

## 目次

1	緒言 .....	3
---	----------	---

## 図目次

図1	メトロニダゾールの構造式.....	3
----	-------------------	---

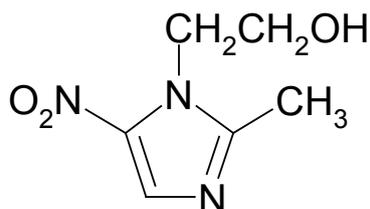
## 1 緒言

メトロニダゾールゲル 0.75% (以下、本剤) は、有効成分としてメトロニダゾールを 0.75% w/w (7.5 mg/g) 含有する水性ゲル製剤であり、がん性皮膚潰瘍の嫌気性菌感染に伴う悪臭を局所塗布投与によって軽減することを意図して開発された。

有効成分メトロニダゾールは、多くの偏性嫌気性菌に対して *in vitro* 抗菌活性を有しており、グラム陰性及びグラム陽性嫌気性桿菌及びグラム陽性嫌気性球菌に対する臨床的有効性が示されている。がん性皮膚潰瘍に伴う悪臭に対するメトロニダゾールの消臭効果は、潰瘍部位における嫌気性菌の消失と関連することが示唆されている (CTD 「2.5 臨床に関する概括評価」 の [4.3] 項参照)。また、日本で実施された臨床試験 (RDT.07.SRE.27013 試験 [5.3.5.2-1]) において、本剤はがん性皮膚潰瘍に伴う悪臭を有する被験者への 14 日間の局所塗布投与で有効性すなわち消臭効果を示した (CTD 「2.7.3 臨床的有効性」 の [2.1] 項参照)。

メトロニダゾールの化学構造式を以下に示す (図 1)。

図 1 メトロニダゾールの構造式



申請された臨床適応及び用法・用量に関する情報を以下に示す。

**【効能・効果】** がん性皮膚潰瘍部位の殺菌・臭気の軽減

**【用法・用量】** 症状及び病巣の広さに応じて適量を使用する。潰瘍面を清拭後、1日 1~2回ガーゼ等にのばして貼付するか、患部に直接塗布しその上をガーゼ等で保護する。

## 目次

1	まとめ .....	4
2	効力を裏付ける試験 .....	5
2.1	主要な抗菌活性 .....	5
2.2	主要な抗原虫活性 .....	7
2.3	作用機序 .....	7
2.4	耐性誘導 .....	9
2.4.1	P/KFOR 酵素活性の低下による薬物活性化抑制 .....	10
2.4.2	代替経路による薬物不活化 .....	12
2.4.3	薬物の細胞内移行抑制又は薬物排出 .....	13
2.4.4	DNA 損傷抑制及び DNA 修復の変化 .....	13
2.4.4.1	酸素捕捉能亢進による DNA 損傷抑制 .....	13
2.4.4.2	DNA 修復能の変化 .....	14
3	副次的薬理試験 .....	14
3.1	抗炎症作用 .....	15
3.2	免疫系への作用 .....	16
4	安全性薬理試験 .....	17
4.1	中枢神経系への影響 .....	18
4.1.1	マウスのヘキサバルビタール誘発睡眠時間に及ぼすメトロニダゾールの影響 .....	18
4.1.2	ラットにおけるメトロニダゾール投与後の神経毒性 .....	18
4.1.3	ネコにおけるメトロニダゾール経口投与後の神経毒性 .....	18
4.1.4	イヌにおけるメトロニダゾール経口投与後の神経毒性 .....	19
4.2	心血管系への影響 ( <i>in vitro</i> 試験) .....	20
5	薬力学的薬物相互作用試験 .....	20
6	考察及び結論 .....	20
6.1	効力を裏付ける試験 .....	20
6.2	副次的薬理試験 .....	20
6.3	安全性薬理試験 .....	21
7	参考文献 .....	21

### 表目次

表 1	MIC 及び MIC <sub>90</sub> (mg/L) の範囲で表した各種菌株のメトロニダゾール感受性 .....	6
表 2	原虫のメトロニダゾール感受性 .....	7

### 図目次

図 1	メトロニダゾールの化学構造及び化学的活性化 .....	8
図 2	嫌気性細菌及び原虫におけるメトロニダゾールの活性化機序.....	9
図 3	酒さの発現機序への関与の可能性のある病因因子 .....	15

## 略号一覧

略称・略号	省略していない表現又は定義	
CTD	Common technical document	コモン・テクニカル・ドキュメント
DTH	Delayed-type hypersensitivity	遅延型過敏症
Fur	Ferric uptake regulator	鉄取り込み調節因子
GABA	Gamma-aminobutyric acid	γ-アミノ酪酸
ICH	International Conference on Harmonization	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
MIC	Minimal inhibitory concentration	最小発育阻止濃度
MIC <sub>90</sub>	Minimal inhibitory concentration inhibiting 90% of strains	90%の菌株の発育を阻止する MIC
MMP	Matrix metalloproteinase	マトリックスメタロプロテイナーゼ
NA	Not available	未入手
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド
NAD(P)H	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸
<i>nim</i>	Nitroimidazole resistance gene	ニトロイミダゾール耐性遺伝子
NO	Nitric oxide	一酸化窒素
PBS	Phosphate buffered saline	リン酸緩衝生理食塩水
PFC	Plaque-forming cell	溶血斑形成細胞
P/KFOR	Pyruvate/ketoacid:ferredoxins oxidoreductase	ピルビン酸/ケト酸：フェレドキシンオキシドレダクターゼ
ROS	Reactive oxygen species	活性酸素分子種
SOD	Superoxide dismutase	スーパーオキシドジスムターゼ
TLR	Toll-like receptor	Toll 様受容体
TNF	Tumor necrosis factor	腫瘍壊死因子

## 1 まとめ

がん性悪臭の局所治療のために 1 日 1~2 回塗布する外用剤としてのメトロニダゾールゲル 0.75%の開発の根拠を示すため、科学的公表文献から収集したデータを用いてメトロニダゾールの薬理学的特性を以下に示す。

本概要文で使用した公表文献の写しは本コモン・テクニカル・ドキュメント (CTD) 第 4 部に提出する。本申請を目的とした開発にあたっては、申請者は効力を裏付ける試験、副次的薬理試験及び安全性薬理試験に該当する試験を実施しなかったため、2.6.3 薬理試験の概要表は作成せず、文献から入手した情報を図表化した場合には本文中に提示した。

文献情報のまとめに際しては、個々の主題に関して入手可能な参考文献をすべて引用したわけではなく、メトロニダゾールの薬理学的情報が適切に説明、記述されており、予定の効能・効果に特に関係があると考えられた公表文献からの情報を記載している。

メトロニダゾールは、バクテロイデス・フラジリス *Bacteroides fragilis*、プレボテラ *Prevotella* 属、フゾバクテリウム・ヌクレアタム *Fusobacterium nucleatum*、ウエルシュ菌 *Clostridium perfringens* 及び嫌気性球菌など、数種類のグラム陰性及びグラム陽性嫌気性菌のがん性皮膚潰瘍部での増殖に起因するがん性悪臭の治療に有効な第一選択薬と認識されている (CTD「2.5 臨床に関する概括評価」の [1.2] 項参照)。メトロニダゾールは、絶対嫌気性条件下での 5 位のニトロ基の還元により細菌内又は原虫内に短寿命のニトロソ遊離基を生成するプロドラッグであり、その細菌内又は原虫内で DNA、RNA、及びタンパクなどの高分子と反応を起こす。その結果、細胞溶解を生じずに、最終的に嫌気性微生物に対して極めて特異性の高い殺効果を示す。がん性皮膚潰瘍に伴う悪臭に対するメトロニダゾールの消臭効果は、潰瘍部位における嫌気性菌の消失と関連することが示唆されている (CTD「2.5 臨床に関する概括評価」の [4.3] 項参照)。

メトロニダゾールに対する細菌及び原虫の感受性の低下については、以下の 4 種類の機序によるものが確認されている：1) ピルビン酸/ケト酸：フェレドキシンオキシドレダクターゼ (P/KFOR) を必要としない別の発酵経路による還元型メトロニダゾールの生成の回避、2) P/KFOR の代替となるニトロイミダゾール還元酵素をコードする耐性遺伝子 (*nim* ファミリー) の発現、3) 抗生物質の移行及び排出に関与する TolC 薬物排出タンパクの過剰発現、4) 酸素捕捉能又は DNA 修復能の上昇による DNA 損傷の抑制。メトロニダゾール耐性獲得率は、ヘリコバクター・ピロリ *H. pylori* では 26.7%などと高いが、バクテロイデス *Bacteroides* 属株では低い (0.06%)。がん性悪臭に対するメトロニダゾールゲル 0.75%の使用では、治療対象である進行がん患者での本剤の使用期間は、一部では 1 年を超えて使用される症例もあるが、多くは 1 ヶ月から 3 ヶ月程度と考えられ (CTD「2.5 臨床に関する概括評価」の [4.5.2] 項参照)、この治療を受ける患者数も非常に少ないと考えられるため、メトロニダゾールに対する薬剤耐性の拡大は進展しないと予想される。

副次的薬理作用として抗炎症活性があり、海外ではメトロニダゾールは主にこの作用機序に基づいて酒さに対する外用剤として販売されている。また、免疫抑制活性があることも報告されている。

