薬 剤 学, **66** (5), 338–343 (2006)

≪若手研究者紹介≫

薬物の胎盤透過機構の解析

大 谷 壽 一 Hisakazu Ohtani
東京大学大学院薬学系研究科

1. 薬物の胎児毒性と胎盤透過

妊娠期のほぼ全般にわたって，胎児と母体の間の物質交換は胎盤を介して行われる．薬物に関しても例外ではなく，母体に投与された薬物は胎盤を介して胎児へと移行する．薬物の胎児毒性というと，まず妊娠初期における催奇形性が想起されるかもしれない．しかしそれだけではなく，妊娠中期から満期においても，非ステロイド性抗炎症薬による動脈管収縮異常，選択的セロトニン再取り込み阻害剤による新生児遷延性肺高血圧症や中枢毒性，アンジオテンシン変換酵素阻害剤による胎児羊水過少や低血圧などといった，さまざまな薬物による胎児毒性が知られている．こうした胎児毒性の観点から，妊婦に対する薬物の投与に関しては特別な注意が払われているものの，実際には，妊婦に対する安全性に関する情報は著しく不足しているのが現状である．その原因として，主に，妊婦における薬物の体内動態，胎児移行性に関する情報が欠如しているうえに，その評価が困難であるという点をあげることが出来るだろう．現在のところ，薬物の胎児移行性を適切に評価するための実験系は確立しておらず，ましてや，ヒトにおける薬物の胎児移行性を *in vitro* の実験から予測することは極めて難しい．また，ヒトにおける薬物の胎盤透過に関する分子機構も，まだ十分には明らかになっていない．

胎盤は，胎児由来の組織であり，胎児血が流れる絨毛組織の外側を母体血が満たしており，母体血と胎児血は直接接触しない構造となっている（図 1）．妊娠満期における母体の子宮血流量は 500 mL/min にも達し，その 80% 程度が胎盤を灌流する．胎児の胎盤血流量も満期では 300 mL/min に達し，両者の豊富な血流の間で，栄養物質や酸素，二酸化炭素，薬物のやりとりが行われる．胎盤において母体血と胎児血を隔てている胎盤膜は，シンシチオトロホブラスト細胞（栄養膜合胞体細胞）と胎児血管の内皮細胞からなっており，妊娠満期には絨毛の表面積は 10 m^2 にも達する．

胎盤膜は単なる非選択性の生体膜ではなく，さまざまな薬物の物質の透過を制限したり，逆に透過を促進する輸送担体が発現していることが知られており，血液胎盤関門と呼ばれている．特に，母体血に直接接する側にあるシンシチオトロホブラスト細胞が，物質透過の制御において最も重要な役割を担っていると考えられている．

2. 物質の胎盤透過を評価するための実験系

一般の薬物体内動態実験にはラットやマウスなどのげっ歯類が広く用いられているが，ヒトにおける物質の胎盤透過を評価するためには，可能な限りヒト由来の試料を用いることが望ましい．これは，ラットやマウスの胎盤は，ヒトの胎盤と構造が大きく異なっており，二層構造を形成していることや，胎盤においては輸送担体の寄与が重要と考えられるが，それらの種差が無視できないと思われるからで

筆者紹介：1990 年 3 月東京大学薬学部薬学科卒業，1994 年 3 月東京大学大学院薬学系研究科博士後期課程中退，同年 4 月東京大学医学部助手（附属病院薬剤部），1999 年 5 月東京大学より博士（薬学）の学位を受ける．同年 11 月九州大学大学院薬学研究科助教授，2005 年 4 月東京大学大学院薬学系研究科助教授，現在に至る．研究のモットー：やって楽しく，終わって人のためになる研究を．趣味：西洋古地図の収集．

