAIDs) との併用投与により増大する。このNQsとNSAIDsとの相互作用による中枢性痙攣では、エノキサシン (enoxacin; ENX) とフェルビナク (felbinac; FLB) あるいはそのプロドラッグ体であるフェンブフェン (fenbufen) との併用投与が最も痙攣誘発性の高い組み合わせであると考えられる (第2章 2-2)。NQsとNSAIDsとの相互作用による痙攣誘発の発現機序としては、NQsのGABA<sub>A</sub>受容体結合に対する阻害作用とNSAIDsによるその増強である可能性が示されている (Tsuji et al., 1988ab; 堀ら, 1988)。また動物を用いた *in vivo* における検討から、NQsの痙攣誘発に関するED<sub>50</sub>に対するNSAIDs併用投与の効果についても検討されている (Akahane et al., 1989; 平井ら, 1989; 山本ら, 1988)。しかしこれら基礎研究においては、*in vivo*での痙攣誘発性と*in vitro*でのGABA結合阻害作用との関係および動物種間におけるそれら毒性作用および体内動態の相違に関する定量的な検討が欠如しているために、両医薬品の臨床使用時における安全性は明確化されていない。

既に本研究において*in vitro*におけるNQsのGABA応答に対する抑制作用から*in vivo*におけるNQsの痙攣誘発性が予測可能であることを示した (第1章)。またヒトにおけるNQsによる中枢性痙攣の誘発性の予測するための各過程となる、ヒトにおける作用部位への移行性の予測と、作用に関する動物種差の検討を行った (第2章 2-1, 2-2)。

そこで本研究では、*in vitro*実験におけるシプロフロキサシン (ciprofloxacin; CFPX)、エノキサシン (enoxacin; ENX)、ノルフロキサシン (norfloxacin; NFLX) および オフロキサシン (ofloxacin; OFLX) のGABA応答に対する抑制作用の濃度依存性とヒトにおいて常用量のこれらNQsを投与した後の脳脊髄液中濃度 ( $C_{CSF}$ ) 範囲との比較に基づき、NQsの臨床使用時における中枢性痙攣の誘発性と、それに及ぼすNSAIDs併用投与の影響について評価した。また、NQsの単独投与による痙攣発現の症例報告においては患者背景として腎機能障害のあったものが多い (千代ら, 1989; 豊田ら, 1991)。したがって、NQs単独投与時にお

いでも痙攣誘発につながる危険因子としての腎機能障害に関する遡及的解析を行った。そして、腎機能障害患者におけるNQsによる中枢性副作用を回避するための用法用量の設定方法を確立し、更にその方法を既報のENXの単独投与により中枢性痙攣を発現した腎不全患者に適用した。

## 方法

### データ収集

本研究で使用した、*in vitro*受容体実験の結果(第1章)を除く全てのヒトに関するデータは既報の文献値を引用した。以下にその引用文献を示す。腎機能正常者における常用量のNQs (CPF<sub>X</sub>、EN<sub>X</sub>、NFL<sub>X</sub>およびOFL<sub>X</sub>)を連続投与した後における血漿中濃度( $C_p$ )と脳脊髄液中濃度( $C_{CSF}$ ):川原ら(1990, 1991);腎不全患者におけるEN<sub>X</sub>単独投与による痙攣誘発時の $C_p$ と患者データである血清クレアチニン(creatinine)( $S_{CR}$ )、体重、年齢および性別:千代ら(1989),豊田ら(1991);EN<sub>X</sub>の腎クリアランス( $CL_{R,ENX}$ )とクレアチニンクリアランス( $CL_{CR}$ )との関係:Nixら,(1988),Auweraら,(1990); $S_{CR}$ と $CL_{CR}$ との関係:Cunha,(1988)。EN<sub>X</sub>の中枢移行率( $K_{p,CSF}$ )は腎機能正常者における常用量のNQsを連続投与した後における $C_p$ と $C_{CSF}$ の比( $C_{CSF}/C_p$ )を用いた。

第1章においては、マウス脳mRNAを注入したアフリカツメガエル卵母細胞におけるNQsのGABA応答に対する抑制作用から、マウスにおけるNQsによる間代性痙攣誘発時の脳組織中濃度が定量的に予測できることを示した。更に第2章2-2においては、脳mRNAを注入したアフリカツメガエル卵母細胞におけるEN<sub>X</sub>の抑制作用とFLBによるその増強効果がmRNAの由来する動物種間において大きな違いがないことを示した。そこで本項では、マウス脳mRNAを注入したアフリカツメガエル卵母細胞における、10  $\mu$ M FLBの共存・非共存下での10  $\mu$ M GABA応答に対するNQs (CPF<sub>X</sub>、EN<sub>X</sub>、NFL<sub>X</sub>およびOFL<sub>X</sub>)の抑制作用に関する濃度作用曲線を、各NQsの痙攣発現性の指標として使用した。

### NQsのヒトにおける $C_{CSF}$ に基づいた痙攣誘発性の評価

NQsのヒトにおける常用量を連続投与した後の $C_{CSF}$ の範囲を、 $10\ \mu\text{M}$  FLBの共存・非共存下でのNQsのGABA応答抑制に関する濃度作用曲線と直接比較することにより、臨床においてNQsを単独あるいはFLBと併用して使用した場合における痙攣誘発性を評価した。ENXについては、腎不全患者におけるENXの単独投与による痙攣発現時の $C_p$ に $K_{pCSF}$ を乗じて算出される痙攣発現時の予測 $C_{CSF}$ 範囲も含めて、ENX単独でのGABA応答抑制に関する濃度作用曲線と比較することにより、痙攣が発現していた際の危険因子について遡及的に解析した。

### 腎機能障害患者におけるENXの用法用量の設定方法

腎機能障害患者においてENX使用中の中枢性副作用を回避するための用法用量の設定方法について検討した。前述の解析において、腎不全患者における痙攣発現時の予測 $C_{CSF}$ 範囲が腎機能正常者におけるENXの適切な抗菌作用が得られる通常使用時の $C_{CSF}$ 範囲を大きく越えていたことから、腎機能障害患者でのENXの $C_p$ を通常使用時と同程度に維持することを目的とした。その内容としては、個々の腎機能障害患者の情報に基づきENXの用法用量を調節する方法とした。更に、この用法用量の設定方法をENXの単独投与で中枢性痙攣を発現した腎不全患者の症例(序論中のTable II)に適用し、 $C_p$ を通常使用時と同程度に維持するための用法用量の算定を試みた。

ENX単独投与による痙攣誘発性

Fig. 1には、FLB非共存下におけるENXのGABA応答抑制に関する濃度作用曲線を、腎不全患者におけるENXの痙攣誘発時の $C_{CSF}$ 範囲ならびに腎機能正常者におけるENXの通常使用時の $C_{CSF}$ 範囲と比較したものを示した。腎不全患者におけるENXの痙攣誘発時の $C_{CSF}$ 範囲は、腎機能正常者におけるENXの通常使用時の $C_{CSF}$ 範囲を大きく越えて、ENX単独においてもGABA応答が抑制される程度にまで上昇していた。この*in vitro*実験におけるENXのGABA応答抑制に関する濃度依存性が*in vivo*におけるENX投与後の痙攣誘発時の $C_{CSF}$ 範囲と対応したことから、NQsによるGABA神経伝達の遮断がNQsによる痙攣誘発の主たる発現機序であることが示唆された。また、腎不全患者におけるENX投与後の $C_{CSF}$ 範囲が腎機能正常者での $C_{CSF}$ 範囲を大きく越えてあり、またENXを含むほとんどの

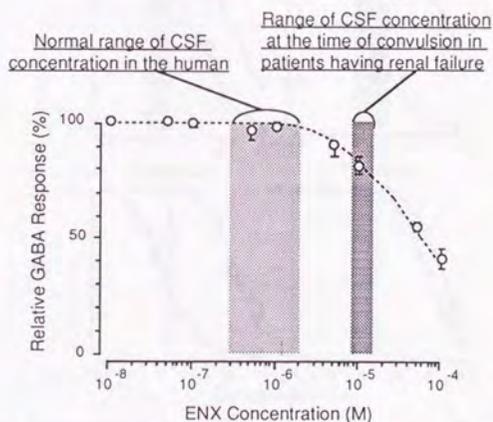


Fig. 1. Comparison between Inhibitory Profile of GABA ( $10 \mu\text{M}$ ) Response by Enoxacin and CSF Concentration (hatched bars) after Oral Administration of Therapeutic Dose of Enoxacin in Patients Having Normal Renal Function or at the Time of Convulsion in Patients Having Renal Failure.

NQsは主たる排泄経路が腎排泄型の薬物であることから (Lode et al., 1987)、腎機能障害患者における薬物消失能の低下による体内への薬物の蓄積が痙攣誘発につながる危険因子となり得ること、更にその薬物の蓄積を防ぐ方法論の確立が必要であることが示された。

#### NQsとFLB併用投与による痙攣誘発性

Fig. 2には、FLB共存・非共存下における4種のNQsのGABA応答抑制に関する濃度作用曲線を、腎機能正常者における常用量のNQs連続投与した後の $C_{CSF}$ 範囲と比較したものを示した。FLB非共存下においては、4種のNQsの通常使用時の $C_{CSF}$ 範囲ではGABA応答抑制は認められなかった。一方FLB共存下においては、4種のNQs間においてGABA応答抑制の程度は大きく異なった。すなわち通常使用時の $C_{CSF}$ 範囲においてGABA応答は、ENXとNFLXにおいては顕著にCPFXでは僅かに抑制されたのに対して、OFLXではほとんど抑

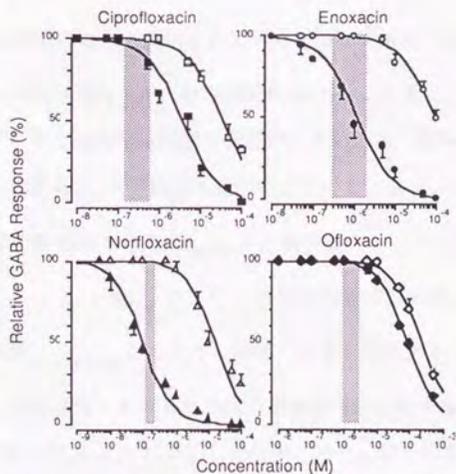


Fig. 2. Comparison between Concentration-response Curve of New Quinolones for Inhibition of GABA ( $10 \mu\text{M}$ )-induced Current in *Xenopus* Oocytes Injected with Mouse-brain mRNA in the Presence (closed symbol) or Absence (Open symbol) of  $10 \mu\text{M}$  Felbinac and the Normal Range of CSF Concentration in the Human after Repeated Administrations of Therapeutic Dose (dotted area).

制されなかった。ここで使用したFLBの濃度は常用量のプロドラッグ体であるフェンブフェン (fenbufen; FB) を連続投与した後に予測されるFLBの脳組織中濃度とはほぼ等しいことから、感染症患者において常用量のENXやNFLXをFBと併用した場合には中枢におけるGABA神経伝達の遮断による中枢性痙攣が発現する危険性が極めて高いと考えられる。以上よりNQsの痙攣誘発性がNSAIDsとの併用投与により増大するという臨床報告は、NQsによるGABA応答抑制が常用量のFLB併用によりヒトにおけるNQsの通常使用時の $C_{CSF}$ 範囲において起こる程度にまで増強されることから説明できた。

#### 腎機能障害患者におけるENXの用法用量の設定方法

先のENX単独投与での痙攣誘発性の解析から、腎機能障害患者における用法用量の調節が必要であることが示された。そこで個々の患者の腎機能を指標とする用法用量の設定方法を確立した(図. 3)。このシステムにおいては初めに、(1) 個々の患者における $S_{CR}$ 、体重、年齢および性別の患者情報に基づいて $CL_{CR}$ を推定する。ここで使用した $S_{CR}$ から $CL_{CR}$ への変換式は臨床において繁用されている計算式である。 $CL_{CR}$ は各患者においても直接測定することは可能であるが、その測定には2 h以上を要し、更に採血以外に3回の完全排尿を必要とするなど測定時に患者の負担が大きいため、臨床においては通常、他の生化学検査も同時に行える $S_{CR}$ を腎機能の指標にしている。次に、(2) 個々の患者における $CL_{CR}$ に基づいてその患者における $CL_{R,ENX}$ を予測する。ここでは既報の $CL_{CR}$ と $CL_{R,ENX}$ との相関を用いた(Nix et al., 1988)。そして、(3) 腎機能正常者における $CL_{R,ENX (normal)}$ と腎機能障害患者における $CL_{R,ENX (dys.)}$ との比から用法・用量を設定する。

