

プロドラッグ型キノロン系抗菌薬 NM441 の痙攣誘発作用について

鶴飼洋司郎・山崎 晃・黒坂智恵美・石間 強・吉國 義明・木村喜代史

日本新薬株式会社創薬研究本部*

プロドラッグ型のキノロン系合成抗菌薬 NM441 の一般薬理試験の一環として、その痙攣誘発作用について、ofloxacin(OFLX), ciprofloxacin(CPFX), lomefloxacin(LFLX) および enoxacin(ENX) を比較対照薬として、マウス、ウサギおよびネコを用いて検討を行った。マウスにおいて、NM441, OFLX, CPFX, LFLX および ENX はいずれも単独経口投与では痙攣を誘発しなかったが、fenbufen との同時経口投与で用量依存性に間代性および強直性痙攣を誘発し、動物を死亡させた。痙攣誘発作用の強さは ENX > LFLX > NM441 > CPFX > OFLX の順であった。また、theophylline との同時経口投与でいずれの薬物も用量依存性に間代性および強直性痙攣を誘発し、動物を死亡させた。致死作用の強さは LFLX \geq OFLX \geq ENX > NM441 > CPFX の順であった。NM441 は bicuculline, pentylenetetrazol および最大電撃痙攣の増強作用を示さなかった。ウサギ脳波において、NM441 の活性本体である NM394 の静脈内投与により視床正中中心核および大脳皮質から棘波や全般性発作発射が出現した。NM394 のこのような作用は CPFX および ENX よりも弱いものであった。NM441 の経口投与はウサギ脳波に影響を及ぼさなかった。ネコの脊髄反射活動電位に対して、NM441 の経口投与および NM394 の静脈内投与はほとんど影響を及ぼさなかった。NM394 のラット脳受容体膜標品における [³H]muscimol 結合に対する阻害作用は他のキノロン系抗菌薬と同様、biphenylacetic acid の存在下で著明に増強された。NM441 の痙攣誘発作用は一部、脳内 GABA_A 受容体結合阻害作用によるものと考えられた。

Key words: NM441, NM394, convulsion, EEG, GABA_A receptor

NM441((±)-6-fluoro-1-methyl-7-[4-(5-methyl-2-oxo-1,3-dioxolen-4-yl)methyl-1-piperazinyl]-4-oxo-4H-[1,3]thiazeto[3,2-a]quinoline-3-carboxylic acid) はプロドラッグ型のニューキノロン(NQ)系の合成抗菌薬である。本薬は経口投与後、小腸上部より吸収され、生体内では NM394((±)-6-fluoro-1-methyl-4-oxo-7-(1-piperazinyl)-4H-[1,3]thiazeto[3,2-a]quinoline-3-carboxylic acid) として抗菌活性を示す。NQ系抗菌薬の中樞神経系の副作用として、めまい、ふらつき、頭痛などの症状が知られているが、最近、非ステロイド系抗炎症薬や theophylline との併用で痙攣が発現することが報告されている^{1,2)}。また、マウス等の動物を用いた実験で、種々の非ステロイド系抗炎症薬のうち、特に fenbufen との併用により顕著な痙攣が誘発されることが見いだされている^{3,4)}。

今回、一般薬理試験の一環として、NM441 の痙攣誘発作用についてマウスを用い、ofloxacin(OFLX), ciprofloxacin(CPFX), lomefloxacin(LFLX) および enoxacin(ENX) を比較対照薬として検討を行った。また、ウサギの脳波およびネコの脊髄反射に対する作用についても検討を行うとともに、痙攣誘発作用の発現機序を知るために [³H]muscimol を用いて脳内 GABA_A 受容体結合阻害作用を検討した。なお、NM441 は NM394 に代謝され、血中では NM394 として存在するため、経口投与を行う場合には NM441 を用い、静脈内投与および *in vitro* の実験を行う場合には NM394 を用いた。

I 材料と方法

1 使用薬物

NM441 および NM394 はともに白色～淡黄色の結晶または結晶性の粉末である。NM441 の他、OFLX, CPFX, LFLX, ENX を経口投与する場合には、用時 0.5% hydroxypropyl cellulose(HPC-SL) 水溶液に懸濁して用いた。NM394, OFLX, CPFX, ENX を静脈内投与する場合には、これらの薬物 250mg を 1N NaOH 1ml で溶解した後、0.1N HCl 1.5ml を加えて pH 8.5～9 に調整し、これを生理食塩水に希釈して用いた。Fenbufen は 0.5% HPC-SL 水溶液に懸濁して用いた。また、*in vitro* の実験の場合には、薬物を 0.1N NaOH で溶解し、10⁻¹M の溶液を調製し、これを蒸留水に希釈して用いた。本実験に使用した薬物を以下に示す。

NM441, NM394, LFLX, fenbufen, biphenylacetic acid(以上、自社合成品), CPFX(シプロキサン[®], パイエル薬品:錠剤より抽出), OFLX(タリビット[®], 第一製薬:錠剤より抽出), ENX(フルマーク[®], 大日本製薬:錠剤より抽出), gallamine triethiodide(FLAXEDIL[®], MAY & BAKER), theophylline(Nacalai Tesque), bicuculline(Sigma), pentylenetetrazol, pentobarbital-Na(東京化成工業), lidocaine HCl(キシロカイン[®], 藤沢薬品), Triton X-100(Packard), HPC-SL(日本曹達), ampicillin Na-cloxacillin Na(注射用ピクシリン[®]S,

* 〒601 京都市南区西大路通八条下ル

明治製菓), [^3H]muscimol(25.3Ci/mmol, NEN)。これらの薬物は用時0.5% HPC-SL水溶液にて懸濁するか、もしくは蒸留水あるいは生理食塩水に溶解して使用した。

2. 使用動物

実験には生後6週齢のSlc: ddY系雄性マウス, Slc: Sprague Dawley系雄性ラット(以上, 日本エスエルシー), JW-NIBS系雄性ウサギ(ラビトン研究所)および雌雄の雑種ネコ(松本実研)を用いた。これらの動物を室温21~25°C, 湿度45~65%, 換気回数15回以上/h, 照明時間12h/日(照度約500ルクス)に保たれた飼育室内で飼育し, この間固形飼料(マウス, ラット用F-2またはGM-1, 船橋農場; ウサギ用NRT-1S, 日生研)および水道水は自由に摂取できるようにした。入荷後, マウスおよびラットは1週間, ウサギは1ヵ月間, 馴化飼育した後に実験に供した。ただし, ネコについては, 室温22~26°C, 湿度約60%に保たれた飼育室で1週間以上飼育した上で実験に用いた。また, NQの経口投与と実験を行う場合には動物を実験前日より絶食させて用いた。

3. 実験方法

1) マウスにおける痙攣誘発作用

実験にはマウスを1群6匹として, 実験前日午後5時以降より絶食させて用いた。薬物投与後, 動物を観察ケージ(230×230×150mm)に1匹ずつ入れて行動の観察を行った。被験薬投与当日は投与後8hにわたり連続して観察し, 以後は24hごとに観察を行った。

