

目次

目次	2
略語一覽	3
要旨	5
序文	6
目的	19
方法	20
結果	33
考察	66
結論	79
引用文献	80
謝辞	91

略語一覽

ABC	ATP-binding cassette
AUC	area under the curve
BCRP/Bcrp	breast cancer resistance protein
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
C_m	drug concentration in milk
$C_{m,lipid}$	drug concentration in lipid fraction of milk
$C_{m,skim}$	drug concentration in skim milk
$C_{m,unbound}$	unbound drug concentration in skim milk
C_p	drug concentration in plasma
$C_{p,unbound}$	unbound drug concentration in plasma
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
FBS	fetal bovine serum
f_m	unbound drug fraction in skim milk
$f_{m,total}$	fraction of drug free from binding to milk protein and lipid
f_p	unbound drug fraction in plasma
GFP	green fluorescent protein
HBSS	Hank's balanced salt solution

HEK	human embryonic kidney
KHBS	Krebs-Henseleit buffer solution
K_f	milk lipid-to-water partition coefficient
LC-MS/MS	liquid chromatography-tandem mass spectroscopy
MDCK	Madin-Darby canine kidney cell
MEM	minimum essential medium
M/P	ratio of drug concentration in milk to that in plasma
$M/P_{unbound}$	ratio of unbound drug concentration in milk to that in plasma
$M/P_{unbound,predicted}$	$M/P_{unbound}$ ratio predicted based on pH partition theory
mRNA	messenger ribonucleic acid
OCT/Oct	organic cation transporter
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
QSAR	quantitative structure activity relationship
<i>RID</i>	relative infant dose
SLC	solute carrier
SNP	single nucleotide polymorphism
TDLU	terminal duct lobar units
TEA	tetraethylanmonium

要旨

臨床データが限定される薬物の乳汁移行に関する基礎的情報を得るために、動物実験データからヒトへの外挿の妥当性、マウスにおけるトランスポーターの関与、さらにトランスポーターの寄与を考慮した新たなヒト乳汁移行予測法の検討を行った。その結果、薬物の乳汁移行には種差を認め、蛋白質や脂質濃度の違いや寄与するトランスポーターの種差が理由である点を実証した。ヒト乳汁への薬物移行予測には、動物実験による *in vivo* データよりも、ヒトで寄与の大きいトランスポーターである BCRP を考慮した *in vitro* データを用いることで、より精度の高い予測が可能である点を実証した。

序文

臨床における授乳婦の薬物療法

日常診療で母乳育児中の薬物使用に関する相談を受けることは少なくなく、母体が摂取した薬物などが母乳中に出ることは、広く一般に認識されている。乳児には不必要な薬物曝露であるため、予期しない影響を懸念して、「母乳の中止と代替療法による患者教育」や「授乳婦における薬物療法の制限」などが指導されてきた。こうした背景から臨床データは限定され、絶対的に情報が不足している。例えば日常診療で参照している添付文書においても、ヒトでデータが無い、あるいはごく少人数の乳汁移行データを根拠に「授乳回避」や「授乳婦への服薬禁忌」などの措置が一律に記載されているにすぎず、授乳婦に対する薬物治療の現場で、科学的に十分な根拠に基づく判断がなされているとは言い難い [1]。一方、近年では母乳育児の利点が数多く実証され、広く社会一般にも理解されてきたため [2]、母乳育児と薬物療法の両立を支援することの重要性は今後も高まっていくと考えられる。

薬物の乳汁移行における動物実験データの妥当性

母乳を介する乳児への薬物曝露のリスクを評価するためには、授乳婦が服用した薬物がどの程度乳汁中に分泌されるかを知ることが最低限必要であるが、上述のように臨床データを得ることは一般に困難な場合が多い。特に新薬の申

請データとして授乳婦での試験は課されないため、通常はこの情報がないまま動物試験データのみが唯一の判断材料となり、極端なケースでは実験動物で乳汁移行することを理由にヒトで母乳を回避するなどの措置が提示されている。

しかし、実際に動物実験データからヒトでの乳汁移行をどの程度外挿できているのか、また種差がどの程度あり、その差を生じるメカニズムについても十分な研究は行なわれておらず、従って動物実験データをヒトにおける乳汁移行データの代替として採用することの妥当性については、現時点でもなお不明なままである。加えて、昨今では動物福祉や愛護の観点から不必要な動物実験は避けられる風潮にあり、例えば EU 諸国において販売されている化粧品については、開発の過程で動物実験は全面禁止措置がとられている [3]。同様の問題は今後、薬の分野にも波及する可能性があり、ヒト臨床データを得にくいという理由のみから動物を用いた薬物の乳汁移行試験を安易に継続することへの科学的妥当性の検証、さらには動物を用いない何らかの代替予測法の開発が急務である。

乳汁を介する薬物の曝露量の算出と M/P 比

乳汁を介する乳児への薬物曝露量は、相対乳児摂取量 (Relative Infant Dose: RID) で算出され、乳児薬物摂取量を母体薬物摂取量で除した下式で示される。

$$\text{相対乳児摂取量} = \frac{\text{乳児薬物摂取量}(\text{mg} / \text{kg} / \text{day})}{\text{母体薬物摂取量}(\text{mg} / \text{kg} / \text{day})}$$

$$\text{乳児薬物摂取量} = \text{乳汁中薬物濃度} \times \text{母乳摂取量} (\text{ml} / \text{kg} / \text{day})$$

$$\text{M/P 比} = \text{乳汁中薬物濃度} / \text{血漿中薬物濃度}$$

RID <10%の薬物は、体重あたりの投与量が一般的な薬効を期待して服用する際の用量、すなわち常用量の 10%未満であることを意味し、小児の代謝解毒能力が大人と等しいと仮定した場合には曝露量の比較的少ない薬物と解釈され、授乳の可否を判断する際のひとつの目安となっている。一方で新生児期は肝臓の代謝解毒能力が大人に比べて未熟で、かつ発達の個人差も大きいこともよく知られ[4]、一律に RID が 10%未満であれば安全と見なすことができない点にも注意が必要である [5]。ここで乳児薬物摂取量は乳汁中薬物濃度と母乳摂取量 (通常 150 ml/kg/day) で決定され、極端には母乳摂取量を減らすことで乳児曝露量を少なくすることが可能である。乳児への安全を考えるならば授乳中止が簡便かつ確実であるが、母乳保育の利点を失う観点から必要のない制限は

避けるべきと考えられる。乳汁中薬物濃度は、血漿中薬物濃度に M/P 比 (Milk to Plasma ratio, 乳汁-血漿移行比) を掛けた値である。 M/P 比は乳汁中薬物濃度を血漿中薬物濃度で除した比率であり、薬物の乳汁移行性を予測することは、この比を予測することとほぼ同義である。

乳腺の解剖学的構造と妊娠・授乳に伴う変化

ヒト乳頭には 15-25 本の主乳管 (lactiferous duct) が独立して開口し、主乳管から 15-20 個の乳腺葉 (mammary lobule) に分岐する (Figure 1) [6]。乳腺葉はさらに小葉間乳管として分岐を繰り返し、終末乳管と終末細乳管からなる小葉単位 (terminal duct lobar units: TDLU) を形成して終わる (Figure 2-a) [7]。妊娠に伴い乳管上皮細胞が腺細胞と変化する。乳汁はここで小葉単位周囲の毛細血管網から血漿成分を取り込み合成され、管腔内に分泌される。ヒトより小さな哺乳動物では乳管腔構造のみだが、大きな哺乳動物は乳汁を蓄積するタンク (乳腺槽) を持つ [8]。

乳腺上皮細胞は基底膜と筋上皮細胞上にある一層の極性細胞で、乳腺上皮細胞の血管腔側は側底 (baso-lateral) 膜、対側の乳管腔側は頂端 (apical) 膜と呼ばれる (Figure 2-b) [7]。薬物など外因性物質の乳汁移行には、血管・間質細胞膜 - 基底膜 - baso-lateral 側細胞膜 - ゴルジ体膜 - apical 側細胞膜が一連の障壁となり、容易な乳汁への物質混入を防いでいる。なお細胞間隙は出産後 72 時間以内に強固に密着結合するため、低分子物質であっても授乳期には通過できない [7]。

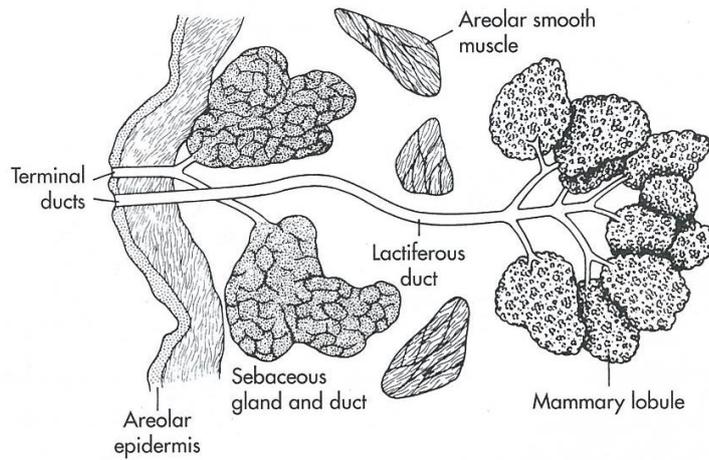


Figure 1. 乳腺の解剖学的構造 (文献 6 より引用)

乳汁は小葉単位周囲毛細血管の血漿成分から合成され乳管に分泌される. ヒトやマウスにはウシのように産生した乳汁を蓄積する腔所 (タンク) を持たない.

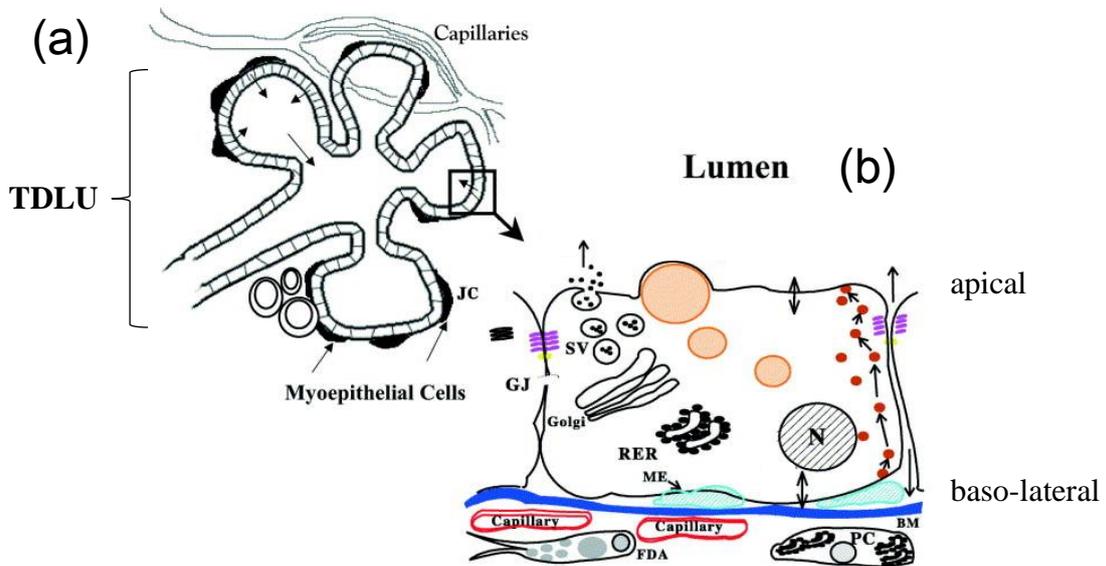


Figure 2. 極性を有する乳腺上皮細胞 (文献 7 より引用)

乳腺上皮細胞は基底膜と筋上皮細胞上にある一層の極性細胞である. 乳腺上皮細胞が乳汁の合成および分泌をつかさどる.

乳腺上皮細胞を通過するのは非結合型薬物のみである

薬物や内因性生理活性物質の多くは、乳腺上皮細胞の baso-lateral 側の細胞膜および apical 側の細胞膜を、濃度勾配に従う受動拡散により移動する (Figure 3)。受動拡散は化合物の物理化学的性質に従う対称性輸送である。ここで細胞膜を透過できるのは薬物分子のうち蛋白や脂質などの高分子に結合していない非結合型分子 (unbound 型) である [9]。非結合型分子はさらにイオン型と分子型 (非イオン型) から構成されるが、その構成比は薬物自身の pK_a と周辺溶液の pH に依存して決まる。一般に親水性のイオン型は膜を透過しにくく、疎水性である分子型が比較的自由に膜透過する。以上の機序をまとめると、一般に、1) 血漿中蛋白結合率の低い薬物ほど非結合型が多く、乳汁移行しやすいこと、2) 脂溶性の高い薬物は脂質二重層よりなる細胞膜を通過しやすいことに加え、乳汁中に存在する脂肪滴に分配してトラップされるため乳汁移行しやすいこと、さらに 3) 血漿の pH 7.4 に対して乳汁 pH は 6.8 - 7.2 と弱酸性に傾いており、塩基性薬物は乳汁側でより多くイオン型として存在してトラップされるため、結果として乳汁移行しやすいことが知られている。

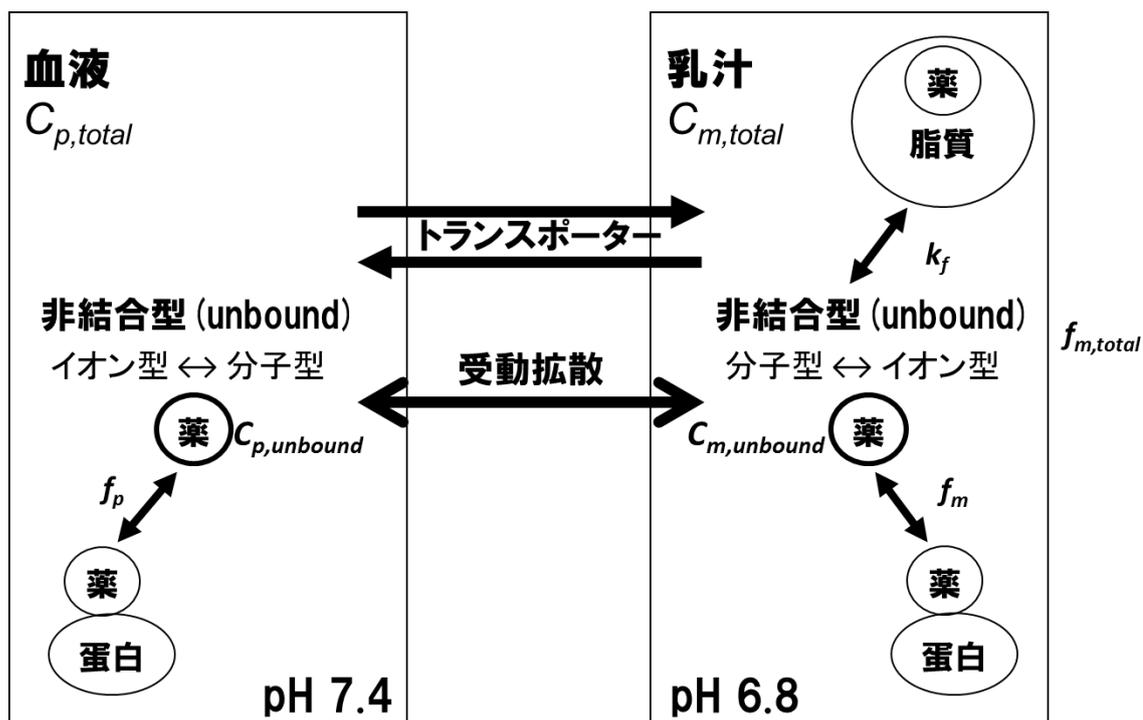


Figure 3. 血液と乳汁間における非結合型薬物の膜輸送

血液および乳汁中の蛋白や脂質などの高分子に結合していない非結合型薬物のうち、分子型が受動拡散により膜透過する。

薬物の受動拡散と pH 分配

M/P 比は上で述べた複数要因から成る値であり、以下の数式で表される。

$$M/P = C_m / C_p = (C_{m,unbound} / f_{m,total}) / (C_{p,unbound} / f_p) = (C_{m,unbound} / C_{p,unbound}) \times (f_p / f_{m,total})$$

右辺の $(f_p / f_{m,total})$ は血漿中の非結合型分率と乳汁中の非結合型分率の比を、また $(C_{m,unbound} / C_{p,unbound})$ は乳腺上皮細胞を介した血漿と乳汁中の非結合型濃度の比を表す。このうち $(f_p / f_{m,total})$ の項は血漿、および乳汁中での「高分子への結合・分配の程度」によって決まり、これら生体試料を用いた添加回収実験により *in vitro* での実測が可能である。一方、 $(C_{m,unbound} / C_{p,unbound})$ の項は「膜透過過程」を表し、主に受動拡散のみで移行する薬物では、弱酸性、弱塩基性薬物それぞれについて以下の式により予測可能である [9] [10] [11]。

$$\text{弱酸性薬物} \quad M / P_{unbound} = \frac{1 + 10^{(milkpH - pKa)}}{1 + 10^{(7.4 - pKa)}}$$

$$\text{弱塩基性薬物} \quad M / P_{unbound} = \frac{1 + 10^{(pKa - milkpH)}}{1 + 10^{(pKa - 7.4)}}$$

$$\text{中性薬物} \quad M / P_{unbound} = 1 \quad (pKa: \text{酸塩基解離定数})$$

加えて、一部の薬物では pH 分配のみでは薬物の乳汁移行が説明できず、非対称性輸送を担うトランスポーターの関与を想定すべき例も示唆されているが

(後述)、情報整理が十分でなく、この点を組み込んだ予測法も存在しない。従って、薬物の乳汁移行についてその予測精度を向上させるためには、関与するトランスポーター分子を同定し、基質薬物についてはその寄与も含めた予測を行なっていくことが必要である。

その他の乳汁移行の予測法

近年では定量的構造活性相関 (Quantitative Structure Activity Relationship: QSAR) や、*in silico* による乳汁移行性を予測する試みも施行されている。QSAR 解析では、蛋白結合や脂質への分配など化合物としての物理化学的性質と生物活性の関係を回帰分析により数式化し予測する方法であるが [12] [13]、古典的 QSAR 回帰式は予測値と実測値の差が大きく、臨床適応には不向きとされてきた [14]。一方、近年では QSAR ソフトを用いて 110 薬物の *M/P* 比を解析し、80%程度の精度の予測式が提唱されている [15]。*in silico* には、人工ニューラルネットワークやサポートベクターマシンといった人工知能による予測精度上昇も期待されている反面で、トランスポーターの寄与が数値化されておらず、予測エラーなど限界も指摘されている [16] [17]。

また pH 分配が瞬時平衡を仮定しているのに対し、実際には時間を要して移行する薬物も知られる。この位相の違いをクリアランスで説明した予測法も報告

されている [18]。血漿から乳汁への分泌クリアランスと乳汁から血漿への再吸収クリアランスを別々に定義し、これらを化合物の物性から予測することでヒトの *M/P* 比が約 72% で予測可能であったとする報告である。しかし、一部の薬物での過小過大評価や、そもそも予測対象としてトランスポーターの寄与が既知の薬物を含めていないなど、汎用性という点で未だ不十分である。

乳腺におけるトランスポーター発現

生体はその進化の中で多様な外来異物防御とともに、内因性物質やその代謝物濃度の厳密な調整のために、様々な異物解毒システムを発達させてきた。代謝酵素と並び一連の薬物トランスポーターはこうした解毒システムの一つであり、極めて分子種が多く、個々のトランスポーターの基質選択性も広範囲である。薬物トランスポーターは大きく ABC (ATP-binding cassette) トランスポーターと、SLC (solute carrier) トランスポーターに分けられる。ABC トランスポーターは細胞内の ATP の加水分解エネルギーを使用して、物質を細胞内から外へ排出する膜蛋白質である。一方で SLC トランスポーターは促進拡散、あるいはイオンや化合物との共輸送・対向輸送により基質の細胞内取り込み、排出に働く (Figure 4) [19]。

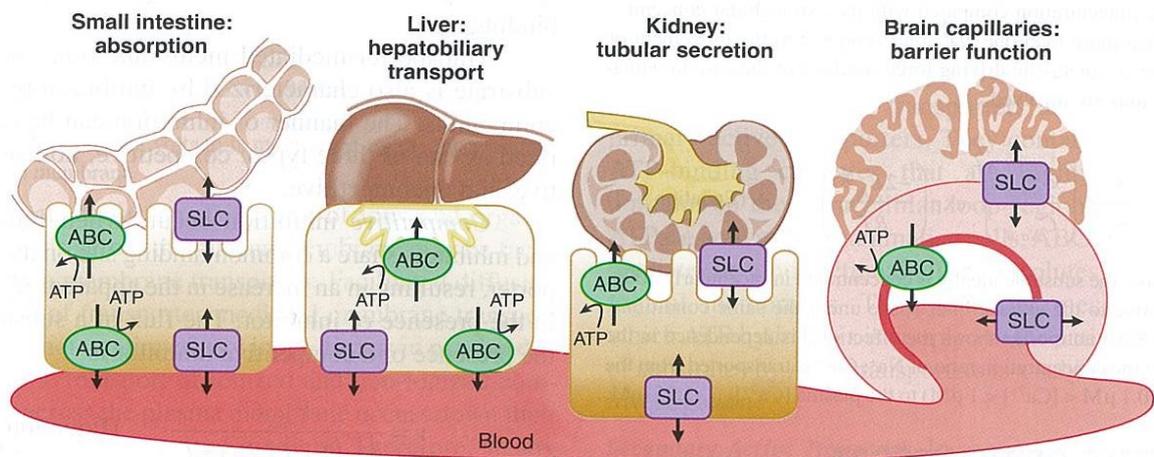


Figure 4. トランスポーターを介する方向性輸送 (文献 18 より引用)

上皮細胞や内皮細胞を介した方向性輸送は、輸送駆動力の異なる ABC, SLC トランスポーターが異なる膜に配置されていることで実現されている

乳腺におけるトランスポーター発現に関しては、数は限られているもののいくつかの報告がなされている [20] [21] [22]。ヒト乳腺では Table 1 に示すように、授乳期における各種トランスポーターの mRNA レベルでの発現増減の報告がなされている。このうち薬物の乳汁移行への関与が最も明確なものは BCRP/ABCG2 (breast cancer resistance protein/ATP-binding cassette G2) である。BCRP は ABC トランスポーターの一種で、腸管や肝臓、腎臓、脳毛細血管内皮細胞など広く全身の極性細胞に発現し、腸管、肝臓、腎臓ではそれぞれ腸管管腔側、胆管側、尿細管管腔側、脳毛細血管内皮細胞では血管側に発現し、細胞内から細胞外への基質のくみ出しに関与する [23] [24]。ヒトを含めた多くの動物種で授乳期に乳腺上皮で誘導を認め、かつその局在は乳管腔側、すなわち分

泌側に位置している [25]。実際にシメチジンやニトロフラントインなどの薬物、リボフラビンやビオチンなどのビタミン類、Aflatoxin B₁ などの発がん物質がその基質となり乳汁中に積極的に分泌され、ノックアウトマウスではその分泌が著しく低下することが明らかとなっている [26] [27]。

BCRP 以外にも、授乳期に誘導されるトランスポーターとしてカチオン性薬物を基質とする Organic Cation Transporter (OCT)1 / SLC22A1 や、Peptide Transporter (PEPT)1 / SLC15A1、Concentrative Nucleotide Transporter (CNT)1 / SLC28 などが知られるが [21] [28] [29]、これらが実際どの程度寄与するかについて、ヒトはもとより実験動物においても検証された報告はない。

