

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：32680

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K14992

研究課題名(和文)メトロニダゾール誘発性脳症の発症機序としての「チアミン欠乏仮説」の検証

研究課題名(英文) Investigation of the "thiamine deficiency hypothesis" as a mechanism of metronidazole-induced encephalopathy

研究代表者

山岸 喜彰 (Yamagishi, Yoshiaki)

武蔵野大学・薬学部・助教

研究者番号：30805255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、メトロニダゾール(MTZ)誘発性脳症の原因として、チアミン構造類似部位を有するMTZがチアミン輸送トランスポーターを阻害してチアミンの脳内輸送量が減少し脳症発症に至る「チアミン欠乏仮説」を提唱し、当該脳症発症メカニズムの解明を目的に検討を行った。In vitroでチアミンの細胞内への取り込み、細胞層の透過に臨床濃度付近のMTZが及ぼす影響について検討を行った結果、MTZはチアミンの消化管からの吸収および脳組織への移行を阻害しない可能性が示唆された。しかし、比較的高濃度のMTZによりチアミンの細胞内への取り込み量の上昇が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、MTZ誘発性脳症は増加傾向にあり、本研究は当該脳症の発症メカニズムの解明に迫る検討を行った。消化管上皮細胞層におけるチアミンの細胞内への取り込みおよび細胞層の透過過程において、MTZが何らかの影響を及ぼしている可能性を示すことができた。これらの結果は、MTZ誘発性脳症の発症メカニズムの解明において有力な手掛かりとなる情報である。今後、当該脳症の発症メカニズムについてさらに詳細な解明を進めることで、臨床におけるMTZの適正使用に資する有用な情報を提供できると考える。

研究成果の概要(英文)：In this study, the mechanism of metronidazole (MTZ)-induced encephalopathy was investigated focusing on the possibility that MTZ, with a substructure similar to thiamine, inhibits thiamine transporters to decrease thiamine uptake into the brain and induce the encephalopathy ("thiamine deficiency hypothesis"). The effects of MTZ near clinical concentrations on the cellular uptake and the transcellular transport of thiamine were investigated in vitro and the results suggested that MTZ may not inhibit the absorption of thiamine from the gastrointestinal tract and its transport into brain tissue. However, an increased cellular uptake of thiamine was detected with relatively high concentrations of MTZ.

研究分野：薬物動態学

キーワード：チアミン メトロニダゾール チアミントランスポーター メトロニダゾール誘発性脳症(MIE)

1. 研究開始当初の背景

メトロニダゾール (Metronidazole: MTZ) は、古くから使用されている抗原虫薬であり、1957年のフランスにおけるフラジール®内服錠の開発を端緒に、1961年より日本でも使用され始めた。当初、脛トリコモナス感染症治療薬としてのみ保険適応が認められていたが、2007年以降、様々な疾患への保険適応が追加された¹⁾。さらに近年、厚生労働省の「医療上の必要性の高い未承認薬・適応外薬検討会議」において「医療上の必要性に係る基準」への妥当性が評価され、2014年に「嫌気性菌感染症」、「感染性腸炎(偽膜性大腸炎を含む)」、「アメーバ赤痢」に対するアネメトロ®点滴静注液 500 mg (MTZ 注射剤) が、2015年に「がん性皮膚潰瘍部位の殺菌・臭気の軽減」に対してロゼックス®ゲル 0.75% (MTZ ゲル剤) が発売され、その使用頻度が増加している。一方で、それに伴う有害事象発生頻度の増加傾向も認められ、中でも「重大な副作用」に挙げられているメトロニダゾール誘発性脳症 (Metronidazole-Induced Encephalopathy: MIE) が近年注目を集めている。

2. 研究の目的

MTZ の使用頻度の高まりに伴い、MIE の症例報告が国内外で増加している。MIE は一般に MTZ 投与の中止で症状は治まるものの、正確な発症頻度は不明であり、非可逆的病変を誘発させる事例も存在する²⁾。また、チアミン (ビタミン B1) 投与で症状が緩和された事例³⁾ や画像所見から、ウェルニッケ脳症 (Wernicke's Encephalopathy: WE) との類似性^{4), 5)} が指摘されている (図 1)。しかし、症例報告は多数存在する一方、基礎研究は、1973年ドイツのグループによるラットの MIE 発症脳組織を病理学的に観察した報告⁶⁾ のみであり、MIE 発症メカニズムに迫る基礎研究は皆無である。そこで申請者は、「脳内チアミンの欠乏」^{3), 5)} に焦点を当て、MIE 発症メカニズムの解明を目指した。

