

## β-ラクタム薬およびβ-ラクタマーゼ阻害薬の γ-アミノ酪酸受容体結合に及ぼす影響

堀 誠治・嶋田甚五郎

聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター\*

近年、抗菌力の増強・抗菌スペクトルの拡大・耐性の克服を目的に、β-ラクタム薬とβ-ラクタマーゼ阻害薬との併用が試みられている。β-ラクタム薬がその大量投与時などに痙攣を誘発することは良く知られている。また、β-ラクタマーゼ阻害薬はβ-ラクタム薬と構造的に類似している。そこで、我々は、両系薬の痙攣発現の可能性を類推するために、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)受容体結合に及ぼすβ-ラクタム薬およびβ-ラクタマーゼ阻害薬の影響を検討した。セフォペラゾン<sup>1</sup>は濃度依存的にGABA受容体結合を阻害したが、クラバン酸、スルバクタム、タゾバクタム、アモキシシリン、ピペラシリンのGABA受容体阻害効果は弱かった。また、β-ラクタマーゼ阻害薬はβ-ラクタム薬のGABA受容体結合に及ぼす効果を増強することはなかった。以上より、β-ラクタマーゼ阻害薬はβ-ラクタム薬の痙攣誘発作用を増強する可能性は低いと考えられた。

**Key words:** β-ラクタム薬, β-ラクタマーゼ阻害薬, GABA受容体結合, tazobactam/piperacillin

近年、多くのβ-ラクタム薬が開発され、臨床の用に供されている。これらの薬物は選択毒性の高い薬物として知られており、臨床の場において最も汎用されている薬物の一つといえる。その結果、耐性菌の出現が問題となってきている。最近、これらの薬物の抗菌力増強・抗菌スペクトルの拡大・耐性菌の克服などを目的にβ-ラクタム薬とβ-ラクタマーゼ阻害薬の配合薬が開発され、臨床応用されている<sup>1)</sup>。β-ラクタム薬の副作用では過敏反応によるものが最もよく知られているが、古くよりβ-ラクタム薬による中枢神経系副作用、とくに痙攣誘発の報告が認められている<sup>2)</sup>。Penicillin Gの大量投与時<sup>3)</sup>、cefazolin (CEZ)の大量投与時<sup>4,5)</sup>、cephaloridine (CER)の髄腔内投与時<sup>6)</sup>などに痙攣が誘発されたとの報告がある。また、これらの薬物の脳室内投与により、ラットに痙攣脳波を誘発することが出来るとの報告もある<sup>7)</sup>。

一方、γ-アミノ酪酸(GABA)は、中枢神経系において抑制伝達物質と考えられており、何らかの機序によりGABA作動性抑制性伝達が阻害されると中枢神経系における興奮性が増大し、痙攣が誘発されると考えられている<sup>8)</sup>。我々は、セファロsporin薬が濃度依存的にGABA受容体結合を阻害することを示し、セファロsporin薬による痙攣誘発にGABA受容体結合阻害

の関与している可能性を示してきた<sup>9)</sup>。β-ラクタマーゼ阻害薬はβ-ラクタム薬と類似した構造を有しており(Fig. 1)、これら阻害薬が痙攣誘発作用を有するか、またβ-ラクタム薬と同時に投与時にβ-ラクタム薬の痙攣誘発作用を増強するか否かが問題となる。そこで、我々は、β-ラクタマーゼ阻害薬のGABA受容体結合に及ぼす影響を検討するとともに、β-ラクタム薬のGABA受容体阻害作用に及ぼすβ-ラクタマーゼ阻害薬の影響を検討した。

### I. 材料および方法

#### 1) 薬物

Tazobactam (TAZ)は大鵬薬品工業株式会社より、sulbactam (SBT)、cefoperazone (CPZ)はファイザー製薬株式会社より、clavulanic acid (CVA)は日本ビーチャム株式会社より供与された。その他はSigma Chemical Co.より購入した。また、[<sup>3</sup>H] GABA (980.5 GBq/mmol)はNew England Nuclear Co. Ltd.より購入した。

#### 2) マウス脳シナプス膜の調製

マウス(ddY系, 雄, 5週令)を断頭、脳をすばやく取り出し、9倍量の等張シヨ糖液を用いホモジェネートを作製した。ホモジェネートより遠心分離により粗ミトコンドリア分画を調製した。粗ミトコンドリア分画を20倍量の10mMカリウム・リン酸緩衝液(pH7.4)