授乳期に発現増加		授乳期に発現増加・減少がみられない		授乳期に発現減少		授乳期・非授乳期ともに発現していない	
BCRP	(ABCG2)	OATP-A	(SLCO1A2)	MDR1	(ABCB1)	OCT2	(SLC22A2)
OCT1	(SLC22A1)	OATP-B	(SLCO2B1)	OCTN2	(SLC22A5)	OAT1	(SLC22A6)
OCTN1	(SLC22A4)	OATP-D	(SLCO3A1)	OCT3	(SLC22A3)	OAT2	(SLC22A7)
PEPT2	(SLC15A2)	MRP2	(ABCC2)	MRP1	(ABCC1)	OAT3	(SLC22A8)
CNT1	(SLC28A1)	MRP5	(ABCC5)	PEPT1	(SLC15A1)	OAT4	(SLC22A11)
CNT3	(SLC28A3)	ENT1	(SLC29A1)	OATP-E	(SLCO4A1)	OATP-C	(SLCO1B1)
ENT3	(SLC29A3)					MRP3	(ABCC3)
NCBT1	(SLC23A1)					MRP4	(ABCC4)
						CNT2	(SLC28A2)
						ENT2	(SLC29A2)
						NCBT2	(SLC23A2)

Table 1. ヒト乳腺における薬物トランスポーター発現 (文献[19] [20] [24]をもとに作成)

mRNA レベルにおけるヒト乳腺トランスポーター発現を示す。このうち蛋白質レベルでの発現増加が確認されているのは、BCRP のみである。

目的

以上のような背景から、本研究ではヒトにおける薬物の乳汁移行予測精度を改善することを目的とし、以下に掲げた項目順に検討を行った。

1. 薬物乳汁移行に関するヒト-マウス間の網羅比較と相違を生じる要因分析
2. 薬物乳汁移行へのトランスポーター関与～各種ノックアウトマウスを用いた解析
3. ヒトにおけるトランスポーターの薬物乳汁移行への寄与と予測精度改善への応用

方法

検討薬物の選択とヒト乳汁移行データの取得

ヒトとマウスの薬物乳汁移行を比較するために、以下の手順に従い検討対象とする薬物を選択した。すなわち、ヒトにおける薬物の乳汁移行に関する 300 余の先行研究 [18]から AUC (曲線下面積) でのヒト M/P 比が算出可能であった 65 薬物を同定し、ヒト $M/P(AUC)$ データとした [18]。次に麻薬や放射性物質を除き、標準物質が入手可能で、液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析装置 (liquid chromatography-tandem mass spectroscopy: LC-MS/MS) にて測定可能な 32 薬物を選出した。この 32 薬物について、サンプル前処理方法や LC-MS/MS 測定時の移動相、さらに薬物間相互作用を回避するなどの観点から 5 群に振分け、次に述べる方法でマウスにおける乳汁移行データを取得した (Table 2)。

グループ名				
A	B	C	D	E
atenolol	acyclovir	chloramphenicol	metformin	acetaminophen
cephapirin	cefotaxime	cimetidine	nitrofurantoin	alprazolam
clindamycin	cephalothin	labetalol	propylthiouracil	caffeine
disopyramide	fluconazole	moclobemide	verapamil	diltiazem
metoprolol	metronidazole	propranolol		nitrazepam
prednisolone		trazodone		praziquantel
mirtazapine				theophylline
quetiapine				
terbutaline				
triprolidine				

Table 2. 検討薬剤一覧

ヒト $M/P(AUC)$ データの文献値がある 65 薬物のうち、除外基準などにより 32 薬剤を 5 群に分けて検討薬剤とした。

マウス乳汁移行データ

全ての動物実験は、東京大学大学院医学系研究科動物実験委員会による承認を受けた動物実験計画に基づいて行った。

マウス乳汁移行データは、定常状態における搾乳実験モデルを新たに構築して取得した。すなわち、野生型妊娠マウス（ddY 系統，初産，交配時 9 週齢，妊娠 14 日目）（日本 SLC 社，Hamamatsu, Japan）を購入し、妊娠期・授乳期ともに同一の食餌（特殊繁殖用 CMF 飼料，水分摂取自由）（オリエンタル酵母社，Tokyo, Japan）および温度・湿度・照明等一定環境下で個体ごとに母仔同ケージにて飼育した。出産 4 日目に仔マウスを 8 匹に調整した。出産 14 日目に浸透圧ポンプ（ALZET[®] 1003D, Durect 社, California）のマウス腹腔内埋め込み術を施行した。浸透圧ポンプは 72 時間放出型で、薬液放出速度は $0.95 \pm 0.02 \mu\text{l/hr}$ であった。ポンプ 1 個に対し 1-7 薬物を 50%DMSO もしくは水を溶媒として溶解し、個体ごとに 1-3 カプセル埋め込んだ。薬物は Table 2 に示す 5 群に分け、各群につき 3-6 匹のマウスを用いた。手術後は直ちに母仔共に同ケージに戻し、飼育を継続した。手術 60 時間後、一定条件下での乳汁および血漿サンプル採取を行った。即ち、実験 8 時間前に母仔マウスを分離し、オキシトシン 1 単位を皮下注射したのち、エーテル麻酔下に小動物用搾乳機（Automatic Milker[®] WAT-2008, リトルレオナルド社, Tokyo, Japan）を吸引圧 140mmHg, 吸引頻度 60 回/分にて

使用し、用手マッサージ下に 10 乳首を順に搾乳して得た乳汁を合わせて乳汁サンプルとした。また搾乳終了後直ちに頸静脈から血液を採取・遠心し、ヘパリン血漿を得た。こうして得たサンプルは採取直後に液体窒素を用い瞬時冷却し、測定時まで-80℃で保管した。

非結合型分率の分析および薬物濃度測定

ヒト血漿中非結合型分率は DrugBank データベース(<http://www.drugbank.ac/>)を参照し、それ以外の非結合型分率は添加回収実験により実測した。すなわち、マウス血漿非結合型分率の実測には、薬液 (1 μM) を添加したマウスブランク血漿を、界面活性剤 (Tween 20, SDS, Triton X-100) で前処理した限外濾過フィルター Nanocep 10K Omega[®] (Pall 社, New York) にて遠心し、濾液を得る限外濾過法を用いた。ヒト・マウス乳汁非結合型分率の実測にも限外濾過法を用いた。すなわち、薬液 (1 μM) を添加したヒト/マウスブランク乳汁を遠心後、液体窒素を用いて瞬時冷却し、上層に分離した脂質部分を切離除去し、脱脂乳分画を得た。この脱脂乳分画を上と同様の前処理を施した限外濾過フィルターにて遠心し濾液を得た。なおヒトブランク乳汁の採取等に当たっては、東大病院に児が入院中の授乳婦のなかで、過去 72 時間以内に薬物服用をしていない健常授乳婦から文書にて同意を得て乳汁を採取した。また採取にあたっては東京大

学医学部倫理委員会による承認のもと行なった。

蛋白および脂質含有割合の測定

血漿および乳汁中蛋白濃度測定には Pierce BCA Protein Assay kit[®] (Thermo Fisher Scientific 社, Illinois) による BCA アッセイ法を用い、メーカー推奨プロトコールに従い定量した。また乳汁中脂質の割合の指標として、クレマトクリット値を用いた。クレマトクリット値は、毛細管に乳汁を満たし 13,000 g, 10 分間遠心して脂質と脱脂乳に分離したのち、全乳汁長で脂質層長を除いた割合として求めた。

LC-MS/MS による薬物濃度の定量

全ての薬物濃度測定には LC-MS/MS 装置を使用し、各薬物の標準物質を用いた検量線を作成し定量した。LC-MS/MS 装置は東大病院薬理動態学寄付講座に設置された Quattro Premier XE[®] タンデム四重極型質量分析装置 (Waters 社, Massachusetts) を使用した。Quattro Premier XE[®] はエレクトロスプレーイオン化法のポジティブモード、multiple reaction-monitoring (MRM) モード、オープン電圧 40°C、イオン化電圧 1kV において Table 3 に示す条件で測定した。カラムには C18 分析カラム (ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 1.7- μ M, 2X100-mm, Waters

社) を使用した。移動相は 0.1%ギ酸を含む水-アセトニトリルもしくは水-メタノールを使用し、流速は 0.3mL/min にて分離した。データ解析は MassLynx software (Version 4.1)を用い、サンプルピークのエリアより検量線法によって濃度を算出した。各サンプル前処理として血漿は 10 倍量のアセトニトリルによる除蛋白処理を行い、上清をスピードバックにて乾固したのち、40%希釈アセトニトリルにて再溶解した。乳汁では同様の除蛋白処理に加え、再溶解後に 0.5 倍量のヘキサンを用いた除脂質を行った。内部標準物質にはカルバマゼピン (500 nM) を使用した。

Drug	Mouse-Pump ^a	Dose (mg/kg/day)	Drug conc. in the pump (mM)	Solvent in the pump	Filter pretreatment ^b	recovery rate (%)			Gradient program	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)	Parent mass (m/z)	Daughter mass (m/z)
						plasma	milk	unbound					
acetaminophen	A-1	0.91	10	50% DMSO	5% Tween-20	90	73	123	I	37	16	151.96	109.9
acyclovir	D-1	4.00	30	50% DMSO	5% SDS	88	78	99	I	21	16	226.08	152.0
alprazolam	A-1	0.55	3	50% DMSO	5% Tween-20	94	80	109	I	41	42	309.03	204.8
atenolol	C-1	20.0	125	50% DMSO	5% Triton X-100	73	52	113	I	25	34	267.12	144.9
caffeine	A-1	1.17	10	50% DMSO	5% Tween-20	59	72	87	I	29	20	194.91	138.0
cefotaxime	D-2	306	1120	Water	5% SDS	75	38	126	I	23	16	455.99	324.0
cephalothin	D-3	11.9	50	50% DMSO	5% SDS	107	35	128	I	33	12	394.68	366.7
cephapirin	C-2	4.08	16	50% DMSO	5% Triton X-100	69	40	96	I	27	16	424.00	292.0
chloramphenicol	B-1	1.15	6	Water	5% Tween-20	119	59	98	I	15	18	322.95	275.0
cimetidine	B-1	2.65	18	Water	5% Tween-20	68	60	95	I	27	16	253.06	116.9
clindamycin	C-3	10.2	40	Water	5% Triton X-100	91	92	125	I	39	22	425.11	377.1
diltiazem	A-1	9.94	40	50% DMSO	5% Tween-20	115	64	96	I	35	26	415.06	369.9
disopyramide	C-2	10.2	50	50% DMSO	5% Triton X-100	105	85	100	I	25	18	340.15	239.1
fluconazole	D-3	11.0	60	50% DMSO	5% SDS	92	82	85	I	25	17	307.32	220.0
labetalol	B-1	87.4	443	Water	5% Tween-20	84	87	113	I	25	34	329.09	161.8
metformin	E-1	4.65	60	50% DMSO	5% Tween-20	93	70	100	II	23	12	129.90	60.1
metoprolol	C-1	48.1	300	50% DMSO	5% Triton X-100	89	76	105	I	33	28	268.18	159.0
metronidazole	D-3	10.3	100	50% DMSO	5% SDS	58	56	105	I	23	14	171.93	127.9
mirtazapine	C-1	7.98	50	50% DMSO	5% Triton X-100	80	74	48	I	37	42	266.12	194.8
moclobemide	B-1	0.15	1	Water	5% Tween-20	76	91	53	I	27	20	269.04	181.9
nitrazepam	A-1	0.72	4	50% DMSO	5% Tween-20	80	80	57	I	41	22	282.05	236.0
nitrofurantoin	E-1	0.30	2	50% DMSO	5% Tween-20	40	40	69	II	29	18	238.88	121.8
praziquantel	A-1	0.63	3	50% DMSO	5% Tween-20	89	88	108	I	31	18	313.16	203.0
prednisolone	C-1	2.16	10	50% DMSO	5% Triton X-100	109	71	115	I	28	10	361.52	147.0
propranolol	B-1	45.4	292	Water	5% Tween-20	88	65	75	I	35	17	260.33	115.9
propylthiouracil	E-1	1.02	10	50% DMSO	5% Tween-20	89	72	85	II	41	16	171.10	153.9
quetiapine	C-1	20.7	90	50% DMSO	5% Triton X-100	88	86	18	I	41	42	384.13	252.8
terbutaline	C-2	2.04	15	50% DMSO	5% Triton X-100	60	54	84	I	25	34	226.14	106.9
theophylline	A-1	1.08	10	50% DMSO	5% Tween-20	91	63	86	I	41	18	180.99	124.0
trazodone	B-1	11.7	52	Water	5% Tween-20	97	89	103	I	49	26	372.07	237.1
triprolidine	C-2	1.50	9	50% DMSO	5% Triton X-100	84	96	95	I	23	16	279.18	208.1
verapamil	E-1	10.9	40	50% DMSO	5% Tween-20	99	62	82	II	47	30	455.18	164.9
carbamazepine (IS)				-	-	92	86	93	-	30	19	237.23	194.0

Table 3. 浸透圧ポンプ実験における薬物量および LC-MS/MS 条件

- a- マウスは 5 群 (A から E) に分け, 薬物を含む浸透圧ポンプを個体あたり 1 から 3 個埋め込んだ.
- b- 限外濾過フィルターには非特異的吸着を防ぐ目的で, 界面活性剤前処理を施した.

IS: 内部標準物質

各パラメータの算出式

以下の計算式を用いて、各種薬物動態パラメータを算出した。

血漿中総濃度 C_p

乳汁中総濃度 C_m

血漿中非結合型濃度 $C_{p,unbound}$

乳汁中非結合型濃度 $C_{m,unbound}$

脱脂乳中濃度 $C_{m,skim}$

血漿中非結合型分率 $f_p = C_{p,unbound} / C_{p,total}$

乳汁中非結合型分率 $f_{m,total} = C_{m,unbound} / C_{m,total}$

脱脂乳中非結合型分率 $f_m = C_{m,unbound} / C_{m,skim}$

乳汁中脂質 - 水分配係数 $K_f = C_{m,lipid} / C_{m,unbound}$

乳汁脂質中濃度 $C_{m,lipid} = \frac{C_m - C_{m,skim} \times (1 - Crematocrit \times 10^{-2})}{Crematocrit \times 10^{-2}}$

総乳汁血漿移行比 $M / P = C_m / C_p$

非結合型乳汁血漿移行比 $M / P_{unbound} = M / P \times \frac{f_{m,total}}{f_p}$

非結合型乳汁血漿移行比予測値

弱酸性薬物 $M / P_{unbound\ predicted} = \frac{1 + 10^{(milk\ pH - pKa)}}{1 + 10^{(7.4 - pKa)}}$

弱塩基性薬物 $M / P_{unbound\ predicted} = \frac{1 + 10^{(pKa - milk\ pH)}}{1 + 10^{(pKa - 7.4)}}$

ノックアウトマウス

トランスポーターの寄与を野生型マウスと比較する目的で、ノックアウトマウスを用いた実験を計画した。Bcrp ノックアウトマウス (Bcrp KO マウス) ならびに Oct1/2 ダブルノックアウトマウス (Oct1/2 DKO マウス) は Taconic 社 (New York) より購入し、野生型マウスと同様に食餌および飼育環境下にて自家繁殖して使用した。なお本研究を実施する時点で、Oct1 あるいは Oct2 単独ノックアウトマウスは商品化されておらず入手困難であることから、本研究では Oct1/2 DKO マウスを選択した。個体ごとに PCR による genotyping を行い、ホモ動物であることを確認の上実験に使用した。これらノックアウトマウスに対応する野生型マウスとして、FVB 系統を使用した。妊娠判明後にマウスは個体ごとに 1 つのケージに収容し、出産後は母仔同ケージにて飼育した。

ノックアウトマウスを用いた輸送実験プロトコールは、前記の浸透圧ポンプを用いた実験と同様に行った。ただし、ノックアウトマウスを用いた輸送実験では、競合阻害の可能性を排除するために 1 個体への同時投与を避け、1 薬物あたり 1 ポンプ、1 個体とした。測定結果の検定には IBM SPSS[®] (日本アイ・ビー・エム社, 東京) を用い、各群間における野生型マウスとノックアウトマウスを比較した T 検定を行った。

定量的リアルタイム PCR

マウス乳腺より、メーカー推奨プロトコールに従って total RNA を抽出したのち、Rever Tra Ace[®] (東洋紡ライフサイエンス, Osaka, Japan) を用いて逆転写反応を行って cDNA を得た。このサンプルを用いた mRNA 発現量の定量は、SYBR Green ER qPCR Supermix Universal[®] (Life Technologies 社, California) による定量的 PCR 反応を Echo Real-Time PCR system[®] (Illumina 社, California) にて検出し、付属ソフトウェアを用いて解析した。遺伝子発現の定量に用いたプライマーは以下の通りである。

マウス Bcrp:

Forward 5'-CAT CAG CCT CGG TAT TCC AT-3'

Reverse 5'-AAT CCG CAG GGT TGT TGT AG-3'

マウス Oct1:

Forward 5'-CAG GTT TGG CCG TAA GCT CT-3'

Reverse 5'-GCA ACA TGG ATG TAT AGT CTG GG-3'

マウス Oct2:

Forward 5'-TGC TGG ACC TGT TTC AGT CAT-3'

Reverse 5'-CTG TCT GCT AGG TAA CCA ATG C-3'

マウス Oct3:

Forward 5'-CTA TGC AGC GGA CAG ATA TGG-3'

Reverse 5'-AGC GGA AAA TCA CAA ACA CAG AA-3'

β -actin:

Forward 5'-CCC GAA GGA AAA CTG ACA GC-3'

Reverse 5'GTG GTG GTG AAG CTG TAG CC-3'

各々の mRNA 発現量は β -actin 発現量により規格化して表示した。

OCT 定常発現系細胞を用いた細胞内取り込み実験

マウス Oct1, マウス Oct2, マウス Oct3, ヒト OCT1, ヒト OCT2, ヒト OCT3 を HEK293 細胞に安定発現させたもの、および MOCK ベクターを組み込んだ HEK 細胞については東京大学薬学部分子薬物動態学教室の楠原洋之教授より供与を受けた。細胞の培地は low glucose DMEM 培地 Gibco[®] (life technologies 社, California) に 10 % fetal bovine serum (FBS) および 100 μ g/mL Penicillin-streptomycin を添加したものをを用い、37°Cの 5%CO₂ インキュベータ内で培養した。

薬物取り込み実験には、予め L-リシンと L-オルニチンによりコーティングを行った 12 ウェルを使用した。各ウェル 4×10^5 となるよう各細胞を播種し、48

時間培養後、酪酸ナトリウム (5 mM) を添加し外来遺伝子の発現を増加させ、さらに 24 時間培養後に取り込み実験を行った。Krebs-Henseleit buffer solution (KHBS) に溶解した各薬物を 10 μ M 濃度にて各ウェルに添加し、5 分後に冷却 buffer で十分に洗浄した。また各薬物と同時に Oct 基質である TEA (テトラエチルアンモニウム) 5 mM を添加し、競合阻害に伴う取り込み低下を確認した。

細胞を回収後、超音波により破砕し、遠心した上清をサンプルとした。サンプルに 2 倍量のアセトニトリルを添加して除蛋白処理を行い、スピードバックにより乾固した後、40%アセトニトリルにて再溶解し、LC-MS/MS による薬物濃度測定を行った。内部標準物質にはカルバマゼピン (500 nM) を使用した。また同時に蛋白定量を行い、細胞回収率のウェル間補正を行った。なお測定結果の検定には IBM SPSS[®]を用いた分散分析 (ANOVA) を行い、Tukey 法による多重比較を行った。

トランスポーターを考慮したヒトにおける乳汁移行予測精度の改善

$M/P_{unbound}$ の予測値および実測値

$M/P_{unbound}$ の予測値には、前述の pH 分配式から算出される予測値を使用した。なお milk pH は 6.8-7.2 で計算し、 pK_a は計算ソフトウェアである MarvinSketch program (ChemAxon 社, Budapest, Hungary) による計算値を使用した。また

$M/P_{unbound}$ の実測値は、 $M/P_{unbound} = M/P \times \frac{f_{m, total}}{f_p}$ から算出した。ここで M/P 値は

ヒト臨床データのうち AUC (曲線下面積) として M/P 比が計算されている

Koshimichi らの報告 [18]に加え、それ以外も含めて広く文献、書籍等から収集

を行い [30]、報告に幅のあるデータについては平均値を採用した。ヒト f_p 値は

DrugBank データベース (<http://www.drugbank.ac/>) を参照した。さらにヒト $f_{m, total}$

値はヒト乳汁を用いた実測値、あるいは f_p と $\log D$ (分配係数) を用いて過去の

回帰式に従って算出した [10] [11]。

なお、 $M/P_{unbound}$ の予測値 ($M/P_{unbound, predicted}$) と観察値 ($M/P_{unbound, observed}$) の比

($M/P_{unbound} ratio$) をとることで、pH 分配による影響を消去した。すなわち、ト

ランスポーターの関与がない場合この値は 1 となり、また非対称輸送により積

極的に乳汁に分泌される場合は 1 を超える値となる。

$$M/P_{unbound} ratio = \frac{M/P_{unbound observed}}{M/P_{unbound predicted}}$$

BCRP 高発現極性細胞を用いた輸送活性評価

極性細胞であるイヌ腎尿細管上皮細胞由来の MDCK II 細胞にヒト BCRP を高

発現させた系を用いて、薬物の経細胞輸送実験を行った。MDCKII 細胞は MEM

培地に 10% FBS、100 倍希釈した非必須アミノ酸溶液、および 100 $\mu\text{g/mL}$

Penicillin-streptomycin を添加し、37°C の 5% CO_2 インキュベータ内で培養した。

実験には 24 ウェル規格の Transwell (3.0 μ m 孔) (Becton, Dickinson and company, New Jersey) を使用した。各 Transwell に 2×10^5 となるよう MDCK II 細胞を播種し、72 時間培養したのちに、50 Moi (multiplicity of infection) となるようアデノウイルス液を感染させた。アデノウイルス液としては、ヒト BCRP をサブクローニングしアデノウイルスに組み込んで精製したヒト BCRP アデノウイルス液を用いた。また陰性対照アデノウイルスとして、GFP を組み込んだ GFP アデノウイルス液を使用した。感染 48 時間後に、HBSS バッファーを用いて平衡化したのちに輸送実験を行った。Transwell の上槽または下槽に 10 μ M となるよう HBSS で希釈した薬液を添加後、再度 37 $^{\circ}$ C に戻し、60 分、120 分、180 分後に反対側の槽からサンプルを採取した。サンプルは 10 倍量のアセトニトリルにより除蛋白処理を行い、スピードバックによる乾固後に 40%アセトニトリルにて再溶解し、LC-MS/MS による薬物濃度測定を行った。内部標準物質にはカルバマゼピン (500 nM) を使用した。測定結果は IBM SPSS[®] を用いて検定し、各群間における efflux ratio に関して T 検定を行った。

結果

総乳汁移行比 M/P 値の種差の検討 (Table 4.および Figure 5)

32 薬物のうち 27 薬物において、マウス血漿および乳汁中薬物濃度が測定可能であり、この結果をもとに、各薬物の乳汁移行比 M/P を算出した (Table 4)。残り 5 薬物 (セファロチン、セファピリン、ミルタザピン、ニトロフラントイン、プレドニゾロン) については血漿、乳汁のいずれか、あるいは両方で薬物濃度が定量限界以下であった (Table 4)。27 薬剤中 21 薬剤において、 M/P はマウスのほうがヒトよりも高値であり、その比は 2.03 (95%信頼区間, 1.42-2.89) であった。ヒトと比較してマウスのほうが高い薬物としては、ジルチアゼム (3.3 倍)、メトホルミン (7.7 倍)、プラジカンテル (5.9 倍)、テルブタリン (8.7 倍)、プロピオチオウラシル (45.6 倍) などであった。また、マウス M/P は最小値 0.20 (セフォタキシム) から最大値 13.3 (テルブタリン)、ヒト M/P は最小値 0.08 (セフォタキシム) から最大値 4.18 (シメチジン) であった。アシクロビルやシメチジンはマウス *Bcrp* 基質となり乳汁中に積極的に分泌されることが知られており (アシクロビル $M/P=1.3$, シメチジン $M/P=13.7$ [26])、今回の結果で得られた値もこれらに近い値 (それぞれ 4.3, 10.3) であり、埋め込み型浸透圧ポンプを用いた本実験系によりトランスポーターの関与する非対称性の薬物乳汁分泌を評価できることが確認できた。

