

ニューキノロン系抗菌剤による中枢性痙攣の
予測とその回避法に関する医療薬学研究

川上純一

【博士論文】

①

ニューキノロン系抗菌剤による中枢性痙攣の
予測とその回避法に関する医療薬学研究

川上 純一

目次

| | 頁 |
|---|-----|
| 序論 | 1 |
| 第1章 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 痙攣誘発の発現機序の解析と定量的評価 | 10 |
| 第2章 ヒトにおけるニューキノロン系抗菌剤の痙攣誘発性の予測 | 59 |
| 2-1 ヒトにおけるニューキノロン系抗菌剤の中樞移行性の予測 | 60 |
| 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GABA _A 受容体応答の抑制作用に関する動物種差・脳部位差 | 91 |
| 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 | 108 |
| 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 | 121 |
| 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— | 122 |
| 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 | 142 |
| 総括 | 156 |
| 謝辞 | 162 |

序論

医薬品による中枢神経系副作用の予測・回避の重要性

医薬品の安全性と適正使用は、品質・有効性と共に医薬品が具備すべき要件として薬事法に規定されている。また医薬品は、前臨床試験にて薬効薬理・毒性作用と体内動態が検討され、更に臨床試験に基づきヒトでの安全性・有効性の実証と用法・用量の決定がなされた後に上市される。しかし実際には、市販後に副作用・毒性作用が報告される医薬品が後を立たないのが現状である。特に顕著な例では、薬価基準収載後において副作用により販売中止となった医薬品としてはシアニダノール(溶血性貧血)、ジレパロール(肝障害)およびテロリジン(不整脈)が、また使用制限を受けたものとしてはホパンテン酸カルシウム(低血糖・アシドーシス・意識障害)、アスピリンDLリジン(ショック)および塩酸プロパフェノン(心室性頻脈・心室細動)が挙げられる。更に1994年には抗ウイルス剤のソリブジンと抗悪性腫瘍剤との併用投与による多数の死亡例が報道されたことにより、医薬品相互作用に基づく副作用・毒性作用の発現に対しても一般の関心が寄せられるようになった。

今日の臨床においては、医薬品による多様な副作用・毒性作用の中でも特に中枢神経系に対する副作用が治療上の深刻な問題となっている。副作用として精神神経症状をもたらす医薬品としては、鎮痛剤、抗パーキンソン剤、散瞳剤、降圧剤、消化性潰瘍剤、ホルモン剤、抗悪性腫瘍剤、抗結核剤、抗菌剤および抗ウイルス剤等に分類されるものが報告されている(融, 1989)。更に精神神経症状においても特に重篤な痙攣を伴った副作用が厚生省医薬品副作用情報により通達された医薬品には、ホパンテン酸カルシウム(No. 53, 60)、塩酸チアラミド(No. 55)、ペニシリン系およびセフェム系抗生物質(No. 63)、エノキサシンとフェンブフェンとの相互作用(No. 81)、シクロスポリン(No. 92, 95)、ニューキノロン系抗菌剤・非ステロイド性消炎鎮痛剤との相互作用(No. 98)、イミペネム・シラスチンナトリウム配合剤(No. 99)、アミドトリゾ酸(No. 102)、 H_2 -受容体拮抗剤(No. 107)、

インターフェロン- α (No. 107)、テオフィリン (No. 121) およびインドメタシン (No. 126) が挙げられる。ここで認識すべき重要点として、これら医薬品のうちほとんどがその薬効薬理として中枢性作用を目的としていないことである。すなわち、末梢作用を期待して投与された各種医薬品が中枢神経系の機能に対して悪影響を及ぼすことによって重篤な痙攣を含む多様な精神神経症状を惹起している。したがってこのような患者のクオリティ・オブ・ライフ (quality of life) を妨げる医薬品による中枢神経系に対する副作用を未然に予測するための方法論およびそれを回避するための適切な治療・処置法の開発は焦眉の急である。一方ではヒトにおいて、副作用・毒性作用が発現する医薬品や化学物質を人為的に投与してその作用を観察したり、あるいは脳組織などの試料を治療行為とは無関係に採取することは、倫理的および現実的に不可能であり許されるものではない。そのため我々が目指すべき方向性としては、実験動物からヒトへ、*in vitro*から*in vivo*への予測を可能とする新規スクリーニング法とそれに基づく臨床使用時における副作用・毒性作用の定量的な評価方法の確立である。更にそれらの方法論は、ヒトでの安全性確認だけに重点をおいた多数の実験動物を犠牲にする*in vivo*での毒性試験や体内動態研究だけに基づくものではなく、使用動物数を減少できる動物実験代替法や将来的に可能であればヒト由来の検体を利用することによりヒトでの作用を直接評価できる*in vitro*試験法であるべきである。

ニューキノロン系抗菌剤による中枢神経系副作用

1980年に、ナリジクス酸 (Leshner et al., 1962) をプロトタイプとして、母核の6位にフッ素、7位に塩基性環状アミンであるピペラジニル基を導入されたノルフロキサシン (Ito et al., 1980, 1981) が合成された。その後、エノキサシン (ENX) (Matsumoto et al., 1980; Nakamura et al., 1984)、オフロキサシン (Goto et al., 1984; Sato et al., 1982)、シプロフロキサシン (Goto et al., 1985; Wise et al., 1983)、塩酸ロメフロキサシン (Hirose et al., 1987; Okezaki et al., 1988)、トシル酸トスフロキサシン (Yasuda et al., 1988) などのDNAジャイレース阻害剤 (Chu and Fernandes, 1989; Shen et al., 1989) であるニューキノロン系合成抗菌剤 (NQs) が次々と開発された。現在ではNQsは尿路感染症や呼吸器感染症などに対する治療をはじめ

として多くの診療科領域において繁用されている (Malinverni and Glauser, 1988; Thys, 1988). NQsの臨床的特徴は、経口剤でありかつ食事の影響が少ないことの使用性、幅広い抗菌スペクトルと強力な抗菌力および良好な生体内安定性と組織移行性であり、優れた抗菌剤として感染症の化学療法に大きく貢献している (Fernandes, 1988; Lode et al., 1989; Sogel et al., 1989).

しかしNQsの使用量の急激な増加に伴い、NQsに関する数多くの問題点も報告されている。耐性緑膿菌・耐性ブドウ球菌の出現 (Acar and Francoual, 1990)、金属カチオン含有の制酸剤・消化性潰瘍用剤による吸収阻害 (川上ら, 1992)、テオフィリン (Sano et al., 1989; Maesen et al., 1984; Wijnands et al., 1984, 1986) やカフェイン (Barnett et al., 1990; Staib et al., 1987; Stille et al., 1987) の代謝抑制に伴う毒性発現、中毒性表皮壊死症 (Lyell症候群) と皮膚粘膜眼症候群 (Stevens-Johnson症候群) (厚生省医薬品副作用情報 No. 105, 1990)、腎毒性 (同 No. 106, 1991)、偽膜性大腸炎 (同 No. 115, 1992)、低血糖 (同 No. 117, 1992) および横紋筋融解症 (同 No. 128, 1994) などが挙げられる。更にNQsに関して臨床上最も懸念すべき副作用として精神神経症状があり、特に重篤なケースとして間代性・強直性痙攣に至る症例が数多く報告されている (Anastasio et al., 1988; Paton and Reeves, 1991; Schwartz and Calvert, 1990; Simpson and Brodie, 1985)。更にNQsによる痙攣誘発の症例報告においてに極めて特徴的な背景因子として非ステロイド系抗炎症剤 (NSAIDs) との併用投与が挙げられる (厚生省副作用情報 No. 81, 1986; 同 No. 98, 1989; 同 No. 120, 1993)。表1と2には、それぞれENXとNSAIDsとの併用投与またはENXの単独投与により痙攣を発現した患者に関する症例報告を示した (千代ら, 1989; 森田ら, 1988)。

表1. エノキサシンとフェンブフェンとの相互作用に基づく中枢性痙攣

| |
|--|
| 42歳男性。咽頭痛、発熱、咳嗽のため近医受診。 |
| リンコマイシン、スルピリンの筋注後、エノキサシン3錠、フェンブフェン6錠、プロナーゼ3錠、カルバベンテン3錠を3日分の投薬を受けた。翌日よりめまい出現し、2日後に再受診し、重曹の静注とジフェニドールの追加投薬を受けた。帰宅し服薬後、夜7時頃まで就寝し、7時30分頃に再び服薬し9時頃までテレビを見ていたところ、突然全身痙攣が出現した。名前を呼んでも反応なくフェノバルビタールの静注も効果がないため、救急センターに紹介された。入院時、全身性の間代性・強直性痙攣を認めた。対症治療として重曹投与やチアミラルによる鎮静及び人工換気を施行した。入院時より乏尿傾向にあり、翌日よりCPK、血清クレアチニン、BUN値の急激な上昇が認められた。また血中、尿中ミオグロビンの高値を認め、黄紋筋融解と共に急性腎不全を併発した。第7病日より血液透析を開始し、第12病日で離脱することが出来た。 |
| 森田ら, 日本内科学会雑誌, 77: 744-745 (1988) |

表2. 腎不全患者におけるエノキサシン投与による中枢性痙攣

| |
|---|
| 37歳女性, 呼吸不全で近医受診し腎不全の診断受け入院治療. |
| 4日後に鬱血性心不全徴候出現、透析治療目的にて救命救急センターに搬送。慢性腎不全のため連日の血液透析を開始。腎機能良好化し、鬱血性腎不全も改善。その後順調に経過したが、16・17日後に軽度の発熱、カテーテルからの感染を考え、18日後よりエノキサシン 600 mgの投与開始、20日後には高熱が続くため1200 mgに増量、22日後に四肢の痙攣、しびれ、耳なりが始まった。腎不全の悪化もしくはエノキサシンによる薬剤中毒が疑われ血液透析を施行(エノキサシンの血中濃度: 14.1 → 16.8 μg/ml)したが、症状の軽快は見られなかった。次に血液濾過を施行(13.0 → 6.98 μg/ml)したところ症状の消失を認めた。以後の発現は認められなかった。この症例においては、腎不全であるため尿中からの排泄が遅れ血中濃度が高くなったため、中枢神経系副作用が発現したと思われる。すなわち腎不全症例への投与には特に注意を要し、腎不全の程度に従って投与量を減少すべきである。 |
| 千代ら, 救急医学, 13: 763-768 (1989) |

NQsとNSAIDsとの相互作用による中枢神経系副作用に関しては*in vitro*における受容体結合実験に基づき、中枢神経系における抑制性神経伝達物質であるγ-アミノ酪酸(GABA)の受容体結合に対するNQsの阻害作用と、その阻害作用に対するNSAIDsの増強効果が可能性の高い発現機序として既に報告されている(Tsuji et al., 1988ab; 堀ら, 1988)。また*in vivo*における相互作用に関する実験動物を用いた毒性試験も実施されており、NQsの痙攣誘発に関するED₅₀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)。しかしこれら各基礎研究においては、実験動物での痙攣誘発や*in vitro*実験でのGABA結合阻害を単にNQsとNSAIDsとにより発現した現象としての解釈に留まっており、得られた結果に対する系統的な解析はなされていない。すなわち、*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。したがって医療現場においても、NQsとNSAIDsとの併用投与による中枢性副作用の回避方法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提供が求められている。

本研究の目的

本研究では、マウスを用いてNQsによる癌誘発性とそれに対するNSAIDsの増強効果に関する発現機序の解析と定量的評価を行った(第1章)。そして臨床使用時における癌誘発性を予測する方法論の各過程を構成する、ヒトにおける体内動態と中枢移行性の予測、毒性作用の動物種差および治療薬物濃度に基づく副作用発現性の定量的評価に関する検討を行った(第2章)。また、NQs単独投与においても癌発現の報告された腎機能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の確立を目指した(第2章 2-3)。更に当該副作用の回避を目的とした処方医薬品の選択および癌発現時における処置方法に関する医薬品情報の構築を試みた(第3章)。

引用文献

- J. F. Acar and S. Francoual.: The clinical problems of bacterial resistance to the new quinolones. *Antimicrob. Chemother.*, **26** (Suppl.B): 207-213 (1990).
- 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).
- G. D. Anastasio, D. Menscer and J. M. Little: Norfloxacin and seizures. *Ann. Intern. Med.*, **109**: 169-170 (1988).
- G. Barnett, J. Segura, R. de la Torre and M. Carbo: Pharmacokinetic determination of relative potency of quinolone inhibition of caffeine disposition. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **39**: 63-69 (1990).
- D. T. W. Chu and P. B. Fernandes: Structure-activity relationship of the fluoroquinolone. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **33**: 131-135 (1989).
- P. B. Fernandes: Mode of action, and *in vitro* and *in vivo* activities of the fluoroquinolones. *J. Clin. Pharmacol.*, **28**: 156-168 (1988).
- S. Goto, T. Fujimoto, A. Tsuji, M. Ogawa, S. Miyazaki, Y. Kaneko and S. Kuwabara: *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of DL-8280, a new pyridone carboxylic acid derivative. *Chemotherapy*(Tokyo), **32** (Suppl.1): 22-46 (1984).
- S. Goto, M. Ogawa, S. Miyazaki, Y. Kaneko and S. Kuwabara: *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of BAY o 9867 (ciprofloxacin), a new pyridone carboxylic acid derivative. *Chemotherapy*(Tokyo), **33** (Suppl.7): 18-30 (1985).
- T. Hirose, E. Okezaki, H. Kato, Y. Ito, M. Inoue and S. Mitsunashi: *In vitro* and *in vivo* activity of NY-198, a new difluorinated quinolone. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **31**: 854-859 (1987).
- A. Ito, K. Hirai, M. Inoue, H. Koga, S. Suzue and S. Mitsunashi: *In vitro* antibacterial activity of AM-715, a new nalidixic analog. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **17**: 103-108 (1980).
- G. Y. Leshner, E. J. Froelich, M. D. Gruett, J. H. Bailey and R. P. Brundage: 1,8-Naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. *J. Med. Pharm. Chem.*, **5**: 1063-1065

(1962).

- H. Lode, G. Hoffken, K. Borner and P. Koeppel: Unique aspects of quinolone pharmacokinetics. *Clin. Pharmacokin.*, **16** (Suppl.1): 1-4 (1989).
- F. P. V. Maesen, J. P. Teengs, C. Baur and B. I. Davies: Quinolones and raised plasma concentrations of theophylline. *Lancet*, II: 530 (1984).
- 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).
- 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 **A-2266**, a new oral antipseudomonal agents. Current Chemotherapy and Infectious Disease, Ed. by J. D. Nelson and C. Grassi, 1980, American Society for Microbiology Washington, D.C., p.454-456.
- S. Nakamura, H. Katae, A. Minami, K. Nakata, S. Inoue, J. Yamagishi, Y. Takase and M. Shimizu: *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of **A-2266**. *Chemotherapy* (Tokyo), **32** (Suppl.3): 70-85 (1984).
- E. Okezaki, K. Ohmichi, S. Koike, Y. Takahashi and E. Makino: Bacteriological evaluation of **NY 198**. *Chemotherapy* (Tokyo), **36** (Suppl.2): 99-111 (1988).
- J. H. Paton and D. S. Reeves: Clinical features and management of adverse effects of quinolone antibacterials. *Drug Safety*, **6**: 8-27 (1991).
- M. Sano, K. Kawakatsu, I. Yamamoto, M. Takeyama, H. Yamashina and M. Goto: Inhibitory effect of enoxacin, ofloxacin and norfloxacin on renal excretion of theophylline in humans. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **36**: 323-324 (1989).
- 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).
- M. T. Schwartz and J. F. Calvert: Potential neurologic toxicity related to ciprofloxacin. *Ann. Pharmacother.*, **24**: 138-140 (1990).
- L. L. Shen, L. A. Mitscher, P. N. Sharma, T. J. O'Donnell, D. W. T. Chu, C. S. Cooper, T. Rosen

- and A. G. Pernet: Mechanism of inhibition of DNA gyrase by quinolone antibacterials: a cooperative drug-DNA binding model. *Biochem.*, **28**: 3886-3894 (1989).
- K. J. Simpson and M. J. Brodie: Convulsion related to enoxacin. *Lancet*, II: 161 (1985).
- F. Sogel, U. Jaehde, K. Naber and U. Stephan: Pharmacokinetic disposition of quinolones in human body fluids and tissues. *Clin. Pharmacokin.*, **16** (Suppl.1): 5-24 (1989).
- A. H. Staib, W. Stille, G. Dietlein, P. M. Shah, S. Harder, S. Mieke and C. Beer: Interaction between quinolones and caffeine. *Drugs*, **34** (Suppl.1): 170-174 (1987).
- W. Stille, S. Harder, S. Mieke, C. Beer, P. M. Shah, K. Frech and A. H. Staib: Decrease of caffeine elimination in man during co-administration of 4-quinolones. *Antimicrob. Chemother.*, **20**: 729-734 (1987).
- J.-P. Thys: Quinolones in the treatment of bronchopulmonary Infections. *Rev. Infect. Dis.*, **10** (Suppl.1): S212-S217 (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).
- W. J. A. Wijnands, C. L. A. van Herwaarden and T. B. Vree: Enoxacin raises plasma theophylline concentration. *Lancet*, II: 108-109 (1984).
- W. J. A. Wijnands, T. B. Vree and C. L. A. van Herwaarden: The influence of quinolone derivatives on theophylline clearance. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **22**: 677-683 (1986).
- 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).
- T. Yasuda, Y. Watanabe, A. Yotsuji, T. Hayashi, S. Minami, S. Okamoto, Y. Yamashiro, H. Araki, Y. Ito and K. Motomura: *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of T3262, a new pyridone carboxylic acid. *Chemotherapy* (Tokyo), **36** (Suppl.9): 95-109 (1988).

川上純一, 澤田康文, 木原英子, 中村幸一, 山田安彦, 櫻井和子, 清野敏一, 内野克善, 伊賀立

二: 総説; ニューキノロン剤吸収に対する金属カチオン含有の制酸剤・消化性潰瘍用剤による時間依存的阻害と服薬のための設計, 病院薬学, **18**: 1-21 (1992).

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).

堀誠治, 斎藤篤, 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).

森田大, 前村憲太郎, 酒井泰彦, 金田能尚: Enoxacinとfenbufen併服用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, 井上讓, 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).

融道男: 薬剤副作用の軽減化(上), 薬剤による精神症状と対策, 医薬ジャーナル, **25**: 971-976 (1989).