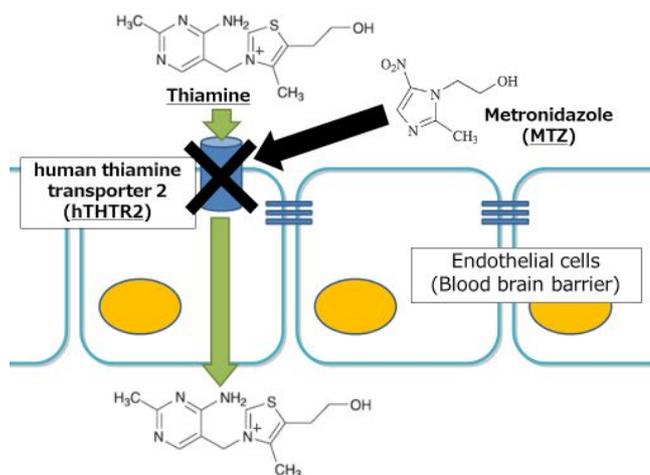


図 1 メトロニダゾールによるチアミン脳内輸送の阻害 (チアミン欠乏仮説)

3. 研究の方法

- (1) MTZ を作用させた Caco-2 細胞におけるチアミントランスポーターの発現量の測定
ヒト結腸癌由来細胞株 Caco-2 細胞を小腸上皮細胞様の単層膜を形成するまで培養し、複数濃度の MTZ (80、400、2,000、5,000、10,000 μM) 添加 3 日後に RNA を抽出し real-time RT-PCR でチアミントランスポーターである thiamine transporter (THTR) 1、THTR2 および organic cation transporter (OCT) 1 の mRNA 量を測定した。
- (2) MTZ とチアミントランスポーターとの分子間相互作用の in silico 解析
MTZ のチアミントランスポーターとの分子間相互作用を解析するために、統合計算化学システムである MOE (Molecular operating environment) を用いた。チアミンを基質とするヒトの主要なトランスポーターの構造は解かれていないため、モデルとして大腸菌チアミントランスポーター (PDB ID: 4NMY) の活性部位におけるアミノ酸とチアミンとの相互作用解析を行った。得られた解析結果を用いた MTZ のドッキングシミュレーションを行い、算出された結合自由エネルギーをもとに MTZ と 4NMY の相互作用を評価した。
- (3) MTZ を作用させた THTR2 発現 MDCK 細胞におけるメトホルミンの取り込み量の測定
ヒトの主要なチアミン輸送担体である THTR2 を発現させたイヌ腎臓尿管上皮細胞由来細胞株 MDCK II (MDCK II/THTR2) 細胞を用い、代表的基質化合物であるメトホルミンの細胞内取り込みへの MTZ の影響を検討した。MDCK II/THTR2 細胞を 3 日間培養後、基質として[14C]メト

ホルミン (0.2 μ M)、MTZ (1, 50 mM) を添加し、37°Cで 20 分間作用させ可溶化後に液体シンチレーションカウンターで放射能を測定し基質の取り込み速度を算出した。

(4) MTZ を作用させた Caco-2 細胞における thiamine-d3 の取り込み量の測定

Caco-2 細胞を 24-well プレートに播種し、2 - 3 週間培養した。単層形成を確認後、チアミン-d3 (3 μ M) および MTZ (0, 0.01, 0.1, 1, 10, 50 mM) の溶液を添加し、37°Cで 7 分間インキュベートした。洗浄後に 0.2% Triton 水溶液を添加し細胞を回収後、アセトニトリルを用いて除タンパク処理を行い、LC-MS/MS によりチアミン-d3 を定量した。