この用法・用量設定システムをENXの単独投与により中枢性痙攣を誘発した腎不全患者の症例(序論中のTable II)に適用した結果、その症例中の患者における $C_p$ を通常使用時と同程度に維持するためにはENXの用法・用量を常用量の1/8-1/9に変更するべきであったと算定できた。

腎機能障害患者における用法・用量の調節法としては、(a) 投与量は変更せずに投

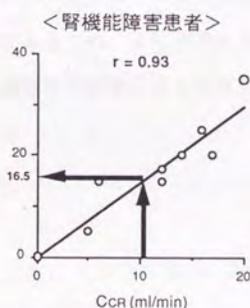
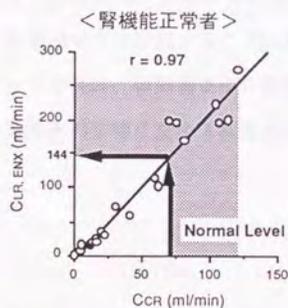
与間隔を延長する方法、(b) 投与間隔は変更せずに投与量を減少させる方法および (c) 両方法の折衷方法の3通りが考えられる。(a)の方法においては、通常使用時と同じ最高・最低血漿中濃度が得られる一方で、高度腎不全患者においては投与間隔が開きすぎるために次回投与前に血漿中濃度の低い時間が通常使用時よりも著しく長く続くという問題がある。

(1) クレアチンクリアランス ( $CL_{CR}$ ; mg/min) の推定 (Cunha, 1988)

$$CL_{CR} = \frac{(140 - \text{Age}) \cdot \text{Body Weight (kg)}}{72 \cdot \text{Serum Creatinine (mg/dl)}} \quad (\text{Male})$$

$$CL_{CR} = \frac{0.85 \cdot (140 - \text{Age}) \cdot \text{Body Weight (kg)}}{72 \cdot \text{Serum Creatinine (mg/dl)}} \quad (\text{Female})$$

(2) エノキサシンの腎クリアランス ( $CL_{R,ENX}$ ; ml/min) の予測 (Nix et al., 1988)



(3) 個々の患者における用法用量の調節

- ・ 投与間隔 ( $\tau$ ) を延長する場合

$$\tau_{(dys.)} = \tau_{(normal)} \cdot \frac{CL_{R,ENX (normal)}}{CL_{R,ENX (dys.)}}$$

- ・ 1回の投与量 (Dose) を減らす場合

$$\text{Dose}_{(dys.)} = \text{Dose}_{(normal)} \cdot \frac{CL_{R,ENX (dys.)}}{CL_{R,ENX (normal)}}$$

図3. 腎障害患者におけるエノキサシンの用法用量の設定方法

(b)の方法においては、薬剤投与回数が変更されないという利点がある一方で、通常使用時と比較して最高血漿中濃度は低くかつ最低血漿中濃度は逆に高いため、抗菌作用や副作用の発現性が異なる場合もあり得る。実際の臨床においては、(c)の様に投与量を下げかつ投与間隔も延長する方法や、 $CL_{CR}$ を基準に腎障害の程度を軽度・中等度および重度の3群に分類し、各群毎に設定されている用法・用量に従うなどの方法(Bennett, 1988)が利用されている。またENXについてはインタビューフォームにおいて腎機能障害時の投与方法として、「健康成人( $CL_{CR} \geq 80$  ml/min)の常用量を600 mg/day、3分割とした場合、中等度腎不全( $50 > CL_{CR} \geq 20$ )では1回200 mgを1日1~2回、高度腎不全( $20 > CL_{CR}$ )では1回200 mgを1日1回」と記載されている(フルマーク錠インタビューフォーム)。

なお本研究の解析においては、腎機能障害患者において二つの仮定を設けている。それは、薬物の中枢移行性は腎機能障害によって影響されないということと、作用部位における薬物に対する感受性は腎機能障害によって影響されないということである。ヒトにおいてこれら両事項を直接検討することは極めて困難であるため、その報告もなされていない。したがって今後は、腎障害モデル動物を用いた薬物の中枢移行性と中枢における感受性に及ぼす腎障害の影響に関する検討が必要であろう。

## まとめ

本研究で使用した臨床使用時の $C_{CSF}$ 範囲に基づく評価方法は、臨床におけるNQs単独あるいはNQsとNSAIDsとの併用による中枢性痙攣の誘発性の評価に有効であった。また腎機能障害患者において、NQsの血漿中濃度を通常使用時と同程度に維持することによりその中枢性副作用の回避をするための、NQsの用法・用量の設定方法が提示できた。

## 引用文献

- K. Akahane, M. Sekiguchi, T. Une and Y. Osada: Structure-epileptogenicity relationship of quinolones with special reference of their interaction with g-aminobutyric acid receptor sites. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **33**: 1704-1708 (1989).
- W. M. Bennett: Guide to drug dosage in renal failure. *Clin. Pharmacokin.*, **15**: 326-354 (1988).
- F. S. Chiccarelli, H. J. Eisner and G. E. Van Lear: Disposition and metabolism of fenbufen in several laboratory animals. *Arzneim. Forsch.*, **30**: 707-715 (1980a).
- F. S. Chiccarelli, H. J. Eisner and G. E. Van Lear: Metabolic and pharmacokinetic studies with fenbufen in man. *Arzneim. Forsch.*, **30**: 728-735 (1980b).
- B. A. Cunha: Antimicrobial therapy. Infectious diseases in the elderly. ed. by B. A. Cunha (1988) 330-344, PSG Publishing, Littleton, MA., U.S.A.
- H. Lode, G. Hoffken, C. Prinzling, P. Glatzel, R. Wiley, P. Plschewski, B. Sievers, D. Reimnitz, K. Borner and P. Koeppe: Comparative pharmacokinetics of new quinolones. *Drugs*, **34** (Suppl.1): 21-25 (1987).
- D. E. Nix, R. W. Schultz, R. W. Frost, A. J. Sedman, D. J. Thomas, A. W. Kinkel and J. J. Schentag: The effect of renal impairment and haemodialysis on single dose pharmacokinetics of oral enoxacin. *J. Antimicrob. Chemother.*, **21** (Suppl. B): 87-95 (1988).
- A. Tsuji, H. Sato, Y. Kume, I. Tamai, E. Okezaki, O. Nagata and H. Kato: Inhibitory effects of quinolone antibacterial agents on g-aminobutyric acid binding to receptor sites in rat brain membranes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **32**: 190-194 (1988a).
- A. Tsuji, H. Sato, E. Okezaki, O. Nagata and H. Kato: Effect of the anti-inflammatory agent fenbufen on the quinolone-induced inhibition of g-aminobutyric acid binding to rat brain membranes *in vitro*. *Biochem. Pharmacol.*, **37**: 4408-4411 (1988b).
- 川原和也, : ニュー・キノロン剤のヒト髄液中移行に関する研究, 日本化学療法学会雑誌 (*Chemotherapy*), **38**: 461-476 (1991).
- 川原和也, 川原元司, 後藤俊弘, 大井好忠: Sparfloxacinのヒト髄液中移行について, 他ニュー・キノロン5剤との比較において, 日本化学療法学会雑誌 (*Chemotherapy*), **39** (suppl.

4): 149-157 (1991).

千代孝夫, 赤堀道也, 北沢康秀, 内田健一郎, 山上和寿, 木内俊一郎, 森口哲也, 田中孝也, ニューキノロン系抗菌剤による中枢神経毒性, 救急医学, 13: 763-768 (1989).

豊田高彰, 村松美紀子, 池田洋, 岡本峰夫, 諫見康弘, 生間敬博, 中村英一, 藤井正博, エノキサシンにて低血糖発作を伴った全身痙攣をきたした透析患者の1例, 日本透析学会誌, 24: 1311-1314 (1991).

平井嗣郎, 田中啓一, 牧野伸治, 成田弘和: ピリドンカルボン酸系抗菌剤及び非ステロイド性抗炎症剤の薬物相互作用: マウスでの経口及び脳内投与による痙攣誘発. 薬学雑誌, 109: 119-126 (1989).

フルマーク錠100 mg・200 mgインタビューフォーム, 大日本製薬(株), 1985, 大阪.

堀誠治, 齋藤篤, 嶋田甚五郎, 大森雅久, 柴孝也, 北条敏夫, 加地正伸, 奥田新一郎, 吉田正樹, 宮原正: 新キノロン薬, T-3262及びその構造類似体の中枢神経毒性に関する研究, 日本化学療法学会雑誌 (Chemotherapy), 36 (suppl. 9): 116-120 (1988).

山本研一, 森川宏二, 永田治, 橋本繁輝, 山田健久, 久保信治, 桶崎英一, 山崎光雄, 内藤行雄, 井上譲, 吉岡弘二: 新キノロン系合成抗菌剤と非ステロイド性抗炎症剤の併用により誘発される痙攣発作, NY-198の中枢作用を中心に, 日本化学療法学会雑誌 (Chemotherapy), 36 (suppl. 2): 300-324 (1988).

## 第3章

ニューキノロン系抗菌剤と非ステロイド性抗炎症剤との  
相互作用による痙攣誘発の回避・処置方法

## 第3章

### 3-1

#### ニューキノロン系抗菌剤と非ステロイド性抗炎症剤による 中枢性副作用を回避するための医薬品情報の構築 —GABA応答抑制の構造活性相関—

## 要約

マウス脳mRNAを注入したアフリカツメガエル卵母細胞におけるGABA応答に対する各種キノロン系抗菌剤(キノロン剤)の抑制作用および非ステロイド性抗炎症剤(NSAIDs)によるその増強効果の構造活性相関に基づき、ニューキノロン系抗菌剤(NQs)とNSAIDsによる中枢性副作用を回避するための医薬品情報の構築を行った。GABA (10  $\mu$ M) 誘発電流は、ナリジクス酸とピロミド酸を除く本研究において使用した全てのキノロン剤により濃度依存的に抑制された。キノロン剤のIC<sub>50</sub> ( $\mu$ M) の順序は、ノルフロキサシン(NFLX) (17) < シプロフロキサシン(CPFX) (32) < エノキサシン(ENX) (58) < ロメフロキサシン(LFLX) (84) < ピベミド酸(PPA) (200) < トスフロキサシン(TFLX) (274) = オフロキサシン(OFLX) (281) < フレロキサシン(FLRX) (457) < スパルフロキサシン(SPFX) (788)であった。キノロン剤のGABA応答抑制と分子構造との関係から、母核7位のピペラジニル基または3-アミノピロリジニル基がGABA<sub>A</sub>受容体に対する拮抗作用を発現している部位である可能性が示された。本研究において使用した全てのNSAIDsは、キノロン剤の非共存下においてGABA応答を変調しなかった。10  $\mu$ Mのフェルピナク(FLB)存在下においてキノロン剤の濃度作用曲線は低濃度側に移動し、FLB非存在下のキノロン剤のIC<sub>50</sub>をFLB存在下のそれと除して得られるキノロン剤の増強比の順序は、FLRX (2.7) = SPFX (2.8) = OFLX (3.2) = TFLX (3.6) < PPA (24) = CPFX (29) < LFLX (83) < ENX (97) < NFLX (165)であった。CPFXを除いて、GABA応答の抑制活性が高いキノロン剤ほどFLBの増強をより強く受ける傾向が得られた。キノロン剤の増強比と分子構造との関係から、母核7位に置換するピペラジニル環上のメチル基と母核1位の比較的大きな置換基が例えば立体障害としてFLBによる増強を防いでいる可能性が示された。NSAIDsについては、フェニル酢酸・プロピオン酸系とインドール酢酸系のNSAIDsはENXの抑制作用を増強したのに対して、その他の系列のNSAIDsであるピロキシカム、アスピリン、サリチル酸、フェニルブタゾン、アセトアミノフェンおよび塩酸チアラミドは増強効果を示さなかった。フェニル酢酸・プロピオン酸系とインドール酢酸系のNSAIDs (10  $\mu$ M) の増強比の順序は、ジク

ロフェナクナトリウム (1.49) < インドメタシン (2.53) < プラノプロフェン (3.09) < イブプロフェン (5.04) < スリンダク (6.24) < ナプロキセン (7.31) < フェノプロフェン (12.7) < ケトプロフェン (22.6) < フルビプロフェン (62.8) < フェルピナク (97.3) であった。使用したこれらのNSAIDsはフェニル酢酸もしくはインドール酢酸構造を共通して有しているため、これらの構造部分がキノロン剤のGABA<sub>A</sub>受容体への抑制活性に対する増強因子として機能している可能性が示された。以上の知見から、NQsとNSAIDsとを併用処方する場合には、第一にNSAIDsとしてフェニル酢酸・プロピオン酸およびインドール酢酸系以外の薬剤を選択するのが望ましく、それが不可の場合にはNQsとしてGABA応答の抑制作用が弱くNSAIDsによる増強が小さい薬剤を選択し、かつNSAIDsとしても増強効果の小さい薬剤を使用するべきであると考えられる。

