

新キノロン薬, gatifloxacin の GABA 受容体結合に及ぼす影響と痙攣誘発作用

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

(*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はよく知られている。我々は、新しいキノロン薬, gatifloxacin (GFLX) の痙攣誘発作用と γ -aminobutyrate (GABA) 受容体結合に及ぼす影響を検討した。GFLX の脳室内投与により、マウスに投与量依存的に痙攣が誘発された。その痙攣誘発作用は norfloxacin と fleroxacin の中間であった。また、GFLX は、高濃度で GABA 受容体結合を阻害した。Biphenylacetate, flurbiprofen の共存により、その GABA 受容体結合阻害作用は中等度増強された。以上の成績より、GFLX は、その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のあることが示唆された。その痙攣誘発作用は、norfloxacin と fleroxacin の中間に位置する可能性が示された。

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

近年、多くのキノロン薬が開発され、臨床応用されているが、一方では、多彩な副作用の報告がなされている。中枢神経系副作用についてみると、キノロン薬の嚙矢である nalidixic acid (NA) において、すでに多彩な中枢神経系副作用が報告されており¹⁾、キノロン薬にとって中枢神経系副作用は宿命的なものと考えられてきた。特に、キノロン薬使用中の痙攣誘発についてみると、NA においてすでに報告されている^{2,3)}。Pipemidic acid (PPA) においても、痙攣誘発の報告がなされている⁴⁾。さらに、enoxacin (ENX)⁵⁾、ciprofloxacin (CPFX)^{6,7)}、norfloxacin (NFLX)⁸⁾、lomefloxacin (LFLX)⁹⁾ などにも関連すると考えられる痙攣誘発の報告があり、キノロン薬による痙攣誘発機序が注目されていた。さらに、キノロン薬と非ステロイド系消炎薬 (NSAIDs) 併用時における痙攣誘発の報告^{10,11)} がなされ、両系薬併用時の痙攣誘発機序が、キノロン薬単独時の痙攣誘発機序とともに注目されてきた。

我々は、キノロン薬の脳室内投与によりマウスに痙攣が誘発され、その痙攣誘発作用は NSAIDs の同時投与により増強されることをすでに示してきた^{12,13)}。さらに、これらキノロン薬が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 -aminobutyrate (GABA)¹⁴⁾ 受容体結合を *in vitro* で阻害し、その阻害効果は NSAIDs の共存により増強されることを明らかにし^{15,16)}、キノロン薬単独および NSAIDs 併用時の痙攣誘発に GABA 受容体結合阻害

が関与している可能性を示してきた。

Gatifloxacin (GFLX) は新しく開発されたキノロン薬であり、本薬が中枢神経系副作用の一つとして痙攣誘発作用を有するか否かに関心が持たれる。そこで、我々は、GFLX の痙攣誘発作用をマウスを用いて検討するとともに、GABA 受容体結合に及ぼす影響を NSAIDs 存在・非存在下に検討した。

I. 方 法

1) マウス脳室内投与

マウス (ddY strain, 6w, male) を無麻酔・非動下に頭皮を切開し、中島の方法¹⁷⁾ に従い、マイクロシリンジを用いて側脳室内に GFLX 5 μ L を注入した。GFLX は生理食塩水に溶解し、5 μ L に 0.25~200 nmol の投与量が含まれるように調製した。マウスは薬物投与後2時間観察し、痙攣の有無を観察した。

NSAIDs, キノロン薬の併用の際は、両薬物溶液を所定の投与量となるよう混合・調整し、その5 μ L を脳室内に注入した。

2) マウス脳 crude synaptic membranes の調製

マウス (ddY strain, 6w, male) を断頭、脳をすばやく取り出し、0.32M sucrose 液にて 10% homogenate を作製した。この homogenate を 2,000g, 10分遠心し、その上清をさらに 15,000g, 15分遠心することにより crude mitochondrial pellet (P2 pellet) を調製した。

この pellet を 10mM potassium phosphate buffer (KPB, pH 7.4) にて低張処理・破壊し, Zukin らの方法¹⁸⁾ に従い, crude synaptic membrane を調製した。さらに, 150mM NaCl を含む 10mM KPB にて 5 回洗浄した。この membrane を適量の 10mM KPB に懸濁し, -20°C にて保存した。