Table 4. ヒトおよびマウスにおける M/P 値および $M/P_{unbound}$ 値

Drug	Observed concentration in mouse (nM)				M/P					M/P _{unbound}				Major functional group		M/P _{unbound,predicted}		
	C_p	±SD	C_m	±SD	n	mouse	±SD	human ^a	±SD	Ratio	mouse	±SD	human	Ratio	Acidic / Basic	pKa	pH6.8	pH7.2
acetaminophen	39	20	37	6.9	6	1.16	0.51	1.24	0.15	0.93	0.81	0.36	1.35	0.60	Acidic	9.5	0.99	1.00
acyclovir	112	21	430	373	6	4.21	4.04	1.58		2.66	3.20	3.07	1.64	1.95	Basic	9.35	3.95	1.58
alprazolam	31	16	40	26	6	1.32	0.35	0.46		2.85	1.57	0.41	1.48	1.06	Basic	2.6	1.00	1.00
atenolol	894	312	1659	1321	5	1.99	1.36	3.12		0.64	2.53	1.74	3.75	0.68	Basic	9.75	3.97	1.58
caffeine	321	197	282	166	6	0.90	0.11	0.71	0.21	1.25	1.10	0.14	1.03	1.07	Basic	0.8	1.00	1.00
cefotaxime	1010	1098	201	280	6	0.20	0.22	0.08	0.03	2.63	0.13	0.14	0.13	1.03	Basic	11.5	3.98	1.58
cephalothin	50	24	-		6	-		0.15		-	-		0.26	-	Acidic	2.4	0.25	0.63
cephapirin	-		-		6	-		0.15		-	-		0.25	-	Acidic	2.67	0.25	0.63
chloramphenicol	48	29	30	15	6	0.80	0.54	0.50	0.17	1.62	0.71	0.48	0.90	0.78	Basic	5.5	1.04	1.01
cimetidine	116	66	898	116	6	10.33	5.68	4.18	1.85	2.47	6.42	3.53	4.51	1.42	Basic	6.8	1.60	1.12
clindamycin	43	31	20	16	6	0.69	0.81	0.94		0.73	1.20	1.41	11.39	0.11	Basic	7.72	3.02	1.40
diltiazem	23	14	61	36	6	3.29	2.20	0.99		3.33	6.20	4.14	2.00	3.09	Basic	7.7	2.99	1.39
disopyramide	461	237	790	534	5	1.78	1.11	2.82		0.63	1.40	0.88	5.69	0.25	Basic	8.36	3.69	1.53
fluconazole	4105	560	3574	1152	6	0.86	0.17	0.87		0.99	0.85	0.17	0.70	1.22	Basic	1.81	1.00	1.00
labetalol	1583	796	1973	481	6	1.46	0.53	1.01		1.44	1.15	0.42	1.24	0.92	Basic	7.57	2.78	1.35
metformin	361	173	1317	672	6	3.68	1.21	0.48	0.12	7.70	4.35	1.43	0.52	8.39	Basic	12.4	3.98	1.58
metoprolol	217	157	514	379	5	2.98	3.09	2.79		1.07	3.14	3.26	2.95	1.06	Basic	9.7	3.97	1.58
metronidazole	825	162	701	182	6	0.87	0.28	0.91		0.97	1.38	0.44	0.79	1.75	Basic	2.6	1.00	1.00
mirtazapine	-		31	24	4	-		0.97		-	-		2.51	-	Basic	7.61	2.84	1.36
moclobemide	3.6	2.9	2.9	1.7	6	1.41	1.55	0.61		2.32	1.00	1.10	0.89	1.12	Basic	6.3	1.22	1.04
nitrazepam	165	94	119	56	6	0.79	0.28	0.40		1.95	0.36	0.13	1.52	0.24	Basic	11	3.98	1.58
nitrofurantoin	-		82	28	6	-		6.29		-	-		11.71	-	Acidic	7.2	0.54	0.77
praziquantel	2.3	2.1	2.1	1.1	6	1.42	1.05	0.24	0.09	5.87	0.96	0.71	0.60	1.61	Neutral	-	1.00	1.00
prednisolone	39	23	-		6	-		0.13	0.06	-	-		1.35	-	Neutral	-	1.00	1.00
propranolol	755	397	655	154	6	1.06	0.46	0.39	0.28	2.72	2.41	1.05	1.55	1.55	Basic	9.45	3.95	1.58
propylthiouracil	162	84	795	273	3	5.84	3.84	0.13		45.6	1.06	0.70	0.50	2.14	Acidic	7.8	0.79	0.89
quetiapine	20	10	21	11	6	1.11	0.33	0.36		3.06	1.98	0.59	0.67	2.93	Basic	3.3	1.00	1.00
terbutaline	16	8	146	93	5	13.34	12.20	1.54	0.05	8.68	13.17	12.04	1.63	8.05	Basic	9.4	3.95	1.58
theophylline	480	257	464	455	6	0.85	0.29	0.64		1.33	0.64	0.22	1.07	0.60	Acidic	8.77	0.97	0.98
trazodone	716	485	98	59	6	0.20	0.15	0.14		1.42	0.45	0.33	0.36	1.24	Basic	6.14	1.16	1.03
triprolidine	11.2	9.2	6.9	4.4	6	0.77	0.49	0.77		1.00	0.54	0.35	1.55	0.35	Basic	3.6	1.00	1.00
verapamil	108	60	100	61	6	0.95	0.45	0.87		1.10	0.33	0.15	1.91	0.17	Basic	9	3.91	1.57

血漿中(C_p) および乳汁中(C_m) 濃度の平均値と標準偏差を示す(n=3-6) .

M/P 値は個々のマウスにおける M/P 値を算出後に平均化した.

a- ヒト M/P 値は Koshimichi らの報告値 [18]を参照した.

Table 5. ヒトおよびマウスにおける蛋白，脂質分配に関連する各パラメータ値

Drug	f_p			$f_{m,total}$				f_m				K_f			
	mouse	±SD	human	mouse	±SD	human	±SD	mouse	±SD	human	±SD	mouse	±SD	human	±SD
acetaminophen	0.66	0.06	0.75	0.46	0.04	0.82	0.05	0.40	0.04	0.82	0.05	0.46	1.84	1.43	2.11
acyclovir	1.03	0.14	0.79	0.78	0.03	0.82	0.07	0.84	0.05	0.93	0.04	1.70	0.55	4.26	1.05
alprazolam	0.21	0.05	0.20	0.25	0.03	0.64	0.03	0.29	0.02	0.73	0.03	7.18	2.57	5.94	0.82
atenolol	0.86	0.04	0.89	1.10	0.11	1.07	0.15	0.99	0.03	0.97	0.05	0.49	0.45	1.32	3.79
caffeine	0.82	0.11	0.70	1.01	0.25	1.00		0.55	0.02	0.96		-		0.22	
cefotaxime	0.77	0.10	0.44	0.49	0.03	0.71	0.03	0.54	0.04	0.78	0.04	2.83	0.75	3.93	0.71
cephalothin	0.47	0.07	0.28	0.59	0.06	0.48	0.05	0.51	0.05	0.54	0.10	0.51	0.99	6.05	2.32
cephapirin	0.66	0.06	0.46	0.77	0.13	0.77	0.06	0.70	0.11	0.80	0.04	0.75	0.29	2.48	3.71
chloramphenicol	0.52	0.08	0.45	0.46	0.14	0.82	0.16	0.27	0.09	0.87	0.13	-		2.94	2.19
cimetidine	0.87	0.03	0.83	0.54	0.19	0.89	0.04	0.42	0.03	0.75	0.01	0.50	3.70	-	
clindamycin	0.39	0.04	0.07	0.69	0.09	0.85	0.04	0.64	0.07	0.85	0.10	1.00	0.39	1.25	1.65
diltiazem	0.21	0.11	0.25	0.39	0.05	0.51	0.08	0.45	0.01	0.90	0.13	4.49	2.21	20.53	3.16
disopyramide	0.86	0.05	0.43	0.68	0.05	0.86	0.02	0.64	0.09	0.85	0.03	1.04	0.46	0.96	0.88
fluconazole	0.81	0.06	0.89	0.80	0.05	0.71	0.05	0.89	0.06	0.80	0.08	1.77	0.58	4.47	0.53
labetalol	0.28	0.06	0.50	0.22	0.02	0.61	0.05	0.19	0.02	0.58	0.03	0.88	2.52	-	
metformin	0.99	0.04	1.00	1.17	0.11	1.09	0.03	1.19	0.02	1.22	0.15	0.93	0.42	2.88	2.28
metoprolol	0.80	0.07	0.88	0.85	0.02	0.93	0.01	0.80	0.01	0.94	0.05	0.88	0.23	1.15	1.36
metronidazole	0.94	0.03	0.90	1.48	0.10	0.78	0.02	1.18	0.02	0.80	0.03	-		1.90	0.54
mirtazapine	0.21	0.05	0.15	0.16	0.07	0.39	0.07	0.27	0.00	1.07	0.25	20.64	13.28	37.87	6.05
moclobemide	0.66	0.07	0.50	0.47	0.01	0.73	0.06	0.46	0.06	0.63	0.04	1.86	0.89	-	
nitrazepam	0.17	0.05	0.15	0.08	0.01	0.56	0.04	0.12	0.04	0.89	0.09	36.32	8.85	15.66	2.07
nitrofurantoin	0.48	0.08	0.60	0.58	0.12	1.12	0.11	0.61	0.03	1.12	0.22	2.31	1.97	0.26	1.40
praziquantel	0.20	0.03	0.18	0.14	0.02	0.43	0.03	0.31	0.04	0.68	0.08	26.33	4.56	20.11	4.30
prednisolone	0.11	0.02	0.08	0.44	0.22	0.83	0.40	0.37	0.16	1.06	0.11	0.64	1.12	10.10	13.41
propranolol	0.14	0.01	0.12	0.31	0.02	0.47	0.02	0.29	0.02	0.62	0.03	2.22	2.49	12.76	1.55
propylthiouracil	0.71	0.09	0.18	0.13	0.02	0.70	0.16	0.14	0.01	0.74	0.22	9.96	5.65	2.80	7.22
quetiapine	0.06	0.02	0.17	0.11	0.02	0.31	0.02	0.14	0.01	0.49	0.02	16.77	5.28	27.75	3.62
terbutaline	0.80	0.05	0.80	0.79	0.07	0.85	0.09	0.75	0.05	0.82	0.09	0.94	0.71	0.25	2.09
theophylline	0.72	0.23	0.60	0.54	0.02	1.00		0.50	0.07	0.95		1.04	0.98	0.15	
trazodone	0.08	0.04	0.08	0.17	0.02	0.21	0.02	0.22	0.04	0.64	0.05	11.39	3.48	74.22	7.60
triprolidine	0.32	0.08	0.10	0.23	0.09	0.20	0.00	0.29	0.06	0.30	0.02	10.91	5.78	38.59	6.73
verapamil	0.23	0.12	0.10	0.08	0.01	0.22	0.01	0.12	0.00	0.87	0.10	30.69	13.95	76.37	6.26

血漿 (f_p)，乳汁 ($f_{m,total}$)，脱脂乳 (f_m) の非結合型分率は *in vitro* 実験により実測したが，ヒト f_p に限り過去の報告値を参照した [18]。 K_f 値において計算上マイナス値となったものは ‘ - ’ で示した。

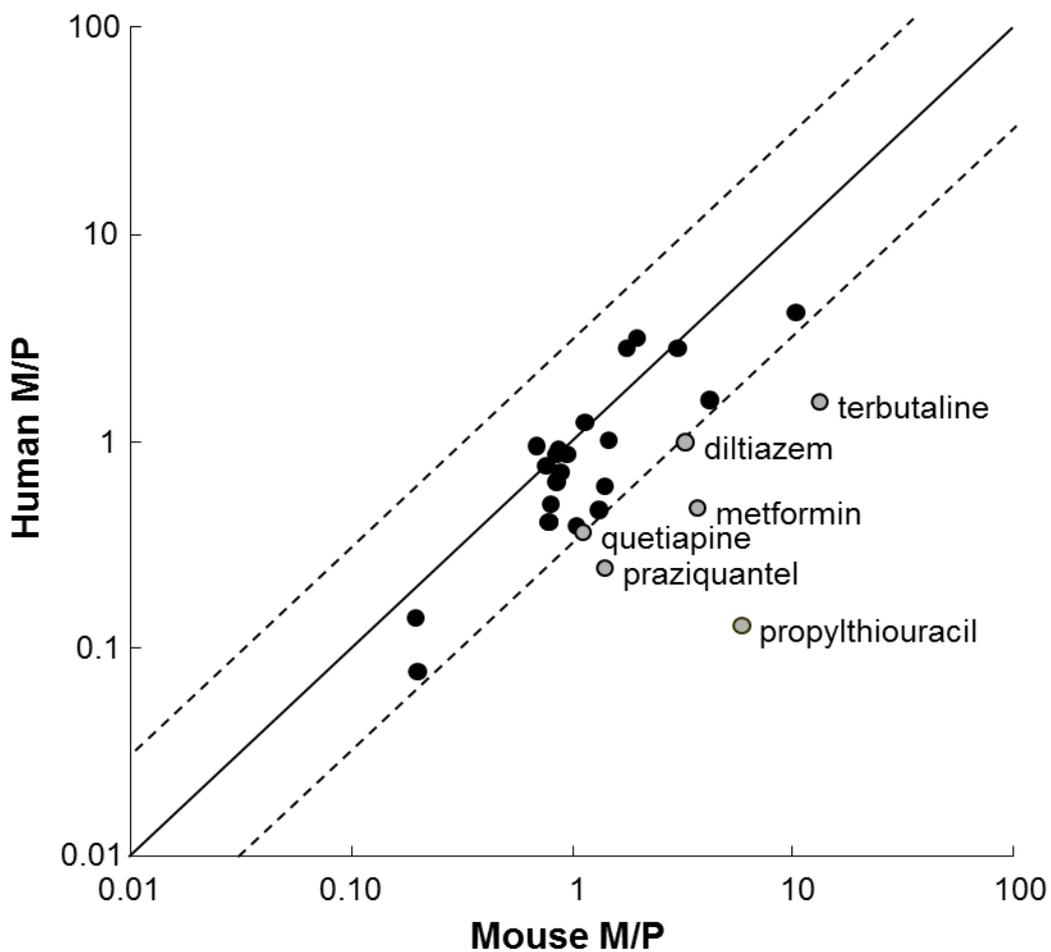


Figure 5. ヒトとマウスにおける M/P 値の比較

ヒト M/P 値は Koshimichi らの報告値を用いた [18].

マウス M/P 値は各個体毎に算出し、これらの平均値としてプロットした。

実線は 1:1 の相関ラインを、点線は上下 3 倍ラインを示す. ヒトよりもマウスが 3 倍以上高い M/P 値を示した薬物を灰色でプロットし、薬物名を付記した. 全般に M/P 値はヒトよりもマウスのほうが高値であった.

血漿中非結合型分率 (f_p) (Table 5)はヒトとマウスで相関が認められた ($R^2=0.737$) (Figure 6-a.)。一方で乳汁中非結合型分率 ($f_{m,total}$) はヒトよりもマウスにおいて全般に低値で、その比 (マウス/ヒト) は 0.64 (95%信頼区間, 0.52-0.77) であり、特に $f_{m,total} < 0.75$ の薬物においてより顕著であった (Figure 6-b.)。

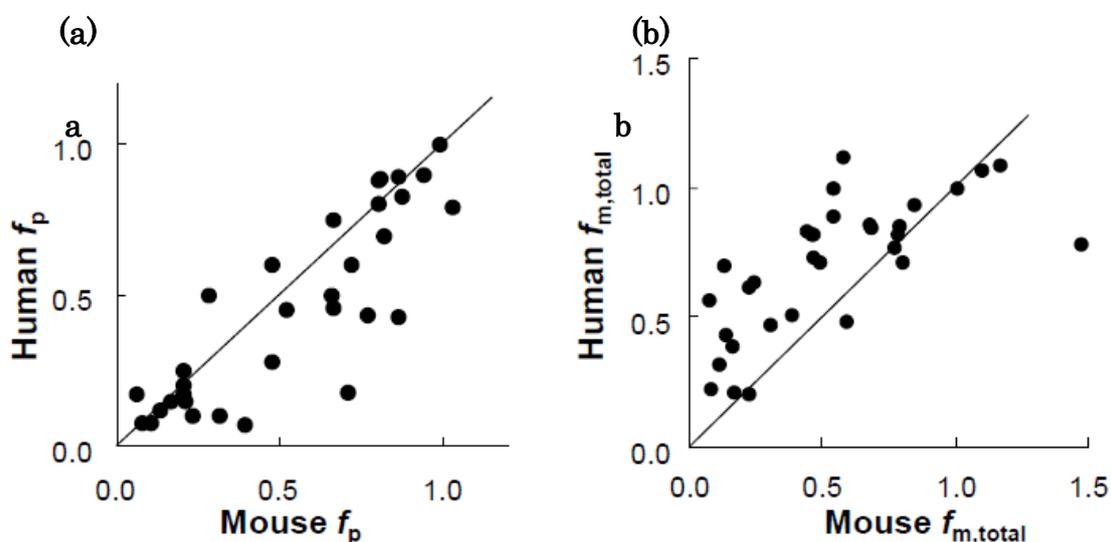


Figure 6. ヒトとマウスにおける f_p (血漿中非結合型分率) (a) および $f_{m,total}$ (乳汁中非結合型分率) (b) の比較

f_p は、ヒトとマウスで、おおむね 1 : 1 の相関を認めた ($r^2=0.736$).

$f_{m,total}$ はヒトがマウスよりも高値で、特にマウス $f_{m,total} < 0.75$ の薬物でより顕著であった。

$f_{m,total}$ に種差を生ずる要因を調べる目的で、乳汁中で薬物が結合・分配する対象となる蛋白質、ならびに脂質のいずれの差が影響しているかを検討した。蛋白結合の影響については脱脂乳中の非結合型分率 (f_m) を、脂質への分配については乳汁中脂質 - 水分配係数 (K_f) を、それぞれヒト、マウスの乳汁に対し各種薬物を添加後、適切な処理を経て分離測定し、これらパラメータについてヒト - マウス間での比較を行った。その結果、ヒトに比べマウスの f_m は小さい薬物が多く、比 (マウス/ヒト) の幾何平均は 0.53 (95%信頼区間, 0.43-0.65) であった (Table 5, Figure 7-a)。脂質への分配しやすさを示す K_f 値の比較でもヒトに比べマウスでは同程度かやや低値で、その比 (マウス/ヒト) の幾何平均は 0.61 (95%信頼区間, 0.40-0.95) であった (Table 5, Figure 7-b)。

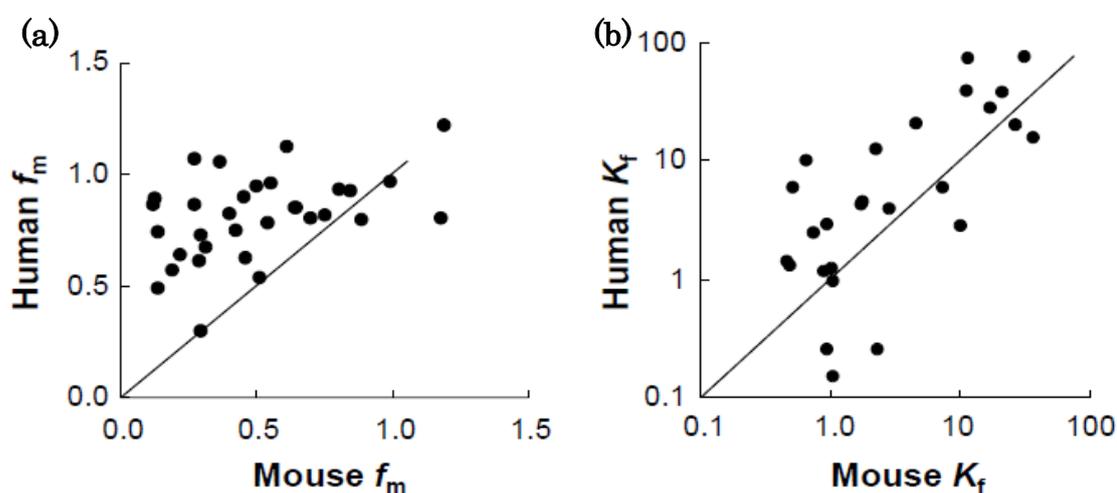


Figure 7. ヒトとマウスにおける f_m (脱脂乳中の非結合型分率) (a) および K_f (乳汁中脂質-水分配係数) (b) の比較

多くの薬物でマウスよりもヒトの f_m が高値である。

マウス f_m は薬物間での差が大きいが、ヒト f_m は比較的その差が小さい。 K_f 値はヒトと同程度かマウスがやや低値である。

非対称性輸送の可能性のある薬物の選択

次に各薬物における非対称性輸送の関与の有無を検証するため、非結合型薬物の乳汁血漿移行比 ($M/P_{unbound}$) を算出した (Table 4)。Figure 8 には 27 薬物における $M/P_{unbound}$ の実測値のヒトとマウスでの比較結果を示す。この比が pH 分配のみを仮定した比よりも大きければトランスポーターによる分泌を、小さければ少なくとも積極的な分泌はないと判断される。Figure 8 より $M/P_{unbound}$ の実測値はヒト、マウスともに多くの薬物で 1.0 付近に集中する傾向が見られた。また M/P とは異なり、 $M/P_{unbound}$ では全体の傾向としてヒトとマウスいずれの種で高値になるかについて一定の傾向は見られず、各薬物の比 (マウス/ヒト) の中央値は 1.03 (95%信頼区間, 0.70-1.52) であった。また Table 4 の最右カラムに pH 分配に基づく $M/P_{unbound}$ の予測値を示した ($M/P_{unbound, predicted}$)。ここで乳汁 pH は通常、血漿 (pH 7.4) よりもやや低 pH であるため、pH 6.8 ならびに pH 7.2 の 2 条件で算出している。27 薬物のうち 17 薬物の $M/P_{unbound}$ について、実測値と予測値 (pH 6.8 と pH 7.2 での算出値の平均) の差はヒト、マウスで 3 倍以内であった (Table 4, Figure 8)。一方で 10 薬物においてはヒト、マウスのいずれかで実測値と予測値に 3 倍以上の乖離を認めた。乖離していた薬物のうち、セフォタキシム、メトホルミン、ニトラゼパム、トラゾドン、ベラパミルではヒト、マウスいずれかで予測値よりも実測値が低値であり、その乖離の程度は薬物に

よって種差を認めた。一方シメチジン、クリンダマイシン、ジソピラミド、ジルチアゼム、テルブタリンでは、ヒト、マウスいずれかで予測値よりも実測値が高値であった (Figure 9)。

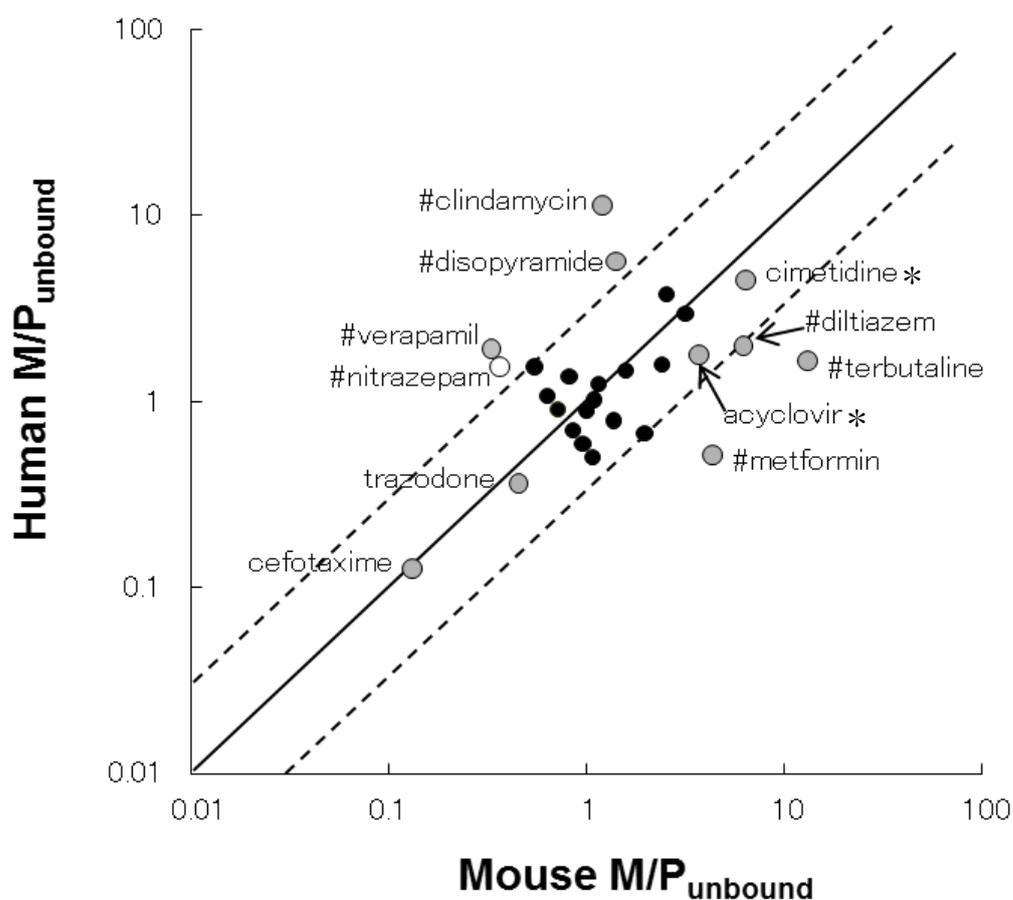


Figure 8. ヒトとマウスにおける $M/P_{unbound}$ 値の比較.