## 緒言

臨床においては、薬剤の中枢神経系に対する副作用は薬物療法上の最も重要な問題となっている。ニューキノロン系抗菌剤 (new quinolone antimicrobial agents; NQs) は種々の精神神経症状 (頭痛、目まい、眠気、震えなど) や重篤な場合には間代性や強直性の痙攣を惹起する (Simpson and Brodie, 1985; Anastasio et al., 1988; Christ et al., 1988; Slavich et al., 1989; Tateo et al., 1989; Schwarts and Calvert, 1990; Paton and Reeves, 1991)。更には、NQsによる痙攣の誘発性は非ステロイド性抗炎症剤 (non-steroidal anti-inflammatory drugs; NSAIDs) との併用投与により増大する (Christ et al., 1988; Takeo et al., 1989; Paton and Reeves, 1991)。本邦では、フェルピナク (felbinac; FLB) のプロドラッグ (pro-drug) 体であるフェンブフェン (fenbufen; FNB)、ケトプロフェン (ketoprofen; KP) およびフルビプロフェン (flurbiprofen; FLP) のプロドラッグ体であるフルビプロフェンアキセチル (flurbiprofen axetil) の3つのNSAIDsが感染症患者においてNQsとの併用投与により痙攣を誘発したことが厚生省医薬品副作用情報によって通達されている (No. 81, 1986; No. 98, 1989; No. 120, 1993)。これらのNSAIDsはフェニル酢酸 (phenylacetic acid) 構造を共有している。臨床での症例報告や *in vivo*での動物実験による研究から判断して、エノキサシン (enoxacin; ENX) とFNBまたはFLBの併用投与が最も危険性の高い組み合わせであろう。この相互作用による中枢性痙攣の発現機序として、脳の膜標品に対するGABA<sub>A</sub>受容体アゴニスト (agonist) の特異的な結合に対するNQsの抑制とそれに対するNSAIDsの増強による可能性が報告されている (Tsuji et al., 1988ab; Akahane et al., 1989; Hori et al., 1989)。しかし、薬物の効力 (例えば完全または部分作動薬および拮抗薬) は放射性標識化合物を用いた結合実験だけでは評価できない。またGABA応答の濃度依存性は<sup>3</sup>H-GABAの特異的結合のそれとは正比例しないことも報告されているため (Aoshima et al., 1987)、GABA<sub>A</sub>受容体介在性応答に対するこれらNQsとNSAIDsによる抑制作用を定量的に評価することが重要である。Akaikeら (1991) はラット海馬単離細胞におけるGABA応答に対するNQsとFLBとによる抑制作用をパッチクランプ (patch clamp) 法により測定しており、彼らの結果は放射性標識化合物を用いた結合実験と

よく対応している、しかし、近年になって市販された新規NQsであるフレロキサシン (fleroxacin; FLRX)、ロメフロキサシン (lomefloxacin; LFLX)、スパルフロキサシン (sparfloxacin; SPFX) およびトスフロキサシン (tosufloxacin; TFLX) のGABA応答に対する抑制活性は未だ報告されていない。またNSAIDsについてはHoriら (1989) が、インドール酢酸 (indoleacetic acid) 誘導体であるインドメタシン (indometacin; IDM) はNQsのGABA<sub>A</sub>受容体結合に対する阻害作用を増強するが、サリチル酸 (salicylic acid) 誘導体であるアスピリン (aspirin; ASP) にはその作用はないことを放射性標識化合物を用いた検討から報告した。しかし *in vitro* におけるNQsとの相互作用に関する研究に使用されたNSAIDsの数が未だ少ないため、NSAIDsのNQsによるGABA応答抑制に対する増強効果とNSAIDsの分子構造に関して各種NSAIDsを用いた系統的な解析はなされていない。従って、FLRX、LFLX、SPFX およびTFLXの4つの薬物を含めたNQsのGABA<sub>A</sub>受容体介在応答に対する抑制作用とそれに対する各種系列のNSAIDsの増強効果を定量的に評価し、更にこれらの作用と両薬物群の分子構造との関係を構造活性相関論的に検討することが、NQsとNSAIDsとの相互作用に基づくGABA神経伝達の遮断による中枢性副作用の発現機序を明かにする観点から必要である。

アフリカツメガエル卵母細胞外來性遺伝情報発現系においては、各種の受容体やチャネル (channel) を再構築することが可能であり、また卵母細胞が大きく球形であることから電流応答の電気生理学的測定も簡便である (Aoshima et al., 1987; Asanuma et al., 1987; Horikoshi et al., 1988)。更にヒト脳のmRNAを注入することによりヒト由来の各種受容体を発現させることも可能である (Gundersen et al., 1984ab; Tomaselli et al., 1989)。我々は既に、この系が薬物間相互作用による受容体介在性の神経毒性に対する *in vitro* スクリーニング (screening) 法として有用であることを報告した (Kawakami et al., 1993)。本論文の第1章において各種アゴニストによる応答に対するNQsとFLBの作用を検討した。その結果、NQsはGABA<sub>A</sub>受容体介在応答を濃度依存的に抑制し、それらの抑制作用はFLB存在下において増強された。一方、高濃度のENXはグリシン (glycine) およびアセチルコリン (acetylcholine) 誘発電流に対する弱い抑制作用を示したが、これらの作用はFLBの存在下に

おいて影響されなかった。セロトニン (serotonin)、L-グルタミン酸 (L-glutamic acid)、カイン酸 (kainic acid)、キスカル酸 (quisqualic acid) そしてN-メチル-D-アスパラギン酸 (N-methyl-D-aspartic acid) 誘発膜電流はENXとFLBの共存またはそれぞれ存在下において変調されなかった。更に第1章と第2章 2-3 における考察から次の二つの知見を見いだした。それは、GABA応答に対するNQsの $IC_{50}$ がマウスの中樞神経系におけるNQsの痙攣誘発活性と有意に相関すること、そしてGABA応答に対するENXの抑制作用発現濃度が腎不全患者におけるENX単独投与による痙攣発現時の脳脊髄液中濃度と対応したことである。したがってこれらの知見から、NQsとNSAIDsとの相互作用による痙攣誘発性はNSAIDs共存下におけるGABA応答に対するNQsの抑制作用に基づいて評価することが可能であると考えられる。また第2章 2-2 において、ENXとFLBによるGABA応答抑制に関しては大きな動物種差はないことも確認した。

本研究ではマウス脳mRNAを注入したアフリカツメガエル卵母細胞を用いて、GABA誘発膜電流に対するFLRX、LFLX、SPFXおよびTFLXを含めたNQsとオールドキノロン系抗菌剤 (old quinolone antimicrobial agents; OQs) の抑制作用と、ENXのGABA応答抑制に対する各種系列のNSAIDsの増強効果を調べた。そして、これらの作用と両薬物群の分子構造との関係に基づいて、NQsとNSAIDsとの相互作用による中枢性副作用を回避するための医薬品情報の構築を行った。

## 材料と方法

### 実験材料

#### 使用動物

雌性アフリカツメガエルの入手および飼育は、第1章に記述した方法に従った。

#### 使用薬物

OQsであるナリジクス酸 (nalidixic Acid; NA) は第一製薬 (株) (東京) より、ピロミド酸 (piromidic acid; PA) とピベミド酸 (pipemidic Acid; PPA) は大日本製薬 (株) (大阪) より、シノキサシン (cinoxacin; CINX) は塩野義製薬 (株) (大阪) より提供された。NQsであるENXとSPFXは大日本製薬 (株) より、ノルフロキサシン (norfloxacin; NFLX) とFLRXは杏林製薬 (株) (東京) より、塩酸シプロフロキサシン (ciprofloxacin hydrochloride; CPFX) はバイエル薬品 (株) (大阪) より、オフロキサシン (ofloxacin; OFLX) は第一製薬 (株) より、LFLXは塩野義製薬 (株) より、TFLXは富山化学工業 (株) (東京) より提供された。Fig. 1にこれらOQsとNQsの構造式を示した。

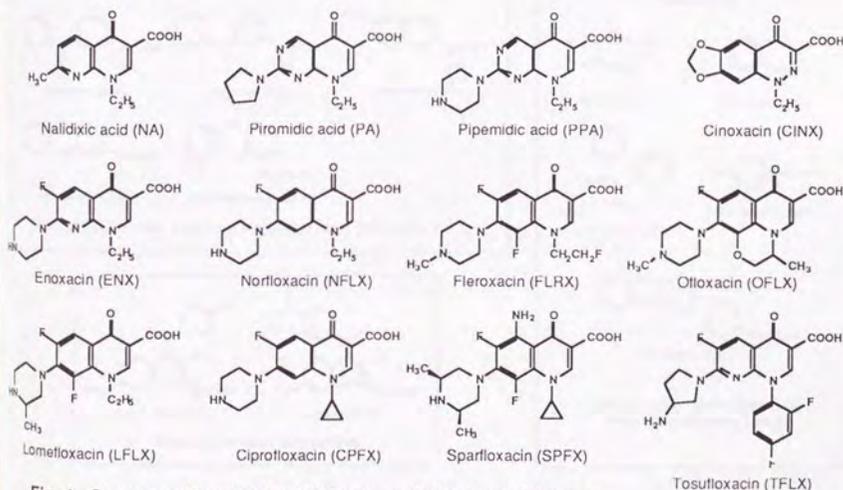


Fig. 1. Structural Formulae of Quinolone Antibacterial Agents.

NSAIDsでは、フェニル酢酸・プロピオン酸 (propionic acid) 系NSAIDsであるFLBは日本レダリー (株) (東京) より、FLPとイブプロフェン (ibuprofen; IBP) は科研製薬 (株) (浦安) より、KTPはキッセイ薬品工業 (株) (松本) より、フェノプロフェンカルシウム (fenopropfen calcium; FNP) は山之内製薬 (株) (東京) より、プラノプロフェン (pranoprofen; PRP) は吉富製薬 (株) (大阪) より、ジクロフェナクナトリウム (diclofenac sodium; DCF) は日本チバガイギー (株) (宝塚) より提供され、ナプロキセン (naproxen; NPR) は米国シグマ・ケミカル社 (Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO) より購入した。インドール酢酸系NSAIDsであるスリンダク (sulindac; SLD) は萬有製薬 (株) (東京) より提供され、IDMは和光純薬工業 (株) (大阪) より購入した。その他系列のNSAIDsである塩酸チアラミド (tiaramide hydrochloride; TRM) は藤沢薬品工業 (株) (大阪) より提供され、ピロキシカム (piroxicam; PXC) は米国シグマ・ケミカル社より、アセトアミノフェン (acetaminophen; AAP) およびASPとその代謝物であるサリチル酸 (salicylic acid; SLC) は和光純薬工業 (株) より、フェニルブタゾン (phenylbutazone; PBZ) はナカライテスク (株) (京都) より購入した。Fig. 2にこれらNSAIDsの構造式を示した。

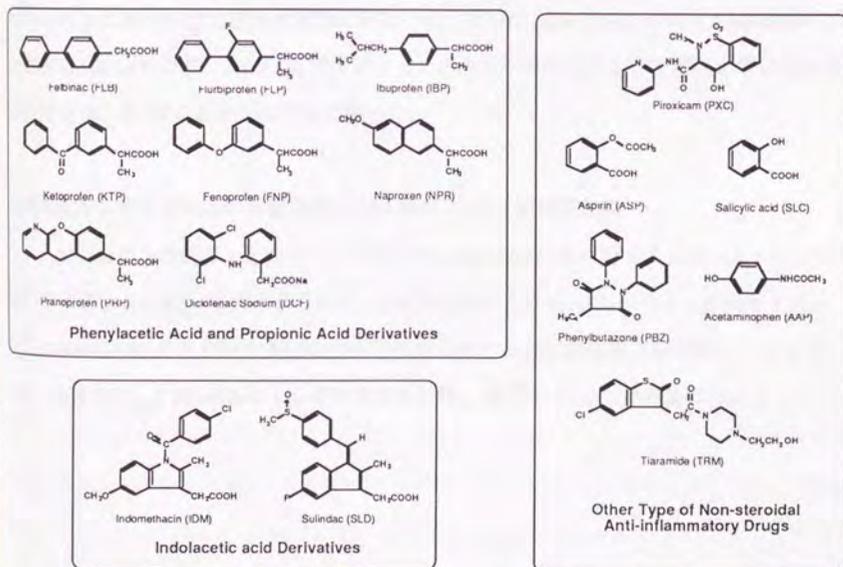


Fig. 2. Structural Formulae of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs.

