

新キノロン系合成抗菌剤と非ステロイド系抗炎症薬の併用により
誘発される痙攣発作——NY-198の中樞作用を中心に——

山本 研¹⁾・森川 宏²⁾・永田 治²⁾・橋本 繁輝²⁾
山田 健久²⁾・久保 信治²⁾・桶崎 英一²⁾・山崎 光雄²⁾
内藤 行雄¹⁾・井上 讓¹⁾・吉村 弘二¹⁾

¹⁾塩野義製薬株式会社研究所・薬理学部門

²⁾北陸製薬株式会社・中央研究所

マウス、ラットおよびネコを用いて、新規開発中の新キノロン剤 NY-198の中樞作用、とくに非ステロイド系抗炎症薬との相互作用により誘発される痙攣発作の機序を調べ、市販の新キノロン剤と比較した。動物種により程度の差はあるが、NY-198は他の新キノロン剤と同様それ自身に中枢神経刺激作用があり、マウスでは benzodiazepine (BDZ) や GABA 神経系に作用点を有する中枢興奮薬、とくに bicuculline の痙攣を増強した。NY-198と fenbufen (FB) または一部のアリアループプロピオン酸系抗炎症薬を併用すると薬物相互作用による痙攣発作が発生したが、用量作用関係は enoxacin (ENX) の場合より弱かった。新キノロン剤と FB の併用により誘発されたネコの痙攣波は新皮質と視床核を中心に現れ、その後全誘導に波及し、全般性発作発射へと発展した。これらの痙攣は muscimol, diazepam, barbiturates により一部または完全に抑制された。高濃度の NY-198 および ENX はラット脳の BDZ および GABA レセプターに対する [³H]-diazepam および [³H]-muscimol の特異的結合を阻害し、とくに [³H]-muscimol の GABA レセプターに対する結合阻害作用は FB の併用により濃度依存性に著しく増強された。しかし NY-198 のマウス血清蛋白結合率、血清中および脳内濃度などに関する薬動学的パラメーターは FB を併用しても修飾されることはなかった。

以上の成績から、NY-198 と FB との薬物相互作用の強さは ENX のそののほぼ $\frac{1}{2} \sim \frac{1}{10}$ と判定されたが、NY-198 を含む新キノロン剤による痙攣発生の機序は、主として GABA-BDZ レセプターに対する結合阻害によるものと推定された。

数年前マウスにピリドンカルボン酸系抗菌剤 nalidixic acid (NA) と pentylenetetrazol を同時投与すると痙攣が増強され、またネコに NA を単独腹腔内投与すると全般性発作発射と間代性痙攣が現れることを報告した¹⁾。ところが最近になって新キノロン剤の enoxacin (ENX) と theophylline を併用した患者で悪心、嘔吐、頻脈、不眠、さらに一部で痙攣が発生したとの報告があり、その原因として theophylline の血中濃度が異常に高まり、かつ $T_{1/2}$ が延長されたためと考えられた^{2,3)}。一方、SIMPSON & BRODIE⁴⁾ は痙攣発作の既往のある18才の男性に ENX 400mg を 3 回使用したところてんかん発作が惹起されたと報告している。我国でも1986年秋、ENX と非ステロイド系抗炎症薬 fenbufen (FB) を併用した数名の患者で重篤な痙攣発作が発生したため、厚生省から両薬物の併用を避けるよう警告が発せられた⁵⁾。

新規開発中の NY-198 は ENX と類似の化学構造をもつキノロン系合成抗菌剤なので、上述の理由からその中

枢神経系に対する作用態度を精査し、とくに抗炎症薬との相互作用や痙攣発生の機序について多角的な解析を行なったので報告する。

I 実験材料

1. 使用薬物

新キノロン系抗菌剤として NY-198 [(±)-1-ethyl-6,8-difluoro-1,4-dihydro-7-(3-methyl-1-piperazinyl)-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid hydrochloride], enoxacin (ENX, 大日本), norfloxacin (NFLX, 杏林), ofloxacin (OFLX, 第一), nalidixic acid (NA, 第一) (Fig.1) を、非ステロイド系抗炎症薬として fenbufen (FB, レダグリー) を含む市販の27種の薬物 (Table 1) を、それぞれマウスの実験

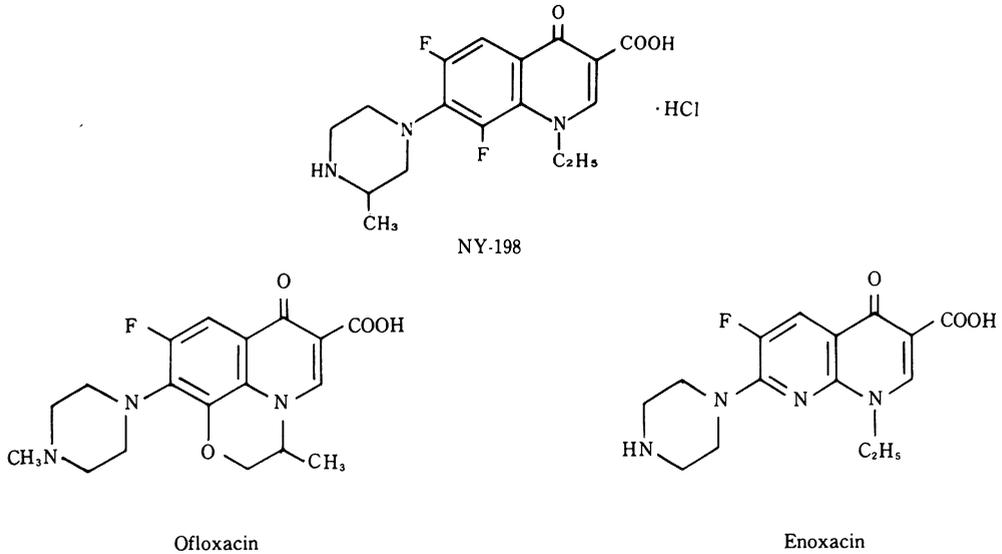


Fig. 1. Chemical structure of NY-198 and main reference compounds

では0.5% CMC または1%アラビアゴム懸濁液として、ネコの実験では薬物の半量のアラビアゴムを加えて懸濁液 (vehicle) として使用した。各薬物の投与方法は各実験の項に述べる。

2. 使用動物

全て雄性の ddY 系マウス (静動協, 三協ラボサービス), Wistar 系ラット (静動物) およびネコ (塩野義油日ラボラトリーズ) を使用し, 薬物および vehicle をマウスには体重10g 当り0.1~0.2ml, ネコには1kg 当り1mlの割合で投与した。

II 実験方法

1. 行動解析

1) 新キノロン剤と抗炎症薬との相互作用

原則として12~24時間絶食を行なったマウス (体重20~25g) を1群10匹として用いた。新キノロン剤と抗炎症薬はそれぞれ単独あるいは同時に経口投与を行なった後8時間の間, 個別ケージ内で行動観察を行ない, 挙尾, 間代性痙攣, 強直性痙攣発生の有無などを観察し, 併せて72時間後の死亡例の有無を調べた。一方, NY-198とFBの投与間隔と痙攣発生の相互関係を調べる実験では1群10匹の飽食マウス (5週令, 体重25~29g) を用い, 同様の観察を行なった。

2) 新キノロン剤と theophylline との相互作用

24時間絶食した1群10~20匹のマウス (体重20~25g) に theophylline を単独または新キノロン剤と同時に経口投与を行ない, 3時間後まで間代性痙攣, 強直性痙攣および死亡例発生の有無を個別ケージ内で観察した。

2. 脳波による解析

山本と城戸⁶⁾の方法に準じて, 慢性に脳波用電極を植込んだネコ34匹を用い, 手術侵襲からの回復 (2週間以上) をまって無麻酔, 無拘束下に実験を行なった。ネコのポリグラフ記録は投与前1時間以上行ない, 動物が十分実験環境に慣れ安定した睡眠-覚醒周期が得られた後, vehicle または薬物を腹腔内に投与し, 以後5~6時間の間, 連続的に脳波, 呼吸, 心電図の記録を行なった。

3. 痙攣発生機序の解析

1) 薬動力学的解析

以下の3項目の実験はマウスを用いて行なった。濃度推移および血清蛋白との結合率を調べる実験では, [¹⁴C]-NY-198 および FB をそれぞれ単独または併用経口投与し所定時間に, 痙攣発現時における未知代謝物の検索および血清中濃度と痙攣との相関をみる場合には両薬物を同時に経口投与し, 投与30分後もしくは痙攣発現時にそれぞれ動物を屠殺した。

i) 血清中および脳内濃度: 濃度推移試験における血清中および脳内の NY-198 (¹⁴C)-NY-198 濃度は燃焼法により求めた。すなわち, 血清50μl もしくは脳ホモジネート400μl をコーンカップ (combusto-coneTM, Packard) にとり, 自動燃焼装置 (306型, Packard) で燃焼処理した後, ¹⁴C 濃度を液体シンチレーションカウンター (LSC-653またはLSC-1000, Aloka) で測定した。なお, 吸収剤およびシンチレーターとしてそれぞれ OxisorbTM-CO₂ (NEN) および OxiprepTM-2 (NEN) を用いた。その他の試験では血清50μl をバイアルビンにとり, シンチレーター (Aquasol-2, NEN) を加えて液

Table 1. Induction of behavioral convulsions by combined oral administration of NY-198 and a non-steroidal anti-inflammatory drug in ddY mice

NY-198 (200 mg/kg, p.o.)		Number of mice with convulsions		Mortality (%)
Non-steroidal anti-inflammatory drug	Dose (mg/kg, p.o.)	Clonic convulsion	Tonic convulsion	
Indomethacin	25	0/10	0/10	0
Diclofenac sodium	35	0/10	0/10	0
Tolmetin sodium	200	0/10	0/10	0
Fenbufen	200	10/10 <12±1>	9/10 <17±1>	100 <19±2>
Sulindac	100	0/10	0/10	0
Anfenac sodium	70	0/10	0/10	0
Ibuprofen	200	0/10	0/10	0
Ketoprofen	50	0/10	0/10	0
Naproxen	200	2/10 <15>	1/10 <21>	20 <24>
Flurbiprofen	40	0/10	0/10	0
Pranoprofen	75	0/10	0/10	0
Fentiazac	100	0/10	0/10	0
Fenoprofen calcium	600	5/10 <58±15>	0/10	50 <124±17>
Tiaprofenic acid	200	0/10	0/10	0
Oxaprozin	135	0/10	0/10	0
Loxoprofen sodium	60	0/10	0/10	0
Acetylsalicylic acid	1500	5/10 <44±14>	3/10 <53±26>	80 <43±11>
Diflunisal	250	0/10	0/10	0
Mefenamic acid	400	0/10	0/10	0
Fulfenamic acid	200	0/10	0/10	0
Tolfenamic acid	100	0/10	0/10	0
Floctafenine	200	0/10	0/10	0
Piroxicam	7	0/10	0/10	0
Tiaramide hydrochloride	100	0/10	0/10	0
Emorfazone	200	0/10	0/10	0
Acetaminophen	500	0/10	0/10	0
Lobenzarit disodium	80	0/10	0/10	0

NY-198 and non-steroidal anti-inflammatory drugs were administered at the same time. Each dose corresponds to about 20 times the clinical dosage. The mice were fasted for 24 h before testing. The number of mice that displayed convulsions or died were determined 8 h later. < > : time until appearance, mean ± S.E. (min).

体シンチレーションカウンターで測定することにより¹⁴C濃度を求めた。一方、FBおよびその主代謝物4-biphenylacetic acid (BPAA, Aldrich) およびγ-hydroxy-4-biphenylbutyric acid (γ-OH)⁹⁾の定量はFLEITMAN⁹⁾らの方法を一部改良して行なった。すなわち、血清50μlまたは脳ホモジネート400μlに精製水を加え1mlとし、濃塩酸1mlを加えて15秒間激しく攪拌した後2分間静置

した。次いで内部標準品NO-675 (血清: 10μg/ml, 脳ホモジネート: 5μg/ml, Fig. 8) を含む水溶液0.1mlを加え、さらにcyclohexaneとdiethyletherの混液(7:3 v/v) 8mlを加え、10分間振盪した後1200Gで10分間遠心分離した。遠心分離後有機層を減圧留去し、残渣を移動相400μlに溶解し、40μlをHPLCに注入した。HPLCの測定には日本分光BIP-Iを用い、カラムにはTSK

gel ODS-80TM (15cm×4.6mmφ)を用いた。測定条件は次の通りである。移動相：0.01M tetrabutylammonium bromide含有0.01Mリン酸緩衝液 (pH7.0) と acetonitrileの混液 (67:33 v/v), 流速：1.0 ml/min, カラム温度：25±1°C, 検出波長：UV265nm, 検出感度：血清；0.04a.u.f.s., 脳ホモジネート：0.02a.u.f.s.