第1章

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 痙攣誘発の発現機序の解析と定量的評価

要約

*In vivo*におけるマウスを用いた動物実験および*in vitro*における受容体結合と応答実験に基づいて、ニューキノロン系抗菌剤 (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発現機序の解析とその定量的評価を行った。初めにβ-ラクタム系抗生物質 (β-LCs) とNQsに関して、それらの痙攣誘発性に対するNSAIDs併用の効果を比較した。β-LCsであるセファゾリンあるいはイミベネム-シラスタチンと典型的なNSAIDsであるフェルビナク (FLB) との併用投与後の間代性痙攣発現に関するED₅₀のインボログラムは相加的あるいは僅かな拮抗的相互作用を示したのに対して、NQsであるエノキサシン (ENX) とFLBとの併用投与のインボログラムは劇的な相乗的相互作用を示し、NSAIDsによる痙攣誘発性の増強はNQsにおいて特異的な現象であった。次にNQs単独での痙攣誘発性を定量的に評価するために、NQs (ENX、ノルフロキサシン (NFLX) およびオフロキサシン (OFLX)) を二段階の投与速度で静脈内に定速注入した後の痙攣発現時間 (T) および痙攣発現時における血漿中濃度 (C_p) と脳組織中濃度 (C_{BR}) を調べた。投与速度間での比較においてTおよび痙攣発現時のC_pはそれぞれ相違したがC_{BR}には違いはなく、NQsの痙攣誘発は濃度依存的な現象であることおよび痙攣発現時のC_{BR}がその作用部位中濃度の指標となることが分かった。次にNQsとNSAIDsとの相互作用を定量的に検討するために、NQsの体内動態に及ぼすFLBの影響およびNQsとFLBとを併用投与後の痙攣誘発性を調べた。NQs (ENXとシプロフロキサシン (CPF)) の静脈内投与後のC_pおよびC_{BR}推移はFLBの併用により変化しなかった。またNQs (ENX、NFLX、CPFおよびOFLX) とFLBとをそれぞれ種々の投与量で静脈内投与した後のC_{BR}のインボログラムにおいて、痙攣発現群と非発現群の間には明確な閾値が観測され、それは原点側に大きく凸の関係を示した。これらの結果から、NQsとNSAIDsとの相互作用は薬物動態学的相互作用ではなく薬物動学的相互作用であることおよび脳組織中における両薬剤の共存が痙攣発現と密接に関わっていることが示された。NQsの中枢神経系に対する直接的な痙攣誘発活性を評

価するために、FLB前処理・未処理後におけるNQs (ENX、NFLX、CPFXおよびOFLX) の脳室内への定速注入を行った。NQsの脳室内投与により間代性痙攣が誘発され、その痙攣誘発投与量はFLBの前処理により減少したことから、NQsによる痙攣誘発はNQsの中枢性作用に基づくことが分かった。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各種アゴニスト (GABA、グリシン、アセチルコリン、セロトニン、グルタミン酸、カイニン酸、キスカル酸およびNMDA) の応答に対するNQsとFLBの効果を調べた。ENXとFLBはGABA以外のアゴニスト応答を大きく変化させなかったが、GABA応答に対してはNQs (ENX、NFLX、CPFXおよびOFLX) は可逆的で濃度依存的な競合阻害様式の抑制作用を示し、FLBはそれ単独ではGABA応答を変化させないもののNQsの抑制作用を濃度依存的に増強した。更にマウス脳単離細胞を用いてGABA_A受容体のアゴニストである³H-ムシモールの特異的結合に対するNQs (ENX、NFLX、CPFXおよびOFLX) とFLBの効果を調べた。受容体応答実験と同様にNQsの阻害作用とFLBによるその増強効果が観測され、³H-ムシモールの特異的結合に対するNQsの阻害活性はGABA応答に対するNQsの抑制活性高い相関性 ($r = 0.99$) を示した。またGABA応答に対するNQsの抑制活性がマウス脳室内にNQsを定速注入した後の痙攣誘発投与量とFLB存在・非存在下それぞれにおいて高い相関性 ($r = 0.99$) を示したことから、NQsの痙攣誘発に関する主たる発現機序は、中枢神経系におけるNQsによるGABA_A受容体の結合阻害に基づくGABA神経伝達の抑制であることが示唆された。そこでGABA応答に対するNQsの抑制活性とマウスにおけるNQs静脈内投与後の痙攣誘発時の C_{BR} との関係を検討した。両データ間には高い相関性 ($r = 0.98$) が認められ、*in vivo*におけるNQsの痙攣誘発性は*in vitro*実験におけるGABA応答に対する抑制作用から定量的に予測可能であることが示された。

緒言

臨床で使用されている医薬品においては、中枢神経系に対する副作用を発現する薬剤が多数存在する (Zaccara et al., 1990). 中枢性作用を目的としていない薬剤においても、各種抗菌剤、 H_2 -受容体遮断薬、インターフェロン (interferon) 等は精神神経症状の中でも重篤な全身性痙攣を惹起する薬剤として報告されている (Janssen et al., 1990; Schentag, 1980; Snively et al., 1984). 特に抗菌剤の中では、ペニシリン系 (penicillins)、セファロスポリン系 (cephalosporins) およびカルバペネム系 (carbapenems) 等の β -ラクタム系抗生物質 (β -lactam antibiotics; β -LCs) やニューキノロン系抗菌剤 (new quinolone antimicrobial agents; NQs) などによる中枢性副作用の症例が数多く報告されている (Calandra et al., 1988; Corrado et al., 1987; Norrby, 1986; Reiter et al., 1989). それらの痙攣発生率はいずれも約1%程度であるが、個々の患者背景によりその誘発性は異なるため、痙攣発生に関与した危険因子の分析が必要である. 一般に痙攣の危険因子としては、中枢神経系障害 (頭部外傷・てんかん歴など) や中枢性感染を有する患者及び静脈内多量投与や髄膜内投与時などが挙げられる (Annerggers et al., 1980, 1986). 更に各薬剤についても危険因子が存在し、 β -LCsでは腎障害 (Calandra et al., 1988; Norrby, 1987) が、NQsではフェンブフェン (fenbufen; FNB) などの非ステロイド性抗炎症剤 (non-steroidal anti-inflammatory drugs; NSAIDs) との併用投与 (Davey, 1988; 竹尾ら, 1989) が報告されている. なおアスピリン (aspirin)、インドメタシン (indomethacin)、メフェナム酸 (mefenamic acid) 及び塩酸チアラミド (tiaramide hydrochloride) などのNSAIDsも痙攣を起こすことが既に報告されている (Zaccara et al., 1990). 一方、このNQsとNSAIDsとの薬物間相互作用は、両薬物共に繁用される医薬品であること、また感染症は炎症を伴うため両医薬品が併用処方されることが多いことから、臨床上極めて重要な問題として認識されている.

NQsによる痙攣誘発とNSAIDsによるその増強作用の機序としては、*in vitro*での研究からNQsが抑制性神経伝達物質である γ -アミノ酪酸 (γ -aminobutyric acid; GABA) の受容体

結合を阻害し、更にNSAIDsの共存下ではその阻害効果が増強されることが既に報告されている(Akahane et al., 1989; Hori et al., 1989; Tsuji et al., 1988). しかしNQsと同様に中枢性副作用を有する β -LCsにおいても、GABA受容体結合阻害作用がその痙攣発現機序であると考えられているため(Antoniadis et al., 1980; Hori et al., 1985)、NSAIDsは β -LCsの痙攣誘発作用も増強する可能性が懸念される。また*in vivo*におけるNQsとNSAIDsとの相互作用に関する毒性試験も実施されており、NQsの痙攣誘発性に対するFNBの増強効果やNQsとの相互作用を示すNSAIDsの一斉スクリーニングなどが検討が行われている(Akahane et al., 1989; 平井ら, 1989; 山本ら, 1988). しかしこれらの報告においては、NSAIDs存在下・非存在下におけるNQsの痙攣誘発性をその投与量を目安として概算している。そのためにNQs間の相対的な痙攣誘発性は得られるもののNQs間における体内動態の相違は考慮されておらず、痙攣誘発に至る作用発現部位におけるNQs濃度と痙攣誘発性との関係および*in vitro*におけるGABA受容体結合に対する阻害作用と*in vivo*における痙攣誘発性との定量的関係については全く考察されていない。

本研究では*in vivo*におけるマウスを用いた動物実験および*in vitro*における受容体結合と応答実験に基づいて、NQsとNSAIDsとの相互作用による中枢性痙攣の発現機序の解析とその定量的評価を行った。初めに β -LCsとNQsの痙攣誘発性に対するNSAIDs併用の効果を比較した。次にNQs単独での静脈内投与による痙攣誘発性とNQsの中枢神経系に対する直接的な痙攣誘発活性およびNQsとNSAIDsとの相互作用に基づくそれらの増強について定量的に評価した。更にマウス脳mRNAを注入したアフリカツメガエル卵母細胞とマウス脳単離細胞を用いて、NQsによる痙攣誘発とNSAIDsによるその増強に関する作用機序の解析を行い、NQsの痙攣誘発に関する主たる発現機序は中枢神経系におけるNQsによるGABA_A受容体の結合阻害に基づくGABA神経伝達の抑制であることを見いだした。最後にNQsのGABA応答に対する抑制作用とNQs投与後の痙攣誘発時の脳組織中濃度(C_{BR})との相関から、*in vitro*実験データに基づいた*in vivo*におけるNQsの痙攣誘発の予測性を示した。

材料と方法

実験材料

使用動物

ddY系雄性マウス (mouse) を日本医科学動物資材研究所 (東京) より購入し、温度 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ に維持した動物飼育ケージの中で5日間以上飼育して使用した。使用時の体重は、脳室内注入では18–22 g、その他の実験では28–32 gであった。飲料水及び飼料 (固形飼料MF、オリエンタル酵母) は自由に与えた。

体長約10 cmの雌性アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) を浜松生物教材 (浜松) から購入し、温度約 20°C に維持した水槽の中で飼育して使用した。食肉専門店で購入した刺身生食用牛肝臓の薄片を飼料として与えた。

使用薬物

NQsであるエノキサシン (enoxacin; ENX) は大日本製薬 (株) (大阪) より、ノルフロキサシン (norfloxacin; NFLX) は杏林製薬 (株) (東京) より、塩酸シプロフロキサシン (ciprofloxacin hydrochloride; CPM) 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) (東京) より提供された。NSAIDsであるフェンブフェン (fenbufen; FNB) の活性代謝物であるフェルビナク (felbinac; FLB) は日本レダリー (株) (東京) より提供された。以上の薬物の構造式はFig. 1に示した。β-LCsであるセファゾリン (cefazolin; CEZ) は市販製剤であるセファメジン®注射用を藤沢薬品工業 (株) (大阪) より、イミペネム-シラスタチン (imipenem-cilastatin sodium; IMP/CS) は市販製剤であるチエナム®点適用を萬有製薬 (株) (東京) より購入して使用した。脳組織内毛細血管容積率の算出に用いた、 ^{131}I -ヒト血清アルブミン (human serum albumin; HSA) (18.5 MBq) は米国デュポン社 (Dupont Co.; Boston, MA) よりNEN® Research Productsを購入し、限外濾過法 (MPS-3 Centrifree micropartition system Amicon; W.R.Grace and Co.-Conn.; Beverly, MA, U.S.A.) によ

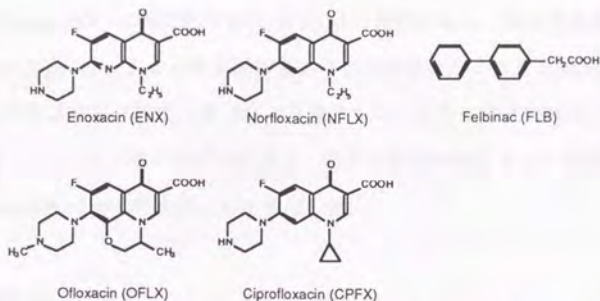


Fig. 1. Structural Formulae of Ciprofloxacin, Enoxacin, Norfloxacin, Ofloxacin and Felbinac.

り算出される遊離型ヨウ素の割合が0.3%未満になるようにカラム精製 (Sephadex G-25 gel, Pharmacia LKB Biotechnology; Uppsala, Sweden) して使用した。各種受容体のアゴニスト (agonist) であるアセチルコリン (acetylcholine; Ach)、GABA、グリシン (glycine; Gly) および L-グルタミン酸 (L-glutamic acid; Glu) は和光純薬工業 (株) (大阪) より、セロトニン (serotonin, 5-hydroxytryptamine; 5-HT)、カイニン酸 (kainic acid; KA)、キスカル酸 (quisqualic acid; QA) および N-メチル-D-アスパラギン酸 (N-methyl-D-aspartic acid; NMDA) と GABA_A 受容体のアンタゴニスト (antagonist) であるビククリン (bicuculline methiodide; BCL) は米国シグマ-ケミカル社 (Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO) より購入した。アフリカツメガエルの卵巣組織の処理に用いた細胞分散用コラゲナーゼ (collagenase) は和光純薬工業 (株) より購入した。受容体結合実験で用いた GABA_A 受容体のアゴニストである ³H-ムシモール ([methylene-³H(N)]-muscimol) (37 MBq) と液体シンチレーション (scintillation) 計測用調製カクテル (cocktail) (ATOMLIGHT) は米国デュボン社の NEN[®] Research Products を、非標識のムシモール (muscimol) と鉱油 (mineral oil) は米国シグマ社より、シリコン油 (silicon oil) は米国アルドリッチ-ケミカル社 (Aldrich Chemical Co., Inc.; Milwaukee, WI) より購入した。血漿および脳組織中薬物濃度の測定における内部標準物質 (internal standard; I.S.) として使用した、オールドキノロン系抗菌剤であるピベミド酸 (pipemidic Acid; PPA) は大日本製薬 (株) より、ナリジクス酸 (nalidixic Acid; NA) は第一製薬 (株) より、NSAIDs であるフルビプロ

フェン (flurbiprofen; FRP) は科研製薬 (株) (浦安) より提供された。残留農薬試験用ジクロロメタン (dichloromethane) および水質試験用ラウリル硫酸ナトリウム (sodium laurylsulphate) 標準品は和光純薬工業 (株) より購入した。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、通常市販の特級品または高速液体クロマトグラフ (chromatograph) 用の物を購入して使用した。

In vivo動物実験

投与薬液の調製と投与方法

NQsであるCPFX、ENX、NFLXおよびOFLXとFLBは等モル (mole) 量の水酸化ナトリウム (NaOH) を添加し、ナトリウム塩 (sodium salt) の水溶液とした。β-LCsは注射用水に溶解させた。これら薬液の浸透圧が生理食塩液よりも低い場合には塩化ナトリウム (NaCl) を添加し等張化した。静脈内瞬時注入においては、各マウスにおける投与薬液の全量は20 μl/g 体重とし、単独投与の場合は薬液と生理食塩液とを、併用投与の場合にはNQsあるいはβ-LCsとFLBとを、1 minの間隔を開けて両尾静脈からそれぞれ1 min ("NQsとβ-LCsの痙攣誘発性に対するFLBの効果"における各薬物の単独投与と"NQsとFLB併用での静脈内投与による痙攣誘発"におけるOFLXの投与では5 min) かけて注入した。静脈内定速注入においては、尾静脈からNQsの薬液を0.03 ml/minの注入速度で間代性痙攣が発現するまで注入した。脳室内定速注入においては、脳室内にNQsの薬液を6 μl/minの注入速度で間代性痙攣が発現するまで注入した (ただし3 min以内に痙攣を発現しなかった場合には注入開始3 min後に注入を停止した)。また脳室内定速注入におけるFLBの前処理の場合には、各マウスあたり20 μl/g 体重となるFLB溶液を腹腔内に約10 secで注入した。静脈・脳室内定速注入には、Compact Infusion Pump, model 975 (Harvard Apparatus; Millis, MA, U.S.A.)を使用した。

NQsと β -LCsの痙攣誘発性に対するFLBの効果

初めにNQsであるENXとFLBをそれぞれ単独で静脈内注入し、間代性痙攣の発現を観察した。そして各薬物の単独投与時の痙攣誘発性に関するED₅₀を求めた。次にENXとFLBとを併用して静脈内注入し、両薬物の併用投与時の痙攣誘発性に関するED₅₀を求めた。併用投与時の両薬物の投与量は各薬物の単独投与により得られたED₅₀の比率に固定した。これらと同様の検討を β -LCsとFLBとの組み合わせでも行った。 β -LCsとしてはセファロスポリン系 (cephalosporins) 抗生物質であるCEZとカルバペネム系 (carbapenems) 抗生物質であるIMP/CSを用いた。ED₅₀はDixon and Mood法により算出した (Dixon and Mood, 1948; Dixon, 1965)。

NQs単独での静脈内定速注入による痙攣誘発

非拘束状態のマウスにENX、NFLXまたはOFLXを、1.5または3 mg/minの投与速度 (NFLXは1.5または2 mg/min) で尾静脈内から定速注入し、間代性痙攣が発現するまでの時間を測定した。間代性痙攣が発現した時点において頸椎脱臼後に断頭し、血液と脳組織を採取した。ヘパリンナトリウム (heparin, sodium salt) を添加した血液は直ちに1620×gで5 min遠心分離し血漿を得た。血漿および脳組織試料は-20℃の冷凍庫内で凍結保存し、後に血漿中薬物濃度 (C_p) およびC_{BR}を測定した。そして各NQにおいて痙攣発現時間、痙攣発現時のC_pおよび痙攣発現時のC_{BR}を二段階の投与速度間で比較した。

使用薬物とその投与速度に関する予備実験において、NFLXを他のNQsと同じ3 mg/minの投与速度で注入した場合には約10 minに呼吸不全により動物が致死したため、NFLXの高投与速度は2 mg/minと設定した。またCPFXについては、2 mg/min以上の投与速度で注入した場合には20 min以内に呼吸不全により動物が致死し、一方1.5 mg/min以上では薬液の血管障害性によって間代性痙攣が誘発されるまで (> 30 min) に薬液が血管内から組織に浸潤し正確に投与できなかったために、本検討から除外した。

NQsの体内動態に及ぼすFLBの影響

マウスの尾静脈からENX (25 mg/kg) とFLB (15 mg/kg) とを、またはCPFEX (20 mg/kg) とFLB (50 mg/kg) とを併用して瞬時注入した。ENXとFLBの併用では、両薬物投与3、5、10、20、30および60 min後に、CPFEXとFLBの併用では両薬物投与5、10、20および40 min後に頸椎脱臼して断頭し、上記と同様の処理を施した。そしてENXおよびCPFEXの C_p と C_{BR} に及ぼすFLBの影響を調べた。

NQsとFLB併用での静脈内投与による痙攣誘発

非拘束状態のマウスにCPFEX、ENX、NFLXまたはOFLXとFLBとをそれぞれ種々の投与量で尾静脈から瞬時注入し、両薬物を投与して20 min以内での間代性痙攣発現の有無を観察した。間代性痙攣を発現した動物はその時点において、発現しなかった動物は両薬物投与20 min後において頸椎脱臼して断頭し、上記と同様の処理を施した。そして両NQsとFLBの C_p または C_{BR} の組み合わせと間代性痙攣誘発性との関係を調べた。

NQsの脳室内定速注入による痙攣誘発

マウスの脳室内へのCPFEX、ENX、NFLXおよびOFLXの定速注入はSteppuhnとTurski (1993) の方法を一部変更して行った。ステンレス製注射針27G3/4 (テルモ (株); 東京) のコネクターから針部 (直径0.4 mm) を切断し、その先端から3.5 mmに直径2 mmのプラスチック製ストッパーを付けたものをポリエチレン製チューブ PE-10 (Becton Dickinson and Co.; Parsippany, N.J., U.S.A.) を用いて50 μ lのマイクロシリンジ (Hamilton Co.; Reno, Nev., U.S.A.) と接続した。注射針は、その先端が人字縫合と矢状縫合の交点であるラムダ (λ ; lambda) から側方 (lateral) 1.0 mm、前方 (anteroposterior) 4.2 mm、下方 (ventral) 3.5 mmに位置するように、頭皮を僅かに切開したマウスの頭蓋表面から垂直に挿入した (Montemurro and Dukelow, 1972)。非拘束状態のマウスの脳室内にNQsを定速注入し、注入開始3 min以内における間代性痙攣が発現するまでの時間を測定した (投与薬液量 $<18 \mu$ l)。対照として生理食塩液を同じ6 μ l/minの注入速度で3 min間定速注入した。各NQsの投与速度について

は、初めに痙攣誘発性に対する注入薬液量の影響を検討するためにENXを60、120および180 nmol/minで定速注入した。次にCPFX、NFLXおよびOFLXを120 nmol/minの投与速度で定速注入した。FLB前処理群においては、FLB (100 mg/kg) を腹腔内投与30 min後にNQsを1.2 nmol/min (OFLXは1.2と12 nmol/min) の投与速度で定速注入した。そして各NQsの中核に対する直接的な痙攣誘発活性を、各NQsの投与速度と痙攣発現までの時間との積で算出される痙攣発現投与量に基づいて評価した。

イソボログラムによる薬物間相互作用の解析

本研究における *in vivo*での薬物間相互作用の解析方法としてイソボログラム (Isobologram) を用いた (Smith, 1966; Wessinger, 1988; Gessner, 1988)。イソボログラムとは、縦・横軸にそれぞれ各薬物の投与量を表示し、ある一定の薬効 (本研究では間代性痙攣) を発現する両薬物の投与量の組み合わせを示すグラフであり、各点を結ぶ曲線をイソボール (Isobol) という。縦・横軸とイソボールが交わる2つの交点 (すなわち各薬物単独投与時における薬効発現投与量) を結ぶ直線が、理論上の相加的 (additive) 相互作用を示すイソボール (Additive Isobol) となる。そして実験により得られた両薬物の投与量の組み合わせが Additive Isobol よりも原点に近ければ両薬物の相互作用は相乗的 (synergistic) 相互作用であり、逆に Additive Isobol よりも原点から離れていれば拮抗的 (antagonistic) 相互作用を意味する (Fig. 2)。その内容を数値化したものが次式による代数解析 (Algebraic Analysis) である (Berenbaum, 1977; Kissin et al., 1989)。

$$\frac{A_C}{A_S} + \frac{B_C}{B_S} = S$$

ここで、 A_S 及び B_S は薬物AまたはBの単独投与時における、ある一定の薬効を発現する投与量、 A_C 及び B_C は薬物AとBの併用投与時における同じ薬効を発現するそれぞれの投与量を表す。そしてこの式の解であるS値 (sum of fractions) が、1よりも小さければ相乗的相互作用、1の場合は相加的相互作用そして1よりも大きければ拮抗的相互作用である。従来では、このイソボログラムの縦・横軸に各薬物の投与量を表示することが多かったが、この

研究においてはそれに加えて各薬物の C_{BR} も用いた。

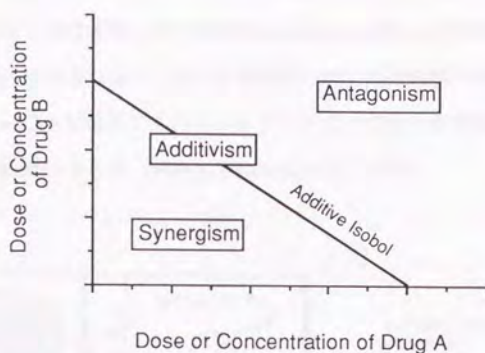


Fig. 2. Schematic Representation of an Isobologram. Plotted are the dose or concentration of drug A and B, which, administered alone or together, elicit a pharmacological effect of defined intensity.