GABAと細胞分散用コラゲナーゼ (collagenase) は和光純薬工業 (株) より、局方生理食塩液は大塚製薬 (株) (東京) より購入した。その他の総ての試薬は、通常市販の特級品を購入して使用した。

### In vitro受容体応答実験

第1章においては、マウス脳mRNAを注入したアフリカツメガエル卵母細胞におけるNQsのGABA応答に対する抑制作用から、マウスにおけるNQsによる間代性痙攣誘発時の脳組織中濃度が定量的に予測できることを示した。更に第2章 2-2 においては、脳mRNAを注入したアフリカツメガエル卵母細胞におけるENXの抑制作用とFLBによるその増強効果がmRNAの由来する動物種間において大きく相違しないことを示した。そこで本章では、マウス脳mRNAを注入したアフリカツメガエル卵母細胞を用いて、GABA応答に対する各種OQs・NQsの抑制作用とFLBによるその増強効果、およびENXのGABA応答抑制に対する各種NSAIDsの増強効果を調べ、更にそれらの作用をOQs・NQsおよびNSAIDsの分子構造に基づき構造活性相関的に評価した。全RNA (total RNA) のマウス脳組織からの抽出とmRNAの単離、mRNAのアフリカツメガエルへの注入および受容体応答の電気生理学測定は、第1章に記述した方法に従った。

#### GABA応答に対するNQsの抑制作用とNSAIDsによるその増強効果

10  $\mu$ M FLBの共存・非共存下における10  $\mu$ M GABA応答に対する各種OQs・NQsの抑制作用に関する濃度作用曲線を求めた。また10  $\mu$ Mの各種NSAIDsの共存・非共存下における10  $\mu$ M GABA応答に対するENXの抑制作用に関する濃度作用曲線を求めた。そしてOQs・NQsの $IC_{50}$ とNSAIDsによる増強比の算出は、第1章に記述した方法に従った。

## 結果

### OOs・NQsによるGABA応答抑制の濃度依存性

Fig. 3には、FLB (10  $\mu$ M) の存在・非存在下におけるGABA (10  $\mu$ M) 誘発電流応答に対する抑制作用に関するOOs・NQsの濃度作用曲線をそれぞれ示した。OOsのPPAと全てのNQsはGABA応答を濃度依存的に抑制し、それら各薬物の濃度作用曲線はFLBの共存により低濃度側にシフトした。一方、OOsのNAとPAは0.5 mM以下の濃度範囲においてFLB共存・非共存下共にGABA応答を変化しなかった。

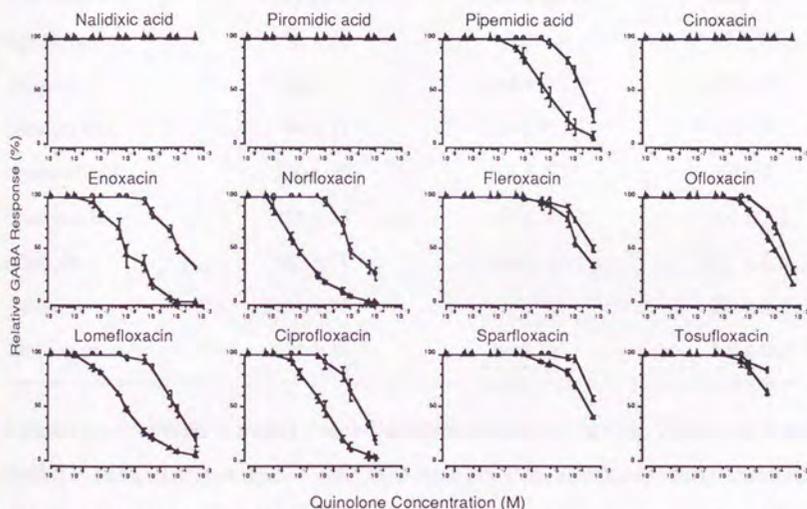


Fig. 3. Concentration-response Curve of Quinolones for the Inhibition of GABA (10  $\mu$ M)-induced Current Response in the Absence (○) and Presence (▲) of Felbinac in *Xenopus* Oocytes Injected with Mouse-brain mRNA. (n = 3, mean  $\pm$  S.D.)

Table IにはGABA応答に対する抑制作用を有したキノロン剤のGABA (10  $\mu$ M) 応答に対する $IC_{50}$ とFLB (10  $\mu$ M) による増強比を表示した。FLBの非共存下における $IC_{50}$ の順序はNFLX < CPFX < ENX < LFLX < PPA < TFLX = OFLX < FLRX < SPFXであり、FLBの共存下における $IC_{50}$ の順序はNFLX < ENX < LFLX < CPFX < PPA < TFLX < = OFLX <

FLRX < SPFXであった。増強比の順序はFLRX = SPFX = OFLX = TFLX < PPA = CPFX < LFLX < ENX < NFLXであった。

Table I IC<sub>50</sub> (μM) and the Potentiated Ratio of Quinolones on GABA (10 μM)-induced Current Response in the Presence or Absence of 10 μM Felbinac.<sup>1</sup>

Quinolone <sup>2</sup>	Control	Felbinac	Potentiated Ratio
Norfloxacin	17 ± 8	0.099 ± 0.013	165 ± 53
Ciprofloxacin	32 ± 10	1.7 ± 1.4	29 ± 12
Enoxacin	58 ± 7	0.64 ± 0.21	97 ± 20
Lomefloxacin	84 ± 21	1.0 ± 0.1	83 ± 26
Pipemidic acid	200 ± 50	9.2 ± 3.9	24 ± 6
Tosufloxacin	274 ± 53	86 ± 22	3.6 ± 1.5
Ofloracin	281 ± 71	87 ± 4	3.2 ± 0.9
Fleroxacin	457 ± 77	170 ± 17	2.7 ± 0.5
Sparfloxacin	788 ± 39	279 ± 16	2.8 ± 0.3

1: All data were presented as mean ± standard deviation of three experiments. GABA response was recorded in *Xenopus* oocytes injected with mouse-brain mRNA by an ordinary voltage-clamp method at a holding potential of -60 mV in modified Brath's medium. Potentiated ratio was calculated by dividing IC<sub>50</sub> in the absence of felbinac (control group) by that in the presence of felbinac (felbinac group).

2: Cinoxacin, nalidixic acid and piromidic acid had no effect on GABA response in their range less than 0.5 mM in the presence or absence of 10 μM felbinac.

Fig. 4にはFLB非存在下におけるキノロン剤の $IC_{50}$ と10  $\mu$ MのFLBによる増強比との関係を示す。 $IC_{50}$ が300  $\mu$ M以下の範囲では、CPFXを除いて $IC_{50}$ のlog値と増強比の間には有意な負の相関性があった。300  $\mu$ M以上の範囲ではこの傾向は見られず、FLRXおよびSPFXの増強比はその $IC_{50}$ の値に関わらずTFLXやOFLXと同じ約3であった。

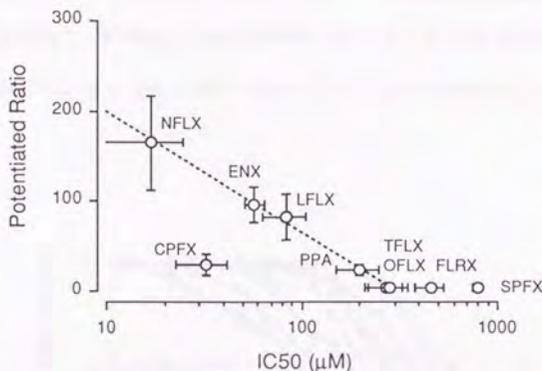


Fig. 4. Relationship between  $IC_{50}$  for GABA (10  $\mu$ M)-induced Current Response in the Absence of Felbinac and Potentiated Ratio by 10  $\mu$ M felbinac for Inhibition of GABA Response among Quinolones.

Broken line represents a linear regression between logarithmic value of  $IC_{50}$  (M) and potentiated ratio of quinolones except CPFX, FLRX and SPFX,  $y = (-134) \cdot \log(x) - 476$ , and the coefficient of correlation is 0.998.

#### NSAIDsによるOQs・NQsのGABA応答抑制に対する増強

ENXのGABA応答抑制に対するNSAIDs (10  $\mu$ M) の増強効果を検討した。その結果、本研究において使用したNSAIDsは、その増強効果を有する薬物 (FLB、FLP、IBP、KTP、FNP、NPR、PRP、DCF、IDMおよびSLD) と増強効果を有さない薬物 (PXC、ASP、SLC、PBZ、AAPおよびTRM) に分類できることが分かった。更に増強効果を有する薬物は全てフェニル酢酸・プロピオン酸系もしくはインドール酢酸系のNSAIDsであり、増強効果を有さない薬物は全てこれらの系列に属さないNSAIDsであった。なお本研究に用いた全て

のNSAIDsはそれ単独では応答を示さず、またENXの非共存下においてはGABA応答を調節しなかった。

Fig. 5には、フェニル酢酸・プロピオン酸系もしくはインドール酢酸系のNSAIDs (10  $\mu$ M) 存在・非存在下におけるGABA (10  $\mu$ M) 応答の抑制作用に関するENXの濃度作用曲線を示した。NSAIDsの共存によりENXの濃度作用曲線は低濃度側にシフトした。Table IIには、フェニル酢酸・プロピオン酸系およびインドール酢酸系のNSAIDs (10  $\mu$ M) の共存下におけるENXのIC<sub>50</sub>と、ENXのGABA応答抑制に対するこれらNSAIDsの増強比を表示した。増強比の順序はDCF < IDM < PRP < IBP < SLD < NPR < FNP < KTP < FLP < FLBであった。

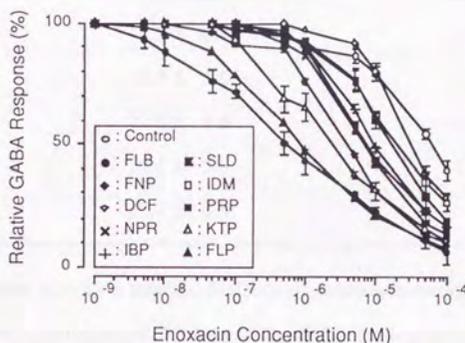


Fig. 5. Potentiation of Inhibitory Effect of Enoxacin on GABA (10  $\mu$ M)-induced Current Response by Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs in *Xenopus* Oocytes Injected with Mouse-brain mRNA. (n = 3, mean  $\pm$  S.D.)

Table II IC<sub>50</sub> (μM) of Enoxacin on GABA (10 μM)-induced Current and the Potentiation Ratio of 10 μM Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs) for Inhibitory Effect of Enoxacin on the GABA Response.<sup>1</sup>

NSAIDs <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> of Enoxacin (μM)	Potentiation Ratio
Felbinac	0.635 ± 0.209	97.3 ± 10.0
Flurbiprofen	0.918 ± 0.137	62.8 ± 3.0
Ketoprofen	2.59 ± 0.45	22.6 ± 2.6
Fenoprofen	4.29 ± 0.17	12.7 ± 1.2
Naproxen	7.45 ± 0.61	7.31 ± 0.21
Sulindac	8.72 ± 0.45	6.24 ± 0.36
Ibuprofen	10.8 ± 0.7	5.04 ± 0.23
Pranoprofen	18.8 ± 5.6	3.09 ± 0.61
Indomethacin	22.0 ± 4.6	2.53 ± 0.21
Diclofenac sodium	36.6 ± 5.5	1.49 ± 0.13
Control	57.7 ± 6.6	12 ± 4

1: All data were presented as mean ± standard deviation of three experiments. GABA response was recorded in *Xenopus* oocytes injected with mouse-brain mRNA by an ordinary voltage-clamp method at a holding potential of -60 mV in modified Brath's medium. Potentiation ratio of NSAIDs was calculated by dividing IC<sub>50</sub> of enoxacin in the absence of NSAIDs by that in the presence of NSAIDs.

2: Piroxicam, aspirin, salicylic acid, phenylbutazone, acetaminophen and tiaramide did not potentiate the inhibitory effect of enoxacin on the GABA (10 μM) response. Control presents in the absence of NSAIDs.