ii) 痙攣発現時における未知代謝物の検索：NY-198 およびその代謝物を同時に検出できる方法⁹⁾で行なった。血清もしくは脳ホモジネート溶液を適宜精製水で希釈し、その4mlを Amberlite XAD-2カラムに付し、精製水20mlで洗滌後 acetonitrile と酢酸の混液 (4:1 v/v) 10mlで溶出させた。溶出液を減圧留去し、残渣を移動相400μlに溶解し、その40μlを HPLC に注入した。測定条件は次の通りである。移動相：0.01M 1-hexanesulfonic acid sodium 含有0.01Mリン酸緩衝液 (pH2.5) と acetonitrile の混液 (8:2 v/v), 流速：0.5ml/min, カラム温度：25±1°C, 検出：蛍光検出器 (励起波長280nm, 蛍光波長455nm)。一方、FB およびその代謝物の検索は FB, BPAA および γ-OH の定量時のクロマトグラムより行なった。

iii) 血清蛋白結合率：血清0.4mlを遠心型蛋白結合試験器 (MPS-1, Amicon) に入れ、37°C, 1000Gで20分間遠心分離した。得られた濾液および血清中の NY-198, FB, BPAA および γ-OH 濃度をそれぞれの定量法に準じて求めた。血清蛋白結合率は、血清中濃度 [S] と濾液中濃度 [F] から次式により算出した。

$$\text{血清蛋白結合率 (\%)} = \frac{[S] - [F]}{[S]} \times 100$$

2) 脳の物理的および化学的刺激に対する作用

6～8週令 (体重30g以上) の飽食マウスを用いた。

i) 電撃痙攣：1群10匹のマウスを用い、各薬物を単独経口投与した場合は60分後に、新キノロン剤と抗炎症薬を併用した場合は30分後にそれぞれ bioconvulsive unit (バイオメディカ) 装置を用いてマウスの両眼角膜に0.2秒間通電 (電流10mA, パルス幅1msec, 周波数50Hz) し、誘発される強直性伸展痙攣 (ED₀₋₁₀) に対する増強作用を調べた。

ii) Pentylenetetrazol 痙攣：1群10匹のマウスを用い、各薬物単独経口投与60分後および併用投与30分後にそれぞれ pentylenetetrazol 41mg/kgを腹腔内注射し、以後30分間に誘発される間代性痙攣 (ED₀₋₁₀) に対する増強作用を調べた。

iii) Bemegride 痙攣：1群10匹のマウスを用い、薬物単独経口投与60分後および併用投与30分後にそれぞれ bemegride 13mg/kgを腹腔内注射し、以後30分以内に誘発される間代性痙攣 (ED₀₋₁₀) に対する増強作用を調べた。

iv) Bicuculline 痙攣：1群10匹のマウスを用い、薬物単独経口投与60分後および併用投与30分後に bicuculline 0.4mg/kgを静脈注射し、その直後から10分間以内に発生する痙攣死を指標に、bicuculline 痙攣に対する増強作用を調べた。

3) ラジオレセプターアッセイ

i) [³H]-Diazepam (85ci/mmol, アマシャムジャパン) 結合：11週令のラットを用い、MÖHLER & OKADA¹⁰⁾の方法を一部改変して行なった。すなわち、ラットを断頭した後、速やかに大脳皮質を剔出し、50mM Tris·HCl 緩衝液 (pH7.4) でホモジネートし、遠心分離と再懸濁を3回繰り返して、液体窒素で凍結した後-80°C庫に保存した。測定に先立ち凍結サンプルを室温で融解した後、50mM Tris·HClに100mM NaCl, 5mM KClを含んだ緩衝液 (pH7.4) に再懸濁しレセプター標品とした。レセプターと [³H]-diazepam (1.93nM) および薬物を混和し、0°Cで60分間 incubation を行ない、Whatman BF/C 濾紙で吸引分別し反応を停止させ、濾紙上の放射活性を液体シンチレーター (クリアゾル I) により測定した。なお、非特異的結合には1μMの diazepam を用いた。

ii) [³H]-Muscimol (5.5ci/mmol, アマシャムジャパン) 結合：11週令のラットを用い、ZUKINら¹¹⁾の方法を一部改変して行なった。すなわち、小脳、嗅球を除く全脳をホモジネートした後、0.32M sucrose で粗 P₂ 分画を得、洗滌後50mM Tris·HCl 緩衝液 (pH7.4) に懸濁し、液体窒素で凍結した後-80°C庫に保存した。測定に先立ち凍結サンプルを室温にて融解した後、Krebs-Henseleit 緩衝液に置換し、0.01% Triton X-100存在下に37°C, 60分間の incubation を行ない、洗滌を3回繰り返した後上記緩衝液に再懸濁しレセプター標品とした。非特異的結合には1mM GABAを用い、レセプターと [³H]-muscimol (6.2μM) および薬物を混和し、0°C, 60分間の incubation の後、 [³H]-diazepam 結合の場合と同様の方法により放射活性を測定した。なお Ki 値は用量作用曲線から算出した。

4. 痙攣抑制作用

1) マウスの行動による解析

NY-198 300mg/kg と FB 300mg/kg または ENX 300mg/kg と FB 100mg/kg の併用投与により100%誘発される痙攣に対する各種薬物の抗痙攣作用を調べた。すなわち、各抗痙攣薬を前処置した後、NY-198 と FB または ENX と FB を経口投与し、以後2時間以内の痙攣誘発の有無を観察した。

2) ネコの脳波による解析

NY-198 20mg/kg と FB 10mg/kg を同時にネコの腹腔内に投与すると、確実に痙攣発作が発現する。この発作

が各種抗痙攣薬の前処置または後処置によりどのような影響を受けるかを、行動とポリグラフを指標に投与後6～7時間の間観察した。

III 実験成績

1. 行動解析

1) 新キノロン剤および非ステロイド系抗炎症薬の単独投与

マウスに NY-198, ENX, OFLX, NFLX および NA100~1000mg/kg を単独経口投与しても痙攣, 振戦, 挙尾, 疾走, 跳躍, 歯ならしなどの興奮行動は全く現れず, 72時間後まで死亡例も認められなかった (Table 2)。同様に FB (100~500mg/kg), diclofenac-Na (DCF, 17~85mg/kg), indomethacin (IDM 12.5 mg/kg), ketoprofen (KPF, 25~125mg/kg), ibuprofen (IPF, 100~500mg/kg), flurbiprofen (FBP, 60~180 mg/kg), naproxen (NPX, 150~450mg/kg), fenoprofen-Ca (FPF, 600mg/kg) を単独経口投与しても痙攣, 振戦, 挙尾, 疾走, 歯ならしなどの興奮行動は全く発現しなかった。しかし, DCF 85mg/kg, FBP 180mg/kg, FPF 600mg/kg 投与群では72時間以内にそれぞれ30, 30, 10%の死亡例が現れた。一方, acetylsalicylic acid (ASA, 460~750mg/kg) では軽度 (10~20%) の jumping 行動および20%の死亡例が現れ, 1500mg/kg (臨床量の20倍) では80%に痙攣が現れ70%が死亡した。

2) 新キノロン剤と抗炎症薬の併用投与

NY-198と抗炎症薬の臨床用量の各20倍相当量をマウスに同時に経口投与すると, 用いた27種の抗炎症薬のうち, FB, NPX, FPF および ASA の4薬物の併用群にのみ痙攣が発生した (Table 1, 但し ASA の痙攣発現

率は単独投与時と同じ)。しかし, 各用量を臨床用量の10倍に下げると, NY-198と NPX および FPF の組み合わせ群では痙攣は現れなくなった。一方, NY-198と FB の併用では臨床量の10倍同士でなお80%の痙攣と死亡例が現れ, 5倍同士で初めて痙攣は発生しなくなった。そこで, 痙攣発生率の最も高かった抗炎症薬 FB と代表的な新キノロン剤 ENX および NFLX を併用し痙攣発生率を調べ NY-198のそれと比較を行なった。すなわち, 臨床用量の10倍 (100mg/kg) 以上ではどの併用群でも痙攣が発生したが, 5倍に下げると NY-198と NFLX ではもはや痙攣は現れなかった。しかし, ENX では臨床量の5倍でなお50%の痙攣が発生し, 2.5倍量で初めて痙攣は現れなくなった (Table 3)。

3) NY-198と FB の投与間隔と痙攣発生との相互関係

マウスに NY-198と FB を臨床用量の10倍同士, すなわち100mg/kg を同時に経口投与すると70%に間代性痙攣が現れた。しかし, FB を前処置しておき同一用量の NY-198を FB の1, 2, 4時間後に投与した場合には痙攣の発生率がそれぞれ70%, 60%, 20%に減少し, さらに両者の投与間隔を6時間以上あけた場合には痙攣の発生はもはやなかった (Table 4 A)。次に, 同じ用量の NY-198を前処置しておき FB を1, 2時間後に投与した場合にはそれぞれ70%, 60%の痙攣が発生した。しかし両者の投与間隔を4時間以上あけるともはや痙攣は現れなかった (Table 4 B)。なお, NY-198と FB の用量を共に臨床用量の20倍 (200mg/kg) に増量し, 併用した場合には前, 後処置に関係なく12時間の投与間隔をおいた時にも痙攣の発生はなかった。

4) 新キノロン剤と theophylline との相互作用

Table 2. Behavioral changes in ddY mice after single administration of NY-198 and related antimicrobial drugs

Behavior (%)	Compound (mg/kg p.o.)	NY-198			Enoxacin			Ofloxacin			Norfloxacin			Nalidixic acid		
		s	s	g	s	s	g	s	s	g	s	s	g	s	s	g
		100	1000	1000	100	1000	1000	100	1000	1000	100	1000	1000	100	1000	1000
Convulsions		0	0	—	0	0	—	0	0	—	0	0	—	0	0	—
Tremors		0	0	—	0	0	—	0	0	—	0	0	—	0	0	—
Twitches		0	0	—	0	0	—	0	0	—	0	0	—	0	0	—
Straub tail		0	0	—	0	0	—	0	0	—	0	0	—	0	0	—
Running		0	0	—	0	0	—	0	0	—	0	0	—	0	0	—
Jumping		0	0	—	0	0	—	0	0	—	0	0	—	0	0	—
Teeth chattering		0	0	—	0	0	—	0	0	—	0	0	—	0	0	—
Fighting				—			—			—			—			—
Mortality			0*			0*			0**			0*			0*	
No. of mice		10	10	(3)	10	10	(3)	10	10	(3)	10	10	(3)	10	10	(3)

s : one mouse per cage, g : three mice per cage, — : none, Mortality : *24h, **72h

Table 3. Induction of behavioral convulsions by combined administration of a antimicrobial drug and fenbufen in ddY mice

Drug (mg/kg, p.o.)		Number of mice with convulsions		
Fenbufen	Antimicrobial drug	NY-198	ENX	NFLX
200	+ 200	10/10 <12±1>	10/10 <14±1>	10/10 <60±9>
100	+ 100	8/10 <22±1>	10/10 <22±2>	2/10 <60>
50	+ 50	0/10	5/10 <40±7>	0/10
25	+ 25	—	0/10	—

ENX : Enoxacin, NFLX : Norfloxacin

Fenbufen and each antimicrobial drug were administered at the same time. The mice were fasted for 24 h before testing.

The number of mice with convulsions was determined 8 h later. < > : time until appearance, mean ± S.E. (min).

マウスに theophylline 280mg/kg (臨床用量の40倍) を単独経口投与すると35%の間代性痙攣と25%の強直性痙攣および35%の死亡例が観察された。次に臨床量の40倍(400mg/kg)のNY-198と同じ用量のtheophyllineを同時に経口投与したか痙攣はほとんど増強されなかった。一方、ENX400mg/kgを併用した場合には痙攣の発生率が80%に増大した (Table 5)。

2. 脳波学的解析

1) 新キノロン剤およびFBの単独投与

ネコにNY-198 20mg/kgを腹腔内注射してもポリグラムの各パラメーターに全く影響は認められなかったが、40mg/kgでは対照記録にみられた安定した徐波深睡眠(SWDS)波が徐波浅睡眠(SWLS)波ないし安静(rest)波主体の脳波に変わり、明らかに脳波は賦活された。さらに1/2例で嘔吐が出現し、新皮質にspike & wave, 他の1例ではslow burstが散発的に現れ、2例共心拍数は増加した。70~100mg/kgでは投与15~60分後より呼吸数、心拍数の著明な増加、嘔吐の多発、脳波の著明な賦活が現れ、70mg/kgで1/2例に、100mg/kgで1/2例に前頭領を中心とした新皮質にspike & wave, 軀幹にはtwitchが現れ、やがて間代性痙攣を伴う全般性発作発射に発展し、100mg/kgでは1例が死亡した。300mg/kgの投与ではこれらの変化がさらに著明になりネコは投与60分すぎに死亡した (Fig. 2)。ENX 100~200mg/kgの腹腔内注射でも脳波の賦活と呼吸数の増加が現れ、投与2~4時間後より新皮質系に全身のtwitchを伴うspike & waveが出現し、6時間以上持続した。NFLX 100~200mg/kgでは40分後頃より嘔吐が多発し脳波は賦活され、心拍数、呼吸数は増加した。投与2~4時間頃より脳波に

spike & waveが出現し、やがて間代性痙攣を伴う全般性発作発射が出現、200mg/kg投与の1例は死亡した (Fig. 2)。OFLX 200mg/kgでは直後より呼吸数、心拍数の著しい増加が現れ、投与10~70分後頃には嘔吐が多発した。6時間以上の間、脳波の著しい賦活が続き、この間投与1.5~3.5時間頃新皮質に間歇的なslow burstが出現した。一方、FB 10mg/kgの腹腔内注射では脳波パターン、睡眠-覚醒周期および行動に全く変化は認められなかった。しかし200mg/kgになると投与10分後頃より嘔吐が現れ、60~90分後まで頻回に発現、この間、排尿、排便があり心拍数は2例共著しく増加し6時間後まで持続した。この中1例の脳波は投与直後より強く賦活され、呼吸数は著しく増加し大量の腹水貯留のため6時間30分後に死亡した。しかし脳波パターンに異常波は現れなかった。

2) 新キノロン剤とFBの併用投与

NY-198 3~6 mg/kgとFB10mg/kgを同時に腹腔内注射したがネコの脳波と行動に全く影響はなかった。10 mg/kg同士の併用では3例中1例で2時間後からspike & waveが出現し、他の1例では流涎、嘔吐が出現した。NY-198 20mg/kgとFB 10mg/kgの併用では10~90分後に全例で嘔吐が、1/2例で1~2時間後に流涎が現れ、呼吸数は著明に増加した。脳波では投与60分後頃より初め新皮質頭頭領、続いて扁桃体、新皮質感覚運動領、後頭領に速波が増加し始め、1時間24分後には運動領を中心に、さらに近縁の新皮質系および外側膝状体にも単発性のspikeが出現、2時間14分後にはtwitchを伴う著明なspike & waveが現れ2時間42分後には全誘導に波及して全般性発作発射となり、間代性痙攣を併

Table 4. Relationship between appearance of convulsions and administration intervals of NY-198 and fenbufen in ddY mice

A) Pretreatment with fenbufen

Fenbufen (100 mg/kg, p.o.) + NY-198 (100 mg/kg, p.o.)	Number of mice with convulsions		Mortality (%)
	Clonic convulsion	Tonic convulsion	
Pretreatment time			
8 h	0/10	0/10	0
6 h	0/10	0/10	0
4 h	2/10 <53>	1/10 <48>	10 <49>
2 h	6/10 <36±6>	6/10 <46±9>	60 <55±11>
1 h	7/10 <40±4>	5/10 <51±10>	60 <61±9>
0	7/10 <46±7>	5/10 <69±3>	50 <86±7>

B) Pretreatment with NY-198

NY-198 (100 mg/kg, p.o.) + Fenbufen (100 mg/kg, p.o.)	Number of mice with convulsions		Mortality (%)
	Clonic convulsion	Tonic convulsion	
Pretreatment time			
8 h	0/10	0/10	0
6 h	0/10	0/10	0
4 h	0/10	0/10	0
2 h	6/10 <38±8>	3/10 <39±3>	30 <50±5>
1 h	7/10 <30±5>	7/10 <38±4>	70 <46±6>
0	7/10 <46±7>	5/10 <69±3>	50 <86±7>

The number of mice that showed convulsions or died were determined 2 h later.