3) GABA 受容体結合の測定

[^3H] GABA (980.5 GBq/m mol, New England Nuclear) の crude synaptic membrane における特異的結合を遠心法により測定し, GABA 受容体結合とした。

測定に先立ち, crude synaptic membrane を融解, 10mM KPB にて 2 回洗浄した。400 μL の 10mM KPB (pH 7.4) 中に, crude synaptic membrane, [^3H] GABA (終濃度: 10nM) および薬物を含む反応混液を 4°C , 20 分 incubate した。20,000g, 15 分遠心し, 反応を停止した。上清を吸引除去したのち, 氷冷した脱イオン水にて pellet 表面をすばやく洗浄し, pellet 中に存在する isotope 量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, 非特異的結合 (1mM 非標識 GABA 存在下の結合量) を全結合 (非標識 GABA 非存在下の結合量) から差し引くことにより求めた。

測定は duplicate で実施した。

4) 比較検討したキノロン薬および NSAIDs

今回, 検討したキノロン薬は NFLX (杏林製薬), FLRX (杏林製薬), GFLX (3/2 水和物: Lot No. G155311, 杏林製薬), ENX (大日本製薬), CPFX (バイエル薬品) および OFLX (第一製薬) であった。また, NSAIDs は acetylsalicylate, flurbiprofen, indomethacin および, biphenylacetate (BPA) (以上全て Sigma Chemical Co.) であった。

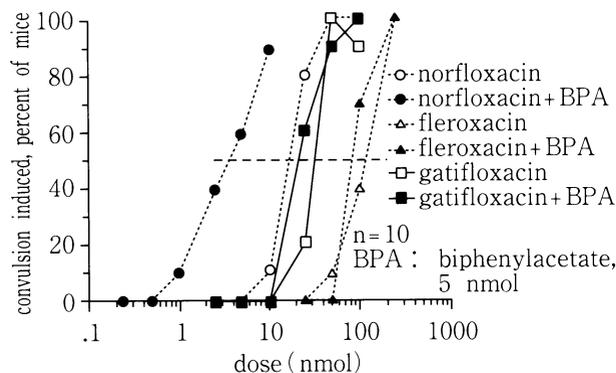


Fig. 1. Convulsant activity of norfloxacin, fleroxacin and gatifloxacin. Quinolones were injected directly in a lateral ventricle of mouse brain with or without biphenylacetate (5 nmol).

II. 結 果

1) マウス脳室内投与による痙攣誘発

NFLX, FLRX および GFLX の脳室内投与により, マウスに投与量依存的に痙攣が誘発された。GFLX の痙攣誘発作用は NFLX と FLRX の中間に位置していた (Fig. 1)。

Fenbufen の活性代謝産物である BPA (5 nmol) の同時投与により, NFLX の痙攣誘発作用は増強されたが, FLRX のそれは殆ど影響されなかった。GFLX は NFLX と FLRX の中間に位置していた (Fig. 1)。

他の NSAIDs 同時投与時の NFLX, FLRX および GFLX の痙攣誘発作用を検討した。NFLX では flurbiprofen, indomethacin (5 nmol) の同時投与により痙攣誘発作

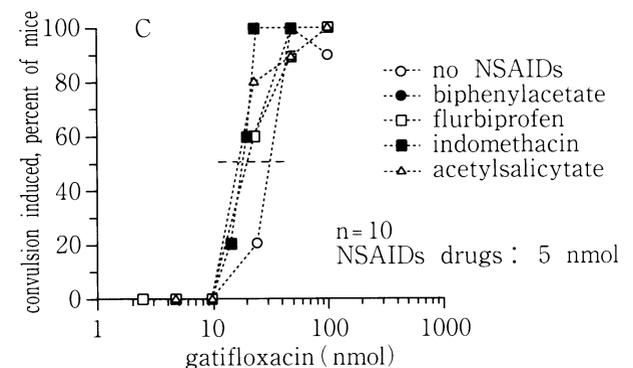
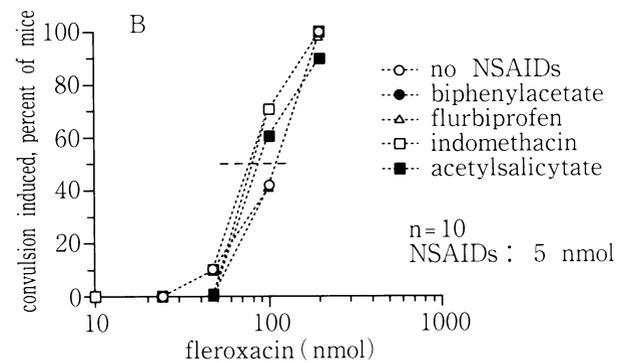
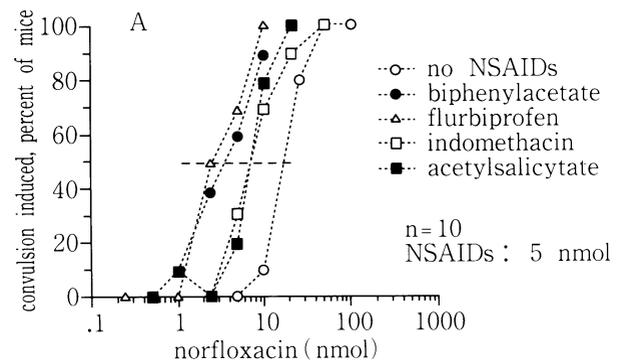


