

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

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

東京慈恵会医科大学第2内科*

近年のキノロン系抗菌薬の進歩には目覚ましいものがあるが、反面、その副作用も注目されてきている。とくに、エノキサシンと非ステロイド系消炎剤の一つであるフェンブフェンとの併用時に痙攣の発現をみたという報告がなされてより、その痙攣発現機序が注目を集めている。我々は、中枢神経系において抑制性伝達物質と考えられている GABA の受容体結合に及ぼす新キノロン系抗菌薬である T-3262 とその構造類似体の影響を検討した。

T-3262 を始めとする構造類似体は濃度依存的に GABA 受容体結合を阻害したが、その阻害効果は、他のキノロン系抗菌薬よりも弱いものであった。さらに、T-3262 は、非ステロイド系消炎剤の共存下においても、その阻害効果は、殆ど増強されなかった。

以上の *in vitro* の結果より、T-3262 は、痙攣誘発作用の弱い薬物であろう事が示唆された。また、非ステロイド系消炎剤との併用時においても、痙攣誘発作用の弱い薬物であろう事が示唆された。

Key words: 新キノロン薬, 痙攣, GABA 受容体結合

近年、キノロン系抗菌薬の開発には目覚ましいものがあり、多くの化合物が合成されている。キノロン系抗菌薬の母体ともいえるナリジクス酸 (NA) 以来、本系薬はその宿命的副作用として、中枢神経毒性を有することが認められている¹⁾。NA の大量投与により^{2,3)}、また、腎不全患者にピベミド酸 (PPA) を大量投与することにより痙攣が誘発されたという報告⁴⁾がある。とくに、1986 年、キノロン系抗菌薬の一つであるエノキサシン (ENX) と非ステロイド系消炎剤 (NSAIDs) の一つであるフェンブフェンとの併用時に痙攣が誘発されたとする報告⁵⁾があつてから、本系薬の中枢神経毒性、とくにその痙攣誘発機序が注目を集めている。我々は、キノロン系抗菌薬の痙攣誘発機序の一つとして、中枢神経系において抑制性伝達物質と考えられている γ -アミノ酪酸 (GABA) の受容体への結合を阻害することを示してきた⁶⁻⁸⁾。

一方、T-3262 は、ナフチリジン環を母核とする新しいキノロン剤である (Fig. 1)。従来の新キノロン系抗菌薬と異なり、7 位にアミノピロリジニル基を、1 位にジフルオロフェニル基を有している。しかし、キノロン系抗菌薬である以上、その中枢神経毒性発現の可能性が問題となる。今回、我々は、T-3262 およびその構造類似体 (Fig. 1, 2) の GABA 受容体結合に及ぼす影響を検討した。

I. 材料と方法

1) 試薬と化合物

T-3262 とその構造類似体は富山化学工業より供与され、フェンブフェンならびにビフェニル酢酸 (BPA) は日本レダリーより供与された。 $[^3\text{H}]$ -GABA (29.3 Ci/mmol) は、New England Nuclear より購入した。その他の試薬は、analytical grade を用いた。

2) マウス脳シナプス膜の調製

ddy マウス (♂, 体重 20~22 g) を断頭後、脳をすばやく取り出し、0.32 M しょ糖液を用い 10% ホモジェネートを作成した。そのホモジェネートより、遠心分離により粗ミトコンドリア画分を得、脳重量の 20 倍量の 10 mM カリウム・リン酸緩衝液 (pH 7.4) で低張処理したのち、ZUKIN らの方法⁹⁾により粗シナプス膜を得た。

上記の方法により得た粗シナプス膜を、120 mM の NaCl を含むカリウム・リン酸緩衝液 (pH 7.4) で 5 回洗浄し、シナプス膜とした。シナプス膜は、適当量のカリウム・リン酸緩衝液 (pH 7.4) に懸濁 (0.5 g/ml) し、 -20°C にて保存した¹⁰⁾。

3) GABA 受容体結合の測定

測定に先立ち、シナプス膜を 2 回 10 mM カリウム・リン酸緩衝液で洗浄し、測定に供した。GABA 受容体結合は、 $[^3\text{H}]$ -GABA のシナプス膜への特異的結合を遠心法により求めることにより GABA 受容体結合とした。