< > : time until appearance, mean ± S.E. (min).

Table 5. Effects of NY-198 and enoxacin on theophylline-induced convulsions and mortality in ddY mice

Drug	Dose (mg/kg, p.o.)		Number of mice with convulsions		
	Theophylline	Antimicrobial drug	Clonic convulsion	Tonic convulsion	Mortality (%)
Theophylline + NY-198	140 ^{a)}	200 ^{a)}	0/10	0/10	0
	280 ^{b)}	400 ^{b)}	5/10 <105±15>	4/10 <127±2>	50 <120±7>
Theophylline + Enoxacin	140 ^{a)}	200 ^{a)}	0/10	0/10	0
	280 ^{b)}	400 ^{b)}	8/10 <146±5>	8/10 <146±5>	80 <146±5>
Theophylline	280 ^{b)}	—	7/20 <84±22>	5/20 <129±25>	35 <128±20>

Theophylline and the antimicrobial drug were administered at the same time. Each dose of a) and b) corresponds to about 20 and 40 times the clinical dosage, respectively. The mice were fasted for 24 h before testing. The number of mice that showed convulsions or died was determined 3 h later.

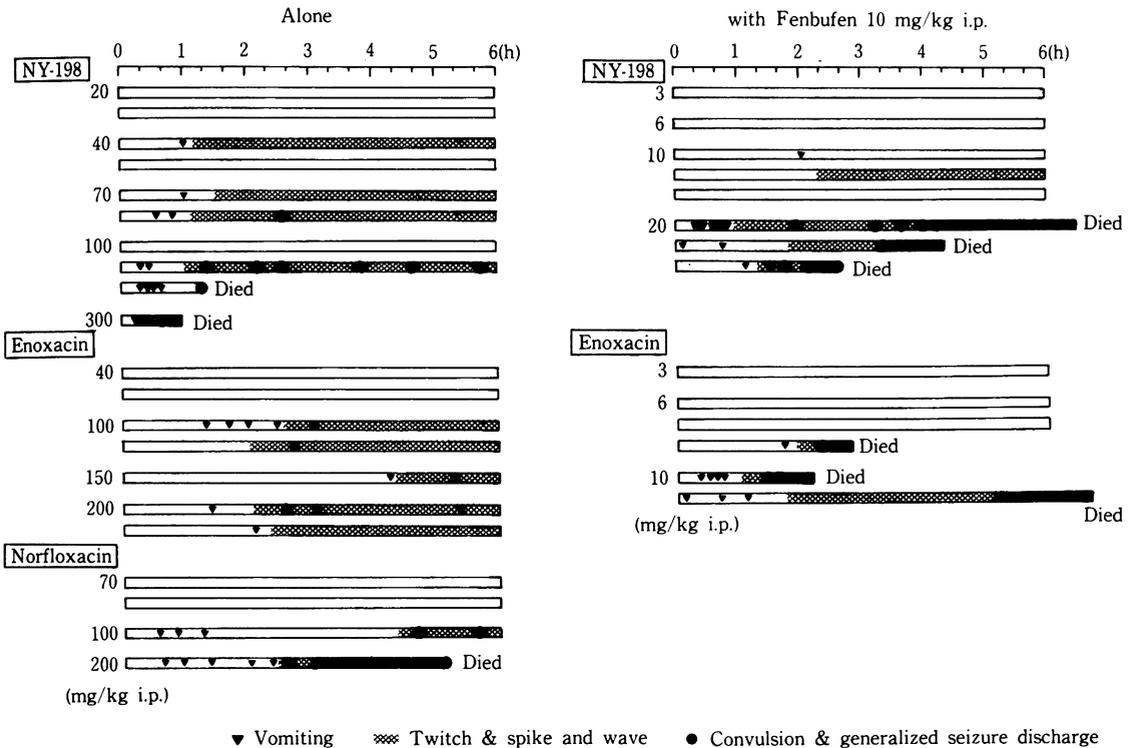


Fig. 2. Seizure discharges induced by NY-198 and reference compounds with and without fenbufen in cats

発して全例死亡した (Fig. 2, 3)。ENX 3mg/kgとFB 10mg/kgとの併用では脳波と行動に著変は認められなかったが、ENX 6mg/kgとFB 10mg/kgを併用した1/2例で脳波の賦活と嘔吐、流涎が現れ、2時間後には著明な間代性痙攣を伴う全般的発作発射が頻発し、3時間後に死亡した。10mg/kg同士の併用では2/3例で嘔吐が多発し、心拍数、呼吸数の増加およびNY-198と同様の著明な脳波の賦活が現れ全般的発作発射が頻発し、1例は2時間後に、他の1例は6.5時間後に痙攣のため死亡した (Fig. 2, 4)。一方、OFLX 40mg/kgとFB 10mg/kgの併用でも著明な脳波の賦活、嘔吐、心拍数、呼吸数の増加が現れ、1/2例では4~6時間後に spike & wave が出現したが、全般的発作発射には至らなかった。

3. 痙攣発生機序の解析

1) 薬動学的解析

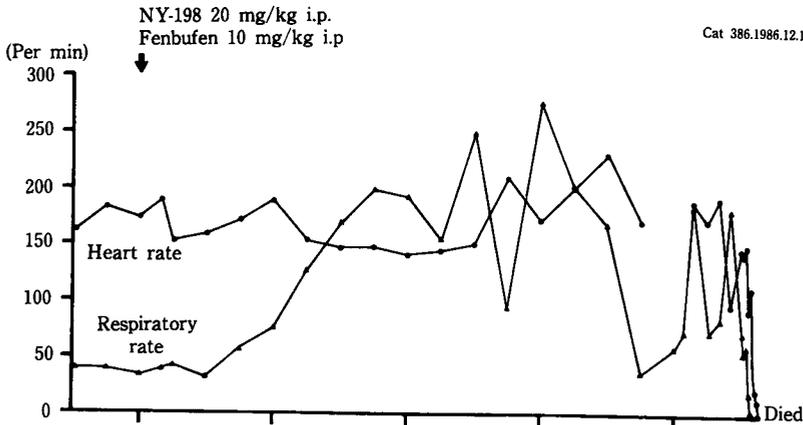
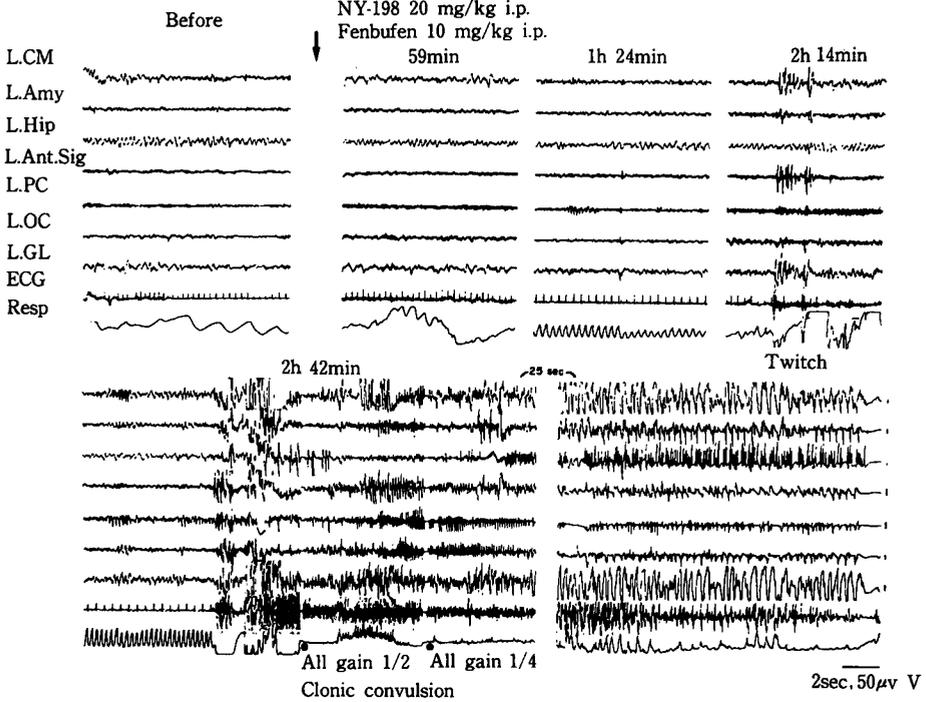
i) 血清中および脳内のNY-198の濃度推移: [^{14}C]-NY-198 50mg/kgをマウスに経口投与し4時間後まで血清中および脳内濃度を測定した。FB 50mg/kgを併用投与すると両者の濃度は[^{14}C]-NY-198単独投与時のそれより幾分低い値を示したが、全般的な濃度推移には単独投与時と併用時との間で大きな違いのないことがわかった (Fig. 5)。また、この時の薬動学的パラメータ

一、 C_{max} 、 T_{max} 、 $T_{1/2}$ 、 AUC_{0-t} にも著変は認められなかった (Table 6)。

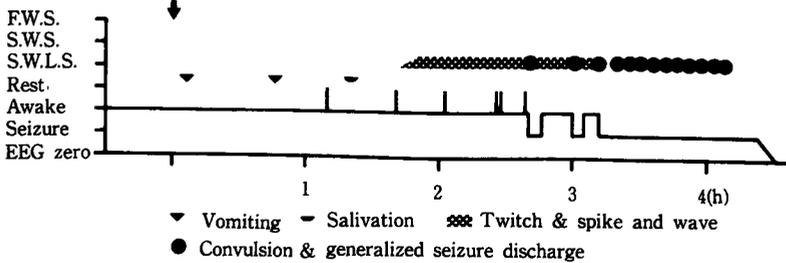
ii) 血清中および脳内のFB、BPAAおよび γ -OHの濃度推移: FB、BPAAおよび γ -OHの血清中および脳内濃度は[^{14}C]-NY-198 50mg/kgを併用投与しても上昇することはなく、むしろFBの吸収はやや遅延する傾向が認められた (Fig. 6)。またNY-198の併用によりFB、BPAAおよび γ -OHの C_{max} の減少、 T_{max} と $T_{1/2}$ の延長傾向などがみられたが、単独投与時と併用時との間の全般的な血清中および脳内濃度推移には大差がなく、また AUC_{0-t} にも影響は認められなかった (Table 6)。

iii) 痙攣発現時の未知代謝物の検索: 痙攣発現時に血清中または脳内に特異的な未知代謝物が生成されるか否かを確認するために、痙攣発生例と非発生例についてHPLCクロマトグラムの比較を行った。すなわち、[^{14}C]-NY-198 100mg/kgを単独に経口投与し痙攣が発生しなかった個体の血清中および脳内代謝物のHPLCクロマトグラムとFB 100mg/kgを併用し痙攣が発生した個体のクロマトグラムを比べると全く同様のパターンであり、痙攣発現例に特異的なピークが現れることはなかった (Fig. 7)。同様に、FB 100mg/kgを単独投与した時の血

Cat 386.1986.12.1



Cat 386.1986.12.1



CM: centremedian nucleus of thalamus, Amy: amygdala, Hip: hippocampus, Ant. Sig: anterior sigmoid gyrus, PC: parietal cortex, OC: occipital cortex, GL: lateral geniculate body, EMG: electromyogram, ECG: electrocardiogram, Resp: respiratory movement, FWS: fast wave sleep, SWDS: slow wave deep sleep, SWLS: slow wave light sleep
 Fig. 3. Changes in polygram caused by combined injection of NY-198 and fenbufen in cat