In vitro受容体応答実験

本研究においては、各種受容体応答の記録にアフリカツメガエル卵母細胞外来遺伝情報発現系を使用した (Asanuma et al., 1987; Horikoshi et al., 1987; Kawakami et al., 1993). この実験系は、脳組織から単離したmRNAをアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の卵母細胞 (oocytes) に注入し翻訳させることにより、膜蛋白をコードしている神経伝達受容体を卵母細胞形質膜上に再構築 (移植) させる方法である (Fig. 3). 卵母細胞は神経細胞 (neuron) と形態的に大きく異なり、直径約 1mm と大きくて取り扱いが容易である。また球形であることから受容体応答を記録する電気生理学測定に際して空間クランプ (clamp) を保持しやすい等の特徴がある。更に卵母細胞は受精後の発生に供えて蛋白合成系が亢進した状態 (体細胞と比較してリボソーム (ribosome) 量は約 10,000 倍以上) にあり、その翻訳効率も極めて高いため、注入する mRNA も微量 (本研究では約 30 ng) で充分である。また卵母細胞のドナー (donor) であるアフリカツメガエルも腹膜縫合後は再度飼育が可能である

ため、使用動物数の大幅な低減が可能となる。従って本試験法は、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動物実験代替法である。加えて卵母細胞における翻訳後の糖鎖修飾もほぼ正常に行われ (Mishina et al., 1985)、その翻訳能も外因性 mRNA の由来する動物種に限定されない。従って将来的には、病理解剖や摘出剖検により得られるヒト臓器由来の mRNA を使用することによりヒトでの作用を直接評価できる試験法としても期待される (Gundersen et al., 1984ab; Tomaselli et al., 1989)。

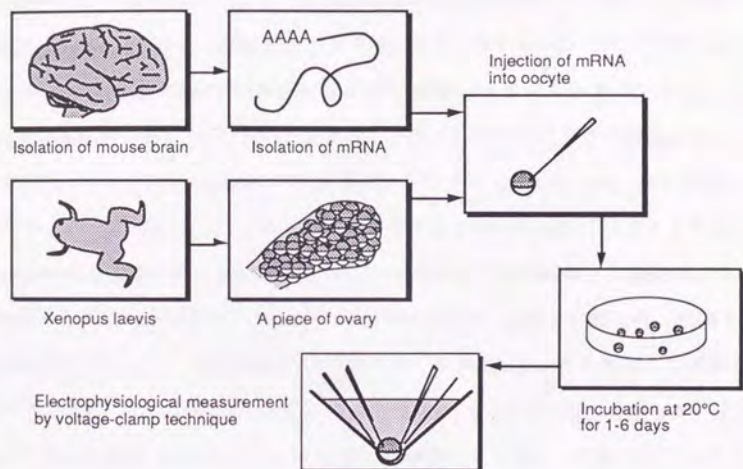


Fig. 3. Schematic Diagram Indicating the Principal Steps Involved in the Extraction, Injection of Mouse-brain mRNA into *Xenopus* Oocytes, Incubation and Electrophysiological Measurement.

Total RNAの脳組織からの抽出とmRNAの単離

RNAaseによるRNAの分解を防ぐため、全ての操作はディスポーザブル (disposable) のポリエチレン (polyethylene) 製グラブ (glove)、無塵紙製マスク及び無塵布製作業衣を着用して行った。また水としては、局方注射用水に0.1% ジエチルピロカールボネートを添加して24 h以上経過した後にオートクレーブ (autoclave) 処理したものを使用した。使用する

全てのガラスおよび金属製の器具は200℃で乾熱処理 (>8 h) し、100℃以上に加熱できない器具は0.1% ジエチルピロカーボネート (diethyl pyrocarbonate) 水溶液中に24 h以上浸した後に100℃で加熱処理 (>15 min) した。更に使用する全ての器具および試薬は本実験専用とし、実験台上はアルミ箔で被いそれを頻りに交換しながら全ての操作を行った。

全RNA (total RNA) の抽出はChomczynskiとSacchi (1987) の方法に従った。マウスを頸椎脱臼後に断頭して、全脳 (大脳、脳幹および小脳) を摘出した。得られた脳組織は直ちに全RNAの抽出操作に使用した。蓋付きポリエチレン製遠心管50 ml内に脳組織約1 g当たり、4 M グアニジンチオシアネート (guanidinium thiocyanate)、25 mM クエン酸ナトリウム (sodium citrate) -pH 7.0、0.5% サルコシル (N-ラウリルサルコシナトリウム塩) (sarcosyl; N-lauroylsarcosine sodium salt) および0.1 M 2-メルカプトエタノール (2-mercaptoethanol) を含有した水溶液10 mlを加え氷冷下にホモジナイズ (homogenize) した。得られたホモジネート (homogenate) に2 M 酢酸ナトリウム (pH 4.0) 1 ml、水で飽和した核酸抽出用フェノール (phenol) 10 mlおよびクロロホルム (chloroform): イソアミルアルコール (isoamyl alcohol) 混液 (49: 1, volume/volume) 2 mlを添加して30 sec激しく振盪後、氷水中に15 min静置した。この試料を4℃において10,000×gで20 min遠心分離した。RNAを含む上清を別の遠心管に移し、等容量のイソプロパノール (isopropanol) を添加して混和した後、-20℃で1 h静置した。この試料を4℃において10,000×gで20 min遠心分離した。上清を除去し得られた全RNAの沈澱に水1 mlを添加して溶解させた後、4 M 塩化ナトリウム (NaCl) 水溶液50 μlとエタノール (ethanol) 2.5 mlを加えて混和し、4℃において10,000×gで5 min遠心分離した。再度上清を除去し精製されたRNAの沈澱にエタノール: 水混液 (75: 25, volume/volume) 10 mlを添加後、4℃において10,000×gで5 min遠心分離し、全RNAの沈澱を得た。全RNAは56 mM 塩化ナトリウムを含有したエタノール-水混液 (75: 25) に懸濁させ、mRNAの単離操作まで-70℃で凍結保存した。

mRNAの単離操作を開始する際には、融解させたこの懸濁液を4℃において10,000×gで20 min遠心分離して上清を除去後、再度エタノール: 水混液 (75: 25) 10 mlを添加して4℃において10,000×gで5 min遠心分離して上清を除去することにより全RNAの沈澱を得た。オリゴ (dT) セルロースカラム (mRNA purification kit; Pharmacia LKB Biotechnology;

Uppsala, Sweden) を用いて、全RNAからmRNA (poly(A)⁺RNA) を精製した。単離された mRNA は 1 mM エチレンジアミンテトラ酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA) と 10 mM トリス-塩酸 (tris-ethylenediamine-HCl) (pH7.4) の水溶液中に溶解させて、アフリカツメガエル卵母細胞への注入操作まで -70℃ で凍結保存した。

mRNAのアフリカツメガエル卵母細胞への注入

氷冷麻酔したアフリカツメガエルの側腹部の皮膚と筋肉層を約 1 cm 切開し、卵巣の一部を摘出した。摘出した卵巣は直ちにメディウム (modified Barth's medium) で満たしたシャーレに移した。メディウムとしては、88 mM 塩化ナトリウム、1 mM 塩化カリウム (KCl)、0.33 mM 硝酸カルシウム (Ca(NO₃)₂)、0.41 mM 塩化カルシウム (CaCl₂)、0.82 mM 硫酸マグネシウム (MgSO₄) および トリス-塩酸 (pH 7.4) の水溶液を使用した。卵巣を摘出したアフリカツメガエルは、腹部を縫合して麻酔から蘇生させた後、飼育用の水槽に戻した。摘出した卵巣は室温下 (約 20℃) で 1.0 mg/ml コラゲナーゼ (collagenase) 含有メディウム中で 30 min 穏やかに攪拌した後、新鮮なメディウムで数回洗浄した。ステージ V-VI に成熟しており両極の境界が明瞭な直径約 1.0 - 1.2 mm の卵母細胞を選び、ピンセットを用いてその卵胞細胞層 (follicle cell layer) を注意深く除去して卵母細胞を単離した。その際にビテリン外套 (viterine envelop) については、その一部でも破壊すると卵母細胞の機械的強度が低下するため、これは取り除かなかった。約 30 ng の mRNA を、先端の直径約 10 μm のガラス製微小ピペット (micropipette) の中を流動パラフィン (paraffin) で満たしたものを用いて、卵母細胞の動物極側に圧注入した。対照の卵母細胞には水を同様に注入した。mRNA を注入した卵母細胞は 20℃ のメディウム中に 2 日間以上静置後、受容体応答の記録に使用した。

受容体応答の電気生理学的測定方法と装置

脳 mRNA を注入したアフリカツメガエル卵母細胞における電気生理学測定は Horikoshi ら (1988) の方法に従って行った。卵母細胞の膜電位は、1.5 M クエン酸カリウム

(potassium citrate) で満たした2本の微小ガラス電極 (電極抵抗約4 M Ω) をそれぞれメディアウム中と卵母細胞の形質膜内とに設置し、微小電極用差動増幅増幅器 (DPZ-16; ダイヤメディカルシステム (株), 東京) にて導出した。更に同様に作成した1本のガラス電極を卵母細胞に刺入し、これを膜電位固定用の通電用電極として使用した。これら3本のガラス電極はAg-AgCl電極を介して各増幅器と接続した。膜電位固定は膜電位固定用増幅器 (CEZ-1100; 日本光電工業 (株), 東京) を用いて行い、Fig. 4のブロックダイアグラム (block diagram) に示すように測定用液槽 (bath) 内にAg-AgCl電極を設置しバーチャル-グランドモード (virtual grand mode) にて電流応答を記録した。卵母細胞より導出された膜電位および膜電流は、オシロスコープ (oscilloscope; ソニー・テクトロニクス (株), 東京) とペンレコーダー (electronic polyrecorder, EPR-200A; 東亜電波工業 (株), 東京) を用いて観察および記録した。

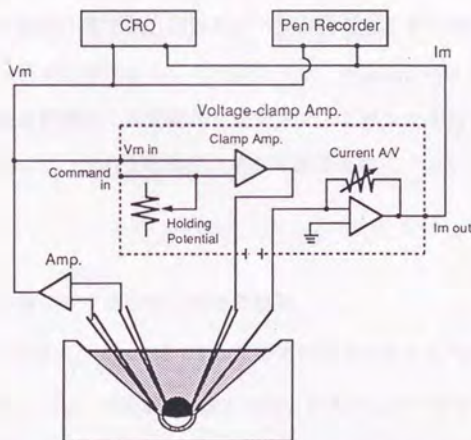


Fig. 4. Schematic Diagram Indicating Electrophysiological Measurement in *Xenopus* Oocytes injected with mRNA of the Brain.

薬物存在・非存在下での各種アゴニストによる応答は、室温 (約20 $^{\circ}$ C) 下において底に小さなくほみを有する逆円錐型の測定用液槽 (容量約1 ml) を用いて測定した。液槽の

くほみ内に動物極側を上にして静置した卵母細胞に電極を設置し膜電位が安定した後に、クランプ (clamp) 電流を通して膜電位を -60 mV に保持した(ただしGABA応答の電流-電位関係を調べる際には保持電位を変化させた)。そして、ピペット (pipette) を用いて卵母細胞の周囲を除く大部分 ($>99\%$) のメディアムを吸引後、アゴニストあるいは薬物を含有するメディアムを液槽内に約 1.5 sec で注入することにより、液槽中のメディアムをすばやく交換し卵母細胞周辺のアゴニストおよび薬物の濃度をすばやく変化させた。その後、バス内のメディアムを新鮮なメディアムと数回以上交換することにより卵母細胞をアゴニストあるいは薬物から洗浄した。

一般に受容体応答等を測定する実験においては、溶液の交換は外液の灌流により行われることが多かった。しかし通常の灌流方法では、測定用液槽内のメディアム交換に時間を要したり測定用液槽に外液を導くチューブ内において拡散により薬物の濃度勾配が生ずる等、アプライする薬物濃度を瞬時に変化させることが困難であった。そのため脱感作を起こすタイプの受容体応答では、応答のピークが得られる前に既に脱感作が始まってしまい形状の乱れた応答が記録されることが多かった。本方法では、底に小さなくほみを有する逆円錐型の測定用液槽内に卵母細胞を安定させ、ピペットを用いて溶液の交換を行うことにより、約 1.5 sec で一定の薬物濃度の溶液を卵母細胞にアプライ (apply) することが可能となった。

各種アゴニストの応答に対するENXとFLBの効果

Ach、5-HT、GABA_A、GlyおよびGlu受容体の応答に対するNQsとNSAIDsの効果を検査するために、 $100\text{ }\mu\text{M}$ ENXと $10\text{ }\mu\text{M}$ FLBの共存・非共存下における各種アゴニストの応答を記録した。用いたアゴニストは、 $10\text{ }\mu\text{M}$ Ach、 $1\text{ }\mu\text{M}$ 5-HT、 $10\text{ }\mu\text{M}$ GABA、 $500\text{ }\mu\text{M}$ Gly、 $100\text{ }\mu\text{M}$ Glu、 $100\text{ }\mu\text{M}$ KA、 $10\text{ }\mu\text{M}$ QAおよび $50\text{ }\mu\text{M}$ NMDAである。これらアゴニストの濃度は各アゴニストによる応答のほぼ EC_{50} に相当する。NMDAを除く全てのアゴニストの応答は前述のメディアム中において、NMDAの応答はマグネシウムイオン (Mg^{2+}) を含有しないメディアム中において $3\text{ }\mu\text{M}$ Glyを共存させて測定した。 Mg^{2+} はNMDA受容体

チャンネル部位の開口部を遮断し、またGlyはNMDAの受容体に対する親和性を亢進させる。またNMDA応答については、NQsが各種の金属イオンとキレートを形成することが報告されているため(川上ら, 1992)、 Mg^{2+} によるその遮断に対するENXとFLBの効果も検討した。

GABA応答に対するNQsの抑制作用とFLBによるその増強効果

GABA応答については、前述のスクリーニングにおいてENXの抑制作用とFLBによるその増強効果が認められた。そこで100 μ M ENXと10 μ M FLBの共存・非共存下におけるGABA応答の濃度依存性と電流-電位関係を調べた。濃度依存性では、100 nMから10 mMまでの濃度のGABAに対する応答を各濃度毎に測定し、GABAの濃度作用曲線を求めた。電流-電位関係では、膜電位をそれぞれ-80、-60、-40、-20、 ± 0 および+20 mVに固定してGABA応答を測定した。

またGABA応答抑制に関するNQsあるいはGABA_AアンタゴニストであるBCLの濃度依存性と、NQsのGABA応答抑制の増強に関するFLBの濃度依存性を検討した。NQsあるいはBCLの濃度依存性については、10 μ M FLBの共存・非共存下における10 μ M GABA応答に対するCPF、ENX、NFLX、OFLXおよびBCLの抑制作用に関する濃度作用曲線を求めた。FLBの濃度依存性については、1、10および100 μ M FLBの共存・非共存下における10 μ 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。

GABAの EC_{50} とNQsあるいはBCLの IC_{50} はLitchfield and Wilcoxon法(1949)により算出した。NQsの抑制作用の強度はNQsの10 μ M GABA応答に対する IC_{50} で評価した。FLBの増強効果の強度は、FLB非共存下における各NQsの IC_{50} をFLB共存下におけるそれと除して得られる増強比を用いて評価した。FLBの濃度依存性に関する検討以外で使用したFLBの濃度(10 μ M)は、臨床におけるFLBのプロドラッグ体であるフェンブフェン(fenbufen; FB)を常用量で連続投与した後の血清中FLB濃度に、動物実験におけるFLBの中枢移行率(脳組織中濃度-血漿中濃度比)を乗じて得られるヒトでの予測脳組織中濃度とほぼ等しい値とした(Chiccarelli et al., 1980ab)。

In vitro受容体結合実験

本研究においては、GABA_A受容体結合量の測定にマウス脳単離細胞を使用した (Geiger et al., 1983)。この実験法では、微細化したマウスの脳組織から機械的に単離した脳実質細胞の細胞体部分(シナプス後膜に相当)を使用し、放射性標識アゴニストとのインキュベート (incubate) 後に、メディアウムと細胞とを両者の比重差に基づき油層 (oil layer) を用いて遠心チューブ内で分離する。その利点としては、通常受容体結合実験における脳組織から得られる膜 (synaptic plasma membrane) 標品を使用する方法と比較して、メディアウムの吸引が不要であり放射活性を有した廃液が拡散しないため操作上の安全性が高いこと、単離細胞の調製が容易なこと、神経伝達物質受容体が正しい向きに組み込まれた閉鎖膜系として細胞体が維持されていることが挙げられる。

マウス脳単離細胞の調製

マウスを頸椎脱臼後に断頭して、全脳(大脳、脳幹および小脳)を摘出した。得られた脳組織は直ちに単離細胞の調製操作に使用し、全ての操作は氷冷下もしくは4℃で行った。メス (surgical blade) で微細化した3匹分の脳組織を210 μmのナイロンメッシュ (nylon mesh) に包んで緩衝液A 40 mlの中に浸し、ガラス棒を用いて穏やかに叩いた。この細胞が懸濁した緩衝液Aを順々に210 μm、130 μmそして80 μmのナイロンメッシュに通した後に、ポリエチレン製の50 ml遠心管に移して300×gで3min遠心した。上清を除去後、緩衝液B 40 mlを添加して細胞を懸濁させ、再度300×gで3min遠心した。上清を除去後、緩衝液B 1.4 mlを添加して得られた細胞の懸濁液を放射性標識化合物結合測定に使用した。この懸濁液に関して、ピロガロールレッド (pyrogallol red) 法により測定されたタンパク濃度は2-3 mg/mlであり、トリパンブルー染色により確認 (trypan blue exclusion test) される単離細胞の生存率 (viability) は90%以上であった。各緩衝液の組成については、緩衝液Aは110 mM 塩化ナトリウム、25 mM ブドウ糖 (dextrose; glucose)、72.1 mM 蔗糖 (saccharose; sucrose)、5.3 mM 塩化カリウムおよび20 mM HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) 水溶液-NaOH (pH 7.4) を、緩衝液Bは110 mM 塩化ナトリウム、25 mM ブドウ糖、68.3 mM

蔗糖、5.3 mM 塩化カリウム、1.8 mM 塩化カルシウム、1.0 mM 硫酸マグネシウムおよび 20 mM HEPES水溶液-NaOH (pH 7.4) を使用した。

^3H -ムシモール特異的結合に対するNQsの阻害作用とFLBによるその増強効果

使用する1 min前から37°Cに加温した細胞懸濁液にGABA_A受容体アゴニストである 10 nM ^3H -ムシモール (3.7 KBq/ml) と非標識の薬物を添加して、37°Cで15 min穏やかに振盪した。本実験条件においてアゴニストおよび薬物の細胞に対する結合が5 min以内に平衡に達していることを予備実験により確認した(データ示さず)。インキュベート後に、ポリエチレン製の共栓付き0.4 ml遠心チューブ内にあらかじめ作成しておいた上相がシリコンオイル (silicon oil) - ミネラルオイル (mineral oil) 混液 ($d = 1.017$) 50 μl 、下相が3 M 水酸化カリウム (KOH) 25 μl からなる二相系の液体上に、懸濁液 50 μl を載せて、直ちに20 sec遠心分離 (Table-top microfuge; Beckman Instruments; Fullerton, CA, U.S.A.) した。遠心することにより細胞だけが懸濁液のメデイウムから分離し、油層を通過して強アルカリ性の最下相中に移行してそこで溶解した。-10°Cで水相を凍結後、刃物を用いてチューブを油層の中ほどで二つに切断した。両切片をそれぞれガラス製のバイアル (vial) に移した後、細胞が可溶化した最下相側には中和用の1 M 塩酸 (HCL aq.) 50 μl を加えて密封しヴォルテクスミキサー (vortex mixer) を用いて激しく振盪した。そして両切片の入っているバイアルに液体シンチレーション計測用調製カクテル 5 ml をそれぞれ添加して密封した後、再度激しく振盪した。液体シンチレーションカウンター (LSC-3100; アロカ (株); 東京) によりメデイウムと細胞の両側の放射活性を測定した。

薬物としては、10 nM-1 mM のCPFX、ENX、NFLXおよびOFLXと10 μM FLBを使用した。非特異的結合は非標識の1 mM ^3H -ムシモールを添加して調べた。そして前述の受容体応答実験と同様に、FLB共存・非共存下における ^3H -ムシモールの特異的結合の阻害に関するNQsの濃度作用曲線からNQsの IC_{50} を求め、NQsの阻害作用とFLBによるその増強効果を評価した。

各実験データ間における相関性の解析

本研究では考察部において次の3組の実験データ間における相関性を検討した：マウス脳単離細胞における ^3H -ムシモールの特異的結合に対するNQsの IC_{50} とマウス脳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 IC_{50} との比較、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 IC_{50} とマウスにおける脳室内定速注入による痙攣誘発投与量との比較およびマウス脳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 IC_{50} とマウスにおける静脈内定速注入による痙攣誘発時の C_{BR} との比較を行った。相関性については、次式にしたがって両実験データのlog値を直線回帰し、相関係数を算出した。

$$y = A \cdot x^B$$

HPLC-UV法によるNQsとFLBの同時定量法

HPLC-UVを用いたNQsとFLBの C_p および C_{BR} の測定は、Nakamuraら(1983)及びKatagiriら(1988a, 1989)の方法を一部修正して行った。本研究では定量操作の効率化を目指してNQsとFLBの同時定量法を開発した。