すなわち、400 μ l のカリウム・リン酸緩衝液中に [3 H]-GABA, シナプス膜, 各種薬剤を含む反応液を 4°C, 20 分反応させ、遠心により反応を停止させた。上清を吸引・除去したのち、冷水にてすばやく洗浄した。その後、ペレット中に存在する放射能を液体シンチレーションカウンターにより測定した。

特異的結合は、全結合（非標識 GABA 非存在下の結合量）より非特異的結合（1 mM の非標識 GABA 存在下の結合量）を差し引くことにより求めた。非特異的結合は、全結合の $21.5 \pm 2.7\%$ であった。

II. 結果

1) T-3262 及びその構造類似体の GABA 受容体結合に及ぼす影響

T-3262 をはじめとするナフチリジン環を母核とする 4 化合物（T-3262, T-3136, T-1152, T-1222）（Fig. 1）

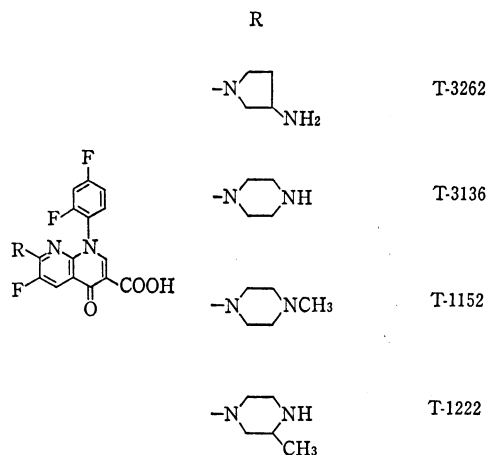


Fig. 1. Structures of quinolones.

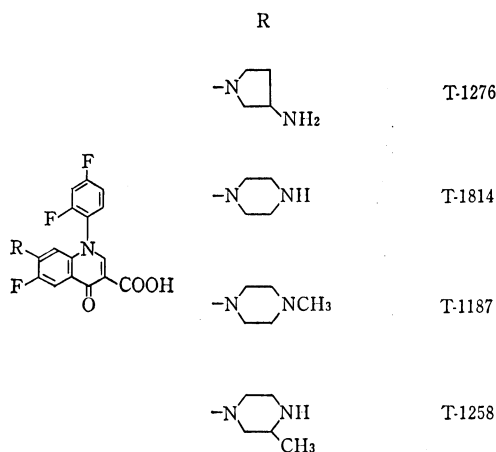
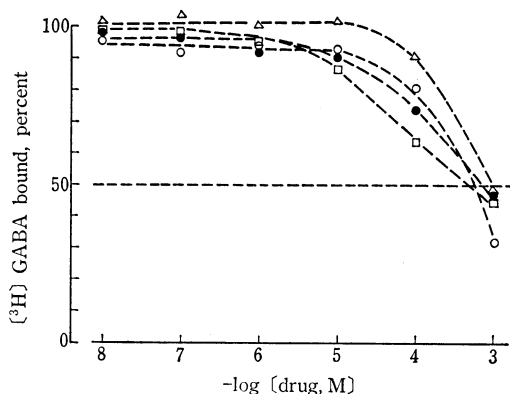


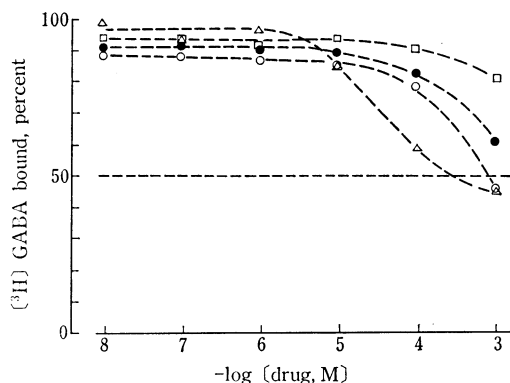
Fig. 2. Structures of quinolones (cont'd).



The receptor binding was determined as specific [3 H] GABA binding in mouse synaptic membranes. The binding assay was carried out with 5 nM [3 H] GABA. Each point indicates the mean of two separate experiments. And all determinations were carried out in duplicate.

The deviations in two experiments were within 11%, and those in duplicate were within 2.8%.

Fig. 3. Effect of T-3262 (○), T-3136 (△), T-1152 (□) and T-1222 (●) on γ -aminobutylic acid receptor binding in mouse synaptic membranes.