Fig. 2. Convulsant activity of norfloxacin (A), fleroxacin (B) and gatifloxacin (C) with non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). Quinolones and NSAIDs (5 nmol) were administered concurrently in a lateral ventricle of mouse brain.

用の増強が認められた (Fig. 2A) が, FLRX および GFLX では NSAIDs (5 nmol) の同時投与においても, その痙攣誘発作用の増強は軽度であった (Fig. 2B and C)。50% のマウスに痙攣を誘発するのに要すると考えられるキノロン薬の投与量 (ED_{50}) を Table 1 に示す。

2) GABA 受容体結合に及ぼす各種キノロン薬の影響
NFLX, FLRX および GFLX の GABA 受容体結合に及ぼす影響をキノロン薬単独および NSAIDs (10^{-4} M) 共存下に検討した。NFLX は濃度依存的に GABA 受容体結合を阻害したが, FLRX, GFLX では阻害作用は弱かった (Fig. 3, Table 1)。BPA, flurbiprofen, indomethacin の共存 (いずれも 10^{-4} M) により, NFLX の GABA 受容体結合阻害効果は著しく増強された (Fig. 3A)。FLRX では, これらの NSAIDs の共存下で, その GABA 受容体結合阻害作用は軽度増強された。GFLX では, BPA と flurbiprofen により GFLX の GABA 受容体結合阻害作用は中等度増強されたが, indomethacin では増強されなかった (Fig. 3B and C)。

Acetylsalicylate は, いずれのキノロン薬の GABA 受容体結合阻害作用を増強させることはなかった。キノロン薬単独および NSAIDs 共存下に GABA 受容体結合を 50% 阻害するのに要するキノロン薬の濃度 (IC_{50}) を, 先に算出した痙攣誘発における ED_{50} 値と共に Table 1 に示す。

ENX, CPFX, OFLX について, 同様に GABA 受容体結合に及ぼす影響を検討した。ENX, CPFX は濃度依存的に GABA 受容体結合を阻害したが, OFLX の阻害作用は弱かった。しかし, これらのキノロン薬では, BPA, flurbiprofen の共存により GABA 受容体結合阻害作用は著しく増強された。Acetylsalicylate では, キノロン薬の GABA 受容体結合阻害作用の増強は認められなかった (Fig. 4)。これらのキノロン薬の IC_{50} を NFLX, FLRX, GFLX と共に Table 2 に示す。