ヒトおよびマウス $M/P_{unbound}$ 値は、 M/P 値と f_p および $f_{m,total}$ 値から算出した実測値である。実線は最良のフィッティングライン (1:1) を、点線は 3 倍ラインを示す。 $M/P_{unbound}$ は多くの薬物で 1 の周囲に分布したが、一部外れる薬物も存在した。ヒトとマウスいずれかにおいて、 $M/P_{unbound}$ 値が pH 分配による予測値よりもヒト、マウスのいずれかで 3 倍以上異なる 10 薬物を灰色丸印でプロットし薬物名を付記した。さらに、ヒトとマウスで 3 倍以上乖離している薬物については薬物名の前に#を記し、同様に薬物名を付記した。既知の BCRP/Bcrp 基質については薬物名の後ろに*を記し、同時に薬物名を付記した。

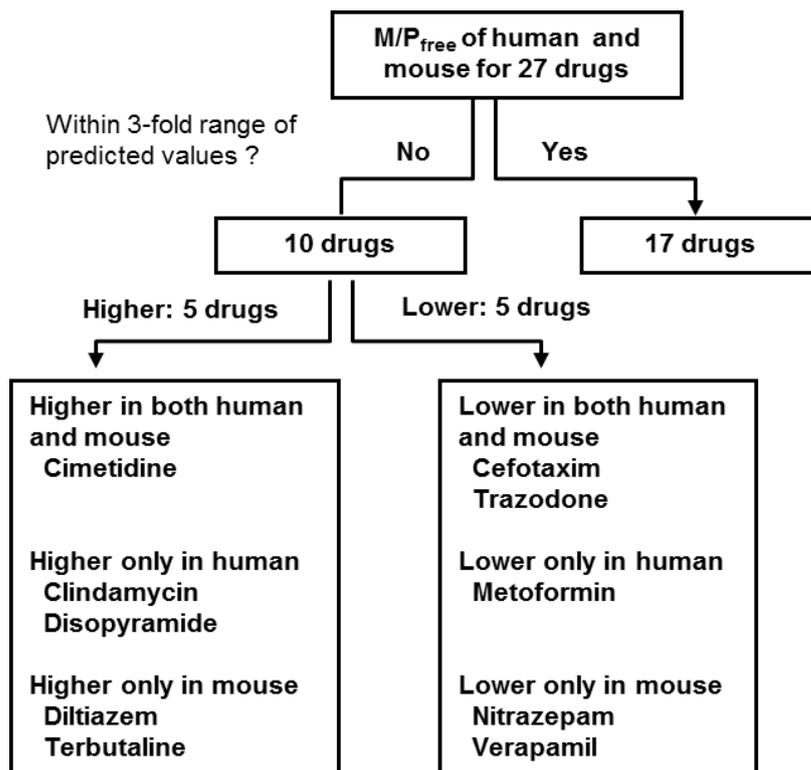


Figure 9. トランスポータによる非対称性輸送の可能性のある薬物
 $M/P_{unbound}$ の予測値と実測値の差が3倍以上異なるか否かで分類を行った。

続いて、本検討結果から、非対称性輸送の想定される薬物のなかでも特に乳児への曝露リスクという観点から、分泌方向へのトランスポーター関与の可能性のある薬物の絞り込みを行った。具体的には、 $M/P_{unbound}$ 実測値がヒトおよびマウスで測定可能であった 27 薬物のうち、ヒトあるいはマウスのいずれかで $M/P_{unbound}$ 予測値よりも 3 倍以上高い薬物、およびそれに準ずるもの、更には乳汁への分泌輸送への関与の明らかな BCRP/Bcrp 基質を選択することとした。その結果、候補薬物としては、ヒト、マウスともに高値のシメチジン (BCRP/Bcrp

基質)、ヒトで高値のクリンダマイシン、ジソピラミド、マウスで高値のテルブタリン、ジルチアゼム、メトホルミン、またヒトとマウスの間で $M/P_{unbound}$ の違いの大きい薬物としてベラパミル、ニトラゼパム、さらには溶解度の制限からこの時点では投与量が少なく $M/P_{unbound}$ が定量困難であった既知の BCRP/Bcrp 基質であるニトロフラントイン、同じく BCRP/Bcrp 基質であるアシクロビルを加え、最終的にこれら 10 薬物について、以降のトランスポーター寄与に焦点をあてた検討をすることとした (Figure 8, Figure 9)。

Bcrp ノックアウトマウスを用いた乳汁移行データの取得

BCRP/Bcrp はこれまでに唯一薬物の乳汁移行への関与が、マウスではノックアウトマウスを用いて明確に、またヒトでもニトロフランチンやアシクロビルなど一部の基質薬物において証明されているトランスポーターである [25] [26] [27]。そこで上記で選択された、分泌方向へのトランスポーター関与が示唆された 10 種の薬物の乳汁移行について、Bcrp の寄与によりどの程度説明可能かを Bcrp ノックアウトマウス（以降 Bcrp KO マウス）を用いて検討した。先までの ddY マウスを用いた検討と同様に、埋め込み型浸透圧ポンプによる腹腔内持続投与後の定常状態 *M/P* 比について、野生型 FVB マウスとの比較結果として示す (Figure 10)。*M/P* 比 (\pm 標準誤差) は野生型 vs Bcrp KO マウスの表示順に、シメチジン 12.53 ± 0.53 vs 2.69 ± 0.82 、ニトロフランチン 11.64 ± 0.53 vs 0.51 ± 0.28 、アシクロビル 1.83 ± 0.84 vs 0.11 ± 0.02 と既知のマウス BCRP 基質では著明に低下した。一方、残り 7 薬物においては、Bcrp KO マウスにおいても *M/P* 比は野生型に比べて低下せず、これら薬物では乳汁分泌に対する Bcrp の寄与はほとんど無いと考えられた。

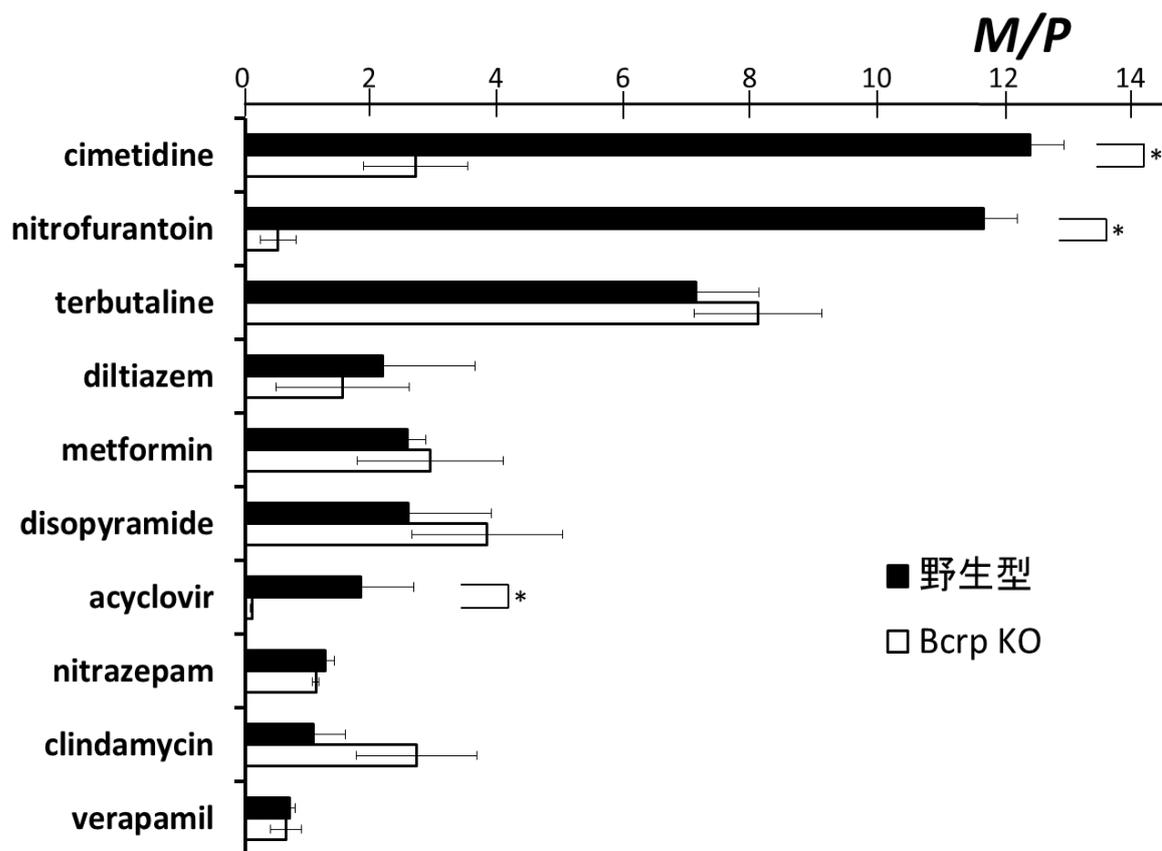
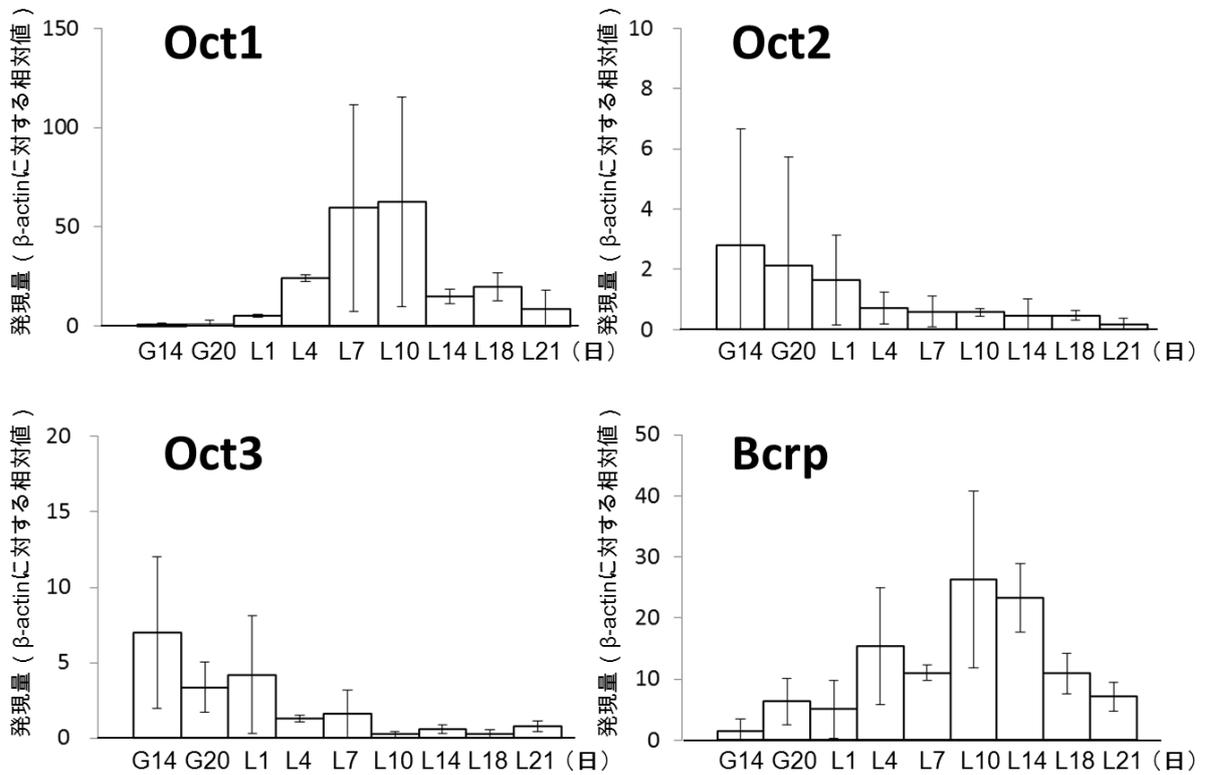


Figure 10. Bcrp ノックアウトマウスと野生型マウスにおける M/P 比の比較
 分泌方向へのトランスポーター関与の可能性がある 10 薬物に関して、浸透圧ポンプを用いた薬物投与および搾乳実験を行い、平均値±標準誤差で示した(n=3). Bcrp KO マウスでは、既知の基質以外で M/P は低下しなかった. *, $p < 0.05$.

授乳期マウス乳腺におけるトランスポーター発現プロファイル

先の *Bcrp* KO マウスを用いた解析では、10 薬物中 7 薬物について *Bcrp* の関与が否定され、それ以外のトランスポーター関与が想定された。興味深いことにこれら 7 薬物のうち 6 つがカチオン性薬物であり、カチオン性化合物を基質とするトランスポーターとしては一般に Organic Cation Transporter (OCT) / SLC22 ファミリーが知られる [31]。OCT ファミリーのうち特に OCT1、OCT2 は基質認識が広く、多くのカチオン性薬物を基質とする [31] [32]。OCT1、OCT2 はそれぞれ肝臓、腎臓の血管側膜に多く発現し、細胞の外から中への電位依存的な取り込みを担うトランスポーターとして知られる [33]。一方、OCT3 は肝臓、腎臓を含め全身に広く分布し、同じく基質の細胞内取り込みに働く [34]。実際にヒト、ラットにおいて OCT ファミリー mRNA が授乳期に乳腺で発現誘導されることが報告されている [20] [21] [35]。そこで、各種 Oct ファミリーについて、出産前後のマウス乳腺における mRNA 発現プロファイルを調べた。結果を Figure 11 に示す。Oct1 は出産前はほとんど発現せず、出産後に誘導され、授乳期間中にあたる L1~L21 の間は出産前に比較して 10 倍以上の高レベルに発現誘導・維持されていることが明らかとなった。一方、Oct2、Oct3 については授乳期には出産前よりむしろ発現が低下する傾向が認められた。ポジティブコントロールとして測定した *Bcrp* については既報通り授乳期に誘導されることを確認した [36]。

Figure 11. マウス乳腺における各種トランスポーターmRNA 発現の出産前後の
変化



マウス妊娠期および授乳期乳腺における total RNA 量をトランスポーターごとに
平均値±標準誤差で示した (n=3) . 各々の RNA 発現量は β -actin 発現量により
規格化した. G は妊娠期, L は授乳期, 数字は日齢を表す. Oct1 は授乳期に誘導さ
れるが, Oct2, Oct3 は授乳期に発現が低下する.

Oct1/2 ダブルノックアウトマウスを用いた輸送実験結果

上記 mRNA 発現誘導の結果より、Bcrp に加え、Oct1 が薬物の乳汁移行に関わっている可能性が考えられた。そこで、現時点で入手可能な Oct1/Oct2 ダブルノックアウトマウス（以降 Oct1/2 DKO マウス）を用い、これまでと同様の手法で先の 10 薬物について *M/P* 比を求め、これを野生型マウスと比較した。結果を Figure 12 に示す。野生型マウスと Oct1/2 DKO マウスで違いの認められたのは 4 薬物であり、それぞれの *M/P* 比 (\pm 標準誤差) は野生型 vs Oct1/2 DKO マウスの順に、シメチジン 12.53 ± 0.53 vs 3.73 ± 0.94 、メトホルミン 2.55 ± 0.30 vs 1.04 ± 0.11 、アシクロビル 1.83 ± 0.84 vs 0.66 ± 0.06 、これに加え、Oct1 基質としてはこれまでに全く報告の無いテルブタリン 7.11 ± 0.99 vs 2.02 ± 0.34 であった。それ以外の 6 薬物においては、Oct1/2 DKO と野生型マウスとの間に顕著な *M/P* 比の差は認めなかった。

以上よりシメチジン、メトホルミン、アシクロビル、テルブタリンは Oct1 により乳汁中に分泌されていることが初めて示された。

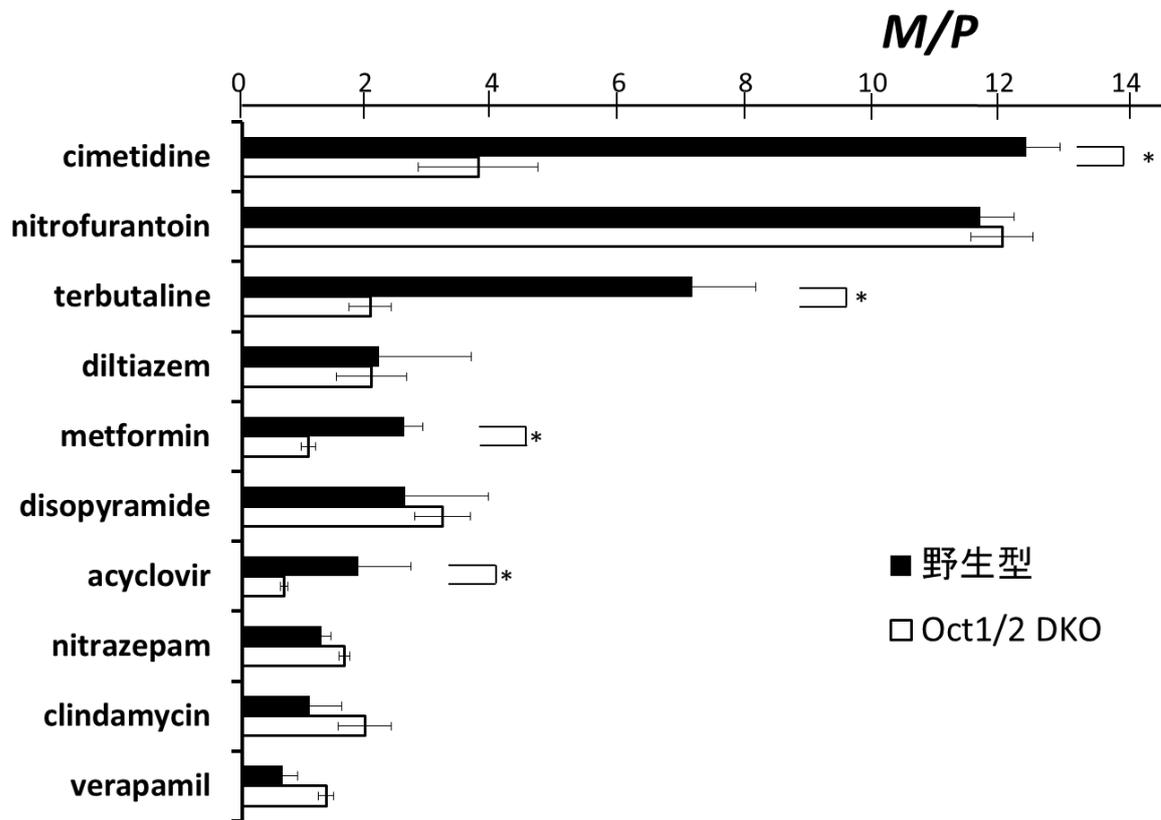


Figure 12. Oct1/2 DKO マウスと野生型マウスにおける *M/P* の比較

分泌方向へのトランスポーター関与の可能性のある 10 薬物に関して浸透圧ポンプを用いた薬物投与および搾乳実験を行い、平均値±標準誤差で示した(n=3). Oct1/2 DKO マウスでは、既知の Oct1 基質 (シメチジン, メトホルミン, アシクロビル) 以外にも、テルブタリンにおいて *M/P* が低下していた. *, p < 0.05.