The receptor binding was determined as specific [3 H] GABA binding in mouse synaptic membranes. Final concentration of [3 H] GABA was 5 nM. Each point indicates the mean of two separate experiments. All determinations were carried out in duplicate. The deviations in two experiments were within 11%, and those in duplicate were within 2.8%.

Fig. 4. Effect of T-1276 (○), T-1814 (△), T-1187 (□) and T-1258 (●) on γ -aminobutylic acid receptor binding in mouse synaptic membranes.

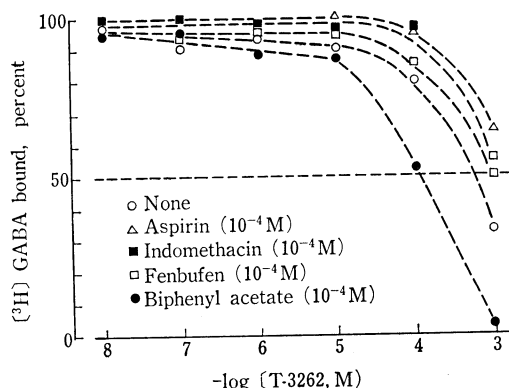
及び、T-1276 をはじめとするキノロン環を母核とする 4 化合物（T-1276, T-1814, T-1187, T-1258）（Fig. 2）の GABA 受容体結合に及ぼす影響を検討した。

各化合物（T-1187 を除く）は、濃度依存的に GABA

Table 1. IC_{50} values of quinolones

Compound	IC_{50} (M)	Compound	IC_{50} (M)
T-3262	5.7×10^{-4}	T-1276	8.3×10^{-4}
T-3136	1.0×10^{-3}	T-1814	3.0×10^{-4}
T-1152	5.2×10^{-4}	T-1187	$> 10^{-3}$
T-1222	7.5×10^{-4}	T-1258	$> 10^{-3}$

Each value represents mean of two separate experiments.



The receptor binding was determined as specific $[^3H]$ GABA binding in mouse synaptic membranes. Membranes were incubated with $[^3H]$ GABA (5 nM), NSAIDs (The final concentration was 10^{-4} M) and T-3262 (The final concentration was shown in the figure) in 10 mM potassium phosphate buffer for 20 min at $4^{\circ}C$. Each point indicates the mean of two separate experiments. All determinations were carried out in duplicate. The deviations in two experiments were within 11%, and those in duplicate were within 2.8%.

Fig. 5. Effect of T-3262 on γ -aminobutylic acid (GABA) receptor binding in the presence of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs).

受容体結合を阻害した (Fig. 3, 4). 阻害曲線より算出した 50% 阻害濃度 (IC_{50}) を Table 1 に示す。いずれの化合物もその阻害効果は、弱いものであった。

2) 非ステロイド系消炎剤存在下における T-3262 の GABA 受容体結合に及ぼす影響

NSAIDs の共存下における T-3262 の GABA 受容体結合におよぼす影響を検討する目的で、アスピリン、インドメサシン、フェンブフェンおよびフェンブフェンの活性代謝産物であるビフェニル酢酸 (それぞれ終濃度 10^{-4} M) 存在下における T-3262 の GABA 受容体結合に及ぼす影響を検討した。

ビフェニル酢酸の存在により、GABA 受容体結合に対する T-3262 の阻害効果は若干増強されたが、他の 3 種の NSAIDs では増強効果は認められなかった (Fig. 5)。

III. 考 察

従来より、キノロン系抗菌薬が中枢神経毒性を有することは知られており、本系薬にとって、中枢神経毒性は、宿命的副作用とも考えられていた¹⁾。前述のように、NA の大量投与により痙攣が誘発されたとの報告^{2,3)}があり、また、PPA においても、腎不全患者に投与した際に痙攣を誘発したという報告⁴⁾がある。しかし、その痙攣発現機序については、注目されながらも不明のままであった。

一方、ノルフロキサシン (NFLX) をはじめとする新キノロン系抗菌薬では、当初、その副作用は軽微であると考えられていた。しかし、1985 年、ENX の投与により、痙攣性疾患の既往・家族歴のない患者に痙攣が発現したとする報告がなされた¹¹⁾。さらに、1986 年、本邦においても、ENX と NSAIDs の一つであるフェンブフェンとの併用時に 7 例に痙攣の発現を見たという報告⁵⁾がなされてより、その痙攣誘発機序が注目を集めている。