## 考察

### OOs・NQsによるGABA応答抑制

FLB存在・非存在下でのGABA誘発電流に対するFLRX、LFLX、SPFXおよびTFLXを含むOOs・NQsの濃度依存的な抑制作用について検討した。OOs (NA、PAおよびPPA) 間における比較では、GABA応答はPPAにより抑制されたがNAとPAでは抑制されなかった。PAとPPAとの構造上の唯一の違いは母核7位の置換基である。PPAはピペラジニル (piperaziny) 基を有しており、このピペラジン (piperazine) 環はTFLX以外の全てのNQsに共通している。TFLXだけは同じ位置が3-アミノピロリジニル (3-aminopyrrolidinyl) 基に置換されている。PPAと全てのNQsはGABA応答に対する抑制作用を示したことから、ピペラジニル基と3-アミノピペラジニル基がGABA<sub>A</sub>受容体に対する拮抗薬としての作用部位である可能性がある。Akahaneら (1989) は幾つかのGABA<sub>A</sub>作動薬、例えばGABA、ムシモール (muscimol)、イソニペコチン酸 (isonipecotinic acid) および3-アミノシクロペンタンカルボキシ酸 (3-aminocyclopentane carboxylic acid)、がキノロン (quinolone) 分子のピペラジン環や3-アミノピロリジン (3-aminopyrrolidine) 環と一部類似した構造を有していることをマウスにおける痙攣誘発活性やラット脳の膜標品への<sup>3</sup>H-ムシモールの特異的結合に対する阻害活性に基づいて報告しており、本研究における知見もAkahaneら (1989) の報告と一致する。

GABA応答に対するPPA・NQsの抑制作用はFLBの存在下において増強されたが、その増強比は薬物間で大きく異なった (Table I)。FLB非存在下でのIC<sub>50</sub>が100 μM以下であったNFLX、CPF<sub>X</sub>、ENXおよびLFLX間で比較すると、CPF<sub>X</sub>の増強比は他の薬物のそれよりも小さかった。CPF<sub>X</sub>だけが母核の1位に大きなシクロプロピル (cyclopropyl) 環を有しており他の薬物ではエチル (ethyl) 基であることから、1位の比較的大きな置換基がFLBによる増強を例えば立体障害の様に妨げている可能性がある。ENXとPPAを比較すると、ENXのIC<sub>50</sub>はPPAのそれよりも小さく、またENXの増強比はPPAのそれよりも大きかった。

ENXとPPA間における構造上の違いはENXが母核6位にフルオロ (fluoro) 基を有していることであり、この6位の置換基のフルオロ基は全てのNQs間において共通している。ニュ

キノロン剤へのフルオロ基の導入は抗菌活性の拡大をもたらした (Schentag and Domagala, 1984). しかしフルオロ基の導入は、GABA<sub>A</sub>受容体に対する阻害活性も増大する結果となったようである。

本研究において、PPA・NQs間におけるFLB非存在下でのIC<sub>50</sub>と増強比との関係から興味深い傾向が見いだされた (Fig. 4). それはCPFXを除いて、GABA応答に対する抑制作用がより強いキノロン剤ほどFLBによる増強も受けやすいということである。FLB非存在下でのIC<sub>50</sub>が200 μM以上と大きく増強比が約3と小さかったTFLX、OFLX、FLRXおよびSPFXは、CPFXと同様に母核1位に比較的大きな置換基を有するだけでなく、GABA<sub>A</sub>受容体に対する拮抗薬としての作用部位と考えられる7位のピペラジン環上にメチル基も有している。従って、ピペラジニル基上のメチル基も母核1位上の比較的大きな部分と同様にGABA<sub>A</sub>受容体への親和性を低下させ更にFLBによる増強も妨げている可能性が考えられる。

#### NSAIDsによる増強効果

本研究で使用したNSAIDsはENXによるGABA応答の抑制に対する増強効果に関して大きく二群に分類され、フェニル酢酸・プロピオン酸系とインドール酢酸系のNSAIDsはその増強効果を示し、その他の系列のNSAIDsは増強効果を示さなかった。フェニル酢酸・プロピオン酸系とインドール酢酸系のNSAIDsはそれぞれフェニル酢酸とインドール酢酸の構造を共通して有している。このフェニル酢酸またはインドール酢酸の構造部分は、増強効果を示さなかったNSAIDsには存在しない。従ってこのフェニル (phenyl) 環もしくはインドール (indole) 環3位に酢酸が付加した構造部分が、NQsによるGABA応答の抑制に対する増強効果に関して重要な役割を担っていると考えられる。

ENXのGABA応答抑制に対する増強比は本研究で使用したフェニル酢酸・プロピオン酸系とインドール酢酸系のNSAIDs間において大きく異なった (Table II). 臨床においてNQsとの相互作用による痙攣誘発の症例報告があったNSAIDsはFLB、FLPおよびKTPであり、これらは増強比が20以上と高い薬物であった。これら3つの薬物以外のフェニル酢酸・

プロピオン酸系とインドール酢酸系のNSAIDsにおいても弱いながらもENXの抑制作用が増強されたことから、これら系列のNSAIDsはNQsの痙攣誘発性を増強する可能性が考えられる。なお本研究においては、各NSAIDsの増強効果に関する濃度依存性については第1章において使用したFLB以外では検討しておらず、また各NSAIDsの中枢移行性に関するデータも完全に入手できなかった。そのために、第2章2-3で示した方法論である、*in vitro*実験におけるNQsによるGABA応答の抑制作用に対するNSAIDsの増強効果と臨床使用時における中枢でのNSAIDs濃度との比較に基づいた、痙攣誘発性に対するNSAIDsの増強効果に関する定量的評価は実施できなかった。

#### まとめ

PPA・NQsの母核7位に置換するピペラジニル基または3-アミノピロリジニル基はGABA<sub>A</sub>受容体に対する抑制作用を発現する部位である可能性が示された。CPF<sub>X</sub>を除いてPPA・NQsのGABA応答に対するIC<sub>50</sub>とFLBによる増強比との間には負の相関性が認められた。NQsにおける母核の7位のピペラジン環上のメチル基と1位の比較的大きな構造部分が、GABA応答に対するNQsの抑制作用とNSAIDsによるその増強効果を妨げていることが示された。フェニル酢酸・プロピオン酸系またはインドール酢酸系のNSAIDsはENXによるGABA応答の抑制作用に対して増強効果を示したのに対して、その他の系列のNSAIDsは増強効果を示さなかった。従ってNSAIDsのフェニル酢酸またはインドール酢酸の構造部分がGABA<sub>A</sub>受容体へのNQsの抑制活性に対する増強因子として機能している可能性が示された。これらの結果からNQsとNSAIDsとを併用処方する場合には、第一にNSAIDsとしてフェニル酢酸・プロピオン酸およびインドール酢酸以外の薬剤を選択するのが望ましく、それが不可の場合にはNQsとしてGABA応答の抑制作用が弱くNSAIDsによる増強が小さい薬剤を選択し、かつNSAIDsとしても増強効果の小さい薬剤を使用するべきであると考えられる。

## 引用文献

- Akahane, K., Sekiguchi, M., Une, T. and Osada, Y.: Structure-epileptogenicity relationship of quinolones with special reference to their interaction with  $\gamma$ -aminobutyric acid receptor sites. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**: 1704-1708, 1989.
- Akaike, N., Shirasaki, T. and Yakushiji, T.: (1991) Quinolones and fenbufen interact with GABAA receptor in dissociated hippocampal cells of rat. *J. Neurophysiol.* **66**: 497-504, 1991.
- Anastasio, G.D., Menscer, D. and Little, J.M.: Norfloxacin and seizures. *Ann. Intern. Med.* **109**: 169-170, 1988.
- Aoshima, H., Anan, M., Ishii, H., Iio, H. and Kobayashi, S.: Minimal model to account for the membrane conductance increase and desensitization of  $\gamma$ -aminobutyric acid receptors synthesized in the *Xenopus* oocytes injected with rat brain mRNA. *Biochem.* **26**: 4811-4816, 1987.
- Asanuma, A., Horikoshi, T., Yanagisawa, K., Anzai, K. and Goto, S.: The distribution of GABA and glycine response in the mouse brain using *Xenopus* oocytes. *Neurosci. Lett.* **76**: 87-90, 1987.
- Christ, W., Lehnert, T. and Ulbrich, B.: Specific toxicologic aspects of the quinolones. *Rev. Infect. Dis.* **10** (Suppl.1): S141-S146, 1988.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156-159, 1987.
- Gundersen, C.B., Miledi, R. and Parker, I.: Messenger RNA from human brain induces drug- and Voltage-operated channels in *Xenopus* oocytes. *Nature* **308**: 421-424, 1984a.
- Gundersen, C.B., Miledi, R., F.R.S. and Parker, I.: Properties of human glycine receptor expressed in *Xenopus* oocytes. *Proc. R. Soc. Lond. B* **221**: 235-244, 1984b.
- Hori, S., Shimada, J., Saito, A., Matsuda, M. and Miyahara, T.: Comparison of the inhibitory effects of new quinolones on  $\gamma$ -aminobutyric acid receptor binding in the presence of antiinflammatory drugs. *Rev. Infect. Dis.* **11** (Suppl. 5): S1397-S1398, 1989.

- Horikoshi, T., Asanuma, A., Yanagisawa, K., Anzai, K. and Goto, S.: Taurine and  $\beta$ -alanine act on both GABA and glycine receptors in *Xenopus* oocyte injected with mouse messenger RNA. *Mol. Brain Res.* **4**: 97-105, 1988.
- Kawakami, J., Shimokawa, M., Yamamoto, K., Sawada, Y., Asanuma, A., Yanagisawa, K. and Iga, T.: Inhibition of GABA<sub>A</sub> receptor-mediated current responses by enoxacin (new quinolone) and felbinac (non-steroidal anti-inflammatory drug) in *Xenopus* oocytes injected with mouse-brain messenger RNA. *Biol. Pharm. Bull.* **16**: 726-728, 1993.
- Kawakami, J., Yamamoto K., Asanuma A., Yanagisawa K., Sawada Y. and Iga. T. Convulsive interaction with new quinolones and non-steroidal anti-inflammatory drug by inhibition of GABA-ergic neurotransmission in mice. (submitted)
- Paton, J.H. and Reeves, D.S.: Clinical features and management of adverse effects of quinolone antibacterials. *Drug Safety* **6**: 8-27, 1991.
- Schentag, J.J. and Domagala, J.M.: Structure activity relationships with the quinolone antibiotics. *Res. Clin. Forums* **7**: 9-14, 1984.
- Schwartz, M.T. and Calvert, J.F.: Potential neurologic toxicity related to ciprofloxacin. *Ann. Pharmacother.* **24**: 138-140, 1990.
- Simpson, K.J. and Brodie, M.J.: Convulsion related to enoxacin. *Lancet* **II**: 161, 1985.
- Slavich, I.L., Gleffe, R.F. and Haas, E.J.: Grand mal epileptic seizures during ciprofloxacin therapy. *JAMA* **261**: 558-559, 1989.
- Takeo, G., Shibuya, N., Motomura, M., Kanazawa, H. and Shishido, H.: A new DNA gyrase inhibitor induces convulsions: A case report and animal experiments. *Chemotherapy* (Tokyo) **37**: 1154-1159, 1989.
- Tomaselli, G.F., Marban, E. and Yellen, G.: Sodium channels from human brain RNA expressed in *Xenopus* oocytes: Basic electrophysiologic characteristics and their modification by diphenylhydantoin. *J. Clin. Invest.*, **83**: 1724-1732, 1989.
- Tsuji, A., Sato, H., Kume, Y., Tamai, I., Okezaki, E., Nagata, O. and Kato, H.: Inhibitory effects of quinolone antibacterial agents on  $\gamma$ -aminobutyric acid binding to receptor sites on rat brain

membranes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 190-194, 1988a.

Tsuji, A., Sato, H., Okezaki, E., Nagata, O. and Kato, H.: Effect of the anti-inflammatory agent fenbufen on the quinolone-induced inhibition of  $\gamma$ -aminobutyric acid binding to rat brain membranes *in vitro*. *Biochem. Pharmacol.* 37: 4408-4411, 1988b.

