
ヒト乳腺培養細胞系を用いた
授乳回避薬物のスクリーニング

1 6 5 9 0 1 1 9

平成16年度～平成17年度科学研究費補助金
(基盤研究(C)(2)) 研究成果報告書

平成18年6月

研究代表者 上田 秀雄
城西大学 薬学部助手

<はしがき>

授乳期間中、ほぼ全ての母親が薬物を服用しているのが現状であり、医師および母親が母乳を介した乳児の薬物曝露を懸念するため、授乳は中断される傾向にある。その主たる理由は、乳汁中薬物濃度の適切な評価法がないことにあり、薬物の乳汁移行性に関する研究、とりわけ、乳汁中濃度の推定法を確立することは重要である。これまでに、臨床および非臨床的アプローチによる乳汁移行性に関する研究が行われてきた。非臨床的アプローチとして、薬物の乳汁移行が受動拡散であることを前提として乳汁移行性を予測する *in vitro* 法が検討されてきた。しかし、近年、ヒトにおいて乳腺上皮細胞を介した乳汁中への薬物移行に能動輸送系の関与が示唆され、これら推定法の妥当性が問題視され始めている。そこで、本研究では、乳汁移行への輸送担体の関与を含めた乳汁移行予測の *in vitro* モデルとして、培養ヒト乳腺上皮細胞単層膜を構築し、予測系としての可能性について検討したので、得られた知見を要約する。

研究組織

研究代表者 : 上田 秀雄 (城西大学薬学部助手)

研究分担者 : 小林 大介 (城西大学薬学部教授)

交付決定額 (配分額)

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
平成16年度	1800,000	0	1800,000
平成17年度	1700,000	0	1700,000
総計	3500,000	0	3500,000

研究発表

(1) 学会誌等

Kimura S. et al., Development of a Human Mammary Epithelial Cell Culture Model for Evaluation of Drug Transfer into Milk, Arch. Pharm. Res. , 29, 2006.

(2) 口頭発表

該当なし

(3) 出版物

なし

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

該当なし

1. 序論

母乳は、乳児にとって栄養効率の優れたものであり、^{1,2)} 母乳育児には、多くの疫学調査により健康、栄養、免疫、発育、心理、社会、経済、そして環境といった幅広い領域に対する利点を有すると報告されている。³⁾ 特に乳児の健康面に対する利点が数多く報告されており、完全母乳育児、すなわち人工乳を併用しない母乳のみによる育児は、乳児での多くの疾患に対する予防効果を有することから、⁴⁾ アメリカ小児科学会をはじめ、保険機関等は少なくとも6ヵ月間の完全母乳育児を推奨している。^{1,5-8)}

米国では、母乳育児を開始する割合は、1990年までに急激な上昇により51.5%に到達し、2001年には69.5%とさらに上昇しており、完全母乳育児の割合は46.0%前後の水準で推移している。⁹⁾ また、出産後6ヵ月における授乳率および完全母乳育児の割合は、1990年から2001年にかけてそれぞれ17.6%から32.5%、および10.4%から17.2%へと上昇し、⁹⁾ 6ヵ月間の母乳育児および完全母乳育児の重要性が社会的に認識されつつある。

一方で、授乳婦は、医薬品服用時において、母乳育児に対して極めて消極的になり、¹⁰⁾ 授乳の回避を決断することが多い。それは、授乳婦の服用した薬物により、乳汁が汚染され、授乳を介して乳児がこれに曝露すると考えるためである。¹¹⁻¹³⁾ このような意識は、授乳婦のみならず、医療従事者にも共通している。ところが、授乳期間中には、ほぼすべての母親が薬物治療を必要としており、産後1週間では90%以上の母親が少なくとも1種類の医薬品を服用し、^{2,14)} さらに産後4ヵ月においても服用率は17%を示し、そのうちの5%の母親が慢性疾患に対する薬物治療を受けている。¹⁵⁾

日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (ICH) において、三者間で調和された臨床試験の一般指針 E8 には、「授乳中の女性が投与対象となる薬剤であれば、その薬物の乳汁中への排泄について検討すべきであろう」と記載されている。¹⁶⁾ しかし、臨床の現場で授乳時の薬剤使用の可否を判断するために必要な情報は、開発段階および市販後以降の調査では得られていない。そのため、添付文書や医薬品インタビューフォームには、「乳汁中へ移行するので、(1) 治療上の有益性が危険性を上回る場合にのみ投与すること、あるいは (2) 授乳婦への投与は