血漿中NQs・FLB定量法

すり共栓付きガラス試験管10 ml内の血漿0.1 mlに0.1 M リン酸(phosphate)緩衝液(pH7.0) 1 ml、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のI.S.メタノール(methanol)溶液0.1 mlおよび抽出溶媒5 mlを添加して、10 min振盪抽出し、1620 $\times g$ で5 min遠心分離した。下相となる有機相4 mlを別の試験管に分取して溶媒を減圧下で蒸発留去し、残渣にメタノール-0.05 M水酸化ナトリウム水溶液(2:1, volume/volume) 50 μl を添加して溶解させ、その20 μl をHPLCに注入した。抽出溶媒としては、OFLXとFLBの同時定量にはジクロロメタン(dichloromethane)を、CPFX、

ENXあるいはNFLXとFLBの同時定量にはクロロギ酸エチル (ethyl chloroformate) を1%含有したクロロホルム (chloroform) を使用した。I.S.としては、ENXの定量にはCPFX、NFLXとCPFXにはPPA、OFLXにはNA、FLBにはFRPを使用した。

脳中NQs・FLB定量法

すり共栓付きガラス試験管10 ml内の脳組織に0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.0) を1:4 (weight/volume) の比率で添加してホモジナイズ (homogenize) した。ホモジナイズには、ブレンダー (blender) 型ホモジナイザーPhycotron® ((株) 日音医理工器械製作所; 船橋) を用いた。ホモジネート (homogenate) 1 mlに10 µg/mlのI.S. メタノール溶液0.1 ml及びジクロロメタン5 mlを添加して、10 min振盪抽出し、1620×gで5 min遠心分離した。下相となる有機相4 mlを別の試験管に分取後、1 mM 水酸化ナトリウム水溶液4 mlを添加して、10 min振盪抽出し、1620×gで5 min遠心分離した。上相となる水相3 mlを再度別の試験管に分取し、以下血漿サンプルと同様の操作を行った (ただしI.S.の添加を除く)。I.S.としては、前述の血漿中NQs・FLB定量法と同じ薬物を使用した。

脳組織中濃度は下式に従って、脳組織内に占める毛細血管容積の割合と血液中薬物濃度から算出される毛細血管内に残存する血液中薬物量を引いて補正した。

$$C_{BR} = \frac{C_{BR,obs} - r \cdot R_B \cdot C_p}{1 - r}$$

ここで、 C_{BR} は真の脳組織中濃度、 $C_{BR,obs}$ は測定された見かけの脳組織中濃度、 R_B は血液-血漿間濃度比、 r は脳組織内毛細血管容積 (ml/g brain)、 C_p は血漿中濃度を表す。 r の算出方法としては、マウスに ^{131}I -HSA (925 MBq/kg) を尾静脈から瞬時注入し、2 min後に断頭して血液と脳組織を採取した。そして血液および脳組織中の放射活性をγカウンター (Auto Well Gamma System ARC300; Aloka) で測定し、脳組織1 g当たりの放射活性を血液1 ml当たりの放射活性で除して r を求めた (Shimokawa et al., 1994)。

HPLC装置・条件

HPLC装置としては、Shimadzu LC-6A liquid chromatograph及びShimadzu SPD-6A spectrophotometer (共に (株) 島津製作所; 京都)を使用した。固定相はNucleosil 5C₁₈ (Macherey-Nagel; Duren, Germany)を6φ×250 mmのステンレススチールカラムに充填したものを30℃に保温して使用した。移動相としては、メタノール-0.005 M リウリル硫酸ナトリウム水溶液 (2:1, volume/volume)にリン酸 (phosphoric acid) を添加してpH 2.5に調整したものを流速1.2 ml/minで送流した。検出波長はENX, NFLX, CPFXは280 nm、OFLXは300 nm、FLBは254 nmとした。本測定条件における検出限界は、血漿および脳組織中濃度共に0.05 µg/mlであった。



Fig. 4. Calibration curves for the compounds ENX, NFLX, CPFX, OFLX, and FLB. The concentration of the compounds in plasma and brain tissue was determined by HPLC.

結果

マウス脳組織内の毛細血管容積

^{125}I -HSAを用いて測定したマウスにおける脳組織内の r は 1.4 ± 0.1 ml/g brain ($n=5$, mean \pm S.D.)であった。

NQsと β -LCsの痙攣誘発性に対するFLBの効果

Fig. 5はCEZ、IMP/CSおよびENXとFLBとの間代性痙攣発現に関する ED_{50} isobologramである。図中の各点は ED_{50} を、破線および各点のバーは95%信頼限界を示した。CEZとFLBとの併用投与では、S値は1.13と1を越えたが ED_{50} とAdditive Isobolとの間に有意な差は見られず、両薬物による間代性痙攣の誘発は相加的相互作用によることが分かった。IMP/CSとFLBとの併用投与では、S値は1.22であり両薬物での痙攣誘発は僅かな拮抗的相互作用による傾向を示した。一方ENXとFLBとの併用投与では、S値は0.0781と極めて強い相乗的相互作用を示した。

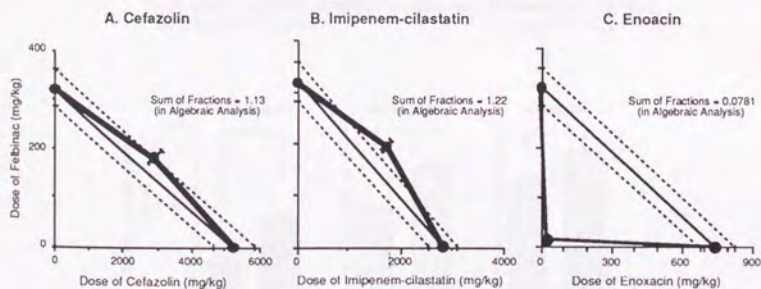


Fig. 5. ED_{50} Isobologram for the Convulsant Interaction between Antibacterial Agents and Felbinac in Mice.
Panel A: Cefazolin, panel B: imipenem-cilastatin, and panel C: enoxacin.

NQs単独での静脈内定速注入による痙攣誘発

NQs (ENX、NFLXおよびOFLX) 単独での静脈内定速注入による間代性痙攣発現時間をFig. 6に示した。全てのNQsにおいて、高投与速度における痙攣誘発時間は低投与速度におけるそれよりも有意に短かった ($p < 0.05$)。NQs (ENX、NFLXおよびOFLX) 単独での静脈内定速注入による間代性痙攣発現時の C_p をFig. 7に示した。全てのNQsにおいて高投与速度における C_p は低投与速度におけるそれよりも有意に高かった ($p < 0.05$)。Fig. 8には間代性痙攣発現時の C_{BR} を示した。全てのNQsにおいて C_{BR} は投与速度間において等しかった。

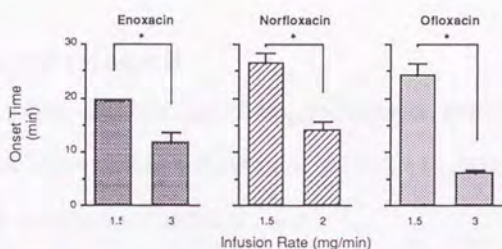


Fig. 6. Onset Time for the Occurrence of Clonic Convulsion after Intravenous Infusion at the Constant Rate in Mice. Enoxacin and ofloxacin were infused at the rate of 1.5 and 3 mg/min, and norfloxacin were infused at the rate of 1.5 and 2 mg/min. ($n = 3$, mean \pm S.D.)

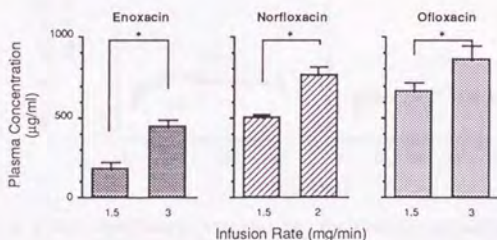


Fig. 7. Plasma Concentration of New Quinolones at the Onset of Convulsion after Intravenous Infusion at the Constant Rate in Mice. Enoxacin and ofloxacin were infused at the rate of 1.5 and 3 mg/min, and norfloxacin were infused at the rate of 1.5 and 2 mg/min. ($n = 3$, mean \pm S.D.)

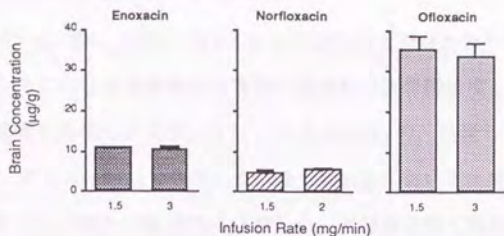


Fig. 8. Brain Concentration of New Quinolones at the Onset of Convulsion after Intravenous Infusion at the Constant Rate in Mice.

Enoxacin and ofloxacin were infused at the rate of 1.5 and 3 mg/min, and norfloxacin were infused at the rate of 1.5 and 2 mg/min. (n = 3, mean ± S.D.)

NQsの体内動態に及ぼすFLBの影響

Fig. 9にFLB併用・非併用時におけるNQs (ENXとCPFX) 静脈内投与後の C_p と C_{BR} 推移を示した。Panel AのENX、Panel BのCPFX共に、その C_p と C_{BR} 推移はそれぞれFLB併用群とFLB非併用群との間において相違しなかった。

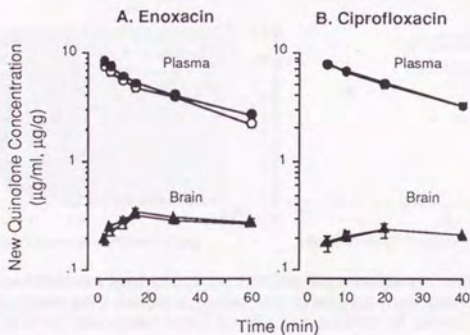


Fig. 9. Effect of Felbinac on Plasma (○●) and Brain (△▲) Concentration of New Quinolones after Concomitant Intravenous Administration in Mice.

Panel A: enoxacin (25 mg/kg) and felbinac (15 mg/kg), and Panel B: ciprofloxacin (20 mg/kg) and felbinac (50 mg/kg). Open symbols: new quinolone alone, and Closed symbols: new quinolone with felbinac. (n = 4, mean ± S.D.)

NQsとFLB併用での静脈内投与による痙攣誘発

Fig. 10にNQs (CPFX、ENX、NFLXおよびOFLX) とFLBとをそれぞれ種々の投与量で静脈内投与した後における痙攣発現の有無と両薬物の脳組織濃度との関係を示した。各点については、痙攣を発現した個体をクロスド (closed) の、発現しなかった個体をオープン (open) のシンボル (symbol) で表示した。全てのNQsにおいて、痙攣を発現した動物の両薬物濃度はグラフ中の網かけ範囲内に分布した。痙攣発現群と非発現群との間にはグラフ中に実線で示した明確な閾値が存在し、更にそれは原点側に凸の相乗的相互作用を示した。

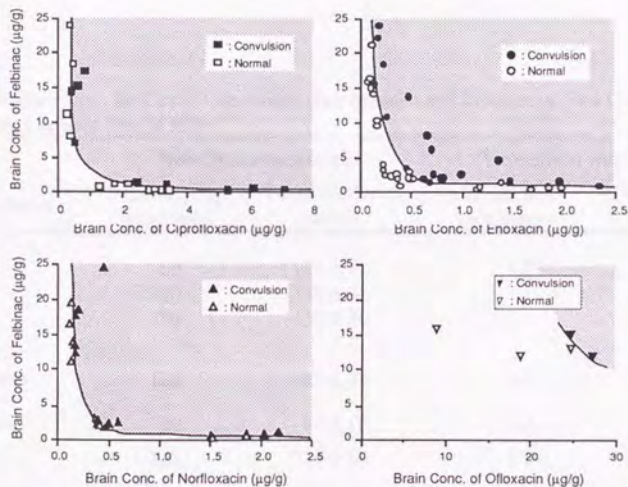


Fig. 10. Brain-concentration Isobologram for the Convulsant Interaction between New Quinolones and Felbinac after Intravenous Injection in Mice. Solid lines are the threshold level for the occurrence of clonic convulsion. Shadow areas present the concentration range of both new quinolones and felbinac for the convulsion group.

NQsの脳室内定速注入による痙攣誘発

Table IにNQsの脳室内定速注入による間代性痙攣発現時間と痙攣発現投与量を示した。FLB未処理群においては、生理食塩液を注入したマウスは間代性痙攣を発現しなかった。ENXの痙攣発現投与量は三段階の投与速度間において等しかった。そこで他のNQsを120 nmol/minで定速注入し、痙攣発現投与量をNQs間において比較した。痙攣発現投与量の順序はNFLX < CPFX = ENX < OFLXであった。FLB前処理群においては、生理食塩液を注入したマウスは間代性痙攣を発現しなかった。各NQsでの痙攣発現投与量はFLB未処理群よりも低い値となった。OFLXにおいては、他のNQsで用いた1.2 nmol/minの投与速度では3 min以内に間代性痙攣が発現しなかったため、12 nmol/minでの定速注入による痙攣発現投与量を求めた。NQs間における痙攣発現投与量の順序はNFLX < ENX < CPFX < OFLXであった。

Table I Threshold Dose for Clonic Convulsion after Intracerebral Infusion of New Quinolones at the Constant Rate in Mice.

| New Quinolones | New Quinolones alone | | Pretreatment with Felbinac | |
|----------------|--------------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------|
| | Infusion Rate (nmol/min) | Threshold Dose (nmol) | Infusion Rate (nmol/min) | Threshold Dose (nmol) |
| Enoxacin | 60 | 142 ± 16 | 1.2 | 1.60 ± 0.36 |
| | 120 | 142 ± 46 | | |
| | 180 | 138 ± 30 | | |
| Ciprofloxacin | 120 | 122 ± 28 | 1.2 | 2.16 ± 0.42 |
| Norfloxacin | 120 | 88 ± 16 | 1.2 | 0.92 ± 0.34 |
| Ofloxacin | 120 | 328 ± 60 | 1.2 | — |
| | | | 12 | 20.6 ± 4.8 |

Isotonic solution containing each new quinolone was infused at 6 µl/min.

The animals were observed for the occurrence of clonic convulsion within 3 min under non-restrained condition.

Threshold dose was calculated by multiplication of administration rate with latency time until the onset of convulsion.

In felbinac group, pretreatment of intraperitoneal administration of felbinac (100 mg/kg) was performed 30 min before the intracerebral infusion of NQs.

All data were presented as mean ± S.D. with four experiments.

各種アゴニストの応答に対するENXとFLBの効果

Fig. 11にマウス脳mRNAを注入したアフリカツメガエル卵母細胞における100 μ M ENXと10 μ M FLBの共存・非共存下での各種アゴニスト (GABA、Gly、Ach、5-HT、Glu、KA、QAおよびNMDA) の応答を示した。Panel AのGly応答はENXにより約80%に抑制されたが、その抑制作用はFLBにより増強されなかった。Panel BのAch応答は応答初期のピークがENXにより僅かに抑制されたが、Gly応答の場合と同様にその抑制作用はFLBにより増強されなかった。Panel CのGABA応答はENXにより約50%に抑制され、更にFLBの共存により完全に抑制された。FLBはGABA応答を変化させなかった。Panel D-Hに示したその他のアゴニストによる応答はENXとFLBにより変化せず、またMg²⁺によるNMDA応答の遮断もENXとFLBにより解除されなかった。

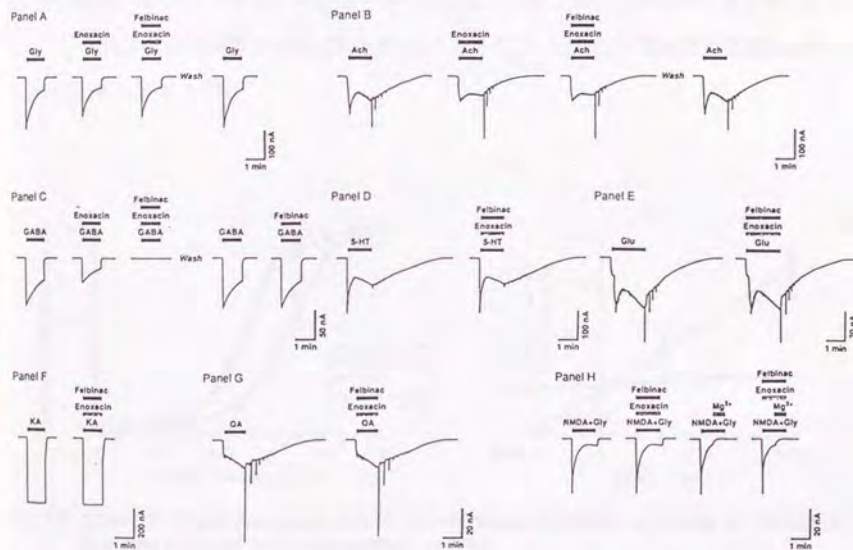


Fig. 11. Modulation of Various Agonist-induced Current Responses by 100 μ M Enoxacin and 10 μ M Felbinac in *Xenopus* Oocytes Injected with Mouse-brain mRNA.

Panel A: 0.5 mM Gly, panel B: 10 μ M Ach, panel C: 10 μ M GABA, panel D: 1 μ M 5-HT, panel E: 0.1 mM Glu, panel F: 0.1 mM KA, panel G: 10 μ M QA, and panel H: 50 μ M NMDA and 3 μ M Gly in the absence and presence of Mg²⁺.

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

GABA_A受容体応答に対するNQsの抑制作用とFLBによるその増強効果

Fig. 12にマウス脳mRNAを注入したアフリカツメガエル卵母細胞におけるENX (10 μ M) とFLB (10 μ M) の存在・非存在下におけるGABAの濃度作用曲線を示した。両ENXとFLBの非存在下において、GABA誘発電流応答は0.3 μ M以上で発生して1 mMで最大値に達し、そのEC₅₀は34 \pm 2 μ Mであった。ENX存在下においては、このGABAの濃度-作用曲線は右方向に移動し、GABA応答のEC₅₀は43 \pm 3 μ Mになった。両ENXとFLBの共存下においては、濃度-作用曲線は更に右方向に移動し、EC₅₀は207 \pm 55 μ Mとなった。GABAの濃度-作用曲線の最大値はENXの存在または非存在下で変化しなかった。GABAによる最大応答はENXにより変化せず、両逆数プロット (double-reciprocal plot) もY軸上で交差したことから、FLB共存・非共存下におけるENXのGABA応答に対する抑制作用は競合阻害様式を示した。一方FLBだけの共存下 (ENX非共存下) においては、GABAの濃度作用曲線は変化しなかった (データ示さず)。

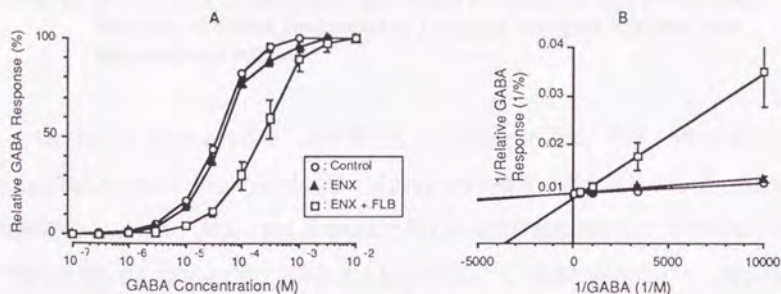


Fig. 12. Effect of 10 μ M Enoxacin and 10 μ M Felbinac on GABA response in *Xenopus* Oocytes Injected with Mouse-brain mRNA.

Panel A: dose-response curve of GABA. GABA-induced current responses are plotted as a function of the logarithm of GABA concentration.

Panel B: double-reciprocal plot for relationship between GABA concentration and GABA-induced current response.

Fig. 13に50 μM ENXと10 μM FLBの共存・非共存下でのGABA (10 μM) 応答の電流-電位関係を示した。Nernstの式に基づき本実験に用いたメディウムとアフリカツメガエル卵母細胞中の各イオン (ion) 濃度から算出される K^+ 、 Na^+ および Cl^- の平衡電位はそれぞれ約-120 mV、+40 mVおよび-20 mVであった。従って本実験で観測したGABA応答の逆転電位は Cl^- の平衡電位とはほぼ一致した。ENXとFLBはGABA応答の逆転電位を変化させず、また両薬物によるGABA応答の相対的抑制率も保持電位に依存しなかった。

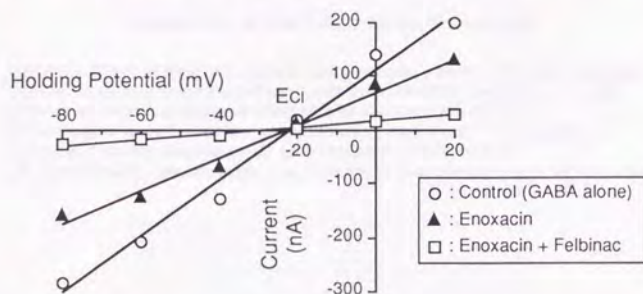


Fig. 13. Effect of 10 μM Enoxacin and 10 μM Felbinac on Current-Voltage Relation of GABA Response in *Xenopus* Oocytes Injected with Mouse-brain mRNA.