安全性薬理作用として、メトロニダゾールのがん性皮膚潰瘍部への局所塗布によって発現して安全性が危惧されるような作用は、現在まで報告されていない。

## 2 効力を裏付ける試験

**Paul and Pieper 2008 [文献 4.3.2.29]、Maeda et al. 1953 [文献 4.3.2.25]、Horie et al. 1956 [文献 4.3.2.20]**

本剤の効能・効果を裏付けるメトロニダゾールの主な薬理活性は、バクテロイデス・フラジリス *Bacteroides fragilis*、プレボテラ *Prevotella* 属、フゾバクテリウム・ヌクレアタム *Fusobacterium nucleatum*、ウェルシュ菌 *Clostridium perfringens* 及び嫌気性球菌など、がん性悪臭の発生に関与する嫌気性菌に対する抗菌活性である (Paul and Pieper 2008 [文献 4.3.2.29])。これらの嫌気性菌は、皮膚潰瘍部で増殖して、吐き気を催させるような悪臭源であるプトレッシンやカダベリンを産生する (Paul and Pieper 2008 [文献 4.3.2.29])。

メトロニダゾールの抗菌活性及び関連する抗菌薬耐性については過去数十年間に広範に検討されてきた報告や資料が蓄積されているため、以下の項では内容を整理、要約して記載する。

メトロニダゾールは、1953年に放線菌から単離されたニトロイミダゾール化合物アゾマイシン *azomycin* (Maeda et al. 1953 [文献 4.3.2.25]) が殺トリコモナス作用を有することが確認されたことを受けて、化学的に合成された (Horie et al. 1956 [文献 4.3.2.20])。それ以後、メトロニダゾールは、嫌気性原虫、グラム陽性菌及びグラム陰性菌に対する高い抗微生物活性を有することが示されてきた (以下参照)。

### 2.1 主要な抗菌活性

**Shinn 1962 [文献 4.3.2.34]、Löfmark et al. 2010 [文献 4.3.2.24]、Freeman et al. 1997 [文献 4.3.2.16]、De Francesco et al. 2011 [文献 4.3.2.11]**

メトロニダゾールの腔トリコモナス *Trichomonas vaginalis*、ランブル鞭毛虫 *Giardia Lamblia* 及び赤痢アメーバ *Entamoeba histolytica* に対する抗原虫活性が発見されて間もなく、1962年に Shinn (1962 [文献 4.3.2.34]) がメトロニダゾールの嫌気性感染症治療薬としての可能性について報告した。

メトロニダゾールは、腹腔内感染症及び婦人科感染症、敗血症、心内膜炎、骨・関節感染症、中枢神経系感染症、呼吸器感染症、皮膚感染症、口腔感染症及び歯科感染症などの嫌気性感染症の治療に有効である (Löfmark et al. 2010 [文献 4.3.2.24])。

メトロニダゾールは、ヘリコバクター・ピロリ *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)、バクテロイデス *Bacteroides* 属 (*B. fragilis*)、フゾバクテリウム *Fuzobacterium* 属 (*F. nucleatum*)、プレボテラ *Prevotella* 属、ガードネレラ・バジナリス *Gardnerella vaginalis*、アクチノバチルス *Actinobacillus* 属、カンピロバクター・フェタス *Campylobacter fetus* 及び数種の嫌気性球菌など、複数のグラム陰性嫌気性菌に有効であることが明らかになっている。また、ペプトストレプトコッカス *Peptostreptococcus* 属、ウェルシュ菌 *Clostridium perfringens* 及びクロストリジウム・ディフィシル *Clostridium difficile* などのグラム陽性嫌気性菌もメトロニダゾールに感受性を示す (Freeman et al. 1997 [文献 4.3.2.16])。一部の嫌気性菌株のメトロニダゾールに対する感受性 (最小発育阻止濃度 [MIC] で表したもの) を表 1 に示す。

表 1 MIC及びMIC<sub>90</sub> (mg/L) の範囲で表した各種菌株のメトロニダゾール感受性

菌株	メトロニダゾール感受性 (MIC [mg/L])	MIC <sub>90</sub> の範囲 (mg/L)
<b>グラム陰性菌</b>		
バクテロイデス・フラジリス <i>Bacteroides fragilis</i>	0.01~25	0.5~4
その他のバクテロイデス <i>Bacteroides</i> 属	0.25~≥256	0.5~6.2
フゾバクテリウム <i>Fuzobacterium</i> 属	0.0625~32	0.5~4
プレボテラ <i>Prevotella</i> 属	NA	4
ガードネレラ・バジナリス <i>Gardnerella vaginalis</i>	1.0~≥128	0.4~≥128
アクチノバチルス <i>Actinobacillus</i> 属	10~40	36
カンピロバクター・フィタス <i>Campylobacter fetus</i>	0.25~≥64	NA
ヘリコバクター・ピロリ <sup>a</sup> <i>Helicobacter pylori</i> <sup>a</sup>	0.5~2	NA
<b>グラム陽性菌</b>		
ペプトストレプトコッカス <i>Peptostreptococcus</i> 属	≤0.06~≥8	0.25~≥8
ウェルシュ菌 <i>Clostridium perfringens</i>	≤0.1~>128	0.5~4
クロストリジウム・ディフィシル <i>Clostridium difficile</i>	0.125~4	2~8

出典：Freeman et al. 1997 [文献 4.3.2.16] (a：De Francesco et al. 2011 [文献 4.3.2.11])、NA：データ未入手

特記すべき点として、メトロニダゾールはクロストリジウム・ディフィシル *C. difficile* 感染症の治療に有効な数少ない医薬品のひとつと考えられている (Freeman et al. 1997 [文献 4.3.2.16])。

微好気性菌ヘリコバクター・ピロリ *H. pylori* の感受性株の MIC は、0.5~2 mg/L と報告された。耐性株の MIC は 8 mg/L 以上 (16~128 mg/L) であった (De Francesco et al. 2011 [文献 4.3.2.11])。好気性菌と嫌気性菌の混合感染症を治療する場合、メトロニダゾールは他の適切な抗菌剤と併用しなければならない (Löfmark et al. 2010 [文献 4.3.2.24])。メトロニダゾールがヘリコバクター・ピロリ *H. pylori* 感染症治療のための各種併用療法でも用いられて来たのは、そのためである。

がん患者におけるがん性悪臭の治療に関連する薬理活性は嫌気性菌株に対するメトロニダゾールの抗菌活性であると考えられる。メトロニダゾールの臨床的有効性、細菌学的検査成績、及び悪臭の改善と嫌気性菌感染の消失との相関性については、CTD「[2.7.3] 臨床的有効性」及び「[2.5] 臨床に関する概括評価」に記載している。

## 2.2 主要な抗原虫活性

**Freeman et al. 1997 [文献 4.3.2.16]、Goodman and Gilman 2001 [文献 4.3.2.18]、Upcroft and Upcroft 2001 [文献 4.3.2.42]**

メトロニダゾールは抗原虫活性を有し、膣炎の一般的な原因となる病原体の膣トリコモナス *Trichomonas vaginalis* によるトリコモナス症に有効である。トリコモナス症は、主に尿生殖路感染症を伴う性感染症である。感染部位として最も多いのは、女性の尿道及び膣である。メトロニダゾールは、腸管感染症及び肝膿瘍の一般的な原因となる病原性原虫の赤痢アメーバ *Entamoeba histolytica* によるアメーバ症にも有効である。この原虫の感染は、成熟嚢子に汚染された飲食物を摂取することで起こる。メトロニダゾールは、下痢を伴う小腸感染症の原因病原体であるランブル鞭毛虫 *Giardia lamblia* によるランブル鞭毛虫症にも有効である。この細菌の感染経路は、便に汚染された飲食物からの経口感染である (Freeman et al. 1997 [文献 4.3.2.16]、Goodman and Gilman 2001 [文献 4.3.2.18]、Upcroft and Upcroft 2001 [文献 4.3.2.42])。

メトロニダゾールは、嫌気性条件下では低濃度で高い効果が確認されている。感受性 (MIC の範囲) を以下の表 2 に示す。

表 2 原虫のメトロニダゾール感受性

原虫	メトロニダゾール感受性 (MIC [mg/L])
膣トリコモナス <i>Trichomonas vaginalis</i>	0.06~6.2
赤痢アメーバ <i>Entamoeba histolytica</i>	0.3~0.625
ランブル鞭毛虫 <i>Giardia lamblia</i>	0.050~50

出典：Freeman et al. 1997 [文献 4.3.2.16]

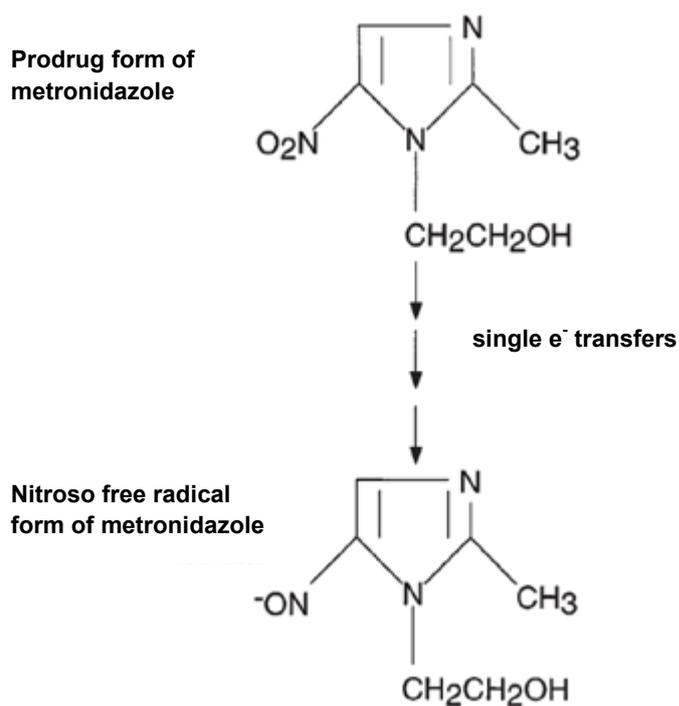
## 2.3 作用機序

**Freeman et al. 1997 [文献 4.3.2.16]、Löfmark et al. 2010 [文献 4.3.2.24]、Goodman and Gilman 2001 [文献 4.3.2.18]、Bendesky et al. 2002 [文献 4.3.2.5]、Leiros et al. 2004 [文献 4.3.2.22]、Olekhovich et al. 2009 [文献 4.3.2.27]**