### 第3章

#### 3-2

## ニューキノロン系抗菌剤と非ステロイド性抗炎症剤により 発現した中枢性痙攣に対する処置方法の確立

## 要約

ニューキノロン系抗菌剤 (NQs) 単独あるいはNQsと非ステロイド性抗炎症剤 (NSAIDs) との併用投与時に中枢性痙攣が発現した場合における処置方法の確立を目的として、抗痙攣薬による後処理効果を検討した。あらかじめ片側の尾静脈を確保してある非拘束状態のマウスにエノキサシン (ENX) とフェルビナク (FLB) とを併用して反対側の静脈内に瞬時注入し間代性痙攣を発現させた。最初に間代性痙攣を発現した直後に、抗痙攣薬であるフェニトイン (PHT) またはジアゼパム (DZP) を確保しておいた尾静脈から注入した。抗痙攣薬を投与後に痙攣を再発した動物には、少量の抗痙攣薬を追加投与した。抗痙攣薬の対照群 (未処理群と生理食塩液群) では、痙攣は抑制されず呼吸不全により致死した。PHT群では、PHT投与直後は一時的に鎮静化するものの間代性痙攣を再発し呼吸不全により致死した。一方DZP群では、DZP投与直後に鎮静化した。一部の動物においては痙攣を再発したが、DZPの追加投与で痙攣の重積を避けることにより再鎮静化し呼吸も維持できた。DZPによって痙攣から離脱した動物は全て翌日以降まで生存した。既報の症例においてもDZPが有効であることおよび死亡例はないことから、NQs単独あるいはNQsとNSAIDsとの併用投与により発現した中枢性痙攣に対しては、DZPを第一選択薬とし、更に必要であるならば気管内挿管による呼吸管理やその他の解毒処置を施行することで対処できると考えられる。

## 緒言

ニューキノロン系抗菌剤 (new quinolone antimicrobial agents; NQs) は痙攣を含む種々の中枢性副作用を誘発し、その誘発性は非ステロイド性抗炎症剤 (non-steroidal anti-inflammatory drugs; NSAIDs) との併用投与により増大する。このNQsとNSAIDsとの相互作用による中枢性痙攣では、エノキサシン (enoxacin; ENX) とフェルビナク (felbinac; FLB) あるいはそのプロドラッグ体であるフェンブフェン (fenbufen) との併用投与が最も痙攣誘発性の高い組み合わせであると考えられる (第3章 3-1)。本研究においては、*in vitro*におけるNQsのGABA応答に対する抑制作用から*in vivo*におけるNQsの痙攣誘発性が予測可能であることを示した (第1章)。また、NQsの痙攣誘発性に関する危険因子となる腎機能障害時における用法用量の設定方法を示した (第2章 3-2)。更に、GABA応答に対する各種NQsとNSAIDsとによる抑制作用とそれら薬物群の分子構造との関係に基づく中枢性副作用を回避するための医薬品情報の構築を行い、NQsとNSAIDsとを併用処方する場合には、第一にNSAIDsとしてフェニル酢酸 (phenylacetic acid)・プロピオン酸 (propionic acid) およびインドール酢酸 (indoleacetic acid) 系以外の薬剤を選択するのが望ましく、それが不可の場合にはNQsとしてGABA応答の抑制作用が弱くNSAIDsによる増強が小さい薬剤を選択し、かつNSAIDsとしても増強効果の小さい薬剤を使用すべきであることを示した (第3章 3-1)。このような医薬品による副作用回避のための用法用量の調節や代替医薬品の選択の具体的提示は、臨床における適切な薬物療法の確立の観点から極めて有用な医薬品情報であろう。更に医療現場では、副作用発現を未然に防ぐための予測・回避法に加えて、実際に患者において当該副作用が発現した際の有効な処置方法に関する医薬品情報の構築が求められている。

NQsとNSAIDsとの相互作用に関しては各種の基礎研究がなされており、その一部において両薬物による中枢性痙攣に対する抗痙攣薬の効果が報告されている (鈴木ら, 1992; 野崎, 1991; 山本ら, 1988)。野崎 (1991) は抗痙攣作用を有する各種化合物の効果を検討しているが、その実験系においては、抗痙攣薬を前処理として投与しており痙攣発現後の後処理効果については検討していないこと、その投与経路が主に腹腔内投与や皮下投与

であり臨床において救急時に用いる静脈内投与ではないこと、抗痙攣作用を主として強直性痙攣に対する抑制作用を中心に考察しており間代性痙攣を抑制していなくても有効と判断していること、その検討自体が痙攣発現機序の解明を主な目的としていること等の問題点がある。また、抗痙攣薬の後処理効果については鈴木ら(1992)と山本ら(1988)がウサギを用いて検討している。しかし、鈴木ら(1992)はジアゼパム(diazepam; DZP)は痙攣を完全には抑制しないと報告している一方で山本ら(1988)はDZPは痙攣を完全に抑制したと報告しており、両者間で結果が相違している。したがってNQsとNSAIDsによる中枢性痙攣に対する抗痙攣薬の後処理効果に関する新たな検討に基づきこの両者間の結果の相違について考察することが必要である。更に臨床における有効な処置方法の確立の観点から、動物実験において再現した中枢性痙攣に対する抑制作用の検討だけではなく、副作用症例における各種処置の効果に関しても考察することが重要である。

本研究では、非拘束状態のマウスにおいてENXとFLBとの静脈内投与により誘発される間代性痙攣に対する抗痙攣薬であるフェニトイン(phenytoin; PHT)あるいはDZPによる後処理効果を検討した。抗痙攣薬としてPHTとDZPを選択した理由は、臨床において両薬物の静注用製剤が痙攣発作に対する救急処置薬として常用されているためである。そして、本研究における中枢性痙攣に対する抗痙攣薬の後処理効果と既報の症例における各種処置の有効性に基づいて、NQsとNSAIDsとの併用投与時に中枢性痙攣が発現した場合における有効な処置方法に関する医薬品情報の構築を行った。

## 材料と方法

### 実験材料

#### 使用動物

ddY系雄性マウス (mouse) の入手および飼育は、第1章に記述した方法に従った。

#### 使用薬物

NQsであるENXは大日本製薬(株)(大阪)より、NSAIDsであるFLBは日本レダリー(株)(東京)より提供された。抗痙攣薬であるPHTは市販製剤であるアレビアチン®注射液を大日本製薬(株)より、DZPは市販製剤であるセルシン®注射液を武田薬品工業(株)(大阪)より購入して使用した。局方生理食塩液は大塚製薬(株)(東京)より購入した。その他の総ての試薬は、通常市販の特級品を購入して使用した。

### In vivo動物実験

マウスにおいてENXとFLBの併用投与により誘発された中枢性痙攣に対する抗痙攣薬の後処理効果を検討した。そして本実験での抗痙攣薬による中枢性痙攣からの回復と既報の症例での各種処置の効果に基づいて、NQsとNSAIDsによる中枢性痙攣の発現時における有効な処置方法に関する医薬品情報の構築を行った。

#### 投与薬液の調製

ENXとFLBの投与薬液の調製は、第1章に記述した方法に従った。PHTの投与薬液は市販製剤の注射液(50 mg/ml)を生理食塩液で20あるいは100倍に希釈して使用した。DZPの投与薬液は市販製剤の注射液(5 mg/ml)を生理食塩液で40あるいは200倍に希釈して使用した。PHTの市販製剤は、PHTを可溶化するためそのpHは約12に調製してあり、生

理食塩液で希釈すると数時間後にはpHの低下によりPHTの結晶が析出する。従ってPHTの希釈は使用直前に行った。ENXとFLBの投与は両薬物を混合した水溶液を用いて行い、その投与薬液量はマウス1匹当たり10  $\mu$ l/g 体重とした。抗痙攣薬の投与薬液量は初回投与の薬液量をマウス1匹当たり10  $\mu$ l/g 体重とした。

#### ENXとFLBにより発現した痙攣に対する抗痙攣薬後処理の効果

あらかじめステンレス製注射針27G1/2(テルモ(株),東京)を付けたポリエチレン(polyethylene)製チューブPE-10(Becton Dickinson and Co.; Parsippany, N.J., U.S.A.)をヘパリンロック(heparin lock)したものをを用いて尾静脈を確保してある非拘束状態のマウスに、ENX(25 mg/kg)とFLB(25 mg/kg)を反対側の尾静脈から瞬時注入した。両薬物を投与して5-15 min経過し間代性痙攣が発現した時点において、抗痙攣薬であるPHTまたはDZPを確保しておいた尾静脈から瞬時注入した(初回投与)。PHTとDZPの初回投与量はそれぞれ5あるいは25 mg/kgと0.25あるいは1.25 mg/kgとした。抗痙攣薬に関する対照群としては生理食塩液群と未処理群を設けた。抗痙攣薬あるいは生理食塩液を初回投与後に痙攣を再発した動物には、少量(初回投与の10%)の抗痙攣薬の追加投与を行った。その際に、追加投与の累計が初回投与量の50%を越えないように投与回数を制限した。ENXとFLBの投与60-90 min後以降において痙攣から回復した動物は、翌日以降まで飼育しその生存を確認した。使用した動物数は各群5例とし、抗痙攣薬による後処理効果は初回痙攣からの鎮静および最終的な痙攣からの離脱の両観点から評価した。

## 結果

ENXとFLBの併用投与後に発現した中枢性痙攣に対するPHTとDZPによる後処理効果をTableに示した。

Table Posttreatment Effect of Phenytoin (PHT) and Diazepam (DZP) on Convulsant Interaction between Enoxacin and Felbinac<sup>a)</sup>.

Treatment <sup>b)</sup>	Dose <sup>c)</sup> (mg/kg)	Occurrence of Convulsion	Sedation from the first Convulsion	Recurrence of Convulsion	Recovery from Convulsion <sup>d)</sup>
None	—	5/5	0/5	—	0/5
Saline	—	5/5	2/5	2/2	0/5
PHT	5	5/5	4/5	4/4	0/5
	25	5/5	5/5	5/5	0/5
DZP	0.25	5/5	5/5	4/5	3/5
	1.25	5/5	5/5	3/5	5/5

a) Five mice were tested in each treatment, and clonic convulsion was induced by intravenous concomitant administration of enoxacin (25mg/kg) and felbinac (25 mg/kg).

b) Anticonvulsants and saline (0.3 ml/30 g mouse) were intravenously injected at the first occurrence of clonic convulsion.

c) Dose presents initial dose administered at the first occurrence of convulsion, and additional injections of low dose (less than 50% of initial dose) of anticonvulsants or small volume of saline were performed in case of repeated recurrence of convulsion.

d) Recovery from convulsion were judged 90 min after administration of enoxacin and felbinac. All the mice recovering from convulsion were alive 24 h after administration of enoxacin and felbinac.

ENXとFLBの静脈内注入5-15 min後に、全ての動物において間代性痙攣が発現した。抗痙攣薬の未処理群では、全ての動物において最初の間代性痙攣から強直性痙攣へと移行し、その5-15 sec後には呼吸不全により致死した。生理食塩液群では、一部の動物は最初の間代性痙攣から鎮静化したもののその後間代性痙攣を再発して強直性痙攣へと移行し、全ての動物が呼吸不全により致死した。PHT群では、PHT投与直後は5 mg/kgの1例を除いて最初の間代性痙攣からは鎮静化した。しかし全ての動物においてその後、PHTの追加投与では抑制されない間代性・強直性痙攣が持続的に再発し、呼吸不全により致死した。

一方DZP群では、DZP投与直後に全ての動物が最初の間代性痙攣から鎮静化した。その後、一部の動物において間代性痙攣の再発が見られたが、その都度追加投与した少量のDZPによって直ちに再鎮静化した。このDZPの追加投与により痙攣の重積を避けることができた動物においては呼吸も維持されていた。なお0.25 mg/kgの2例においては、間代性痙攣が高頻度に再発しその後呼吸不全により致死した。ENXとFLBを投与して60-90 min後以降は間代性痙攣は再発しなかった。間代性痙攣から鎮静化した全ての動物は翌日以降まで通常の飼育条件で生存した。

## 考察

### 抗痙攣薬による痙攣の抑制

本研究においては、NQsとNSAIDsとの併用投与時に中枢性痙攣が発現した際の処置方法を確立する目的で、臨床において痙攣発作に対して繁用されている静注用製剤であるPHTとDZPの後処理効果を検討した。PHTの抗痙攣効果は痙攣発現初期における一時的な作用であり、ENXとFLBによる中枢性痙攣を完全に阻害することはできなかった。一方DZPは顕著な抗痙攣効果を示し、更に痙攣から離脱した動物は全て翌日以降まで生存したことから、DZPはNQsとNSAIDsとの併用投与により発現した中枢性痙攣に対する有効な処理方法となり得る可能性が示された。

実験動物においてNQsとNSAIDsとの併用投与により発現した中枢性痙攣に対する抗痙攣薬の効果を検討した例は既に幾つか報告がなされている。山本ら(1988)は、脳波用電極を付けたネコを用いてロメフロキサシン(lomefloxacin; LFLX) 20 mg/kgとFLBのプロドラッグ体であるフェンブフェン(fenbufen; FNB) 10 mg/kgとの腹腔内投与による間代性痙攣の発現とそれに対する抗痙攣薬の作用を脳波学的に検討した。LFLX 20 mg/kgとFNB 10 mg/kgにより誘発された間代性痙攣と全般性発作発射は、DZP 2 mg/kgまたはペントバルビタールナトリウム(pentobarbital sodium) 20 mg/kgの静脈内注射により完全に抑制され、致死しなかった。DZPでは投与直後より痙攣波が抑制され、脳波背景活動は徐波深睡眠パターンに変わり、著明に増加していた呼吸数も対照レベルに回復した。ペントバルビタールでは投与直後より麻酔に入り痙攣波が完全に抑制され、著明に増加していた呼吸数も対照レベルに回復した。我々の検討においてもマウスにおいてENXとFLBとの静脈内投与により誘発された間代性痙攣がDZPで抑制されており、その結果は彼らの報告と一致する。また彼らの検討において、GABA<sub>A</sub>受容体に作用するバルビツール酸(barbiturate)誘導体であるペントバルビタールにより間代性痙攣が抑制されたことは、NQsとNSAIDsによる中枢性痙攣の主たる発現機序がGABA<sub>A</sub>受容体結合部位の遮断であることと対応している。

