

## 研究題目 医薬品の乳汁移行性予測に関する研究

病院薬剤学講座

小林大介 (Daisuke Kobayashi),  
沼尻幸彦 (Sachihiko Numajiri)

### 【緒言】

薬物療法中に授乳をした場合、乳汁を介する乳児の医薬品曝露が問題になる。臨床では、その授乳の可否に関する薬剤師への問い合わせが頻繁である。しかしながら、ニーズを満たすだけのデータは蓄積されておらず、答えに窮している。一般に、乳汁中への薬物の移行性は受動拡散で説明できるとされており、乳汁中薬物濃度予測式がいくつか報告されているものの<sup>1,2)</sup>、この式に合わない薬物も多々ある。この合わない原因は、乳腺上皮細胞による能動輸送の介在と考えられるため、単純な受動拡散だけで薬物の移行性を説明するのは難しい。そこで、我々はヒト乳腺上皮細胞 (HMECs) を用いて、種々薬物の能動輸送について検討し、将来、本実験結果および実験系が医薬品の開発あるいは臨床現場で応用され、授乳の可否に関して、高い有用性を発揮することが研究目的である。

本研究は、実験系の確立、および臨床汎用薬のHMECs monolayerを介した輸送性評価に分かれる。では、授乳期乳腺上皮細胞と同等の機能を発現する細胞へと導く培養条件を確立する必要があり、現在は、その実験過程にある。これまでに乳腺発達に影響を及ぼすestrogen、progesteroneおよびprolactin<sup>3-6)</sup>の培養系におけるHMECsの増殖および経上皮抵抗値( TER )への影響を検討し、それらホルモンの添加パターンを決定した。本報告では、有機カチオントランスポーター (OCTs) の基質であるtetraethylammonium ( TEA ) を用いて、HMECs monolayerでの能動輸送系の発現を検討し、さらに三次元培養法による機能分化を目的としたHMECs monolayer 培養法を検討した。

なお、現在に至るまで、ヒト乳腺上皮細胞培養系を用いて、能動輸送の機序について研究された報告はない。

### 【方法】

#### 1 . HMECs monolayer を介した TEA 輸送に対するホルモン添加の影響

ホルモン添加・無添加条件下、ECM コート上でのHMECs monolayer の調製

HMECs monolayer の調製および透過実験を行うために、laminin または collagen でコーティングされた cell culture insert を用いた。

HMECs を 3,200 cells/well で播種し、培養した。播種翌日からホルモン添加および無添加培養に分け、Table 1 に示すパターンで confluent に到達するまで培養した。播種後、毎日培地交換を行い、80% confluent 付近から培地交換の際に、cell culture insert を介した経上皮抵抗値 ( TER ) を測定し、最大値に到達したことを確認した後に透過実験を行った。

**Table 1 Culture-method for HMECs monolayer**

	<i>Hormones addition pattern</i>			
	<i>1~</i>	<i>2~</i>	<i>After confluent ~</i>	<i>Next 2days from confluent ~</i>
<i>Hormones present</i>	<i>MEGM</i>	<i>Estrogen (1nM)</i>	<i>Progesterone (100nM)*1</i>	<i>Prolactin (10 μg/mL)</i>
<i>Hormones absent</i>	<i>MEGM</i>			

※1 Exclude EGF from MEGM

#### <sup>14</sup>C-TEA 透過実験

<sup>14</sup>C-TEA は、能動輸送に飽和が起こらないと予測される 0.41 nM でapicalおよびbasal 側に添加した。このとき、paracellular marker として<sup>3</sup>H-mannitolを 11.25 nMの濃度で添加した。1,2,3 および 4 時間後にサンプリングを行った。lamininおよびcollagen をECM とした実験では、それぞれ<sup>3</sup>H-mannitol 累積透過量に対する <sup>14</sup>C-TEA 累積透過量比を算出した。

#### 定量

<sup>14</sup>C-TEA および<sup>3</sup>H-mannitol は、共に液体シンチレーションカウンター (LC-5100, ALOKA) を用いて定量した。

#### 2 . 三次元培養を応用したHMECs monolayerの調製と<sup>14</sup>C-TEAの輸送方向性培養

HMECs を三次元培養するために、matrigel 溶液の入っている cell culture insert ( FALCON ) を用いた。

matrigelをマニファクチュアプロトコルに従って前処理し、10,000cells/cm<sup>2</sup>で播種し、培養した。播種翌日からホルモン添加および無添加培養に分け、Table 2 に示すスケジュールで培養した。播種後、毎日培地交換を行った。

三次元培養で得られた HMECs コロニーを dispase ( FALCON ) で処理し、コロニーを matrigel から回収した。そして、回収した HMECs を collagen コートされた cell culture insert に播種し、confluent に到達するまで培養した。単層培養でも毎日培地交換し、これまでと同様の方法により TER を測定し、最大値に到達したことを確認した後に透過実験を行った。