メトロニダゾールは、絶対嫌気性条件下での 5 位のニトロ基の還元によって活性化されるプロドラッグである (図 1 メトロニダゾールの化学構造及び化学的活性化を参照)。この電子供与はニトロ基への電子伝達を伴い、細菌又は原虫の細胞内でメトロニダゾールを短寿命のニトロソ遊離基に変換し、これが細胞内で DNA、RNA 及びタンパクなどの高分子と反応する。短寿命のニトロソ遊離基は、DNA と相互作用して DNA と結合した後に DNA 合成を阻害し、さらに酸化反応によって一本鎖及び二本鎖切断を誘導することで DNA を損傷すると考えられる。これにより、

最終的に細胞溶解を生じることなく嫌気性微生物に対して特異性の高い殺効果を示す。なお、化学構造の共鳴を促すイミダゾール環の 2 位の置換（特にラクタム環と置換）をした場合は、概して抗原虫活性が増強した。一方、そのような共鳴効果を打ち消すような 2 位のアシル基の置換がある場合は、抗原虫活性が減弱したとの知見も報告されている。（Freeman et al. 1997 [文献 4.3.2.16]、Löfmark et al. 2010 [文献 4.3.2.24]、Goodman and Gilman 2001 [文献 4.3.2.18]）。

図 1 メトロニダゾールの化学構造及び化学的活性化



DNA 損傷を生じさせるメトロニダゾール由来の分子種としては、ヒドロキシルアミン付加体が考えられる（Bendesky et al. 2002 [文献 4.3.2.5]）。

嫌気性細菌及び原虫におけるメトロニダゾールの活性化機序の概略図を図 2 に示す。

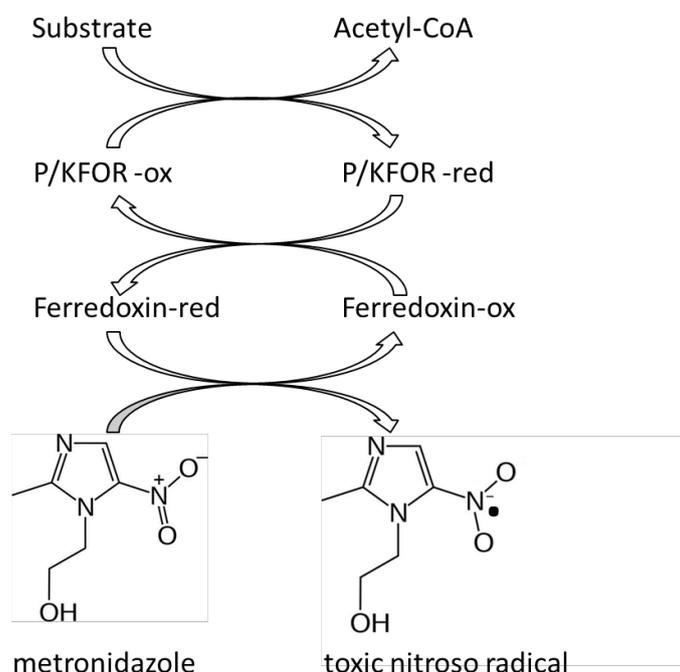
この電子伝達は、嫌気性又は微好気性微生物内にフェレドキシン、小型の Fe-S タンパク、及び場合により他の酵素や電子伝達成分でメトロニダゾールに電子を供与できるだけの負の酸化還元電位を持つものが存在することによって行われる（Goodman and Gilman 2001 [文献 4.3.2.18]、Löfmark et al. 2010 [文献 4.3.2.24]）。原虫をはじめとするメトロニダゾール感受性の嫌気性又は微好気性微生物は、ピルビン酸などのケト酸の酸化発酵からエネルギーを生成している。ピルビン酸の脱炭酸反応を触媒するのは、好気性微生物に存在するピルビン酸デヒドロゲナーゼに相当するピルビン酸/ケト酸：フェレドキシンオキシドレダクターゼ（P/KFOR）である。この P/KFOR は、フェレドキシンを還元するための電子を生成し、その電子を電子受容体又はメトロニダゾールに触媒的に供与する。酸素（O<sub>2</sub>）の存在下では、電子は主に酸素へ伝達されるため、メトロニダゾールへの電子伝達が減り、その結果メトロニダゾールの還元活性化が抑制され、活

性型薬物の再循環が増加する。最終的に、メトロニダゾールは酸素の存在下ではその抗菌活性を失うことになる (Goodman and Gilman 2001 [文献 4.3.2.18]、Löfmark et al. 2010 [文献 4.3.2.24])。

以上、結論として、メトロニダゾールが活性化され、殺菌作用を持つ活性型に変換されるには、メトロニダゾールのニトロ基が嫌気条件特異的に還元される必要がある。

ヘリコバクター・ピロリ *H. pylori* などの微好気性菌においては、酸素非感受性ニトロレダクターゼ (RdxA) を介するメトロニダゾールの還元で 1 電子対が伝達されるステップを必要とする別の活性化機序の存在が報告されている (Löfmark et al. 2010 [文献 4.3.2.24])。ヘリコバクター・ピロリ *H. pylori* における RdxA によるメトロニダゾールの還元は、NAD(P)H 依存性であり、絶対嫌気性条件を必要とする (Olekhovich et al. 2009 [文献 4.3.2.27])。

図 2 嫌気性細菌及び原虫におけるメトロニダゾールの活性化機序



Ox, 酸化型、red, 還元型。Substrate (基質) は以下のものに該当すると考えられる：ジアルジア *Giardia* 属では 2-ケト酪酸、赤痢アメーバ *E. histolytica* では  $\alpha$ -ケト酪酸、 $\alpha$ -ケトグルタル酸及びオキサロ酪酸、ヘリコバクター・ピロリ *H. pylori* ではピルビン酸。P/KFOR, 好気性微生物に存在するピルビン酸デヒドロゲナーゼに換わってエネルギーを産生するピルビン酸/ケト酸：フェレドキシノキシドレダクターゼ。

出典：Leiros et al. 2004 [文献 4.3.2.22] (一部改変)

## 2.4 耐性誘導

Samuelson 1999 [文献 4.3.2.31]、Olekhovich et al. 2009 [文献 4.3.2.27]、De Francesco et al. 2010 [文献 4.3.2.10]、Snydman et al. 2010 [文献 4.3.2.36]、Shah et al. 2010 [文献 4.3.2.33]、Baines et al. 2008 [文献 4.3.2.4]、Löfmark et al. 2010 [文献 4.3.2.24]、Upcroft and Upcroft 2001 [文献 4.3.2.42]、Tejman-Yarden et al. 2011 [文献 4.3.2.40]

臨床において、メトロニダゾールの抗菌活性及び抗原虫活性は、プロドラッグであるメトロニダゾールのニトロ基が P/KFOR と連動した電子伝達体であるフェレドキシンにより、DNA 損傷性があり変異原性を有する分子種へと変換されることにより生じる。P/KFOR は偏性嫌気性微生物の中核的な代謝及びエネルギー生成に必須である。したがって、偏性嫌気性微生物で臨床的に重要なメトロニダゾール耐性が発現することは稀である (Samuelson 1999 [文献 4.3.2.31]、Olekhovich et al. 2009 [文献 4.3.2.27])。

バクテロイデス *Bacteroides* 属株のメトロニダゾール耐性化率は低く、2000～2007 年に米国で分離された耐性株は 2 株である (Snydman et al. 2010 [文献 4.3.2.36])。一方、微好気性菌であるヘリコバクター・ピロリ *H. pylori* においては、メトロニダゾール耐性化率は 26.7% (95%信頼区間：25.2～28.1%) などと高い (De Francesco et al. 2010 [文献 4.3.2.10])。クロストリジウム・ディフィシル *C. difficile* でもメトロニダゾール耐性が認められており (Shah et al. 2010 [文献 4.3.2.33])、2005～2006 年に英国でスクリーニングされた分離株での低感受性菌発現率は 24.4% 以下であった (Baines et al. 2008 [文献 4.3.2.4])。

ランブル鞭毛虫症では、メトロニダゾールの治療不成功率は最高 20% である (Upcroft and Upcroft 2001 [文献 4.3.2.42]) が、ランブル鞭毛虫 *G. lamblia* のメトロニダゾール耐性株が臨床で分離されることは稀である (Tejman-Yarden et al. 2011 [文献 4.3.2.40])。

耐性は細菌及び原虫で報告されており、主に 4 つの誘導機構が考えられている (Löfmark et al. 2010 [文献 4.3.2.24])。

- 薬物活性化抑制 (P/KFOR 酵素系に関連)
- 代替経路による薬物不活性化
- 薬物の細胞内移行抑制又は薬物排出
- DNA 損傷の抑制又は DNA 修復能の変化

これらの各耐性誘導機構について、以下の項で詳述する。

#### 2.4.1 P/KFOR 酵素活性の低下による薬物活性化抑制

**Upcroft and Upcroft 2001 [文献 4.3.2.42]、Dunn et al. 2010 [文献 4.3.2.12]、Tejman-Yarden et al. 2011 [文献 4.3.2.40]、Samuelson 1999 [文献 4.3.2.31]、Goodwin et al. 1998 [文献 4.3.2.19]、Olekhovich et al. 2009 [文献 4.3.2.27]、Smith and Edwards 1997 [文献 4.3.2.35]**

