

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：32680

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18959

研究課題名(和文)メトロニダゾールによる薬物相互作用機構の解明および新たな相互作用の可能性の検討

研究課題名(英文)Elucidation of drug interaction mechanism by metronidazole and investigation of possibility of unknown interactions.

研究代表者

工藤 敏之(KUDO, Toshiyuki)

武蔵野大学・薬学研究所・講師

研究者番号：10584815

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：飛躍的に適応が拡大している抗真菌薬メトロニダゾール(MTZ)が関与する薬物相互作用のメカニズム解明に加え、MTZが未知の薬物相互作用を起こす可能性の検討を目的として、主にヒト肝由来試料を用いたin vitro試験を実施した。その結果、主要な薬物代謝酵素の活性および発現あるいは肝取り込みトランスポーターの発現に対して臨床濃度のMTZは顕著な影響を及ぼさないことが明らかとなり、臨床においてMTZがそれらを介する相互作用を起こさないことが示唆された。今後、MTZ代謝物の影響等についても検討を行うことで、報告されている相互作用のメカニズム解明および臨床におけるMTZの適正使用に繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the mechanism of drug-drug interactions caused by metronidazole (MTZ), a widely used anti-fungal agent, and to investigate the possibility of unknown interactions, in vitro studies were performed using human liver-derived sources. As a result, MTZ was found not to have pronounced effects on the metabolic activities and expression of major drug-metabolizing enzymes and on the expression of hepatic uptake transporters at the clinically relevant concentrations, suggesting that MTZ is not likely to cause drug-drug interactions via those enzymes/transporters in clinical practice. In the future, investigation of the effects of MTZ metabolites would contribute to the clarification of the mechanism of reported interactions caused by MTZ and appropriate use of MTZ in clinical practice.

研究分野：薬物動態学

キーワード：metronidazole 薬物相互作用

1. 研究開始当初の背景

Metronidazole (MTZ) を主成分とするフラジール[®]内服錠は、1957年にフランスにおいて開発され、日本においては1961年より販売されている。MTZは当初、膾炙トリコモナスによる感染症の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、ヘリコバクター・ピロリ除菌、細菌性膣症、嫌気性菌感染症、感染性腸炎、アメーバ赤痢、ランブル鞭毛虫感染症に保険適応が追加された。さらに、2014年9月にMTZ注射剤(アネメトロ[®]点滴静注液500mg)、2015年5月にMTZゲル剤(ロゼックス[®]ゲル0.75%)が発売され、今後ますますMTZの汎用性が高まっていくと考えられる。

上記の商品の他に、がん性悪臭の緩和のため、多くの病院においてMTZ外用剤が院内製剤として調製され、長期かつ大量に塗布されている。我々は、1%MTZ軟膏を潰瘍部に塗布した患者の血中MTZ濃度を測定し、MTZ250mgを単回経口投与した時とほぼ同濃度のMTZが検出されたことを報告した(*Biol. Pharm. Bull.*, **36**, 89-95 (2013))。すなわち、MTZを外用剤として使用した場合でも、内服時と同様にMTZによる副作用・相互作用が生じる可能性が示唆された。

MTZと同様にアゾール系抗菌薬であるketoconazoleおよびitraconazoleは、アゾール環に含まれる窒素原子が阻害活性部位となり、cytochrome P450 (CYP) 3A4を強力に阻害することが知られており、MTZも同様の阻害活性を示す可能性が考えられる。臨床試験において、MTZの併用によりS-warfarin、busulfanおよび5-fluorouracilの血中濃度が上昇したことが報告されており、それぞれの主代謝酵素であるCYP2C9、glutathione S-transferase (GST) A1およびdihydropyrimidine dehydrogenase (DPD)をMTZが阻害する可能性が考えられる。また、MTZの併用によりtacrolimus、cyclosporine、quinidine、carbamazepineの血漿中濃度が上昇したという症例報告がある他、マウスにおいて、MTZの併用によりP-糖タンパク質(P-gp)の基質であるimatinibの脳内移行が促進したという報告があり、MTZがCYP3A4およびP-gpを阻害する可能性が示唆されている。しかし、MTZがCYP3A4を阻害しないという報告もあり、上記のいずれの相互作用についてもメカニズムは明らかになっていない。MTZは開発された時期が古いことから、薬物代謝酵素や薬物トランスポーターへ及ぼす影響についてほとんど報告が無く、併用薬の体内動態に影響を及ぼす可能性について十分な検討がなされないまま、その臨床での使用頻度が増えているのが現状である。