避けることが望ましいが、やむを得ず投与する場合は授乳を中止させること」といった内容が記載されているだけであり、薬物がどの程度乳汁中へ移行するかなど、乳児のリスクを推定するために必要な情報は含まれていない。

授乳婦の服薬による授乳を介した乳児のリスクを明らかにするためには、とくに、薬物の乳汁移行性を知ることが重要である。これまでに、*in vivo* 研究においてはその評価を目的とした研究が行われ、また *in vitro* 研究ではその予測法に関する研究が行われてきた。しかし、すべての薬物で *in vivo* データを入手することは倫理的な問題が関わることから非常に困難である。そのため、正確に乳汁移行性を評価できる *in vitro* モデルの構築が必要であると考えられた。

1.1 培養細胞を用いた *in vitro* 乳汁移行性評価モデルの必要性

これまでに、薬物の乳汁中への移行が受動拡散に支配されていると仮定した *in vitro* 予測法が報告されている。その方法は、pH 分配仮説、乳脂質相への分配およびタンパク結合率を含む薬物の物理化学的性質に基づいている。具体的には平衡透析法、¹⁷⁻¹⁹⁾ 拡散法、²⁰⁻²⁴⁾ 予測回帰モデル²⁵⁻²⁷⁾ などが報告されてきた。特に予測回帰モデルに分類される Atkinson らの方法は、pKa、血漿中タンパク非結合率、および pH7.2 での n-オクタノール/水分配係数の3つのパラメータのみから乳汁移行性の予測が可能であり、他の方法に比べて予測が容易であることから、広く知れている。しかし、cimetidine や nitrofurantoin の乳汁中への移行には能動輸送系の関与が示唆されており、^{28,29)} 乳汁移行を単純な受動拡散のみでとらえることは困難であると考えられる。そのため、既存の予測法の臨床的価値は低い。

血液-乳汁間において、乳腺上皮細胞はバリアーとして働き、物質移行を制限しており、さらにヒトおよびラットの授乳期乳腺上皮細胞でトランスポーターの発現が観察されたため、^{30,31)} 能動輸送を含めた物質輸送を評価するためには、乳腺上皮細胞を用いたモデルは有用であると考えられる。

1. 2 ヒト乳腺上皮細胞を用いた乳汁移行性評価モデルの構築

乳腺は、乳汁の産生および分泌を行なう哺乳類特有の器官である。乳腺の実質をなす乳腺上皮細胞は脂肪組織中に埋まっており、この中で樹枝状形態をとって発育する。Estrogen, progesterone, prolactin などのホルモンの働きによって妊娠期には、乳腺上皮細胞の急激な増殖がみられ、また、出産直後には分化し、乳汁産生が開始され、大量の乳汁タンパク質が合成されるようになる。⁴⁹⁾ そのため、授乳期間中の現象を捉えるためには、授乳期と同様の機能を有する培養細胞系を構築しなければならない。また、経細胞輸送を評価するために *in vivo* と同等のバリアー機能を有し、さらに輸送担体を介した乳汁移行を再現できなければならない。

Schmidhauser らは、³³⁾ prolactin に応答して β -casein を発現することが明らかになったマウス乳腺上皮細胞株である COMMA-1D 細胞³⁴⁾ から機能分化した細胞グループを選択的に回収することに成功し、さらに Toddywalla ら³⁵⁾ や Gerk ら³⁶⁾ は、その細胞を用いてタイトな単層膜を形成し、乳汁中へ移行しやすいことが報告されている nitrofurantoin の能動輸送について検討してきた。しかし、授乳期における薬物の乳汁移行性には種差が観察されることから、³⁷⁾ ヒトでの乳汁移行性を評価するためにヒト乳腺上皮細胞 (HMEC) を用いた培養細胞系の構築が望まれる。

これまでに、HMEC を用いて、経細胞輸送を評価できる授乳期機能を有した単層膜を培養した報告はない。本研究では、ヒトでの授乳期における乳腺上皮細胞を介した能動輸送を再現できる培養細胞による評価系を構築することを目的として以下の検討を行なった。