P/KFOR 活性の低下は、いくつかのメトロニダゾール感受性微生物における主要な耐性誘導機構である。

ジアルジア *Giardia* 属において、P/KFOR はメトロニダゾール耐性株で発現量が最低 5 分の 1 まで減少し、電子伝達系の次の電子受容体であるフェレドキシン I も約 7 分の 1 まで減少する。もうひとつの 2-オキソ酸オキシドレダクターゼは他の基質 (主に 2-ケト酪酸) を用いることができ

るため、低下した P/KFOR 活性を補うことができる。この新しい経路では、必ずしもフェレドキシンに電子が供与されず、酸化還元電位を高めることでメトロニダゾール活性化経路を迂回することができる (Upcroft and Upcroft 2001 [文献 4.3.2.42])。さらに、P/KFOR 発現レベルが正常なランブル鞭毛虫 *G. lamblia* のメトロニダゾール高度耐性株が実験室で出現しており、他にも耐性形成の経路が存在する可能性が示唆されている (Dunn et al. 2010 [文献 4.3.2.12])。

膣トリコモナス *T. vaginalis* のメトロニダゾール耐性臨床分離株は、P/KFOR 及びヒドロゲナーゼ活性が低下しており、メトロニダゾールの解毒には何らかの方法で O<sub>2</sub> を必要とするため好気性条件下で出現すると考えられる。このように、メトロニダゾール耐性分離株には O<sub>2</sub> 消去能が欠乏している可能性がある (Upcroft and Upcroft 2001 [文献 4.3.2.42])。実験室で高濃度メトロニダゾールにより耐性を誘発させた膣トリコモナス *T. vaginalis* においても、P/KFOR 発現レベルが低下しており、同時にフェレドキシン発現レベル、ヒドロゲノソームのリンゴ酸酵素及び NAD : フェレドキシンオキシドレダクターゼも低下している。その代わりに、この耐性株は乳酸発酵能及び解糖能が高い (Upcroft and Upcroft 2001 [文献 4.3.2.42])。膣トリコモナス *T. vaginalis* の高耐性分離株はタンパク又は mRNA レベルで P/KFOR 又はフェレドキシンを発現しないため、代替として 2-オキソ酸オキシドレダクターゼ酵素が P/KFOR 経路を補い、フェレドキシンへの電子供与を必ずしも行わない経路によりエネルギーを生成することで、メトロニダゾール高度耐性に関連する P/KFOR の発現量減少の影響を受けずに済む。これらの 2-オキソ酸オキシドレダクターゼは、ジアルジア *Giardia* 属で活性化する代替経路で認められるものと類似している (Upcroft and Upcroft 2001 [文献 4.3.2.42])。

一方、赤痢アメーバ *E. histolytica* は 5%以下の酸素中で増殖することができる通性嫌気性微生物である。赤痢アメーバ *E. histolytica* は P/KFOR 活性を発現するが、この酵素は  $\alpha$ -ケト酪酸、 $\alpha$ -ケトグルタル酸及びオキサロ酢酸などをも基質とする。赤痢アメーバ *E. histolytica* は、酸素解毒酵素としてカタラーゼ、ペルオキシダーゼ及び 2 種類のスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) を発現する。赤痢アメーバ *E. histolytica* のメトロニダゾール耐性株においては、P/KFOR 活性は変化せず、Fe-SOD の発現が 3~5 倍に増強し、もうひとつの SOD の活性が消失している。さらに、ペルオキシレドキシンの発現が亢進し、フェレドキシン I の発現が低下している (Upcroft and Upcroft 2001 [文献 4.3.2.42])。

メトロニダゾール耐性の原虫が臨床で分離又は機序解析のために実験室で誘導されたが、このような耐性はまだ原虫の地域的流行に発展したことはない。ランブル鞭毛虫 *G. lamblia* は、メトロニダゾール耐性により、腸粘膜に付着しにくくなり、その結果感染力が低下した (Tejman-Yarden et al. 2011 [文献 4.3.2.40])。膣トリコモナス *T. vaginalis* のメトロニダゾール耐性は、性行為感染による感染力の低下に関連すると考えられており、耐性の問題はキャリアのみの問題として残ると考えられた (Upcroft and Upcroft 2001 [文献 4.3.2.42])。管腔内に寄生する原虫においてメトロニダゾール耐性獲得が遅い理由は、こうした原虫の倍数性及び P/KFOR 系の代替となる発酵経路がないことに関連するものと考えられている (Samuelson 1999 [文献 4.3.2.31])。

メトロニダゾール耐性ヘリコバクター・ピロリ *H. pylori* では、RdxA と呼ばれる非必須酸素非感受性 NAD(P)H ニトロレダクターゼの変異が同定された (Goodwin et al. 1998 [文献 4.3.2.19])。RdxA は強力な NAD(P)H オキシダーゼ活性も有し、その NAD(P)H オキシダーゼ活性は、ヘリコバクター・ピロリ *H. pylori* の耐性株ではなく感受性株で主に RdxA の機能によるものであることが示された (Olekhnovich et al. 2009 [文献 4.3.2.27])。この酸素非感受性 NADPH ニトロレダクターゼの各種変異がヘリコバクター・ピロリ *H. pylori* の主なメトロニダゾール耐性化機序と考えられた (Goodwin et al. 1998 [文献 4.3.2.19])。このように、RdxA 変異体は、メトロニダゾール還元部位からの酸素捕捉能を低下させ、その結果メトロニダゾールの活性化を妨げることにより、ヘリコバクター・ピロリ *H. pylori* にメトロニダゾール耐性を付与すると考えられる (Smith and Edwards 1997 [文献 4.3.2.35])。特記すべき点として、ヘリコバクター・ピロリ *H. pylori* 耐性株が嫌気性条件に予め曝露すると、耐性が消失し、メトロニダゾール感受性が回復する。この場合、NADH オキシダーゼが酸素スカベンジャーとしての役割を果たし、低酸化還元電位/酸素圧を確保し、この抗生物質を活性型の状態に維持する (De Francesco et al. 2011 [文献 4.3.2.11])。これにより、ヘリコバクター・ピロリ *H. pylori* における微好気性条件下での RdxA の正常な生理学的役割に疑問が生じる。ひとつの可能性として、メトロニダゾールの活性化に関与する他の酵素の効率が低酸素条件下では上昇することが考えられる (Olekhnovich et al. 2009 [文献 4.3.2.27])。別のニトロレダクターゼをコードする *fixA* やフェレドキシン様酵素をコードする *fixB* などの他の遺伝子は、RdxA 変異の存在下で不活性化すると、メトロニダゾール耐性を増強させる可能性がある (Olekhnovich et al. 2009 [文献 4.3.2.27])。

さらに、ヘリコバクター・ピロリ *H. pylori* には、他のメトロニダゾール耐性化機序が存在する可能性もある (以下の 2.4.3 及び 2.4.4.1 項参照)。

#### 2.4.2 代替経路による薬物不活化

**Löfmark et al. 2010 [文献 4.3.2.24]、Stubbs et al. 2000 [文献 4.3.2.37]、  
Löfmark et al. 2005 [文献 4.3.2.23]、Alauzet et al. 2010 [文献 4.3.2.2]、  
Trinh et al. 1996 [文献 4.3.2.41]、Leiros et al. 2004 [文献 4.3.2.22]、  
Pelaez et al. 2008 [文献 4.3.2.30])**

メトロニダゾールは、バクテロイデス *Bacteroides* 属などの様々なグラム陽性及びグラム陰性嫌気性菌に存在する特定の耐性遺伝子 *nim* により不活性化されることが報告されている (Löfmark et al. 2010 [文献 4.3.2.24])。バクテロイデス・フラジリス *B. fragilis* などの細菌では異なる 8 種類の遺伝子 (*nimA*~*nimH*) が同定され、いずれも P/KFOR の代替となるニトロイミダゾールレダクターゼをコードしている。*nim* 遺伝子によりコードされているそれらの酵素が 4-又は 5-ニトロイミダゾール分子を毒性のない 4-又は 5-アミノイミダゾール誘導体に変換することで、メトロニダゾールの抗菌活性に関与する毒性のあるニトロソ遊離基の生成が回避される (Stubbs et al. 2000 [文献 4.3.2.37]、Löfmark et al. 2005 [文献 4.3.2.23]、Löfmark et al. 2010 [文献 4.3.2.24]、Alauzet et al. 2010 [文献 4.3.2.2])。

9種類目の *nim* 遺伝子 (*nimI*) もプレボテラ・バーロニアエ *Prevotella baroniae* で報告されているが、この菌種に固有の沈黙遺伝子であると考えられる (Alauzet et al. 2010 [文献 4.3.2.2])。

これらの遺伝子の一部 (*nimA*、*C*、*D*) は接合によりバクテロイデス *Bacteroides* 属のメトロニダゾール耐性株から感受性株へと伝達され得るプラスミドにより運ばれるのに対し、*nimB* 及び *nimI* は染色体遺伝子である (Trinh et al. 1996 [文献 4.3.2.41]、Leiros et al. 2004 [文献 4.3.2.22]、Alauzet et al. 2010 [文献 4.3.2.2]、Löfmark et al. 2010 [文献 4.3.2.24])。

バクテロイデス *Bacteroides* 属の一部の株で沈黙 *nim* 遺伝子が報告された。これらの沈黙遺伝子は、メトロニダゾールに長期間曝露された菌株では耐性関連遺伝子になる可能性がある。このような活性化は、遺伝子のすぐ上流にある挿入因子プロモーターの挿入、あるいは挿入後の新規プロモーターの生成のいずれかによる遺伝子の点突然変異により生じ得る (Alauzet et al. 2010 [文献 4.3.2.2])。

クロストリジウム・ディフィシル *C. difficile* のメトロニダゾール耐性株は非常に稀で、耐性を示す分離株は 6.3%以下であると報告されたが、これらの分離株のいずれにおいても *nim* 遺伝子は関与していなかった (Pelaez et al. 2008 [文献 4.3.2.30])。