(1) 単独作用

被験薬を経口投与し, 以後72hにわたり間代性および強直性痙攣発現の有無および発現潜時について観察した。また, 死亡動物数および死亡時間についても観察した。

(2) Fenbufenとの併用による痙攣誘発作用

Fenbufen 100あるいは200mg/kgと被験薬とを同時に経口投与し, 以後72hにわたり間代性および強直性痙攣発現の有無および発現潜時について観察した。また, 死亡動物数および死亡時間についても観察した。

(3) Theophyllineとの併用による痙攣誘発作用

Theophylline 250mg/kgと被験薬とを同時に経口投与し, 以後72hにわたり間代性および強直性痙攣発現の有無および発現潜時について観察した。また, 死亡動物数および死亡時間についても観察した。

(4) Bicuculline, pentylenetetrazolおよび最大電撃誘発痙攣増強作用

被験薬を経口投与し, 30min後にbicucullineあるいはpentylenetetrazolを腹腔内投与し, 以後30min間にわたり間代性痙攣発現の有無を観察した。山本ら³⁾に従い, bicucullineおよびpentylenetetrazolの投与用量として, 予試験での間代性痙攣発現の用量反応曲線から求めたED₀₋₁₀値を用いた。また, 被験薬投与30min後に0.2

sec間の電撃ショックを電撃発生装置(MK-800, 室町器械)を用い, 角膜電極を介して動物に与え, 強直性痙攣発現の有無を観察した。電撃の強さは予試験により強直性痙攣100%発現の閾値電流を求め, その90%とした。

2) ウサギ自発性脳波

(1) 静脈内投与と実験

エーテル麻酔下, 気管カニューレを挿管し, 右大腿動脈には血圧測定用の, 左大腿静脈には薬物注射用のポリエチレンチューブをそれぞれ挿管した。東大脳研式脳定位固定装置(高橋商店)に頭部を固定し, Sawyerらの脳図譜⁵⁾を参考にして, 頭蓋骨に歯科用電気ドリルで孔をあけ, 銀球電極を大脳皮質運動野および視覚野の硬膜上に留置し, ステンレススチール製双極電極を背側海馬, 扁桃核, 視床正中中心核に刺入した。この後, エーテル麻酔を停止するとともに, gallamine triethiodide (10 mg/kg, i.v.)で非動化し, 人工呼吸器(661, Harvard Apparatus)を用いて人工呼吸を施した。術時の切開創には局所麻酔薬(2% lidocaine HCl)を塗布した。以後2h以上を経過した後, 被験薬を低用量から15min間隔で順次用量を増大しながら静脈内投与し, 脳波, 血圧および心電図の変化を観察した。脳波は脳波計(EEG4214, 日本光電)を用いて記録した。また, 血圧は右大腿動脈圧を圧トランスデューサー(TP-200T, 日本光電)および歪圧力用プリアンプ(AP-621G, 日本光電)を介し, 心電図は標準四肢誘導第II誘導法により針電極を用いて生体電気用プリアンプ(AB-620G, 日本光電)を介して, 脳波計を用いて脳波と同時に記録した。

(2) 経口投与と実験

Pentobarbital・Na麻酔下, 東大脳研式脳定位固定装置に頭部を固定し, 頭部皮膚切開の後, 頭蓋骨に歯科用電気ドリルで孔をあけ, 大脳皮質運動野および視覚野の脳硬膜上に銀球電極を留置し, 背側海馬, 扁桃核, 視床正中中心核に双極ステンレススチール製電極を刺入し, さらにステンレス線にて作製した筋電図用電極を頸部僧帽筋に刺入し, 各電極を歯科用セメントにて頭蓋骨上に一旦固定した。各電極からリード線をコネクタ(DA-15, Canon)のピンにハンダ付けた後, 歯科用セメントで頭蓋骨上に固定した。頭部皮膚切開創を縫合し, 感染を防ぐためにampicillin Na-cloxacillin Naを筋注した。術後1週間以上経過して手術創がほぼ完全に治癒した後に脳波記録を開始した。動物を実験前日より脳波記録用防音シールド室内に置かれた観察用ケージに移し, 動物が脳波室の環境に十分馴れた後に薬物を経口ゾンデを用いて胃内投与した。薬物投与後, 6h以上にわたり脳波および一般症状を連続的に観察, 記録した。薬物投与前16hおよび脳波記録中は絶食とした。

3) ネコ脊髄反射

エーテル麻酔下, ネコの第一頸髄を切断し, 人工呼吸器(SN-480-5, シナノ)を用いて人工呼吸を施した脊髄

ネコ標本を作製し、常法に従い椎弓切除術を施行し、腰仙部を露出した。単シナプス反射および多シナプス反射電位の記録は腰髄 (L7) または仙髄 (S1) の前根より行い、また隣接する後根より後根反射電位を導出し、ブラウン管オシロスコープ (VC-9, 日本光電) により観察し、ポラロイドカメラ (5R-31, 日本電気三栄) を用いて5個の活動電位を重ねて撮影した。電気刺激は電気刺激装置 (SEN-1101, 日本光電) を用い、持続 0.2msec の矩形波による超最大刺激 (2~5V) を 5sec に1回の割合で脛骨神経に与えた。記録および刺激電極を流動パラフィンプール中に留置し、プールは温度調節装置 (MK-900, 室町器械) を用いて、直腸内温度とともに $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ に保った。NM441 は経口ゾンデを用いて胃内投与し、また NM394 は右大腿静脈に挿管したポリエチレンカニューレより 10min 間かけて緩徐に投与した。脊髄反射活動電位のうち、単シナプス反射は電位振幅を、多シナプス反射および後根反射電位はその面積を測定した。

4) GABA_A 受容体結合阻害作用

受容体膜標品の調製：ラットを断頭後、直ちに小脳を除いて全脳を摘出し、氷冷した 10 倍容の 0.32M sucrose 中にてホモジナイズした。ホモジネートを 1,000g にて 10min 間遠心分離し、上清を 39,000g にて 20min 間遠心分離した。沈渣を 50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) にて洗滌後、同緩衝液に懸濁し、 -60°C にて凍結保存した。これを室温にて融解し、0.01% Triton X-100 存在下で 37°C にて 60min 間インキュベーションを行い、洗滌を 3 回繰り返して内因性の GABA 等のアミノ酸を極力除去し、上記緩衝液に再度懸濁し、これを受容体膜標品とした。

[³H] muscimol 結合：受容体膜標品を 50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 中にて 2nM の [³H] muscimol と 0°C 、60min 間インキュベーションを行った。インキュベーション終了後、反応液をガラス繊維濾紙 (Whatman GF/C) 上に吸引濾過し、濾紙の放射能を液体シンチレーションカウンター (TRICARB 4640, PACKARD) で測定し、これを全結合量とした。100 μM muscimol 存在下での結合実験も並行して行い、得られた放射能を非特異的結合量とし、全結合量から非特異的結合量を差し引くことにより特異的結合量を求めた。さらに種々の濃度の被験薬存在下で [³H] muscimol 結合実験を行い、[³H] muscimol の特異的結合を 50% 抑制する濃度 (IC₅₀ 値) を算出した。

