

NM441 およびその活性本体の GABA 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臨床薬理部門* (* 現：東京慈恵会医科大学薬理学講座第1)

キノロン薬が潜在的に痙攣誘発作用を有する可能性のあることはよく知られている。そこで、我々は新しいプロドラッグ型のキノロン薬である NM441 の活性本体 NM394 およびその代謝産物の GABA 受容体結合に及ぼす影響を検討した。NM394 および NM441 は濃度依存的に GABA 受容体結合を阻害した。NM394 の GABA 受容体阻害作用は非ステロイド系消炎薬の共存により増強された。一方、NM394 のオキソ体、エチレンジアミノ体は、単独では本体である NM394 とほぼ同等の阻害作用を有していたが、biphenylacetic acid の共存ではその阻害効果は増強されにくかった。以上の成績より、NM394 は GABA 受容体結合を阻害することにより痙攣を誘発する可能性のあることが示唆され、また非ステロイド系消炎薬併用時にはその痙攣誘発作用が増強される可能性が示唆された。

Key words: キノロン薬, 痙攣, GABA 受容体, 非ステロイド系消炎薬, NM441

最近のキノロン薬の開発にはめざましいものがある。その使用量の増加に伴い、種々の副作用が報告されるようになった。それらの多くは軽微なものと考えられるが、痙攣などの重篤な副作用の報告も認められている。キノロン薬の母体ともいえる nalidixic acid (NA) において、既に眩暈・頭痛・視覚障害などの軽微なものから痙攣に至るまで多彩な中枢神経系副作用が認められている¹⁾。痙攣については、NA で既に痙攣誘発の報告がある^{2,3)}。また、pipemidic acid (PPA) を腎不全患者に投与した際に痙攣が誘発されたとの報告がある⁴⁾。いわゆるニューキノロン薬 (NQs) では、enoxacin (ENX)⁵⁾、ciprofloxacin (CPF)^{6,7)}、norfloxacin (NFLX)⁸⁾ および lomefloxacin (LFLX)⁹⁾ の投与時にも痙攣が誘発されたとの報告がある。さらに 1986 年、NQs の一つである ENX と非ステロイド系消炎薬 (NSAIDs) の一つである fenbufen (FB) との併用時に痙攣が誘発されたとの報告¹⁰⁾ がなされてより、NQs 単

独ならびに NSAIDs 併用時の痙攣発現機序が注目されている。

一方、 γ -アミノ酪酸 (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、その合成阻害・受容体結合阻害などが生じ GABA 作動性抑制性伝達が阻害された際には、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¹¹⁾。我々は、NQs が GABA 受容体結合を阻害することを示し、NQs による痙攣の発現に GABA 受容体結合阻害の関与している可能性を示してきた¹²⁾。さらに我々は、NSAIDs 共存下では NQs の GABA 受容体結合阻害効果が増強されることを明らかにし、両系薬併用時にはより低濃度の NQs でも痙攣が誘発される可能性を示してきた¹²⁻¹⁵⁾。新しいキノロン薬 NM441 は NM394 を活性本体とするエステル型のプロドラッグであり、その主な代謝産物としてオキソ体とエチレンジアミノ体の存在が確認されている (Fig. 1)¹⁶⁾。これらのキノロン薬およびその代謝産物が痙攣作用を