マウス Oct 安定発現細胞を用いた輸送活性の確認

Oct1/2 DKO マウスの結果を受け、*M/P* に変化の見られた 4 薬物がマウス Oct の基質となることを、マウス Oct1、Oct2、Oct3 それぞれの安定発現細胞株を用いた取り込み実験によって確認した。結果を Figure 13 に示す。先述のようにシメチジン、メトホルミンはヒトならびにマウスで [37] [38]、アシクロビルは少なくともヒトにおいては既に OCT/Oct ファミリーの基質となることが知られている薬物であるが [39]、これら 3 薬物についてはマウス Oct1、Oct2、Oct3 全ての細胞で MOCK 細胞に比べてその取り込みが大きく、かつ Oct 基質である TEA の過剰存在下でその取り込みは抑制されたことから、既報通りマウス Oct1、Oct2、Oct3 の輸送基質となることが確認された。加えて、これまで Oct ファミリーの基質として報告の無いテルブタリンについても同様にマウス Oct1、Oct2 で良好な基質となることが初めて確認された。一方で検討対象とした 10 薬物のうち残り 6 薬物については、Oct1~3 いずれでも輸送を認めず、Oct ファミリーの基質とされないことが示された

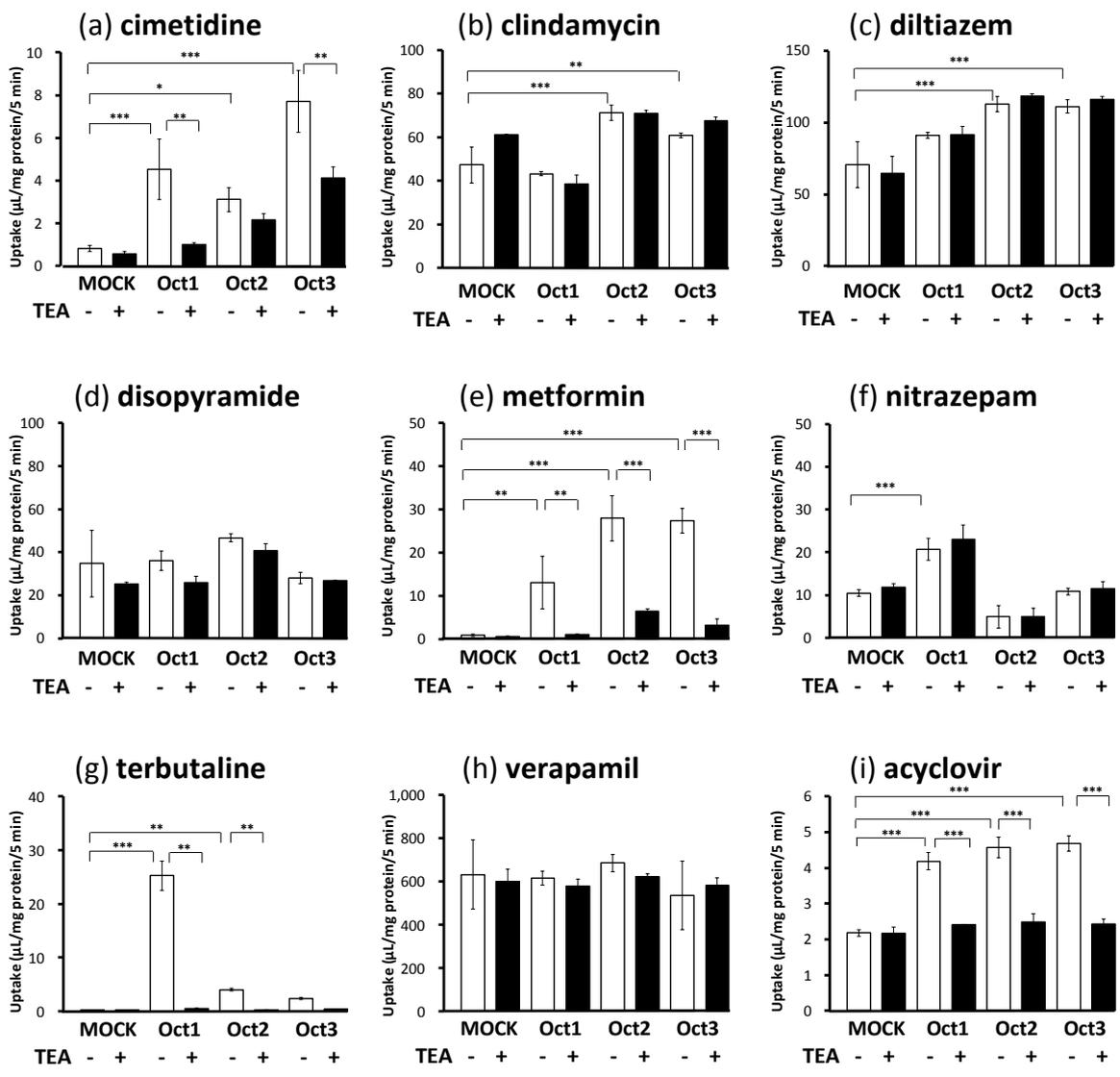


Figure 13. マウス Oct1, Oct2, Oct3 発現 HEK 細胞における薬物取り込み実験
 TEA - および + は, TEA 添加の無, 有を示し, 測定値は平均値±標準誤差で示した. コントロールベクターである MOCK に比べ マウス Oct 発現細胞において, シメチジン(a), メトホルミン(e), テルブタリン(g), アシクロビル(i) における取り込み活性の上昇, および TEA による競合阻害に伴う活性低下を認めている (n=3). *, p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

ヒト OCT 安定発現細胞を用いた輸送活性の確認

これまでの検討により、マウスにおいてはシメチジン、メトホルミン、アシクロビル、テルブタリンが Oct ファミリーの基質となり、かつ Oct1/2 DKO マウスを用いた解析から、*in vivo* においても Oct1/2 の寄与により積極的に乳汁中に分泌されている可能性が示された。マウス授乳期において Oct1 の発現は顕著に誘導され、Oct2 の発現は低下することから、これら薬物の pH 分配からの予測以上の乳汁移行性は、主に Oct1 の関与で説明できると考えられた。OCT1 はヒト乳腺においても授乳期に発現誘導されることが示唆されており [21]、マウスと同様にこれら基質薬物の乳汁移行に関与する可能性が考えられる。そこで先の 10 薬物について、ヒト OCT1~3 の発現系を用いて輸送基質となるか否かについて確認した。結果を Figure 14 に示す。マウスと同様に既知の OCT 基質であるシメチジン、メトホルミンは OCT1、OCT2 により同程度の輸送活性が見られ、OCT3 の基質とはならなかった。一方、アシクロビルは OCT1 の、テルブタリンは OCT1、OCT2 の両者の基質となることが示されたが、OCT1 のほうがより高い輸送活性を示した。

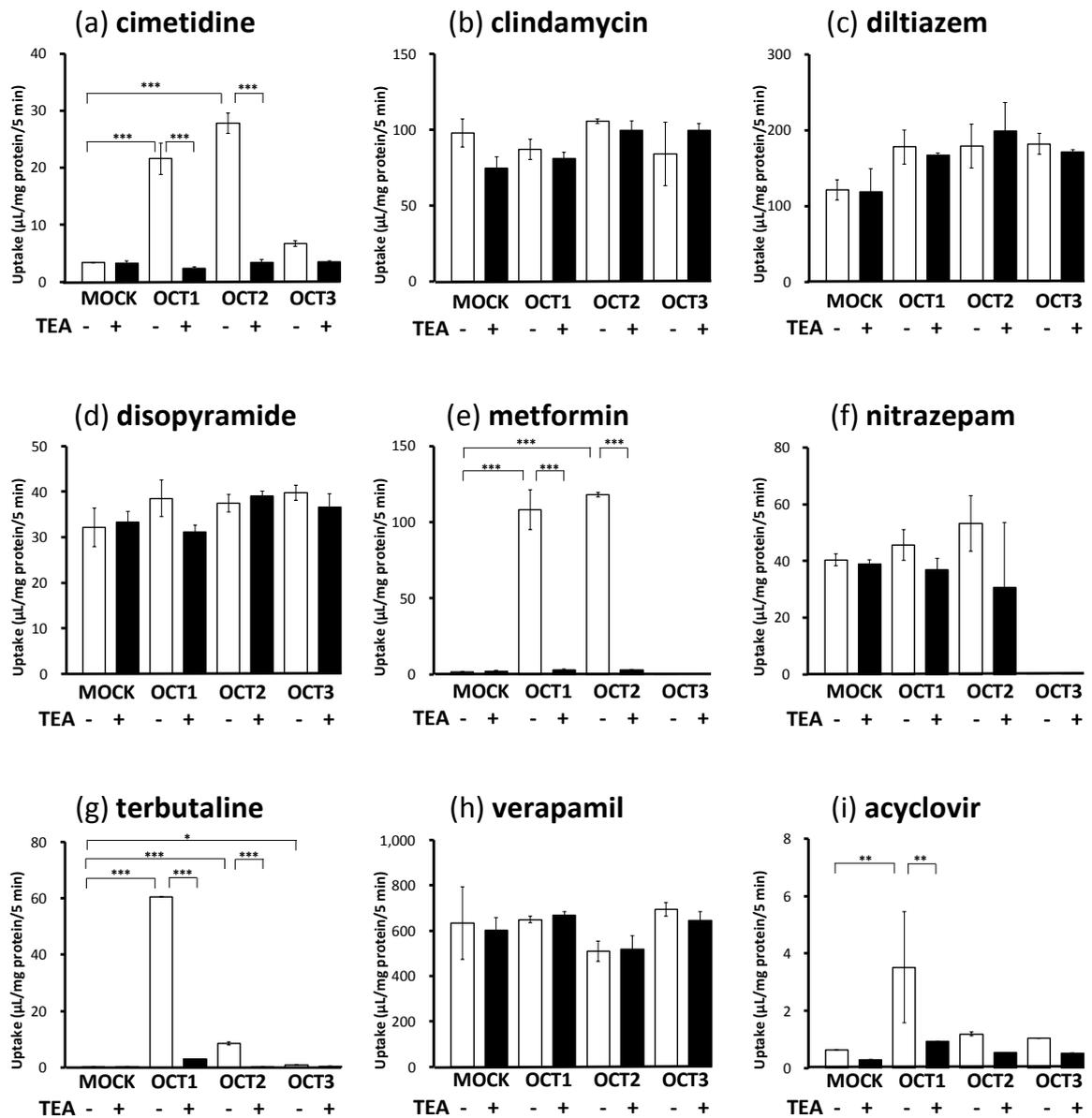


Figure 14. ヒト OCT1, OCT2, OCT3 発現 HEK 細胞における薬物取り込み実験
 TEA - および + は, TEA 添加の無, 有を示し, 測定値は平均値±標準誤差で示した. マウス Oct 発現細胞と同様にヒト OCT 発現細胞において, コントロールベクターである MOCK に比べてシメチジン(a), メトホルミン(e), テルブタリン(g), アシクロビル(i) における取り込み活性の上昇, および TEA による競合阻害に伴う活性低下を認めている(n=3). *, p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

乳汁分泌に対するトランスポーターの寄与には種差がある

Bcrp KO マウスでニトロフラントイン、シメチジン、アシクロビルの M/P が野生型マウスに比べて低下し、さらに Oct1/2 DKO マウスでシメチジン、メトホルミン、アシクロビル、テルブタリンの M/P が野生型マウスに比べて低下したことから、少なくともマウスでは Bcrp と Oct1 が乳汁分泌に関与し、 M/P が pH 分配で予測される値よりも高くなっているものと考えられた。Bcrp ならびに Oct1 の基質認識性はヒトとマウスで大きな種差を認めないことから (Figure 13, 14)、これらトランスポーターがヒトにおいても同様に薬物の乳汁分泌に関わる可能性が考えられる。そこで、以降ではヒトにおいて BCRP および OCT1 が実際に薬物の乳汁移行に寄与しているかの検証を試みた。Table 4 をもとに 27 種の薬物について横軸に pH 分配のみから算出した $M/P_{unbound,predicted}$ を、縦軸に観測された $M/P_{unbound,observed}$ をプロットした (Figure 15)。その結果、マウスでは Bcrp 基質、Oct1 基質のいずれについても pH 分配から予測されるより高い値となり、Bcrp、Oct1 の両トランスポーターが基質薬物の乳汁分泌に関わることがあらためて明確となった (Figure 15-a)。一方、ヒトでは、BCRP 基質は pH 分配から予測される値に比べて高値を示したのに対し、良好な OCT1 基質であることが *in vitro* 実験で確認されているメトホルミン、テルブタリンのいずれも pH 分配から予測される値と同程度か、むしろ低値となることが示された (Figure 15-b)。従ってマウスと異なり、ヒトでは OCT1 の薬物乳汁分泌における寄与は限定的で、

仮にあったとしてもほぼ無視できる程度に小さいものと考えられた。

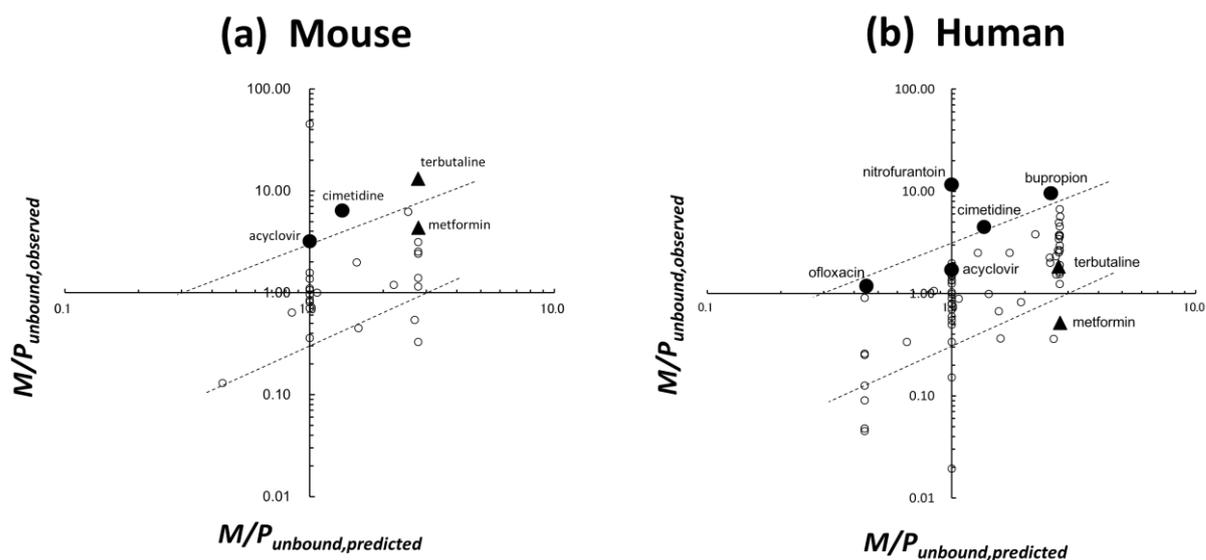


Figure 15.

マウス (a) およびヒト (b) における $M/P_{unbound}$ 実測値および予測値の相関。BCRP/Bcrp 基質を●, OCT1/Oct1 基質を▲, それ以外を○で示す。pH 分配に基づく予測値と比較してマウスでは Bcrp および Oct1 基質ともに実測値が高かった一方、ヒトでは BCRP 基質については高値を示したが、OCT1 基質では高値ではなかった。点線は 3 倍と 3 分の 1 倍を示す。

ヒトにおける薬物乳汁移行の受動拡散のみに基づく予測値と観察値の対応

上記解析 (Figure 15) によりヒトでの OCT1 の寄与は小さく、BCRP の寄与はマウスと同様に無視できない程大きいことが示唆された。この点が薬物一般に成立するか検証する目的で、対象薬物を「ヒトにおける M/P 比が既知の薬物」(AUC の比として算出されたという条件を付さずに情報収集) に広げ調査した。

ヒトで M/P 比のデータが存在し、かつ乳汁中と血漿中の非結合型分率が一定の範囲内であった 167 薬物について、ヒト $M/P_{unbound} ratio$ (実測値と予測値の比) を算出した結果を Table 6 に示す。この結果、全検討薬物の中で $M/P_{unbound} ratio$ が 2.0 以上と高値の 36 薬物中、既知の BCRP 基質は 10 薬物 (27.8%) と高頻度で認められたが、既知の OCT 基質は 2 薬物のみであった (5.6%)。一方、比が 0.5-2.0 の 80 薬物中では BCRP 基質は 4 薬物 (5%)、OCT1 基質は 2 薬物 (2.5%)、さらに比が 0.5 以下の 51 薬物中では BCRP 基質は 2 薬物 (3.9%)、OCT 基質は 1 薬物 (2.0%) のみであった (Table 6, 7)。特にテルブタリン、メトホルミンなど OCT1 の基質でかつマウスでは $M/P_{unbound}$ が予測よりも高値であった薬物が、それぞれ 0.68、0.14 と 1 を大きく下回っていた。以上より、ヒトにおいて対象薬物を広げた解析においても BCRP の関与は明確であり、 $M/P_{unbound}$ が pH 分配からの予測に比べ 3 倍以上高値に出る薬物のうち、約 25% の薬物について BCRP の関与で説明できる一方、OCT1 の関与はほとんど認められなかった。

Table 6. 167 薬物におけるヒト $M/P_{unbound}$ 実測値と観察値の対応

Drug	$M/P_{observed}$	$f_{m,total}$	$f_{m,protein}$	Kf	$\log D_{7.2}$	f_p	$f_{m,total}$	$f_{m,total}/f_p$	$M/P_{unbound,observed}$	pKa	charge	$M/P_{unbound,pre}$ at pH6.8	$M/P_{unbound,pre}$ at pH7.2	$M/P_{unbound,pre}$ at est	$M/P_{unbound,pre}$ ratio (Obs/Pred)
dyphylline	2.08	0.97	0.92	0.00	-1.87	0.16	0.97	6.03	12.55		neutral	1.00	1.00	1.00	12.55
Nitrofrantoin	6.29 1)	1.00	0.96	0.066573	-0.23	0.6	1.07 2)	1.78	11.22		neutral	1.00	1.00	1.00	11.22
mesalamine	2.69	1.00	0.96	0.00	-1.56	0.6	1.00	1.67	4.48	3.5	acid	0.25	0.63	0.44	10.15
nifedipine	1.00	0.42	0.87	28.50	1.81	0.045	0.42	9.33	9.33	5.3	basic	1.02	1.00	1.01	9.21
foscarnet	3.00	1.01	0.96	0.00	-7.35	0.85	1.01	1.18	3.55	1.8	acid	0.25	0.63	0.44	8.06
phenacyclidine	10.00	0.76	0.94	6.65	1.32	0.35	0.76	2.18	21.79	10.6	basic	3.98	1.58	2.78	7.83
doxycycline	0.35	0.95	0.91	0.00	-5.97	0.1	0.95	9.48	3.32	4.6	acid	0.25	0.63	0.44	7.51
nortriptyline	2.29	0.65	0.90	10.38	1.47	0.08	0.65	8.16	18.68	10.5	basic	3.98	1.58	2.78	6.71
valproic acid	0.42	0.91	0.92	1.22	0.75	0.1425	0.91	6.41	2.69	5.1	acid	0.25	0.63	0.44	6.06
hydralazine	0.93	0.92	0.91	1.02	0.69	0.13	0.92	7.06	6.53	6.4	basic	1.27	1.05	1.16	5.62
Zidovudine	3.21	1.00	0.96	0.04	-0.41	0.66	1.00	1.52	4.87		neutral	1.00	1.00	1.00	4.87
acebutolol	9.65	1.00	0.96	0.01	-0.78	0.74	1.00	1.36	13.09	9.57	basic	3.96	1.58	2.77	4.72
bupropion	4.35	0.19	0.93	93.52	2.21	0.19	0.42 2)	2.21	9.62	8.2	base	3.57	1.50	2.54	3.79
tetracycline	0.93	1.00	0.95	0.00	-6.03	0.565	1.00	1.77	1.64	4.6	acid	0.25	0.63	0.44	3.72
paregoric	2.35	1.00	0.96	0.13		0.65	1.00	1.53	3.60		structure not av	1.00	1.00	1.00	3.60
hydroxychloroquine	5.50	0.99	0.95	0.15	0.05	0.55	0.99	1.80	9.92	9.8	basic	3.97	1.58	2.78	3.57
doxycycline	3.00	0.92	0.96	2.09	0.93	0.85	0.92	1.08	3.25		neutral	1.00	1.00	1.00	3.25
cimetidine	4.18 1)	1.00	0.96	0.06	-0.27	0.83	0.89 2)	1.07	4.48	6.9	basic	1.72	1.14	1.43	3.14
levofloxacin	0.95	1.00	0.96	0.10	-0.1	0.69	1.00	1.45	1.37	5.6	acid	0.26	0.64	0.45	3.06
phenytoin	0.32	0.93	0.91	0.36	0.34	0.1	0.93	9.33	2.94		neutral	1.00	1.00	1.00	2.94
ciprofloxacin	1.91	1.00	0.96	0.01	-0.81	0.7	1.00	1.43	2.74		neutral	1.00	1.00	1.00	2.74
pefloxacin	0.93	0.99	0.96	0.35	0.33	0.75	0.99	1.32	1.23	5.66	acid	0.26	0.64	0.45	2.72
ofloxacin	0.92 1)	1.00	0.96	0.097949	-0.1	0.68	0.88 2)	1.29	1.19	5.6	acid	0.26	0.64	0.45	2.65
cefoperazone	0.12	0.95	0.91	0.00	-4.25	0.1	0.95	9.48	1.14	3.38	acid	0.25	0.63	0.44	2.58
sumatriptan	5.59 1)	1.01	0.96	0.00	-1.42	0.83	1.01	1.21	6.78	9.5	basic	3.96	1.58	2.77	2.45
carbamazole	0.50	0.73	0.92	7.27	1.35	0.15	0.73	4.88	2.44		neutral	1.00	1.00	1.00	2.44
nadolol	4.60	1.00	0.96	0.00	-1.61	0.7	1.00	1.43	6.59	9.8	basic	3.97	1.58	2.78	2.37
disopyramide	2.82 1)	0.97	0.95	0.47	0.43	0.43	0.98 2)	2.28	6.43	10.4	basic	3.98	1.58	2.78	2.31
cefepime	0.80	1.01	0.96	0.00	-3.45	0.8	1.01	1.26	1.01	3.25	acid	0.25	0.63	0.44	2.28
carisoprodol	2.50	0.36	0.95	39.52	1.92	0.4	0.36	0.90	2.24		neutral	1.00	1.00	1.00	2.24
acyclovir	1.58 1)	1.01	0.96	0.00	-1.55	0.79	1.09 2)	1.38	2.18		neutral	1.00	1.00	1.00	2.18
magnesium sulfate	1.50	1.00	0.96	0.00	-5.59	0.725	1.00	1.38	2.08		basic	1.00	1.00	1.00	2.08
oxycodone	3.40	0.96	0.96	0.96	0.67	0.6	0.96	1.60	5.43	8.5	basic	3.76	1.54	2.65	2.05
ranitidine	4.30	1.00	0.96	0.15	0.05	0.85	1.00	1.18	5.06	8.08	basic	3.47	1.48	2.47	2.04
primidone	0.72	0.85	0.94	3.67	1.12	0.3	0.85	2.82	2.03		neutral	1.00	1.00	1.00	2.03
clindamycin	0.94 1)	0.95	0.93	0.64	0.53	0.22	0.99 2)	4.50	4.23	7.6	basic	2.83	1.36	2.09	2.02
hydrochlorothiazide	0.99 1)	0.98	0.94	0.02	-0.58	0.32	0.64 2)	2.00	1.98	9.4	acid	0.99	1.00	0.99	1.99
sotalol	5.40	1.01	0.96	0.00	-2.3	1	1.01	1.01	5.45	9.6	basic	3.96	1.58	2.77	1.97
betaxolol	2.75	0.99	0.95	0.20	0.14	0.5	0.99	1.98	5.43	9.67	basic	3.97	1.58	2.77	1.96
fluvoxamine	1.28 1)	0.91	0.93	1.70	0.86	0.22	0.91	4.13	5.28	9.2	basic	3.93	1.58	2.76	1.92
procainamide	4.15	1.01	0.96	0.01	-0.89	0.825	1.01	1.22	5.06	9	basic	3.91	1.57	2.74	1.85
lamivudine	1.36	1.00	0.96	0.01	-1.1	0.74	1.00	1.36	1.85		neutral	1.00	1.00	1.00	1.85
quinidine	0.71	0.92	0.91	0.96	0.67	0.13	0.92	7.07	5.02	9	basic	3.91	1.57	2.74	1.83
flecainide	3.15	0.93	0.96	1.55	0.83	0.6	0.93	1.56	4.91	9.62	basic	3.96	1.58	2.77	1.77
diazepam	1.45	0.02	0.80	1239.37	3.08	0.015	0.02	1.17	1.70		neutral	1.00	1.00	1.00	1.70
alprazolam	0.46 1)	0.13	0.93	150.42	2.37	0.2	0.74 2)	3.70	1.70	5.1	basic	1.01	1.00	1.01	1.69
erythromycin	0.92	0.71	0.92	8.19	1.39	0.15	0.71	4.74	4.36	8.4	basic	3.71	1.53	2.62	1.66
flouxetine	0.48	0.52	0.88	18.26	1.66	0.055	0.52	9.53	4.56	9.8	basic	3.97	1.58	2.78	1.64
cefprozil	0.53 1)	0.85	0.96	3.90	1.14	0.64	0.85	1.33	0.71	3.5	acid	0.25	0.63	0.44	1.60
dextroamphetamine	3.60	1.01	0.96	0.01	-0.81	0.82	1.01	1.23	4.41	10	basic	3.97	1.58	2.78	1.59
zonisamide	0.93	0.99	0.96	0.18	0.11	0.6	0.99	1.65	1.54	9.1	acid	0.99	0.99	0.99	1.55
ampicillin	0.58	1.01	0.96	0.00	-2.18	0.86	1.01	1.17	0.68	3.24	acid	0.25	0.63	0.44	1.54
theophylline	0.75 1)	1.00	0.96	0.01	-0.85	0.6	1.00	1.67	1.25	7.8	acid	0.79	0.89	0.84	1.49
escitalopram	2.21 1)	0.81	0.95	5.089792	1.23	0.44	0.81	1.84	4.07	9.8	basic	3.97	1.58	2.78	1.46
tinidazole	1.28	1.01	0.96	0.02	-0.58	0.88	1.01	1.14	1.46	3.1	basic	1.00	1.00	1.00	1.46
triprolidine	0.85	0.07	0.91	297.8516	2.6	0.1	0.46 2)	4.60	3.91	8.6	basic	3.80	1.55	2.68	1.46
valacyclovir	2.35	1.01	0.96	0.02	-0.57	0.845	1.01	1.19	2.80	7.5	basic	2.66	1.33	1.99	1.40
prednisone	0.13 1)	0.53	0.90	18.26	1.66	0.08	0.86 2)	10.75	1.40		neutral	1.00	1.00	1.00	1.40
allopurinol	1.15	1.01	0.96	0.01	-0.89	1	1.01	1.01	1.16	7.83	acid	0.80	0.90	0.85	1.37
nitrazepam	0.4 1)	0.08	0.92	256.7438	2.55	0.15	0.51 2)	3.40	1.36		neutral	1.00	1.00	1.00	1.36
clozapine	3.55	0.02	0.85	1037.05	3.02	0.03	0.02	0.70	2.48	7.35	basic	2.40	1.28	1.84	1.35
lincomycin	0.90	0.98	0.94	0.00	-1.15	0.275	0.98	3.57	3.21	8	basic	3.38	1.47	2.43	1.32
mirtazapine	0.97 1)	0.02	0.92	1315.22	3.1	0.15	0.25 2)	1.67	1.62	6.6	basic	1.41	1.08	1.24	1.30
mefloquine	0.20	0.36	0.82	36.15	1.89	0.02	0.36	17.94	3.59	9.5	basic	3.96	1.58	2.77	1.30
famciclovir	1.00	1.00	0.96	0.03	-0.49	0.775	1.00	1.30	1.30		neutral	1.00	1.00	1.00	1.30
methylphenidate	2.80	0.99	0.96	0.41	0.38	0.785	0.99	1.26	3.52	9.1	basic	3.92	1.57	2.75	1.28
atenolol	3.12 1)	1.01	0.96	0.006761	-1	0.89	0.96 2)	1.08	3.37	9.7	basic	3.97	1.58	2.77	1.21
trimethoprim	1.25	0.89	0.95	2.73	1.02	0.56	0.89	1.59	1.99	7.16	basic	2.09	1.21	1.65	1.20
rimantadine	2.00	1.00	0.96	0.03	-0.47	0.6	1.00	1.66	3.33	10.1	basic	3.98	1.58	2.78	1.20
topiramate	0.86	1.00	0.96	0.19	0.13	0.72	1.00	1.38	1.19		neutral	1.00	1.00	1.00	1.19
citalopram	1.43 1)	0.81	0.94	5.09	1.23	0.35	0.81	2.30	3.29	9.78	basic	3.97	1.58	2.78	1.19
dalteparin	0.12	0.95	0.91	0.00	-15.57	0.1	0.95	9.48	1.18		neutral	1.00	1.00	1.00	1.18
morphine	2.22 1)	0.94	0.96	1.377527	0.79	0.65	0.94	1.45	3.22	9.12	basic	3.93	1.57	2.75	1.17
mexiletine	1.45	0.98	0.95	0.25	0.22	0.45	0.98	2.18	3.17	9.5	basic	3.96	1.58	2.77	1.14
sertraline	0.89	0.07	0.82	289.13	2.59	0.02	0.07	3.53	3.14	9.85	basic	3.97	1.58	2.78	1.13
dicyclomine	2.22	0.01	0.77	1571.81	3.16	0.01	0.01	1.39	3.08	8.96	basic	3.90	1.57	2.74	1.13
levetiracetam	1.00	1.01	0.96	0.02	-0.59	0.9	1.01	1.12	1.12		neutral	1.00	1.00	1.00	1.12
metoprolol	2.79 1)	1.01	0.96	0.02	-0.64	0.88	0.96 2)	1.09	3.04	9.7	basic	3.97	1.58	2.77	1.10
risperidone	0.42	0.84	0.91	3.07	1.06	0.12	0.84	7.03	2.95	8.76	basic	3.86	1.56	2.71	1.09
fluconazole	0.87 1)	0.98	0.96	0.70	0.56	0.89	1.11 2)	1.25	1.09		neutral	1.00	1.00	1.00	1.09
metronidazole	0.91 1)	1.01	0.96	0.03	-0.46	0.9	1.06 2)	1.18	1.07		neutral	1.00	1.00	1.00	1.07
tramadol	2.40	0.98	0.96	0.47	0.43	0.8	0.98	1.23	2.95	9.23	basic	3.94	1.58	2.76	1.07