我々はこれまでに、MTZが臨床濃度においてヒト肝ミクロソームによるS-warfarinの代謝を阻害しない(*Biol. Pharm. Bull.*, **36**, 89-95 (2013))一方で、ヒト肝細胞において、核内

受容体であるconstitutive androstane receptor (CAR)の発現減少を介してCYP2C8、CYP2C9、CYP3A4のmRNA発現を減少させることを見出した(*Xenobiotica.*, **45**, 413-419. (2015))。しかし、他の薬物代謝酵素やトランスポーターへのMTZの影響については未検討であり、上述の相互作用を定量的に説明できる知見を得るには至っていない。

2. 研究の目的

本研究では、飛躍的に適応が拡大しているMTZの関与する既報の薬物相互作用のメカニズムについて解明することに加え、MTZがその他の薬物と相互作用を起こす可能性を検討することを目的とする。すなわち、主要な薬物代謝酵素(CYPおよびuridine diphosphate glucuronosyltransferase (UGT))、MTZが阻害する可能性が考えられるGST分子種およびDPDに加え、種々の肝取り込みトランスポーターを対象とし、それらの発現に及ぼすMTZの影響についてヒト肝細胞を用いて検討する。さらに、ヒト肝ミクロソームおよびヒト肝サイトゾルを用いて、これらの薬物代謝酵素の活性に及ぼすMTZの影響を検討する。

3. 研究の方法

3 - 1) 薬物代謝酵素およびトランスポーター発現に対するMTZの影響の検討

3 - 1 - 1) 凍結ヒト肝細胞におけるGST分子種および取り込みトランスポーターの発現に及ぼすMTZの影響の検討

凍結ヒト肝細胞(3 lot: Hu1442, Hu4232, Hu4244)を融解させた後96 wellプレートに播種し、種々の濃度のMTZ(20 - 500 μM)を添加した。3日間培養後、種々のGST分子種(A1, M1, P1)および種々の取り込みトランスポーター(organic anion transporting polypeptide (OATP) 1A2, 1B1, 1B3, 2B1, Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP))のmRNA発現量をreal-time RT-PCRにより測定した。ハウスキーピング遺伝子としては、β-アクチンを用いた。また、同条件で培養した細胞についてMTT assayを行い、細胞生存率を評価した。

3 - 1 - 2) HepaRG細胞におけるUGT分子種の発現に及ぼすMTZの影響の検討

ヒト肝腫瘍由来細胞株HepaRG細胞を融解させた後96 wellプレートに播種し、種々の濃度のMTZ(20 - 2,500 μM)を添加した。2日間培養後、種々のUGT分子種(1A1, 1A3, 1A8, 1A9)のmRNA発現量をreal-time RT-PCRにより測定した。ハウスキーピング遺伝子としては、GAPDHを用いた。また、

同条件で培養した細胞について MTT assay を行い、細胞生存率を評価した。

3 - 1 - 3) HepG2 細胞における DPD の発現に及ぼす MTZ の影響の検討

ヒト肝腫瘍由来細胞株 HepG2 を融解させた後 96 well プレートに播種し、種々の濃度の MTZ (4 - 2,000 μ M) を添加した。3 日間培養後、DPD の mRNA 発現量を real-time RT-PCR により測定した。ハウスキーピング遺伝子としては、 β -アクトチンを用いた。また、同条件で培養した細胞について WST assay を行い、細胞生存率を評価した。

3 - 2) 薬物代謝酵素に対する MTZ の阻害活性の検討

3 - 2 - 1) CYP2C8 に対する MTZ の阻害活性の検討

MTZ (100 - 1,000 μ M) および NADPH 存在下において、プールドヒト肝ミクロソーム (0.25 mg/mL) を用いた paclitaxel (5 μ M) の代謝試験を行い、主に CYP2C8 により生成される代謝物 6 α -hydroxypaclitaxel を HPLC により定量した。CYP2C8 阻害のポジティブコントロールには、montelukast (1 μ M) を使用した。

3 - 2 - 2) CYP2C9 に対する MTZ の阻害活性の検討

n=2 で行った既報 (*Biol. Pharm. Bull.*, **36**, 89-95 (2013)) の結果について n=3 で再現をとるために、MTZ (100 - 1,000 μ M) および NADPH 存在下において、プールドヒト肝ミクロソーム (0.50 mg/mL) を用いた S-warfarin (5 μ M) の代謝試験を行い、主に CYP2C9 により生成される代謝物 7-hydroxywarfarin を LC-MS により定量した。CYP2C9 阻害のポジティブコントロールには、sulfaphenazole (10 μ M) を使用した。