### 2.4.3 薬物の細胞内移行抑制又は薬物排出

van Amsterdam et al. 2005 [文献 4.3.2.43]

ヘリコバクター・ピロリ *H. pylori* において、外膜に存在し、各種抗生物質の細胞内移行及び細胞外排出に関与する 2 種類の TolC 薬物排出タンパクが欠損していると、その欠損株のメトロニダゾール感受性が上昇することが見出されたことから、これらの薬物排出ポンプの過剰発現がメトロニダゾール耐性化の機序となることが間接的に示された。

### 2.4.4 DNA損傷抑制及びDNA修復の変化

#### 2.4.4.1 酸素捕捉能亢進によるDNA損傷抑制

Wang et al. 2006 [文献 4.3.2.44]、De Francesco et al. 2011 [文献 4.3.2.11]、Smith and Edwards 1997 [文献 4.3.2.35]、Choi et al. 2011 [文献 4.3.2.8]

ヘリコバクター・ピロリ *H. pylori* は、多岐にわたる活性酸素分子種 (ROS) 解毒酵素を有しているが、酸素感受性のままであるため、好気性条件下では増殖できない (Wang et al. 2006 [文献 4.3.2.44])。2.4.1 項で既述し、また以下にも要約するように、メトロニダゾール耐性機序の一部は細胞内酸化還元電位制御に直接関連している。

メトロニダゾール活性化の過程で生成される ROS が微生物に対する DNA 損傷及び細胞毒性に重要な役割を果たし、細胞内酸化還元電位/酸素圧はメトロニダゾールの細胞毒性に直接関連している (De Francesco et al. 2011 [文献 4.3.2.11])。ヘリコバクター・ピロリ *H. pylori* のメトロニダゾール耐性株の RdxA に変異が生じると、NADH オキシダーゼ/NAD(P)H ニトロレダクターゼ

が不活性化し (2.4.1 項参照)、その結果細胞内の酸化還元電位/酸素圧が上昇し、メトロニダゾール耐性が発現する (Smith and Edwards 1997 [文献 4.3.2.35]、De Francesco et al. 2011 [文献 4.3.2.11])。

メトロニダゾールの活性化の過程で生成される ROS に対する抵抗性を高めるため、ヘリコバクター・ピロリ *H. pylori* は、鉄取り込み調節因子 (Fur) 遺伝子の変異に伴い発現が亢進することが明らかになっている SodB と呼ばれる鉄イオン共役型 SOD を有している (Choi et al. 2011 [文献 4.3.2.8])。Fur タンパクは、転写調節因子ファミリーに属しており、鉄結合型タンパク (Fe-Fur) として数種類の遺伝子を制御し、鉄非結合型タンパク (Apo-Fur) としてその他の遺伝子を制御することができる。*fur* 遺伝子の変異のパターンによっては、Apo-Fur タンパクと SodB プロモーターとの結合が減少し、SOD の合成増加に続いて、メトロニダゾールの活性化産物の解毒に至る (Choi et al. 2011 [文献 4.3.2.8])。

#### 2.4.4.2 DNA修復能の変化

Löfmark et al. 2010 [文献 4.3.2.24]、Sander et al. 2001 [文献 4.3.2.32]

メトロニダゾール耐性発現に間接的に関与するもうひとつの機序として、DNA 修復能の変化が提唱されている (Löfmark et al. 2010 [文献 4.3.2.24])。これは、絶対嫌気性条件下でメトロニダゾールが休眠期のウシ型結核菌 *Mycobacterium bovis* に作用し、その活性が *recA*<sup>+</sup> 野生型株に比べて *recA* 変異株では 5 倍高いとの観察結果に基づいている (Sander et al. 2001 [文献 4.3.2.32])。*recA* 遺伝子は普遍的組換え及び DNA 修復の両方に関与する遍在的な多機能タンパクをコードしているため、この観察結果は、*recA* DNA 修復系が過剰発現すると、メトロニダゾールによる DNA 損傷に対する抵抗性が高まる可能性があることを示唆している。このことは、数種類の菌株で *recA* が微好気性菌の耐気性を媒介し、コリシン、ピオシン及び細胞外分解酵素の産生を誘導し、かつ毒素遺伝子の増幅を誘導することにより、毒性因子になり得るという事実により裏付けられている (Sander et al. 2001 [文献 4.3.2.32])。

### 3 副次的薬理試験

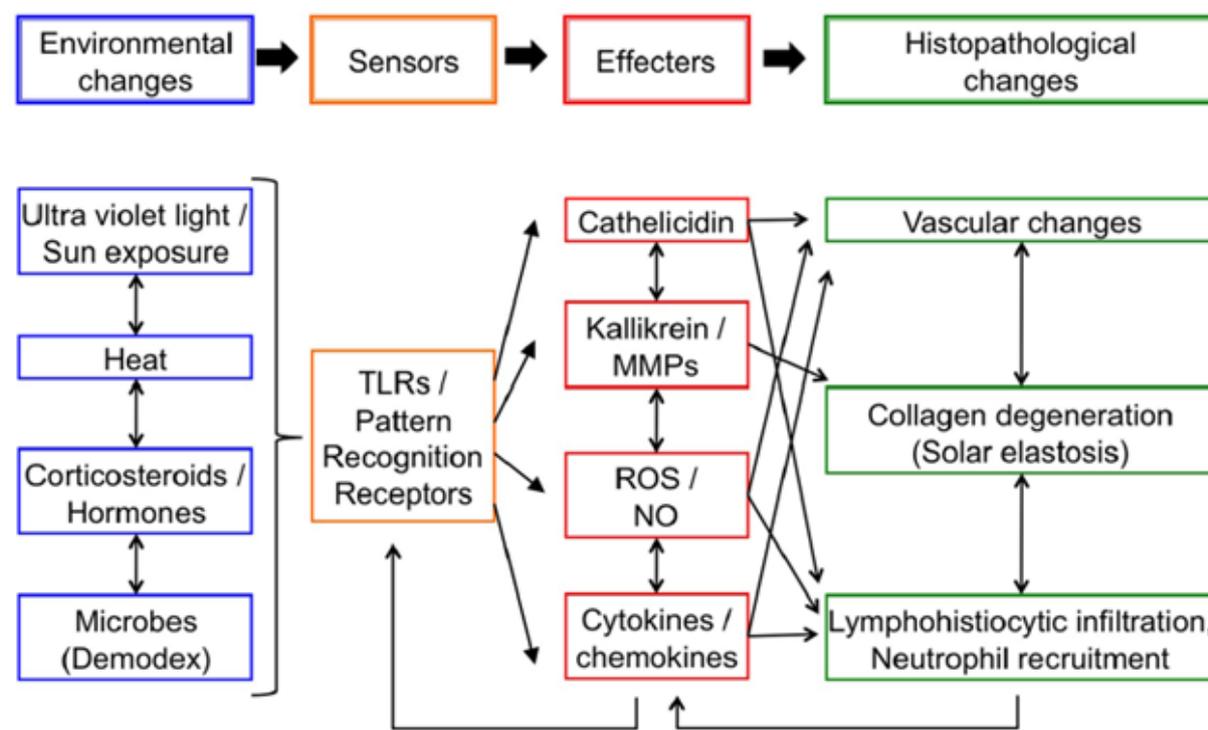
Yamasaki and Gallo 2009 [文献 4.3.2.46]、Cohen and Tiemstra 2002 [文献 4.3.2.9]

海外において、メトロニダゾール 0.75~1%外用剤は丘疹膿疱性酒さの第一選択薬と考えられているという背景があり、メトロニダゾールの副次的薬理作用については、酒さに対する治療薬としての適用に関連して検討されたデータがある (Yamasaki and Gallo 2009 [文献 4.3.2.46]、Cohen and Tiemstra 2002 [文献 4.3.2.9])。

酒さは、複数の因子が関与する炎症性疾患であり、顔面の間欠性の紅斑、紅潮、丘疹、膿疱、炎症性結節及び毛細血管拡張の出現が特徴である。尋常性ざ瘡とは異なり、酒さの主な炎症性皮疹である丘疹に先行して面皰が出現することはない。

酒さの病因には、自然免疫機構（特に Toll 様受容体 [TLR] 認識機構）、セリンプロテアーゼ活性高値、紅潮発現に至る血管の変化、好中球によると考えられる ROS の生成、UV 曝露などの環境因子、ニキビダニ *Demodex folliculorum* やヘリコバクター・ピロリ *H. pylori* などの微生物を含め、いくつかの因子が関与していると考えられている（Yamasaki and Gallo 2009 [文献 4.3.2.46]）。酒さの病因に関与すると考えられる因子を図 3 に示す。

図 3 酒さの発現機序への関与の可能性がある病因因子



環境変化、ホルモンバランスの変化及び微生物負荷は、TLR 及び他のパターン認識受容体により感知される。TLR シグナル伝達は、次のエフェクター分子を誘導する：カテリシジン、カリクレイン、マトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP)、ROS、一酸化窒素 (NO)、サイトカイン及びケモカイン。これらのエフェクター分子は、炎症細胞の動員を伴う血管変化及びコラーゲン変性により表皮構造を変化させる。浸潤した好中球及びリンパ球も、TLR を直接的又は間接的に活性化させるエフェクター分子の発生源となる。

出典：Yamasaki and Gallo 2009 [文献 4.3.2.46]

メトロナゾールは丘疹膿疱性酒さに特に有効であることから、その抗炎症活性に関する検討が複数報告されている。また、免疫系への影響も報告されている。それらについて以下に要約する。

### 3.1 抗炎症作用

Miyachi et al. 1986 [文献 4.3.2.26]、Akamatsu et al. 1990 [文献 4.3.2.1]、Taylor 1966 [文献 4.3.2.39]、Gnarpe et al. 1981 [文献 4.3.2.17]、Tanga et al. 1975 [文献 4.3.2.38]