を用いて低張処理・破壊したのち、Zukinらの方法<sup>10)</sup>により粗シナプス膜を調製した。その後、20倍量の150mM NaClを含む10mMカリウム・リン酸緩衝液(pH7.4)にて5回洗浄し、マウス脳シナプス膜標品とした。得られた膜標品は、適当量(約0.3g/ml)の10mMカリウム・リン酸緩衝液(pH7.4)に懸濁し、 $-20^{\circ}\text{C}$ にて保存した。

### 3) GABA受容体結合の測定

GABA受容体結合は、マウス脳シナプス膜における $[^3\text{H}]$  GABAの特異的結合として求めた。測定に先立ち、マウス脳シナプス膜を10mMカリウム・リン酸緩衝液(pH7.4)にて3回洗浄した。400 $\mu\text{l}$ の10mMカリウム・リン酸緩衝液(pH7.4)中にシナプス膜、 $[^3\text{H}]$  GABA(最終濃度5nM)、薬物を含む反応混液を $4^{\circ}\text{C}$ にて15分反応させた。反応は、22,000g、15分遠心することにより停止させた。さらに、ペレット表面を氷冷した脱イオン水で素早く洗浄したのち、ペレット中に存在する放射エネルギーを液体シンチレーションカウンターを用いて測定した。特異的結合は、非特異的結合(1mM非ラベルGABA存在下の結合量)を全結合量(非ラベルGABA非存在下の結合量)を差し引くことによ

り求めた。測定はduplicateで行った。

## II. 結 果

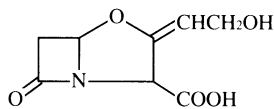
### 1) $\beta$ -ラクタム薬ならびに $\beta$ -ラクタマーゼ阻害薬のGABA受容体結合に及ぼす影響

$\beta$ -ラクタム薬としてamoxicillin (AMPC), piperacillin (PIPC), CPZを、 $\beta$ -ラクタマーゼ阻害薬としてTAZ, SBT, CVAをそれぞれ単独で反応液中に添加し、これら薬物のGABA受容体結合に及ぼす影響を検討した。

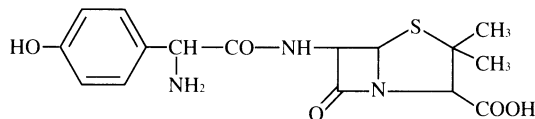
Fig. 2に示すように、TAZ, SBTおよびCVAは、高濃度(50mM)においてGABA受容体結合を軽度(約50%)に阻害した。一方、CPZは濃度依存的にGABA受容体結合を阻害し、そのGABA受容体結合を50%阻害するのに要する濃度( $\text{IC}_{50}$ )は8.4mMであった。しかし、AMPC, PIPCはGABA受容体結合を高濃度(50mM)において軽度(約50%)に阻害したのみであった。

### 2) $\beta$ -ラクタマーゼ阻害薬存在下における $\beta$ -ラクタム薬のGABA受容体結合に及ぼす影響

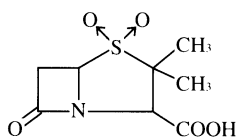
$\beta$ -ラクタマーゼ阻害薬存在下(1mMおよび10mM)に $\beta$ -ラクタム薬のGABA受容体結合に及ぼす影響を検討した。CVAの添加によってAMPCのGABA受容体結



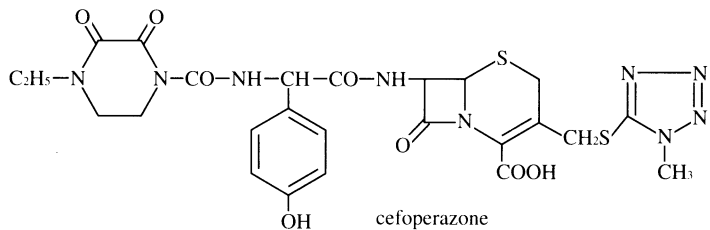
clavulanic acid



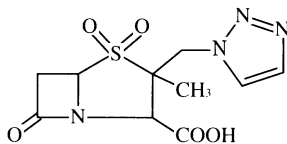
amoxicillin



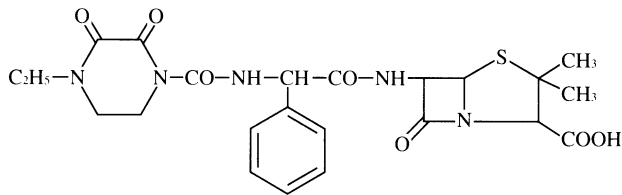
sulbactam



cefoperazone



tazobactam



piperacillin

Fig. 1. Chemical structures of  $\beta$ -lactams and  $\beta$ -lactamase inhibitors.