Drug	M/P _{observed}	f _{m,total}	f _{m,protein}	K _f	logD _{7.2}	f _p	f _{m,total}	f _{m,total} /f _p	M/P _{unbound,observed}	pKa	charge	M/P _{unbound,pre_d pH6.8}	M/P _{unbound,pre_d pH7.2}	M/P _{unbound,pre_d}	M/P _{unbound,ratio (Obs/Pred)}
desipramine	0.65	0.80	0.92	4.94	1.22	0.175	0.80	4.55	2.96	10.02	basic	3.97	1.58	2.78	1.06
meperidine	1.07 1)	0.69	0.94	9.78	1.45	0.28	0.69	2.45	2.62	8.2	basic	3.57	1.50	2.54	1.03
caffeine	0.71 1)	1.00	0.96	0.03	-0.55	0.695	1.00	1.44	1.02		neutral	1.00	1.00	1.00	1.02
ethanol	1.00	1.01	0.96	0.08	-0.16	1	1.01	1.01	1.01		neutral	1.00	1.00	1.00	1.01
budesonide	0.46 1)	0.05	0.91	438.23	2.73	0.13	0.28 2)	2.15	0.99		neutral	1.00	1.00	1.00	0.99
nicotine patch	3 1)	1.01	0.96	0.03	-0.5	0.98	0.87 2)	0.89	2.66	8.9	basic	3.89	1.57	2.73	0.98
pseudoephedrine	2.64 1)	1.01	0.96	0.01	-0.96	1	1.01	1.01	2.66	9.5	basic	3.96	1.58	2.77	0.96
codeine	2.12 1)	1.01	0.96	0.02	-0.64	0.84	1.01	1.20	2.54	9.2	basic	3.93	1.58	2.76	0.92
ethosuximide	0.94	0.98	0.96	0.68	0.55	1	0.98	0.98	0.92		neutral	1.00	1.00	1.00	0.92
heroin	2.45	1.01	0.96	0.05	-0.34	1	1.01	1.01	2.47	9.1	basic	3.92	1.57	2.75	0.90
moclobemide	0.61 1)	0.71	0.95	8.95	1.42	0.5	0.78 2)	1.56	0.95	6	basic	1.11	1.02	1.07	0.89
naltrexone	1.90	1.00	0.96	0.11	-0.06	0.79	1.00	1.27	2.41	8.9	basic	3.89	1.57	2.73	0.88
zaleplon	0.55 1)	0.64	0.95	12.40795	1.53	0.4	0.64	1.60	0.88		neutral	1.00	1.00	1.00	0.88
hydromorphone	1.85 1)	0.99	0.96	0.42	0.39	0.8	0.99	1.23	2.28	8.6	basic	3.80	1.55	2.68	0.85
antipyrine	1.00	0.82	0.96	4.94	1.22	0.99	0.82	0.83	0.83	0.37	basic	1.00	1.00	1.00	0.83
diltiazem	0.99 1)	0.51	0.94	21.18	1.71	0.25	0.53 2)	2.12	2.10	8.18	basic	3.56	1.50	2.53	0.83
tocainide	1.95	0.94	0.96	1.51	0.82	0.9	0.94	1.05	2.04	8.2	basic	3.57	1.50	2.54	0.80
clonidine	2.00	0.67	0.96	11.02	1.49	0.7	0.67	0.96	1.91	8.16	basic	3.54	1.50	2.52	0.76
aminosalicylic acid	0.13	0.99	0.95	0.00	-2.16	0.385	0.99	2.57	0.33	3.68	acid	0.25	0.63	0.44	0.76
pyridostigmine	0.75	1.01	0.96	0.00	-3.47	1	1.01	1.01	0.75		neutral	1.00	1.00	1.00	0.75
methohexital	1.10	0.17	0.94	111.76	2.27	0.27	0.17	0.61	0.67	8.7	acid	0.96	0.98	0.97	0.69
zopiclone	0.56 1)	0.96	0.95	0.86	0.63	0.55	0.96	1.75	0.98	6.9	basic	1.72	1.14	1.43	0.69
terbutaline	1.54 1)	1.01	0.96	0.01	-0.9	0.8	0.98 2)	1.23	1.89	9.76	basic	3.97	1.58	2.78	0.88
metoclopramide	1.29 1)	1.00	0.96	0.04	-0.44	0.7	1.00	1.43	1.85	9	basic	3.91	1.57	2.74	0.67
verapamil	0.87 1)	0.07	0.91	297.85	2.6	0.1	0.21 2)	2.10	1.83	9.7	basic	3.97	1.58	2.77	0.66
quetiapine	0.36 1)	0.08	0.92	272.46	2.57	0.17	0.45 2)	2.65	0.95	7.1	basic	2.00	1.20	1.60	0.60
phenobarbital	0.50	0.75	0.96	7.49	1.36	0.675	0.75	1.11	0.56	8.4	acid	0.93	0.97	0.95	0.58
amitriptyline	1.00	0.16	0.91	118.60	2.29	0.1	0.16	1.56	1.56	9.76	basic	3.97	1.58	2.78	0.56
methylidopa	0.61 1)	1.01	0.96	0.00	-1.36	0.9	0.81 2)	0.90	0.55		basic	1.00	1.00	1.00	0.55
clomipramine	1.23	0.03	0.84	704.86	2.89	0.025	0.03	1.22	1.50	9.2	basic	3.93	1.58	2.76	0.54
cephradine	0.20	1.01	0.96	0.00	-2.57	0.875	1.01	1.15	0.23	3.5	acid	0.25	0.63	0.44	0.52
amoxapine	0.21	0.67	0.91	9.78	1.45	0.1	0.67	6.69	1.40	8.83	basic	3.87	1.56	2.72	0.52
famotidine	1.10	1.01	0.96	0.00	-2.82	0.825	1.01	1.22	1.34	8.4	basic	3.71	1.53	2.62	0.51
acetaminophen	1.24 1)	0.92	0.96	1.97	0.91	0.75	0.84 2)	1.12	1.39	9.5	basic	3.96	1.58	2.77	0.50
ethambutol	1.00	1.00	0.96	0.00	-2.47	0.75	1.00	1.34	1.34	9.3	basic	3.94	1.58	2.76	0.49
propranolol	0.39 1)	0.95	0.91	0.23	0.18	0.12	0.41 2)	3.42	1.33	9.7	basic	3.97	1.58	2.77	0.48
trazodone	0.14 1)	0.03	0.90	684.23	2.88	0.08	0.42 2)	5.25	0.74	7.1	basic	2.00	1.20	1.60	0.46
lithium carbonate	0.45	1.00	0.96	0.13		1	1.00	1.00	0.45		basic	1.00	1.00	1.00	0.45
duloxetine	0.27	0.46	0.91	25.31	1.77	0.1	0.46	4.56	1.22	9.7	basic	3.97	1.58	2.77	0.44
lamotrigine	0.56	0.37	0.95	38.36	1.91	0.45	0.37	0.81	0.46	5.87	basic	1.09	1.02	1.05	0.43
penicillin G	0.08	0.99	0.95	0.00	-2.21	0.435	0.99	2.28	0.18	3.5	acid	0.25	0.63	0.44	0.41
sulfamethoxazole	0.06	0.98	0.94	0.16	0.07	0.3	0.98	3.26	0.20	6.2	acid	0.30	0.65	0.47	0.41
loperamide	0.43	0.07	0.85	280.67	2.58	0.03	0.07	2.42	1.04	9.41	basic	3.95	1.58	2.77	0.38
quinine	0.32	0.94	0.94	0.96	0.67	0.3	0.94	3.15	1.01	9.05	basic	3.92	1.57	2.74	0.37
thiopental	0.42 1)	0.09	0.93	214.83	2.49	0.2	0.16 2)	0.80	0.34		neutral	1.00	1.00	1.00	0.34
methimazole	0.91 1)	0.96	0.96	1.22	0.75	1	0.37 2)	0.37	0.34	5.4	basic	1.03	1.01	1.02	0.33
timolol	0.80	1.01	0.96	0.00	-1.14	0.9	1.01	1.12	0.90	9.8	basic	3.97	1.58	2.78	0.32
nimodipine	0.20	0.08	0.88	241.94	2.53	0.05	0.08	1.67	0.33	5.4	basic	1.03	1.01	1.02	0.32
streptomycin	0.56	1.00	0.96	0.00	-12.33	0.66	1.00	1.52	0.85	11.5	basic	3.98	1.58	2.78	0.31
minoxidil	0.76 1)	1.01	0.96	0.00	-2.12	1	1.06 2)	1.06	0.81	9.2	basic	3.93	1.58	2.76	0.29
pyrimethamine	0.32	0.25	0.91	65.48	2.09	0.12	0.25	2.09	0.66	7.8	basic	3.13	1.42	2.28	0.29
pantoprazole	0.03	0.20	0.82	83.04	2.17	0.02	0.20	10.21	0.29	9.5	acid	0.99	1.00	1.00	0.29
mepindolol sulfate	0.40	1.00	0.95	0.03	-0.51	0.5	1.00	1.99	0.80	9.7	basic	3.97	1.58	2.77	0.29
chloroquine	0.36	0.96	0.95	0.88	0.64	0.45	0.96	2.13	0.76	10.32	basic	3.98	1.58	2.78	0.27
encainide	1.00	0.18	0.94	99.24	2.23	0.258	0.18	0.71	0.71	9.5	basic	3.96	1.58	2.77	0.26
imipramine	1.00	0.16	0.93	118.60	2.29	0.225	0.16	0.70	0.70	9.2	basic	3.93	1.58	2.76	0.25
cefazolin	0.02	0.97	0.93	0.00	-4.96	0.2	0.97	4.86	0.11	3.03	acid	0.25	0.63	0.44	0.25
cefepodoxime proxetil	0.08	1.00	0.96	0.00	-3.91	0.725	1.00	1.38	0.11	3.22	acid	0.25	0.63	0.44	0.25
propylthiouracil	0.13 1)	0.82	0.93	4.01	1.15	0.18	0.31 2)	1.72	0.22	8.1	acid	0.88	0.94	0.91	0.25
fosfomycin	0.10	1.01	0.96	0.00	-3.14	1	1.01	1.01	0.10	1.6	acid	0.25	0.63	0.44	0.23
methotrexate	0.045 1)	1.00	0.95	0.00	-6.38	0.5	1.01 2)	2.02	0.09	3.4	acid	0.25	0.63	0.44	0.21
methylgonovine	0.30	0.94	0.96	1.38	0.79	0.64	0.94	1.47	0.44	7.9	basic	3.26	1.44	2.35	0.19
temazepam	0.18	0.04	0.86	523.72	2.79	0.04	0.04	1.01	0.18	10.7	acid	1.00	1.00	1.00	0.18
chlorothiazide	0.05	1.00	0.96	0.01	-0.9	0.6	1.00	1.67	0.08	6.5	acid	0.33	0.67	0.50	0.17
nicardipine	0.25	0.08	0.88	241.94	2.53	0.05	0.08	1.67	0.42	8.2	basic	3.57	1.50	2.54	0.16
haloperidol	0.70	0.04	0.90	479.07	2.76	0.08	0.04	0.55	0.38	8.05	basic	3.44	1.48	2.46	0.16
chlorpromazine	0.50	0.08	0.91	256.74	2.55	0.1	0.08	0.79	0.40	9.2	basic	3.93	1.58	2.76	0.14
desmopressin	0.20	1.00	0.95	0.00	-7.87	0.5	1.00	1.99	0.40	11.77	basic	3.98	1.58	2.78	0.14
clarithromycin	0.22 1)	0.29	0.95	53.19	2.02	0.54	0.89 2)	1.65	0.36	8.38	basic	3.70	1.53	2.61	0.14
metformin	0.48 1)	1.01	0.96	0.00	-5.66	1	0.80 2)	0.80	0.38	11.6	basic	3.98	1.58	2.78	0.14
zuclopenthixol	0.29	0.02	0.82	893.92	2.97	0.02	0.02	1.21	0.35	8.2	basic	3.57	1.50	2.54	0.14
rofecoxib	0.21 1)	0.08	0.91	264.48	2.56	0.13	0.08	0.59	0.12		neutral	1.00	1.00	1.00	0.12
lidocaine	0.40	0.21	0.94	85.55	2.18	0.3	0.21	0.69	0.27	7.8	basic	3.13	1.42	2.28	0.12
gentamicin	0.28	1.01	0.96	0.00	-12.65	0.85	1.01	1.18	0.33	9.9	basic	3.97	1.58	2.78	0.12
domperidone	0.25	0.06	0.90	377.75	2.68	0.08	0.06	0.69	0.17	7.03	basic	1.89	1.17	1.53	0.11
captopril	0.035 1)	1.00	0.96	0.00	-2.29	0.725	1.00	1.38	0.05	4	acid	0.25	0.63	0.44	0.11
carbenicillin	0.025 1)	1.00	0.95	0.00	-5.77	0.57	1.03 2)	1.81	0.05	3.3	acid	0.25	0.63	0.44	0.10
cephalexin	0.07	1.01	0.96	0.00	-2.32	0.86	1.01	1.17	0.09		neutral	1.00	1.00	1.00	0.09
amoxicillin	0.03	1.01	0.96	0.00	-2.49	0.8	1.01	1.26	0.04	3.23	acid	0.25	0.63	0.44	0.08
rifampin	0.20	0.04	0.91	523.72	2.79	0.11	0.04	0.37	0.07		neutral	1.00	1.00	1.00	0.07
bepidril	0.33	0.00	0.77	4859.59	3.54	0.01	0.00	0.45	0.15	9.16	basic	3.93	1.57	2.75	0.05
eliotriptan	0.25	0.08	0.92	272.46	2.57	0.15	0.08	0.50	0.13	8.37	basic	3.69	1.53	2.61	0.05
cefadroxil	0.01	1.00	0.96	0.00	-2.63	0.72	1.00	1.39	0.02	3.45	acid	0.25	0.63	0.44	0.04
aztreonam	0.01														

1) Koshimichi らの文献 [18]より引用し, それ以外は Hale らの教科書 [30]より引用した.

2) $f_{m,total}$ として実測データを利用, それ以外は $\log D_{7.2}, f_p$ の値より算出した. ピンク色は BCRP 基質を [40] [41] [42] [43] [44] [45], 青色は OCT1 基質を [34], 紫色は BCRP と OCT1 基質を [39] 示す. $M/P_{unbound} ratio$ は BCRP 基質では高値の薬物が多かった一方, OCT1 基質はむしろ低値であり, ヒトにおける BCRP と OCT1 の関与の違いは明らかであった.

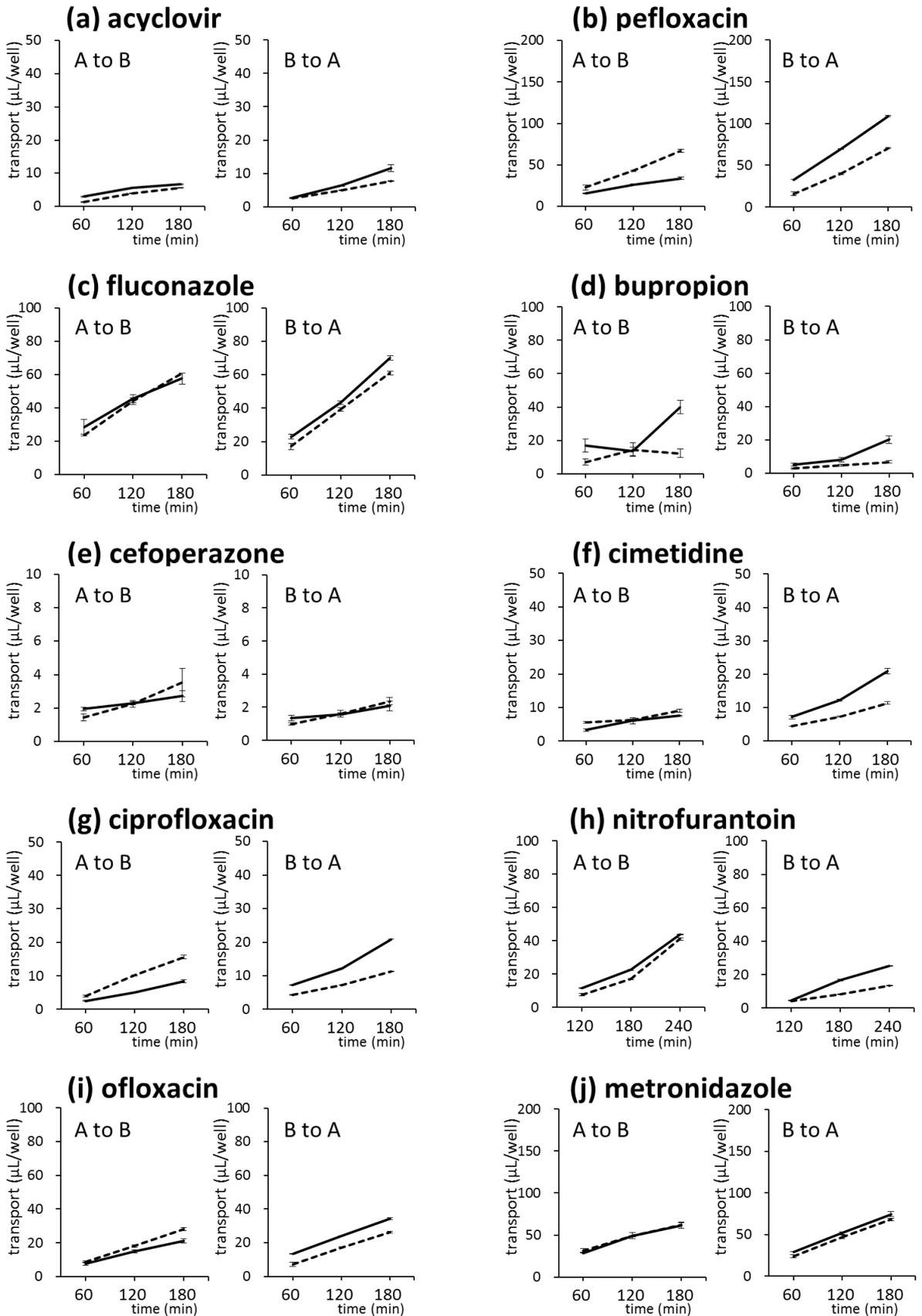
Table 7. ヒト $M/P_{unbound} ratio$ と BCRP および OCT1 基質の占める割合

$M/P_{unbound} ratio$	薬物数	うちBCRP基質数(%)		うちOCT1基質数(%)	
高 (>2.0)	36	10	27.8	2	5.6
中 (0.5-2.0)	80	4	5.0	2	2.5
低 (<0.5)	51	2	3.9	1	2.0

$M/P_{unbound} ratio$ が高値の薬物において BCRP 基質は相当数認めしたが, OCT1 基質はほとんど認めなかった. 一方でテルブタリンやメトホルミンなどの OCT1 基質は, マウスでは $M/P_{unbound}$ が予測値を上回っていたが, ヒトでは予測値を大きく下回っていた.