III. 考 察

近年のキノロン薬の開発には目覚ましいものがある。その一方で, キノロン薬の中枢神経系副作用は多彩なものが報告されている。中でも, 痙攣誘発作用は, キノロン薬の嚆矢ともいえる NA において既に報告されている¹⁻³⁾。また, PPA においても, 腎不全患者に投与中に痙攣が誘発されたとの報告がある⁴⁾。ニューキノロン薬では, ENX, LFLX, CPFX, NFLX など使用時の痙攣誘発の報告⁵⁻⁹⁾ がなされている。また, 1986 年, キノロン薬の一つである ENX と NSAIDs の一つである fenbufen との併用時に, 腎機能などに異常のない患者において痙攣が認められ¹⁰⁾, 両薬併用時の痙攣誘発機序が注目されていた。我々は, キノロン薬の痙攣誘発機序を, 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 の受容体結合との関連で検討してきた^{12, 13, 15, 16)}。その中で, キノロン薬が GABA 受容体結合を阻害することを, さらに, NSAIDs 存在下ではキノロン薬の GABA 受容体結合阻害作用が増強されることを示し, キノロン薬関連の痙攣誘発に GABA 受容体結合阻害の関与を示唆してきた。GFLX は新しく開発されたキノロン薬であり, その中枢神経系に対する副作用, とくに痙攣誘発作用の有無に興味を持たれる。本薬は, その構造上 1 位に cyclopropyl 基, 7 位に methyl 基を有する piperazinyl 基を持っており, 遊離 piperazinyl 基を有する NFLX および N-methylpiperazinyl 基を有する FLRX と構造を異にしている (Fig. 5)。GFLX の脳室内投与による痙攣誘発作用は NFLX と FLRX の間に位置し, GABA 受容体結合阻害効果においても NFLX よりは弱いものの FLRX よりは強かった (Fig. 1, Table 1)。我々は, GABA 受容体結合阻害における構造活性相関を検討してきた¹⁶⁾。そこでは, 7 位に遊離 piperazinyl 基を有するものが GABA 受容体結合を強く阻害し, さらに N-alkyl 化された piperazinyl 基を有する化合物では,

Table 1. IC_{50} values (M) and ED_{50} (nmol) of norfloxacin, fleroxacin and gatifloxacin.

	no NSAIDs	acetylsalicylate	flurbiprofen	indomethacin	biphenyl-acetate
norfloxacin					
IC_{50}	1.4×10^{-5}	1.4×10^{-5}	1.4×10^{-8}	1.9×10^{-7}	$< 10^{-8}$
ED_{50}	16	6.8	2.5	6.8	3.5
fleroxacin					
IC_{50}	7.6×10^{-4}	7.6×10^{-4}	2.5×10^{-4}	5.8×10^{-4}	1.0×10^{-4}
ED_{50}	112	89	112	77	70
gatifloxacin					
IC_{50}	3.1×10^{-4}	2.2×10^{-4}	7.9×10^{-6}	2.2×10^{-4}	6.3×10^{-6}
ED_{50}	31	19	21	19	21

NSAIDs: 5 nmol for intraventricular injection
10⁻⁴ M for GABA receptor assay

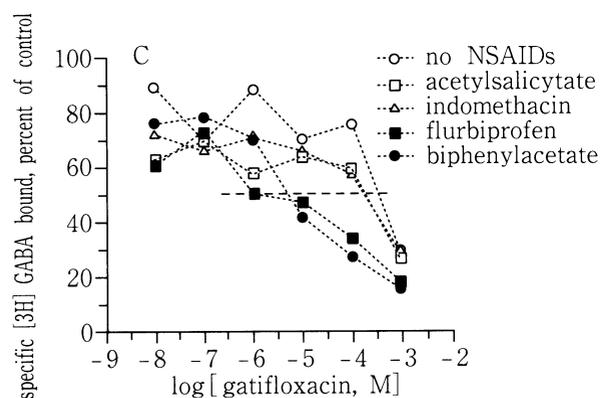
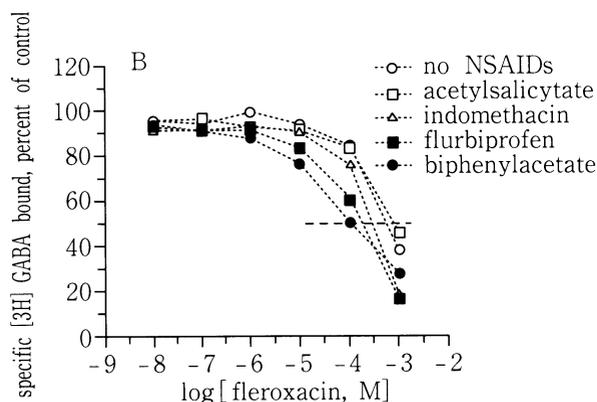
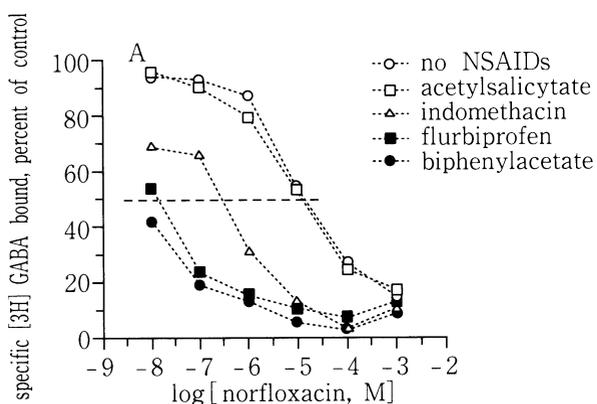


Fig. 3. Effect of norfloxacin (A), fleroxacin (B) and gatifloxacin (C) on the receptor binding of γ -aminobutyric acid in mouse crude synaptic membranes in the presence or absence of non-steroidal anti-inflammatory drugs (10^{-4} M).