合に対する影響に大きな変化は認められなかった。SBTも、CPZのGABA受容体阻害効果には影響を与えなかった(Fig. 3)。また、TAZも1mMの濃度ではPIPのGABA受容体結合に及ぼす作用に大きな影響を与えなかったが、10mMのTAZではそれ自身でGABA受容体結合をコントロールの82%に低下させた。しかし、PIPのGABA受容体阻害作用を著しく増強させることはなかった(Fig. 3)。

Ⅲ. 考 察

近年、多くの抗菌薬が開発され臨床の用に供されている。その中でも、β-ラクタム薬の開発には目ざましいものがある。β-ラクタム薬は、選択毒性が高く、安全域の広い薬剤として知られており、最も頻用されている薬物の一つである。しかし、最近ではβ-ラクタマーゼ産生による耐性菌の増加が問題となっている。耐性菌克服法の一つとして、β-ラクタム薬とβ-ラクタマーゼ阻害薬との併用が試みられ、よい臨床効果を得ている<sup>1)</sup>。そこで、今回新しく開発されたβ-ラクタマーゼ阻害薬であるTAZをβ-ラクタム薬であるPIPと併用する試みがなされている。

一方、β-ラクタム薬の副作用は過敏反応によるものが多く認められている。しかし、以前よりβ-ラクタム薬が中枢神経系副作用、とくに痙攣誘発作用を有することは知られている。Penicillin系薬に関連した痙攣誘発の報告は古くより認められている。Penicillin薬の大量投与時<sup>2)</sup>に、また、同系薬を実験動物の大脳皮質に直接作用させた際<sup>3)</sup>に痙攣が誘発されたという報告がみられる。Penicillin薬による痙攣誘発機序として、神経終末からのGABAの放出阻害・GABA受

容体結合阻害などの関与を示す報告がある<sup>12,13)</sup>。さらに、cephalosporin (CEP)薬では、CERを未熟児の髄腔内投与した際<sup>6)</sup>に、また腎機能低下者にCEZを投与した際<sup>7)</sup>などに痙攣が誘発されたという報告がある。さらに、CEP薬をラット脳室内注入することにより痙攣

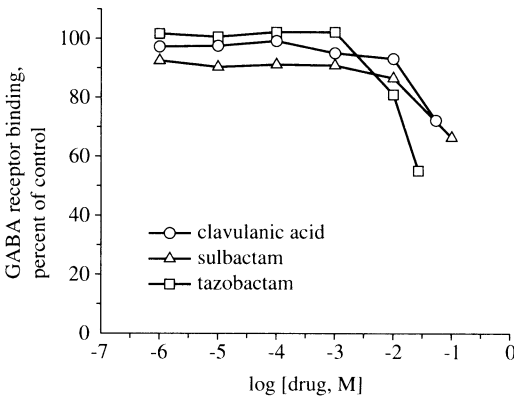


Fig. 2. Effect of β-lactamase inhibitors on the receptor binding of γ-aminobutyric acid. Each point represents the mean of two separate experiments. Each experiment was carried out in duplicate.