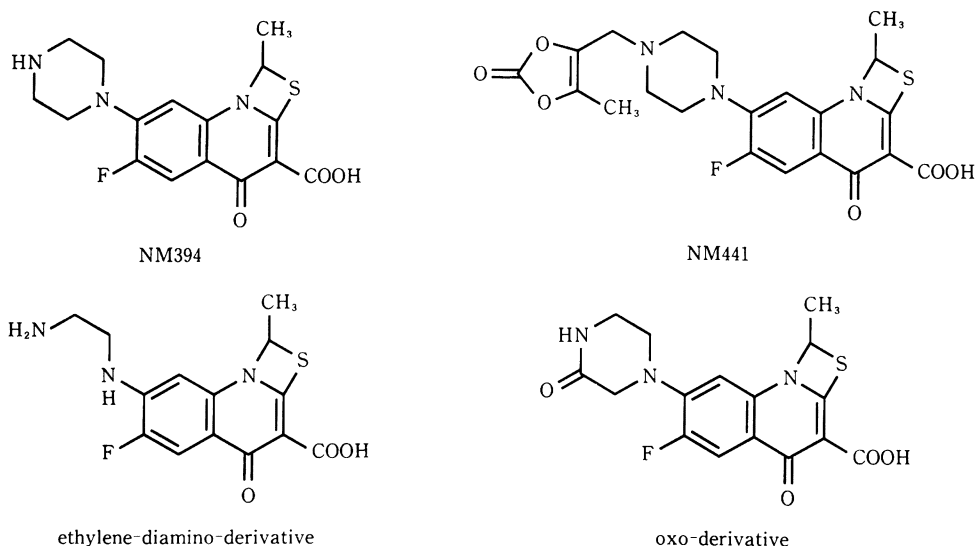


Fig. 1. Chemical structures of NM394, NM441 and the metabolites

有するか否かが注目される。そこで我々は、これらの化合物の GABA 受容体結合に及ぼす影響を NSAIDs 共存・非共存下にて測定し、他のキノロン薬と比較検討した。

I 材料および方法

1. 薬物など

NM441, NM394 ならびにそのオキソ体, エチレンジアミノ体は明治製菓株式会社より供与された。NFLX, fleroxacin (FLRX) は杏林製薬株式会社より, ENX, sparfloxacin (SPFX) は大日本製薬株式会社より, OFLX は第一製薬株式会社より, CPFX はバイエル薬品株式会社より, さらに tosfloxacin (TFLX) は富山化学工業株式会社より供与された。NSAIDs は Sigma Chemical Co. より, また [^3H]GABA は New England Nuclear Research Products より購入した。

2. Mouse synaptic membrane の調製

Mouse (ddY strain, 5 週齢) を断頭, すばやく脳を取り出し, 0.32M sucrose 液にて 10% homogenate を作製した。この homogenate より, 遠心により crude mitochondrial pellet (P2 pellet) を調製した。その pellet を 10mM potassium phosphate buffer (KPB, pH7.4) にて低張処理・破壊した後, Zukin らの方法¹⁷⁾ により crude synaptic membrane を調製した。さらに, 150mM NaCl を含む 10mM KPB にて 5 回洗浄し, mouse synaptic membrane とした。この membrane を適量の 10mM KPB に懸濁し (ca. 0.3g brain-equivalent membrane/ml), -20°C にて保存した。

3. GABA 受容体結合の測定

[^3H]GABA の mouse synaptic membrane における特異的結合を濾過法により測定し, GABA 受容体結合とした。

測定に先立ち, mouse synaptic membrane を融解, 10 mM KPB にて 2 回洗浄した。Membrane, [^3H]GABA (最終濃度: 10nM) および薬物を含む 400 μl の反応混液 (10mM KPB) を 4°C , 20 分間 incubate した。そのうち 350 μl をグラスフィルター (Whatman GF/B) 上に吸引濾過した。3ml の氷冷した脱イオン水にて 2 回洗浄し, フィルター上の isotope 量を液体シンチレーションカウンターにて測定し結合量とした。

特異的結合量は, 全結合量 (非標識 GABA 非存在下の結合量) より非特異的結合量 (1mM 非標識 GABA 存在下の結合量) を差し引くことにより求めた。

測定はすべて duplicate にて実施した。

II. 結果

1. NM441, NM394 ならびに代謝産物の GABA 受容体結合に及ぼす影響

NM441, その活性本体である NM394 およびその代謝産物の GABA 受容体結合に及ぼす影響を検討した。NM441, NM394 は濃度依存的に GABA 受容体結合を阻害した。その代謝産物であるオキソ体, エチレンジア