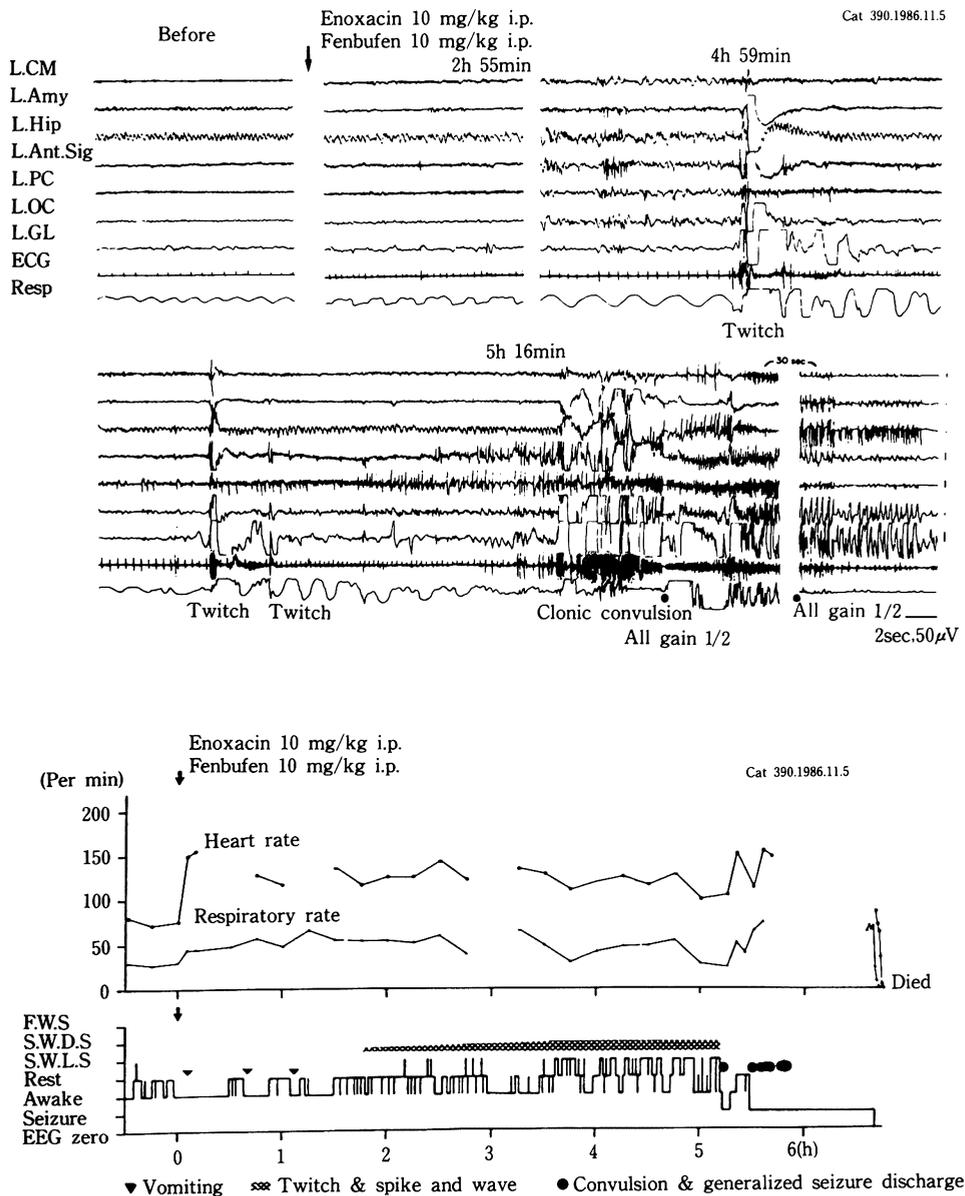


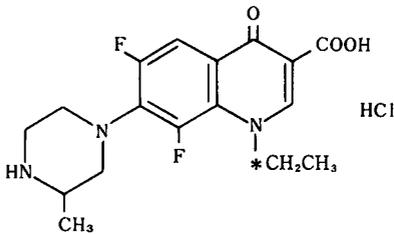
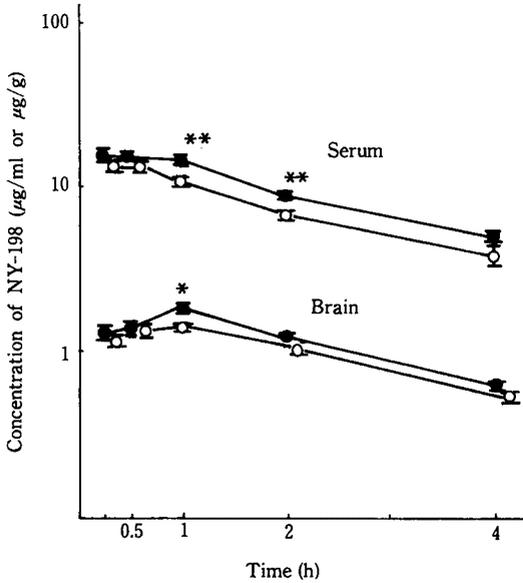
Fig. 4. Changes in polygram caused by combined injection of enoxacin and fenbufen in cats

清および脳のクロマトグラムと $[^{14}\text{C}]$ -NY-198 100mg/kgを併用し痙攣が発生した時のクロマトグラムを比較したが両者の間に差はなく、未知代謝物の生成を示唆する特異的なピークの出現はなかった (Fig. 8)。

iv) 血清中濃度と痙攣の相関：マウスに $[^{14}\text{C}]$ -NY-198およびFBをそれぞれ25~300mg/kgの間のいろいろの用量で同時に経口投与した際の痙攣発生の有無と血清中NY-198濃度(横軸)に対する血清中FB, BPAAおよび γ -OH濃度(縦軸)との関係(痙攣閾値濃度)を求め Fig. 9~11に示した。すなわち、NY-198とFBの場

合はNY-198の血清中濃度が約 $10\mu\text{g/ml}$ 以上で、FBの濃度が約 $60\mu\text{g/ml}$ 以上になった時(Fig. 9)に、 γ -OHの場合はNY-198と γ -OHの濃度がともに $10\mu\text{g/ml}$ 以上になった時に痙攣が発生した (Fig. 10)。しかし、NY-198とBPAAの痙攣閾値濃度については明瞭な相関関係が認められなかった (Fig. 11)。

v) 血清蛋白結合率：マウスに $[^{14}\text{C}]$ -NY-198およびFBをそれぞれ50mg/kgずつ単独および同時に経口投与し0.25および0.5時間後における血清蛋白結合率を求めた。各結合率はNY-198 17~18%, FB 96~97%,



* ¹⁴C-labeled position

●-● : single group, ○-○ : combined group
 Significantly different from combined group:
 (*) : p < 0.05, (**) : p < 0.01
 Each point represents the mean ± S.E. for six mice.

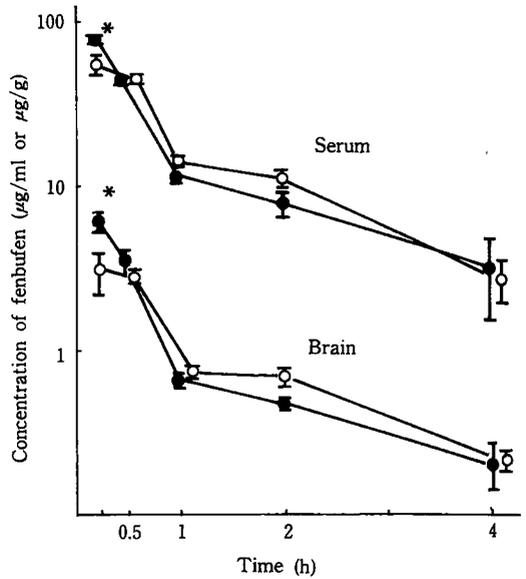
Fig. 5. Serum and brain concentration of NY-198 after single administration of ¹⁴C-NY-198 and combined administration of ¹⁴C-NY-198 and fenbufen to mice

BPAА 95~96%, γ-OH 86~88%であり, 単独投与時と併用時との間に差は認められなかった (Table 7).

2) 脳の物理的ならびに化学的刺激に対する作用

i) 電撃痙攣: NY-198, ENX, OFLX および FB の100および500mg/kgをマウスに単独経口投与したが, 電撃痙攣に対する増強作用は全く認められなかった。また, NY-198, ENX および OFLX と FB を同時に経口投与しても電撃痙攣に対する増強作用は全く認められなかった (Table 8)。

ii) Pentylenetetrazol 痙攣: OFLX および FB の



●-● : single group, ○-○ : combined group
 Significantly different from combined group:
 (*) p < 0.05
 Each point represents the mean ± S.E. for six mice.

Fig. 6. Serum and brain concentration of fenbufen after single administration of fenbufen and combined administration of fenbufen and ¹⁴C-NY-198 to mice

100および500mg/kgを経口投与しても pentylenetetrazol 痙攣に対する増強作用は認められなかった。しかし, NY-198および ENX の500mg/kgを投与した場合にはそれぞれ30%, 40%の痙攣が現れた。さらに, NY-198 と FB および ENX と FB を併用すると各単独投与時の1/2ないし1/3に相当する少量同士 (50~100mg/kg) の組み合わせから用量依存性に痙攣増強作用 (20~80%) が観察された。しかし, OFLX と FB の各100mg/kgを併用した群では痙攣の発生は認められなかった (Table 8)。

iii) Bemegride 痙攣: 各新キノロン剤および FB を単独に経口投与しても bemegride 痙攣に対する増強作用はなかった。しかし, NY-198と FB の100mg/kg同士の併用では70%の痙攣が, ENX と FB の50および100 mg/kg同士の併用ではそれぞれ40, 100%の痙攣が現れた。一方, OFLX と FB の併用では痙攣増強作用は認められなかった (Table 8)。

iv) Bicuculline 痙攣: OFLX および FB 100~500 mg/kgを単独経口投与しても bicuculline 痙攣に対する増強作用は全く認められなかった。しかし, NY-198または ENX 500mg/kgと bicuculline を併用経口投与すると

Table 6. Pharmacokinetic parameters for serum and brain concentration of NY-198, fenbufen, 4-biphenylacetic acid (BPAA) and γ -hydroxy-4-biphenylbutyric acid (γ -OH)

Compound	Specimen	Dosing method	Tmax (h)	Cmax (μ g/ml)	AUC _{0-t} (μ g·h/ml)	T1/2 (h)
NY-198	Serum	single	<0.25	15.30	38.15	1.98
		combined	<0.25	13.45	29.98	2.02
	Brain	single	1.00	1.85	4.70	1.93
		combined	1.00	1.42	4.01	2.09
Fenbufen	Serum	single	<0.25	77.91	59.59	1.56
		combined	<0.25	55.20	60.35	1.20
	Brain	single	<0.25	6.11	4.25	1.69
		combined	<0.25	3.07	3.66	1.53
BPAA	Serum	single	2.00	61.59	189.08	3.63
		combined	2.00	59.31	190.90	5.74
	Brain	single	0.50	3.59	10.15	1.94
		combined	2.00	3.21	10.00	2.92
γ -OH	Serum	single	<0.25	17.46	10.88	0.46
		combined	0.50	12.96	9.96	0.45
	Brain	single	0.50	4.08	3.06	0.55
		combined	0.50	3.57	2.43	0.66

Tmax: time at which maximum concentration was reached, Cmax: maximum concentration, AUC_{0-t}: area under the concentration-time curve calculated by trapezoidal method, T1/2: elimination half-life calculated by least squares method, single: NY-198 or fenbufen was administered alone, combined: NY-198 and fenbufen were administered at the same time.

Each value represents the mean for six mice.

それぞれ70%と40%の痙攣が現れた。さらに、NY-198 および ENX と FB をそれぞれ50, 100mg/kg 同士で併用すると bicuculline 痙攣はそれぞれ40~70%および50~60%に増強された。一方、OFLX と FB を併用した場合は bicuculline に対する痙攣増強作用は認められなかった (Table 8)。

3) ラジオレセプターアッセイ

i) [³H]-Diazepam 結合阻害作用: NY-198 および ENX は0.1~10 μ M で [³H]-diazepam の BDZ レセプターに対する特異的結合を阻害することはなかった。しかし、NY-198 は100 μ M および1000 μ M の高濃度でそれぞれ36, 81%, ENX は100 μ M および1000 μ M の高濃度でそれぞれ14, 25%の結合阻害作用を示した。一方、FB は0.1~100 μ M の濃度範囲で [³H]-diazepam の特異的結合に対して全く阻害作用を示さなかった。(Fig. 12, 左)。次に、NY-198 および ENX の0.1~1000 μ M と FB100 μ M を併用したが、新キノロン剤単独適用時の結合阻害作用が増強されることはなかった (Fig. 12, 右)。

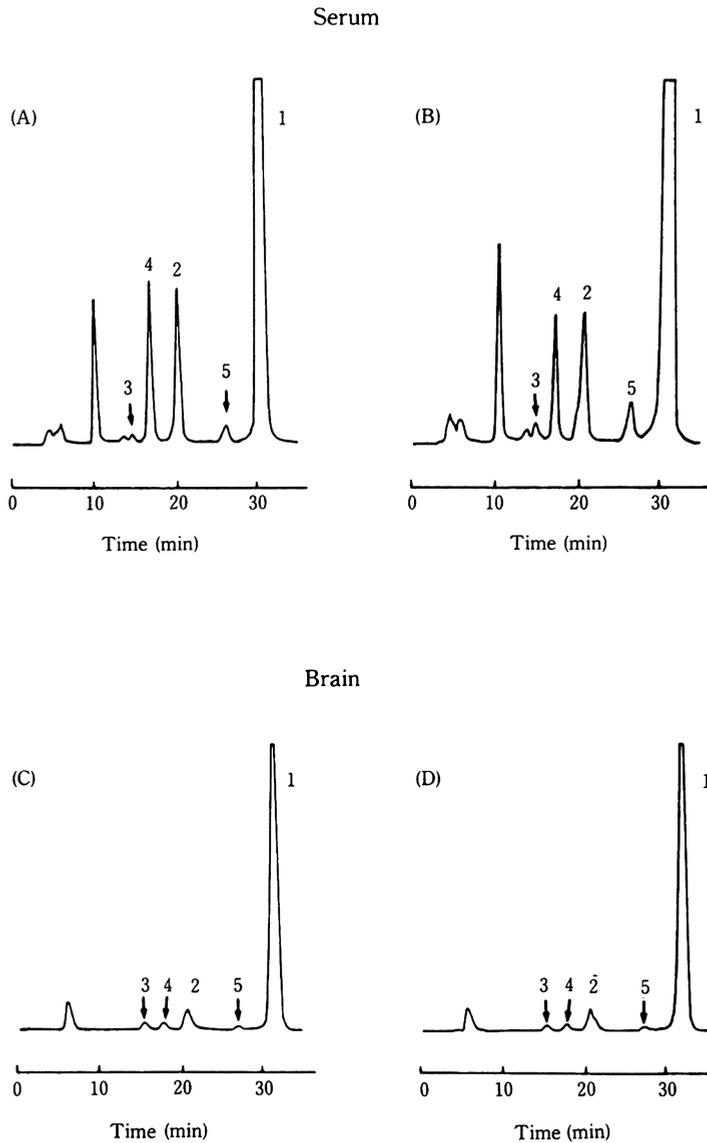
ii) [³H]-Muscimol 結合阻害作用: NY-198, ENX および OFLX は0.1~10 μ M の濃度範囲で [³H]