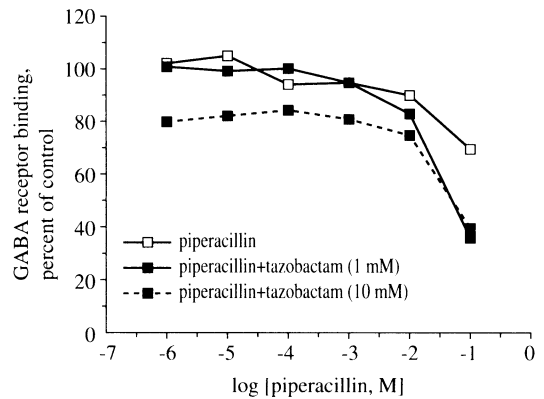
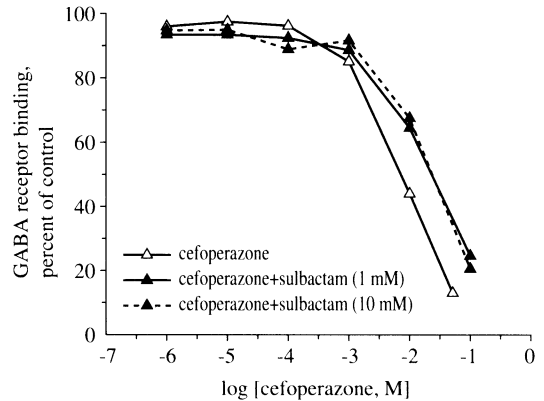
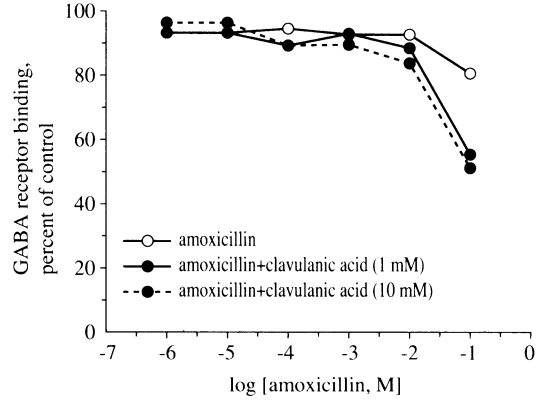


Fig. 3. Effect of β-lactams on the receptor binding of γ-aminobutyric acid with or without β-lactamase inhibitors. Each point indicates the mean of two separate experiments. Each experiment was carried out in duplicate.

が誘発される事が示されている<sup>7)</sup>。我々は、CEZ, CER が *in vitro* で GABA 受容体結合を阻害することを示し、CEP 薬による痙攣発現に GABA 受容体結合阻害の関与の可能性を示してきた<sup>9)</sup>。

一方、 $\beta$ -ラクタム薬の耐性菌克服法の一つとして、 $\beta$ -ラクタム薬と $\beta$ -ラクタマーゼ阻害薬の併用が試みられている。 $\beta$ -ラクタマーゼ阻害薬は $\beta$ -ラクタム薬に類似した化学構造を有しているため、 $\beta$ -ラクタマーゼ阻害薬が痙攣誘発作用を有するか、また、併用時に $\beta$ -ラクタム薬の有する痙攣誘発作用を増強するかが問題となる。この問題を解決するべく、 $\beta$ -ラクタム薬・ $\beta$ -ラクタマーゼ阻害薬の GABA 受容体結合に及ぼす影響を検討した。

Fig. 2 に示すように、 $\beta$ -ラクタマーゼ阻害薬は GABA 受容体結合に対する阻害作用は弱いものであった。 $\beta$ -ラクタム薬では、CPZ は濃度依存的に GABA 受容体結合を阻害したが、AMPC, PIPC は GABA 受容体結合を殆ど阻害しなかった (Fig. 3)。今回の *in vitro* 結果より、CPZ は、中枢神経系に蓄積された際には、痙攣を誘発する可能性を有する薬物であることが示唆された。さらに、 $\beta$ -ラクタマーゼ阻害薬および AMPC, PIPC は痙攣誘発作用の弱い薬物である可能性が示唆された。さらに、 $\beta$ -ラクタマーゼ阻害薬では、その 3 位に陽性荷電を有する側鎖をもつ TAZ で、軽度ではあるが GABA 受容体結合阻害効果の強い傾向が認められた。

$\beta$ -ラクタマーゼ阻害薬は、抗菌活性を有する $\beta$ -ラクタム薬と併用される。そこで、同阻害薬の併用時に $\beta$ -ラクタム薬の痙攣誘発作用が増強されるか否かが問題となる。しかし、Fig. 3 に示すように CVA・SBT・TAZ (1mM) は、それぞれ AMPC・CPZ・PIPC の GABA 受容体結合阻害効果を増強することはなかった。一方、TAZ (10mM) は、それ自身で GABA 受容体結合を 20% 低下させたが、PIPC の GABA 受容体結合阻害効果との間に相乗効果は認められなかった。

以上の *in vitro* の成績より、 $\beta$ -ラクタマーゼ阻害薬は、その併用時にも $\beta$ -ラクタム薬の痙攣誘発作用を増強しにくい可能性が示唆された。