5) 統計処理

有意差検定は χ^2 test あるいは分散分析後に Dunnett 法により行った。ただし、脊髄反射電位については paired-t test を用いて、薬物投与前値と投与後値の間で検定を行った。有意水準は危険率 5% 未満とした。また、ED₅₀ 値および LD₅₀ 値の算出は probit 法を用いて行い、各々の 95% 信頼限界も求めた。

II. 実験結果

1. マウスにおける痙攣誘発作用

1) 単独作用

NM441, OFLX, CPFY, LFLX および ENX の 1,000 mg/kg の単独経口投与ではいずれも痙攣は認められなかった。

2) Fenbufen との併用による痙攣誘発作用

結果を Table 1 にまとめて示した。Fenbufen 100mg/kg あるいは 200mg/kg の単独経口投与では痙攣は認められなかった。

Fenbufen 100mg/kg との併用投与で、NM441 は 300 mg/kg 以上で、ENX は 30mg/kg 以上で間代性および強直性痙攣を誘発したが、OFLX および CPFY は各々 1,000mg/kg でも痙攣を誘発しなかった。

Fenbufen 200mg/kg との併用投与で、NM441 は 100 mg/kg 以上で用量依存性に間代性痙攣および強直性痙攣を誘発した。OFLX は 1,000mg/kg でも痙攣を誘発しなかった。CPFY は 300mg/kg 以上で、LFLX は 60mg/kg 以上で、ENX は 10mg/kg 以上で用量依存性に痙攣を誘発した。痙攣発現後ほとんどの動物は死亡した。間代性痙攣発現の ED₅₀ および致死用量 (LD₅₀ 値) を Table 2 にまとめて示した。ED₅₀ 値および LD₅₀ 値から痙攣発現および致死作用の強さを比較すると、ENX > LFLX > NM441 > CPFY > OFLX の順であった。

3) Theophylline との併用による痙攣誘発作用

結果を Table 3 にまとめて示した。Theophylline 250 mg/kg の単独経口投与では痙攣は認められなかった。

Theophylline との併用投与で NM441 は 300mg/kg 以上で間代性痙攣および強直性痙攣を誘発し、痙攣後動物は死亡した。OFLX は 100mg/kg 以上で、CPFY は 750 mg/kg 以上で、LFLX は 100mg/kg 以上で、ENX は 30 mg/kg 以上で、NM441 の場合と同様、痙攣を誘発し、動物を死亡させた。Table 4 には間代性痙攣発現の ED₅₀ と LD₅₀ 値をまとめて示した。ED₅₀ 値から痙攣発現の強さを比較すると ENX \geq LFLX > NM441 \geq OFLX > CPFY の順であったが、LD₅₀ 値で比較すると LFLX \geq OFLX \geq ENX > NM441 > CPFY の順であった。

4) Bicuculline, pentylenetetrazol および最大電撃誘発痙攣増強作用

結果を Table 5 にまとめて示した。予試験で bicuculline および pentylenetetrazol の間代性痙攣発現の ED₀₋₁₀ 値を求めたところ、bicuculline は 2.5mg/kg、pentylenetetrazol は 35mg/kg であったので、この用量を用いて NQ の痙攣増強作用を検討した。

Control 群では bicuculline 2.5mg/kg で痙攣を発現せず、pentylenetetrazol 35mg/kg で 6 例中 1 例が痙攣を示した。また、NM441, OFLX, CPFY 1,000mg/kg はいずれも bicuculline 2.5mg/kg との併用によっても痙攣を誘発しなかったが、ENX は 1,000mg/kg で

Table 1. Convulsant effects of NM441 and reference drugs in combination with fenbufen in mice

Fenbufen (mg/kg, p.o.)	Drug	Dose (mg/kg)	No. of mice		
			Clonic convulsion	Tonic convulsion	Death
100mg/kg	HPC-SL ^{a)}	—	0 (—)	0 (—)	0 (—)
	NM441	100	0 (—)	0 (—)	0 (—)
		300	3 (82)	3 (95)	3 (96)
		1000	4 (111)	3 (132)	3 (139)
	Ofloxacin	1000	0 (—)	0 (—)	0 (—)
	Ciprofloxacin	1000	0 (—)	0 (—)	0 (—)
	Enoxacin	10	0 (—)	0 (—)	0 (—)
		30	2 (55)	2 (81)	2 (86)
		100	5* (38)	5* (42)	5* (47)
	200mg/kg	HPC-SL	—	0 (—)	0 (—)
NM441		30	0 (—)	0 (—)	0 (—)
		100	1 (137)	1 (156)	1 (169)
		300	4 (129)	3 (147)	4 (143)
		1000	6** (87)	3 (117)	6** (109)
Ofloxacin		1000	0 (—)	0 (—)	0 (—)
Ciprofloxacin		100	0 (—)	0 (—)	0 (—)
		300	2 (123)	0 (—)	0 (—)
		500	3 (72)	3 (74)	3 (75)
		1000	5* (66)	5* (70)	5* (73)
Lomefloxacin		30	0 (—)	0 (—)	0 (—)
		60	2 (52)	2 (64)	2 (64)
		100	5* (39)	4 (50)	4 (54)
		300	6** (25)	6** (29)	6** (30)
Enoxacin		3	0 (—)	0 (—)	0 (—)
		10	1 (121)	1 (121)	1 (130)
		30	4 (66)	1 (50)	2 (75)
		100	6** (22)	6** (29)	6** (32)

Six mice were used for each group. New quinolones were concomitantly administered p.o. with fenbufen. Means of the latent period in min to the onset of convulsions and death are indicated in the parentheses.

^{a)}: 0.5% hydroxypropylcellulose, *: p<0.05, **: p<0.01 (χ^2 test)

Table 2. Summary of the convulsant activity of new quinolones by concomitant oral administration with 200mg/kg of fenbufen in mice

Drug	Clonic conv. : ED ₅₀ (mg/kg)	LD ₅₀ (mg/kg)
NM441	207.4 (102.2~429.8)	207.4 (102.2~429.8)
Ofloxacin	>1000	>1000
Ciprofloxacin	473.7 (258.6~962.9)	585.3 (405.4~983.9)
Lomefloxacin	70.8 (47.2~107.5)	78.5 (51.2~157.8)
Enoxacin	20.7 (10.2~ 43.0)	29.6 (14.8~ 63.8)

(): 95% confidence limits

bicuculline との併用により 6 例中 1 例で間代性痙攣を誘発した。

Pentylentetrazol 35mg/kg との併用では, NM441 および CPMX 1,000mg/kg は痙攣を誘発しなかったが, OFLX 1,000mg/kg は 6 例中 2 例で間代性痙攣を, 1 例で強直性痙攣を誘発した。また, ENX 1,000mg/kg

は 6 例中 1 例で間代性痙攣を誘発した。

予試験での最大電撃痙攣閾値は 1.0mA であったので, その 90% の強さの電流 (0.9mA) を最大電撃誘発痙攣増強作用の検討のために用いた。いずれの被験薬においても 1,000mg/kg の投与 30min 後に 0.9mA の電撃を与えても痙攣が誘発されることはなかった。