-muscimol の GABA レセプターに対する特異的結合を阻害することはなかったが、100 μ M の濃度ではそれぞれ 39.2, 48.9, 24.4% の結合阻害作用が現れた。しかし、FB および DCF は0.1~100 μ M の濃度範囲で (³H)-muscimol の結合に対する阻害作用を示さなかった (Fig. 13, 左)。次に FB 100 μ M と NY-198 および ENX を併用すると用量依存性に結合阻害作用が増強され、それぞれの Ki 値は12.5 および1.3 μ M になった。また、結合阻害作用の弱かった OFLX でも FB 100 μ M の併用により0.1~100 μ M の濃度範囲で阻害作用は13.1~47.2% に増強された (Fig. 13, 中)。一方、新キノロン剤と併用しても痙攣増強作用のなかった DCF 100 μ M を併用したが NY-198, ENX および OFLX は100 μ M の高濃度でそれぞれ49.8, 62.2, 38.3% の阻害作用を示したにすぎなかった (Fig. 13, 右)。

4. 痙攣抑制作用

1) マウスの行動解析

NY-198 と FB 各300mg/kg の併用によって100%誘発される痙攣は, diphenylhydantoin, trimethadion, phenobarbital, pentobarbital-Na, diazepam, baclofen および AOAA の前処置により全く抑制されな



(A), (C) : normal (^{14}C -NY-198 100 mg/kg)
 (B), (D) : occurrence of convulsions (^{14}C -NY-198
 100mg/kg + fenbufen 100 mg/kg)
 1 : NY-198, 2 : M-III 3 : M-IV, 4 : M-V, 5 : M-VI

Fig. 7. HPLC chromatograms of mouse serum and brain after single administration of ^{14}C -NY-198 and combined administration of ^{14}C -NY-198 and fenbufen

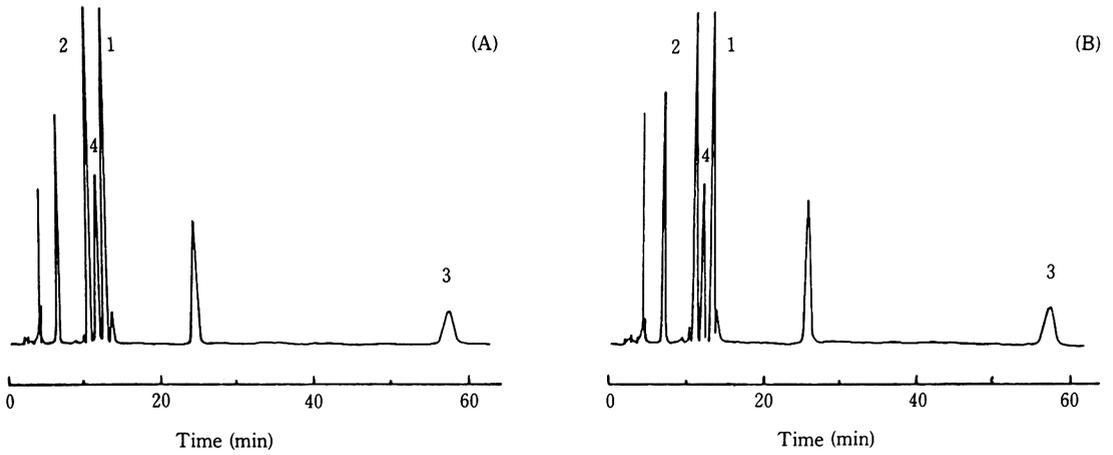
かった。しかし、barbital-Na 20mg/kgの前処置では軽度(10%)、muscimol 2~4mg/kgの前処置では20~80%の抗痙攣作用が認められた。一方、ENX 300mg/kgとFB100mg/kgの併用により100%誘発される痙攣に対して diazepam 10mg/kgの前処置では30%、muscimol 2~

4mg/kgの前処置は30~70%の抗痙攣作用が現れた (Table 9)。

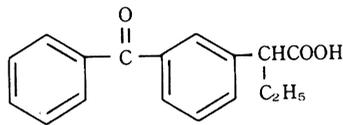
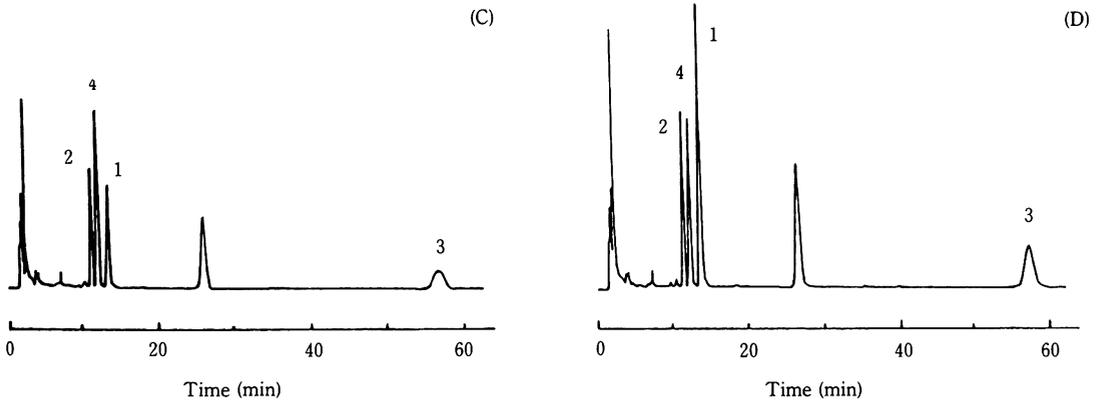
2) ネコの脳波による解析

i) 抗痙攣薬の前処置: NY-198 20mg/kgとFB 10mg/kgの同時腹腔内投与によって100%誘発される痙攣

Serum



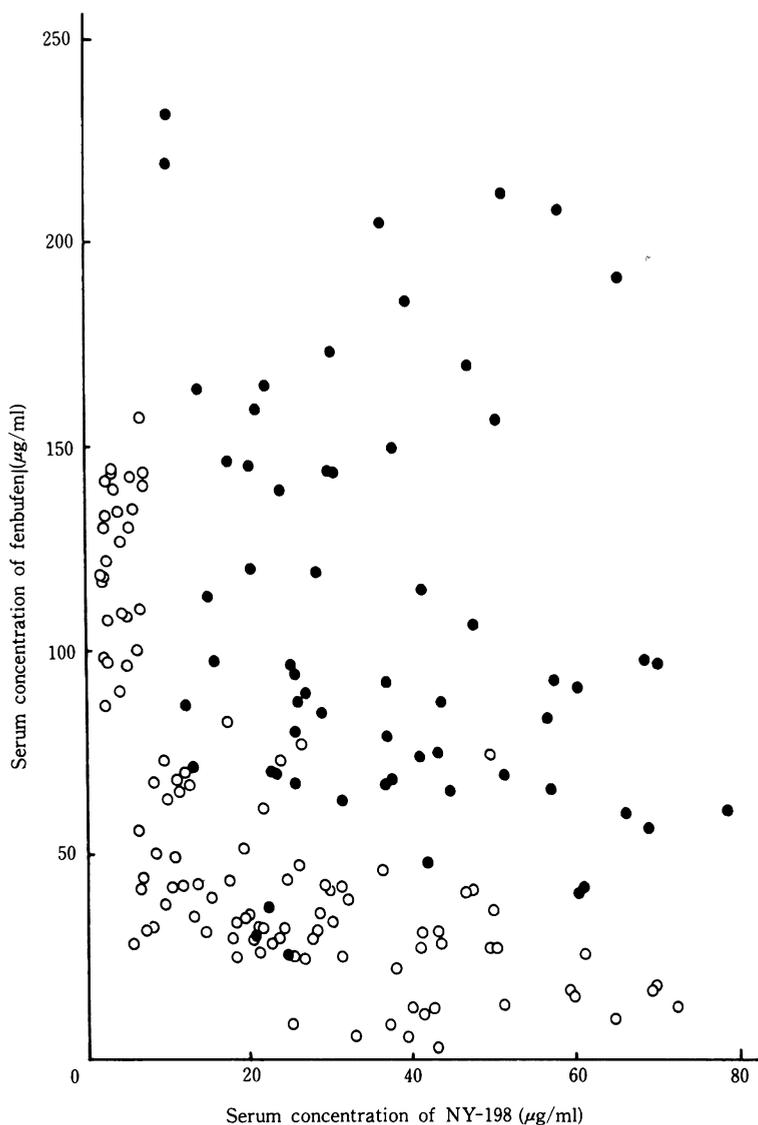
Brain



NO-675 (Internal standard)

(A), (C) : normal (fenbufen 100 mg/kg)

(B), (D) : occurrence of convulsions (fenbufen 100 mg/kg + ^{14}C -NY-198 100 mg/kg)1 : fenbufen, 2 : 4-biphenylacetic acid (BPAA), 3 : γ -hydroxy-4-biphenylbutyric acid (γ -OH), 4 : NO-675 (internal standard)Fig. 8. HPLC chromatograms of mouse serum and brain after single administration of fenbufen and combined administration of fenbufen and ^{14}C -NY-198



○ : normal, ● : occurrence of convulsions

Fig. 9. Relationship between serum concentration of NY-198 or fenbufen and occurrence of convulsions after combined administration of ^{14}C -NY-198 and fenbufen to 170 mice

死に対して diazepam 1 mg/kgの前処置では抑制効果が認められなかった。2 mg/kgでは3例中2例で嘔吐が出現したものの、全例安定した徐波睡眠が持続し、痙攣は完全に抑制された (Fig.14)。phenobarbital 20mg/kgを投与した $\frac{3}{4}$ 例では痙攣が完全に抑制され、さらに50mg/kgに増量すると2例とも安定した徐波睡眠が続き、嘔吐も現れず痙攣の発生は完全に抑制された (Fig.14)。しかし、diphenylhydantoin 20mg/kgを前処置 (経口) した個体では痙攣の抑制は認められなかった。

ii) 抗痙攣薬の後処置: NY-198 20mg/kgとFB 10 mg/kgを同時に腹腔内投与すると全般性発作発射と間代性痙攣が現れ、ネコは全例死亡する (Fig. 2)。同じ用量のNY-198とFBの併用によりすでに発生した間代性痙攣と全般性発作発射は diazepam 2mg/kgまたは pentobarbital-Na 20mg/kgの静脈注射により完全に抑制され、死亡例もなかった。また diazepam を静脈注射した場合は直後より痙攣波が完全に抑制され、脳波背景活動は徐波深睡眠 (SWDS) パタンに変わり、著明に増加

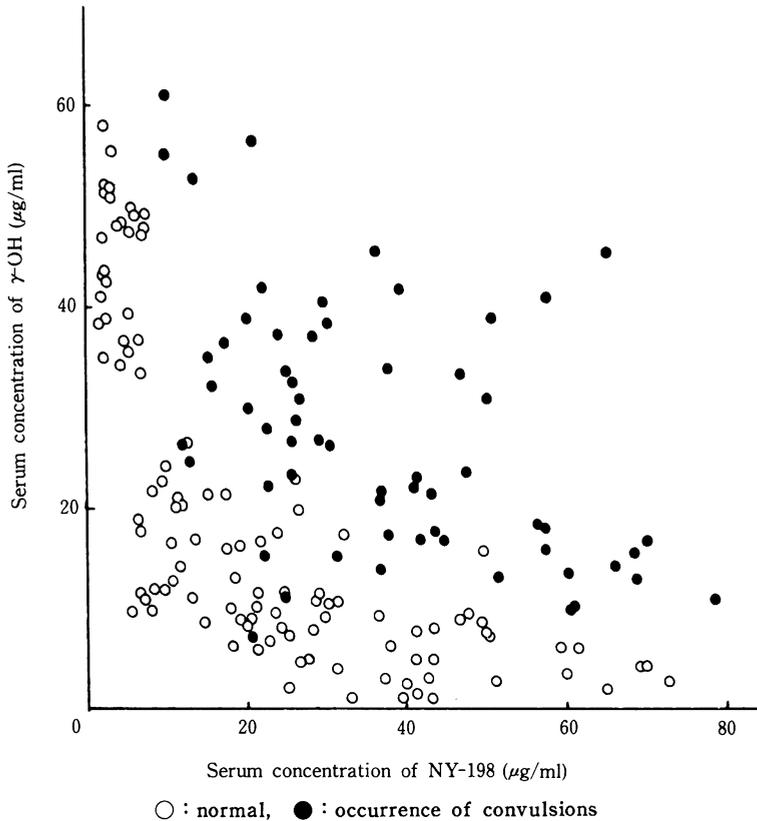


Fig. 10. Relationship between serum concentration of NY-198 or γ -hydroxy-4-biphenylbutyric acid (γ -OH) and occurrence of convulsions after combined administration of ^{14}C -NY-198 and fenbufen to 170 mice