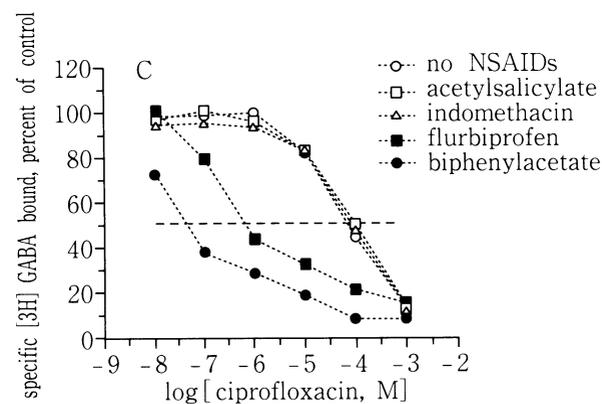
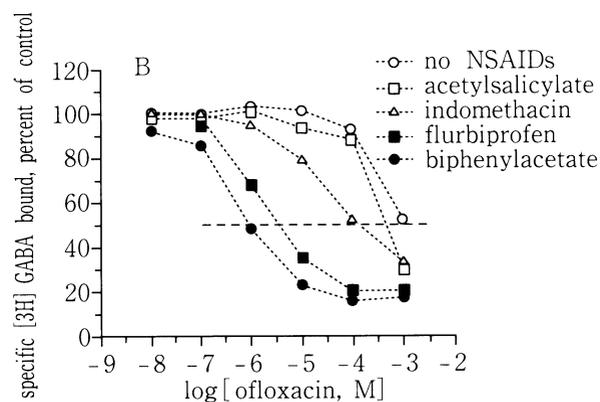
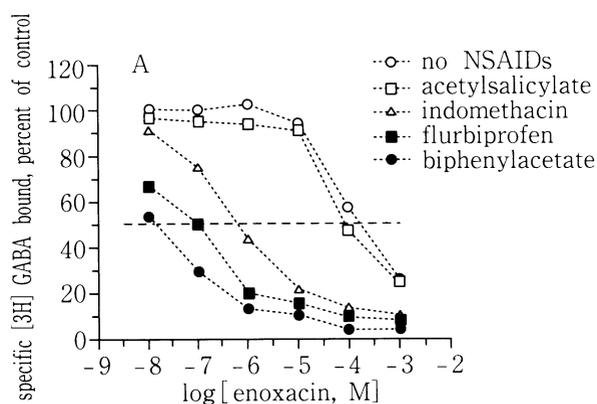


Fig. 4. Effect of enoxacin (A), ofloxacin (B) and ciprofloxacin (C) on the receptor binding of γ -aminobutyric acid in mouse crude synaptic membranes.

Table 2. IC_{50} values [M] of new quinolones in the presence of NSAIDs (10^{-4} M).

	no NSAIDs	acetylsalicylate	flurbiprofen	indomethacin	biphenylacetate
gatifloxacin	3.1×10^{-4}	2.2×10^{-4}	7.9×10^{-6}	2.2×10^{-4}	6.3×10^{-6}
norfloxacin	1.4×10^{-5}	1.4×10^{-5}	1.4×10^{-8}	1.9×10^{-7}	$< 10^{-8}$
enoxacin	1.4×10^{-4}	8.3×10^{-5}	3.3×10^{-8}	5.3×10^{-7}	1.1×10^{-8}
ciprofloxacin	7.6×10^{-5}	1.0×10^{-4}	1.0×10^{-6}	1.0×10^{-4}	3.0×10^{-8}
ofloxacin	1.0×10^{-3}	7.6×10^{-4}	3.0×10^{-6}	1.2×10^{-4}	8.3×10^{-7}
floxacin	7.6×10^{-4}	7.6×10^{-4}	2.5×10^{-4}	5.8×10^{-4}	1.0×10^{-4}