ミノ体の GABA 受容体結合阻害作用は, NM394 に比べ若干弱かった (Fig. 2, Table 1)。また, NFLX, CPFX, ENX は濃度依存的に GABA 受容体結合を阻害した。それらの IC_{50} を Table 1 に示す。一方, FLRX, TFLX, SPFX では, GABA 受容体結合阻害作用は弱かった。NM394 の GABA 受容体阻害作用は CPFX と ENX との中間に位置していた。

2. NSAIDs 存在下における NM394 および NQs の GABA 受容体結合に及ぼす影響

Indomethacin (Indo), acetylsalicylic acid (Acet), FB の活性代謝産物である biphenylacetic acid (BPA) の存在下 (10^{-4}M) に NM394 の GABA 受容体結合に及ぼす影響を検討した。NM394 の GABA 受容体結合阻害効果は, Acet の共存によっては影響されなかったものの, Indo, BPA の共存により増強された (Fig. 3)。また, BPA (10^{-4}M) 存在下に NM394 の代謝産物であるオキソ体, エチレンジアミノ体の GABA 受容体結合に及ぼす影響を検討した。これらの代謝産物の GABA 受容体結合阻害作用は, BPA の存在により若干増強された (Fig. 3)。NFLX, ENX, CPFX および OFLX では, BPA の共存下でそれらの GABA 受容体結合阻害効果が著しく増強された。しかし, TFLX, SPFX, FLRX では, ほとんど影響されなかった (Fig. 4)。Indo, Acet 共存下におけるこれら NQs の IC_{50} を含め Table 1 に示す。

III. 考察

近年, 多くの NQs が開発され, 臨床に用いられている。キノロン薬の副作用は, 従来から比較的軽微なものと考えられてきた。しかし, キノロン薬の母体ともいえる NA において, 多彩な中枢神経系副作用を呈しており¹⁾, その中には痙攣誘発の報告も認められている^{2,3)}。また, NQs においても ENX⁵⁾, CPFX^{6,7)}, NFLX⁸⁾, LFLX⁹⁾ などにおいて痙攣誘発の報告があり, これらキノロン薬が潜在的に痙攣誘発作用を有する可能性のあることはよく知られている。さらに 1986 年, NQs の一つである ENX と NSAIDs の一つである FB の併用時に痙攣が誘発されたとの報告がなされ¹⁰⁾, NQs 単独および NSAIDs 併用時の痙攣誘発作用が注目されている¹⁸⁾。我々は, NQs が中枢神経系において抑制性伝達物質である GABA の受容体への結合を阻害し, さらにその阻害効果は NSAIDs の共存により増強されることを示し, NQs 単独および NSAIDs 併用時の痙攣誘発に GABA 受容体結合阻害の関与している可能性を示してきた¹²⁻¹⁵⁾。

NM394 は新しく開発された NQ であり, 本薬が単独で, また NSAIDs との併用により痙攣を誘発する可能性を有するか否かが興味もたれる。我々は, NM394 およびそのエステル型のプロドラッグである NM441, さらに NM394 の主な代謝産物の GABA 受容体結合に及ぼす影響を検討した。NM441 および NM394 は濃度依存