していた呼吸数は急速に対照レベルに回復した (Fig. 15)。pentobarbital-Na を投与した場合は直後より麻酔に入り痙攣波が完全に抑制され、著明に増加していた呼吸数も対照レベルに回復した (Fig.15)。

IV 考 察

NY-198は一般に新キノロン剤と呼ばれるピリドンカルボン酸系合成抗菌剤の一つで抗菌作用は OFLX と同程度であるが¹²⁾、各種毒性試験や一般薬理試験の結果から安全性の高い抗菌剤であることが証明された¹³⁾。しかしながら、NY-198はFBと併用した際にヒトで痙攣発作を惹起した ENX⁹⁾と近似した化学構造を有し、また一般薬理試験において ENX と同様 pentylenetetrazol 痙攣を増強する作用があり、イヌに単独投与した場合痙攣発作の起ることが判ったため¹³⁾、改めて NY-198について中枢作用を精査することにした。

まず、マウスに NY-198を含む新キノロン剤を1000 mg/kgまで単独大量経口投与したが、72時間の観察中痙攣はもとより振戦、攣縮、挙尾、疾走、跳躍、歯ならしなどの中枢興奮を示唆する行動変化は全く認められなかった。一方、慢性電極植込みネコに NY-198(70mg/kg以上)を単独腹腔内投与(経口投与では嘔吐が発現し、薬物を吐出するため)すると、頻回に嘔吐が現れ、呼吸数と心拍数の増加および脳波の賦活があり、やがて新皮質系に spike & wave が現れ、個体によっては全般性発作発射と間代性痙攣に発展した。同様に、NFLX 100~200 mg/kgの投与でも全般性発作発射と間代性痙攣が出現したが、ENX では200mg/kgの投与によっても spike & wave の発生にとどまり、全般性発作発射は出現しなかった。一方、OFLX では200mg/kgまで脳波の強い賦活が認められただけであった。このように動物種と薬物により程度の差はあるが、新キノロン剤には全て中枢神経刺

激作用のあることが判った。ただネコによる痙攣誘発作用が NY-198 で最も強く現れた原因として、NY-198 の溶解性や吸収が良かったことがあげられる。事実、嘔吐、呼吸数の増加、脳波賦活などの諸作用の発現が NY-198 では投与後 30~60 分と早く、一方、ENX では 1~4 時間後と著しく遅延し、吸収速度の違いが裏付けられた。

次に、マウスに FB, DCF, IDM, KPF, IPF などの非ステロイド系抗炎症薬を 500mg/kg まで単独に経口投与したが中枢神経刺激症状は全く認められなかった。ただ、消化管潰瘍に起因すると思われる死亡例が一部の薬物で認められ、安息香酸系の ASA では軽度の jumping 行動、大量で痙攣が現れた。一方、ネコに FB 200mg/kg を腹腔内投与すると投与 10 分以降に数回の嘔吐が発現、 $\frac{1}{2}$ 例は不眠傾向を示し死亡した。しかし、脳波および行動上にはとくに中枢神経刺激作用を示唆する変化は認められず、むしろ大量の腹水の貯留が認められたことから死因は末梢作用によるものと思われた。このように、マウスの行動解析だけでは判然としなかった中枢神経刺激作用も無麻酔、無拘束ネコの脳波と行動を指標にすると各薬物の薬理作用の特徴が判然とし、その結果抗炎症薬よりはむしろ、新キノロン剤自身により著明な中枢神経刺激作用のあることが明らかになった。

しかし、ヒトで現れた痙攣発作は ENX または FB の単独投与によるものでなく、両薬物の併用投与によって発生したものであるため、我々はこの薬物相互作用を重視し次の試みとして、NY-198 と市販の 27 種の抗炎症薬を臨床用量の 20 倍同士でマウスに同時経口投与した時の痙攣誘発作用を検討した。すなわち、NY-198 と 27 種の抗炎症薬を臨床用量の 20 倍同士で経口的に併用した場合、ASA を除けば痙攣が発生したのは FB, NPX, FPF の 3 種で、さらに 10 倍量に減量した場合は FB のみであった。同様の現象は ENX および NFLX と FB を組み合わせ投与した場合にも認められた。すなわち、一部のアール酢酸系およびアールプロピオン酸系抗炎症薬には新キノロン剤の中枢作用を増強する作用があり、とくに FB は各新キノロン剤に対して特異的に痙攣を誘発する作用があり、中でも ENX と併用した時に顕著であることが判った。

このように新キノロン剤と FB をマウスに同時に経口投与するとかなりの高率で痙攣が発生することが明らかになったので、次に両薬物の投与間隔をどれだけ開ければ薬物相互作用が消失するかを調べた。その結果、NY-198 と FB を臨床量の 10 倍 (100mg/kg) または 20 倍同士で併用すると、どちらの薬物を先に投与してもそれぞれ 6 または 12 時間以上の投与間隔をおけば痙攣は起らないことが明らかになった。

前述のように ENX の薬物相互作用は ENX がヒト

で theophylline の作用を増強し、痙攣を含む重篤な副作用を誘発したことに端を発しているため、次に NY-198 と theophylline との相互作用を調べた。しかし、NY-198 は臨床用量の 40 倍まで theophylline 痙攣を増強することはなかった。一方、ENX は WIJNANDS²⁾ や MAESEN³⁾ がヒトで経験したのと同様にマウスでも theophylline 痙攣を明らかに増強した。

前述のように無麻酔、無拘束ネコでは新キノロン剤の単独投与により用量依存性に痙攣が発生したが、小量 (10 mg/kg i.p.) の FB を併用すると NY-198 では 20mg/kg で、ENX ではさらに低い 6~10mg/kg の用量で痙攣が発生した。つまり、新キノロン剤単独投与時と FB 併用時の痙攣増強作用の比率は NY-198 が 5 倍程度であったのに対し、ENX では 20 倍以上となり ENX と FB との間の薬物相互作用は NY-198 と FB のそれよりも著しく強いことが明らかになった。なお、痙攣波は初め新皮質前頭領および視床核など個体発生学的には新しい脳構造から現れ、その後全誘導に波及し、全般性発作発射へと発展する特徴を有している。

次に、新キノロン剤と FB の併用による痙攣発生の機序を解明するため、2、3 の検討を加えた。前述のように ENX と theophylline を併用したヒトで発生した薬物相互作用は ENX が theophylline の代謝様式を変え、その血中濃度を異常に高め、かつ T $\frac{1}{2}$ を延長したためと言われている²⁾。このため新キノロン剤と FB を併用した場合の痙攣発現にも各薬物の血中濃度ないし脳内濃度の上昇、新しい痙攣誘発物質の生成の可能性あるいは血清蛋白結合率の変化などが充分に想されたので、まずマウスを使って薬動力学的解析を行った。しかし、NY-198 と FB を同時に経口投与しても NY-198、FB および FB の主活性代謝物であり¹⁾、またマウス尿中にも主代謝物として存在する BPAA、 γ -OH⁷⁾ の血清中濃度および脳内濃度は各薬物を単独投与した時と大差がなかった。また、その血中と脳内濃度の推移もほぼ同様なので、NY-198 と FB の併用によりその代謝過程が大きく修飾されたとは考えられない。さらに、NY-198 と FB を同時投与した際、痙攣を発現した動物における NY-198 および FB の代謝パターンは血清中、脳内とも各薬物単独投与時のそれと相違がなかった。従って両薬物を併用することにより発生した痙攣が新たに生成した未知代謝物に起因するという可能性は否定された。また、NY-198、BPAA、 γ -OH の血清蛋白結合率も単独、併用投与との間で差が認められなかった。これらの成績は前述の脳内濃度推移を調べた際、両薬物の単独投与と併用投与との間で差がなかったという成績をよく反映しているものと思われる。

以上のように、NY-198 と FB を併用しても両薬物の

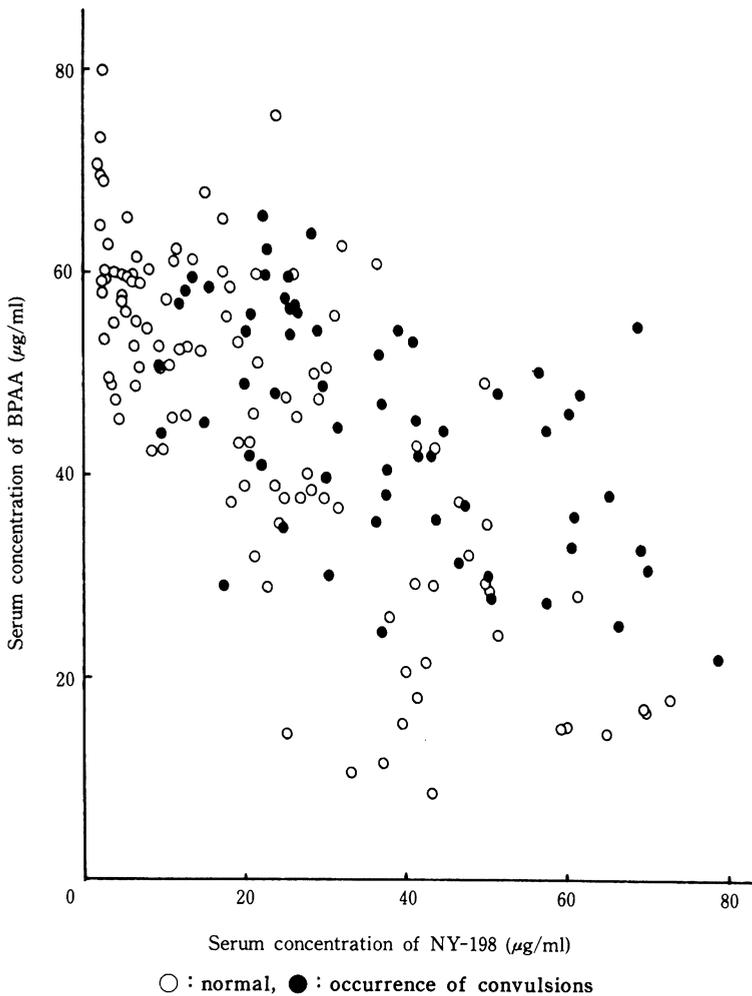


Fig. 11. Relationship between serum concentration of NY-198 or 4-biphenylacetic acid (BPAA) and occurrence of convulsions after combined administration of ^{14}C -NY-198 and fenbufen to 170 mice

体内動態に大きな違いはなかったので痙攣発生の原因を薬動学的変化に求めることはできなかった。しかしながら、両薬物を併用した時の NY-198 と FB および γ -OH の血清中濃度と痙攣発生との間にはある相関関係がある模様で、これを仮りに痙攣閾値濃度とみなすと、NY-198 が約 $10\mu\text{g/ml}$ で、同時に FB が約 $60\mu\text{g/ml}$ 、 γ -OH が約 $10\mu\text{g/ml}$ に達した個体で痙攣が発生していることが明らかにされた。すなわち、NY-198 と FB を併用したマウスが痙攣を発現するための条件の一つとして、NY-198 と FB もしくは γ -OH の血清中濃度が共にある濃度以上に達することが必要なかもしれない。

よく知られているように抗てんかん薬開発に際してのスクリーニング法としてヒトの大発作には最大、最小電

撃痙攣が、またヒトの欠神発作の最良のモデルとして pentylenetetrazol 痙攣が挙げられている¹⁵⁾。また、扁桃核電気刺激による kindling¹⁶⁾ や GABA antagonist および GAD-inhibitor などに対する拮抗作用も抗痙攣薬の作用機序を知る上で重要な手がかりになると言われている^{15,17)}。それ故、新キノロン剤と痙攣誘発作用を有する各種の中樞興奮薬との相互作用を調べれば新キノロン剤の痙攣発生機序を知るための有力な手がかりが得られるのではないかと考えた。そこで、マウスの行動を指標に 2, 3 の中樞興奮薬に対する新キノロン剤の影響を検討した結果、NY-198 や ENX は単独で BDZs の antagonist とされている pentylenetetrazol, barbiturates の antagonist の bemegride, とくに GABA_A レセプター

Table 7. Serum protein binding of NY-198, fenbufen, 4-biphenylacetic acid (BPAA) and γ -hydroxy-4-biphenylbutyric acid (γ -OH)

Time (h)	Dosing method	Serum protein binding (%)			
		NY-198	Fenbufen	BPAA	γ -OH
0.25	single	17.5 \pm 0.6	96.4 \pm 0.2	95.7 \pm 0.3	87.5 \pm 0.7
	combined	16.7 \pm 0.9	96.0 \pm 0.4	95.4 \pm 0.6	86.2 \pm 0.9
0.50	single	17.9 \pm 0.5	96.5 \pm 0.3	94.8 \pm 0.4	87.8 \pm 1.0
	combined	16.9 \pm 0.7	96.6 \pm 0.2	95.7 \pm 0.2	86.0 \pm 0.7

single: NY-198 or fenbufen was administered alone.

combined: NY-198 and fenbufen were administered at the same time.

Each value represents the mean \pm S. E. for six mice.