活性化好中球により産生される活性酸素類は炎症部位の組織損傷を引き起こし得る強力な酸化物質とされるが、*in vitro* での検討により、メトロナゾールはザイモサン刺激好中球による過酸化

水素及びヒドロキシルラジカル産生を有意に低下させることが示されている（文献 Miyachi et al. 1986 [文献 4.3.2.26]）。好中球による ROS 生成に対するメトロナダゾールの抑制作用は、パルミトレイン酸（ヒト皮膚に一般に存在している遊離脂肪酸の一種）の存在下では濃度依存的かつ相乗的に増強される（Akamatsu et al. 1990 [文献 4.3.2.1]）。

これらのことから、メトロナダゾールは炎症細胞に対する直接的な薬理作用を有するということが提唱された。酒さにおけるメトロナダゾールの抗炎症作用は、炎症メディエーター類が病理組織学的変化を誘導して（図 3 参照）丘疹及び膿疱を形成するという仮説的な酒さ発症過程を妨げるものと考えられる。

その他、メトロナダゾールの白血球（好中球性顆粒球）機能に及ぼす影響ならびに抗炎症活性に関する知見がいくつか報告されている。血管周囲炎を有する患者の末梢血管疾患におけるメトロナダゾールの抗炎症作用が報告されており（Taylor 1966 [文献 4.3.2.39]）、また、メトロナダゾールはクローン病患者の白血球遊走能を改善したとの報告もある（Gnarpe et al. 1981 [文献 4.3.2.17]）。その他、各種潰瘍病変における抗炎症作用を報告した研究もある（Tanga et al. 1975 [文献 4.3.2.18]）。

以上のような結果が認められているため、メトロナダゾールの免疫系への影響についてさらに詳細に検討された。

### 3.2 免疫系への作用

**Bähr and Ullmann 1983 [文献 4.3.2.3]、  
Elizondo and Ostrosky-Wegman 1996 [文献 4.3.2.13]、  
Fararjeh et al. 2008 [文献 4.3.2.15]**

メトロナダゾール及び特にその代謝物 1- (2-ヒドロキシエチル-2-ヒドロキシメチル) -5-ニトロイミダゾールは、マウスリンパ球のフィトヘマグルチニン A 刺激による細胞分裂を促進すると報告された（Bähr and Ullmann 1983 [文献 4.3.2.3]）。

メトロナダゾールならびにその酢酸及びヒドロキシ代謝物はヒスタミンと化学構造的に類似性があり、それより類似度合は低いが、シメチジンの構造とも類似している。ヒスタミンは H<sub>2</sub> 受容体と結合して CD4 リンパ球によるインターロイキン 2 及びインターフェロン  $\gamma$  の合成及び放出ならびに CD8 リンパ球によるヒスタミン誘導免疫抑制因子の放出の抑制などの免疫応答の賦活化を惹起する内因性アミンである（Elizondo and Ostrosky-Wegman 1996 [文献 4.3.2.13]）。

メトロナダゾール及びそのヒドロキシ代謝物はヒト末梢血リンパ球のフィトヘマグルチニン刺激による細胞分裂を用量依存的に促進した。競合実験において、メトロナダゾール及びそのヒドロキシ代謝物はヒスタミンのリンパ球増殖抑制作用を用量依存的に阻害したが、その阻害が非競合的であったことから、イミダゾール化合物の標的は H<sub>2</sub> 受容体の活性部位ではないと推察された（Elizondo and Ostrosky-Wegman 1996 [文献 4.3.2.13]）。

別の研究では、メトロナダゾールは *in vitro* でのヒト末梢血リンパ球、ならびに *in vivo* 及び *in vitro* での Balb/c マウスで免疫抑制を誘導することが以下のように示された (Fararjeh et al. 2008 [文献 4.3.2.15])。すなわち、ヒト末梢血細胞を単離し、メトロナダゾール (5~200 µg/mL) 存在下での増殖について検討された。また、雌 Balb/c マウスにリン酸緩衝化生理食塩水 (PBS、陰性対照) 又はメトロナダゾール (14、28、42、57 及び 114 mg/kg/day) を 14 日間腹腔内投与し、体重、免疫器官の重量 (胸腺、リンパ節、脾臓)、血液学的パラメータ (白血球数を含む)、遅延型過敏症 (DTH) 反応、IgM 溶血斑形成細胞 (PFC) 数、及び血清中赤血球凝集抗体価を検討した。さらに無処置の雌 Balb/c マウスから単離した脾細胞を用いてリンパ球増殖 (混合リンパ球反応試験) を、また、腹腔内マクロファージを採取、培養して貪食作用と腫瘍壊死因子 (TNF) α 定量値を、いずれもメトロナダゾール (5~200 µg/mL) 存在下 *in vitro* で検討した。

ヒト末梢血リンパ球の増殖は、10、50 及び 200 µg/mL のメトロナダゾールにより統計学的に有意に抑制された。

メトロナダゾールを投与したマウスでは、循環血中の好中球及び単球の割合が統計学的に有意に減少し、循環血中のリンパ球の割合が増加した。42~114 mg/kg/day の用量で脾臓重量の減少 (全体重増加との相対値) が認められた。これに伴い、同じ用量で白脾髄の萎縮が認められた。28~114 mg/kg/day の用量では胸腺髄質組織の有意な減少が認められた。メトロナダゾールは、すべての用量で 2 回目の抗原投与後 24 時間での DTH 反応を用量依存的に抑制した。PFC 反応は 28 mg/kg/day から、赤血球凝集抗体価は 14 mg/kg/day から低下を示した。

マウス脾細胞の混合リンパ球反応試験では高濃度 (50 及び 200 µg/mL) でリンパ球増殖の抑制が認められた。マウスから単離したマクロファージでは、5~200 µg/mL の濃度で *in vitro* 貪食能の抑制が認められ、また、同じ濃度のメトロナダゾールとの *in vitro* 培養後に TNFα 濃度の低下が認められ、いずれも濃度依存的であった。

以上の結果から、メトロナダゾールがマウス及びヒト末梢血リンパ球で免疫抑制を誘導したことが示唆された。

#### 4 安全性薬理試験

本申請を目的とした開発にあたっては、安全性薬理試験に該当する試験は実施しなかった。文献でも ICH 準拠の安全性薬理試験は特定されなかった。メトロナダゾールは 1970 年代初期から広く臨床使用されてきたため、生理機能に及ぼしうる本化合物のほとんどの有害作用について、その特性が有害事象の臨床症例報告に基づき、明らかにされている。

動物の生理機能に対するメトロナダゾールの影響については、文献データとして報告されている。メトロナダゾールは、マウス、ラット、ネコ及びイヌの中樞神経系に影響を及ぼすことが報告されている。本概要文では、病理組織学的変化を検討した初期の研究とあわせて、ネコ及びイヌにおけるメトロナダゾール中毒の動物症例を提示する。なお、ラット心臓由来の細胞を用いた *in*

*vitro* 試験 (4.2 項)、及びイヌの反復経口投与毒性試験 (4.1.4 項) では、心血管系の毒性は認められていない。

#### 4.1 中枢神経系への影響

動物における神経徴候の症例が獣医によるネコ及びイヌへのメトロニダゾール使用に基づいて報告されたが、メトロニダゾールの毒性発現機序に関する報告はほとんどない。以下の 4.1.3 及び 4.1.4 項にネコ及びイヌにおける症例報告例を提示する。

##### 4.1.1 マウスのヘキソバルビタール誘発睡眠時間に及ぼすメトロニダゾールの影響

Hospador and Manthei 1968 [文献 4.3.2.21]

成熟及び 21 日齢離乳期の雄 CD-1 マウスにメトロニダゾール 17.2 mg/kg を 3 日間腹腔内投与した。メトロニダゾールの最終投与 24 時間後に 100 mg/kg (催眠用量) のヘキソバルビタールを投与し、正向反射消失持続時間を測定して睡眠時間を推定した。成熟マウスの一部は、ヘキソバルビタール投与前の 48 時間、水のみを与えて絶食させた。

絶食成熟及び離乳期マウスではメトロニダゾール (17.2 mg/kg/day) の腹腔内投与によりヘキソバルビタール誘発睡眠時間の短縮が認められたが、摂餌成熟マウスでは認められなかった。この短縮は、メトロニダゾール投与によりヘキソバルビタール代謝酵素が誘導されたことが原因と考えられた (CTD 「2.6.4 薬物動態試験の概要文」の [5.3.1] 項参照)。

##### 4.1.2 ラットにおけるメトロニダゾール投与後の神経毒性

Bradley et al. 1977 [文献 4.3.2.7]

Wistar 白色ラット 6 例にメトロニダゾール 180 mg/kg/day、別の 6 例に 90 mg/kg/day を連日皮下投与し、メトロニダゾールの末梢神経毒性を検討した。メトロニダゾールは 0.5% 生理食塩水溶液として投与した。対照群の 4 例には同じ投与容量の生理食塩水を皮下投与した。投与期間は最長 16 週間とした。組織切片を大脳半球、小脳、脳幹、頸髄、腰髄、後根神経節、大腿及び足関節レベルの坐骨神経、長趾伸筋及び内臓について作製、検査した。その結果、筋内神経を含む中枢神経系及び末梢神経系に変性は認められなかった。さらに、高用量メトロニダゾール群 3 例、低用量メトロニダゾール群 3 例及び生理食塩水群 3 例を用い、脳、脊髄及び後根神経節における DNA 及び RNA 合成速度をそれぞれ  $^3\text{H}$ -チミジン及び  $^{14}\text{C}$ -ウリジンでの 1 時間のパルス標識により検討した。その結果、メトロニダゾール群と対照群で放射能の取り込みに有意な差は認められなかった。