一方鈴木ら(1992)は、山本ら(1988)の報告や本研究における結果とは異なる知見を報告している。鈴木ら(1992)は、FNB 50 mg/kgの経口投与による前処理(30 min前)を施したウサギにおける各種NQsの100あるいは200 mg/kgの経口投与により生じた高頻度棘波や発作発射は、DZP 1-4 mg/kgの静脈内投与により投与3-5 min後は抑制されたがその後は完全には抑制されなかったとしている。またPHT 100 mg/kgやカルバマゼピン(carbamazepine) 200 mg/kgの経口投与によっても明かな抑制は見られなかったとしている。この彼らの報告と先の山本ら(1988)および本研究の知見との間におけるDZPの効果に関する結果の乖離は、使用した薬剤の投与量が著しく異なっていることに起因すると考えられる。本研究においてはENX 25 mg/kgとFLB 25 mg/kgの静脈内投与、そして山本ら(1988)の検討ではLFLX 20 mg/kgとFNB 10 mg/kgの腹腔内投与で痙攣を発現させているのに対して、鈴木ら(1992)はENX 100-200 mg/kgとFNB 50 mg/kgの経口投与を行っている。なお臨床における両薬剤の用量(投与量/日)は、体重60 kgで換算した場合でNQs 5-10 mg/kgとFNB 5-10 mg/kgである。すなわち鈴木ら(1992)の検討では、痙攣を発現させるために使用したNQsやNSAIDsの投与量が高く、発現した痙攣が極めて強い作用であったためにDZPの効果が小さく評価されたと考えられる。いずれにしても両薬剤投与後の血漿あるいは脳組織中濃度が測定されていないため、今後抗痙攣薬の効果を定量的に検討するためにはNQsやNSAIDsの血漿中および中枢における濃度に基づいて評価する必要があると考えられる。

#### 症例における各種処置の効果

既報の症例においても、NQs単独あるいはNSAIDsとの併用投与により発現した中枢性副作用に対して様々な処置の効果が施されている。それらは有効であった処置と無効であった処置の二つに分類できた。有効例としては、ノルフロキサシン(norflaxacin; NFLX) 300 mgとFNB 600 mgを1日3回服用による全身性の間代性強直性痙攣に対するDZP 10 mgの静脈内投与と気管内挿管・人工呼吸器管理(山下ら, 1990)、オフロキサシン(ofloxacin; OFLX) 200 mg服用による全身性痙攣に対するDZP 10 mgの静脈内投与(その後再発したが再度DZP 10 mgの静脈内投与により再鎮静化)(山下ら, 1990)、ENX 600 mgとFNB

600 mgを1日3回服用による全身性の間代性強直性痙攣に対するDZP 5 mgの静脈内投与とフェノバルビタール 100 mgの筋肉内投与(江口ら, 1987)、NFLX 200 mgとジクロフェナクナトリウム(diclofenac sodium) 25 mg服用による軽度の震えに対するDZPの点滴(宇佐美ら, 1989)、ENX 1日1200 mg服用の腎不全患者における四肢の痙攣に対する血液濾過(千代ら, 1989)、ENX 1日600 mg服用の腎不全患者における全身性の間代性強直性痙攣に対する血液濾過透析(豊田ら, 1991)、LFLXの大量3000 mg服用による全身性硬直に対する気管内挿管と解毒処置(胃洗浄・強制利尿・吸着剤と下剤の投与)(定光ら, 1989)、OFLX 300 mg1日3回服用による強直性間代性痙攣に対するDZPとフェノバルビタールの注射(大沼ら, 1989)、OFLX 300 mg1日3回服用による全身性の強直性間代性痙攣に対するフェノバルビタールの服用(鶴田ら, 1989)などが挙げられる。一方無効例としては、ENXとFNBによる全身性痙攣に対するフェノバルビタールの注射とその後の重曹(bicarbonate)・チアミラル(thiamylal)・バルプロ酸(valproic acid)の投与(森田ら, 1988)などが挙げられる。以上の各症例における処置方法から、NQsの単独あるいはNQsとNSAIDsとの併用投与による中枢性痙攣に対する最も有効な抗痙攣薬による処置はDZPの静脈内投与であり、それに次ぐ処置はフェノバルビタールの筋肉内投与であると考えられる(参考:フェノバルビタールの静脈内投与は保険適用外の使用法のため)。更に全身発作や硬直が強くDZP等の薬剤投与だけではその抑制が不十分の場合には、気管内挿管による呼吸管理やその他の解毒処置・血液濾過なども施行するべきであろう。また当該副作用に関して死亡例の報告はないため、NQsとNSAIDsによる中枢性副作用は直接の致死原因となり得る毒性作用ではないと考えられる。

## まとめ

本研究においては、マウスをモデル動物としたENXとFLBの併用投与による中枢性痙攣に対して、PHTは投与直後において一時的な抗痙攣作用しか示さなかった。一方DZPは極めて有効な抗痙攣作用を示し、痙攣を再発した場合においてもその少量の追加投与によって痙攣から離脱できた。既報の症例においても、NQsによる中枢性痙攣に対してはDZPが最も有効であり、また死亡例もない。したがって、NQsの単独あるいはNQsとNSAIDsとの併用投与により発現した中枢性痙攣に対しては、DZPを第一選択薬とし、更に必要であるならば気管内挿管による呼吸管理やその他の必要処置を施行することで対処できると考えられる。

## 引用文献

- 宇佐美栄治, 水野政義, 瀧井孝敏: ノルフロキサシンとジクロフェナクナトリウムの併用によると思われる痙攣発作について, クリニカルファーマシー, **5**: 73 (1989).
- 江口拓也, 田中武, 佐々木公一郎, 瀧岡壽英, 矢崎光保, 島津博達, 北沢正敏: エノキサシンとフェンブフェンの相互作用による痙攣発作の1症例, 米沢市病医誌, **7**: 47-51 (1987).
- 大沼菊夫, 蓮池美樹, 林泉: OFLX投与中に重い神経症状がみられた呼吸器感染症の2例, 大発作様痙攣と幻視, 第37回日本化学療法学会総会プログラム講演抄録, 1989, 東京, 71.
- 鴨田知博, 片岡なつ恵, 重田みどり, 中原千恵子: Ofloxacinによる痙攣を来した急性間質性腎炎の1例, 日本小児科学会雑誌, **93**: 1188-1194 (1989).
- 定光大海, 立石彰男, 副島由行, 松本美志也, 中島研, 前川剛志: 塩酸ロメフロキサシンを大量に服用した1例, 第2回中国四国中毒研究会プログラム・抄録集, 1990, 広島, 4.
- 鈴木俊雄, 原幸男, 玉川正次, 柿崎一志, 村山智: ウサギ脳波におよぼすニューキノロン抗菌薬と非ステロイド系抗炎症剤併用の効果, 日本薬理学会誌, **99**: 45-54 (1992).
- 千代孝夫, 赤堀道也, 北沢康秀, 内田健一郎, 山上和寿, 木内俊一郎, 森口哲也, 田中孝也, ニューキノロン系抗菌剤による中枢神経毒性, 救急医学, **13**: 763-768 (1989).
- 豊田高彰, 村松美紀子, 池田洋, 岡本峰夫, 諫見康弘, 生間敬博, 中村英一, 藤井正博, エノキサシンにて低血糖発作を伴った全身痙攣をきたした透析患者の1例, 日本透析学会誌, **24**: 1311-1314 (1991).
- 野崎正勝: 新しいキノロン財治療の現状と将来, けいれんとの関係, 化学療法の領域: **7**: 64-72 (1991).
- 森田大, 前村憲太郎, 酒井泰彦, 金田能尚: Enoxacinとfenbufen併用服薬により全身痙攣と意識消失をきたし、急性腎不全を合併した1例, 日本内科学会雑誌, **77**: 744-745 (1988).
- 山下武廣, 首藤寛, 佐藤勝彦, 西村清文, 藤田裕介, 杉元紘一: ニューキノロン系抗菌剤と非ステロイド性消炎鎮痛剤の併用により誘発された痙攣発作の2症例, ICUとCCU, **14**: 877-882 (1990).

山本研一, 森川宏二, 永田治, 橋本繁輝, 山田健久, 久保信治, 桶崎英一, 山崎光雄, 内藤行雄,  
井上諒, 吉岡弘二: 新キノロン系合成抗菌剤と非ステロイド性炎症剤の併用により  
誘発される痙攣発作, NY-198の中樞作用を中心に, 日本化学療法学会雑誌  
(*Chemotherapy*), 36 (suppl. 2): 300-324 (1988).

## 総括

### 医薬品副作用研究の基本概念

医薬品の副作用を取り扱う研究における本質的な目的は、ヒトにおける副作用発現性の予測と、副作用を回避するための方法論の確立である。たしかに臨床において問題とされた副作用の発現機序を解析することは、最終的には医薬品の開発やその処方適正化にフィードバックされるであろう。しかし医療現場へ生きた医薬品情報を提供するためには、副作用発現機序の解析と同時に、臨床使用時における安全性の明確化、すなわち患者のクオリティ・オブ・ライフを妨げるような副作用の発現を未然に防ぐための副作用予測のための方法論開発のための基礎研究と、当該副作用の回避法に関する具体的な提示のための応用研究が必要である。治療上の必要性から投与している薬剤の使用を単に中止するだけでは現実的な副作用の回避方法とはなり得ないため、実際には治療目的に適した薬効を有しかつ当該副作用や相互作用を発現しない他の医薬品による代替を行う必要がある。また、医薬品の副作用に関してはその誘発性を増大させる危険因子の問題がある。したがって、当該医薬品の副作用にはどのような危険因子が問題となるのか、またどうすればその危険因子を除去することが可能かということに関しても考察しなければならない。更に、未然の副作用の予測と回避に加えて、副作用発現時における有効な処置方法の確立も必要とされる。したがって、これら代替薬の選択、危険因子の評価および処置方法の確立のための基礎と応用の両方面からの研究が必須なのである。

本研究ではニューキノロン系抗菌剤 (NQs) による中枢性痙攣の誘発に関して、初めに *in vivo* 動物実験と *in vitro* 受容体応答・結合実験に基づいてその発現機序の解析とその定量的評価を行い、*in vitro* における GABA 応答の抑制作用から *in vivo* における痙攣誘発性の予測が可能であることを示した (第1章)。次に、ヒトにおける副作用発現部位への移行性の予測、副作用発現濃度の動物種差の検討、および治療濃度と副作用発現濃度との比較に基づいて、臨床使用時における NQs と非ステロイド性抗炎症剤 (NSAIDs) との相互作用による中枢性痙攣の誘発に関する臨床使用時における副作用発現性の予測からなる、臨床使

用時における副作用発現性を予測する各過程を示した(第2章)。またNQsの単独投与においても痙攣誘発につながる危険因子としての腎機能障害時における中枢性副作用回避のための処方設計の変更方法について考察した(第2章 2-3)。そしてNQsとNSAIDsとの相互作用による中枢性痙攣を回避するための代替医薬品の選択および副作用発現時における有効な処置方法に関する医薬品情報の構築を行った(第3章)。

本研究ではNQsによる中枢神経系に対する副作用の*in vivo*スクリーニング法としてアフリカツメガエル卵母細胞の外來遺伝情報発現系を使用した。この方法の利点としては以下の三点が挙げられる。第一に注入するmRNAの由来する動物種を限定しない(第2章 2-2)。すなわち医薬品の副作用や毒性作用を対象とした研究には常に動物種差の問題が存在し、またヒトにおいてその作用を人為的に誘発させることにも倫理的・現実的に厳しい制限がある。この外來遺伝子情報発現系では、将来的にヒト脳検体由来のmRNAを利用することにより、ヒトにおける中枢神経系に対する毒性作用を直接評価することが可能になると考えられる。第二に、使用動物数を大幅に減少できる動物実験代替法であることである(川上ら, 1992)。たとえ医薬品の副作用研究であっても、多数の実験動物を犠牲にする*in vivo*での毒性試験と体内動態研究だけに基づくものであってはならず、*in vitro*試験法を積極的に利用しなければならない。また*in vitro*試験法を利用するためには、その前提条件となる*in vitro*での作用に基づいた*in vivo*での副作用発現の定量的な予測性を示す必要があらう(澤田, 1993)。第三に、実験操作や測定の簡便性が挙げられる。そのためにこの方法は薬効薬理や毒性作用の一次スクリーニング系としても極めて有用であり、将来の医薬品開発にも大いに利用可能な方法であると考えられる。