Table 8. Effects of NY-198, enoxacin, ofloxacin, fenbufen and their combinations on electroshock-, pentylenetetrazol-, bemegride- and bicuculline-induced convulsions in ddY mice

Compound	Dose mg/kg p.o.	No. of mice	Appearance of convulsions (%)			
			ES ¹⁾	PTZ ²⁾	BG ³⁾	BCL ⁴⁾
1% Gum arabic		20	0	0	5	5
NY-198	100	10	0	0	10	10
	500	10	0	30	20	70
Enoxacin	100	10	0	10	10	10
	500	10	0	40	10	40
Ofloxacin	100	10	10	0	0	
	500	10	0	0	0	10
Fenbufen	100	10	0	0	0	0
	500	10	0	0	0	10
NY-198 + Fenbufen	25 + 25	10			0	10
	50 + 50	10		20	20	40
	100 + 100	10	10	50	70	70
Enoxacin + Fenbufen	25 + 25	10		10	0	10
	50 + 50	10		30	40	50
	100 + 100	10	10	80	100	60
Ofloxacin + Fenbufen	100 + 100	10	0	0	0	10

All compounds were given 30-60 min prior to the convulsants.

- 1) ES: Electroshock (10mA, 1 msec, 50Hz, 0.2 sec)
- 2) PTZ: Pentylenetetrazol (41 mg/kg, i.p., observed for 30 min)
- 3) BG: Bemegride (13 mg/kg, i.p., observed for 30 min)
- 4) BCL: Bicuculline (0.4 mg/kg, i.v., observed for 10 min)

の antagonist と言われている bicuculline による痙攣¹⁸⁾を用量依存性に特異的に増強し、さらにこれらの作用は FB を併用すると著しく増強されることが判った。これらの成績は新キノロン剤が OLSEN¹⁹⁾の GABA-BDZ-barbiturates 複合受容体に対して特異的な拮抗作用の有ることを想定するための有力な根拠となった。

そこで、ラット脳のシナプトゾーム分画を用いてラジオレセプターアッセイを行い、BDZ および GABA レセ

プターに対する各 agonist の特異的結合とこれに及ぼす新キノロン剤の影響を調べた。その結果、NY-198 は 100 および 1000 μ M の高濃度で大脳皮質の [³H]-diazepam 結合をそれぞれ 36, 81% 阻害したが、この阻害作用は FB 100 μ M を併用してもほとんど変化しなかった。一方、 [³H]-muscimol の GABA レセプターに対する特異的結合は NY-198 および ENX の各 100 μ M の濃度で 40~50% 阻害された。FB にはほとんどこの種の阻害

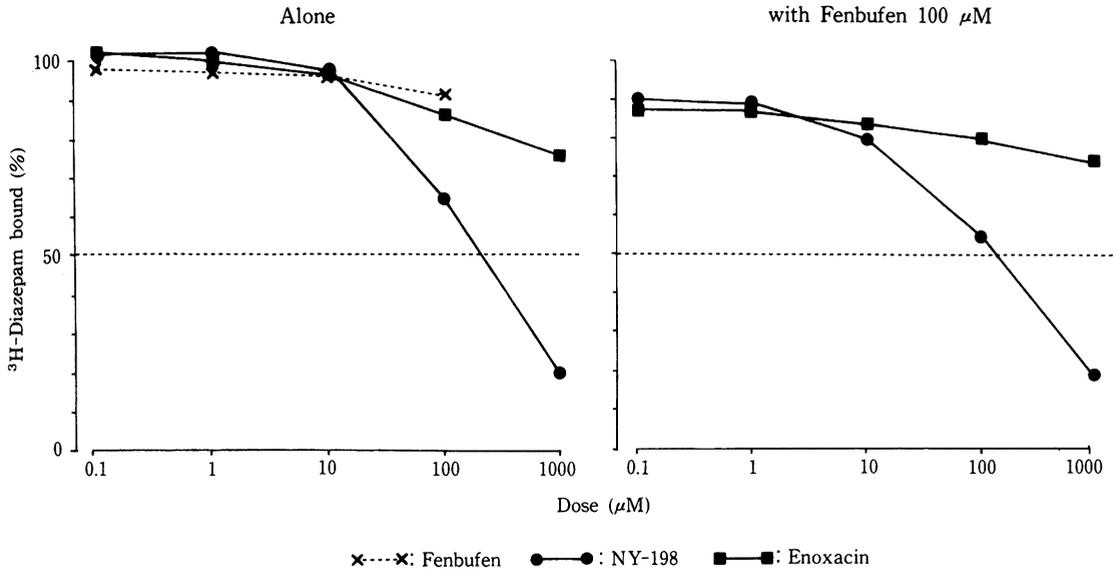


Fig. 12. Inhibitory effects of NY-198, enoxacin, fenbufen and their combination on ³H-diazepam binding to receptor site in rat cortex

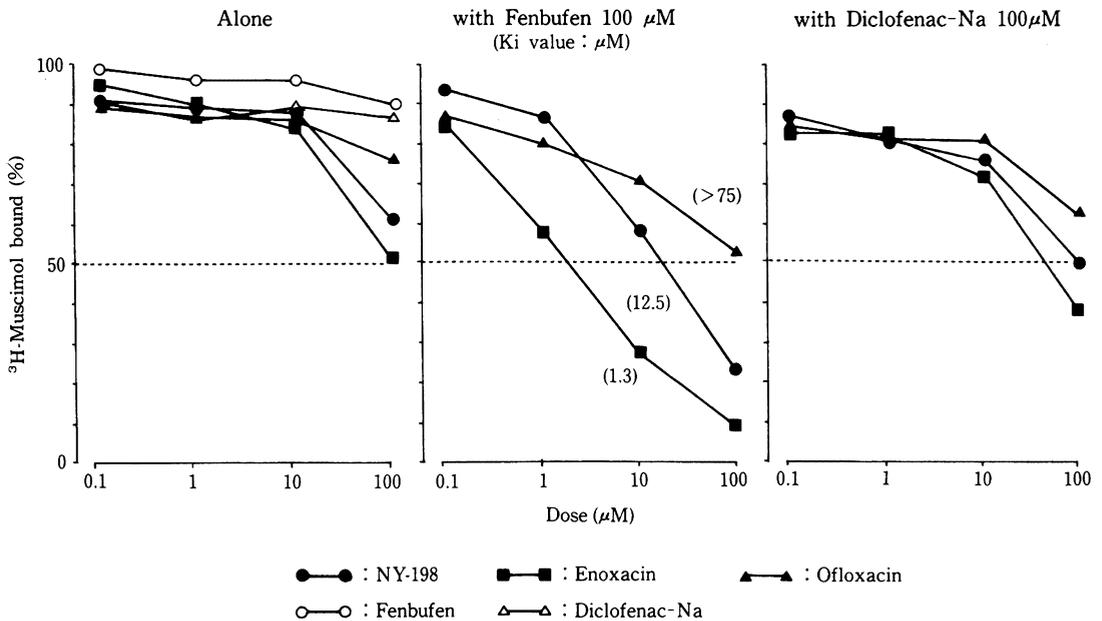


Fig. 13. Inhibitory effects of NY-198, enoxacin, ofloxacin, diclofenac-Na and their combinations on ³H-muscimol binding to receptor site in rat brain

作用はみられなかったが、NY-198およびENXの0.1~100 μ MとFB 100 μ Mを併用すると結合阻害作用は濃度依存性に著明に増強されKi値は12.5, 1.3 μ Mとなった。ところが新キノロン剤に対する痙攣増強作用のなかったDCFにはそれ自身結合阻害作用はなく、また各新キノロン剤の³H)-muscimol結合に対する阻害作用

を増強する作用もなかった。これらの成績はNY-198を含む新キノロン剤が10⁻⁶~10⁻³M濃度でラット脳のGABAレセプターに対する³H)-GABAあるいは³H)-muscimolの特異的結合を競合的に阻害するというTsuji²⁰⁾らの報告により支持された。これらの成績は各新キノロン剤がGABA-BDZレセプター、とくに

Table 9. Effects of some compounds on convulsions induced by the combination of NY-198 or enoxacin with fenbufen

Compound	Dose (mg/kg)	Route	Pretreatment (min)	Inhibition of convulsions (%)	
				NY (300) + FB (300)	ENX (300) + FB (100)
Control				0	0
Diphenylhydantoin	20	p. o.	60	0	0
Trimethadione	500	p. o.	60	0	0
Phenobarbital	50	p. o.	60	0	0
Barbital-Na	20	p. o.	60	10	
Pentobarbital-Na	50	i. p.	30	0	0
Diazepam	10	p. o.	60	0	30
Muscimol	1	i. p.	30	0	0
	2	i. p.	30	20	40
	3	i. p.	30	20	30
	4	i. p.	30	80	70
Baclofen	10	i. p.	30	0	0
AOAA	20	i. p.	60	0	0

Ten mice were used in all experiments except for the control (n=20)

NY: NY-198, ENX: enoxacin, FB: fenbufen

GABA レセプターに対する ligand の結合を阻害することを明らかにしたもので、誘発された痙攣の発生機序の一つの可能性を強く示唆しているものと思われる。

そこで、各新キノロン剤による痙攣がどの種の薬物によって抑制されるかをマウスを使って系統的に調べた。まず、NY-198およびENXとFBの併用によるマウスの痙攣発作には通常の抗痙攣薬 diphenylhydantoin, trimethadionは無効であった。このことは、新キノロン剤がマウスの電撃痙攣に対して殆んど影響を及ぼさなかった事実と相通じる現象と思われる。一方、GABA_Aレセプターに特異的な親和性を有する muscimol¹⁸⁾を前処置すると痙攣は用量依存性にかなりよく抑制された。muscimol 25~75ngをラットの黒質内に投与すると電撃や pentylenetetrazol 痙攣が抑制され^{21,22)}、扁桃体の電気刺激による kindling も抑制される²³⁾と言われている。さらに muscimol 50ngをマウスの脳室内に投与すると電撃痙攣閾値が高まり、また1.5mg/kgを腹腔内に注射すると diphenylhydantoin の抗電撃痙攣作用が増強されると言われている²⁴⁾。従って、今回新キノロン剤と抗炎症薬の併用により誘発された痙攣が muscimol により著明に抑制された事実は、本痙攣の発生が GABA 神経系と密接に関連していることを示唆する成績と思われる。この他、BDZレセプター-agonistで、強い抗pentylenetetrazolと抗bicuculline作用を有する diazepam¹⁵⁾もある程度有効な抗痙攣作用を示した。なお、bicuculline

非感受性GABA agonistのbaclofen¹⁸⁾およびGABA分解酵素抑制剤のAOAAでは抗痙攣効果が認められなかった。一方、ネコにphenobarbital (20mg/kg p.o.以上)またはdiazepam (2 mg/kg p.o.)を前処置しておくと、NY-198単独投与あるいはFBとの併用投与により誘発される痙攣脳波と間代性痙攣の発生は完全に抑制された。また、確実に痙攣死を招来する NY-198 (20mg/kg i.p.)とFB (10mg/kg i.p.)の併用により誘発された痙攣脳波と間代性痙攣は pentobarbital-Na (20mg/kg) または diazepam (2 mg/kg) の静脈注射により完全に抑制され、脳波は徐波化し、その他の随伴症状も対照レベルに回復した。すなわち、新キノロン剤とFBの併用により誘発される痙攣発生の程度および各抗痙攣薬の作用態度には多少の種特異性は認められたが薬理作用発現の方向は同じと判断された。

以上の成績から総合的に考察すると、NY-198を含む新キノロン剤には程度の差はあるが、すべて中枢神経刺激作用があり、FBおよび一部のプロピオン酸系抗炎症薬の併用により増強され、痙攣発作が誘発された。実験方法により NY-198の中枢神経刺激作用の現れ方は異なるが、ENXのおよそ1/2ないし1/3と判定された。また痙攣発作の機序は新キノロン剤が GABA-BDZ レセプターに対する ligand の結合を阻害したことにより一因があるのではないかと推定された。

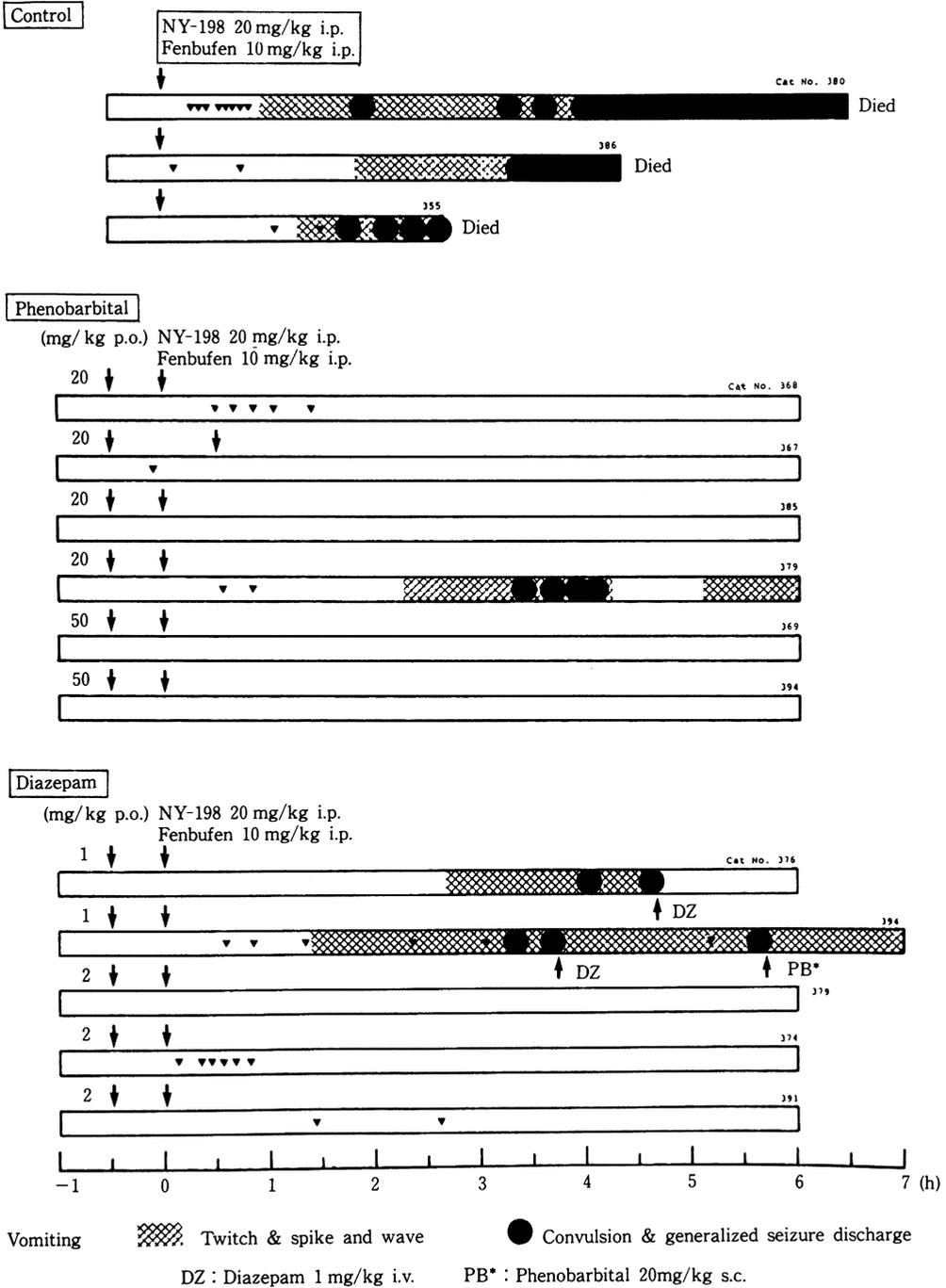


Fig. 14. Pre-treatment effects of phenobarbital and diazepam on seizure discharges caused by combined administration of NY-198 and fenbufen in cats