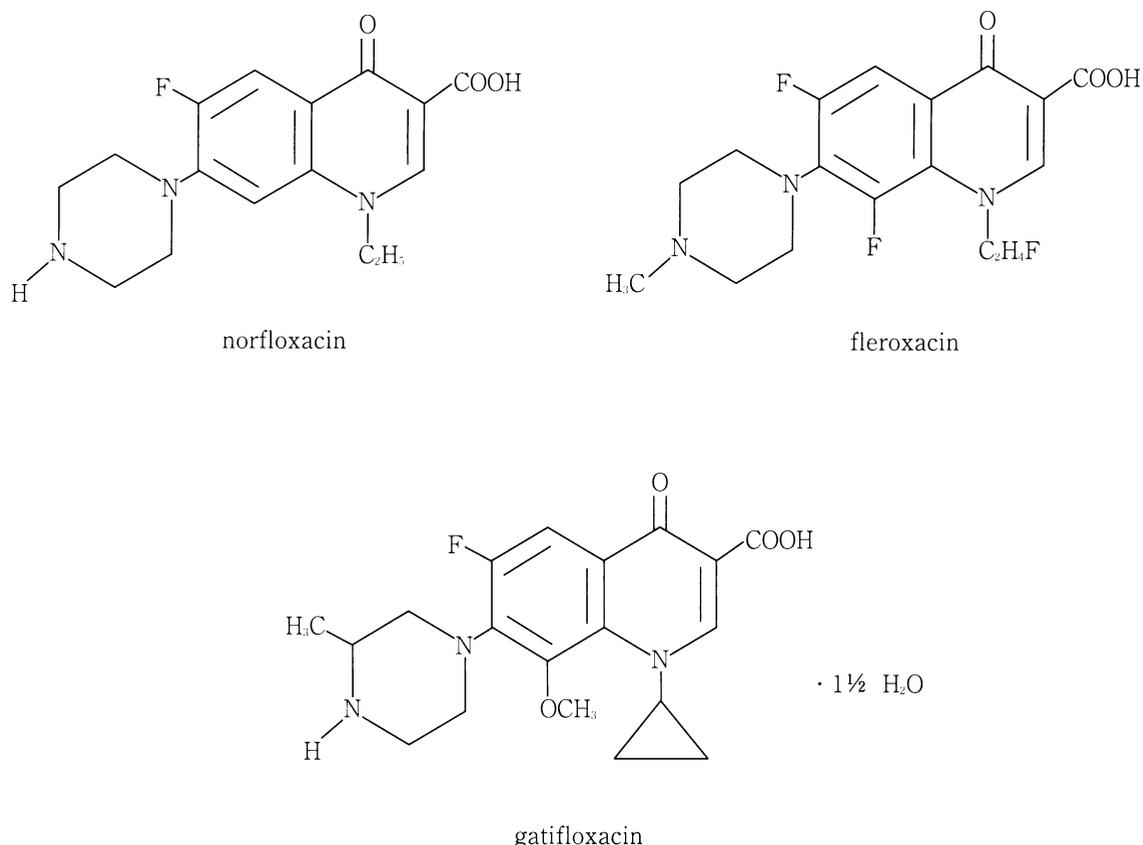


Fig. 5. Chemical structures of norfloxacin, fleroxacin and gatifloxacin.

GABA 受容体結合阻害作用の弱いことが明らかとなった。今回の成績でも、遊離 piperazinyl 基を有する NFLX では、脳室内投与による痙攣誘発作用、GABA 受容体結合阻害作用ともに強かったが、N-methyl 化された piperazinyl 基を有する FLRX では両作用ともに弱く、methyl 基を側鎖に有する piperazinyl 基を有する GFLX はその中間に位置していた。このことは、以前に我々が示した成績と一致していると考えられる。

キノロン薬の痙攣誘発作用が NSAIDs との併用により増強されることはよく知られている。また、NSAIDs の共存により *in vitro* におけるキノロン薬の GABA 受容体結合阻害作用が増強されることも示されている^{15,16)}。GFLX の痙攣誘発作用ならびに GABA 受容体結合阻害作用を NSAIDs 共存下で検討した。その結果、マウス脳室内投与による痙攣誘発作用は、NSAIDs の同時投与により軽度増強されたが、NFLX のそれは、NSAIDs、とくに flurbiprofen, BPA の同時投与により増強された。FLRX では痙攣誘発作用も弱く、NSAIDs の同時投与によっても増強されにくかった。GFLX では、NSAIDs 同時投与による痙攣誘発作用の増強は軽度であった。一方、*in vitro*