BCRP 高発現細胞を用いた *in vitro* 実験系における輸送活性評価

ここまでの検討により、ヒトにおいては主に BCRP が薬物の乳汁分泌に寄与し、基質薬物の $M/P_{unbound}$ が pH 分配のみから予測される値よりも大きくなると考えられた。そこで次に、BCRP による輸送活性を考慮することで $M/P_{unbound}$ 、ひいては M/P 比の予測精度が従来より行なわれてきた pH 分配のみを考慮したものに比べて改善するかについての検討を試みた。Table 6 に挙げた 167 種の薬物のうち、既知の BCRP 基質として 8 薬物（アシクロビル，ペフロキサシン，ブプロピオン，セフォペラゾン，シメチジン，シプロフロキサシン，ニトロフラントイン，オフロキサシン）および非基質として 4 薬物（フルコナゾール，メトロニダゾール，モクロベミド，ベラパミル）を選択し、BCRP 高発現 MDCK II 細胞を用いた *in vitro* 実験により BCRP 輸送活性を評価した (Figure 16)。それぞれ 60 分と 180 分間（ニトロフラントインのみ 120 分と 240 分間）の傾きから経細胞クリアランスを算出し、Basal→Apical のクリアランスを $CL_{B\rightarrow A}$ 、Apical→Basal のクリアランスを $CL_{A\rightarrow B}$ と定義した。両者の比である $CL_{B\rightarrow A}/CL_{A\rightarrow B}$ を efflux ratio とし、さらに BCRP アデノと GFP アデノの efflux ratio 比を BCRP/GFP efflux ratio として BCRP 輸送活性の指標とした。Table 8 にまとめたように、BCRP/GFP efflux ratio は BCRP 基質である 8 薬物では 1.0 を上回り、非基質である 4 薬物では 1.0 前後と低値であった。



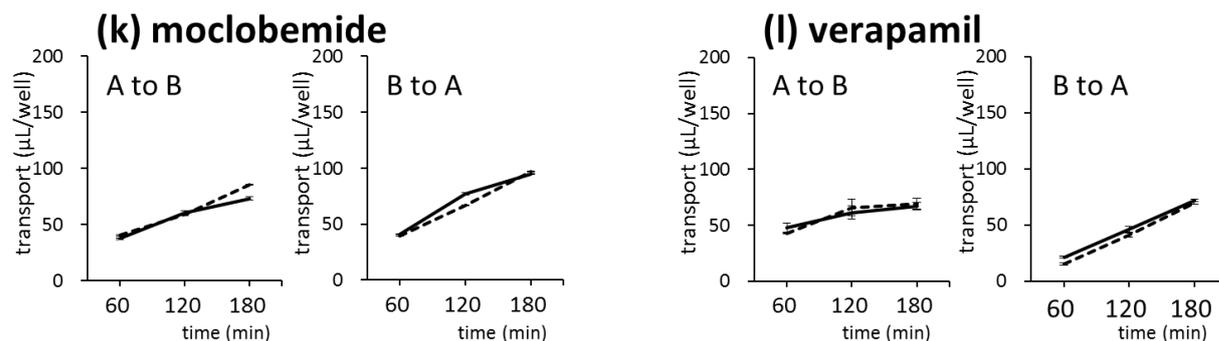


Figure 16. BCRP 高発現細胞における経細胞輸送の評価

実線は BCRP 高発現 MDCK II 細胞群 (BCRP 群) を, 点線は対照群である GFP 高発現 MDCK II 細胞群 (GFP 群) における Transwell を用いた継時的な方向性輸送結果を平均値±標準誤差で示した (n=3). アシクロビル(a), ペフロキサシン(b), フルコナゾール(c), ププロピオン(d), セフォペラゾン(e), シメチジン(f), シプロフロキサシン(g), ニトロフランチン(h), オフロキサシン(i), メトロニダゾール(j), モクロベミド(k), ベラパミル(l) の 12 薬物を検討した. A to B は apical to basal 方向への輸送を, B to A は basal to apical 方向への輸送を示す. BCRP 群と GFP 群を比較した場合, BCRP 基質である(a), (b)および(d)から(i)において, A to B 方向への輸送は継時的に輸送差が変化しないことが多いのに対して, B to A 方向への輸送は継時的に両群間差が大きくなる傾向を認めた. BCRP 基質でない(c)および(j)から(l)では, A to B 方向も B to A 方向も両群間での継時的輸送差は認めない.

Table 8. BCRP 高発現細胞で得られた各薬物の経細胞クリアランスと BCRP/GFP efflux ratio

	MDCK II / GFP			MDCK II / BCRP			BCRP/GFP efflux ratio	BCRP/GFP efflux ratio (補正後)
	CL _{A→B} (μL/h/well)	CL _{B→A} (μL/h/well)	efflux ratio (CL _{B→A} /CL _{A→B})	CL _{A→B} (μL/h/well)	CL _{B→A} (μL/h/well)	efflux ratio (CL _{B→A} /CL _{A→B})		
(a) acyclovir	2.1 ± 0.0	2.5 ± 0.0	1.2 ± 0.0	1.8 ± 0.0	4.4 ± 0.4	2.4 ± 0.2 **	2.0	2.5
(b) pefloxacin	22.1 ± 0.5	27.3 ± 1.0	1.2 ± 0.1	9.2 ± 0.8	38.0 ± 0.3	4.2 ± 0.4 **	3.4	3.4
(c) fluconazole	22.0 ± 0.0	21.9 ± 0.4	1.0 ± 0.1	15.4 ± 0.3	23.6 ± 0.1	1.5 ± 0.0	1.5	1.3
(d) bupropion	5.0 ± 0.0	2.0 ± 0.3	0.4 ± 0.1	7.7 ± 0.0	8.1 ± 0.0	1.1 ± 0.3 *	2.8	2.3
(e) cefoperazone	1.0 ± 0.3	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1	1.1 ± 0.2	1.4	2.4
(f) cimetidine	1.7 ± 0.3	3.5 ± 0.2	2.1 ± 0.2	2.1 ± 0.3	6.9 ± 0.1	3.4 ± 0.5 *	1.6	1.6
(g) ciprofloxacin	5.8 ± 0.4	4.9 ± 0.0	0.8 ± 0.0	2.9 ± 0.2	5.9 ± 0.1	2.1 ± 0.2 **	2.4	2.8
(h) nitrofurantoin	16.7 ± 0.6	4.5 ± 0.0	0.3 ± 0.0	16.1 ± 0.1	10.4 ± 0.1	0.6 ± 0.0 ***	2.4	5.4
(i) ofloxacin	9.6 ± 0.5	9.6 ± 0.3	1.0 ± 0.0	6.8 ± 0.3	10.4 ± 0.3	1.5 ± 0.1 *	1.5	3.3
(j) metronidazole	15.2 ± 0.5	22.1 ± 1.6	1.5 ± 0.1	16.3 ± 1.7	22.6 ± 1.5	1.4 ± 0.2	1.0	0.9
(k) moclobemide	22.6 ± 0.3	28.6 ± 0.5	1.3 ± 0.0	17.9 ± 0.9	26.9 ± 0.3	1.5 ± 0.1	1.2	1.6
(l) verapamil	13.2 ± 1.9	27.3 ± 0.8	2.1 ± 0.2	13.6 ± 0.9	25.4 ± 0.5	1.9 ± 0.1	0.9	0.9

各薬物における BCRP 高発現 MDCK II 細胞 (MDCK II/BCRP) と対照群である GFP 高発現 MDCK II 細胞 (MDCK II/GFP) を用いた経細胞クリアランス, および輸送活性の指標である BCRP/GFP ratio を平均値±標準誤差で示した (n=3). アシクロビル(a), ペフロキサシン(b), フルコナゾール(c), ブプロピオン(d), セフォペラゾン(e), シメチジン(f), シプロフロキサシン(g), ニトロフラントイン(h), オフロキサシン(i), メトロニダゾール(j), モクロベミド(k), ベラパミル(l) の 12 薬物を検討した. BCRP/GFP efflux ratio は, BCRP 基質では 1 以上の高値であったが, BCRP 基質でない薬剤では 1 近傍の値であった. なお実験回による発現量補正を行い, BCRP/GFP efflux ratio (補正後) として示した. MDCK II/BCRP 群と対照群における efflux ratio において, p < 0.05 を*で, p < 0.01 を**で, p < 0.001 を***で示した.

BCRP の寄与を考慮したヒトにおける $M/P_{unbound}$ の予測

先の in vitro 実験により求められた BCRP/GFP efflux ratio において、理論上同じ条件で実験を施行するにもかかわらず、実際のトランスポーター発現量は実験回ごとに異なる。そこで基準薬物としてペフロキサシンを毎回組み込み、実験回による BCRP 発現量差を補正した (Table 8 最右列)。

続いて(a)から(c) の3薬剤における BCRP/GFP efflux ratio (補正值) と、ヒトにおける $M/P_{unbound}$ の観察値と予測値の比 $M/P_{unbound}$ ratio (Observed/Predicted) の関係を Figure 17 に示す。両者には正の相関が認められた ($y=0.7864x+0.0854$, $R^2=0.9999$)。

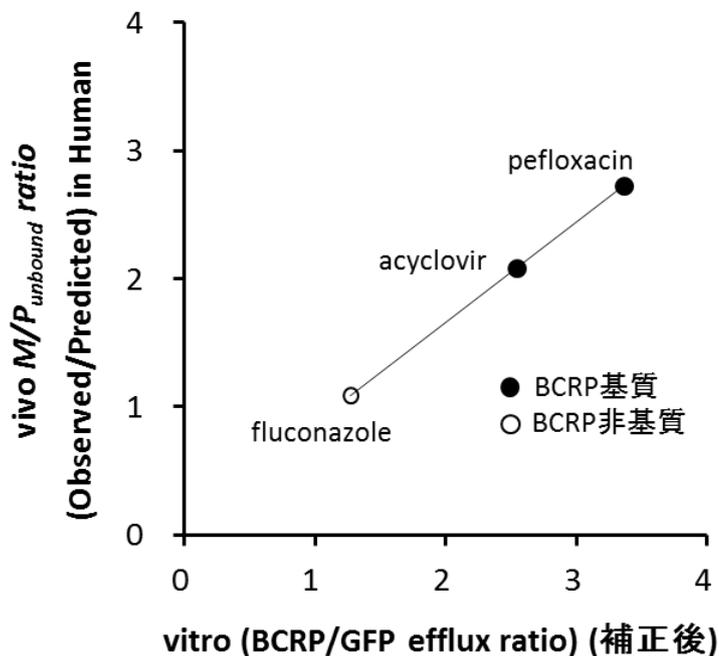


Figure 17. vitro における BCRP/GFP efflux ratio と vivo における $M/P_{unbound}$ ratio の相関

In vitro 実験で得られた BCRP/GFP efflux ratio (補正值) とヒト in vivo における $M/P_{unbound}$ ratio (Observed/Predicted) の間には正の相関が認められた ($y=0.7864x+0.0854$, $R^2=0.9999$) .

次にこうして得た in vitro から in vivo へのヒト $M/P_{unbound}$ 値の予測の妥当性を検討する目的で、残りの(d) から(l) の9薬物の M/P 比について、従来から提唱されている pH分配のみからの予測と、BCRP 高発現細胞系で得られた BCRP/GFP efflux ratio の値を考慮した予測とで、どの程度予測が改善するかを検証した。即ち、Figure 17 より得られた回帰式 ($y=0.7864x + 0.0854$, ただし y は $M/P_{unbound}$ ratio、 x は BCRP/GFP efflux ratio [補正值]) により、薬物毎の y 値を補正係数として算出し、これを次式のように M/P 値の予測式に組み込んだ。

$$M/P_{predicted} = M / P_{unbound predicted} / \frac{f_{m, total}}{f_p} \times \text{補正係数}$$

補正前と補正後の結果を Figure 18 に示す。前者において予測値と観測値の相関係数 $R^2=0.1055$ であったのに対し、後者の方法、すなわち BCRP による輸送活性を組み込むことにより、最終的な予測値と観測値の相関は $R^2=0.8770$ と大幅に改善することが示された。

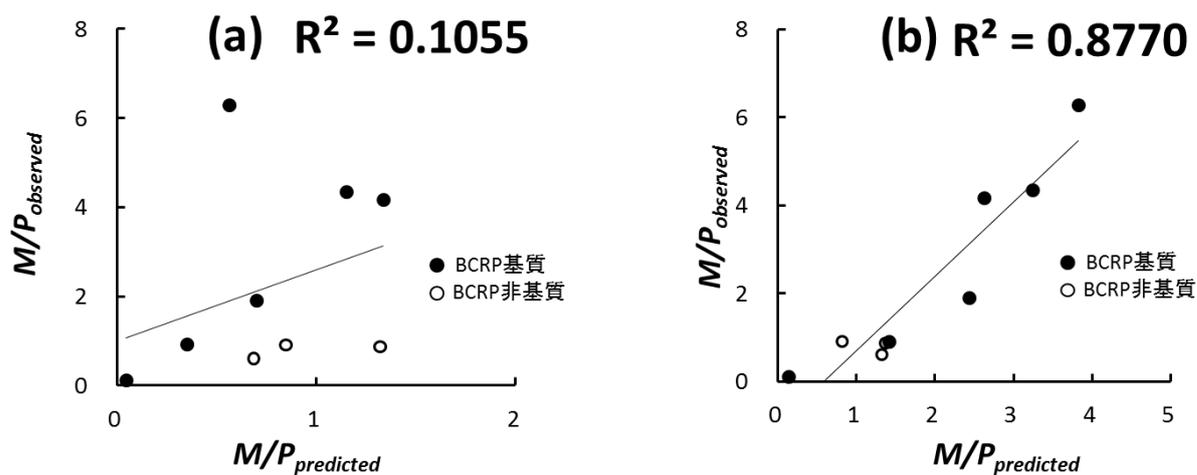


Figure 18. ヒト BCRP の寄与を考慮することで M/P 比の予測精度が向上する pH 分配のみからの MP 予測 (a) と BCRP の輸送を考慮した M/P 比の予測 (b) を示す. BCRP の寄与を考慮した予測により, 相関係数 $R^2=0.1055$ から $R^2=0.8770$ へと予測精度が大きく改善した.

考察

本研究を通じて以下のことが示された。

1. 薬物乳汁移行に関するヒト-マウス間の網羅比較と、相違を生じる要因

分析を行った結果、ヒトとマウスの間で M/P 比の値には種差が認められ、多くの薬物でマウスはヒトに比べて高値となることが初めて示された。また、種差を生じる要因として主に、乳汁中蛋白および脂質濃度がヒトに比べマウスで高いことが影響していると考えられた。

2. 薬物乳汁移行へのトランスポーター関与についての各種ノックアウト

マウスを用いた解析から、マウスにおいて $M/P_{unbound}$ が受動拡散のみから予測されるよりも3倍以上高い薬物のうち5種について、**Bcrp** ならびに **Oct1** の寄与で説明可能であり、従来より関与の知られている **Bcrp** に加え、**Oct** ファミリーも薬物乳汁分泌に関与することを初めて実証した。また、トランスポーターの寄与にはヒトとマウスで種差があり、マウスでは **Bcrp** と **Oct1** の両方の寄与が明確となったが、ヒトでは **BCRP** の寄与しか観察されず、**OCT1** の寄与はほとんど認められなかった。

3. ヒトにおけるトランスポーターの薬物乳汁移行への寄与と予測精度改

善への応用に向け、上記で得られた結果を踏まえ、**BCRP** による輸送活性を考慮することでヒトにおける薬物の乳汁移行予測精度が改善される可能性が示され

た。

上記 3 項目について以下に順次考察を加える。

1. 薬物乳汁移行に関するヒトーマウス間の網羅比較と相違を生じる要因

分析

本研究では、ヒトで比較的 M/P の値が精度よく実測されている薬物のうち 32 種類について、マウスでの M/P 比測定、ならびに *in vitro* 添加回収実験による血漿中、乳汁中非結合型分率の実測を通じ、 M/P 比の種差、ならびにその要因について網羅的に精査した。ヒトに比べマウスでは調査した各薬物の M/P のマウスとヒトでの比は中央値が 2.03 とマウスのほうが高値であったが、これについては、マウスで乳汁中蛋白濃度や脂質濃度が高いことに起因すると考えられた。実際にこれら要因を補正後の $M/P_{unbound}$ について各薬物でヒトとマウスでの比を求めたところ、その中央値はほぼ 1 に等しいことから、膜透過過程について一部の例外薬物を除き、種差は大きくないものと考えられた。全体的に $f_{m,total}$ はマウスで低い一方、 f_p はヒトとマウス間の種差を認めていない。 $f_{m,total}$ は蛋白と脂質分配の両方の要素を含むが、それぞれ蛋白結合単独の指標である f_m 値、脂質分配単独の指標である K_f 値ともにマウスではヒトに比べて低い傾向を示したことから、 $f_{m,total}$ の種差は蛋白および脂質含量の違いの両者の寄与で説明しうる

と考えられた。今回用いた乳汁中の平均蛋白濃度は、ヒト 13.9 mg/dl に対してマウス 92.0 mg/ml であり、先行研究における 9.2 mg/ml (ヒト) [46]、97.0-213.6 mg/ml (マウス) [47] とほぼ同様にヒトに比べてマウスが高値であった。乳汁中の主な薬物の結合蛋白である乳汁中アルブミン濃度はヒトで 0.5 mg/ml に対して [48]、マウスでは 4.8-10.2 mg/ml と [49]、10 倍以上高い。一方で血漿中のアルブミン濃度はヒト、マウスでそれぞれ 44 mg/ml、38 mg/ml と報告されているように種差が大きくなり [50] [51]、各薬物で今回実測した f_p の値がヒトとマウス間で種差を認めない結果と矛盾しなかった。一方、乳汁中の脂質含量については種差が大きいことが知られている (後述)。今回実験に用いた乳汁における脂質含有もヒトでは 4.5% であったのに対し、マウスでの実測値は 18-22% と 5 倍程度高かった。一般に同一個体内においても授乳時期による蛋白質や脂質濃度の変化はよく知られているが、いずれも変動幅は大きくても 2 倍以内であり [52]、マウスでの搾乳時期を適宜調整したとしても、ヒトとマウス間に存在する濃度差を無視できる程に抑えることは不可能と考えられる。Table 9 に示すように、脂質や蛋白濃度がヒトに近い哺乳動物としてはヤギが挙げられるが、解剖学的に乳腺槽と呼ばれるヒトには無いタンクを有するなどヒトへの外挿性については困難が予想される [53]。一方、サルはヒトと同様に乳腺槽を有さず、蛋白質および脂質濃度もヒトに近いことが知られるが [9] [54]、乳汁移行実験での

扱いやすさ、費用等の問題を考えると、実際にこれを応用していくことは困難である。

Table 9. 哺乳動物種と乳汁成分の違い [9]

動物種	水分(g/dL)	脂質(g/dL)	炭水化物(g/dL)	蛋白質(g/dL)
ヒト	87	3.5	6.5	1.5
ウシ	87	4	4.8	3.5
ヤギ	88	4.5	4.1	2.9
イヌ	6	9.5	3.5	9.5
ウサギ	74	12	2	13
ラット	72	14	3.2	9
サル	88	2.5	6.4	2.2

さらにこうした乳汁成分の種差だけでなく、本研究の後半で明らかとしたトランスporter寄与の種差も存在することから、薬物の乳汁移行において動物実験データをヒトにそのまま外挿することは現時点で困難であり、科学的妥当性、さらには動物愛護の観点からも何らか別の手段を用いて予測を行う必要があると考えられた。これについては、後述するトランスporterの関与を考慮した *in vitro* データからの予測法が一つの代替案として考えられる。

2. 薬物乳汁移行へのトランスポーター関与についての各種ノックアウト

マウスを用いた解析

今回、マウスで M/P を実測し、非結合型の濃度比として算出した $M/P_{unbound}$ について多くの薬物でヒトとの間に比較的種差がなく、ヒトとマウスでほぼ 1 前後に集約する傾向を認めた。この結果は乳汁移行が多くの薬物において pH 分配によるとの一般的な認識と合致する [9] [55]。一方、これから外れる例外的な薬物の存在もよく知られる [56] [57] [58]。今回のマウスおよびヒトでの解析をもとに、最終的に非対称性輸送、特に分泌方向に働くトランスポーターの関与がヒトあるいはマウスのいずれかで想定された薬物 10 種について、乳汁移行への関与が確立されている BCRP/Bcrp [26]、さらには BCRP と同様に授乳期に発現誘導される特徴を有する OCT/Oct ファミリー [21] に焦点をあてた解析を行った。

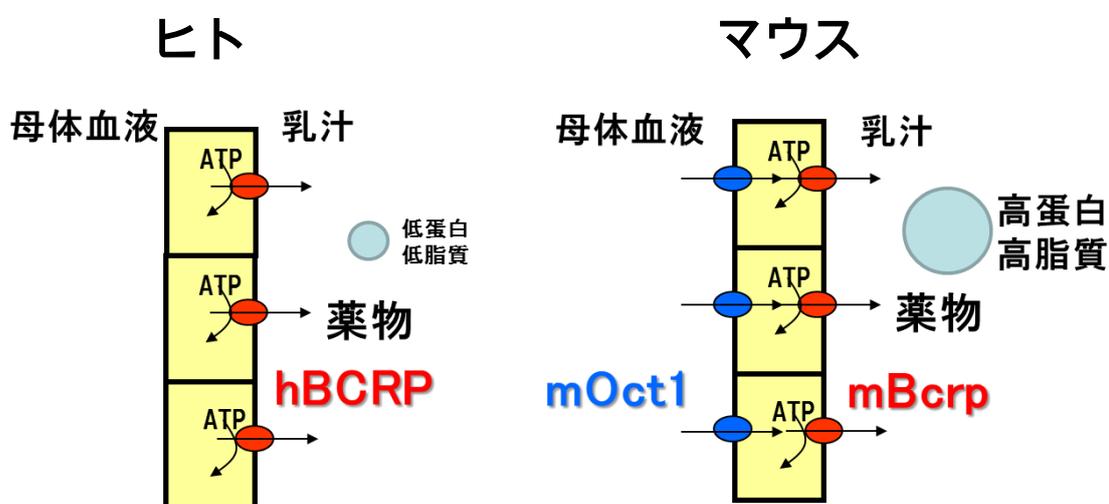
後半で解析対象とした 10 種の薬物のうち、シメチジンはマウス、ヒトそれぞれで $M/P_{unbound}$ が 6.42, 4.51 と pH 分配から予測される値 1.43 に比べて数倍高く、これについては BCRP/Bcrp が寄与すると考えられた。シメチジンは Oct1 の基質でもあることがヒト、マウスいずれにおいても確認されており、実際に Oct1/2 DKO マウスではほぼ同程度、かつ pH 分配から予測される程度まで M/P 比が低下したことから、シメチジンについては少なくともマウスにおいては、Oct1 と Bcrp

の両者が乳汁移行に関与しているものと考えられた。同様にアシクロビルについても **Bcrp** と **Oct1/2** の両基質となり [33] [39]、実際にそれぞれの **KO** マウスで **M/P** 比は低下することが確認された。**Bcrp** は乳腺上皮細胞の乳汁側の膜に局在することが免疫染色で確認されており [33]、乳腺上皮細胞から乳汁中への基質輸送に働いていると考えられる。一方、**Oct1** については乳腺上皮細胞における局在情報が無いが、シメチジン、アシクロビル、メトホルミン、そして今回初めて基質として見出されたテルブタリンの **DKO** マウスでの結果より、**Oct1** は血管側膜に局在し、血液から乳腺上皮細胞への取り込み過程に働いているものと推察される。これはヒト初代培養乳腺上皮細胞におけるカチオン取り込み輸送体の発現が血管側膜に特徴的に見出されるという過去のデータと矛盾しない [59] が、ヒトとマウスの種差、培養による影響など慎重に考慮する必要があるため、**Oct1** の乳腺上皮における局在については抗体を用いた組織染色などによる、より直接的な証明が必要である。今回の検討から **Figure 12** に示すように、マウスにおいて **Oct1** の薬物乳汁移行への関与は明確となったが、一方でヒトにおける **OCT1** の関与については否定的な結果となった。その原因は現時点で不明であるが、考えられる要因として少なくとも 2 点挙げることが可能である。一つ目は **OCT1** のヒト乳腺における発現量が授乳期でもそれほど高くない可能性、二つ目は **OCT1** の局在がマウスとは逆に乳腺上皮細胞の管腔側であるとい

う可能性である。前者については実際のところ、OCT1 の授乳期におけるヒト乳腺での発現誘導に関するデータはこれまで一報しか報告がなく [21]、かつその測定方法についても直接的に乳腺組織を採取可能な実験動物を用いた解析に比較して決して精度の高い方法とはいえない。すなわち、ヒト乳腺における OCT1 の発現誘導データは、母乳中に含まれる一部剥離脱落した乳腺上皮細胞を遠心により収集し、これから RNA を抽出して得たデータであり、また非授乳期のサンプルについては乳癌患者における外科切除の際の非癌部組織を用いている。これに対し、我々も含め多くの報告でマウスその他の実験動物では直接的に出産直前、出産後の乳腺組織を十分量採取して mRNA の定量を行っている。従って、動物に比べてヒトでのトランスポーター発現誘導のデータについてはサンプル間でのばらつきも大きいことが予想され、再現性等を含め更なるデータ集積を行なった上での慎重な議論が必要と考えられる。また、後者の可能性については、OCT1 の基質であるメトホルミン、テルブタリンのヒトにおける $M/P_{unbound}$ の実測値が pH 分配から予測される値に比べてむしろ低く（メトホルミン：実測値 0.52 vs 予測値 2.78、テルブタリン：実測値 1.63 vs 予測値 2.77）、いったん乳汁に分泌された薬物が OCT1 により細胞内に再取り込みされると考えると矛盾しない。OCT1 は肝臓や腎臓を含む他の臓器では血管側膜に発現することが示されているが [60]、興味深いことに最近の報告で、消化管では逆に管腔側