Fig. 14に10 μM FLBの共存・非共存下におけるNQs (CPFX, ENX, NFLXおよびOFLX)とBCLのGABA (10 μM) 応答に対する抑制作用の濃度作用曲線を示した。Panel AのFLB非共存下において、NQsとBCLはGABA応答を濃度依存的に抑制し、その抑制作用強度の順序はOFLX < ENX < CPFX < NFLX < BCLであった。FLBの共存により、NQsの濃度作用曲線は低濃度側にシフトし、その程度は薬物間で相違した。一方BCLの濃度作用曲線は変化しなかった (Panel B)。FLB共存下におけるこれら薬物の抑制作用強度の順序は、OFLX < CPFX < ENX = BCL < NFLXであった。Table IIにNQsの IC_{50} と10 μM FLBによる増強比を示した。NFLXの増強比は100を越える値であったがOFLXでは3であり、増強比は薬物間において大きく異なった。BCLに関しては、FLBの共存・非共存下における IC_{50} はそれぞれ $0.97 \pm 0.04 \mu\text{M}$ と $1.10 \pm 0.10 \mu\text{M}$ であり、10 μM FLBによる増強比は約1であった。

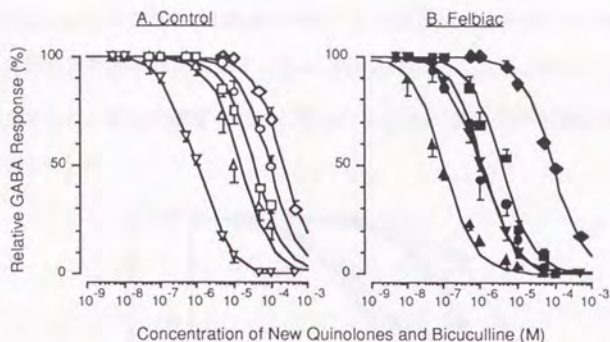


Fig. 14. Inhibitory Effect of New Quinolones and Bicuculline on 10 μ M GABA-induced Current Response in the Presence (panel B) or Absence (panel A) of 10 μ M Felbinac in *Xenopus* Oocytes Injected with Mouse-brain mRNA. GABA-induced current response was recorded by an ordinary voltage-clamp method at a holding potential of -60 mV in modified Brath's medium. \blacksquare : Ciprofloxacin, \circ ●: enoxacin, \triangle ▲: norfloxacin, \diamond ◆: ofloxacin, and ∇ ▽: bicuculline. ($n = 3$, mean \pm S.D.)

Table. II IC_{50} (M) and Potentiated Ratio of New Quinolones for GABA (10 μ M)-induced Current Response in the Presence or Absence of 10 μ M Felbinac.

| New Quinolone | Control ($\bullet 10^{-5}$) ($IC_{50,C}$) | Felbinac ($\bullet 10^{-7}$) ($IC_{50,F}$) | Potentiated Ratio ($IC_{50,C}/IC_{50,F}$) |
|---------------|--|---|--|
| Ciprofloxacin | 3.3 ± 1.0 | 17 ± 14 | 29 ± 12 |
| Enoxacin | 5.8 ± 0.7 | 6.4 ± 2.1 | 97 ± 20 |
| Norfloxacin | 1.7 ± 0.8 | 1.0 ± 0.1 | 165 ± 53 |
| Ofloxacin | 28.1 ± 7.1 | 873 ± 37 | 3.2 ± 0.9 |

All data were presented as mean \pm 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. Potentiated ratio was calculated by dividing IC_{50} in the absence of felbinac ($IC_{50,C}$) by that in the presence of felbinac ($IC_{50,F}$).

Fig. 15に1, 10および100 μM FLBの共存・非共存下におけるENXのGABA (10 μM) 応答に対する抑制作用の濃度作用曲線を、Table IIIにENXの IC_{50} と1, 10および100 μM FLBによる増強比を示した。FLBの濃度の増加に従って、ENXの濃度作用曲線は低濃度側にシフトし、 IC_{50} は減少した。

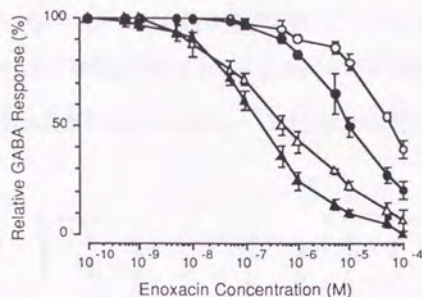


Fig. 15. Concentration-response Curve of Enoxacin for Inhibition of GABA (10 μM)-induced Current Response in the Absence or Presence of 1, 10 and 100 μM Felbinac in *Xenopus* Oocytes Injected with Mouse-brain mRNA.

○: Control (ENX in the absence of felbinac), ●: 1 μM felbinac, △: 10 μM felbinac, and ▲: 100 μM felbinac.

Table III IC_{50} (μM) of Enoxacin on GABA (10 μM)-induced Current and the Potentiation Ratio of Felbinac for Inhibitory Effect of Enoxacin on the GABA Response.¹

| Felbinac (μM) | IC_{50} of Enoxacin (μM) | Potentiation Ratio |
|----------------------------|--|--------------------|
| 1 | 12 ± 4 | 5.2 ± 1.1 |
| 10 | 0.64 ± 0.21 | 97 ± 20 |
| 100 | 0.22 ± 0.07 | 271 ± 46 |

1: All data were presented as mean \pm 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 felbinac was calculated by dividing IC_{50} of enoxacin in the absence of felbinac by that in the presence of felbinac.

GABA_A受容体結合に対するNQsの阻害作用とFLBによるその増強効果

Fig. 16にマウス脳単離細胞における10 μM FLBの共存・非共存下でのNQsの³H-ムシモール特異的結合の阻害に関する濃度作用曲線をそれぞれ示した。Panel AのFLB非共存下においては、NQsは弱いながらも³H-ムシモールの特異的結合を濃度依存的に阻害した。更にFLBの共存により、NQsの濃度作用曲線は低濃度側にシフトした (Panel B)。Table IVにNQsのIC₅₀と10 μM FLBによる増強比を示した。NQs間における相対的なIC₅₀および増強比共に前述のGABA_A受容体応答に対するそれらとほぼ同様の傾向が得られた。

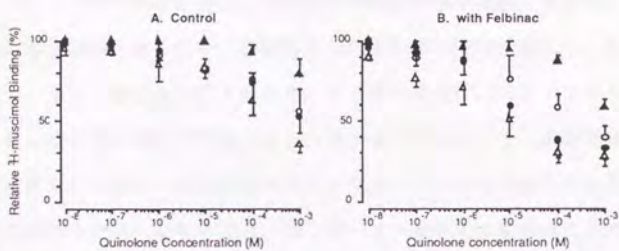


Fig. 16. Inhibitory Effect of New Quinolones on Specific Binding of ³H-muscimol to Dissociated Mouse-brain Cells in the Presence or Absence of 10 μM Felbinac. ○: Ciprofloxacin, ●: Enoxacin, △: Norfloxacin, and ▲: Ofloxacin. (n=3, mean±S.D.)

Table. IV IC₅₀ (M) and Potentiated Ratio of New Quinolones for Specific Binding of ³H-muscimol to Dissociated Brain Cell in the Presence or Absence of 10 μM Felbinac.

| New Quinolone | Control ($\cdot 10^{-4}$) (IC _{50,C}) | Felbinac ($\cdot 10^{-5}$) (IC _{50,F}) | Potentiated Ratio (IC _{50,C} /IC _{50,F}) |
|---------------|--|---|--|
| Ciprofloxacin | 7.2 ± 2.7 | 8.1 ± 2.8 | 9.0 ± 4.9 |
| Enoxacin | 8.7 ± 2.7 | 2.0 ± 0.8 | 44 ± 10 |
| Norfloxacin | 3.1 ± 2.1 | 0.51 ± 0.15 | 61 ± 15 |
| Ofloxacin | 25.9 ± 1.7 | 133 ± 19 | 1.9 ± 0.6 |

All data were presented as mean ± standard deviation of three experiments. Binding of ³H-muscimol to dissociated brain cell of mice was measured by centrifugal filtration method using a layer of a mixture of silicone oil and mineral oil (d = 1.017). Potentiated ratio was calculated by dividing IC₅₀ in the absence of felbinac (IC_{50,C}) by that in the presence of felbinac (IC_{50,F}).

考察

イソボログラムによる薬物間相互作用の記述

本研究においては、薬物間相互作用を記述する方法としてイソボログラムを使用した。複数の薬物における用量作用関係では、 x 軸に薬物Aを、 y 軸に薬物Bを、 z 軸に薬効を表示した場合、3次元的な用量作用曲面になるためにその記述が極めて複雑化するが、薬効(z 軸)を固定するイソボログラムでは xy 平面と平行な平面と用量作用曲面との交線であるため容易かつ明確に薬物間相互作用を表現することができる。しかしイソボログラムに関する以下のような短所も存在する。相互作用の発現機序が表現できない、すなわち作用部位における相互作用であるのか、各薬物での作用が単に同時発現しているだけであるのか分からない。そして薬効を固定するため、より弱い薬効におけるイソボログラムや最大効果が得られる投与量や濃度が推定できない等が挙げられる。また薬物間相互作用においては、酵素誘導などの様に一定の期間をかけて発現される生理的変化が条件となる場合、作用部位への親和性が高い薬物の場合、更には一方の薬物での前処理により惹起される場合などもあり、毒性学における暴露時間や暴露累積量などの概念の表現がイソボログラムでは困難である。

しかし、NQsとNSIADsによる痙攣誘発に関しては、NQ単独での定速注入による痙攣誘発が痙攣誘発時間(投与開始からの時間)ではなく脳組織中濃度に依存すること(Fig. 6, 8)、発現機序が受容体介在性でかつ可逆的阻害であること(Fig. 11)が本研究で明らかとなった。また、症例において単回投与の場合においても痙攣が発現すること、死亡した例はないこと、および動物実験において両薬物を投与する時間間隔をあけると相互作用は発現しないこと(山本ら, 1988)なども報告されている。従って、NQsとNSIADsとの相互作用による痙攣誘発に関しては、その作用部位である中枢神経系における両薬物の存在が必須であり、暴露時間および暴露量等の時間概念の導入は不要と考えられるため、イソボログラムを用いて両薬物の相互作用を記述した。

NQsと β -LCsの痙攣誘発性に対するFLBの効果

間代性痙攣の誘発性に関して、CEZあるいはIMP/CSとFLBとのED₅₀のイソボログラムは相加的から僅かな拮抗的相互作用を示したが、ENXとFLBとのED₅₀のイソボログラムは劇的な相乗的相互作用を示した (Fig. 5)。NQsと同様に、 β -LCsも副作用として中枢性痙攣を誘発し、その発現機序としてはGABA_A受容体結合の阻害作用が報告されている (Antoniadis et al., 1980; Hori et al., 1995)。本研究において、NQsのGABA応答抑制を増強したFLBは、その一方でGABA応答やそれに対するBCLの抑制作用は変化させなかったことから (Fig. 11, 14)、全てのGABA_A受容体に結合するアゴニストやアンタゴニストおよび薬物の親和性を増強させる作用を有してはいない。 β -LCsのGABA_A受容体結合の阻害作用もFLBによって増強されることはなく、そのために β -LCsとFLBとの併用投与は痙攣誘発に関して相乗的相互作用を示さなかったと考えられる。以上より、NSAIDsとの併用投与によるその痙攣誘発性の増強はNQsに関する特異的な現象であり、NQsをNSAIDsと併用投与した時には単独投与時と比較して極めて低い投与量で間代性痙攣が誘発された。

NQs単独での静脈内定速注入による痙攣誘発

NQs単独での静脈内定速注入後の痙攣誘発では、二段階の投与速度間において痙攣誘発時のC_pは異なったがC_{BR}は等しかった (Fig. 7, 8)。すなわち、C_pは痙攣発現の作用部位における濃度を直接反映していない一方で、C_{BR}は作用部位における濃度の直接的な指標になり得ることが分かった。更に二段階の投与速度間において痙攣誘発時間も異なった (Fig. 6)。これらの結果は、痙攣誘発性が薬物の投与を開始してからの時間ではなく作用部位での薬物濃度によって決定されることを示している。従ってこのNQsによる間代性痙攣の発現は、暴露量 (濃度×時間) ではなく濃度に依存した現象であることが分かった。

NQsの体内動態及び中枢移行性に対するNSAIDsの影響

本研究では、マウスにおけるCPFXあるいはENXとFLBとを併用して静脈内注入した後のNQsの C_p と C_{BR} に及ぼすFLBの影響を調べた (Fig. 9). その結果、NQsの C_p 推移はFLBの併用により僅かに高くなる傾向は見られたが有意には上昇しなかった. また、NQs静脈内投与の15-20 min後に最高値に達した C_{BR} 推移もFLBにより変化しなかった. 従ってNQsの体内動態 (血漿中濃度推移と中枢移行性) はFLBによって影響されず、NSAIDsによるNQsの痙攣誘発性の増強は薬物動態学 (pharmacokinetics) 的相互作用に基づいた作用部位でのNQs濃度の上昇によるものではないと考えられる.

ラットにおけるNQsの体内動態に及ぼすNSAIDsの影響に関しては、既にNaoraらによって検討されている (Ichikawa et al., 1992; Katagiri et al., 1989bc; Naora et al., 1991). 彼らの報告では、NQs (CPFX、NFLXあるいはOFLX) とFNBとを同時に静脈内投与した後のNQsの C_p は、NQsを単独で投与した場合と比較してやや高い傾向が見られた. 更にNQsの C_{BR} と脳脊髄液中濃度 (C_{CSF}) も最大で約2倍程度に上昇し、その理由としてはモデル解析に基づいて血液-脳間および血液-CSF間の膜透過クリアランスが増大するためとしている. しかし一方ではNQsの C_{BR} と C_{CSF} に対するFNB併用の効果は見られないとする他の研究者らの報告もある (山本ら, 1988). また、FNBは経口剤として開発されたプロドラッグ体 (pro-drug) であり、ヒトにおける常用量のFNBを連続して経口投与した後の C_p は、FLBが約10 $\mu\text{g/ml}$ に対してFNBでは約4 $\mu\text{g/ml}$ である (Chiccarelli et al., 1980b). Naoraらの報告では、ラットにおいてFNBを静脈内投与した後のFNBの C_p は約100 $\mu\text{g/m}$ に達している (Katagiri et al., 1989bc). 従ってNaoraらの報告は、実際には経口剤であるFNBを静脈内に直接注入したこと、および臨床レベルと比較して約25倍も高い濃度範囲において体内動態パラメータの変化を検討していること等の問題点がある. 更にラットにおけるNQs単独での静脈内投与後の C_{BR} と C_{CSF} に関して、Satoら (1988) はOFLXあるいはLFLXの C_{BR} と C_{CSF} は投与して約30 min後に最高値に達することを報告している. しかしNaoraら (1991) の報告ではCPFXの C_{BR} と C_{CSF} は既に投与後4 min以内に最高濃度に達している. 従って、Naoraらの報告では

得られている実験結果自体も他の研究者らの結果と相違している。以上の各理由から、本研究ではNQsの中枢移行性の解析にNaoraらの報告値を使用しなかった。我々の検討結果が同じCPFXを用いたNaoraら(1991)の結果と一致しなかった原因については、我々が併用したNSAIDsに活性代謝物であるFLBを使用したことおよびマウスを用いて検討したことによる薬物と動物種の相違によるためと推察される。

NQsとFLB併用での静脈内投与による痙攣誘発

既にNQs単独での静脈内投与において C_{BR} が痙攣誘発に関する作用部位中濃度の直接的な指標になり得ることが分かった。従って、NQsとFLBとをそれぞれ種々の投与量で静脈内投与した後における痙攣誘発を C_{BR} のイソログラムを用いて解析した。その結果痙攣発現群と非発現群との間には明確な閾値が存在した(Fig. 10)。この両薬物の C_{BR} に関する閾値は、間代性痙攣の発現時における両薬物の C_{BR} の組み合わせに相当する。従って、NQsとFLBとの併用投与による痙攣誘発性は、NQs単独での静脈内定速注入後の痙攣発現時における C_{BR} と同様に、この閾値 C_{BR} を用いて評価できることが分かった。更に作用部位中濃度である C_{BR} において相乗的相互作用が示されたことから、NQsとNSAIDsとの相互作用による中枢性痙攣の誘発は、薬物動力学(pharmacodynamics)的相互作用に基づくことが分かった。

従来の*in vivo*におけるNQsの痙攣誘発性は、小動物における各NQsの投与量を用いて評価されていた(Akahane et al., 1989; 平井ら, 1989; 山本ら, 1988)。しかし各NQsのバイオアベイラビリティ(bioavailability)・分布容積・消失クリアランス(clearance)・血漿中タンパク結合率などの体内動態パラメータ及び中枢移行率がNQs間だけでなく動物種間においても異なることが考えられる。従ってその評価においては、薬物動態学的な要素と薬物動力学的な要素が分離されておらず、各NQsの正確な痙攣誘発性は評価されていなかった。本研究において使用した間代性痙攣発現時の C_{BR} は、薬物動態学的な要素を含まず*in vivo*におけるNQsの痙攣誘発性を純粋に評価できる指標になり得ると考えられる。

NQsの脳室内定速注入による痙攣誘発

ENXの痙攣発現投与量は三段階の投与速度間において等しかった。またFLB前処理・未処理群共に生理食塩液を注入したマウスでは間代性痙攣は発現しなかった (Table I)。これらの結果より本方法で評価される痙攣誘発活性は注入薬液の容量に影響されないことが分かった。NQsを中枢神経系内に直接投与することにより末梢である静脈から投与した場合と同様の間代性痙攣が観察されたことから、NQsによる痙攣誘発は中枢神経系を介して作用を発現していることが分かった。更に静脈内投与による痙攣誘発の場合と同様に、FLBの前処理によって各NQsは極めて小さい投与量で間代性痙攣を発現した。以上の検討よりNQsの中枢神経系に対する直接的な痙攣誘発活性は、脳室内定速注入による痙攣発現投与量を用いて評価できることが分かった。

各種アゴニストの応答に対するENXとFLBの効果

マウス脳mRNAを注入したアフリカツメガエル卵母細胞を各種アゴニストの応答に対するENXとFLBの効果のスクリーニングに応用した。5-HT、Glu、KA、QAあるいはNMDAの応答と Mg^{2+} によるNMDA応答の遮断は、ENXとFLBにより変化しなかった (Fig. 11, Panel D-H)。アゴニスト非共存下においてもENXとFLBは応答を示さなかったことから、5-HT受容体やGlu受容体に対するENXとFLBの効果はないものと考えられる。Glu神経伝達に関してDoddら (1989) は、NQsは 3H -Glu、KAあるいは α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (QAと同じGlu受容体サブタイプに対するアゴニスト)の結合を変化させないことを報告した。彼らはまた、大脳皮質のホモジネートにおけるGluの非代謝型アナログ (analogue) であるD- 3H -aspartateの取り込み (uptake) もNQsに影響されないことを報告している。我々のGlu受容体に関する結果は彼らの知見と対応する内容であった。

今回我々はENXがGlyおよびAch応答を一部抑制することを見いだした (Fig. 11, Panel A, B)。このスクリーニングに用いたENXの濃度 (100 μ M) は臨床レベル (0.3-2 μ M) を大きく越えており、またこれらの抑制作用はFLBの共存によっても変化しなかった。In

*vivo*ではFLBはENXの痙攣誘発性を強く増強していることから、これらGlyおよびAch応答に対するENXの弱い抑制作用は痙攣誘発の主たる発現機序ではないと考えられる。しかしNQsは間代性・強直性痙攣以外にも多様な精神神経症状の副作用(頭痛、めまい、幻覚および振戦など)を発現する(Paton and Reeves, 1991)。中枢神経系におけるGlyあるいはAch神経伝達の一部の遮断がこれら副作用の原因の一つになっているかもしれない。

一方で、GABA (10 μ M) 応答はENX (100 μ M) により約50%に抑制され、更にFLB (10 μ M) の共存により完全に抑制された (Fig. 11, Panel C)。このGABA応答はBCLにより完全に拮抗された (Fig. 14)。またENXとFLBは、Nernstの式から算出されるCl⁻の平衡電位と一致するGABA応答の逆転電位を変化させなかった (Fig. 13)。これらの知見は、本研究において観測しているGABA誘発膜電流はGABA_A受容体Cl⁻チャンネル複合体を介したものであり、FLB共存・非共存下におけるENXのGABA応答に対する抑制作用は卵母細胞からのCl⁻流出の減少として記録されていることを表している。

GABA_A受容体応答に対するNQsの抑制作用とFLBによるその増強効果

本研究では、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におけるGABA応答に対するNQsとFLBとの相乗的相互作用による可逆的な抑制作用を観察した。FLB共存・非共存下においてNQsはGABA応答を濃度依存的に競合阻害様式で抑制し (Fig. 14)、NQsによる相対的抑制率は保持電位に依存しなかった (Fig. 13)。またFLBは、NQsの抑制作用を濃度依存的に増強したが (Fig. 15)、NQs非共存下ではGABA応答変化させなかった (Fig. 11)。更にNQsの抑制作用やFLBによる増強比は各NQs間において大きく異なった (Table II)。以上の知見は、既報の放射性標識化合物を用いた結合実験 (Tsuji et al., 1988a; Hori et al., 1989) やAkaikeら (1991) の結果と一致した。彼らは、ラット海馬CA1の単離錐体細胞を用いてNQsとNSAIDsとの相互作用を検討しており、NQsはFLBの共存下においてGABA応答に対し競合阻害様式で直接的に作用する一方で、ベンゾジアゼピン (benzodiazepine) 結合部位に対するインバースアゴニスト (inverse agonist) 様の作用はないことを報告した。したがって我々の知見とAkaikeら (1991) らの報告に基づいて、以下のよう

な作用機序が考えられる。すなわち、NQs分子がGABA_A受容体-Cl⁻チャネル複合体に作用し抑制性神経伝達物質であるGABAの受容体への結合を競合的かつ可逆的に阻害する、そしてFLBは何らかのアロステリック (allosteric) な機構を介してGABA_A受容体-Cl⁻チャネル複合体におけるこのNQsの阻害作用を増強するというものである。しかしFLBは、GABAの活性やBCLの拮抗薬としての活性を変化させなかった (Fig. 14)。この理由としては、NQsとGABAあるいはBCL間におけるGABA_A受容体に対する結合様式やFLBによる増強に対する感受性の相違に起因すると考えられる。

GABA_A受容体結合に対するNQsの阻害作用とFLBによるその増強効果

本研究ではマウス脳単離細胞を用いて³H-ムシモール特異的結合に対するNQsの阻害作用とFLBによるその増強効果について検討し、マウス脳mRNAを注入したアフリカツメガエル卵母細胞での受容体応答実験とほぼ同様の傾向が得られた (Table II, III)。そこでこれら両*in vitro*実験で得られたデータの比較を行った。Fig. 17は、マウス脳単離細胞における³H-ムシモールの特異的結合に対するNQsのIC₅₀とマウス脳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IC₅₀との関係である。両データ間において高い相関性が得られ ($r = 0.99$)、FLBの共存・非共存に関わらずNQsによるGABA_A受容体におけるアゴニスト結合の阻害がGABA応答の抑制に対する重要な過程であることが分かった。

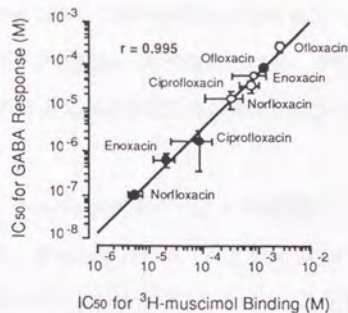


Fig. 17. Relationship between IC_{50} of New Quinolones for Specific Binding of 3H -muscimol to Dissociated Mouse-brain Cell and that for GABA Response in *Xenopus* Oocytes Injected with Mouse-brain mRNA in the Presence (●) or Absence (○) of Felbinac.

