

論文の内容の要旨

論文題目 薬物の乳汁移行過程における
 乳腺上皮トランスポーターの役割に関する研究

氏名 伊藤 直樹

授乳婦の薬物療法は乳児に不必要な薬物暴露であるため、従来は薬物療法か授乳のいずれかを回避する患者指導が主流であった。近年では母乳育児の利点が多く実証され、母乳育児と薬物療法の両立を支援することの重要性が高まってきた。ただし臨床データは絶対的に不足しているため動物試験データを参照することも少なくないが、種差の程度やメカニズムは解明されておらず、動物を用いた乳汁移行試験自体の科学的妥当性は不明である。また不必要な動物実験は避けられる風潮にもあり、代替予測法の開発も急務といえる。

薬物の乳汁移行性の予測は、 M/P といわれる乳汁中薬物濃度を血漿中薬物濃度で除した比率を予測することと同義である。乳汁を産生する乳腺上皮細胞は一層の極性細胞群であり、薬物はこの側底側および頂端側の細胞膜を、濃度勾配に従う受動拡散により対称性に輸送される。乳腺上皮細胞を通過するのは、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のみであるため、血漿中蛋白結合率の低い薬物や、脂溶性の高い薬物ほど細胞膜を通過しやすく乳汁中に移行しやすい。

こうした物性を考慮した M/P の予測が種々提唱されているが、大半は pH 分配による受動拡散型の膜透過のみを扱ったものに留まっている。最近では一部の薬物でのトランスポーターによる非対称性輸送も報告されているが、こうした能動輸送を加味した M/P 予測法は未だない。

従って本研究では、ヒトでの薬物の乳汁移行予測精度を改善することを目的とし、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の順に解析を行った。

まずヒトとマウスの薬物乳汁移行を比較するために、定常状態におけるマウス搾乳実験モデルを新たに構築した。すなわち、授乳 14 日目のマウス腹腔内に薬物を含む浸透圧ポンプを埋め込み、60 時間後に搾乳および採血をして薬物濃度を測定した。薬物はヒト $M/P(AUC)$ データのある 65 薬剤から 32 薬剤を選択した。各薬物の血漿中、乳汁中の非結合型分率は、薬物非投与の個体より採取した血漿、乳汁に薬物を添加後、限外濾過法によって分離測定することで実測した。全ての薬物は LC-MS/MS にて濃度測定を行った。

その結果、総薬物濃度の比 (M/P) は測定できた 27 薬剤中 21 薬剤においてヒトよりもマウスが高値であり、比の中央値は 2.03 であった。この点はヒトに比べてマウス乳汁中により高い蛋白質や脂質濃度で説明された。乳汁中の総非結合型分率である $f_{m,total}$ はヒトがマウスより高値であり、マウス乳汁の高い蛋白質や脂質濃度に合致していた。また乳汁中の蛋白結合の指標である f_m (この値が小さいほど蛋白結合が大きい)、脂質分配の指標である K_f (この値が小さいほど脂質分配が大きい) とともにマウスがヒトに比べて低値で、いずれも乳汁中蛋白質や脂質濃度の量的種差により説明された。以上より、 M/P には種差を認め多くの薬物でマウスはヒトよりも高く、これは乳汁中蛋白質および脂質濃度の違いに起因することが網羅的な検討から示された。

続いて、膜透過過程、特にトランスポーターの関与に焦点を当てた解析を進めた。先述のように膜透過するのは非結合型薬物であるため、非結合型薬物の乳汁と血漿の分配比を表す $M/P_{unbound}$ に注目し、ヒトとマウスで比較した。その結果、27 薬物のうち 17 薬物で $M/P_{unbound}$ は種差なく 1 周囲に集中した。一方で 10 薬物については実測値と予測値に 3 倍以上の乖離を認めた。これら 10 薬物のうち、さらに乳汁分泌方向へのトランスポーター関与の可能性が示唆される薬物であるシメチジン (BCRP 基質)、クリンダマイシン、ジソピラミド、テルブタリン、ジルチアゼム、メトホルミンの 6 薬物と、 $M/P_{unbound}$ に種差を認めたベラパミル、ニトラゼパム、さらに既知の BCRP 基質のニトロフ란トイン、アシクロビルを加えた合計 10 薬物について、トランスポーターに焦点をあてた以降の検討を進めた。

まず 10 薬物が全て Bcrp 基質で説明できるか、Bcrp ノックアウトマウスを用いて検証した。しかし既知の基質以外の 7 薬物では M/P は変化せず、Bcrp 以外のトランスポーターの寄与を考えた。続いて 7 薬物のうち 6 つがカチオン性薬物であることから、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 OCT ファミリーに着目した。授乳期には、ヒト OCT1 の発現増加も指摘されている。そこで出産前後のマウス乳腺 cDNA を用い、mRNA レベルでの発現を検討した。その結果、マウス授乳期にも Oct1 が誘導されており、一方で Oct2 や Oct3 は授乳期の発現が低下していた。