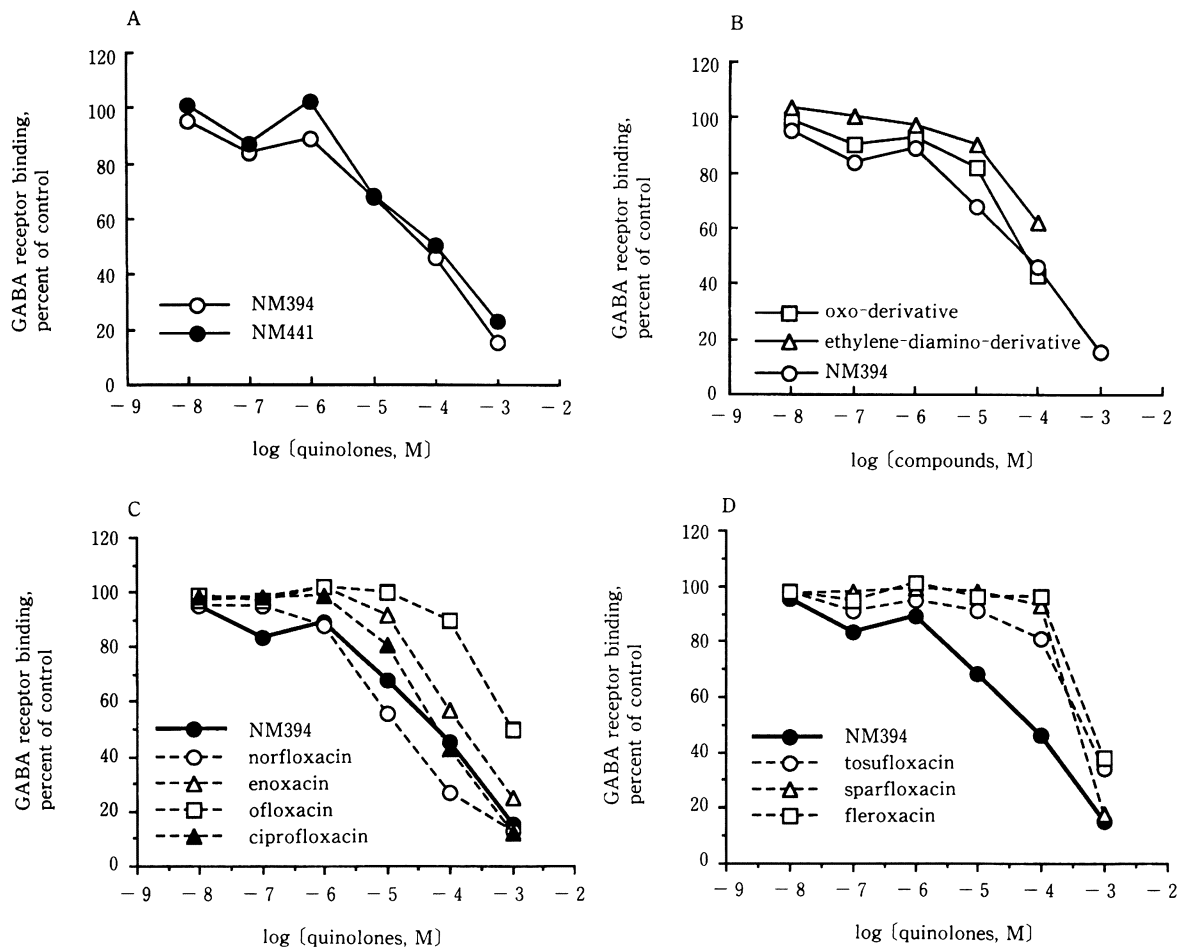


Fig. 2. Effect of NM394, NM441 (A), its metabolites (B) and new quinolones (C and D) on the receptor binding of γ -aminobutyric acid

Table 1. IC_{50} value (M) of new quinolones in the presence of non-steroidal anti-inflammatory drugs (10^{-4} M)

	no NSAIDs	acetylsalicylic acid	indomethacin	biphenylacetic acid
NM394	7.5×10^{-5}	2.7×10^{-5}	5.8×10^{-7}	$< 10^{-8}$
norfloxacin	1.4×10^{-5}	1.4×10^{-5}	1.9×10^{-7}	$< 10^{-8}$
enoxacin	1.4×10^{-4}	8.3×10^{-5}	5.3×10^{-7}	1.1×10^{-8}
ofloxacin	1.0×10^{-3}	7.6×10^{-4}	1.2×10^{-4}	8.3×10^{-7}
ciprofloxacin	7.6×10^{-5}	1.0×10^{-4}	1.0×10^{-4}	3.0×10^{-8}
tosufloxacin	5.7×10^{-4}	$> 10^{-3}$	$> 10^{-3}$	1.2×10^{-4}
fleroxacin	7.6×10^{-4}	7.6×10^{-4}	5.8×10^{-4}	1.0×10^{-4}
sparfloxacin	9.1×10^{-4}	1.0×10^{-3}	2.8×10^{-4}	5.2×10^{-5}