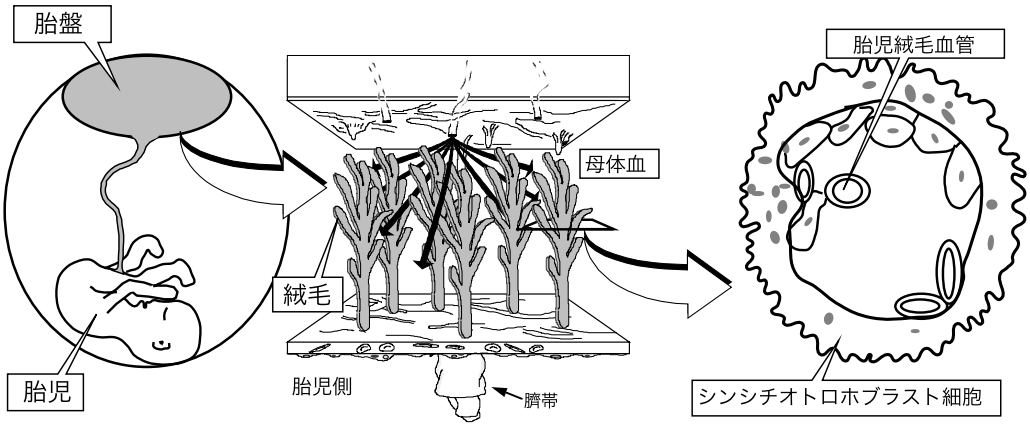

図1　ヒト胎盤の構造
ヒト胎盤は，母体血が満たされた絨毛間腔に，胎児血が灌流する絨毛が突出した構造を取っている（中央）．絨毛の外側はシンシチオトロホブラスト細胞が取り巻いており，絨毛内に胎児血が流れる胎児絨毛血管がある（右）．

ある．また，胎盤組織は分娩に伴い娩出され，通常は医療廃棄物として廃棄されるため，ヒトにおいて被験者に新たな侵襲を強いることなく入手可能なほぼ唯一の臓器である．ヒト胎盤を用いた実験系としては，(1) ヒト胎盤灌流実験法，(2) ヒト胎盤由来単離トロホブラスト細胞を用いた実験，(3) ヒト胎盤由来トロホブラスト細胞頂側膜小胞（BBMVs）及び同基底膜小胞（BLMVs）を用いた実験などがある．また，胎盤組織を用い，RT-PCR や Western blotting による輸送担体の発現確認，免疫組織化学的手法による輸送担体の発現部位の確認などといったアプローチも，胎盤における物質透過機構を知る上で有用である．さらに，ヒト胎盤絨毛癌由来培養細胞（BeWo 細胞）などを用いた輸送実験も，上述の実験を補完する意味で重要であろう．

3. ヒト胎盤灌流実験による薬物の経胎盤透過キネティクスの解析

胎盤灌流実験は，ヒト胎盤組織に直接薬物を灌流して胎児側血管に移行する薬物量を定量的に測定する方法で，最も *in vivo* に近い薬物胎盤透過性の評価法として広く用いられてきた．しかしながら，現在までの胎盤灌流実験では，単に薬物の母体側と胎児側の濃度比を測定するだけにとどまっており，母体血と胎盤，胎盤と胎児血の間の物質移行を分離して評価することは行われていなかった．そこで我々は，ヒト胎盤灌流実験において，母体側に薬物を含む灌流液を流す従来の実験のみではなく，胎児側に薬液を灌流するプロトコルや，短時間の灌流後に washout する灌流プロトコルを併用し，さらに胎盤中の薬物濃度を測定することで，薬物の経胎盤輸送の詳細な pharmacokinetic 解析を可能にした[1]．図2には，解析に使用した pharmacokinetic model を，図3にはジクロフェナクの胎盤灌流実験の結果に図2のモデルをあてはめて解析した結果を示す．算出された個々のパラメータについては記載を省略するが，ジクロフェナクの母体側からの非結合型の取込クリアランス（K_1/f_b）の値は，サリチル酸やアンチピリンと比較して 100 倍以上と顕著に大きかった．したがって，ジクロフェナクの母体血から胎盤組織への取り込みには何らかの輸送担体が寄与している可能性が考えられた．一方で我々は，胎盤絨毛癌由来培養細胞である BeWo 細胞において，ジクロフェナクが，細胞内へのプロトン依存的な乳酸の取り込みを阻害することを報告している．したがって，ジクロフェナクが乳酸を輸送する輸送担体と相互作用してその基質となっているのかもしれない．本稿においては詳細は省くが，今回の胎盤灌流実験，薬物動態学的モデル解析，並びに灌流液中の薬物の蛋白結合率をもとにすれば，母体における薬物の血中濃度推移が与えられた場合の，薬物の胎児移行の経時変化，すなわち胎児から見た薬物の入力関数をシミュレートすることが可能となる．これは，薬物の母胎・胎児動態を予測し，胎児の薬物曝露を予測する上で重要な方法論となるだろう．