次に Oct1 が薬物の乳汁移行に関わっている可能性を考えた。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、Oct1/Oct2 ダブルノックアウトマウスを購入し、同様に 10 薬物での M/P を求めた。その結果、既知の Oct 基質のシメチジン、メトホルミン、アシクロビルに加え、テルブタリンの M/P がノックアウトにより 7.1 から 2.0 と著明

に低下していた。

さらに、マウス Oct1-3 安定発現 HEK 細胞株を用いて in vitro に確認した。in vivo 実験結果と同様に、既知の Oct 基質に加えテルブタリンでマウス Oct1 および Oct2 で良好な基質となることが確認された。また残り 6 薬物は Oct の基質ではなかった。テルブタリンが Oct 基質である点や、乳腺での Oct の寄与を実証した報告は過去に全くなく、ともに新知見であった。

最後にヒトトランスポーターを考慮した予測法を検討した。まずヒト OCT1-3 安定発現 HEK 細胞株を用いて、10 薬剤での輸送実験を行った。その結果、マウスと同様にシメチジン、メトホルミン、アシクロビルでは OCT1-3 全てにおいて、またテルブタリンでは OCT1 および OCT2 において取り込み活性の変化を確認した。

次に 10 薬剤の $M/P_{unbound}$ 実測値と pH 分配に基づく予測値を比較した。マウスでは Bcrp と Oct1 基質ともに高値であった一方、ヒトでは BCRP 基質は高値を示したが、OCT1 基質は高くなかった。そこで「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」と考え、ヒトにおける予測値と実測値を網羅的に検討した。すなわち、ヒト M/P 比のデータがあり、かつ乳汁中と血漿中の非結合型分率が一定の範囲内の 167 薬剤について、実測値と予測値の比 ($M/P_{unbound}$ ratio) を算出した。対称性輸送であれば、理論上 1 になる。その結果、 $M/P_{unbound}$ ratio が 2.0 以上と高値の 36 薬物中 BCRP 基質は 27.8% と高頻度であったが、OCT 基質は 5.6% であった。またマウスで高値のテルブタリンとメトホルミンの OCT1 基質の $M/P_{unbound}$ ratio は、ヒトでは順に 0.68、0.14 と 1 を大きく下回っていた。以上よりヒト OCT1 は BCRP に比較して寄与が少ないと考えた。

そこで、ヒトでは BCRP を考慮することで予測精度が改善すると考え、in vitro における BCRP 輸送活性評価を行った。すなわち、アデノウイルスを用いてヒト BCRP を高発現させた MDCKII 細胞、ならびにコントロールとして GFP を発現させた MDCKII 細胞それぞれを Transwell に播種し、12 種類の検討薬物における Apical→Basal 方向、および Basal→Apical 方向への経細胞輸送クリアランスを別々に求め、その比を efflux ratio として算出した。さらに両細胞の efflux ratio 比 ($BCRP/GFP$ efflux ratio) を計算し、BCRP 輸送活性の指標とした。実験回による BCRP 発現量差は、基準薬物を毎回組み込み補正した。その結果、既知の BCRP 基質 8 薬物ではこの比が全て 1.0 を大きく上回り、非基質の 4 薬物では 1 前後と低値であった。続いてアシクロビル、ペフロキサシン、フルコナゾールにおける $BCRP/GFP$ efflux ratio と、ヒト in vivo データより算出された $M/P_{unbound}$ ratio との対応が正の相関となることを確認し ($R^2=0.9999$)、回帰式を得た。そこで残り 8 薬物において、従来の pH 分配による M/P 予測と、こうして得た回帰式による値を補正係数として組み込んだ新たな予測とを比較した。その結果、BCRP による輸送活性を組み込むことにより、予測値と観測値の相関は $R^2=0.1055$ から $R^2=0.8770$ と大幅に改善し、予測精度の向上と予測式の妥当性が示された。

本研究により、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や、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。また寄与するトランスポーターには種差があり、ヒトでは主に **BCRP** が基質薬物の分泌方向に寄与することが確認された。ヒト *M/P* の予測においては、**pH** 分配による予測に加えて血漿や乳汁中の非結合率の **in vitro** 実験値、さらに **BCRP** に着目した **in vitro** 輸送実験値を組み合わせることで、予測精度は改善すると期待される。今後は、本予測式を用いたデータをさらに集積しトランスポーターを考慮した新たな予測を深め、授乳婦に対する薬物療法へのより精度の高い情報源の一助となるよう努めていきたいと思う。