##### 4.1.3 ネコにおけるメトロニダゾール経口投与後の神経毒性

Olson et al. 2005 [文献 4.3.2.28]

メトロニダゾール 73.5~147 mg/kg/day を経口投与された 3.4 kg の成熟ネコでは、炎症性腸疾患の疑いが 40 日間持続し、メトロニダゾール中毒と考えられる症例として報告された。このネコはプレドニゾンも投与されていた。中枢神経系関連の神経徴候として、急性四肢不全麻痺、無反応、振戦及び異常発声が認められた。このネコは 12 日間の対症療法後に安楽死された。剖検時、肉眼的異常は認められなかった。病理組織学的検査では、脳幹部の間脳から延髄にわたり、辺縁部が非常に明瞭な多巣性の壊死病巣が認められた。

#### 4.1.4 イヌにおけるメトロニダゾール経口投与後の神経毒性

**Bost 1977 [文献 4.3.2.6]、Evans et al. 2003 [文献 4.3.2.14]**

イヌにおけるメトロニダゾールの神経毒性が複数の臨床症例及び研究で報告されている。

慢性毒性試験（文献に投与期間の記載なし）において、イヌ（文献に例数及び性別の記載なし）に 75、110、150 及び 225 mg/kg/day の用量でメトロニダゾール（ゼラチンカプセルに充填）を投与した。その結果、150 及び 225 mg/kg/day 群で中枢神経系に対する非常に明確な影響が認められた。すなわち、失調性歩行、筋硬直及び振戦の徴候があり、その後重度の虚脱が認められた（Bost 1977 [文献 4.3.2.6]）。

イヌでの第 2 の試験（Bost 1977 [文献 4.3.2.6]）では、225 mg/kg/day（文献に投与期間の記載なし）を投与したイヌ（文献に例数及び性別の記載なし）の脳の病理組織学的検査の結果、観察された重度の症状を説明できるような形態学的変化は認められなかった。興味深い点として、明確な症状の出現後、投与を中止すると徴候は消失した。回復に要する期間は約 1 週間であった。

イヌでのメトロニダゾール中毒に関する症例報告のレトロスペクティブな研究（Evans et al. 2003 [文献 4.3.2.14]）において、ジアゼパム投与の影響が検討された。メトロニダゾール中毒を発症したイヌが 8 例特定され、メトロニダゾールの用量は  $65.1 \pm 23.3$  mg/kg/day、投与期間は  $37.3 \pm 34.9$  日であった。これらのイヌはジアゼパム投与を受けず、対症療法のみ施された。臨床的な神経学的徴候の出現及び回復までの時間がメトロニダゾール  $60.3 \pm 17.5$  mg/kg/day を  $127.5 \pm 295.5$  日間投与された 13 例のイヌの群と比較された。これらの 13 例のイヌには、最初にジアゼパム 0.43 mg/kg が静脈内急速投与された後、0.43 mg/kg が 8 時間毎に 3 日間経口投与された。

イヌの入院時に認められた主な臨床徴候は、垂直眼振、体幹運動失調、歩行不能及び不全対麻痺であった。メトロニダゾール投与は入院時に中止した。反応時間（衰弱性の一般状態が消失するまでの時間）は、対症療法のためのイヌで 4.25 日、ジアゼパム投与を受けたイヌではわずか 13 時間であった。回復に要する時間（残留性の一般状態がすべて消失するまでの時間）は、対症療法のためのイヌで 11.6 日、ジアゼパム投与を受けたイヌでわずか 38.8 時間であった。この研究の結果、イヌのメトロニダゾール毒性の神経学的徴候を軽減するジアゼパムの有益な効果が示され、ジアゼパムが主な作用を発揮する神経伝達物質  $\gamma$ -アミノ酪酸（GABA）の受容体部位とメトロニダゾールとの相互作用が裏付けられた。

## 4.2 心血管系への影響 (*in vitro*試験)

Wenzel and Cosma 1984 [文献 4.3.2.45]

新生児ラットの心臓から単離した細胞を用いた *in vitro* 心毒性試験が実施された。筋細胞、内皮細胞、及び線維芽細胞を単離し、生存可能な培養条件下で保存し、定量的代謝阻害試験ならびに形態及び拍動の変化を毒性の指標として用いて心毒性を検討した。測定は、6時間後及び12時間後の時点とし、内皮細胞及び線維芽細胞では7日間、筋細胞では3日間毎日行った。最高810 µg/mL までのメトロニダゾールを好気性又は嫌気性条件下で、直接又は肝ミクロゾームとの反応後に検討した。

これらの実験条件下では、メトロニダゾールは未変化体としても *in vitro* 代謝後でも、いずれの種類細胞に対しても毒性を示さなかった。

## 5 薬力学的薬物相互作用試験

メトロニダゾールはヒトにおいて50年以上にわたり経口、経膈及び静脈内の投与経路で使用され、関連する重要な影響は既に明らかになっていると考えられることから、本申請を目的とした開発にあたって薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。

## 6 考察及び結論

### 6.1 効力を裏付ける試験

1970年代初期以降、メトロニダゾールは腹腔内感染症及び婦人科感染症、敗血症、心内膜炎、骨・関節感染症、中枢神経系感染症、呼吸器感染症、皮膚感染症、口腔感染症及び歯科感染症などの嫌気性感染症の治療に有効な第一選択薬として認識されている (Löfmark et al. 2010 [文献 4.3.2.24])。メトロニダゾールは、バクテロイデス・フラジリス *Bacteroides fragilis*、プレボテラ *Prevotella* 属、フゾバクテリウム・ヌクレアタム *Fusobacterium nucleatum*、ウェルシュ菌 *Clostridium perfringens*、及び嫌気性球菌などがん性悪臭に関与する数種類のグラム陰性及びグラム陽性嫌気性菌に有効である (Paul and Pieper 2008 [文献 4.3.2.29])。予想されるメトロニダゾール耐性は、数種類の細菌で報告され、耐性化機序も複数提唱あるいは認められているものの、本剤によるがん性悪臭の治療対象である進行がん患者での本剤の使用期間は、一部では1年を超えて使用される症例もあるが、多くは1ヵ月から3ヵ月程度と考えられ (CTD「2.5 臨床に関する概括評価」の [4.5.2] 項参照)、この治療を受ける患者数も非常に少ないと考えられるため、原因菌に対する抗菌治療中に大きな問題となる可能性は低いと考えられる。

### 6.2 副次的薬理試験

副次的薬理作用として抗炎症活性があり、この機序に基づいて海外では酒さに対する外用剤として販売されている。免疫抑制特性があることも報告されている。

### 6.3 安全性薬理試験

メトロニダゾールの 1970 年代初期以降の広範な臨床使用経験を踏まえ、本申請を目的とした開発に際して特別な試験は実施しなかった。なお、臨床において、がん性皮膚潰瘍に伴う悪臭の治療にメトロニダゾールゲル 0.75%を患部に局所塗布で適用したときの全身曝露量が、既に市販されているメトロニダゾール錠 250 mg を既承認 1 日最大投与量 (2250 mg [1 回 750 mg を 1 日 3 回]) で経口投与したときの全身曝露量を超えることはないと考えられることは確認されている (CTD 「[2.7.2] 臨床薬理試験」参照)。

メトロニダゾールの安全性薬理を検討するために入手し得た文献情報は少なく限定的ではあるが、中枢神経系に対する影響がいくつか報告されていた。安全性薬理に関連する影響は、ヒトにおけるメトロニダゾールの広範な市販後調査に基づいた臨床での有害事象として記録されており、これについては CTD 「[2.7.4] 臨床的安全性」に記載している。

## 7 参考文献

Akamatsu H, Oguchi M, Nishijima S, Asada Y, Takahashi M, Ushijima T, Niwa Y. The inhibition of free radical generation by human neutrophils through the synergistic effects of metronidazole with palmitoleic acid: a possible mechanism of action of metronidazole in rosacea and acne. *Arch Dermatol Res.* 1990. 282:449-454 [文献 4.3.2.1]

Alauzet C, Mory F, Teyssier C, Hallage H, Carlier JP, Grollier G, Lozniewski A. Metronidazole resistance in *Prevotella* spp. and description of a new nim gene in *Prevotella baroniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010. 54:60-64 [文献 4.3.2.2]

Bahr V, Ullmann U. The influence of metronidazole and its two main metabolites on murine in vitro lymphocyte transformation. *Eur J Clin Microbiol.* 1983. 2:568-570 [文献 4.3.2.3]

Baines SD, O'Connor R, Freeman J, Fawley WN, Harmanus C, Mastrantonio P, Kuijper EJ, Wilcox MH. Emergence of reduced susceptibility to metronidazole in *Clostridium difficile*. *J Antimicrob. Chemother.* 2008. 62:1046-52 [文献 4.3.2.4]

Bendesky A, Menéndez D, Ostrosky-Wegman P. Is metronidazole carcinogenic? *Mut. Res.* 2002. 511:133-144 [文献 4.3.2.5]

Bost RG. Metronidazole: toxicology and teratology. In: Finegold SM, McFadzean JA, Roe FJC, eds. *Metronidazole: proceedings of the international metronidazole conference*. Princeton, NJ: Excerpta Medica. 1977. 112-118 [文献 4.3.2.6]

Bradley WG, Karlsson IJ, Rassol CG. Metronidazole neuropathy. *Brit. Med. J.* 1977. 2:610-611 [文献 4.3.2.7]