Table 3. Convulsant activities of NM441 and reference drugs in combination with theophylline in mice

Theophylline (mg/kg, p.o.)	Drug	Dose (mg/kg)	No. of mice		
			Clonic convulsion	Tonic convulsion	Death
250mg/kg	HPC-SL ^{a)}	—	0 (—)	0 (—)	0 (—)
	NM441	30	0 (—)	0 (—)	0 (—)
		100	0 (—)	0 (—)	0 (—)
		300	4 (131)	3 (183)	3 (183)
		1000	4 (267)	4 (268)	4 (269)
	Ofloxacin	30	0 (—)	0 (—)	0 (—)
		100	1 (49)	1 (196)	1 (197)
		300	1 (106)	3 (179)	3 (299)
		1000	5* (65)	5* (83)	6** (111)
	Ciprofloxacin	300	0 (—)	0 (—)	0 (—)
		500	0 (—)	0 (—)	0 (—)
		750	1 (142)	1 (143)	1 (143)
		1000	5* (181)	5* (200)	5* (200)
	Lomefloxacin	30	0 (—)	0 (—)	0 (—)
		100	2 (133)	2 (134)	2 (134)
		300	2 (160)	2 (160)	3 (587)
		1000	6** (127)	4 (128)	6** (145)
	Enoxacin	10	0 (—)	0 (—)	0 (—)
		30	1 (50)	1 (137)	1 (139)
		100	1 (36)	1 (36)	1 (51)
		300	4 (97)	3 (56)	3 (56)
		1000	5* (71)	3 (121)	5* (149)

Six mice were used for each group. New quinolones were concomitantly administered p.o. with theophylline.

Means of the latent period in min to the onset of convulsions and death are indicated in the parentheses.

^{a)}: 0.5% hydroxypropylcellulose, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (χ^2 test)

Table 4. Summary of the convulsant activity of new quinolones by concomitant oral administration with 250mg/kg of theophylline in mice

Drug	Clonic conv. : ED ₅₀ (mg/kg)	LD ₅₀ (mg/kg)
NM441	405.0 (182.4~1560.6)	487.9 (225.1~2254.9)
Ofloxacin	466.2 (220.0~2021.0)	247.4 (120.6~527.4)
Ciprofloxacin	866.1 (680.5~1109.2)	866.1 (680.5~1109.2)
Lomefloxacin	248.8 (117.6~597.4)	206.9 (94.0~472.5)
Enoxacin	219.0 (93.1~744.4)	272.9 (113.0~1223.5)

(): 95% confidence limits

2. ウサギ自発性脳波に対する作用

1) 静脈内投与実験

NM394, OFLX, CPFX および ENX の静脈内投与によるウサギ脳波への作用を Table 6 にまとめて示した。

NM394 は 30mg/kg 以下の用量の静脈内投与では脳波、血圧および心電図にほとんど影響を及ぼさなかった。しかし、100mg/kg で 6 例中 2 例で投与直後より不整脈が発生し、血圧下降の後、投与 10min 以内に 2 例とも死亡した。生存例では、4 例中 2 例で投与 15min 後から視床正中中心核や大脳皮質運動野より棘波が頻発し始め、投与 30min 頃には両部位から発作波が発現するようになり、うち 1 例では 1h 10min 後、他の 1 例では 2h を経過した頃より全般性発作発射に移行した。Fig. 1 に 1 例を示したが、この例は投与 3h 30min 後に血圧下降の後

死亡した。他の 1 例では 4h 以上全般性発作発射が持続して出現したものの死には至らなかった。他の生存例 2 例では脳波上著変は認められなかった。

OFLX は 100mg/kg の静脈内投与でも、3 例全例で脳波上著変を示さなかった。

CPFX 30mg/kg では 6 例中 1 例が投与 2min 以内に不整脈を惹起して死亡したが、他の 5 例では、一部不整脈が認められたものの、脳波上著変は認められなかった。100mg/kg ではさらに 2 例が不整脈、血圧下降の後に死亡した。生存例 3 例中 1 例では脳波上著変は認められなかったが、1 例では投与 10min 頃より大脳皮質運動野から棘波が出現するようになり、45min 以降、棘波が群発化し、以後 3h 以上にわたり棘波群発が頻発した。他の生存例 1 例では投与 10min 前後より大脳皮質運動野およ

Table 5. Proconvulsant effects of NM441 and reference drugs in mice treated with subconvulsive doses of convulsants and subthreshold electrical shock

	Drug	Dose (mg/kg)	No. of mice		
			Clonic convulsion	Tonic convulsion	Death
Bicuculline 2.5mg/kg, i.p.	HPC-SL	—	0	0	0
	NM441	1000	0	0	0
	Ofloxacin	1000	0	0	0
	Ciprofloxacin	1000	0	0	0
	Enoxacin	300	0	0	0
		1000	1	0	0
Pentylentetrazol 35mg/kg, i.p.	HPC-SL	—	1	0	0
	NM441	1000	0	0	0
	Ofloxacin	300	0	0	0
		1000	2	1	1
	Ciprofloxacin	1000	0	0	0
	Enoxacin	1000	1	0	0
ECS 0.9mA	HPC-SL	—	0	0	0
	NM441	1000	0	0	0
	Ofloxacin	1000	0	0	0
	Ciprofloxacin	1000	0	0	0
	Enoxacin	1000	0	0	0

Six animals were used for each group.

New quinolones were administered p.o. 30 min before bicuculline, pentylentetrazol or electroconvulsive shock (ECS). HPC-SL. 0.5% hydroxypropylcellulose

Table 6. Summary of the effects of intravenously administered NM394 and reference drugs on the EEG in rabbits

Drug	Dose (mg/kg)	Incidence		
		no change	spike/polyspike	seizure discharge
NM394	30	6/6		
	100 ^(#1)	2/4	2/4	2/4
Ofloxacin	100	3/3		
	30 ^(#2)	5/5		
Ciprofloxacin	100 ^(#3)	1/3	2/3	1/3
	30	3/3		
Enoxacin	30	3/3		
	100		3/3	3/3

EEG recordings were made in rabbits which were immobilized by gallamine and artificially respirated.

Two out of 6 (#1), 1 out of 6 (#2) and 2 out of 5 animals (#3) died after drug injection.