## 文 献

- 1) Neu H C: Other  $\beta$ -lactam antibiotics. In Principles and Practice of Infectious Diseases (Mandel D L, Douglas R G Jr. and Bennet J E ed), pp. 257 ~ 263, Churchill Livingstone, New York, 1990
- 2) Neu H C: Penicillins. In Principles and Practice

of Infectious Diseases (Mandel D L, Douglas R G Jr. and Bennet J E ed), pp. 230 ~ 246, Churchill Livingstone, New York, 1990

- 3) Raicle M E, Kutt H, Louis S and McDowell F: Neurotoxicity of intravenously administered penicillin G. Arch. Neurol., 25, 232 ~ 239, 1971
- 4) Yost R L, Lee J D and O'Leary J P: Convulsions associated with sodium cefazolin: a case report. Am. Surg., 43, 417 ~ 420, 1977
- 5) Bechtel T P, Slaughter R L and Moore T D: Seizures associated with high cerebrospinal fluid concentrations of cefazolin. A. J. Hosp. Pharm., 37, 271 ~ 273, 1980
- 6) Yoshioka H, Nanbu H, Fukita M and Uehara H: Convulsion following intrathecal cephaloridine. Infection 3, 123 ~ 124, 1975
- 7) Kamei C, Sunami A and Tasaka K: Epileptogenic activity of cephalosporins in rats and their structure-activity relationship. Epilepsia 24: 421 ~ 439, 1983
- 8) Meldrum B S: Epilepsy and  $\gamma$ -aminobutyric acid-mediated inhibition. Int. Rev. Neurobiol., 17, 1 ~ 36, 1975
- 9) Hori S, Kurioka S, Matsuda M and Shimada J: Inhibitory effect of cephalosporins on  $\gamma$ -aminobutyric acid receptor binding in rat synaptic membranes. Antimicrob Agents Chemother 27: 650 ~ 651, 1985
- 10) Zukin S R, Young A B and Snyder S H: Gamma-aminobutyric acid binding to receptor sites in the rat central nervous system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 71, 4802 ~ 4807, 1974
- 11) Curtis D R, Game C J A, Johnston A R, McCulloch R M and Maclachlan R M: Convulsive action of penicillin. Brain Res. 43: 242 ~ 245, 1972
- 12) Antoniadis A, Muller W E and Wollert U: Inhibition of GABA and benzodiazepine receptor binding by penicillins. Neurosci. Lett. 18: 309 ~ 312, 1980
- 13) Olsen R W, Ticku M K, van Ness P C and Greenlee D: Effect of drugs on  $\gamma$ -aminobutyric acid receptors, uptake, release and synthesis *in vitro*. Brain Res. 139: 277 ~ 294, 1978

Effect of  $\beta$ -lactams and  $\beta$ -lactamase inhibitors on the receptor binding of  $\gamma$ -aminobutyric acid in mouse synaptic membranes

Seiji Hori and Jingoro Shimada

Division of Clinical Pharmacology, Institute of Medical Science,

St. Marianna University School of Medicine

2-16-1 Sugao, Miyamae-ku, Kawasaki 216, Japan

To enhance the antimicrobial activity of  $\beta$ -lactams,  $\beta$ -lactamase inhibitors have been developed and concurrently administered with  $\beta$ -lactams.  $\beta$ -lactams are well known to have potent convulsant activity. Since  $\beta$ -lactamase inhibitors have similar chemical structures to  $\beta$ -lactams, it is important to know whether these inhibitors might have convulsant activity. To solve this problem, we studied the effect of  $\beta$ -lactamase inhibitors, as well as  $\beta$ -lactams, on the receptor binding of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA), an inhibitory transmitter in the central nervous system. Cefoperazone inhibited GABA receptor binding in a concentration-dependent manner ( $IC_{50}=8.4$  mM). GABA receptor binding with amoxicillin and piperacillin was 80 and 70% of control binding, respectively, at the concentration 100 mM. Clavulanic acid, sulbactam and tazobactam hardly inhibited GABA receptor binding. Furthermore, these  $\beta$ -lactamase inhibitors did not enhance the inhibitory activity of  $\beta$ -lactams on GABA receptor binding. These *in vitro* results suggest that  $\beta$ -lactamase inhibitors might have weak convulsant activity and that they might not enhance the convulsant activity of  $\beta$ -lactams.