**Table 2 Culture-method of three-dimension and monolayer**

	<i>Three dimensional culture in matrigel layer</i>			<i>Monolayer culture on collagen coat</i>
<i>Day in culture</i>	2~	16~	23~	43~75
<i>Added hormones</i>	<i>Estrogen (1nM)*1</i>	<i>Progesterone (100nM)*2</i>	<i>Prolactin (10 µg/mL)</i>	
<i>No added hormones</i>	<i>MEGM</i>			

※1 Culture using MEGM on first day after the cells were embedded

※2 Exclude EGF from MEGM

<sup>14</sup>C-TEA透過実験および定量

1. および と同様の方法により、<sup>14</sup>C-TEA透過実験および定量を行った。

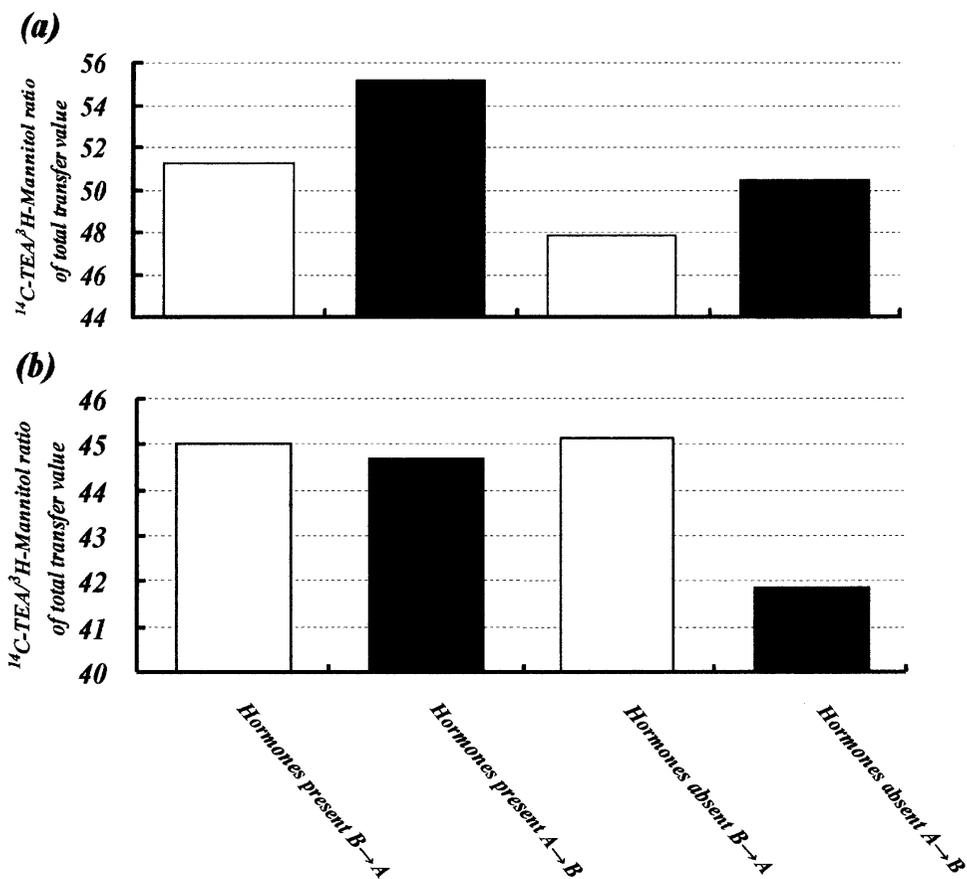
【結果】

1. HMECs monolayer を介した TEA 輸送に対するホルモン添加の影響

laminin および collagen 上でホルモン添加培養した HMECs monolayer の TER は、培養 18 日目、一方ホルモン無添加培養では、培養 15 日目から低下に転じた。そのため、培養 18 日目あるいは培養 15 日目に透過実験を行った。

ホルモン添加・無添加条件下での A → B および B → A の両方向からの 4 時間後の mannitol 累積透過量に対する TEA 累積透過量比を Fig. 1 に示す。その結果より、両 ECM においてホルモン添加に関係なく、TEA 輸送に directionality は観察されなかった。

しかし、collagen を用いたときの TEA 輸送では、B → A の輸送が A → B に比べて若干高い傾向が見られた ( Fig. 1b )