*In vitro*実験データと*in vivo*実験データとの相関性

*In vitro*でのGABA応答の抑制作用と*in vivo*での中枢神経系に対する直接的な痙攣誘発活性の比較を行い、NQsによる痙攣誘発の発現機序を解析した。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 IC_{50} とマウスにおけるNQsの脳室内注入後での痙攣発現投与量との関係をFig. 18に示した。

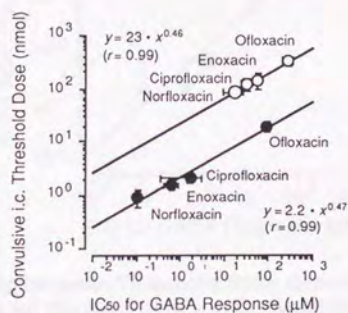


Fig. 18. Relationship between IC_{50} of New Quinolones for GABA ($10 \mu M$)-induced Current in the Presence or Absence of $10 \mu M$ Felbinac in *Xenopus* Oocytes Injected with Mouse-brain mRNA and Convulsive Intracerebral Threshold Dose of New Quinolones with or without Intraperitoneal Pretreatment of 100 mg/kg Felbinac before 30 min in Mice.
○: in the absence/without pretreatment of felbinac
●: in the presence/with pretreatment of felbinac.

FLB共存・非共存下それぞれにおいて高い相関性が得られた ($r = 0.99$)。この知見と先の Fig. 17で見られた結合阻害と応答抑制との相関に基づき、中枢神経系におけるNQsによるGABA_A受容体の結合阻害によるGABA神経伝達の抑制がNQsによる痙攣誘発の主たる発現機序であると考えられる。

更に *in vitro* 実験データと *in vivo* 実験データとの相関性に基づく *in vitro* から *in vivo* への予測性について考察した。 *In vitro* におけるマウス脳mRNAを注入したアフリカツメガエル卵母細胞でのGABA応答に対するNQsのIC₅₀と *in vivo* におけるマウスでのNQsによる痙攣発現時における脳組織中NQs濃度との関係をFig. 19に示した。両データ間において高い相関性が得られた ($r = 0.98$)。この知見より、 *in vivo* におけるNQsの痙攣誘発性は *in vitro* 実験におけるGABA応答に対する抑制作用から定量的に予測可能であることが示された。例えば新規に開発されたNQsの *in vitro* におけるGABA応答に対するIC₅₀が100 μMであれば、そのNQsの脳組織中濃度が約46 nmol/g以上において間代性痙攣が誘発されると推定できる。

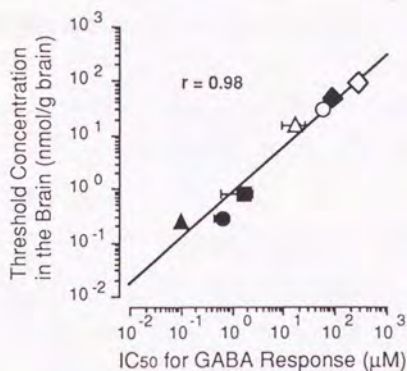


Fig. 19. Relationship between Threshold Brain Concentration of New Quinolones for the Occurrence of Convulsion in Mice and IC₅₀ for Inhibitory Effect of New Quinolones and Felbinac on GABA (10 μM) Response in *Xenopus* Oocytes Injected with Mouse-Brain mRNA. ▽: Ciprofloxacin, ○●: enoxacin, □■: norfloxacin, and ▲△: ofloxacin. Closed and open symbols represent in the presence and absence of felbinac, respectively. Felbinac concentration *in vitro* and *in vivo* were 10 μM and 71 nmol/g brain, respectively.

まとめ

本研究において、以下の結論が得られた。

- (1) NSAIDsとの併用投与による痙攣誘発性の増強は β -LCsには見られずNQsにおいて特異的な現象である。
- (2) NQsとNSAIDsとの相互作用による痙攣誘発は、薬物動態学的相互作用ではなく薬物動力学的相互作用であり、脳組織中における両薬剤の共存が痙攣発現と密接に関係する。
- (3) *In vivo*におけるNQsの痙攣誘発性は、暴露量ではなく濃度に依存的な現象であり、痙攣発現時の C_{BR} が作用部位における濃度直接的な指標となる。
- (4) NQsの中枢神経系に対する直接的な痙攣誘発活性は、脳室内定速注入による痙攣発現投与量を用いて評価できる。
- (5) NQsの痙攣誘発とFLBによるその増強の主たる発現機序は、中枢神経系におけるNQsのGABA_A受容体結合阻害によるGABA神経伝達の抑制とFLBによるその増強である。
- (6) *In vivo*におけるNQsの痙攣誘発性は*in vitro*実験におけるGABA応答に対する抑制作用から定量的に予測可能である。

引用文献

- K. Akahane, M. Sekiguchi, T. Une and Y. Osada: Structure-epileptogenicity relationship of quinolones with special reference to their interaction with γ -aminobutyric acid receptor sites. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **33**: 1704-1708 (1989).
- N. Akaike, T. Shirasaki and T. Yakushiji: Quinolones and fenbufen interact with GABA_A receptor in dissociated hippocampal cells of rat. *J. Neurophysiol.*, **66**: 497-504 (1991).
- J. F. Annerggers, J. D. Grabow, R. V. Groover, E. R. Laws, L. R. Elveback and L. T. Kurland: Seizures after head trauma: a population study. *Neurol.*, **30**: 683-689 (1980).
- A. Antoniadis, W. E. Muller and U. Wollert: Inhibition of GABA and benzodiazepine receptor binding by penicillins. *Neurosci. Lett.*, **18**: 309-312 (1980).
- A. Asanuma, T. Horikoshi, K. Yanagisawa, K. Anzai and S. Goto: The distribution of GABA and glycine response in the mouse brain using *Xenopus* oocytes. *Neurosci. Lett.*, **76**: 87-90 (1987).
- M. C. Berenbaum: Synergy, additivism and antagonism in immunosuppression. *Clin. Exp. Immunol.*, **28**: 1-18 (1977).
- G. Calandra, E. Lydick, J. Carrigan, L. Weiss and H. Guess: Factors predisposing to seizure in seriously ill infected patients receiving antibiotics: experience with imipenem/cilastatin. *Am. J. Med.*, **84**: 911-918 (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).
- P. Chomczynski and N. Sacchi: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162**: 156-159 (1987).
- M. L. Corrado, W. E. Struble, C. Peter, V. Hoagland and J. Sabbaj: Norfloxacin: review of safety studies. *Am. J. Med.*, **82** (Suppl.6B): 22-26 (1987).

- P. G. Davey: Overview of interactions with the quinolones. *J. Antimicrob. Chemother.*, **22** (Suppl. C): 97-107 (1988).
- W. J. Dixon: The up-and-down method for small samples. *J. Am. Stat. As.*, **60**: 967-978 (1965).
- W. J. Dixon and A. M. Mood: A method for obtaining and analyzing sensitivity data. *J. Am. Stat. As.*, **43**: 109-126 (1948).
- P. R. Dodd, L. P. Davies, W. E. J. Watson, B. Nielsen, J. A. Dyer, L. S. Wong and G. A. R. Johnston: Neurochemical studies on quinolone antibiotics: Effects on glutamate, GABA and adenosine systems in mammalian CNS. *Pharmacol. Toxicol.*, **64**: 404-411 (1989).
- J. D. Geiger, M. E. Johnston and V. Yago: Pharmacological characterization of rapidly accumulated adenosine by dissociated brain cells from adult rat. *J. Neurochem.*, **51**: 283-291 (1983).
- P. K. Gessner: A straightforward method for the study of drug interactions: an isobolographic analysis primer. *J. Am. Coll. Toxicol.*, **7**: 987-1012 (1988).
- C. B. Gundersen, R. Mileli and I. Parker: Messenger RNA from human brain induces drug- and voltage-operated channels in *Xenopus* oocytes. *Nature*, **308**: 421-424 (1984a).
- C. B. Gundersen, R. Mileli, F.R.S. and I. Parker: Properties of human glycine receptor expressed in *Xenopus* oocytes. *Proc. R. Soc. Lond.*, **B 221**: 235-244 (1984b).
- S. Hori, J. Shimada, A. Saito, M. Matsuda and T. Miyahara: Comparison of the inhibitory effects of new quinolones on γ -aminobutyric acid receptor binding in the presence of antiinflammatory drugs. *Rev. Infect. Dis.*, **11** (Suppl.5): S1397-S1398 (1989).
- S. Hori, S. Kurioka, M. Matsuda and J. Shimada: Inhibitory effect of cephalosporins on γ -aminobutyric acid receptor binding in rat synaptic membranes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **27**: 650-651 (1985).
- T. Horikoshi, A. Asanuma, K. Yanagisawa, K. Anzai and S. Goto: Taurine and β -alanine act on both GABA and glycine receptors in *Xenopus* oocyte injected with mouse messenger RNA. *Mol. Brain Res.*, **4**: 97-105 (1988).
- N. Ichikawa, K. Naora, M. Hayashibara, Y. Katagiri and K. Iwamoto: Effect of fenbufen on the entry of new quinolones, norfloxacin and ofloxacin, into the central nervous system in rats. *J.*

- Pharm. Pharmacol.*, **44**: 915-920 (1992).
- H. L. A. Janssen, L. Berk, M. Vermeulen and S. W. Schalm: Seizures associated with low-dose α -interferon. *Lancet*, **2**: 1580 (1990).
- Y. Katagiri, K. Naora, N. Ichikawa, M. Hayashibara and K. Iwamoto: Simultaneous determination of ofloxacin, fenbufen and felbinac in rat plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **431**: 135-142 (1988).
- Y. Katagiri, K. Naora, N. Ichikawa, M. Hayashibara and K. Iwamoto: High-performance liquid chromatographic procedure for the simultaneous determination of norfloxacin, fenbufen and felbinac in rat plasma. *Chem. Pharm. Bull.*, **37**: 2858-2860 (1989a).
- Y. Katagiri, N. Ichikawa, K. Naora, M. Hayashibara and K. Iwamoto: A minor possibility of pharmacokinetic interaction between norfloxacin and fenbufen in rats (英文). *病院薬学*, **37**: 427-436 (1989b).
- Y. Katagiri, K. Naora, N. Ichikawa, M. Hayashibara and K. Iwamoto: Absence of pharmacokinetic interaction between ofloxacin and fenbufen in rats. *J. Pharm. Pharmacol.*, **41**: 717-719 (1989c).
- J. Kawakami, M. Shimokawa, K. Yamamoto, Y. Sawada, A. Asanuma, K. Yanagisawa and T. Iga: Inhibition of GABA_A 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).
- I. Kissin, P. T. Brown, E. L. Bradley, Jr., A. Robinson and J. L. Cassady: Diazepam-morphine hypnotic synergism in rats. *Anesthesiol.*, **70**: 689-694 (1989).
- J. T. Litchfield Jr. and F. Wilcoxon: A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **96**: 99-113 (1949).
- M. Mishina, T. Tobimatsu, K. Imoto, K. Tanaka, Y. Fujita, K. Fukuda, M. Kurasaki, H. Takahashi, Y. Morimoto, T. Hirose, S. Inayama, T. Takahashi, M. Kuno and S. Numa: Location of functional regions of acetylcholine receptor α -subunit by site-directed mutagenesis. *Nature*, **313**: 364-369 (1985).

- D. G. Montemurro and R. H. Dukelow: A stereotaxic atlas of the diencephalon and related structures of the mouse, Futura, Mount Kisco, N.Y., 1972.
- R. Nakamura, T. Yamaguchi, Y. Sekine and M. Hashimoto: Determination of a new antibacterial agent (AT-2266) and its metabolites in plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **278**: 321-328 (1983).
- K. Naora, Y. Katagiri, N. Ichikawa, M. Hayashibara and K. Iwamoto: Enhanced entry of ciprofloxacin into the rat central nervous system induced by fenbufen. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **258**: 1033-1037 (1991).
- S. R. Norrby: Problems in evaluation of adverse reactions to β -lactam antibiotics. *Rev. Infect. Dis.*, **8** (Suppl.3): S358-S370 (1986).
- J. H. Paton and D. S. Reeves: Clinical features and management of adverse effects of quinolone antibacterials. *Drug Safety*, **6**: 8-27 (1991).
- C. Reiter, M. Pfeiffer and R. H. Hullman: Brief report: safety of ciprofloxacin based on phase IV studies ("Anwendungsbeobachtung") in the Federal Republic of Germany. *Am. J. Med.*, **87** (Suppl.5A): 103S-106S (1989).
- 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).
- J. J. Schentag: Cimetidine-associated mental confusion: Further studies in 36 severely ill patients. *Ther. Drug Monit.*, **2**: 133-142 (1980).
- M. Shimokawa, K. Yamamoto, J. Kawakami, Y. Sawada and T. Iga.: Effect of renal or hepatic dysfunction on neurotoxic convulsion induced by ranitidine in mice. *Pharm. Res.*, **11**: 1519-1523 (1994).
- N. T. Smith: Use of Isobolograms in Anesthesia. *Anesth. Analg.*, **45**: 467-473 (1966).
- S. R. Snavey and G. R. Hodges: The neurotoxicity of antibacterial agents. *Ann. Intern. Med.*, **101**: 92-104 (1984).
- K. G. Steppuhn and L. Turski: Modulation of the seizure threshold for excitatory amino acids in mice by antiepileptic drugs and chemoconvulsants. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **265**: 1063-1070

(1933).

- G. F. Tomaselli, E. Marban and G. Yellen: 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).
- W. D. Wessinger: Modeling multiple agent interaction in behavioral pharmacology. *J. Am. Coll. Toxicol.*, **7**: 953-962 (1988).
- G. Zaccara, G. C. Muscas and A. Messori: Clinical features, pathogenesis and management of drug-induced seizures. *Drug Safty*, **5**: 109-151 (1990).
- 川上純一, 澤田康文, 木原英子, 中村幸一, 山田安彦, 櫻井和子, 清野敏一, 内野克善, 伊賀立二: ニューキノロン剤吸収に対する金属カチオン含有の制酸剤・消化性潰瘍用剤による時間依存的阻害と服薬のための設計, *病院薬学*, **18**: 1-21 (1992).
- 竹尾剛, 渋谷統寿, 本村政勝, 金沢一, 宍戸春美: ニューキノロン系抗菌剤による痙攣の発症, 症例報告と痙攣発症の実験的研究, *日本化学療法学会雑誌 (Chemotherapy)*, **37**: 1154-1159 (1989).
- 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).
- 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, 井上讓, 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の中樞作用を中心に, *日本化学療法学会雑誌 (Chemotherapy)*, **36** (suppl. 2): 300-324 (1988).

第2章

ヒトにおけるニューキノロン系抗菌剤の痙攣誘発性の予測

第2章

2-1

ヒトにおけるニューキノロン系抗菌剤の中枢移行性の予測

要約

ニューキノロン系抗菌剤 (NQs) であるオフロキサシン (OFLX) のヒトにおける脳脊髄液 (CSF) 移行性を各種動物における生理学的特性値とNQsの体内動態パラメータ (parameter) に基づいて予測することを試みた。始めに、薬物のCSF移行性を評価するために必要な生理学的特性値であるCSF容積、CSF産生・消失速度そして脈絡叢重量をラット、ウサギ、ネコ、イヌおよびヒトにおいて比較した。各動物におけるこれら特性値と脳重量との両対数プロットにおける直線回帰から、冪値 ($Y=A \cdot X^B$ のB値) が約0.85-0.88の相関性 ($r=0.97$) が得られた。次にOFLXのCSF移行性をCSFから血液への一方向性の汲み出し (エフラックス; efflux) 過程を組み込んだ "Diffusion and flow model" を用いて解析した。ヒトにおけるOFLXの血液-CSF間の膜透過クリアランス (clearance) とエフラックスクリアランスは、ラット、ウサギおよびイヌにおけるこれらのパラメータと脳組織重量とのアロメトリック (allometric) な相関関係に基づいて動物データから外挿した。またヒトにおけるNQsの分布容積と全身クリアランスは、体重との相関を用いる従来の Adolph-Dedrick 法に基づいて動物データから予測が可能であった。ヒトのCSF検体は腰椎穿刺によって採取されるため、これらの予測されたパラメータを用いてヒトにおけるOFLXのCSF中濃度推移を記述するためには、腰椎内CSFと脳室内CSFの両コンパートメント (compartment) を考慮する必要がある。動物実験データだけから予測されたヒトにおける予測血漿・CSF中OFLX濃度推移は、臨床におけるそれらの実測値と良好な対応が得られた。

緒言

薬物の分布、代謝および排泄の動物種差に関しては既に数多くの報告がある(1-10)。Adolphは、各種動物における体重と腎臓に関する特性値(臓器重量、ネフロン(nephron)数および尿素・イヌリン(inulin)・*p*-アミノ馬尿酸(*p*-aminohippurate)・クレアチニン(creatinine)の腎クリアランス)とを両対数プロットした場合、極めて高い相関性があることを示した(1)。同様の関係が体重と1- β -D-アラビノ-フラノシルシトシン(1- β -D-arabino-furanosylcytosine)やメトトレキサート(methotrexate; MTX)の腎クリアランスとの間にあることをDedrickらは報告した(2)。更にDedrickらは、各種動物におけるMTXの静脈あるいは腹腔内投与後の血漿中濃度推移が、縦座標は血漿中濃度を体重当たりの投与量で標準化し横座標は体重1/4乗当たりの時間に標準化して再プロットした場合、ほぼ一本の曲線として記述できることを示した(3,4)。Boxenbaumはヒトにおけるアンチピリン(antipyrine)、フェニトイン(phenytoin)及びクロナゼパム(clonazepam)など幾つかの薬物に関する肝重量当たりの代謝固有クリアランスが他の動物種よりも低い現象について、Maximum Lifespan Potential (MLP)の概念を用いて明かにした(5)。更に彼は、イヌとヒトとにおける12種のベンゾジアゼピン誘導体(benzodiazepines)の体内動態パラメータを比較し、近縁薬物誘導体間においては1種の動物におけるデータからヒトにおけるパラメータを外挿できることを示した(6)。そしてSawadaらは、Adolph-Dedrick法による6種の β -ラクタム系抗生物質の体内動態パラメータや体重当たりのthe unbound volume of distribution of tissues (V_T/f_u)を用いた10種の弱塩基性薬物の V_d に関する種々の動物からヒトへの予測(7,8)、Boxenbaum法による6種の β -ラクタム系抗生物質に関する体内動態パラメータのサルからヒトへの外挿(7)、そして多種の弱酸性・弱塩基性薬物のパラメータに関するBoxenbaum法や生理学的モデルによるラットからヒトへのスケールアップなど多くの成功を取っている(9,10)。