び視覚野から棘波が出現するようになり、投与15min後には全般性発作発射が出現した。以後、投与34min後および3h44min後にも全般性発作発射が認められた。

ENX 30mg/kg以下では3例全例で脳波に変化は認められなかったが、100mg/kgでは全例で全般性発作発射が認められた。全般性発作発射は1例では投与3min後に出現しはじめ、投与2h後まで頻回に出現した。他の2例では発作発射に先立ち、投与10min前後より大脳皮質運動野から棘波が出現するようになり、うち1例では投与13min後に、他の1例では27min後に全般性発作発射が出現し、以後4h以上にわたり発作発射が頻発した。

2) 経口投与実験

NM441 1,000mg/kgの経口投与例4例のいずれの例においても投与後6h以上にわたり脳波に著変は認められなかった (Fig. 2)。一方、ENX 300mg/kgの経口投与では3例中1例で投与3h後頃より大脳皮質および海

馬から棘波が出現するようになり、8h後においても持続して認められたが、24h後には認められなくなった (Fig. 3)。ENX 1,000mg/kgでは4例中3例で投与3h後頃から大脳皮質および海馬から棘波が出現しはじめ、うち2例では投与5h後頃より間代性痙攣を伴った全般性発作発射が出現するようになった (Fig. 4)。この2例中1例ではこの頃より全般性発作発射が頻発するようになり、約7h後に死亡した。他の1例では投与24h後には発作発射は認められなくなった。

3. ネコ脊髄反射に対する作用

Fig. 5に脊髄反射電位に対するNM441およびNM394の作用を示した。薬物投与前の値をコントロールとして、薬物投与後の値をコントロールに対する百分率で表した。NM441 100mg/kgの胃内投与 (Fig. 5-A)、あるいはNM394 20mg/kgの静脈内投与 (Fig. 5-B)によっても、脊髄反射電位にほとんど変化は認められな

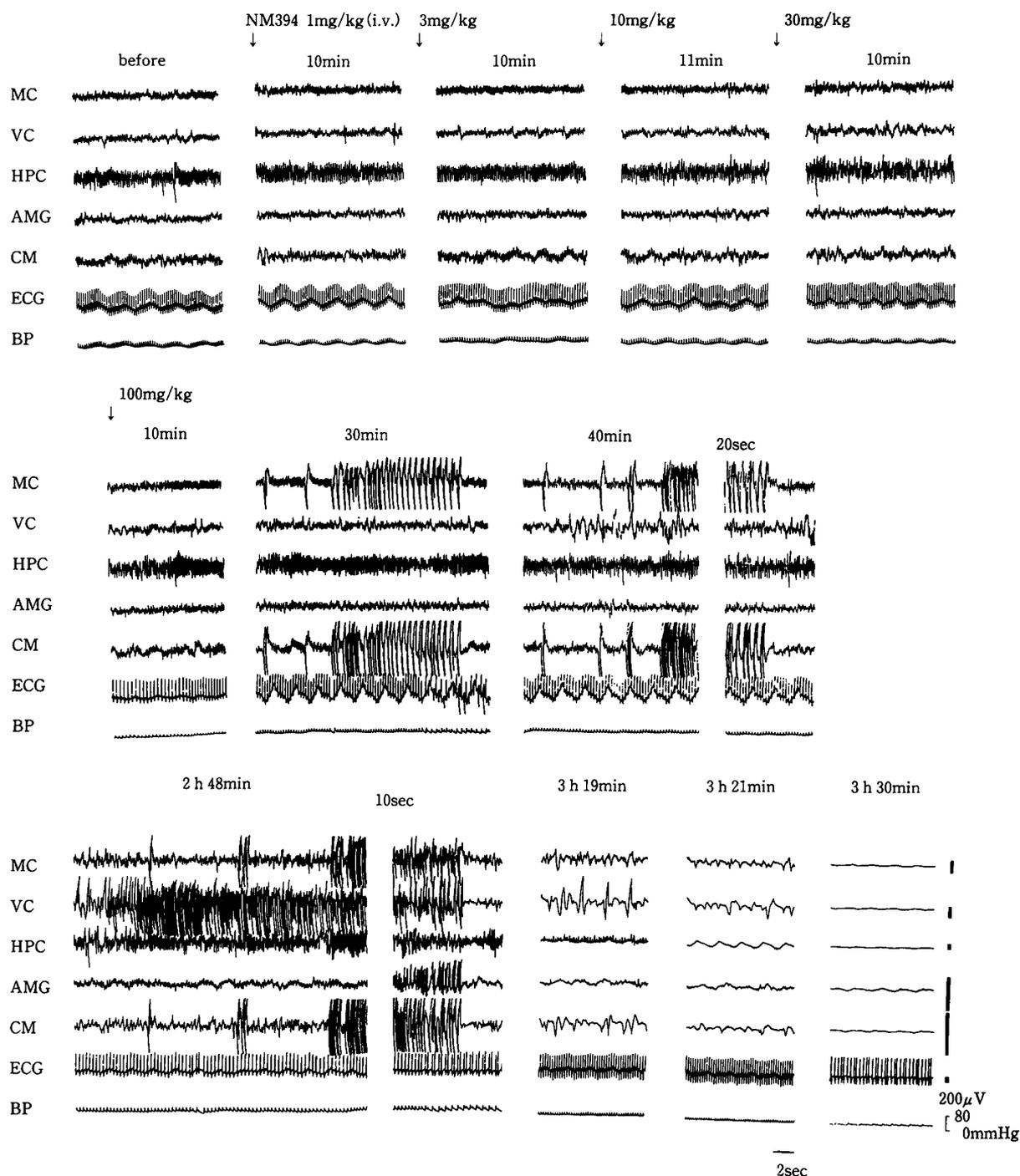


Fig. 1. Typical EEG recordings of a rabbit intravenously administered with NM394
 Abbreviations; MC: Motor cortex, VC: Visual cortex, HPC: Hippocampus, AMG: Amygdala,
 CM: N. centrum medianum, ECG: Electrocardiogram, BP: Blood pressure

かった。

4. GABA_A 受容体結合阻害作用

結果を Table 7 にまとめて示した。NM394, OFLX, CFPX および ENX はラット受容体膜標品への [³H] muscimol の特異的結合をいずれも IC₅₀ 値が 10⁻³~10⁻⁴ M の濃度で阻害した。IC₅₀ 値で比較すると結合阻害作用

の強さは NM394>ENX>CFPX>OFLX の順であった。Biphenylacetic acid 10⁻⁴ M 存在下においても IC₅₀ 値で比較した結合阻害作用の強さの順は biphenylacetic acid 非存在下の場合と同様であったが、いずれの薬物でも biphenylacetic acid 非存在下と比べ結合阻害作用は著明に増強された。Biphenylacetic acid 存在下と非存