3 - 2 - 3) CYP3A4 に対する MTZ の阻害活性の検討

MTZ (100 - 1,000 μ M) および NADPH 存在下において、プールドヒト肝ミクロソーム (0.50 mg/mL) を用いた triazolam (25 μ M) の代謝試験を行い、主に CYP3A4 により生成される代謝物 α -hydroxytriazolam を HPLC により定量した。CYP3A4 阻害のポジティブコントロールには、ketoconazole (1 μ M) を使用した。

3 - 2 - 4) UGT に対する MTZ の阻害活性の検討

MTZ (125 - 1,000 μ M)、Brij58 および UDP-グルクロン酸存在下において、プールドヒト肝ミクロソーム (0.025 mg/mL) を用いた 4-methylumbelliferone (4-MU; 25 μ M) の代謝試験を行い、UGT による代謝物である 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide を HPLC により定量した。UGT 阻害のポジティブコン

トロールには、diclofenac (1 mM) を使用した。

3 - 2 - 5) DPD に対する MTZ の阻害活性の検討

MTZ (100 - 1,000 μ M) および NADPH 存在下において、プールドヒト肝サイトゾル (1.0 mg/mL) を用いた 5-fluorouracil (20 μ M) の代謝試験を行い、残存 5-fluorouracil 濃度を LC-MS により定量した。DPD 阻害のポジティブコントロールには、5-bromouracil (1 μ M) を使用した。

3 - 2 - 6) GST に対する MTZ の阻害活性の検討

MTZ (20 - 2,500 μ M) およびグルタチオン存在下において、プールドヒト肝サイトゾル (0.25 mg/mL) を用いた busulfan (500 μ M) の代謝試験を行い、GST 活性の指標となる代謝物 tetrahydrothiophene (THT) を GC-MS により定量した。サイトゾル非存在下における非酵素的な THT の生成量との差をとることにより、GST の代謝活性を評価した。GST 阻害のポジティブコントロールには、ethacrynic acid (1 mM) を用いた。

3 - 3) ラットにおける 5-fluorouracil の体内動態に及ぼす MTZ の影響の検討

7 週齢の雄性 SD ラットに MTZ 懸濁液 (200 mg/kg) あるいは溶媒 (0.5% カルボキシメチルセルロース; 2 mL/kg) を 1 日 1 回 3 日間反復経口投与し、最終投与 1 時間後に 5-fluorouracil 懸濁液 (100 mg/kg) を経口投与した。90 分後まで経時的に尾静脈から採血し、血漿中 5-fluorouracil および MTZ 濃度を LC-MS/MS により測定した。また、最終採血後に摘出した肝臓における DPD mRNA 発現量を real-time RT-PCR により測定した。ハウスキーピング遺伝子としては、 β -アクトチンを用いた。

4 . 研究成果

1) 薬物代謝酵素およびトランスポーター発現に対する MTZ の影響の検討

凍結ヒト肝細胞 (3 lot) に種々の濃度の MTZ を添加し、3 日間培養した後の細胞生存率は、いずれの lot の肝細胞においても 80% 以上であった。GSTA1、M1 および P1 の mRNA 発現量には、いずれの lot の肝細胞においても MTZ 添加による有意な変動は認められなかった。また、取り込みトランスポーターの発現に及ぼす MTZ の影響には lot 間差が大きく、濃度依存的な影響も認められなかったことから、MTZ が取り込みトランスポーターおよび GST の発現を減少させることによって相互作用が生じる可能性は低いと考えられた。HepaRG 細胞については、いずれの濃度の MTZ 添加群においても細胞生存率は 80% 以上であり、いずれの UGT 分子種の発現にも MTZ 濃度依存的な影響は認められなかった。また、HepG2 細胞については、いずれの濃度