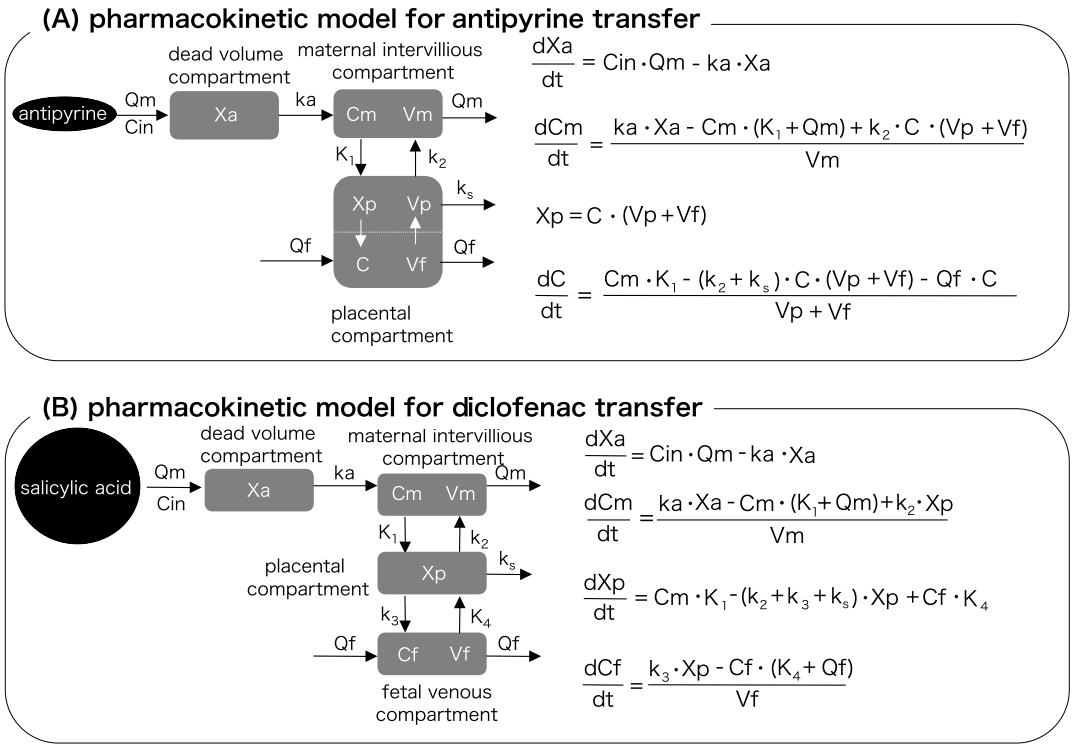

図2　薬物の胎盤透過・胎児血移行を表現するための薬物動態学的モデル
胎盤においては，アンチピリンについては絨毛間腔コンパートメントと胎盤コンパートメントの二つのコンパートメントを，ジクロフェナクについては絨毛間腔コンパートメント，胎盤組織コンパートメント並びに胎児血管コンパートメントの三つのコンパートメントをおくことで，胎盤透過動態を表現することができた．各コンパートメントはwell-stirredを仮定し，コンパートメント間の移行は一次速度過程を仮定している．