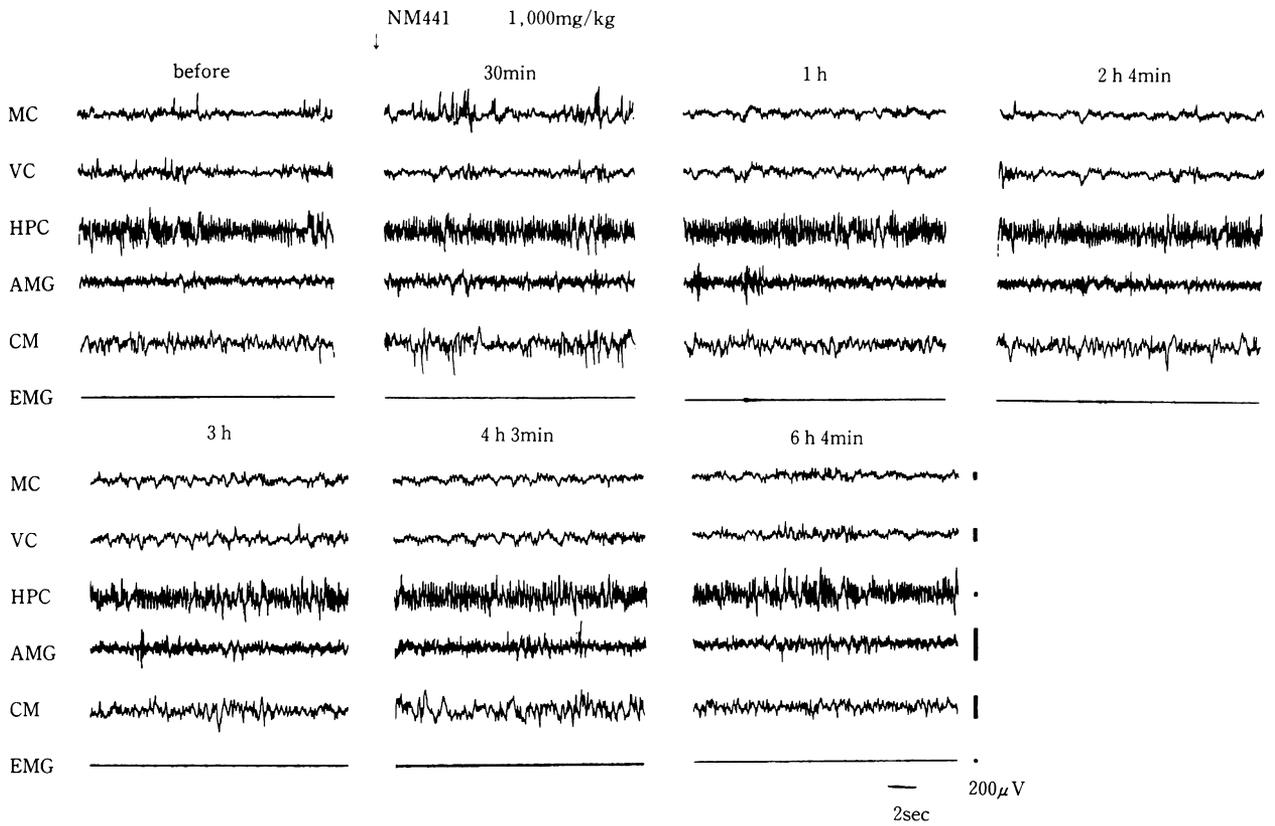


Fig. 2. Typical EEG recordings of a rabbit orally administered with NM441 at a dose of 1,000mg/kg
Abbreviations; MC: Motor cortex, VC: Visual cortex, HPC: Hippocampus,
AMG: Amygdala, CM: N. centrum medianum, EMG: Electromyogram

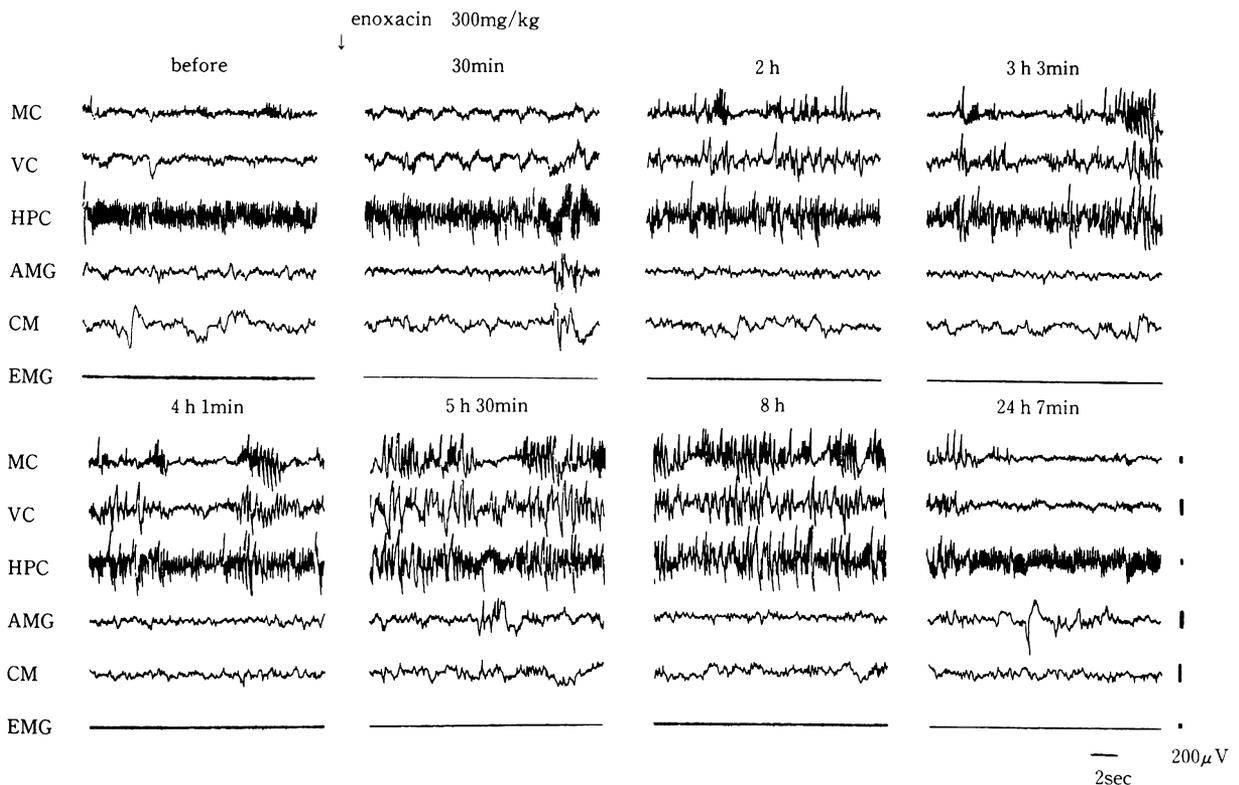


Fig. 3. Typical EEG recordings of a rabbit orally administered with enoxacin at a dose of 300mg/kg
Abbreviations; MC: Motor cortex, VC: Visual cortex, HPC: Hippocampus,
AMG: Amygdala, CM: N. centrum medianum, EMG: Electromyogram