の MTZ 添加群においても細胞生存率は 70%以上であり、DPD の発現に MTZ 濃度依存的な影響は認められなかった (data not shown)。

2) 薬物代謝酵素に対する MTZ の阻害活性の検討

ヒト肝ミクロソームによる paclitaxel 6 α 水酸化活性 (CYP2C8)、S-warfarin 7 水酸化活性 (CYP2C9)、triazolam α 水酸化活性 (CYP3A4) および 4-MU グルクロン酸抱合活性 (UGT) に及ぼす MTZ の影響を in vitro 代謝試験により検討した。CYP2C8、CYP2C9 および CYP3A4 の代謝活性はいずれもそれぞれのポジティブコントロールの添加により顕著に阻害されたが、MTZ による阻害は全く認められなかった。UGT の代謝活性もポジティブコントロールの添加により顕著に阻害されたが、MTZ による阻害作用は弱く、MTZ 濃度依存性も認められなかった (図 1)。

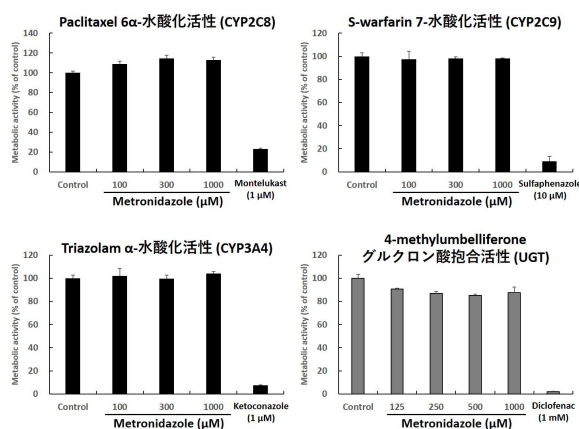


図 1 CYP2C8、CYP2C9、CYP3A4 および UGT の活性に及ぼす metronidazole の影響 (mean+SD, n=3)

ヒト肝サイトゾルによる 5-fluorouracil 代謝活性 (DPD) および busulfan グルタチオン抱合活性 (GST) についても、MTZ の影響を検討した。その結果、いずれの代謝活性もそれぞれのポジティブコントロールの添加により顕著に阻害されたが、MTZ による影響は弱く、MTZ 濃度依存的な阻害は認められなかった (図 2)。

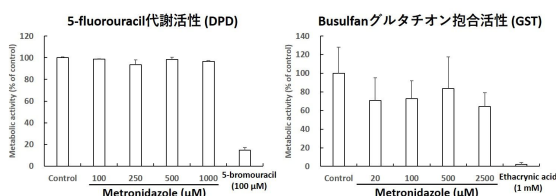


図 2 DPD および GST の活性に及ぼす metronidazole の影響 (mean+SD, n=3)

3 - 3) ラットにおける 5-fluorouracil の体内動態に及ぼす MTZ の影響の検討

MTZ 懸濁液 (200 mg/kg) を 1 日 1 回 3 日間

反復経口投与したラットにおける、血漿中 MTZ 濃度は個体間でばらつきが認められたものの (70 - 140 μ g/mL)、個体内では 90 分間ほぼ一定であった。血漿中 5-fluorouracil 濃度は MTZ 投与群の方が低い傾向が認められたが、個体間でのばらつきが大きく、MTZ の明確な影響は確認されなかったことから、臨床において認められた MTZ と 5-fluorouracil の相互作用はラットで再現できなかったと考えられる。また、肝臓における DPD mRNA 発現量には MTZ 投与による影響はほとんど認められなかった (data not shown)。

健康成人に常用量の MTZ を反復経口投与あるいは反復静脈内投与した際の最高血漿中非結合形 MTZ 濃度はそれぞれ約 100 μ M あるいは約 230 μ M と報告されている。これら臨床濃度付近の MTZ は、本研究において検討した薬物代謝酵素およびトランスポーターの発現あるいは活性に対してほとんど影響を及ぼさなかった。すなわち、臨床において認められた MTZ 併用による血中 5-fluorouracil 濃度上昇は、MTZ による DPD 阻害に基づくものではないこと、臨床において認められた MTZ 併用による血中 busulfan 濃度の上昇は、MTZ による GST 活性の阻害および発現減少に基づくものではないこと、臨床において、MTZ が本研究で検討したトランスポーターの発現変動および代謝酵素の活性変動に基づく相互作用を惹起する可能性が低いことが示唆された。