(5) MTZ を作用させた Caco-2 細胞における thiamine-d3 の透過量の測定

チアミンの消化管からの吸収や脳組織への移行に MTZ が影響を及ぼす可能性について検討するために、Caco-2 細胞を Transwell®に播種し 21 日間培養して単層膜形成を確認後、チアミン-d3 (3 μ M) および MTZ (0, 0.3, 10, 50 mM) の溶液を添加し、37°Cで 120 分間インキュベートした。その後、Basal 側の液を回収して LC-MS/MS によりチアミン-d3 を定量した。

4 . 研究成果

(1) MTZ を作用させた Caco-2 細胞におけるチアミントランスポーターの発現量の測定

薬物非添加群と比べて何れの濃度の MTZ 添加群においても THTR1、THTR2 および OCT1 の mRNA 発現量に明確な差は認められなかったことから (図 2A - C)、MIE の発症にこれら輸送担体の発現変動が関与する可能性は低いことが示唆された。

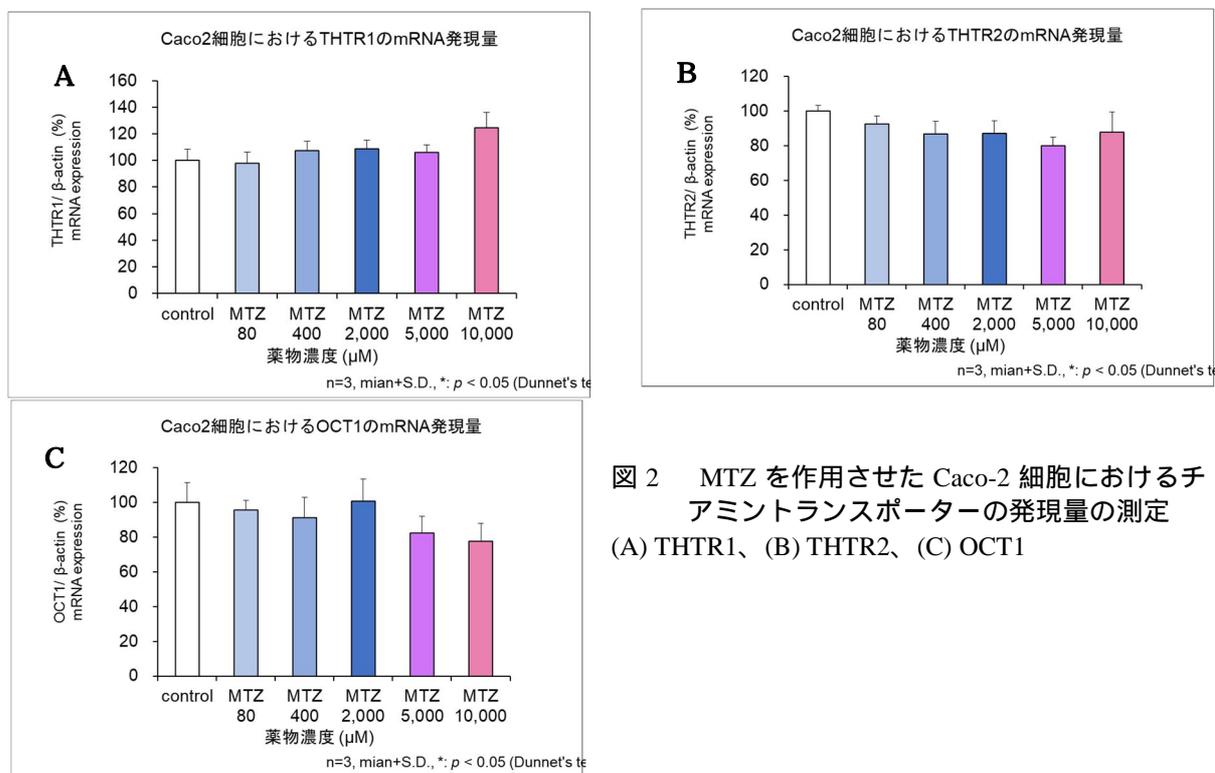


図 2 MTZ を作用させた Caco-2 細胞におけるチアミントランスポーターの発現量の測定 (A) THTR1、(B) THTR2、(C) OCT1

(2) MTZ とチアミントランスポーターとの分子間相互作用の in silico 解析

チアミンと比較して、MTZ の結合自由エネルギーは高いものの、MTZ はチアミンと同様に 4NMY に結合する可能性が示された。また、推定された MTZ と相互作用するアミノ酸には、チアミンと 4NMY が相互作用する際のアミノ酸と共通するものが認められた (図 3)。