GABA は、中枢神経系において抑制性伝達物質と考えられており、GABA 作動性抑制性伝達の低下は、中枢神経系の興奮性を増大させ、痙攣を誘発するものと考えられている。すなわち、GABA 量の低下をひきおこす様な状態、例えば、ビタミン B₆ 欠乏¹²⁾・高圧酸素呼吸時¹³⁾には、GABA 合成の低下→GABA 量の低下→興奮性の増大→痙攣という連鎖の存在が示されている。

また、GABA の受容体への結合を阻害するような物質、例えば、ピククリンの投与により痙攣が誘発されることも報告されている¹⁴⁾。さらに、我々は、セファロスポリン系抗生剤による痙攣の発現機序の一つとして、

Table 2. IC_{50} values of new quinolones in the presence of non-steroidal anti-inflammatory drugs

	Free	Aspirin 10^{-4} M	Fenbufen 10^{-4} M	Indomethacin 10^{-4} M	Biphenyl acetate 10^{-4} M
Norfloxacin	1.4×10^{-5}	1.4×10^{-5}	1.2×10^{-7}	1.9×10^{-7}	$< 10^{-8}$
Enoxacin	1.4×10^{-4}	8.3×10^{-5}	1.3×10^{-6}	5.3×10^{-7}	1.1×10^{-8}
Ofloxacin	1.0×10^{-3}	7.6×10^{-4}	3.6×10^{-5}	1.2×10^{-4}	8.3×10^{-7}
T-3262	5.7×10^{-4}	$> 10^{-3}$	$> 10^{-3}$	$> 10^{-3}$	1.2×10^{-4}

Each value represents mean of two separate experiments.

GABA 受容体結合の阻害を示してきた^{10,15)}。

従来、キノロン系抗菌薬による痙攣誘発機序にかんする報告は、皆無であった。しかし、我々は、本系薬が濃度依存的に GABA 受容体結合を阻害し、痙攣を誘発する可能性を示してきた⁶⁾。その上、キノロン系抗菌薬による GABA 受容体結合の阻害は、アスピリンを除く NSAIDs の存在下では著しく増強されることを明らかにし、両剤の併用時には、より低濃度のキノロン系抗菌薬で痙攣が誘発される可能性を示してきた^{7,8)}。

今回、新しいキノロン系抗菌薬である T-3262 をはじめとする 8 種の構造類似体につき GABA 受容体結合に及ぼす影響を検討した。これらの化合物は、いずれも、GABA 受容体結合阻害効果は弱く (Fig. 3, 4)、この点より見ると、中枢神経毒性、とくに痙攣誘発の可能性は低いものと考えられた。さらに、フェンブフェンとの併用時の痙攣の報告⁵⁾があり、T-3262 においても、NSAIDs との併用時の中枢神経毒性が問題となるところである。そこで、NSAIDs 共存下における T-3262 の GABA 受容体結合に及ぼす影響を検討した。フェンブフェンの代謝産物で、薬理活性を有するビフェニル酢酸 (10^{-4} M) の共存下での T-3262 の GABA 受容体結合に対する阻害効果は若干増強された (Fig. 5 および Table 2)。しかし、Table 2 に示すように、他のキノロン系抗菌薬では、ビフェニル酢酸の共存により、その IC_{50} は $10^3 \sim 10^4$ 分の 1 に低下しているのに対し、T-3262 では、約 5 分の 1 に低下しただけであった。また、アスピリン、インドメサシン、フェンブフェン自身の共存によっても、他のキノロン系抗菌薬では IC_{50} の低下を見ているが、T-3262 では、 IC_{50} の低下は認められなかった。GABA 受容体結合を強く阻害すれば、中枢神経系での興奮性が増加し痙攣を誘発しやすくなることを考え合わせれば、T-3262 は NSAIDs の共存下においても痙攣誘発作用の弱い薬物と言えよう。

以上の *in vitro* の成績より、T-3262 は、中枢神経毒性、特に痙攣誘発作用の弱い薬物であろう事が示唆された。また、NSAIDs の共存下においてもその痙攣誘発作用は弱い薬物であろうことが示唆された。