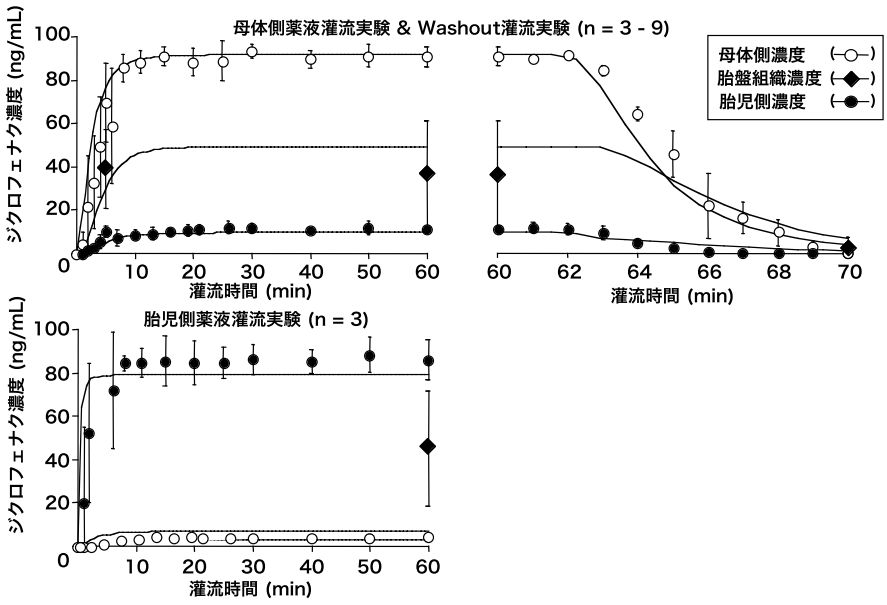

図3　三種のプロトコルにおけるヒト胎盤灌流実験系によるジクロフェナクの経胎盤動態と，モデルによる解析結果
各点は平均± SEMを示す．ジクロフェナクの経胎盤透過キネティクスは，図2のモデルにより良好に表現できている．

4. ヒト胎盤トロホブラスト細胞膜小胞を用いた薬物透過の解析

胎盤灌流実験は，胎盤の薬物輸送機能を最も生体に近い条件下で評価できるという点で極めて有用であるが，ある薬物の輸送特性を評価するために多数の胎盤が必要であることや，薬物の輸送機構，輸送に関わる輸送担体の評価などが行えないという欠点もある．こうした欠点を補う実験系として，ヒト胎盤トロホブラスト細胞由来の標本を用いた実験系があげられる．すなわち，ヒト胎盤からは，トロホブラスト細胞の頂側膜（BBM）と基底膜側（BLM）を分離して調製することができる．

まず，それらの Western blotting により，トロホブラスト細胞の両膜における輸送担体の発現と局在を推定することが可能である．図 4 には代表的な ABC トランスポータである P-glycoprotein（P-gp）及び MRP1 のトロホブラスト細胞における局在について，BLM と BBM の Western blotting により検討した結果を示す[2]．P-gp 及び MRP1 がそれぞれ BBM と BLM に優位に発現していることがわかる．ここで得られた結果は，P-gp については過去の，また MRP1 について我々の免疫染色により得られた結果とも良好に一致している．

次に，BBM 及び BLM からそれぞれ膜小胞（BBMVs，BLMVs）を調製し，それらを用いて，輸送担体の典型的基質の取り込みを評価することにより，血液胎盤関門において生理的に発現している輸送担体の機能特性（親和性，最大輸送速度，阻害剤の影響など）を詳細に評価することができる．図 5 には，ヒト胎盤由来 BBMVs を用いて，P-gp の典型的基質であるジゴキシンとビンブラスチンの輸送キネティクスを評価した結果を示す[3]．なお，ABC トランスポータは排出系の輸送担体であるため，ここでは小胞外に ATP と基質を添加し，inside-out 型膜小胞への取り込みとして輸送能を評価している．この輸送が抗 P-gp 抗体である C219 などによりほぼ

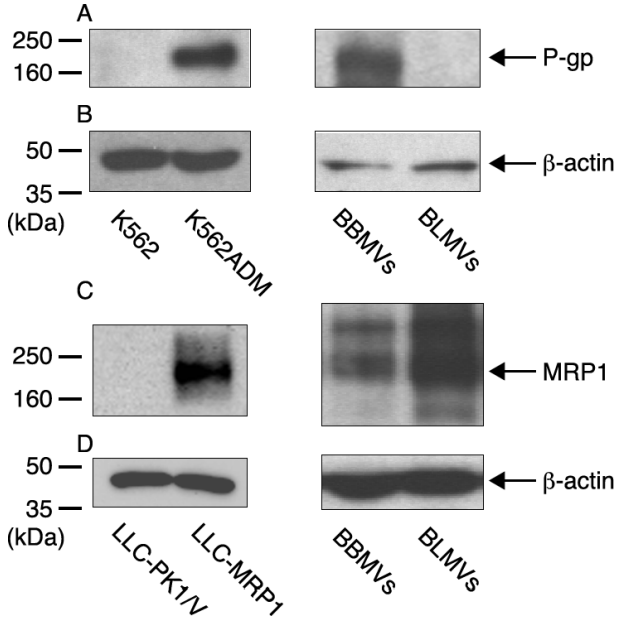

図 4　ヒト胎盤における P-gp 及び MRP1 の発現
ヒト胎盤から調製した BBMVs 及び BLMVs における P-gp 及び BCRP の Western blotting．K562/ADM 及び LLC-MRP1 はそれぞれ，K562 に P-gp を，LLC-PPK1 細胞に MRP1 を強制発現させた細胞であり，positive control として用いた．