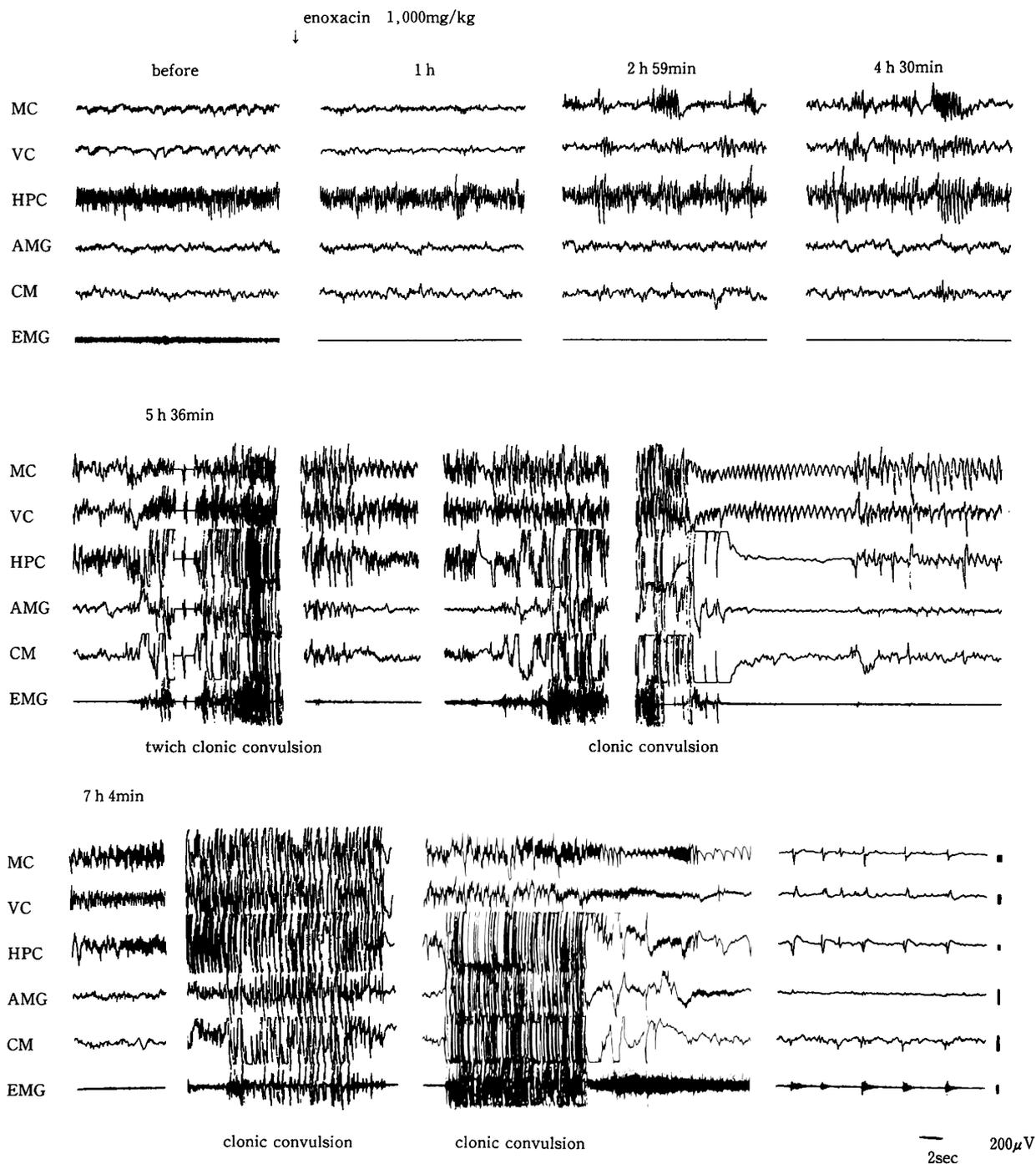


Fig. 4. Typical EEG recordings of a rabbit orally administered with enoxacin at a dose of 1,000mg/kg
Abbreviations; MC: Motor cortex, VC: Visual cortex, HPC: Hippocampus,
AMG: Amygdala, CM: N. centrum medianum, EMG: Electromyogram

在下での IC_{50} 値の比は NM394 が 23,000, OFLX が 72, ENX が 14,000, CPFY が 20,000 で、結合阻害作用が最も増強されたのは NM394 であった。

IV. 考 察

NM441 は 1,000mg/kg の単独経口投与ではマウスにおいて痙攣を誘発しなかったが、fenbufen あるいは theophylline との併用投与により、100 あるいは 300mg/

kg 以上で痙攣を誘発した。Fenbufen 併用投与時の NM441 の痙攣誘発作用は LFLX や ENX より弱く、CPFY より強かった。また、theophylline と併用した場合、NM441 の作用は LFLX より強いものの、OFLX や CPFY あるいは ENX より弱かった。

このようにマウスで NM441 が fenbufen あるいは theophylline との併用で痙攣誘発作用を示したことが

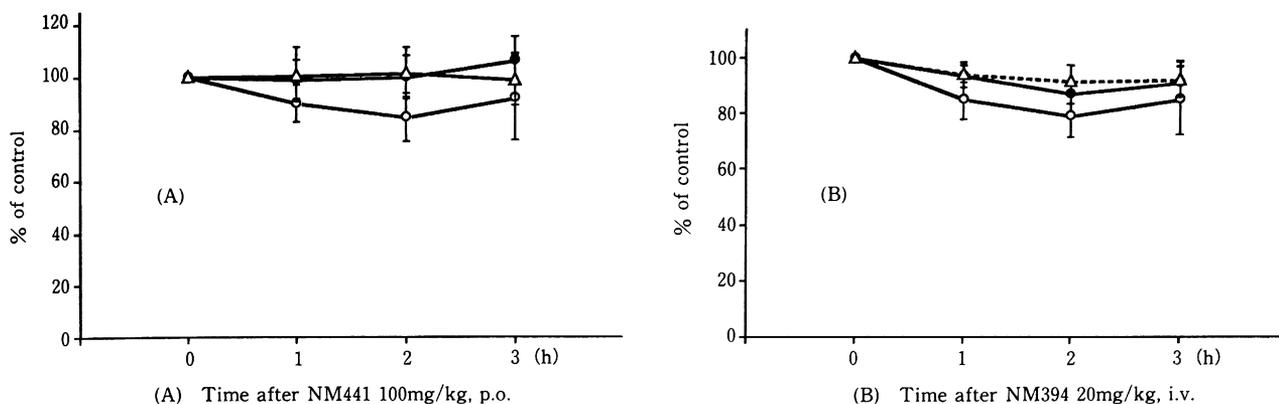


Fig. 5. Effects of NM441 (A) and NM394 (B) on the spinal cord reflex potentials in spinal cats. Each point and bar represent the mean and SE of 4 (NM441) or 5 (NM394) animals, expressed as the percentage of the pre-drug control value.
 —○— Monosynaptic reflex potential —●— Polysynaptic reflex potential ---△--- Dorsal root reflex potential

Table 7. Inhibition of [³H]muscimol binding by NM394 and reference drugs with or without biphenylacetic acid

Quinolones	Biphenylacetic acid		
	none (A)	10 ⁻⁴ M (B)	A/B
NM394	1.5 × 10 ⁻⁴	6.6 × 10 ⁻⁹	23000
Ofloxacin	1.3 × 10 ⁻³	1.8 × 10 ⁻⁵	72
Ciprofloxacin	1.0 × 10 ⁻³	4.9 × 10 ⁻⁸	20000
Enoxacin	2.4 × 10 ⁻⁴	1.7 × 10 ⁻⁸	14000

Each value represents the mean of IC₅₀ (M) of 3 experiments.