Each value represents mean of two or three separate experiments
NSAIDs: non-steroidal anti-inflammatory drugs

的に GABA 受容体結合を阻害した。その阻害の強さは CFX と ENX との中間に位置していた。CPFX, ENX は臨床的に⁵⁻⁷⁾、また動物実験¹⁹⁾においても、痙攣が誘発されるとの報告がある。NM394 の GABA 受容体結合阻害の強さがこの両薬の中間に位置していることから、本薬の脳内濃度が上昇した際には痙攣が誘発される可能性のあることが示唆された。以前より、我々は GABA 受容体結合阻害におけるキノロン薬の構造活性相関を検討してきた。その結果、キノロン薬の 7 位に遊離ピペラジニ

ル基を有する化合物が GABA 受容体結合を強く阻害することを明らかにしてきた^{12,13,15)}。NM394 は、その 7 位に遊離ピペラジニル基を有している。NM394 の GABA 受容体結合阻害作用が遊離ピペラジニル基を有する ENX と CFX との中間に位置していることは以前より示してきた構造活性相関と一致している。

NQs には NSAIDs の併用によりその痙攣誘発作用が増強されることが報告されているものがある。それらの NQs では NSAIDs の共存により GABA 受容体結合に

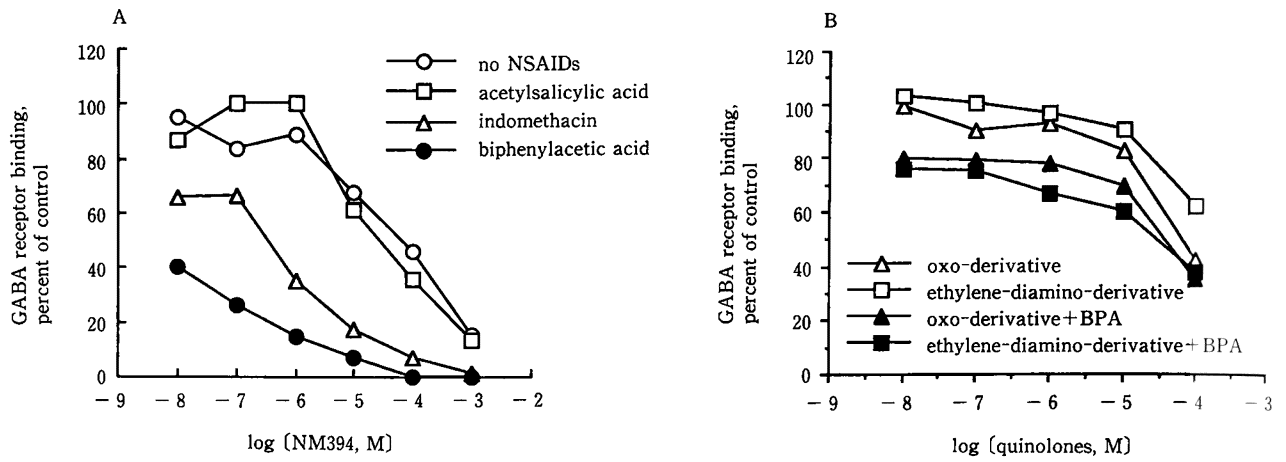


Fig. 3. Effect of NM394 in the presence of non-steroidal anti-inflammatory drugs (10^{-4} M) (A) on the receptor binding of γ -aminobutyric acid, and effect of the metabolites on the binding in the presence or in the absence of biphenylacetic acid (10^{-4} M) (B)
BPA: biphenylacetic acid