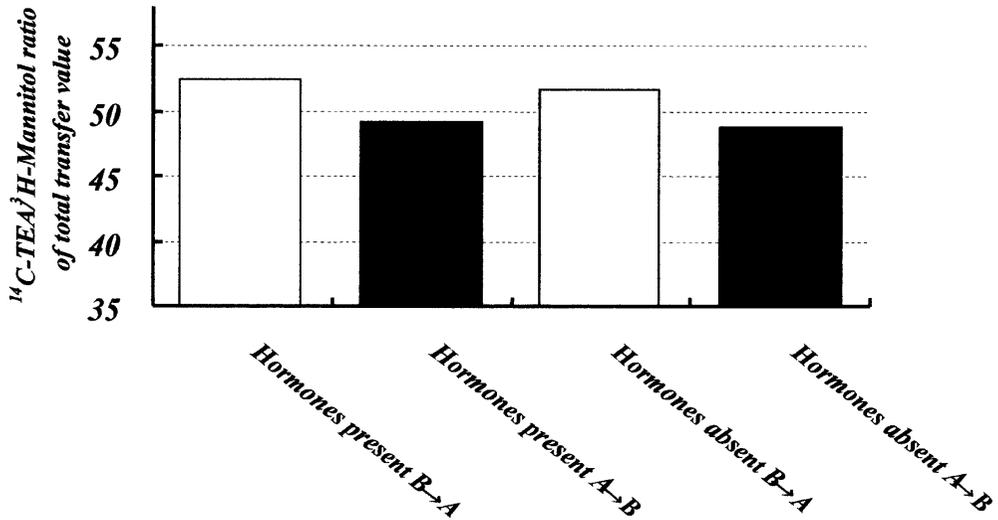
**Fig. 1 Effect of hormones on drug transport across HMECs monolayer cultured on laminin(a) and collagen IV(b)**

2. 三次元培養したHMECsを用いたmonolayerの調製と $^{14}\text{C-TEA}$ 輸送について

43日間、三次元培養し、cell culture insert に植え替えた。このとき、HMECs は、コロニーを形成しており、単離細胞は比較的少なかった。

ホルモン添加および無添加培養した HMECs monolayer の TER は、植え替え後、28～31日目（合計培養日数 72～75 日目）までほぼ維持されていた。そこで、TER 最大値と判断し、透過実験を行った。

ホルモン添加・無添加条件下でのA BおよびB Aの両方向からの 4 時間後の $^3\text{H-mannitol}$  累積透過量に対する $^{14}\text{C-TEA}$  累積透過量比をFig. 2 に示す。ホルモン添加および無添加に影響されず、B Aの累積透過量比の平均値がA Bのそれより大きい傾向が観察された。



**Fig. 2 Determination on active transport across HMECs monolayer cultured in the present or absent of hormones after the cells grew on three dimensional culture**

**【考察】**

現在のところ、明確に能動輸送を確認できていない。これまでの調査から、MECsにおける能動輸送系の発現は、機能分化に密接な関係があると予測される。そこで、 $\alpha$ -caseinの液体クロマトグラフィーでの確認を試みている。また、能動輸送が確認できない理由として、TERが透過実験を行えるような値に到達していない可能性が考えられた。データを示さないが、mannitol permeability coefficientから細胞間接着が不十分であり、paracellular routeの透過が非常に大きいことがわかった。そのため、能動輸送系が発現していたとしてもマスクされてしまう可能性が考えられる。そこで、機能分化を目的とした培養方法のみでなく、細胞間接着も強める培養方法の検討が必要と考えられた。しかし、ECMにcollagenを用いた実験および三次元培養細胞を用いた実験では、B→Aの $^{14}\text{C-TEA}$ 輸送が、A→Bより大きい傾向が観察されたことより、HMECsに能動輸送が発現している可能性が示唆された。このことから、今後同様の実験を再度行い、再現性を調べる必要があると考えられる。

【参考文献】

- 1 ) H. C. Atkinson and E. J. Begg, Prediction of drug distribution into human milk from physicochemical characteristics, *Clin. Pharmacokinet.*, 18 (2), 151-167, 1990.
- 2 ) L. J. Notarianni, D. Belk, S. A. Aird and P.N. Benett, An in vitro technique for the rapid determination of drug entry into breast milk, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 40, 333-337, 1995.
- 3 ) F. Borellini, T. Oka, Growth control and differentiation in mammary epithelial cells, *Environ. Health. Perspect*, 80, 85-99, 1989.
- 4 ) T. L. Woodward, J. Xie, J. L. Fredrick, S. J. Haslam, Proliferation of mouse mammary epithelial cells in vitro: interactions among epidermal growth factor, insulin-like growth factor , ovarian hormones, and extracellular matrix proteins, *Endocrinology*, 141(10), 3578-3586, 2000.
- 5 ) J. Xie, S. J. Haslam, Extracellular matrix regulates ovarian hormone-dependent proliferation of mouse mammary epithelial cells, *Endocrinology*, 138(6), 2466-2473, 1997.
- 6 ) H. A. Hahm, M. M. IP, K. Darcy, J. D. Black, W. K. Shea, S. Forczek, M. Yosimura, T. Oka, Primary culture of normal rat mammary epithelial cells within a basement membrane matrix. . Functional differentiation under serum-free conditions, *In Vitro Cell. Dev. Biol*, 26, 803-814, 1990.