(3) MTZ を作用させた THTR2 発現 MDCK 細胞におけるメトホルミンの取り込み量の測定

MTZ 濃度依存的に[14C]メトホルミンの取り込みが阻害され、何れの濃度の MTZ 添加群においてもコントロール群と比べ有意差が認められた (図 4)。以上の結果から、MTZ によるチアミントランスポーターを介したチアミン吸収の阻害が MIE の発症に関与する可能性が示唆された。

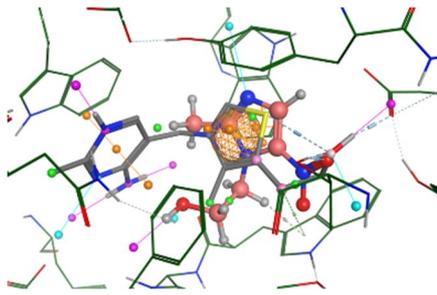


図3 MTZとチアミントランスポーターとの分子間相互作用の in silico 解析

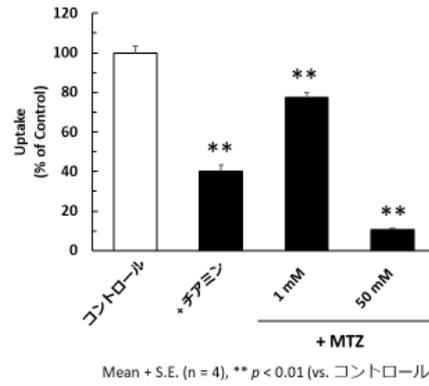


図4 MTZを作用させたTHTR2発現MDCK細胞におけるメトホルミンの取り込み量の測定

(4) MTZを作用させたCaco-2細胞におけるthiamine-d3の取り込み量の測定

チアミン-d3の細胞内濃度は、単独添加群と比べて低濃度(0.01-1 mM)のMTZ添加群では変化が認められなかったが、高濃度(10、50 mM)のMTZ添加群においては有意に高い値を示した(図5)。

(5) MTZを作用させたCaco-2細胞におけるthiamine-d3の透過量の測定

臨床における血漿中濃度付近および経口投与後の消化管内濃度付近のMTZは、Caco-2細胞におけるチアミン-d3の経細胞輸送に影響を及ぼさなかった(図6)。

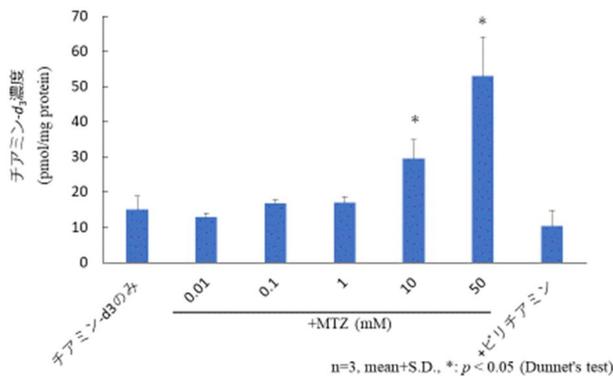


図5 MTZを作用させたCaco-2細胞におけるthiamine-d3の取り込み量の測定

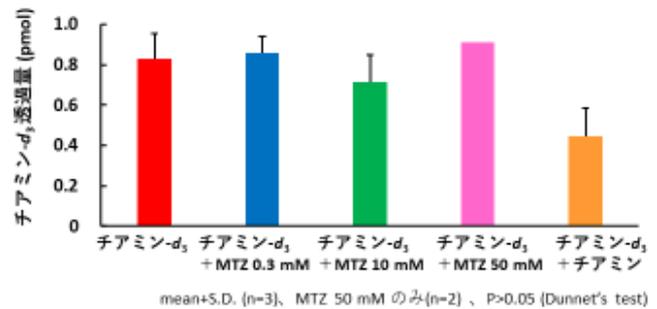


図6 MTZを作用させたCaco-2細胞におけるthiamine-d3の透過量の測定

図5および6の結果から、MTZはチアミンの脳組織への移行および消化管からの吸収を阻害しない可能性が示唆された。しかし、比較的高濃度のMTZによりチアミンの細胞内への取り込み量が上昇する現象が認められた。