臨床においては、向精神薬や化学療法剤などの、脳内の標的部位へ直接作用し薬効薬理あるいは毒性作用などを惹起させる多くの薬物が使用されており、ヒトにおける薬物の中枢移行性の評価が重要な課題となっている。Dedrickらは薬物の中枢移行性を動態学

的に解析するために有用な各種のモデル (例えば lumped compartment model や distributed model など) を設計して、静脈内あるいは局所 (頸動脈内・脊髄内) 投与後の脳・CSF 中濃度推移を記述した (11,12)。しかし血液と尿とは異なり、薬物の中枢移行性を動態学的に解析するために必要な脳組織や CSF 検体のヒトからの経時的な採取は倫理的・現実的に厳しく制限されている。従って、薬物の中枢移行性に関する動物種差を取り扱った報告は少ない。

1980年にナリジクス酸 (nolidixic acid) をプロトタイプ (prototype) としてノルフロキサシン (norfloxacin; NFLX) が開発された後、エノキサシン (enoxacin; ENX)、シプロフロキサシン (ciprofloxacin; CPFX) およびオフロキサシン (ofloxacin; OFLX) など多くのニューキノロン系抗菌剤 (NQs) が合成され臨床において使用されている (13-16)。今日、NQs は尿路感染症や呼吸器感染症などをはじめとする各種感染症の治療に繁用されている (17,18)。NQs による副作用としては、1-2% の患者において幻覚、頭痛、めまいおよび不安などを含む精神神経症状が生じている (19)。更に、NQs と非ステロイド性抗炎症剤 (NSAIDs) との相互作用による痙攣も報告されている (20-22)。Sato らはラットにおける NQs の中枢神経系 (central nervous system; CNS) への移行性について検討しており、NQs は血液脳関門を透過して脳組織中の細胞外間隙に移行すること、そして血液-CNS 間の透過クリアランス (clearance) は各脳部位や脳脊髄液 (cerebrospinal fluid; CSF) において大きな相違はないことを報告した (23)。しかし、ヒトにおける NQs の中枢移行性を動物実験における結果から予測することは未だ報告されていない。

本研究では、各種動物における解剖・生理学的特性値と NQs の体内動態パラメータに関する文献検索を行った。これらのデータに基づき、ヒトにおける OFLX の CSF 移行性の予測を試みた。更に、予測されたヒトにおける OFLX の血漿および CSF 中濃度推移と臨床におけるそれらの実測値との比較から、本研究における薬物の中枢移行性に関する予測方法を評価した。

方法

データ収集

本研究において使用した総てのデータ、すなわち各種動物における解剖・生理学特性値である体重、脳重量、CSF容積 (V_{CSF})、CSF産生・消失速度 (bulk flow rate; Q_{CSF})、脈絡叢重量 (W_{CP})、見かけの腰椎内CSF容積 (V_{LUM}) および脳室-腰椎間のCSF移行速度 (Q_{VL}) と、 NQ_s の体内動態パラメータである血漿中濃度 (C)、CSF中濃度 (C_{CSF})、血漿中非結合形分率 (fu)、見かけの分布容積 (V)、全身クリアランス (CL_p) および消失半減期 ($t_{1/2}$) は既報の文献値を引用した。主に C と C_{CSF} は *Antimicrob. Agents Chemother.*、*Infection*、*J. Antimicrob. Chemother.* および *Rev. Infect. Dis.* から、 fu 、 V および CL_p は *Chemotherapy* (Tokyo) から、そして V_{CSF} 、 Q_{CSF} および W_{CP} は *Am. J. Physiol.* と *J. Pharmacol. Exp. Ther.* から検索した。体内動態パラメータが原著者によって報告されていない場合は、次の "体内動態解析" に記述した方法に従って算出した。各 NQ_s の C_{CSF} 推移は次の各番号の文献から引用した； CFX: 24-29; ENX: 28-30; フレロキサシン (fleroxacin; FLRX): 28, 29, 31; ロメフロキサシン (lomefloxacin; LFLX): 23; NFLX: 24, 28, 29, 31; OFLX: 23, 27-29, 32, 33; ペフロキサシン (pefloxacin; PFLX): 27, 34-36; スパルフロキサシン (sparfloxacin; SPFX): 29。被検者が髄膜炎・脳室炎などの中枢性感染症患者を対象とした報告は本研究の解析から除外した、その理由としては、一般に薬物の中枢移行率 (C_{CSF}/C ratio) は中枢性感染により健常な状態と比較して変化するためである。

体内動態解析

血漿中薬物濃度推移 (45)

C_p 推移は、静脈内投与 (瞬時注入) の場合には2-コンパートメントモデル (two-

compartment model) に、静脈内定速注入の場合には1-コンパートメントモデル (one-compartment model) に、そして筋肉内あるいは経口投与の場合には一次速度の吸収過程とラグタイム (lag time) を伴った1-コンパートメントモデルに、非線型最小二乗法によりフィッティング (fitting) した (37,38). $t_{1/2}$ は $\ln 2$ を消失速度定数 (k_{el}) もしくは β で除して算出した。血漿中濃度-時間曲線下面積 (AUC) は、Cを対数表示した際の消失相の傾きを時間 $= \infty$ にまで外挿した台形法により求めた。CL_pは投与量をAUCで除して算出した。VはCL_pを k_{el} で除して算出した。

C_{CSF}推移のシミュレーション (simulation)

C_{CSF}推移は、CSFから血液への一方向性の汲み出し (エフラックス; efflux) 過程を組み込んだKarolの "diffusion and flow model" を用いて解析した (39,40). その際に次の仮定を設定した: (A) 脳毛細血管の通過による薬物の抽出率は極めて小さいため、C推移はC_{CSF}推移に依存しない、(B) 非結合形薬物だけが毛細血管壁を透過でき、その透過は線型な過程である、(C). CSF中で薬物の化学的変化および代謝は生じない。CSF中の薬物量は次式で記述される。

$$V_{CSF} \cdot \frac{dC_{CSF}}{dt} = PS \cdot (f_u \cdot C - f_{u_{CSF}} \cdot C_{CSF}) + Q_{CSF} \cdot (f_u \cdot C - f_{u_{CSF}} \cdot C_{CSF}) - CL_{eff} \cdot C_{CSF} \quad (1)$$

ここでPS、 $f_{u_{CSF}}$ およびCL_{eff}はそれぞれ血液-CSF間の膜透過クリアランス (clearance)、CSF中非結合形分率およびCSFから血液への一方向性のエフラックス-クリアランスを表す。 $f_{u_{CSF}}$ の値は1に固定した。

ヒトにおけるCSFのモデル化

動物実験においては、CSFは大槽穿刺法あるいは脳室-大槽還流法などにより採取されている。しかしヒトでの試験においては、例えばドレナージを必要とする水頭症患者におけるドレナージ (drainage) や脳腫瘍患者における開頭術時などの特別な場合を除き、

CSFを脳室内から直接得ることは通常不可能である。従って実際には、ヒトのCSFは腰椎穿刺によって採取されている。

Blasbergらは、髄膜白血病あるいは髄膜癌腫症患者におけるMTXの脳室内単回投与後における脳室内CSF (C_{VEN}) および腰椎内CSF (C_{LUM}) 推移の解析を報告した(41,42)。MTXを投与して初めの数時間においては C_{LUM} は上昇する一方で C_{VEN} は急速に減少し、投与4-6時間後に C_{LUM} と C_{VEN} が逆転し、その後 C_{LUM} は C_{VEN} の4-5倍の値になった。彼らは、 C_{LUM} および C_{VEN} 推移をCSFを幾つかのコンパートメントに分けたモデルを用いて解析し、 V_{LUM} および Q_{VL} を算出した。彼らは更に、脳室内CSFは大槽内CSFと本質的に平衡であり、両CSF共に一つのコンパートメントとして取り扱えることも報告した。本研究では、ヒトにおける C_{CSF} としては、彼らのモデルを一部変更したモデルと Q_{VL} および V_{LUM} の各パラメータ値を用いて (Fig. 1)、 C_{VEN} および C_{LUM} 推移の両方を算出した。 C_{LUM} は次式で記述される。

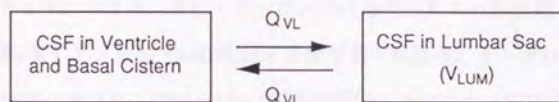


Fig. 1. Compartment Model for Analysis of the Drug Delivery into Human CSF. V_{LUM} (25 ml) and k_{LUM} (0.035 ml/min) are the apparent CSF volume of the lumbar sac and the flow constant from the ventricle and the basal cistern to the lumbar sac, respectively (41).

$$V_{LUM} \cdot \frac{dC_{LUM}}{dt} = Q_{VL} \cdot (C_{VEN} - C_{LUM}) \quad (2)$$

アニマルスケールアップ (Animal scale-up)

V_{CSF} 、 Q_{CSF} および W_{CP} に関する動物種差

ラット、ウサギ、ネコ、イヌおよびヒトにおける V_{CSF} 、 Q_{CSF} and W_{CP} は次の二つの方法に従って評価した：“Method I”では各動物の体重とこれらの値を両対数プロットし、“Method II”では各動物の脳重量とこれらの値を両対数プロットした。対数値の直線回帰は次に示す冪乗の式に従い、最小二乗法によりAとBの値を算出した。

$$y = A \cdot x^B \quad (3)$$

ここでyは縦座標でありxは横座標である。

ヒトにおけるOFLXの C_{CSF} 推移の予測

ヒトにおけるOFLXのPSと CL_{eff} は、ラット (23)、ウサギ (27) およびビーグル犬 (O. Nagata et al., unpublished data, 1989) におけるこれらのパラメータからMethod IとMethod IIに従って外挿した。ラット、ウサギ、そしてビーグル犬の各検討における使用した動物数、1匹当たりのデータポイント (data point) 数および投与量と経路は、それぞれ4-7、6および20 mg/kgの静脈内投与、6、5および30 mg/kgの筋肉内投与、そして4、8および5 mg/kgの静脈内投与であった。 C_{CSF} はHPLC法により測定された。ヒトにおける両 C_{VEN} と C_{LUM} の推移は推定したPSと CL_{eff} から算出し、患者における C_{CSF} ($C_{LUM,PTS}$) の実測値と比較した (32)。この $C_{LUM,PTS}$ のデータは腰椎穿刺を必要とした非感染症の患者におけるOFLX 200 mgを30 minかけて定速注入した後の結果であり、HPLC法とバイオアッセイ (bioassay) 法により測定された。そしてヒトにおけるOFLXのC推移は実測値へのフィテティングにより得られた体内動態パラメータから算出し、 C_{CSF} 推移の推定時における入力関数とした (前述の仮定 (A) による)。Method IとMethod IIによる予測された C_{LUM} 推移は、実測値である $C_{LUM,PTS}$ とのRMSE (residual mean square error) によって評価した。

C_{LUM} 推移の各種パラメータに対するセンシティブリティのシミュレーション解析

Method IIにより予測されたヒトにおける C_{LUM} 推移関数の各種パラメータに対するセンシティブリティ (sensitivity) のシミュレーション解析を行った。PS、 CL_{eff} 、 Q_{VL} および V_{LUM} をそれぞれ二倍($\times 2$)あるいは半分($\times 1/2$)の値に変えてシミュレーションした場合における C_{LUM} 推移の変動を検討した。PSと CL_{eff} は C_{LUM} 推移関数のパラメータであり、 Q_{VL} と V_{LUM} はMTXの検討における報告値である(41,42)。シミュレーションされた C_{LUM} 推移は、実測値である $C_{LUM,PTS}$ とのRMSEによって評価した。

ヒトにおけるCおよび C_{CSF} 推移の完全予測

ヒトにおけるCおよび C_{CSF} の両方の推移を予測するために、ヒトにおける薬物のCSF移行性の予測と同時に、ヒトにおけるC推移の動物データからの予測を行った。初めに、ヒトにおけるVと CL_p を推定するためにAdolph-Dedrick法(Method I)に従って各種動物における体重と NQ_s のVあるいは CL_p との関係について検討した。次に、ヒトにおけるPSと CL_{eff} を動物におけるそれらパラメータの値からMethod IIによって外挿した。そして、ヒトにおけるCと C_{LUM} の両方の推移をヒトに外挿したパラメータ(PS、 CL_{eff} 、Vおよび CL_p)を用いて予測した。最後に、これらの予測した曲線を患者におけるCあるいは C_{CSF} の実測値と比較した。

結果・考察

V_{CSF} , Q_{CSF} および W_{CP} の動物種差

Table I には V_{CSF} , Q_{CSF} , W_{CP} および (3) 式の冪乗値である B と、Method I と Method II による V_{CSF} , Q_{CSF} および W_{CP} における相関係数 (r) を表示した。Fig. 2 には脳重量と V_{CSF} , Q_{CSF} および W_{CP} との関係 (Method II) を両対数表示によって図示した。

Table I. Anatomical and Physiological Properties of CSF in Various Species.

| Species | Body Weight (kg) | Brain Weight (g) | V_{CSF} (ml) | Q_{CSF} (ml/min) | W_{CP} (mg) | Ref. No. |
|--------------|---------------------|---------------------|-------------------|-----------------------|------------------|--------------|
| Rat | 0.25 | 1.88 | 0.2 | 0.0022 | 4 | 3, 23, 43-45 |
| Rabbit | 2.55 | 9.97 | 1.83 | 0.008 | 23.4 | 3, 46, 47 |
| Cat | 2.71 | 24.6 | 2.84 | 0.017 | 40.0 | 3, 47-50 |
| Dog | 14.2 | 75.4 | 15.7 | 0.05 | 80.0 | 3, 44, 50-54 |
| Human | 70.0 | 1,530 | 65.0 | 0.5 | 1,800 | 3, 40, 55 |
| Method I: B | | | 1.04 | 0.949 | 1.02 | |
| r | | | 0.997 | 0.977 | 0.966 | |
| Method II: B | | | 0.853 | 0.817 | 0.889 | |
| r | | | 0.973 | 0.999 | 0.995 | |

V_{CSF} , Q_{CSF} and W_{CP} represent CSF volume, bulk flow rate and choroid plexus weight, respectively. B and r are power value of the formula; $y = A \cdot x^B$ and coefficient of correlation, respectively.

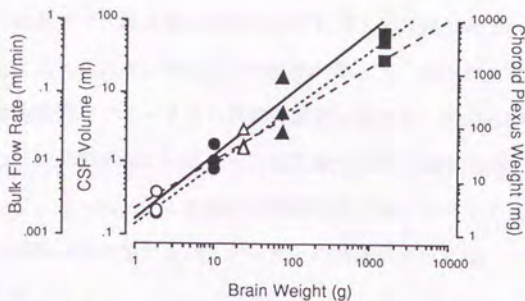


Fig. 2. Relationship between brain weight and volume of CSF (solid line), bulk flow rate (dotted line) and choroid plexus weight (broken line) in various species.

○: rat, ●: rabbit, △: cat, ▲: dog, and ■: human.

体重あるいは脳重量と V_{CSF} 、 Q_{CSF} および W_{CP} との間には、Method I と Method II とともに $r > 0.96$ の有意な相関関係が観測された。しかし W_{CP} に関する Method I による B が 1 を越えており、ヒトにおいては体重当たりの W_{CP} が他の動物種におけるそれよりも大きいことが示された。Dedrick らは各種動物における体重と脳重量との関係について報告した (11, 12)。体重と脳重量とを両対数プロットした場合、霊長類以外の哺乳類において B が 0.72 の相関関係がある。この関係と比較して、ヒト以外の霊長類においては B は変わらないもののその脳重量は 3-4 倍大きい。更にヒトの脳重量は、ほぼ同じ体重の巨大類人類よりも約 3 倍、霊長類以外の哺乳類よりも約 10 倍大きい。したがって脳重量/体重比に関しては大きな動物種差があり、例えばウサギにおいては 0.39% であるのに対してヒトにおいては 2.2% である (5)。一方 Method II による B は、 V_{CSF} 、 Q_{CSF} および W_{CP} の全てにおいて 0.82-0.89 の値であった。この関係は、体重と腎臓の特性値との関係と類似している。腎臓においては、各種動物における臓器重量、ネフロン数、尿量、糸球体容積および尿素・イヌリン・*p*-アミノ馬尿酸・クレアチニンのクリアランスが体重との間に有意な冪乗の関係があり、その冪乗値は 0.7-0.9 である (1, 4)。一方で脈絡叢は CSF を産生し、内因性物質や薬物を CSF から血液に分泌している。脈絡叢の CNS における分泌臓器としての機能は、全身系における排泄臓器である腎臓の機能と対応している。

これらの知見より、脈絡叢の機能の評価に関してはMethod IよりもMethod IIの方がより適切であると考えられる。既に各種の薬物に関して、ヒトにおける体内動態パラメータが、体重と体内動態パラメータとの冪乗の関係に基づき、Adolph-Dedrick法によって予測可能であることが報告されている。一方脳重量/体重比は動物種間において大きく相違する。したがって、ヒトにおける薬物の中枢移行性に関するパラメータは、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冪乗の関係に基づいて、外挿するべきであると考えられる。

ヒトにおけるOFLXの C_{CSF} 推移の予測

薬物のCSF移行性に関するモデル化の妥当性を検討するために、各種動物におけるNQsの C_{CSF}/C 比推移と偽定常状態における $fu \cdot C (=C_u)$ と C_{CSF} との関係を図示した (Fig. 3-1, 2)。偽定常状態には各NQs投与して1-6時間後に達した (Fig. 3-1)。偽定常状態においても C_{CSF} が C_u よりも低いため (Fig. 3-2)、なんらかの輸送機構を介するCSFから血液への一方向性のNQsのエフラックス過程が示唆された。各NQsの C_{CSF}/C 比に関する動物種差については以下の様になった。CPFXではウサギ: 6-8% (27), ヒト: 10-14% (24, 25, 26, 28, 29)、FLRXではラット: 25% (31), イヌとヒト: 50% (28, 29, 31)、LFLXではラット: 10-20% (23), イヌ: 30% (O. Nagata et al., unpublished data, 1989)、OFLXではラットとウサギ: 10-20% (23, 27), イヌとヒト: 30-50% (28, 29, 32, 33, O. Nagata et al., unpublished data, 1989)であった。これらの結果はNQsのCSFからのエフラックスは脳重量の増加に伴って小さくなることを示しており、すなわち脳重量と中枢移行性に関する各種パラメータとの間には冪乗値が1未満となる冪乗の相関関係が成立することを示唆している。

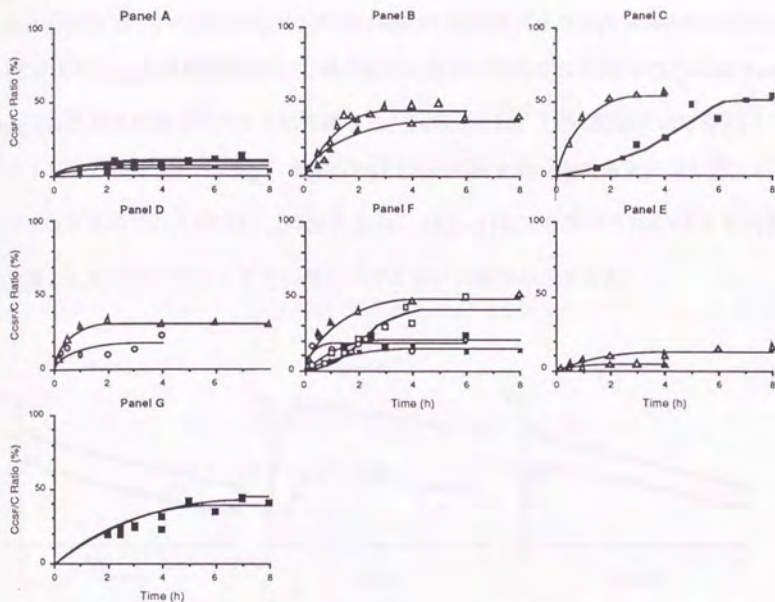


Fig. 3-1. CSF Concentration/Plasma Concentration Ratio (C_{CSF}/C)-time Profile of New Quinolones in Various Species.

Panel A: ciprofloxacin, panel B: enoxacin, panel C: fleroxacin, panel D: lomefloxacin, panel E: norfloxacin, panel F: ofloxacin, and panel G: sparfloxacin.

Circle: rat (n=3-7), cross: rabbit (n=6; intramuscular administration), triangle: dog (n=3-4), and square: human (individual data).

Opensymbol: intravenous administration, and closed symbol: oral administration.

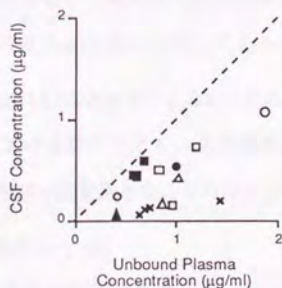


Fig. 3-2. Relationship between Unbound Plasma Concentration and CSF Concentration of New Quinolones in Various Species.

X: Ciprofloxacin, O: enoxacin, ●: fleroxacin, Δ: lomefloxacin, ▲: norfloxacin, □: ofloxacin, and ■: sparfloxacin.