## 今後の展望

本研究においては、医薬品による中枢神経系に対する副作用の例としてNQsによる痙攣誘発をテーマとして取り上げた。NQsの痙攣誘発に関して極めて特徴的な現象は、非ステロイド性抗炎症剤(NSAIDs)との併用投与がその危険因子になることであった。またNQsではその単独投与によっても痙攣が発現した症例が報告されており、その際の危険因

子として腎機能の障害が挙げられる。この痙攣発現に対する危険因子としての腎機能障害の存在は、 $\beta$ -ラクタム系抗生物質、消化性潰瘍治療剤である $H_2$ -受容体遮断薬、そして気管支喘息治療剤であるテオフィリンなどによる中枢性痙攣においても多数報告されている(澤田ら, 1991ab; 澤田ら, 1992; 下川ら, 1992ab; 山本ら, 1992ab)。本研究においては、危険因子としての腎機能障害を単純に薬物消失能の低下により体内薬物レベルの上昇を惹起する要因として解析し、その際に毒性作用(中枢性痙攣)発現濃度は不変であることを仮定した。しかし一方で、腎障害時には薬物の中枢移行性や作用強度が亢進している可能性も考えられる(第2章2-3)。このことに関連した最新の検討結果を以下に示した。Fig. は、両尿管結紮術により作成した急性腎不全モデルラットを用いて、エノキサシン(ENX)の静脈内定速注入による痙攣発現時の脳組織中濃度( $C_{BR}$ )に及ぼす腎不全の影響を検討した結果である(大橋ら, 1995)。

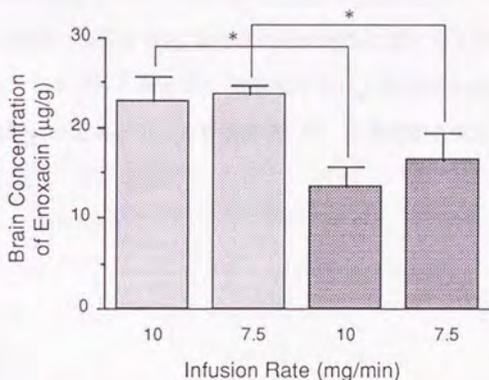


Fig. Effect of Renal Failure on Convulsive Threshold Concentration in the Brain after Intravenous Constant Infusion of Enoxacin in Rats. □: Control, and ■: renal failure. Renal Failure was produced by Bilateral Ureteral Ligation.

濃い網かけで示した急性腎不全ラットにおいては薄い網かけで示した正常ラットと比較して有意に痙攣発現時の $C_{BR}$ が低下している。すなわち急性腎不全時には正常時よりも低いENXの濃度で中枢性痙攣が発現している。また同様の結果が同じ両尿管結紮術により作成した急性腎不全モデルラットを用いて検討した $H_2$ -受容体遮断薬であるシメチジンによる中枢性痙攣に関しても見いだされている(中田ら, 1994)。したがって腎機能障害時には薬物の中枢神経系に対する作用強度が亢進している可能性が示唆されている。

一般に医療現場では複数の医薬品が併用処方されるケースが極めて多く、更に一部の患者においては複数の診療科や医療施設を掛け持ち受診しているため、本研究においても取り上げた医薬品相互作用に関する問題が生じているのが現状である。薬物療法において他剤が併用される背景としては、単なる対象疾患に対する治療効果の拡大だけではなく、併発している複数疾患の治療や多症状の緩和などの目的も存在する。そこには、併用した医薬品が他の医薬品の体内動態や作用に対して影響を与えるだけではなく、併発した疾患が他の疾患のために投与されている医薬品のそれらに対しても影響を与えるという問題が生じている。すなわち臨床においては複数疾患併発時の薬物治療の確立という観点からも、薬物-薬物間の相互作用に加えて病態-薬物間の相互作用に関する有用な医薬品情報の提供が求められている。したがって今後は、“病態時における医薬品の体内動態および薬効薬理・副作用の変動要因の解析とその定量的評価”が、医療薬学における一つの重要なテーマとなるであろう。

## 本研究の臨床的意義と結論

ヒトにおけるNQsによる中枢性痙攣誘発の予測とその回避および処置法の確立を目的とした本研究の臨床的意義を以下に記した。

- ・本研究において使用した外来遺伝情報発現系による *in vitro*スクリーニング法は、動物実験代替法としての有用性、動物種間での薬効毒性比較に関する有効性、そしてその簡便性の観点から、医薬品の受容体介在性副作用の構造活性相関論的な予測に有用であった。
- ・医薬品の臨床使用時における副作用発現に関する薬物間での相対強度と安全性を定量的に評価することができた。
- ・医薬品の中枢性副作用誘発性予測するための、ヒトにおける中枢移行性の予測、中枢作用の動物種差、そして臨床使用時の中枢における濃度範囲との比較による副作用発現性の評価の各過程が確立できた。
- ・腎障害患者における副作用回避のための処方設計の変更方法が提示できた。
- ・NQsとNSAIDsとの相互作用に基づく副作用発現回避のための代替医薬品の選択および副作用発現時の処置方法に関する医薬品情報が構築できた。

最後に、本研究ではその表題において医療薬学研究という名称を使用した。医療薬学研究の目的は、処方作成の支援と医薬品使用の適正化を通じて、臨床における適切な薬物療法を確立することである。更にそれは、“患者の利益を守る”という医療の根本原則を志向する薬学の立場からの科学的な方法論である。

## 引用文献

大橋聖子, 川上純一, 山本康次郎, 澤田康文, 伊賀立二, ニューキノロン剤による中枢性痙攣誘発に及ぼす急性腎不全の影響 (1), 日本薬学会第115年会 (講演要旨集), 1995, 仙台, (印刷中).

川上純一, 下川昌文, 山本康次郎, 澤田康文, 浅沼厚, 柳沢懋二, 伊賀立二, 医薬品による中枢性副作用 (痙攣誘発) の *in vitro* 試験に基づく予測: ニューキノロン系抗菌剤と非ステロイド性抗炎症剤との相互作用, 日本動物実験代替法学会第6回大会 (要旨集), 1992, 東京, 16-17.

澤田康文著, 薬剤予測学, 伊賀立二監修, 薬事時報社, 1993, 東京.

澤田康文, 川上純一, 山田安彦, 中村幸一, 伊賀立二: 薬物による中枢神経系・精神障害 (2), ペニシリン系・セフェム系抗生物質とけいれん, 薬局: 42: 1011-1018 (1991a).

澤田康文, 川上純一, 伊賀立二: 薬物による中枢神経系・精神障害 (3), カルバペネム系抗生物質とけいれん, 薬局: 42: 1171-1176 (1991b).

澤田康文, 下川昌文, 山本康次郎, 山田安彦, 中村幸一, 伊賀立二: 薬物による中枢神経系・精神障害 (7), テオフィリンとけいれん 1, 薬局: 43: 233-239 (1992).

下川昌文, 澤田康文, 山本康次郎, 山田安彦, 中村幸一, 伊賀立二: 薬物による中枢神経系・精神障害 (8), H<sub>2</sub>受容体拮抗剤と精神錯乱・痙攣 1, 薬局: 43: 369-376 (1992a).

下川昌文, 澤田康文, 山本康次郎, 山田安彦, 中村幸一, 伊賀立二: 薬物による中枢神経系・精神障害 (10), H<sub>2</sub>受容体拮抗剤と精神錯乱・痙攣 2, 薬局: 43: 687-696 (1992b).

中田優, 山本康次郎, 川上純一, 澤田康文, 伊賀立二, ラットにおけるH<sub>2</sub>受容体遮断薬による中枢性痙攣誘発のトキシコダイナミクス: 急性腎障害モデルにおける解析, 日本薬学会第114年会 (講演要旨集4), 1994, 東京, 120.

山本康次郎, 澤田康文, 下川昌文, 山田安彦, 中村幸一, 伊賀立二: 薬物による中枢神経系・精神障害 (9), テオフィリンとけいれん 2, 薬局: 43: 559-567 (1992).

## 謝辞

本研究に際し、御指導と御鞭撻を賜りました東京大学医学部伊賀立二教授に謹んで  
深謝致します。

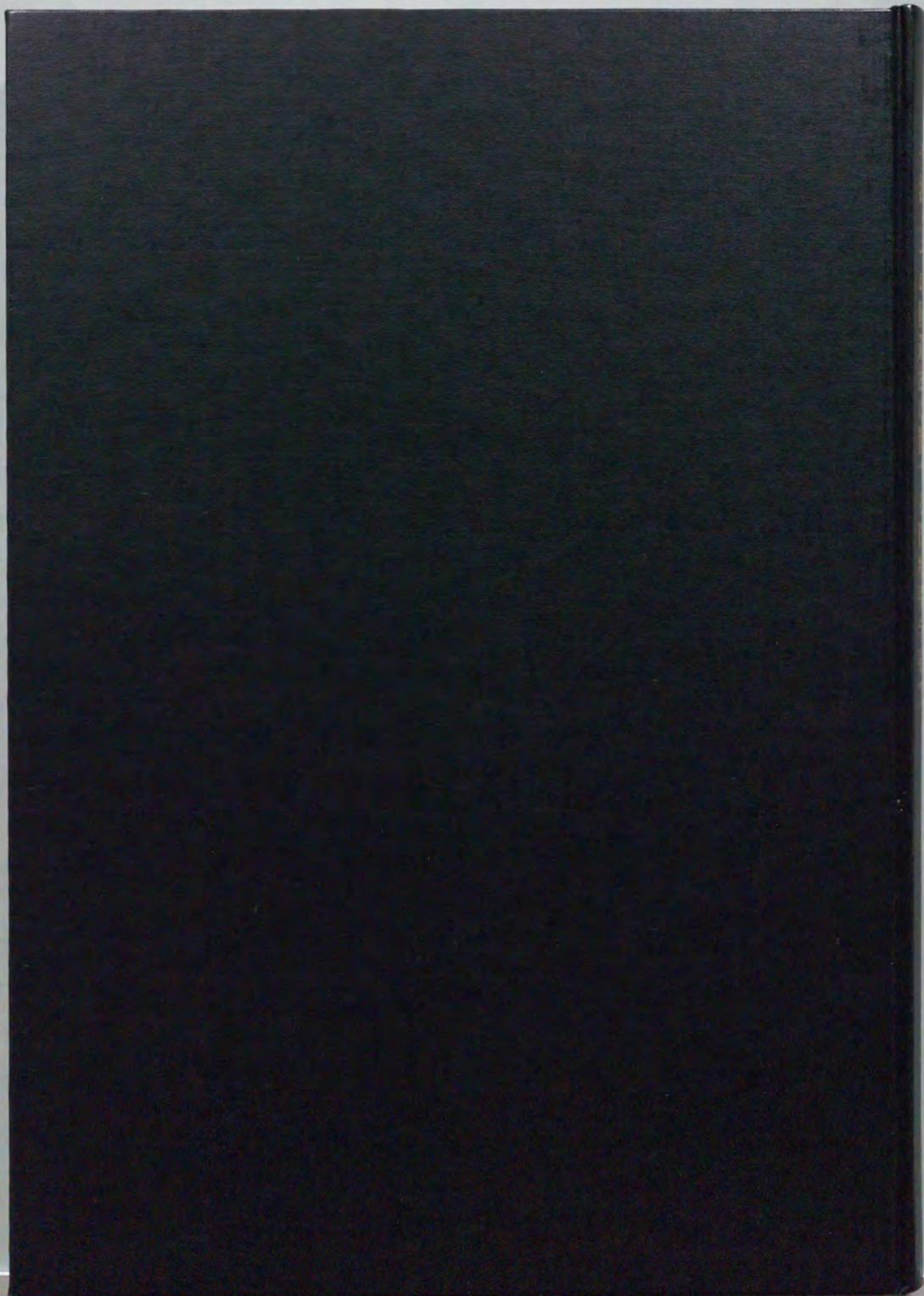
本研究中、終始懇篤な指導を賜りました東京大学医学部澤田康文助教授に謹んで感  
謝の意を表します。

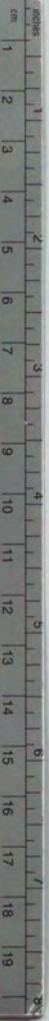
受容体応答実験において有益な御助言と御協力を戴きました、鶴見大学歯学部柳沢  
慧二教授ならびに同浅沼厚講師に限りない感謝の意を表します。

そして、多くの御教示を戴きました東京大学医学部附属病院薬剤部の諸先生方に厚  
く感謝致します。

平成7年1月20日

川上 純一





# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue	Cyan	Green	Yellow	Red	Magenta	White	3/Color	Black

# Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