これらのことについては今後、MTZがチアミンの細胞内から細胞外への輸送に及ぼす影響およびチアミンの代謝に及ぼす影響を検討する必要がある。また、チアミン以外のMIE発症メカニズムが存在する可能性も含めて検討する必要がある。

引用文献

- 1) フラジール® 内服錠 インタビューフォーム
- 2) Groothoff MV, et al., Clin. Ther., 32,60-4, 2010
- 3) Iwadata D, et al., J. Neurol. Sci., 379, 324-6, 2017
- 4) Zuccoli G, et al., AJNR. Am. J. Neuroradiol., 29, E84, 2008
- 5) 音成 秀一郎 他, 臨床神経学, 55, 174-7, 2015
- 6) von Rogulja P et al., Act. Neuropathol., 25, 36-45, 1973

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 山岸 喜彰	4. 巻 56
2. 論文標題 チアミントランスポーター介在薬物-栄養素相互作用リスク医薬品の予測	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 1047 ~ 1047
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14894/faruawpsj.56.11_1047	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 杉田美幸、橋本光弘、小川康子、山岸喜彰、工藤敏之、伊藤清美
2. 発表標題 Caco-2細胞へのチアミンの取り込みに及ぼす高濃度メトロニダゾールの影響
3. 学会等名 日本医療薬学会第4回フレッシュャーズ・カンファランス
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉田美幸、橋本光弘、小川康子、山岸喜彰、工藤敏之、伊藤清美
2. 発表標題 メトロニダゾールがチアミントランスポーターの発現に及ぼす影響
3. 学会等名 第64回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山岸喜彰、白坂善之、鮎井悠汰、橋本光弘、工藤敏之、井上勝央、伊藤清美
2. 発表標題 hTHTR2発現MDCKII細胞を用いたメトロニダゾールによるhTHTR2阻害作用の検討
3. 学会等名 第30回日本医療薬学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 広橋 恵、橋本光弘、山岸喜彰、工藤敏之、廣谷 功、伊藤清美
2. 発表標題 MOEによるメトロニダゾールとチアミントランスポーターの分子間相互作用の解析
3. 学会等名 日本医療薬学会第3回フレッシュャーズ・カンファランス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 楠 洋平、増尾寛子、高岡 裕、山岸喜彰、工藤敏之、伊藤清美
2. 発表標題 フルオロウラシルの代謝酵素と輸送体の発現に及ぼすメトロニダゾールの影響
3. 学会等名 日本医療薬学会第3回フレッシュャーズ・カンファランス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamagishi Y, Tomokiyo E, Uemura M, Ogino A, Masuo H, Kusunoki Y, Okuyama M, Maekawa H, Goda H, Kudo T, Ito K
2. 発表標題 Investigation of the interaction mechanism between metronidazole and 5-fluorouracil
3. 学会等名 12th International ISSX meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋本光弘、山岸喜彰、小川康子、合田ひとみ、工藤敏之、伊藤清美
2. 発表標題 Caco-2細胞におけるチアミン-d3取り込みへのメトロニダゾールの影響
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高岡 裕、楠 洋平、小川康子、山岸喜彰、工藤敏之、伊藤清美
2. 発表標題 メトロニダゾールがフルオロウラシルの代謝酵素と輸送体の発現に及ぼす影響
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林薫子、伊藤栞、合田ひとみ、山岸喜彰、工藤敏之、伊藤清美
2. 発表標題 ワルファリンの血清タンパク結合に及ぼすメトロニダゾールの影響
3. 学会等名 日本薬剤学会第33年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 増尾寛子、荻野晃大、山岸喜彰、工藤敏之、伊藤清美
2. 発表標題 ヒト肝癌由来細胞株におけるジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼの発現に対するメトロニダゾールの影響
3. 学会等名 日本薬剤学会第33年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------