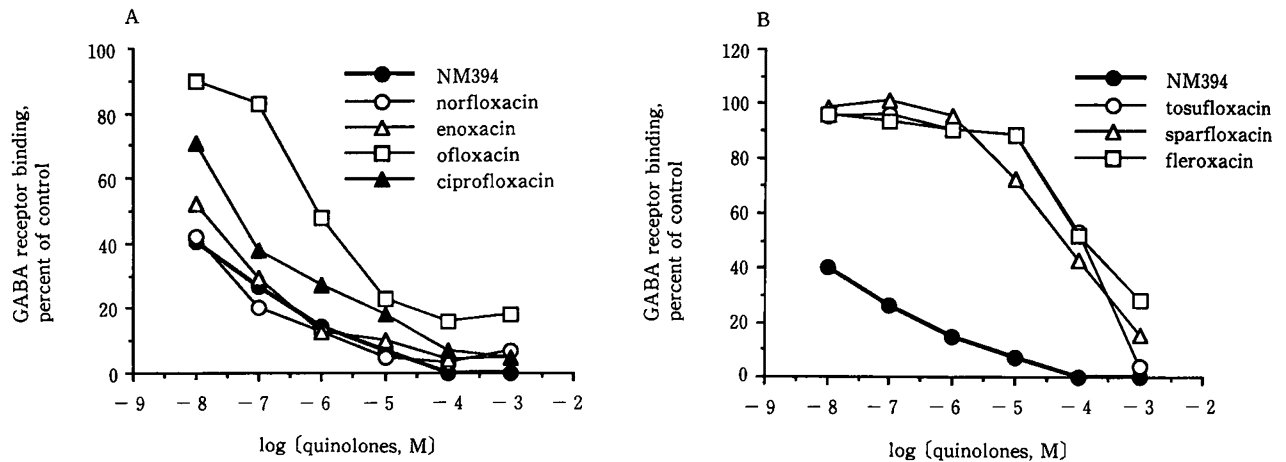


Fig. 4. Effect of NM394 and new quinolones on γ -aminobutyric acid receptor binding in the presence of biphenylacetic acid (10^{-4} M)

対する阻害効果が増強されることが知られている。そこで、NM394のNSAIDs併用時の痙攣誘発作用を推測する目的で、NSAIDs共存下にNM394のGABA受容体結合に及ぼす影響を検討した。Fig. 3に示すように、NM394のGABA受容体阻害効果はFBの活性代謝産物であるBPA (10^{-4} M)の共存により著しく増強された。さらにIndoの共存下においてもNM394のGABA受容体結合阻害効果は増強された。これらの*in vitro*の成績より、NM394の痙攣誘発作用はNSAIDsの併用時には増強される可能性のあることが示された。

また、NM394の代謝産物であるオキシ体ならびにエチレンジアミノ体のGABA受容体阻害効果は、単独ではNM394自身より若干弱かったが、BPAの共存下では

軽度の増強作用が認められた。ラット尿中には投与量の0.1%のエチレンジアミノ体が、またヒト尿中には投与量の0.8%のエチレンジアミノ体と5.1%のオキシ体が検出されている¹⁶⁾。代謝産物の検出率が低いことを考慮すれば、生体内で痙攣が誘発されるとすれば、その痙攣発現には主としてNM394自身に関与するものと考えられる。しかし、何らかの理由で血中濃度の上昇をきたした場合には、代謝産物の作用をも考慮する必要がある。

以上の*in vitro*の成績より、NM394は脳内濃度が上昇した際には、GABA受容体結合を阻害することにより痙攣を誘発する可能性が示唆された。さらにNSAIDs併用時には、その痙攣誘発作用が増強される可能性が示唆された。