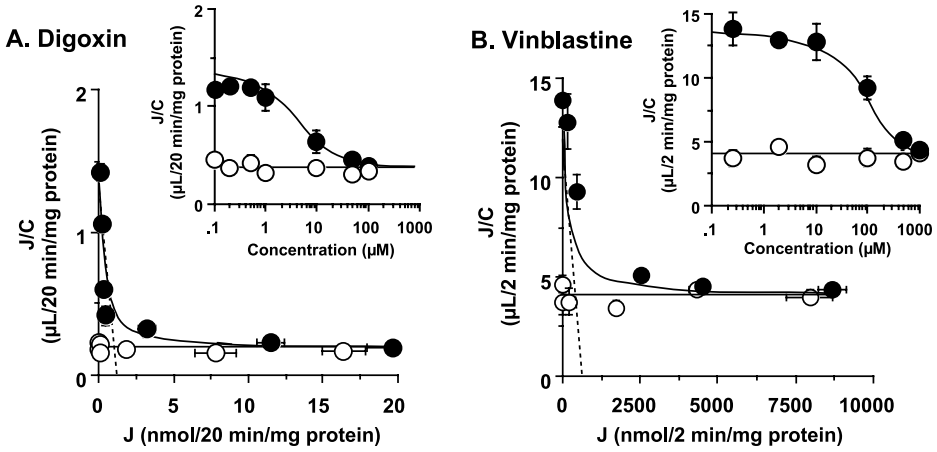

図 5　ヒト胎盤から調製した BBMVs へのジゴキシン及びビンブラスチンの取り込みに関する濃度依存性の Eadie-Hofstee plot
●：ATP 存在下，○：ATP 非存在下．各点は平均 ± SEM（n = 4）を示す．

抑制されたことや，得られた親和性が過去の P-gp 発現系において認められた値と対応していたことなどから，ここで観測されているのは，P-gp を介した輸送であると考えられる．

胎盤においては，排出系の ABC 輸送担体のみならず，OATs（organic anion transporters），OATPs（organic anion transporting polypeptides），OCTs（organic cation transporters），MCTs（monocarboxylate transporters）などの輸送担体が発現，機能していると考えられている．我々はこれらの発現と機能についても検討を行ってきた[4~6]．例えばカチオンの輸送に関しては，OCTs のうち OTC3 のみが胎盤において発現していることを確認し，BLMVs を用いて，OCT の典型的基質である MPP^+ の輸送特性を検討した[4]．図 6 には，BLMVs への MPP^+ の取り込みに対する各種阻害剤の影響を検討した結果を示す．BLMVs への MPP^+ の取り込みに関して，輸送の親和性，各種阻害剤の阻害プロファイルなどを評価し，OCT3 発現細胞における結果と比較検討したところ，両者の間に良好な対応が認められた．したがって，胎盤トロホブラスト細胞基底膜においては，MPP^+ などのカチオンを輸送する輸送系として OCT3 が発現し機能していることが示された．

現在までに同様の手法によって，OATs，OATPs，MCTs についても胎盤トロホブラスト細胞における発現と機能の解析を進めてきた．

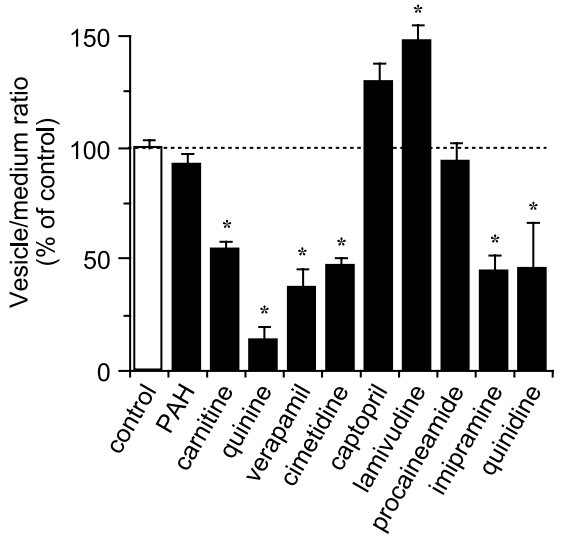

図 6　ヒト胎盤から調製した BLMVs への 10 μM MPP^+ の取り込みに対する各種薬物の影響
各薬物の濃度は 1 mM において検討した．バーは平均± SEM（$n = 3$）を示す．$^*p < 0.05$（ANOVA-Dunnett's test）．