- Choi SS, Chivers TP, Berg DE. Point mutations in *Helicobacter pylori*'s fur regulatory gene that alter resistance to metronidazole, a prodrug activated by chemical reduction. PLoS ONE. 2011. 6:1-10 [文献 4.3.2.8]
- Cohen AF, Tiemstra JD. Diagnosis and treatment of rosacea. J. Am. Board. Fam. Pract. 2002. 15:214-217 [文献 4.3.2.9]
- De Francesco V, Goglio F, Hassan C, Manes G, Vannella L, Panella C, Ierardi E, Zullo A. Worldwide *H. pylori* antibiotic resistance : a systematic review. J Gastrointestin. Liver Dis. 2010. 19:409-414 [文献 4.3.2.10]
- De Francesco V, Zullo A, Hassan C, Goglio F, Rosania R, Ierardi E. Mechanisms of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance: an update appraisal. World J. Gastrointest. Pathophysiol. 2011. 15:35-41 [文献 4.3.2.11]
- Dunn LA, Burgness AG, Krauer KG, Eckmann L, Vanelle P, Crozet MD, Gillin FD, Upcroft P, Upcroft JA. A new-generation 5-nitroimidazole can induce highly metronidazole-resistant *Giardia lamblia* in vitro. Int. J. Antimicrob. Agents. 2010. 36:37-42 [文献 4.3.2.12]
- Elizondo G, Ostrosky-Wegman P. Effects of metronidazole and its metabolites on histamine immunosuppression activity. Life Sciences. 1996. 4:285-297 [文献 4.3.2.13]
- Evans J, Levesque D, Knowles K, Longshore R, Plummer S. Diazepam as a treatment for metronidazole toxicosis in dogs: a retrospective study of 21 cases. J. Vet. Intern. Med. 2003. 17:304-310 [文献 4.3.2.14]
- Fararjeh M, Mohammad MK, Bustanji Y, Alkhatib H, Abdalla S. Evaluation of immunosuppression induced by metronidazole in Balb/c mice and human peripheral blood lymphocytes. Int. Immunopharm. 2008. 8:341-350 [文献 4.3.2.15]
- Freeman CD, Klutman NE, Lamp KC. Metronidazole A therapeutic review and update. Drugs. 1997. 54:679-708 [文献 4.3.2.16]
- Gnarpe H, Belsheim J, Persson S. Influence of nitroimidazole derivatives on leukocyte migration. Scand J. Infect Dis (Suppl). 1981. 26:68-71 [文献 4.3.2.17]
- Goodman and Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics. 10th Ed. McGraw-Hill. 2001. pp 1105-1108 [文献 4.3.2.18]
- Goodwin A, Kersulyte D, Sisson G, van Zanten SJOV, Berg DE, Hoffman PS. Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* is due to null mutations in a gene (RdxA) that encodes and oxygen-insensitive NADPH nitroreductase. Mol. Microbiol. 1998. 28:383-393 [文献 4.3.2.19]
- Horie H. Anti-trichomonas effect of azomycin. The J of Antibiotics, SER. A. 1956. 4:168 [文献 4.3.2.20]

- Hospador MA, Manthei RW. Influence of age and diet on the induction of hexobarbital metabolizing enzymes in the mouse. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1968. 128:130-132 [文献 4.3.2.21]
- Leiros HKS, Kozielski-Stuhrmann S, Kapp U, Terradot L, Leonard GA, McSweeney SM. Structural basis of 5-nitroimidazole antibiotic resistance. The crystal structure of NimA from *Deinococcus radiodurans*. J Biol. Chem. 2004. 53:55840-55849 [文献 4.3.2.22]
- Löfmark S, Fang H, Hedberg M, Edlund C. Inducible metronidazole resistance and nim genes in clinical *Bacteroides fragilis* group isolates. Antimicrob. Agent Chemoter. 2005. 49:1253-1256 [文献 4.3.2.23]
- Löfmark S, Edlund C, Nord CE. Metronidazole is still the drug of choice for treatment of anaerobic infections. Clin Infect Dis. 2010. 50:S16-S23 [文献 4.3.2.24]
- Maeda K, Ōsato T, Umezawa H. A new antibiotic, azomycin. J of Antibiotics, SER. A. 1953. 4:182 [文献 4.3.2.25]
- Miyachi Y, Imamura S, Niwa Y. Anti-oxidant action of metronidazole: a possible mechanism of action in rosacea. Br J Dermatol. 1986. 114:231-234 [文献 4.3.2.26]
- Olekhovich IN, Goodwin A, Hoffman PS. Characterization of the NDA(P)H oxidase and metronidazole reductase activities of the RdxA nitroreductase of *helicobacter pylori*. FEBS J. 2009. 276:3354-3364 [文献 4.3.2.27]
- Olson EJ, Morales SC, McVey AS, Hayden DW. Putative metronidazole neurotoxicosis in a cat. Vet. Pathol. 2005. 42:665-669 [文献 4.3.2.28]
- Paul JC, Pieper BA. Topical metronidazole for the treatment of wound odor: a review of the literature. Ostomy Wound Management. 2008. 54:18-27 [文献 4.3.2.29]
- Pelaez T, Cercenado E, Alcalá L, Marin M, Martín-López A, Martínez-Alarcón J, Catalan P, Sánchez-Somolinos M, Bouza E. Metronidazole resistance in *Clostridium difficile* is heterogeneous. J Clin. Microbiol. 2008. 46:3028-3032 [文献 4.3.2.30]
- Samuelson J. Why metronidazole is active against both bacteria and parasites. Antimicrobial Agents and chemother. 1999. 43:1533-1541 [文献 4.3.2.31]
- Sander P, Papavinasundaram KG, Dick T, Stavropoulos E, Ellrott K, Springer B, Colston MJ, Böttger EC. *Mycobacterium bovis* BCG recA deletion mutation shows increased susceptibility to DNA-damaging agents but wild-type survival in a mouse infection model. Infection and Immunity. 2001. 69:3562-3568 [文献 4.3.2.32]

Shah D, Dang M-D, Hasbun R, Koo HL, Jiang ZD, DuPont HL, Garey KW. Clostridium difficile infection: update on emerging antibiotic treatment options and antibiotic resistance. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 2010. 8:555-564 [文献 4.3.2.33]

Shinn DLS. Metronidazole in acute ulcerative gingivitis. *The Lancet.* 1962. 2:1191 [文献 4.3.2.34]

Smith MA, Edwards DI. Oxygen scavenging, NADH oxidase and metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *J. of Antimicrob. Chemother.* 1997. 39:347-353 [文献 4.3.2.35]

Snydman DR, Jacobus NV, McDermott LA, Golan Y, Hecht DW, Goldstein EJC, Harrell L, Jenkins S, Newton D, Pierson C, Rihs JD, Yu LV, Venezia R, Finegold SM, Rosenblatt JE, Gorbach SL. Lessons learned from the anaerobe survey: historical perspective and review of the most recent data (2005-2007). *Clinical Infect. Diseases.* 2010. 50:S26-S33 [文献 4.3.2.36]

Stubbs SLJ, Brazier JS, Talbot PR, Duerden BI. PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of *Bacteroides* spp. and characterization of nitroimidazole resistance genes. *J Clin. Microb.* 2000. 38:3209-3213 [文献 4.3.2.37]

Tanga MR, Antani JA, Kabade SS. Clinical evaluation of metronidazole as an anti-inflammatory agent. *Int. Surg.* 1975. 60:75-76 [文献 4.3.2.38]

Taylor JAT. Pharmacodynamic observations on metronidazole therapy. Side effects in endocrine, metabolic and auto-immune disorders. III Anti-ischemic and anti-inflammatory action in peripheral vascular disorders. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 1966. 9:37-39 [文献 4.3.2.39]

Tejman-Yarden N, Millman M, Lauwaet T, Davids BJ, Gillin FD, Dunn L, Upcroft JA, Miyamoto Y, Eckmann L. Impaired parasite attachment as fitness cost of metronidazole resistance in *Giardia lamblia*. *Antimicrobial Agents and Chemother.* 2011. 55:4643-4651 [文献 4.3.2.40]

Trinh S, Haggoud A, Reysset G. Conjugal transfer of the 5-nitroimidazole resistance plasmid pIP417 from *Bacteroides vulgatus* BV-17: characterization and nucleotide sequence analysis of the mobilization region. *J Bacteriol* 1996. 178:6671-6676 [文献 4.3.2.41]

Upcroft P, Upcroft JA. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *Clin Microb Rev.* 2001. 14:150-164 [文献 4.3.2.42]

van Amsterdam K, Bart A, van der Ende A. A *Helicobacter pylori* TolC efflux pump confers resistance to metronidazole. *Antimicrob Agents and Chemoter.* 2005. 49:1477-1482 [文献 4.3.2.43]

Wang G, Alamuri P, Maier RJ. The diverse antioxidant systems of *Helicobacter pylori*. *Molecular Microbiology.* 2006. 61:847-860 [文献 4.3.2.44]

Wenzel DG, Cosma GN. A model system for measuring comparative toxicities of cardiotoxic drugs with cultured rat heart myocytes, endothelial cells and fibroblasts. I. Emetine, chloroquine and metronidazole. *Toxicology*. 1984. 33:103-115 [文献 4.3.2.45]

Yamasaki K, Gallo RL. The molecular pathology of rosacea. *J Dermatol Sci*. 2009. 55:77-81 [文献 4.3.2.46]

## 目次

2.6.3.1	薬理試験：一覧表 .....	2
2.6.3.2	効力を裏付ける試験 .....	2
2.6.3.3	副次的薬理試験 .....	2
2.6.3.4	安全性薬理試験 .....	2
2.6.3.5	薬力学的薬物相互作用試験 .....	2

**2.6.3.1 薬理試験：一覧表**

該当資料なし

**2.6.3.2 効力を裏付ける試験**

該当資料なし

**2.6.3.3 副次的薬理試験**

該当資料なし

**2.6.3.4 安全性薬理試験**

該当資料なし

**2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験**

該当資料なし