における成績を見ると、NSAIDs による GABA 受容体結合阻害作用の増強は、NFLX で強く認められ、FLRX では弱く、GFLX では軽度であった。この NSAIDs による GABA 受容体結合阻害作用の増強は、*in vivo* の脳室内投与における痙攣誘発作用の増強と同様の傾向を示した (Table 1)。また、GABA 受容体結合阻害作用の上から検討すると、GFLX は、NFLX, ENX, CPMX よりはその阻害作用は弱い傾向が認められ、NSAIDs による GABA 受容体結合阻害作用の増強効果も、これらのキノロン薬より弱いものであった。

以上の、*in vivo* および *in vitro* の成績より、GFLX の痙攣誘発作用は、比較的弱いと考えられるが、NSAIDs 共存下では増強の可能性が否定できないことが示唆された。

文 献

- 1) Kucers A, McBenet N: Nalidixic acid p. 1203~1218 in The use of antibiotics (4th ed.), Lippincot Co., Philadelphia, 1988
- 2) Islam M A, Sreedharan T: Convulsions, 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. Brit Med J 2: 1518, 1977
 - 4) 上田 泰, 松本文夫, 斉藤 篤, 他: Pipemidic acidに関する臨床的研究。Chemotherapy 23: 2798~2870, 1975
 - 5) Simpson K J, Brodie M J: Convulsions related to enoxacin. Lancet ii: 161, 1985
 - 6) Fass R J: Efficacy and safety of oral ciprofloxacin in the treatment of serious respiratory infections. Am J Med 82 (suppl 4A): 202~207, 1987
 - 7) Arcieri G, Griffith E, Gruenwald G, et al.: Ciprofloxacin; an update on clinical experience. Am J Med 82 (suppl 4A): 381~394, 1987
 - 8) Anastasio G D, Mensder D and 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, 他: 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.81, 1986
 - 11) 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。p.157~163 in 医薬品の副作用。Annual Report 1990 (伊藤宗元ほか編)。中外医学社。東京, 1991
 - 12) 堀 誠治, 嶋田甚五郎, 柴 孝也, 他: Sparfloxacinの痙攣誘発作用に関する研究。Chemotherapy 39 (S-4): 161-166, 1991
 - 13) 金光敬二, 堀 誠治, 柳川 明, 他: 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
 - 14) Meldrum B S: Epilepsy and γ -aminobutyric acid-mediated inhibition. Int Rev Neurobiol 17: 1~36, 1975
 - 15) 堀 誠治, 嶋田甚五郎, 宮原 正, 他: 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
 - 16) Hori S, Shimada J: Effects of quinolones on the central nervous system. In Quinolone Antimicrobial Agents, 2nd Ed., (ed. by Hooper D C and Wolfson J S), p.513~518, American Society for Microbiology. Washington D. C., 1993
 - 17) 中島晋介: Vitamin B6拮抗体による痙攣とその抑制効果について。昭和医学会誌 32: 9~17, 1984
 - 18) 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

Effect of gatifloxacin, a new quinolone antimicrobial, on the receptor binding of γ -aminobutyric acid and its convulsant activity.

Seiji Hori[#] and Jingoro Shimada

Institute of Medical Science, St. Marianna University School of Medicine,
2-16-1 Sugao, Miyamae-ku, Kawasaki 216-8511, Japan

([#]present address: Department of Pharmacology (I), Jikei University School of Medicine)

Since quinolones are known to have potent convulsant activity, we studied the convulsant activity of gatifloxacin (GFLX), a newly developed quinolone, and its effect on the receptor binding of γ -aminobutyric acid (GABA), an inhibitory transmitter in the mammalian central nervous system (CNS). Intraventricular injection of GFLX induced convulsions in mice in a dose-dependent manner. The potency of convulsant activity was between norfloxacin and fleroxacin. GFLX inhibited GABA receptor binding at high concentrations. Biphenylacetate and flurbiprofen moderately enhanced its inhibitory activity. These results suggest that GFLX might induce convulsions at unusually high concentrations in the brain.