本研究の結果および我々の既報 (*Xenobiotica.*, 45, 413-419. (2015)) に基づくと、臨床において認められた MTZ の併用による血中 S-warfarin 濃度の上昇は、タンパク質レベルおよび活性レベルでの確認が必要であるが、CYP2C9 の発現減少に基づく可能性が考えられる。また、busulfan および 5-fluorouracil の血中濃度が MTZ の併用により上昇したことのメカニズムの解明には至らなかった。ひとつの可能性として、ヒト肝サイトゾルの反応系あるいはラット体内においては生成しない MTZ 代謝物が busulfan および 5-fluorouracil の体内動態に影響を及ぼした可能性が考えられる。今後、MTZ 代謝物の影響などについても検討を行うことで、臨床で報告されている相互作用のメカニズムの解明および臨床において MTZ を安全に使用することに繋がると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

1) Kudo T, Goda H, Yokosuka Y, Tanaka R, Komatsu S, Ito K. Estimation of the contribution of CYP2C8 and CYP3A4 in repaglinide metabolism by human liver microsomes under

various buffer conditions. *J. Pharm. Sci.* **106**: 2847-2852 (2017).

〔学会発表〕(計 10 件)

- 1) 横須賀友希、吉原早映、左田野光代、合田ひとみ、工藤敏之、伊藤清美
Repaglinide 代謝における CYP2C8 の寄与率に及ぼす緩衝液条件の影響、日本薬剤学会第 31 年会、2016 年
- 2) 工藤敏之、荻原将人、中村敏明、伊藤清美
抗てんかん薬の薬物相互作用 (バルプロ酸 - ラモトリギン) の生理学的薬物速度論モデル解析、医療薬学フォーラム 2016/第 24 回クリニカルファーマシーシンポジウム、2016 年
- 3) 左田野光代、合田ひとみ、横須賀友希、工藤敏之、伊藤清美
ヒト肝ミクロソームにおける S-ワルファリン代謝活性に及ぼす緩衝液条件の影響、第 26 回日本医療薬学会年会、2016 年
- 4) 荻原将人、工藤敏之、中村敏明、伊藤清美
生理学的薬物速度論モデルによるバルプロ酸-ラモトリギン相互作用の解析、日本薬剤学会第 32 年会、2017 年
- 5) 前田藍理、小林薫子、工藤敏之、伊藤清美
トリアゾラムの非特異的ミクロソーム結合に及ぼす緩衝液条件の影響、日本薬剤学会第 32 年会、2017 年
- 6) 荻野晃大、上村将仁、奥山 誠、山岸喜彰、工藤敏之、伊藤清美
5-フルオロウラシルの代謝活性に及ぼすメトロニダゾールの影響、日本医療薬学会第 1 回フレッシュャーズ・カンファランス、2017 年
- 7) 吉原早映、中林 勇、中内佳奈、合田ひとみ、舟越亮寛、山岸喜彰、工藤敏之、伊藤清美
CYP2C19 の活性に及ぼすエソメプラゾールとボノプラザンの影響、日本医療薬学会第 1 回フレッシュャーズ・カンファランス、2017 年
- 8) 前川 遥、奥山 誠、上村将仁、金川一成、合田ひとみ、工藤敏之、伊藤清美
ラットにおける 5-フルオロウラシルの体内動態に及ぼすメトロニダゾールの影響、医療薬学フォーラム 2017/第 25 回クリニカルファーマシーシンポジウム、2017 年
- 9) 工藤敏之、伊藤清美
生理学的薬物速度論モデルに基づく薬物相互作用の定量的予測 - レパグリニドを例に -、第 27 回日本医療薬学会年会、2017 年
- 10) 山岸喜彰、前川 遥、荻野晃大、金川一成、合田ひとみ、吉見 猛、工藤敏之、伊藤清美

5-フルオロウラシルの体内動態および代謝酵素発現に及ぼすメトロニダゾールの影響、第 27 回日本医療薬学会年会、2017 年

〔図書〕(計 2 件)

- 1) 工藤敏之、伊藤清美 代謝酵素の基質同士を併用した場合、临床上 DDI は問題になりますか？ *薬局* 2016, 67(8), 2475-2477.
- 2) 工藤敏之、伊藤清美 代謝阻害の相互作用はどれくらい持続しますか？ *薬局* 2016, 67(8), 2478-2481.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

工藤 敏之 (KUDO, Toshiyuki)
武蔵野大学・薬学研究所・講師
研究者番号：10584815

(2) 研究協力者

伊藤 清美 (ITO, Kiyomi)
武蔵野大学・薬学研究所・教授
研究者番号：60232435

廣谷 功 (HIROYA, Kou)
武蔵野大学・薬学研究所・教授
研究者番号：70192721