ら、中枢作用をより詳細に知るために、ウサギ脳波およびネコ脊髄反射に及ぼす影響についても検討を加えた。

ウサギ脳波においてNM441の活性本体であるNM394は100mg/kgという高用量の静脈内投与によって半数例に棘波や全般性発作発射を誘発し、同用量のCPFXは2/3例で、ENXは全例で棘波群発あるいは全般性発作発射を誘発した。一方、OFLXはこのような脳波変化を示さなかった。また、NM441は1,000mg/kgの経口投与で脳波には影響を与えなかった。一方、比較対照薬として用いたENXは300mg/kgの経口投与で棘波を発現させ、1,000mg/kgでは間代性痙攣を伴う全般性発作発射を誘発した。このように脳波上で比較した場合、NM441あるいはNM394の痙攣誘発作用は、OFLXよりは強いものの、ENXよりはかなり弱く、CPFXとは同程度ないしはやや弱いものと考えられた。

今回、NM394の大量静脈内投与で大脳皮質運動野や視床正中中心核から棘波が発現し、一部の例では痙攣発作に移行した。NM441は大量経口投与でも痙攣波を誘発しなかったが、ENXは経口投与でまず大脳皮質から棘波や痙攣発作波を誘発した。鈴木ら⁶⁾により、ウサギにおいてはfenbufenとNQ系抗菌薬の併用により、まず大脳皮質に棘波や発作発射が出現し、次いで発作波が海馬・扁桃体に広がることを見いだされている。また、ネコを用いた実験でもENXやLFLXの投与時に痙攣波が皮質前頭葉や視床正中中心核などから現れることが報

告されており³⁾、NQ系抗菌薬による痙攣原発部位はこの様な発生学的には新しい脳部位にあるものと思われる。さらに、今回、ネコの脊髄反射電位がNM441あるいはNM394で影響を受けなかったことは、NM441による痙攣が脊髄を原発部位とするものではないことを示している。

NQ系抗菌薬の痙攣誘発作用の発現機序の一つとして、中枢神経系における抑制性伝達物質と考えられているGABAの受容体結合を阻害することが示唆されている⁷⁾。NM394のGABA_A受容体結合阻害作用はfenbufenの活性代謝産物であるbiphenylacetic acid存在下で著しく増強された。このことから、NM441とfenbufen併用時の痙攣の発現およびNM394の痙攣脳波の誘発にはNM394のGABA_A受容体結合阻害作用が一部関与しているものと考えられる。

ところで、NM441は経口投与後速やかに吸収され、血中ではその活性本体であるNM394として存在するが、NM394は比較的脂溶性が低いことから中枢移行性が低いことが知られ⁸⁾、さらにfenbufenとの併用投与によっても中枢移行性が著明に高まることはないことが確認されており(奥山ら、未発表データ)、このことがNM441およびNM394の痙攣誘発作用が他剤に比較して強くはなかったことの理由と考えられる。

Theophylline併用時のNQ系抗菌薬による痙攣誘発作用の発現機序については不明な点が多いが、ENX投

与時に theophylline の血中濃度が高まり、血中半減期も延長することが報告されている⁹⁻¹¹⁾ことから、NM441 の theophylline 併用時に認められた痙攣誘発作用も ENX と同様の機序に基づいて発現している可能性も考えられる。

以上のごとく、NM441 は、今回用いた NQ 系抗菌薬の中では中等度の痙攣誘発作用を有し、作用の発現には GABA_A 受容体結合阻害作用が一部関与していることが示唆された。

謝 辞

本研究の遂行にご尽力頂いた千葉大学医学部薬理学教室 鈴木俊雄助教授に感謝致します。

文 献

- 1) 日本医事新報 3263, 101-102, 1986(厚生省薬務局 医薬品副作用情報 No. 81.)
- 2) Stahlmann R, Lode H: Safety overview: Toxicity, adverse effects and drug interactions. The quinolones (Andriole V T ed.), p. 201~233, Academic Press, London, 1988
- 3) 山本研一, 他: 新キノロン系合成抗菌剤と非ステロイド系抗炎症剤薬の併用により誘発される痙攣作用—NY-198 の作用を中心に—. Chemotherapy 36: 300~324, 1988
- 4) 村山 智, 原 幸男, Ahmmed A, 鈴木俊夫, 玉川正次: マウスにおけるニューキノロン抗菌剤と非ステロイド系抗炎症剤による中枢興奮作用。日薬理誌 99: 13~18, 1992
- 5) Sawyer C H, Everett J W, and Green J D: The rabbit diencephalon in stereotaxic coordinates. J Comp Neurol 101: 801~824, 1954
- 6) 鈴木俊雄, 原 幸雄, 玉川正次, 柿崎一志, 村山 智: ウサギ脳波におよぼすニューキノロン抗菌薬と非ステロイド系抗炎症薬併用の効果。日薬理誌 99: 45~54, 1992
- 7) 堀 誠治, 嶋田甚五郎, 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
- 8) 芝崎茂樹, 栗林尚志, 程島直子, 仲田武實: イヌにおける NM441 の脳脊髄液中濃度推移の検討。日化療会誌 44(S-1): 160~164, 1996
- 9) Wijnands W J A, Van Herwaarden C L A, Vree T B: Enoxacin raises plasma theophylline concentrations. The Lancet ii: 108~109, 1984
- 10) Wijnand W J A, Vree T B, Van Herwaarden C L A: Enoxacin decreases the clearance of theophylline in man. Brit J Clin Pharmacol 20: 583~588, 1985
- 11) Wijnands W J A, Vree T B, Van Herwaarden C L A: The influence of quinolone derivatives on theophylline clearance. Brit J Clin Pharmacol 22: 677~683, 1986

Convulsant effects of NM441, a prodrug type antibacterial agent of the quinolone class

Yojiro Ukai, Akira Yamazaki, Chiemi Kurosaka,
Tsuyoshi Ishima, Yoshiaki Yoshikuni and Kiyoshi Kimura
Research Laboratories, Nippon Shinyaku Co., Ltd.
Nishiohji-Hachijo, Minami-ku, Kyoto 601, Japan

Convulsant effects of NM441 were compared with those of ofloxacin (OFLX), ciprofloxacin (CPFX), lomefloxacin (LFLX) and enoxacin (ENX). These quinolones caused no convulsion in mice when orally treated alone, however, they elicited clonic and tonic convulsions and death by the combined treatment with fenbufen. The order of potency of their convulsant activity was ENX > LFLX > NM441 > CPFX > OFLX. NM441 as well as other quinolones caused convulsions and death by the combined oral treatment with theophylline at the order of potency: LFLX ≥ OFLX ≥ ENX > NM441 > CPFX. NM441 alone showed no potentiation of convulsant activities of bicuculline, pentetrazol and maximal electroshocks. Intravenous injection of NM394, an active metabolite of NM441, generated spike activities or seizure discharges from the thalamus and cerebral cortex in rabbits, and its effect was less significant than that of ENX and CPFX. Oral administration of NM441 showed no changes in the behavior and EEGs in rabbits. Spinal reflex potentials in cats were not affected by intravenous or oral treatments with NM394 or NM441, respectively. Binding of [³H]muscimol to the membrane preparations from rat brains was weakly inhibited by NM394 alone, and the inhibition was markedly potentiated in the presence of biphenylacetic acid, an active metabolite of fenbufen. The interaction of NM394 with GABA_A receptors may partly contribute to the convulsions caused by NM441.