文 献

1) 古賀 弘：ビリドンカルボン酸系合成抗菌剤の構造活性相関とドラッグデザイン。化学の領域 (増刊) 136 : 177~202, 1982

2) ISIAM, M A and SREEDHARAN T : Convulsions, hyperglycemia and glycosuria from overdose of nalidixic acid. JAMA 192 : 1100~1101, 1985

3) FRASER, A G and HARROWER ADB : Convulsions and hyperglycemia associated with nalidixic acid. Brit Med J 2 : 1518, 1977

4) 上田 泰, 松本文夫, 斎藤 篤, 嶋田基五郎, 大森雅久, 小林千鶴子, 柴 孝也, 山路武久, 三枝幹文, 内浦玉堂, 橋本隆男, 香川景継 : Pipemidic acid に関する臨床的研究。Chemotherapy 23 : 2798~2870, 1975

5) 厚生省薬務局 : 医薬品副作用情報 (No. 81) 日本医事新報 No. 3263 : 101~102, 1982

6) HORI, S SHIMADA J SAITO A MIYAHARA T KURIOKA S and MATSUDA M : Effect of new quinolones on γ -aminobutylic acid receptor binding. Abstract of 25 th ICAAC Meeting : 157, 1985

7) HORI, S SHIMADA J SAITO A MIYAHARA T KURIOKA S and MATSUDA M : A study on enhanced epileptogenicity of new quinolones in the presence of antiinflammatory drugs. Abstract of 27 th ICAAC Meeting : 101, 1987

8) 堀 誠治, 嶋田基五郎, 宮原 正, 栗岡 晋, 松田 誠 : キノロン系化学療法剤の痙攣発現機序に関する研究。神経化学 26 : 178~180, 1987

9) ZUKIN, S R YOUNG A B and SNYDER S H : Gamma-aminobutylic acid binding to receptor sites in the rat central nervous system. Proc Natl Acad Sci USA 71 : 4802~4807, 1974

10) HORI, S KURIOKA S MATSUDA M and SHIMADA J : Inhibitory effect of cephalosporins on γ -aminobutylic acid receptor binding in rat synaptic membranes. Antimicrob Agents Chemother 27 : 650~651, 1985

11) SIMPSON, K J and BRODI M J : Convulsions related to enoxacin. Lancet 8447 : 161, 1985

12) 松田 誠 : ビタミン B₆ 欠乏による痙攣発作の発現機序に関する研究。ビタミン 57 : 1~15, 1983

13) HORI, S : Study on hyperbolic oxygen-induced convulsion with particular reference to γ -aminobutylic acid in synaptosomes. J Biochem 91 : 443~448, 1982

14) 黒田広生 : GABA/Benzodiazepine/Carboline レセプター。脳のレセプター (小川紀雄) 184~209, 世界保険通信社, 1986

15) 堀 誠治, 栗岡 晋, 松田 誠, 嶋田基五郎 : セファロスポリン系抗生剤により誘発される痙攣と γ -アミノ酪酸。神経化学 23 : 385~387, 1984

EFFECT OF T-3262 AND ITS STRUCTURAL DERIVATIVES ON GABA RECEPTOR BINDING

SEIJI HORI, ATUSHI SAITO, JINGORO SHIMADA, MASAHISA OHMORI,
KHOYA SHIBA, TOSHIO HOJO, MASANOBU KAJI, SHINICHIRO OKUDA,
MASAKI YOSHIDA and TADASHI MIYAHARA

Second Department of Internal Medicine,
School of Medicine, The Jikei University
3-25-8 Nishi-shinbashi, Minato-ku, Tokyo 105, Japan

Recently, many new quinolones have been developed and used for the treatment of infectious diseases. They were considered to have little side effect. However, in 1986, it was reported that convulsions were induced in patients treated with enoxacin and fenbufen, one of the non-steroidal anti-inflammatory drugs.

We studied the effect of T-3262 and related derivatives on the receptor binding of γ -aminobutylic acid (GABA), an inhibitory transmitter in the mammalian central nervous system.

T-3262 inhibited GABA receptor binding in a concentration-dependent manner. The concentration which inhibited 50% of the binding was lower than that of the other new quinolones. And in the presence of biphenyl acetate, an active metabolite of fenbufen, the inhibitory activity was slightly enhanced. However, other non-steroidal anti-inflammatory drugs did not enhance the inhibitory activity of T-3262.

From these *in vitro* results, we consider T-3262 to have lower convulsant activity, even in the presence of non-steroidal anti-inflammatory drugs.