Fig. 4には、ラット (Panel A)、ウサギ (Panel B) およびビーグル犬 (Panel C) における OFLX の C および C_{CSF} 推移を图示した。3種の動物において算出された PS と CL_{eff} は Method I と Method II の両方法に基づいてヒトに外挿した。Table II には、3種の動物における PS と CL_{eff} 、ヒトにおける予測 PS と CL_{eff} 、および PS と CL_{eff} に関する r と B の値を表示した。Method II により算出された PS と CL_{eff} に関する r は、Method I により算出された r よりも大きく、脳重量とこれらのパラメータとの間における高い相関性が示された。

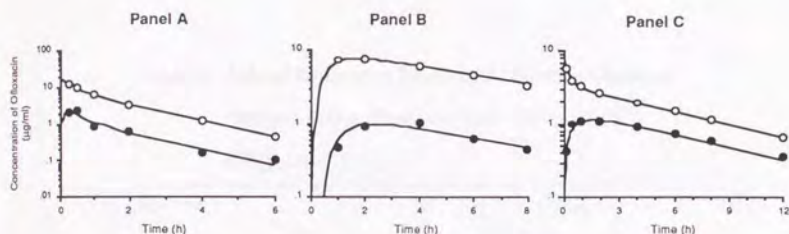


Fig. 4. Plasma (○) and CSF (●) Concentration-time Profiles of Ofloxacin in the Rat (Panel A), Rabbit (Panel B) and Dog (Panel C). Panel A: intravenous administration at a dose of 20 mg/kg, Panel B: intramuscular administration at a dose of 30 mg/kg and Panel C: intravenous administration at a dose of 5 mg/kg.

CL_{eff} に関する B は両方法において 1 以下の値であり、体重あるいは脳重量あたりの CSF からのエフラックスが体重あるいは脳重量の増加に伴って小さくなることが示された。 CL_{eff} は CSF から血液への薬物の汲み出し能力を表しており、先の検討から 0.7-0.8 の冪乗値が予測される。しかし、Method I と Method II による B はそれぞれ 0.4 と 0.5 であった。幾つかの薬物に関しては各種動物における腎クリアランスの冪乗値が 0.7 以下のものもあるが、この知見は W_{CP} に関する動物種差 (脳重量と W_{CP} との間において観測された冪乗値 0.8 の相関関係) だけでは説明できなかった (5)。

Method II による PS に関する B はほぼ 1 であった。PS は血液と CSF との間における膜透過クリアランスを示しており、薬物の脂溶性や分子量などの物性から評価できる透過性 (P) と毛細血管の交換面積などの表面積 (S) とによって規定される。脳組織中の交換表面

積は脳重量との間において両対数プロット時の冪乗値が0.93の相関関係にあることが報告されており(12)、Sに関しては動物種差が小さいことが推定される。OFLXが単純拡散によって毛細血管壁を透過するのであれば、Pは動物種に依存しないと考えられる。中枢におけるNQsの特殊な輸送機構は未だ報告されていないので、PSに関してはMethod IIの方がMethod Iよりもより現実的なBの値を示したと考えられる。ヒトにおける脳重量/体重比は他の動物種よりも極めて大きいことを反映し、Method Iによって予測されたPSおよび CL_{eff} はMethod IIによって予測されたそれらのそれぞれ1/7および1/4の値となった。

Table II. Animal Scale-up of Blood-CSF Diffusion Clearance (PS) and Efflux Clearance from CSF to Blood (CL_{eff}) of Ofloxacin.

| Species | PS (ml/min) | CL_{eff} (ml/min) |
|-------------------|----------------|------------------------|
| Rat | 0.00439 | 0.0258 |
| Rabbit | 0.00581 | 0.0337 |
| Dog | 0.0950 | 0.135 |
| Human* (Method I) | 0.192 | 0.209 |
| (Method II) | 1.38 | 0.746 |
| Method I : B | 0.759 | 0.414 |
| r | 0.838 | 0.873 |
| Method II : B | 0.916 | 0.491 |
| r | 0.958 | 0.962 |

*: Values of PS and CL_{eff} in Human were predicted with Method I or Method II.

B: power value of the formula; $y = A \cdot x^B$

r: coefficient of correlation.

(1) 式は脈絡叢において産生されるCSF中の薬物濃度は C_u に等しいという仮定に基づいている。しかし産生されるCSF中の薬物濃度の評価は現在研究者間において一致しておらず今後の検討が必要である。PSや CL_{eff} を絶対値として算出しその種差について検討するためには*in vitro*での検討も必要であろう。PSに相当する透過係数に関しては、脳毛細血管内皮細胞系を用いた取り込みや経細胞輸送実験が、また CL_{eff} に関しては、単離脈絡叢を用いた取り込み速度の測定が有用と考えられる。

ヒトにおけるOFLXの当てはめ計算によるC推移と予測 C_{CSF} 推移をFig. 5に図示した。

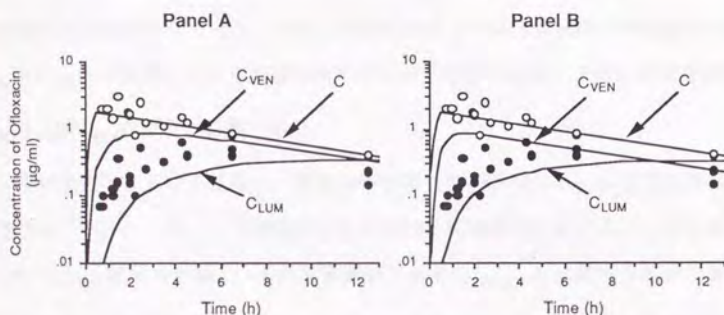


Fig. 5. Simulated C-time Profile Fitted to Observed Data, Predicted C_{VEN} and C_{LUM} -time Profiles and Observed Plasma Concentration (○) and CSF concentration (●) of Ofloxacin in the Human after Constant Intravenous Infusion at a Dose of 200 mg/30 min.
Panel A: Method I, and panel B: Method II

予測 C_{CSF} 推移としては、Table IIにおける外挿されたPSと CL_{eff} を用いて C_{VEN} および C_{LUM} 推移を算出した。OFLXを投与して4時間以降においては、Method IIにより予測された C_{VEN} 推移 (Fig. 5, Panel B) はMethod Iにより予測されたそれ (Panel A) と比較して $C_{LUM,PTS}$ により近い値を示した。投与後初期においては、予測 C_{VEN} 推移は $C_{LUM,PTS}$ を越えており、脳室から腰椎へのCSFの対流あるいはOFLXの拡散が遅いため腰椎内CSF中のOFLX濃度は脳室内CSFよりも低い可能性が示された。したがって $C_{LUM,PTS}$ の評価に対しては C_{VEN} ではなく

C_{LUM} 推移の方が適切であると考えられる。Method I および Method II 共に予測 C_{LUM} 推移は実測値である $C_{LUM,PTS}$ よりも低い値となったが、Method II によるシミュレーション曲線の方が Method I よりも予測精度が高かった。

本研究における Q_{VL} and V_{LUM} の値としては、既報の髄膜白血病あるいは髄膜癌腫症患者における MTX の脳室内投与後における臨床試験データを使用した (方法参照)。MTX は、分子量が 456 でオクタノール/水分係数 (log octanol/water) が -1.85 の両性化合物であり、その f_u は 20-50% である (41)。一方 OFLX も、分子量が 361 でオクタノール/水分係数が 0.407 の両性化合物であり、その f_u は約 25% である (35,38)。したがって、両薬物の物理化学的特徴は比較的類似している。しかし病態時の患者における MTX での検討から得られた Q_{VL} と V_{LUM} は本研究に対して最適な値ではないと考えられる。今後は健常な状態における Q_{VL} および V_{LUM} の評価が必要である。

神経組織内における拡散は、薬物の中樞移行性の評価における重要な過程であることが知られている。しかし、本研究の主たる目的は実験動物におけるデータに基づいてヒトにおける C_{LUM} 推移を予測し、それを実測値である $C_{LUM,PTS}$ と比較することである。更に神経組織内における拡散過程の評価に必要な実験動物およびヒトにおける相組織中の NQs 濃度のデータが入手不可能であった。したがって、本研究では簡略化された "diffusion and flow model" に CSF から血液への一方向性のエフラックス過程を組み込んだモデルだけを用いた。

CNS に対する副作用の観点から、 $C_{LUM,PTS}$ は中枢における NQs の濃度推移に対する直接的な指標とはならないことを理解しておかなければならない。例えば、 $C_{LUM,PTS}$ よりも脳組織内の薬物作用部位における細胞間隙中濃度を反映していると考えられる C_{VEN} は投与後初期において急速に上昇していた。一方、 C_{LUM} は緩やかに上昇し、 C_{VEN} が最高値に達する時間において未だその 1/10 であった (Fig. 5, Panel B)。したがって、NQs の毒性作用発現に関する C_{CSF} 範囲は単回投与後の $C_{LUM,PTS}$ だけからは評価できない。

C_{LUM} 推移の各種パラメータに対するセンシティブリティのシミュレーション解析

PS、 CL_{eff} 、 Q_{VL} または V_{LUM} をそれぞれ二倍あるいは半分の値に変えてシミュレーションした場合における C_{LUM} 推移を Fig. 6 の Panel A-D にそれぞれ示した。Panel A においては、PS の増加に伴い投与後初期からシミュレーションされる C_{LUM} 推移が増加した。Panel B においては、投与して約 2 時間以降において CL_{eff} の増加に伴いシミュレーションされる C_{LUM} 推移は C 推移から離れた。 C_{LUM} 推移関数は PS や CL_{eff} よりも Q_{VL} や V_{LUM} に対してセンシティブリティが高く、 Q_{VL} の増加あるいは V_{LUM} の減少によってシミュレーションされる C_{LUM} 推移は $C_{LUM,PTS}$ に近い値となった。

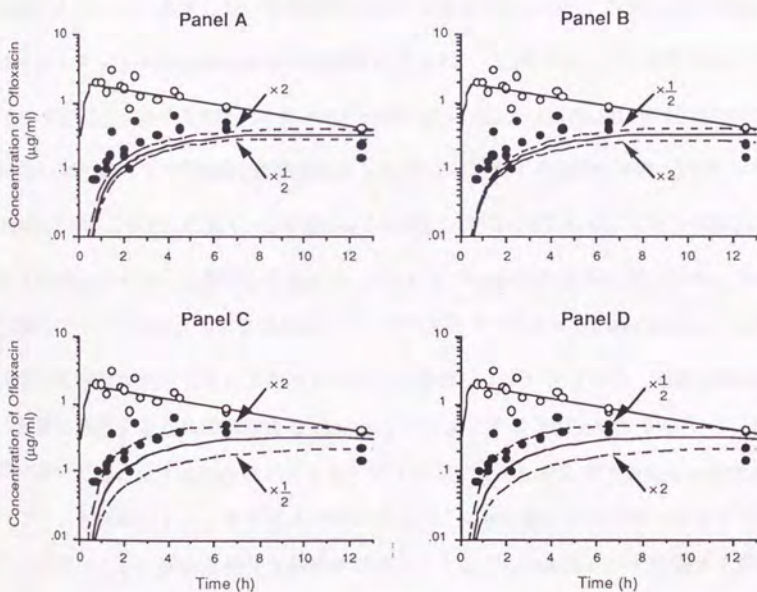


Fig. 6. Simulation Study on the Sensitivity of the Predicted C_{CSF} -time Profile to PS (Panel A), CL_{eff} (Panel B), Q_{VL} (Panel C) and V_{LUM} (Panel D). Broken lines were simulated with double or half each value.

本モデルを用いたシミュレーション-スタディにおいて Q_{VL} の値を0.07 ml/minを使用した時 (Fig. 6のPanel C中の $\times 2$)に、Method IIによる予測 C_{LUM} 推移は投与後初期において $C_{LUM,PTS}$ とはほぼ一致した。(なお本研究においては、 Q_{VL} はCSFの大槽と腰椎との間における単純な流れと薬物の腰椎内CSFへの拡散過程の二つの現象に関するハイブリッド (hybrid) 型のパラメータとして定義されている。すなわち、 Q_{VL} は実際の生理学的な特性値ではないため、必ずしもOFLXの C_{CSF} 推移解析における最適な値ではない。)

ヒトにおけるCおよび C_{CSF} 推移の完全予測

Table IIIには各種実験動物とヒト (臨床第一相試験) におけるNQsの経口投与後の体内動態パラメータを表示した。各種動物における体重とNQsのVおよび CL_p の間には良好なアロメトリック (allometric) の相関関係が示され、Vに関するr、Vに関するB、 CL_p に関するrおよび CL_p に関するBは、それぞれ 0.978 ± 0.011 、 0.753 ± 0.123 、 0.969 ± 0.021 および 0.667 ± 0.135 であった (平均値 \pm 標準偏差)。ENXの CL_p に関するBだけは約0.5であったが、他のNQsのVおよび CL_p に関するBの値は0.7-0.9および0.6-0.8であり、これらはNQs以外の数多くの薬物のそれらと類似した値であった (2,7)。Table IIIに表示したパラメータは経口投与後のデータであり、Vおよび CL_p はバイオアベイラビリティ (bioavailability)、fuおよび腎あるいは肝固有クリアランスのハイブリッド型のパラメータである。薬物の体内動態をより厳密に評価するためには固有な (intrinsic) パラメータの方が適切であろう。しかし本研究においては、全てのNQsのバイオアベイラビリティやfuが入手できなかったために、ハイブリッド型のパラメータのまま取り扱った。NQsに関してはそのバイオアベイラビリティが高いこと、尿中未変化体排泄率が高いことおよびfuが低いことに関する動物種差が小さいために (74)、経口投与後におけるハイブリッド型のパラメータを用いた解析にも関わらず高い相関性が観測された。以上より、ヒトにおけるNQsのVおよび CL_p は実験動物におけるそれらからAdolph-Dedrick法によって予測可能であることが示された。

Table. III. Pharmacokinetic Parameters of New Quinolones in Various Species after Oral Administration.

| Drug | Species | Dose (mg/kg) | Body Weight (kg) | V (l) | CL _p (ml/min) | t _{1/2} (h) | f _u (%) | Ref. No. |
|------|---------|-----------------|---------------------|----------|-----------------------------|-------------------------|-----------------------|----------|
| ENX | Mouse | 20 | 0.037 | 1.19 | 6.85 | 2.0 | 72.4 | 57, 58 |
| | Rat | 20 | 0.198 | 5.82 | 34.6 | 2.8 | 65.5 | |
| | Monkey | 20 | 3.3 | 8.67 | 34.4 | 4.2 | - | |
| | Dog | 20 | 13.6 | 26.3 | 87.5 | 5.0 | 66 | |
| | Human | 6.4 | 62.5 | 127 | 300 | 4.9 | 68 | |
| LFLX | Mouse | 20 | 0.023 | 0.118 | 0.470 | 2.9 | - | 59-63 |
| | Rat | 20 | 0.22 | 0.445 | 2.95 | 1.8 | 70.1 | |
| | Monkey | 20 | 5 | 12.3 | 52.2 | 2.9 | - | |
| | Dog | 20 | 11 | 31.0 | 55.7 | 6.5 | 78.5 | |
| | Human | 3.1 | 64.7 | 175 | 239 | 8.5 | 78.6 | |
| NFLX | Mouse | 50 | 0.029 | 2.44 | 8.06 | 3.5 | 93.9 | 64-66 |
| | Rat | 50 | 0.235 | 5.59 | 16.1 | 4.0 | 85 | |
| | Rabbit | 50 | 3.2 | 34.2 | 88.3 | 4.5 | 98 | |
| | Dog | 30 | 12.3 | 386 | 1870 | 2.4 | 98.4 | |
| | Human | 6.5 | 61.6 | 518 | 1360 | 4.4 | 89.8 | |
| OFLX | Rat | 20 | 0.3 | 1.85 | 4.47 | 4.8 | 52.3 | 67-69 |
| | Monkey | 20 | 2.75 | 4.39 | 10.8 | 4.7 | 71.3 | |
| | Dog | 20 | 12.5 | 23.0 | 27.8 | 9.6 | 51.1 | |
| | Human | 10.1 | 59.5 | 60.1 | 146 | 4.8 | 75 | |
| PFLX | Mouse | 50 | 0.026 | 0.405 | 2.46 | 1.9 | - | 70 |
| | Rats | 50 | 0.25 | 1.06 | 3.72 | 3.3 | 79.7 | |
| | Monkey | 25 | 3.8 | 7.06 | 14.7 | 5.6 | - | |
| | Dog | 50 | 14.5 | 39.1 | 120 | 3.8 | 80.9 | |
| | Human | 6.2 | 64.5 | 103 | 138 | 8.6 | 75 | |
| TFLX | Mouse | 100 | 0.021 | 0.452 | 1.31 | 4.0 | 45.4 | 71-73 |
| | Rat | 100 | 0.32 | 13.0 | 59.9 | 2.5 | 48.2 | |
| | Rabbit | 100 | 3.05 | 89.1 | 312 | 3.3 | 65.1 | |
| | Dog | 100 | 11.5 | 214 | 381 | 6.5 | 72.9 | |
| | Human | 4.8 | 63 | 326 | 975 | 3.9 | 62.6 | |

V, CL_p, t_{1/2} and f_u represent the apparent distribution volume, total body clearance, elimination half-life and plasma unbound fraction, respectively.

Table IVには、3種の動物とヒトにおけるVおよびCL_p、ヒトにおけるVおよびCL_pの予測値、そしてMethod I (Adolph-Dedrick法)により外挿した際のBおよびrを表示した。ヒトにおけるVに関しては、6%の小さい誤差率でほぼ正確に予測できた。ヒトにおける予測CL_pは実測値よりも小さく、誤差率は約54%であった。ヒト試験におけるデータは、精密な動物実験とは異なり、そのプロトコル (protocol)や生理的状态の相違および個人間変動などにより大きく影響される。他のデータであるTable IV中の括弧内に示した健康人における臨床第一相試験での結果と比較すると、ヒトにおける予測VおよびCL_pの誤差率はそれぞれ55%と35%であった。

Table IV. Animal Scale-up of Apparent Volume of Distribution (V) and Total Body Clearance (CL_p) of Ofloxacin.

| Species | V (l) | CL _p (ml/min) |
|------------------|--------------|-----------------------------|
| Rat | 0.486 | 3.90 |
| Rabbit | 6.98 | 16.9 |
| Dog | 14.4 | 33.2 |
| Human (observed) | 103, (63.6)* | 219, (154)* |
| (predicted) | 96.9 | 100 |
| B | 0.935 | 0.581 |
| r | 0.983 | 0.997 |

*: Data from phase I study (adjusted for body weight).

B: power value of the formula; $y = A \cdot x^B$

r: coefficient of correlation.

Fig. 7には、Table IVに示すMethod Iにより予測された V および CL_p とTable IIに示すMethod IIにより予測された PS および CL_{eff} を用いてシミュレーションしたヒトにおける予測 C および C_{LUM} 推移を、 C および $C_{LUM,PTS}$ の実測値と比較して図示した。予測 C_{LUM} 推移は実測値である $C_{LUM,PTS}$ よりも僅かに低いものの、ヒトに関する投与量と体重の限られた情報に基づいて、ヒトにおける C および C_{LUM} 推移を動物実験データだけから完全に予測することが可能であった。

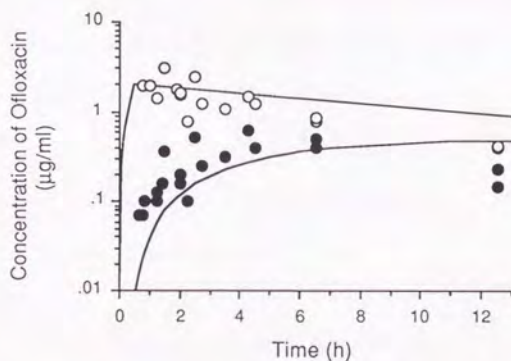


Fig. 7. Predicted Plasma and Lumbar CSF Concentration-time Profiles and Observed Plasma (○) and CSF (●) Concentrations of Ofloxacin in the Human after Constant Intravenous Infusion at a Dose of 200 mg / 30 min.

本研究では、NQsの中移行性を C_{CSF} を用いて評価した。脳組織内の細胞外液 (extracellular fluid; ECF) とCSFとの間においては、血液-脳関門 (blood-brain barrier; BBB) の様な薬物の拡散障壁は存在しないため、 C_{CSF} が脳組織内のECF中濃度 (C_{ECF}) に対する一つの指標になると考えられる。しかし、薬物が脈絡叢を透過しCSF中に移行した後ECF中へ拡散する場合や、あるいはBBBを透過した後にECFからCSFに拡散する場合もあり得る。NQsに関しては、OFLXとLFLXのラットにおける血液-脳組織間の透過クリアランスと血

液-CSF間の透過クリアランスとがほぼ等しいこと (23) およびPFLXのヒトにおける血液-脳組織間の濃度比と血液-CSF間の濃度比が大きく相違しないこと (35,75) が既に報告されている。本研究では、ヒトにおける予測 C_{LUM} 推移と実測値である $C_{LUM,PTS}$ との比較に基づいてヒトにおける C_{VEN} 推移も同時に予測した。今後は実験動物を用いて C_{VEN} と微小透析法により測定される C_{ECF} との関係を解明することが求められる。