に発現することが示されており [61]、ヒト乳腺における OCT1 の局在についてはマウスとの種差、さらには臓器特異的な局在方向の違いの可能性も含めて明らかにしていく必要がある。

Figure 19. 乳腺において薬物の乳汁移行に寄与するトランスポーター



薬物の乳汁移行においては血漿・乳汁中の蛋白質および脂質含量の違いに伴う種差と同時に、トランスポーターを考慮する必要がある。

3. ヒトにおけるトランスポーターの薬物乳汁移行への寄与と予測精度改善への応用

一連の検討から、動物データをヒトの乳汁移行にそのまま当てはめることはできないことが示された。その理由として大きく二つに分けられ、一つめとして乳汁中薬物の非結合型分率を支配する蛋白濃度、脂質濃度の量的種差、二つめは非対称輸送に関わるトランスポーター寄与に関する質的種差である (Figure 19)。前者については授乳婦ボランティアより得た乳汁サンプルに薬物を添加し、適切な分離と前処理により乳汁中の非結合分率を実測することが可能であり、動物実験に依存しない方法を用いることで種差の問題を解決しうる。一方、膜透過過程について、ヒト乳腺上皮を再現した培養細胞の利用が考えられ、現時点で報告されている細胞系でそれに最も近いものとしては、ヒト乳腺組織より採取されたヒト初代乳腺培養細胞 hMEC が存在する [59]。しかしこれについてはトランスポーター発現プロファイルなどの基礎データが不足しており、乳腺上皮細胞の膜透過を予測する上での有用性については不明である。我々が後半で行なった、臨床で M/P 比が報告されている薬物の $M/P_{unbound}$ の実測値と、pH 分配からの予測値との比較整理により、これまで一部の基質薬物のみで乳汁分泌への関与は示唆されながらも薬物一般における寄与の程度は不明であった BCRP のヒトにおける乳汁移行への寄与の全容を、初めて明確化することができ

た (Table 6)。さらにマウスでは寄与の明らかであった OCT1 がヒトではほとんど薬物の乳汁分泌に寄与しないことも明らかとなり、現時点では少なくとも、pH 分配から予測される値よりも 3 倍以上高く乳汁に移行する薬物についてはその 27.8%の薬物種が BCRP による輸送で説明された。そして、最終的に BCRP による輸送の程度を *in vitro* 実験により見積もることで、ヒトにおける乳汁移行の予測精度が改善される可能性が示された。

BCRP の一塩基多型 (SNPs) に関しても、日本人におけるアレル頻度は比較的高く、臨床的に興味深い。BCRP と痛風の関連性においては、その臨床的意義が報告されている[62]。すなわち、BCRP 機能半減変異である 421C>A (Q141K) アレル頻度は日本人の 31.9%と高い[63]。この Q141K 変異を有する日本人では、野生型と比較してヘテロ変異やホモ変異を有する場合において、腎臓や消化管などからの尿酸排泄機構が低下するために血中尿酸値が上昇することが実証されている。また機能消失変異である 376C>T (Q126X) アレル頻度も日本人では 2.8%に認められ、Q141K とともに痛風発症リスクの上昇が報告されている。こうした SNPs とヒト乳腺での薬物排泄における検討は未だなされておらず興味深い。ただし、BCRP 機能低下に伴い乳児への薬物曝露は減少することが予想されることから、臨床的に乳児側にはあまり問題とならないと予想される。

新薬の承認申請時に *M/P* 比のデータ添付は義務ではなく、授乳婦での臨床試

験についても倫理面からその実施は極めて困難である。そのため多くの薬でヒトにおける乳汁移行データが無く、添付文書では実験動物における乳汁移行有無についての定性的記載に留まっているのが現状である。Table 6 にまとめたヒトで *M/P* 比データの報告されている 167 の薬物についてもその多くが数十年以上前に承認された古い薬物が占め、これらも一定の基準と例数を満たした臨床試験によるデータではなく、偶然あるいは必要に迫られて投与された授乳婦で得られた希少データの集積の結果である。承認から間もない比較的歴史の浅い薬、今後承認される薬については特にデータが不足し、予測の必要性・重要性は引き続き高いものと思われる。今回の結果を踏まえると、少なくとも蛋白・脂質含量がヒトより高く、かつヒトでは寄与の無い Oct1 が乳汁移行に積極的に関与するマウスを用いて得られるデータは、一般にヒトよりも高値に出るものと予想される。ヒトでの予測においては、ヒト血漿、ヒト乳汁を用いた非結合率の *in vitro* での実測値、さらにはヒトで寄与の高い BCRP に着目した *in vitro* 輸送実験での実測値を組み合わせることで、動物データからの外挿、あるいは既存の pH 分配のみを想定した予測に比べ、その予測精度は改善するものと期待される (Figure 20)。また、動物実験に依存しない本予測法は、医薬品開発における実験動物利用の縮小化という時代の流れとも合致し、その点においても有用と考えられる。

今後は、この *in vitro* 実験系を用いてヒト *M/P* (*AUC*)情報のある 65 薬物においてより多くの薬物における検討を深める必要があると思われ、これにより本予測式の妥当性や予測精度をさらに向上させる必要性があると考えられる。なぜなら倫理的にも臨床データが得にくく、動物実験データも直接使用しにくい現状において、**BCRP** 基質となる薬物では新生児への曝露量がより多くなるため、臨床データを得ることがますます困難となることが予想されるからである。また新薬など **BCRP** 基質かどうか不明の薬物においても、*in vitro* 実験値のみを用いて予測可能な本式の臨床的意義は決して低くなく、乳汁移行性の判定材料の一つとなりうるからである。ただし、今回初めてトランスポーター寄与を考慮した予測式を提唱したが、あらゆる薬物の予測が本式で解決するとも思われず限界があるであろう。**BCRP** や **OCT** 以外のさらに新たなトランスポーター寄与の有無も含めた検討を深めることにより、予測式の精度がますます向上する可能性も期待される。このように、薬物の乳汁移行性に関して受動拡散だけでなくトランスポーターを考慮した予測を深め、データを集積することにより、これからの授乳婦に対する薬物療法への情報源の一助となるようさらに努めていきたいと思う。

Figure 20. 新たな M/P の予測式

$$M/P = M / P_{unbound, predicted} / \frac{f_{m, total}}{f_p} \times \text{補正係数}$$

pH分配による予測
(in silico)
添加回収実験
(血漿, 乳汁)
(in vitro)
BCRP高発現細胞での
方向性輸送実験
(in vitro)

従来より行われてきた動物データからの外挿，pH分配のみを考慮した予測法に比べて，BCRPに着目した方向性輸送実験や，ヒト血漿，乳汁を用いた添加回収実験などの *in vitro* データ、さらに既存の pH 分配式からの予測を組み合わせることで、薬物の M/P 比の予測精度は改善が期待される。

結論

薬物の乳汁移行にはヒトとマウスの間で種差を認め、これには主にマウス乳汁において高い蛋白濃度ならびに脂質含量が影響していること、さらには寄与するトランスポーター分子種の違いが原因であることが示された。特にトランスポーターの寄与については、ヒトでは現時点では唯一 **BCRP** のみが基質薬物の分泌方向に寄与することが確認され、この点を考慮することで乳汁移行の予測精度が改善される可能性が示された。

引用文献

1. Sachs HC; Committee On Drugs. The transfer of drugs and therapeutics into human breast milk: an update on selected topics. *Pediatrics*. 132: e796-809 (2013).
2. Policy Statement. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics*. 129: e827-841 (2012).
3. Menache A. Trends in animal use and replacement in the 'Three Is' of industry. *Altern Lab Anim*. 40: 20-1 (2012).
4. Alcorn J, McNamara PJ. Ontogeny of hepatic and renal systemic clearance pathways in infants: part II. *Clin Pharmacokinet*. 41: 1077-94 (2002).
5. Ilett KF, Kristensen JH. Drug use and breastfeeding. *Expert Opin Drug Saf*. 4: 745-68 (2005).
6. Lawrence RA, Lawrence RM. Anatomy of the human breast. In: Breastfeeding. A guide for the medical profession. 6th ed., Elsevier Mosby, Philadelphia; 39-63 (2005).
7. McManaman JL, Neville MC. Mammary physiology and milk secretion. *Adv Drug Deliv Rev*. 55: 629-41 (2003).
8. Hovey RC, Trott JF, Vonderhaar BK. Establishing a Framework for the Functional Mammary Gland: From Endocrinology to Morphology. *J Mammary Gland Biol*

- Neoplasia*. 7: 17-38 (2002).
9. Fleishaker JC. Models and methods for predicting drug transfer into human milk. *Adv Drug Deliv Rev*. 55: 643-652 (2003).
 10. Atkinson HC, Begg EJ. Prediction of drug concentrations in human skim milk from plasma protein binding and acid-base characteristics. *Br J Clin Pharmacol*. 25: 495-503 (1988).
 11. Atkinson HC, Begg EJ. Relationship between human milk lipid-ultrafiltrate and octanol-water partition coefficients. *J Pharm Sci*. 77: 796-8 (1988).
 12. Atkinson HC, Begg EJ. Prediction of drug distribution into human milk from physicochemical characteristics. *Clin Pharmacokinet*. 18: 151-67 (1990).
 13. Begg EJ, Atkinson HC, Duffull SB. Prospective evaluation of a model for the prediction of milk:plasma drug concentrations from physicochemical characteristics. *Br J Clin Pharmacol*. 33: 501-5 (1992).
 14. Larsen LA, Ito S, Koren G. Prediction of milk/plasma concentration ratio of drugs. *Ann Pharmacother*. 37: 1299-306 (2003).
 15. Katritzky AR, Dobchev DA, Hür E, Fara DC, Karelson M. QSAR treatment of drugs transfer into human breast milk. *Bioorg Med Chem*. 13: 1623-32 (2005).
 16. Agatonovic-Kustrin S, Ling LH, Tham SY, Alany RG. Molecular descriptors that

- influence the amount of drugs transfer into human breast milk. *J Pharm Biomed Anal.* 29: 103-19 (2002).
17. Zhao C, Zhang H, Zhang X, Zhang R, Luan F, Liu M, Hu Z, Fan B. Prediction of milk/plasma drug concentration (M/P) ratio using support vector machine (SVM) method. *Pharm Res.* 23: 41-8 (2006).
18. Koshimichi H, Ito K, Hisaka A, Honma M, Suzuki H. Analysis and prediction of drug transfer into human milk taking into consideration secretion and reuptake clearances across the mammary epithelia. *Drug Metab Dispos.* 39: 2370-2380 (2011).
19. Giacomini KM, Sugiyama Y. Membrane transporters and drug response. In: Laurence B, Bruce C, Bjorn K., editors. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 12th ed., *McGraw-Hill, New York*; 89-123 (2011).
20. Ito S, Alcorn J. Xenobiotic transporter expression and function in the human mammary gland. *Adv Drug Deliv Rev.* 55: 653-65 (2003).
21. Alcorn J, Lu X, Moscow JA, McNamara PJ. Transporter gene expression in lactating and nonlactating human mammary epithelial cells using real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Pharmacol Exp Ther.* 303: 487-496

- (2002).
22. Gerk PM, Oo CY, Paxton EW, Moscow JA, McNamara PJ. Interactions between cimetidine, nitrofurantoin, and probenecid active transport into rat milk. *J Pharmacol Exp Ther.* 296: 175-80 (2001).
 23. Ieiri I. Functional significance of genetic polymorphisms in P-glycoprotein (MDR1, ABCB1) and breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2). *Drug Metab Pharmacokinetics.* 27: 85-105 (2012).
 24. Robey RW, To KK, Polgar O, Dohse M, Fetsch P, Dean M, Bates SE. ABCG2: a perspective. *Adv Drug Deliv Rev.* 61: 3-13 (2009).
 25. Jonker JW, Merino G, Musters S, van Herwaarden AE, Bolscher E, Wagenaar E, Mesman E, Dale TC, Schinkel AH. The breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2) concentrates drugs and carcinogenic xenotoxins into milk. *Nat Med.* 11: 127-129 (2005).
 26. van Herwaarden AE, Schinkel AH. The function of breast cancer resistance protein in epithelial barriers, stem cells and milk secretion of drugs and xenotoxins. *Trends Pharmacol Sci.* 27: 10-6 (2006).
 27. Merino G, Jonker JW, Wagenaar E, van Herwaarden AE, Schinkel AH. The breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) affects pharmacokinetics, hepatobiliary

- excretion, and milk secretion of the antibiotic nitrofurantoin. *Mol Pharmacol.* 67: 1758-64 (2005).
28. Groneberg DA, Döring F, Theis S, Nickolaus M, Fischer A, Daniel H. Peptide transport in the mammary gland: expression and distribution of PEPT2 mRNA and protein. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 282: E1172-9 (2002).
29. Ritzel MW, Ng AM, Yao SY, Graham K, Loewen SK, Smith KM, Hyde RJ, Karpinski E, Cass CE, Baldwin SA, Young JD. Recent molecular advances in studies of the concentrative Na⁺-dependent nucleoside transporter (CNT) family: identification and characterization of novel human and mouse proteins (hCNT3 and mCNT3) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides (system cib). *Mol Membr Biol.* 18: 65-72 (2001).
30. Hale TW. Preface. In: Medications and Mothers' Milk, 13th ed., *Hale publishing, Amarillo*; 5-20 (2008).
31. Koepsell H, Lips K, Volk C. Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharm Res.* 24: 1227-51 (2007).
32. Lee WK, Wolff NA, Thévenod F. Organic cation transporters: physiology, toxicology and special focus on ethidium as a novel substrate. *Curr Drug Metab.* 10:

- 617-31 (2009).
33. Jonker JW, Schinkel AH. Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: OCT1, 2, and 3 (SLC22A1-3). *J Pharmacol Exp Ther.* 308:2-9 (2004).
34. Nies AT, Koepsell H, Damme K, Schwab M. Organic cation transporters (OCTs, MATEs), in vitro and in vivo evidence for the importance in drug therapy. *Handb Exp Pharmacol.* 201: 105-67 (2011)
35. Gilchristand SE, Alcorn J. Lactation stage-dependent expression of transporters in rat whole mammary gland and primary mammary epithelial organoids. *Fundam Clin Pharmacol.* 24: 205-214 (2010).
36. Vlaming ML, Lagas JS, Schinkel AH. Physiological and pharmacological roles of ABCG2 (BCRP): recent findings in Abcg2 knockout mice. *Adv Drug Deliv Rev.* 61: 14-25 (2009).
37. Jonker JW, Wagenaar E, Mol CA, Buitelaar M, Koepsell H, Smit JW and Schinkel AH. Reduced hepatic uptake and intestinal excretion of organic cations in mice with a targeted disruption of the organic cation transporter 1 (Oct1 [Slc22a1]) gene. *Mol Cell Biol.* 21: 5471-5477 (2001).
38. Wang DS, Jonker JW, Kato Y, Kusuhara H, Schinkel AH, Sugiyama Y. Involvement

- of organic cation transporter 1 in hepatic and intestinal distribution of metformin. *J Pharmacol Exp Ther.* 302: 510-515 (2002).
39. Takeda M, Khamdang S, Narikawa S, Kimura H, Kobayashi Y, Yamamoto T, Cha SH, Sekine T, Endou H. Human organic anion transporters and human organic cation transporters mediate renal antiviral transport. *J Pharmacol Exp Ther.* 300: 918-24 (2002).
40. Hasegawa M, Kusuhara H, Adachi M, Schuetz JD, Takeuchi K, Sugiyama Y. Multidrug resistance-associated protein 4 is involved in the urinary excretion of hydrochlorothiazide and furosemide. *J Am Soc Nephrol.* 18: 37-45 (2007).
41. Kato Y, Takahara S, Kato S, Kubo Y, Sai Y, Tamai I, Yabuuchi H, Tsuji A. Involvement of multidrug resistance-associated protein 2 (Abcc2) in molecular weight-dependent biliary excretion of beta-lactam antibiotics. *Drug Metab Dispos.* 36: 1088-96 (2008).
42. Hemauer SJ, Patrikeeva SL, Wang X, Abdelrahman DR, Hankins GD, Ahmed MS, Nanovskaya TN. Role of transporter-mediated efflux in the placental biodisposition of bupropion and its metabolite, OH-bupropion. *Biochem Pharmacol.* 80: 1080-6 (2010).
43. Meyer zu Schwabedissen HE, Kroemer HK. In vitro and in vivo evidence for the

- importance of breast cancer resistance protein transporters (BCRP/MXR/ABCP/ABCG2). *Handb Exp Pharmacol.* 201: 325-71 (2011).
44. Beery E, Rajnai Z, Abonyi T, Makai I, Bansaghi S, Erdo F, Sziraki I, Heredi-Szabo K, Kis E, Jani M, Marki-Zay J, Toth GK, Krajcsi P. ABCG2 modulates chlorothiazide permeability--in vitro-characterization of its interactions. *Drug Metab Pharmacokinet.* 27: 349-353 (2012).
45. Nakanishi H, Yonezawa A, Matsubara K, Yano I. Impact of P-glycoprotein and breast cancer resistance protein on the brain distribution of antiepileptic drugs in knockout mouse models. *Eur J Pharmacol.* 710: 20-28 (2013).
46. Mitoulas LR, Kent JC, Cox DB, Owens RA, Sherriff JL, Hartmann PE. Variation in fat, lactose and protein in human milk over 24 h and throughout the first year of lactation. *Br J Nutr.* 88: 29-37 (2002).
47. Piletz JE, Ganschow RE. Genetic variation of milk proteins in mice. *Biochem Genet.* 19: 1023-1030 (1981).
48. Montagne P, Cuilliere ML, Mole C, Bene MC, Faure G. Immunological and nutritional composition of human milk in relation to prematurity and mother's parity during the first 2 weeks of lactation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 29: 75-80 (1999).
49. Boumahrou N, Andrei S, Miranda G, Henry C, Panthier JJ, Martin P, Bellier S. The

- major protein fraction of mouse milk revisited using proven proteomic tools. *J Physiol Pharmacol.* 60 Suppl 3: 113-118 (2009).
50. Bezerra FF, Laboissiere FP, King JC, Donangelo CM. Pregnancy and lactation affect markers of calcium and bone metabolism differently in adolescent and adult women with low calcium intakes. *J Nutr.* 132: 2183-2187 (2002).
51. Stock B, Dean M, Levy G. Serum protein binding of drugs during and after pregnancy in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 212: 264-268 (1980).
52. Aoki N, Yamaguchi Y, Ohira S, Matsuda T. High fat feeding of lactating mice causing a drastic reduction in fat and energy content in milk without affecting the apparent growth of their pups and the production of major milk fat globule membrane components MFG-E8 and butyrophilin. *Biosci Biotechnol Biochem.* 63:1749-55 (1999).
53. Bruckmaier RM, Blum JW. B-mode ultrasonography of mammary glands of cows, goats and sheep during alpha- and beta-adrenergic agonist and oxytocin administration. *J Dairy Res.* 59: 151-9 (1992).
54. Sakakura T. Embryogenesis. In: Neville MC, Daniel CW., editors. *The Mammary Gland Development, Regulation and Function, Plenum, New York*; 37-66 (1987).
55. Miller GE, Banerjee NC, Stowe CM Jr. Diffusion of certain weak organic acids and

- bases across the bovine mammary gland membrane after systemic administration. *J Pharmacol Exp Ther.* 157: 245–253 (1967).
56. Dostal LA, Weaver RP, Schwetz BA. Excretion of high concentrations of cimetidine and ranitidine into rat milk and their effects on milk composition and mammary gland nucleic acid content. *Toxicol Appl Pharmacol.* 102: 430-42 (1990).
57. McNamara PJ, Burgio D, Yoo SD. Pharmacokinetics of cimetidine during lactation: species differences in cimetidine transport into rat and rabbit milk. *J Pharmacol Exp Ther.* 261: 918-923 (1992).
58. Gerk PM, Oo CY, Paxton EW, Moscow JA, McNamara PJ. Interactions between cimetidine, nitrofurantoin, and probenecid active transport into rat milk. *J Pharmacol Exp Ther.* 296: 175-180 (2001).
59. Kimura S, Morimoto K, Okamoto H, Ueda H, Kobayashi D, Kobayashi J, Morimoto Y. Development of a human mammary epithelial cell culture model for evaluation of drug transfer into milk. *Arch Pharm Res.* 29: 424-9 (2006).
60. Koepsell H, Lips K, Volk C. Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharm Res.* 24: 1227-51 (2007).
61. Han TK, Everett RS, Proctor WR, Ng CM, Costales CL, Brouwer KL, Thakker DR.

Organic cation transporter 1 (OCT1/mOct1) is localized in the apical membrane of Caco-2 cell monolayers and enterocytes. *Mol Pharmacol.* 84: 182-9 (2013).

62. Matsuo H, Takada T, Ichida K, Nakamura T, Nakayama A, Ikebuchi Y, Ito K, et al.

Common defects of ABCG2, a high-capacity urate exporter, cause gout: a function-based genetic analysis in a Japanese population. *Sci Transl Med.* 1: 5ra11 (2009).

63. Maekawa K, Itoda M, Sai K, Saito Y, Kaniwa N, Shirao K, Hamaguchi T, et al.

Genetic variation and haplotype structure of the ABC transporter gene ABCG2 in a Japanese population. *Drug Metab Pharmacokinet.* 21: 109-21 (2006).

謝辞

本研究の遂行にあたり、現国立成育医療研究センター総長（前東京大学医学部小児科学教室教授） 五十嵐 隆先生、現東京大学医学部小児科学教室 岡明教授におかれては、本研究に対する大変温かいご理解・ご助言を頂くとともに、医学のみでは解決困難と思われる本研究の薬学への橋渡しをしていただきました。研究の遂行及び論文の執筆にあたっては、甚大なるご指導・ご鞭撻を賜りました東京大学医学部附属病院薬剤部 鈴木 洋史教授ならびに千葉大学大学院薬学研究院生物薬剤学研究室 伊藤 晃成教授に深く感謝するとともに、厚く御礼申し上げます。また東京大学大学院薬学系研究科分子薬物動態学教室 楠原 洋之教授には、OCT/Oct 発現細胞を用いた輸送実験をはじめ数多くのご指導を頂戴いたしました。東京大学医学部附属病院薬剤部 本間 雅助教には、マウスにおける搾乳実験系の確立を始めセミナー等で数多くのご助言を賜りました。東京大学医学部附属病院 22 世紀医療センター薬理動態学 樋坂 章博特任准教授には、LC-MS/MS での質量分析における的確な御助言を数多く頂戴いたしました。また同研究室の 池淵 祐樹助教におかれては、実験手法を始めとした基礎的なご指導を多岐にわたりご教示いただきました。そして越道 大樹氏には、数多くの実践的なご指導とともに本研究の先行研究を遂行していただき、数多くの基礎的データをご提示いただきました。

以上の共同研究者ならびに共著者の諸先生方のお力添えとともに、東京大学医学部附属病院薬剤部 高田 龍平講師には、Bcrp ノックアウトマウスを用いた実験をはじめセミナーなどで数多くの最新かつ的確なご指導を頂戴しました。豊田 優研究員にはノックアウトマウス実験申請やアデノウイルス御供与をはじめ、多くのご指導を頂戴いたしました。さらに東京大学大学院薬学系研究科分子薬物動態学教室の 鬼頭 朋子氏には、OCT 輸送実験をはじめとした実験手法をご教示いただきました。本稿を借りて皆様方のご指導・ご鞭撻に深謝いたします。

最後に、私が 4 年間もの間大学院生活を送ることができたのは、様々な面で常に支えて頂いた家族のおかげであることは間違いありません。重ねて深謝いたします。