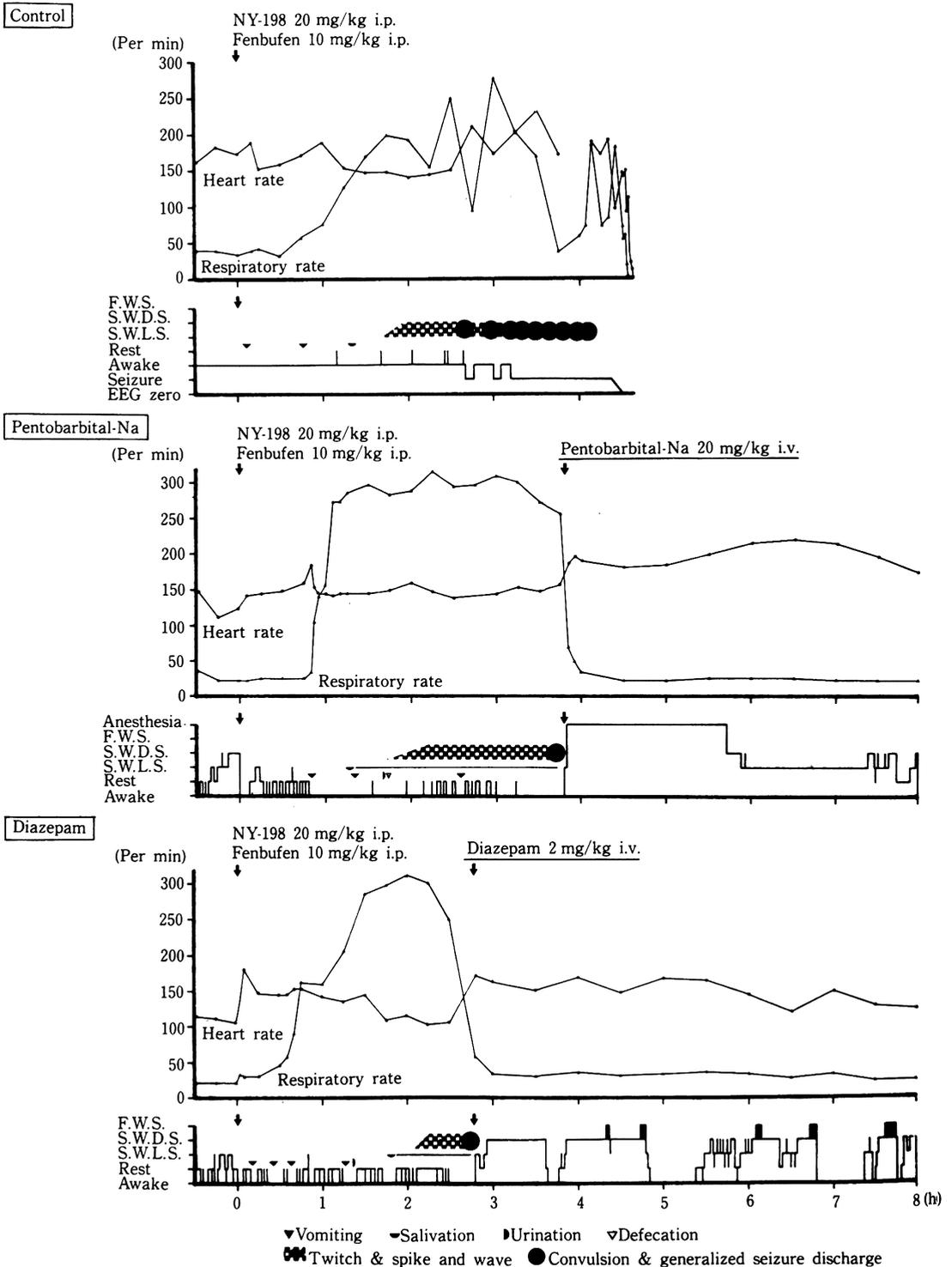


Fig. 15. Post-treatment effect of pentobarbital-Na and diazepam on seizure discharges caused by the combination of NY-198 and fenbufen in cats

謝 辞

稿を終わるにあたり、本研究の遂行に御協力を頂いた北陸製薬株式会社中央研究所の岩永裕氏、田中和男、垣内正人、沢田陽子、山口俊明、長谷川洋通の各氏、ラジオレセプターアッセイを担当された塩野義製薬株式会社研究所の高原幸雄、新宅治幸、永業正美、松下享の各氏、行動と脳波解析を担当された武居秀夫、竹内稔、小藪清孝、堀内裕一、広野悟の各氏に深甚なる謝意を表します。

文 献

- 1) 山本研一, 吉村弘二, 松下享: Cinoxacinの一般薬理作用(1)中枢神経系に対する作用. *Chemotherapy* 28 : 530~549, 1980
- 2) WIJNANDS, W.J.A.; C.L.A. van HERWAARDEN & T. B. VREE : Enoxacin raises plasma theophylline concentrations. *The Lancet* July 14 : 108~109, 1984
- 3) MAESEN, F.P.V.; J.P. TEENGES, C. BAUR & B.I. DAVIES: Quinolones and raised plasma concentrations of theophylline. *The Lancet* Sept.1 : 530, 1984
- 4) SIMPSON, K.J. & M.J. BRODIE : Convulsions related to enoxacin. *The Lancet* July 20 : 161, 1985
- 5) 厚生省薬務局: エノキサシンとフェンブフェンの相互作用による痙攣発作. 医薬品副作用情報 No.81 : 1986
- 6) 山本研一, 城戸良之助: 動物実験による中枢神経系作用薬物の解析: とくに脳波と行動の対応と分離の立場から. *脳と神経* 16 : 44~56, 1964
- 7) CHICCARELLI, F.S.; H.J. EISNER & G.E. VAN LEAR : Disposition and metabolism of fenbufen in several laboratory animals. *Arzneim.-Forsch.* 30 : 707~715, 1980
- 8) FLEITMAN, J.S.; S.G. SCHULMAN & J.H. PERRIN : High-performance liquid chromatography assay for fenbufen and two serum metabolites. *J. Chromatogr.* 228 : 372~376, 1982
- 9) 永田治, 山田健久, 高橋和余, 桶崎英一, 柳田知司, 中西秀樹: NY-198の体内動態 III—HPLC法によるサルにおける吸収, 代謝, 排泄—. *Chemotherapy* 36 (S-2) 144~150, 1988
- 10) MÖHLER, H. & T. OKADA : Benzodiazepine receptor: Demonstration in the central nervous system. *Science* 198 : 849~851, 1977
- 11) ZUKIN, S.R.; A.B. YOUNG & S.H. SNYDER : Gamma-aminobutyric acid binding to receptor sites in the rat central nervous system. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71 : 4802~4807, 1974
- 12) 桶崎英一, 大道光一, 小池祥二, 高橋慶衛, 牧野栄一: NY-198の細菌学的評価—*in vitro* および *in vivo* 抗菌作用—. *Chemotherapy* 36 (S-2) : 99~111, 1988
- 13) 森川宏二, 橋本繁輝, 岩永裕氏, 山内利栄: NY-198の一般薬理作用(1)中枢神経系および呼吸, 循環器系に対する作用. *Chemotherapy* 36 (S-2) : 265~283, 1988
- 14) CUISINAUD, G.; J. LEGHEAND, G. LLORCA, C. BELKAHIA, E. LEJEUNE & J. SASSARD : Pharmacokinetics of fenbufen in man. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 16 : 59~61, 1979
- 15) 村崎光邦: ベンゾジアゼピン系薬剤と抗けいれん効果. *神経精神薬理* 2 : 37~53, 1980
- 16) 佐藤光源, J.A. WADA : 新しい実験てんかんモデルとしての“kindling” preparation : 展望. *脳と神経* 27 : 257~273, 1975
- 17) WOOD, J.D. : The role of γ -aminobutyric acid in the mechanism of seizures. *Prog. Neurobiol.* 5 : 77~95, 1975
- 18) 栗山欣弥, 田口淳一, 大熊誠太郎: GABA レセプター—. *神経精神薬理* 5 : 887~896, 1983
- 19) OLSEN, R.W. : GABA-benzodiazepine-barbiturate receptor interactions. *J. Neurochem.* 37 : 1~13, 1981
- 20) TSUJI, A.; H. SATO, Y. KUME, I. TAMAI, E. OKEZAKI, O. NAGATA & H. KATO : Inhibitory effects of quinolone antibacterial agents on γ -aminobutyric acid binding to receptive sites in rat brain. *Antimicrob. Agents Chemother.* in press
- 21) IADAROLA, M.J. & K. GALE : Cellular compartments of GABA in brain and their relationship to anticonvulsant activity. *Mol. Cell. Biochem.* 39 : 305~330, 1981
- 22) IADAROLA, M.J. & K. GALE : Substantia nigra: Site of anticonvulsant activity mediated by γ -aminobutyric acid. *Science* 218 : 1237~1240, 1982
- 23) McNAMARA, J.O.; L.C. RIGSBEE & M.T. GALLOWAY : Evidence that substantia nigra is crucial to neural network of kindled seizures. *Eur. J. Pharmacol.* 86 : 485~486, 1983
- 24) CZUCZWAR, S.J.; B. CHMIELEWSKA, W.A. TURSKI & Z. KLEINROK: Differential effects of baclofen, γ -hydroxybutyric acid and muscimol on the protective action of phenobarbital and diphenylhydantoin against maximal electroshock-induced seizures in mice. *Neuropharmacology* 23 : 159~163, 1984

SEIZURE DISCHARGES INDUCED BY THE COMBINATION OF
A NEW QUINOLINECARBOXYLIC ACID ANTIMICROBIAL DRUGS
AND NON-STEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS

— EFFECT OF NY-198 ON THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM —

KEN-ICHI YAMAMOTO, YUKIO NAITOH, YUZURU INOUE and KOHJI YOSHIMURA
Shionogi Research Laboratories, Shionogi & Co., Ltd., Osaka

KOHJI MORIKAWA, OSAMU NAGATA, SHIGEKI HASHIMOTO, TAKEHISA YAMADA and SHINJI KUBO
Central Research Laboratory, Hokuriku Seiyaku Co., Ltd., Fukui

The effect of a new difluorinated quinolinecarboxylic acid, NY-198, on the central nervous system (CNS), especially the mechanism of seizure discharges induced by the interaction between NY-198 and non-steroidal anti-inflammatory drugs, was examined in mice, rats and cats and compared with those of new quinolones on the market. Depending on the animal species, NY-198 itself had a more or less stimulating action on the CNS, as do other quinolones. NY-198 caused convulsions and increased the effect of CNS stimulants, especially bicuculline, acting on the GABA-benzodiazepine (BDZ)-barbiturate receptor complex.

Also, in mice, combined oral administration of NY-198 and fenbufen or some arylpropionic acid anti-inflammatory drug caused convulsions, but this interaction was less than that seen with enoxacin. The seizure pattern elicited by the combination of NY-198 and fenbufen originated in the neocortex and thalamus and extended to all EEG leads in cats, and finally generalized seizure discharges developed. These seizures could be suppressed by muscimol, diazepam and barbiturates. The specific bindings of ^3H -diazepam and ^3H -muscimol to receptor sites in rat brain were inhibited by a high concentration of NY-198 and enoxacin alone. The inhibitory effect of these quinolones against ^3H -muscimol binding to the GABA_A receptor site was markedly potentiated by combination with fenbufen in a dose-dependent manner. Serum protein binding and pharmacokinetic parameters in mouse serum and brain, such as the concentration of NY-198 and fenbufen, were not influenced by this combination. In conclusion, we suggest that seizures induced by the interaction of NY-198 and fenbufen are involved in the inhibition of GABA-BDZ receptor binding by quinolones and that this interaction is 1/2 to 1/10 as potent as that seen with enoxacin.