これらの結果は，血液胎盤関門において検討対象とした輸送担体が発現し機能していることを示しているのみならず，胎盤から調製したトロホブラスト細胞膜小胞が，生理的に発現している（すなわち，生体において生理的条件下で翻訳後修飾などが行われた）輸送担体の機能特性を評価するための有用な評価系（実験材料）でもあることを示している．

5. お　わ　り　に

本稿においては，胎盤における薬物輸送特性と輸送機構を評価するための代表的な実験方法を，実験結果も交えて紹介させていただいた．最終的には，胎盤灌流実験とその PK モデル解析，単離トロホブラスト細胞における輸送特性解析と輸送担体の発現解析，BBMVs 及び BLMVs を用いた輸送特性解析と輸送担体の発現解析などの結果を総合的に解析することにより，*in vitro* における実験結果からヒトにおける薬物の胎児移行性を定量的に予測するための方法論が構築できると考えている．

本研究は，九州大学大学院薬学研究院，医学研究院及び東京大学大学院薬学系研究科において行われました．特に，終始ご指導ご鞭撻いただきました，東京大学大学院薬学系研究科情報学環・薬学系研究科 澤田康文 教授に，衷心より御礼申し上げます．また，研究遂行にあたり，多大なるご指導やお力添えをいただきました，九州大学大学院薬学研究院 松尾浩民 助手，神山紀子 助手，村上秀康 助手，辻本雅之 助手，同 医学研究院 中野仁雄 教授，桑野信彦 教授，川渕　優 教授，和田守正 助教授，月森清巳 講師，佐藤昌司 講師，平川俊夫 講師，平田和穂 講師，永田秀昭 博士，内海　健 助手をはじめとする先生方に，心より御礼申し上げます（いずれも所属・役職は研究実施当時）．さらに，日夜を分かたず研究に邁進された，九州大学大学院薬学府 製剤設計学分野の卒業生，修了生のみなさまに，心より感謝いたします．

引　用　文　献

1) 新宅恭平, 辻本雅之, 永田秀昭, 佐藤昌司, 月森清巳, 中野仁雄, 堀里子, 大谷壽一, 大戸茂弘, 澤田康文, ヒト胎盤灌流法を用いたジクロフェナクの胎盤透過性の検討, 第 15 回日本医療薬学会年会（岡山, 2005

年 10 月), 講演要旨集, p. 284.
2) M. Nagashige, F. Ushigome, N. Koyabu, K. Hirata, M. Kawabuchi, T. Hirakawa, S. Satoh, K. Tsukimori, H. Nakano, T. Uchiumi, M. Kuwano, H. Ohtani, Y. Sawada, Basal membrane localization of MRP1 in human placental trophoblast, *Placenta*, **24**, 951–958, 2003.
3) F. Ushigome, N. Koyabu, S. Satoh, K. Tsukimori, H. Nakano, T. Nakamura, T. Uchiumi, M. Kuwano, H. Ohtani, Y. Sawada, Kinetic analysis of P-glycoprotein-mediated transport by using normal human placental brush-border membrane vesicles, *Pharm. Res*., **20**, 38–44, 2003.
4) R. Sata, H. Ohtani, M. Tsujimoto, H. Murakami, N. Koyabu, T. Nakamura, T. Uchiumi, M. Kuwano, H. Nagata, K. Tsukimori, H. Nakano, Y. Sawada, Functional analysis of organic cation transporter 3 expressed in human placenta, *J. Pharmacol. Exp. Ther*., **315**, 888–895, 2005.
5) M. Inuyama, F. Ushigome, A. Emoto, N. Koyabu, S. Satoh, K. Tsukimori, H. Nakano, H. Ohtani, Y. Sawada, Characteristics of L-lactic acid transport in basal membrane vesicles of human placental syncytiotrophoblast, *Am. J. Physiol*., **283**, C822–830, 2002.
6) A. Emoto, F. Ushigome, N. Koyabu, H. Kajiya, K. Okabe, S. Satoh, K. Tsukimori, H. Nakano, H. Ohtani, Y. Sawada, H^+-Linked transport of salicylic acid, an NSAIDs, in human trophoblast cell line, BeWo, *Am. J. Physiol*., **282**, C1064–C1075, 2002.