文 献

- 1) Kucers A, Mck Bennet N: The use of antibiotics (4th ed.), Lippincott Co., Philadelphia, 1988
- 2) Islam M A, Sreedharan T: Convulsion, hyperglycemia and glucosuria from overdose of nalidixic acid. *JAMA* 192: 1100~1101, 1965
- 3) Fraser A G, Harrower A D B: Convulsions and hyperglycemia associated with nalidixic acid. *Br Med J* 2: 1518, 1977
- 4) 上田 泰, 他: Pipemidic acid に関する臨床的研究. *Chemotherapy* 23: 2798~2810, 1975
- 5) Simpson K J, Brodie M J: Convulsions related to enoxacin. *Lancet* ii: 161, 1985
- 6) Arcieri G, Griffith E, Gruenwald G, Heyd A, O'Brien S, Becker N, August R: Ciprofloxacin; an update on clinical experience. *Am J Med* 82 (suppl 4A): 381~394, 1987
- 7) Fass R J: Efficacy and safety of oral ciprofloxacin in the treatment of serious respiratory infections. *Am J Med* (suppl 4A): 202~207, 1987
- 8) Anastasio G D, Mensder D, Little J M: Norfloxacin and seizures. *Ann Intern Med* 109: 169~170, 1988
- 9) 定光大海, 立石彰男, 副島由行, 松本美志也, 中島 研, 前川剛志: 塩酸ロメフロキサシンを大量に服用した1例. 第2回中国四国中毒研究会プログラム・抄録集: 4, 1990
- 10) 厚生省薬務局: 医薬品副作用情報 No.8, 1986
- 11) Meldrum B S: Epilepsy and γ -aminobutyric acid-mediated inhibition. *Int Rev Neurobiol* 17: 1~36, 1975
- 12) 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
- 13) Hori S, Shimada J, Saito A, Matsuda M, Miyahara T: 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
- 14) 堀 誠治, 嶋田甚五郎, 柴 孝也, 吉田正樹, 斎藤 篤, 酒井 紀: Sparfloxacin の痙攣誘発作用に関する研究. *Chemotherapy* 39(S-4): 161~166, 1991
- 15) Hori S, Shimada J: Effect of quinolones on the central nervous system. *In Quinolone Antimicrobial Agents*, 2nd ed. (Hooper D C, Wolfson J S ed.), p. 513~518, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1993
- 16) 名出頼男, 副島林造: 第42回日本化学療法学会西日本支部総会, 新薬シンポジウム。NM441, 名古屋, 1994
- 17) Zukin S R, Young A B, 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
- 18) 梅沢 修: ニューキノロン系抗菌薬と酸性非ステロイド性消炎鎮痛薬との相互作用—痙攣。医薬品の副作用 Annual Report 1990 (伊藤宗元, 他編), p.157~163, 中外医学社, 東京, 1991
- 19) 金光敬二, 堀 誠治, 柳川 明, 嶋田甚五郎: キノロン薬の痙攣誘発作用に関する研究—特に非ステロイド系抗炎症剤との薬物相互作用について—。 *臨床薬理* 24: 241~242, 1993

Effect of NM441 and its active form on GABA receptor binding

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

*Present address: Department of Pharmacology (I), The Jikei University School of Medicine

New quinolones have been reported to have potent convulsant activity, and the concurrent administration of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) has been reported to enhance this convulsant activity. We studied the effect of NM441, a newly developed quinolone, and NM394, an active metabolite of NM441, and its metabolites on the receptor binding of γ -aminobutyric acid (GABA), which is an inhibitory transmitter in the mammalian central nervous system (CNS). NM394 and NM441 inhibited GABA receptor binding in a concentration-dependent manner. The potency in the inhibition of the binding was between that of enoxacin and ciprofloxacin. In the presence of biphenylacetic acid (BPA), the inhibitory activity of NM394 was remarkably enhanced. The oxo-derivative and the ethylene-diamino-derivative inhibited GABA receptor binding, and their potencies were almost the same as NM394. But the inhibitory activity of the metabolites was little enhanced in the presence of BPA. These *in vitro* results suggest that NM394 induces convulsions through the inhibition of GABA receptor binding when it accumulates in the CNS, and that the concurrent administration of NSAIDs enhances the convulsant activity of NM394.