2. 実験方法

2. 1 試薬

ヒト乳腺上皮細胞基準培地 (MEBM[®]) と乳腺上皮細胞添加因子セット (MEGM[®] SingleQuots) の二つからなるヒト乳腺上皮細胞専用培地 (MEGM[®]) キット, および 0.025 % trypsin / 0.01 % EDTA, trypsin neutralizing solution (TNS), hepes buffered saline solution (HBSS) の三つからなるサブカルチャー用試薬パックは, Cambrex BioScience Wakersvill Inc. (MD, U.S.A) から購入した. EHS 肉腫由来の細胞外基質である Matrigel[®] は, BD Biosciences (CA, U.S.A) から購入した. [1-³H] D-mannitol (20 Ci/mmol), [ethyl-1-¹⁴C]TEA (55.4 mCi/mmol), および [glycyl-1-¹⁴C]PAH (55 mCi/mmol) は, American Radiolabeled Chemicals Inc. より購入した. その他の試薬は, Sigma Chemicals co. (MO, U.S.A) から購入した.

2. 2 細胞培養

2. 2. 1 細胞

HMEC (Cambrex BioScience Wakersvill Inc.) を用いた.

2. 2. 2 Matrigel[®] コートしたディッシュおよび cell culture insert の調製

-20 °C で保存された Matrigel[®] を一晩かけて 4 °C で解凍した. そして, 氷冷下, 解凍した Matrigel[®] を MEBM[®] で 250 µg/mL に希釈し, コーティング溶液を調製した. コーティング溶液を 100 mm ディッシュ (IWAKI) に 8 mL, 24 well-cell culture insert (Becton, Dickinson and company, NJ, U.S.A) に 125 µL/well, 12 well-cell culture insert (Becton, Dickinson and company, NJ, U.S.A) に 360 µL/well 入れ, 37 °C で 3 時間インキュベートし, Matrigel[®] をポリメライズさせた. インキュベート後, クリーンベンチ内で数分間放置し, 余分な溶液を除去した. 最後に, コーティング部分を phosphate buffered saline solution (PBS) で洗浄し乾燥させた.

2. 2. 3 培地調製

培養には、MEBM[®] に MEGM[®] プレットキット (insulin, hEGF, hydrocortione, amphotericin-B, gentamicin, ウシ脳下垂体抽出物) を添加し、MEGM[®] を調製した。この MEGM[®] を用いて、最終濃度が 10 µg/mL の prolactin 添加 MEGM[®] を調製した。ただし、trypsin 処理によって剥がれた細胞の培養には、hEGF は除去した prolactin 添加 MEGM[®] である differentiation medium を用いた。

2. 2. 4 t-HMEC の培養方法

t-HMEC は、HMEC をディッシュ上で培養し増殖後に trypsin 処理し、その処理により剥離した細胞であり、Schmidhauser らの方法を模倣して培養した。以下に詳細を示す。凍結保存した HMEC を 37 °C の水浴で融解し、血球計数盤を用いて細胞数を計数した。Matrigel[®] コートした 100 mm ディッシュに HMEC を播種密度 100,000 cells/ディッシュで播種し、37 °C/5 % CO₂ 条件下で培養した。このときの培地は、MEGM[®] を用いた。80% confluent 到達後、trypsin 処理し、ディッシュから剥がれなかった HMEC を同じディッシュ上で継続して培養した。再び 80% confluent 到達後、trypsin 処理を行い、ディッシュ上での培養と trypsin 処理を合計 3 回繰り返した。各々の trypsin 処理により剥がれてきた細胞は、trypsin 処理の回数に基づき 1-t、2-t、および 3-t-HMEC と呼ぶことにした (Fig. 1)。

t-HMEC は、Matrigel[®] コートした cell culture insert 上で、TER 測定および輸送実験のためのもの、また、Matrigel[®] コートした 60 mm ディッシュ上で、RT-PCR のためのものをそれぞれ培養した。このときの培地は、differentiation medium で、cell culture insert は、面積が 0.9 cm²、または 0.33 cm²、ポアサイズは 1.0 µm のものを用いた。

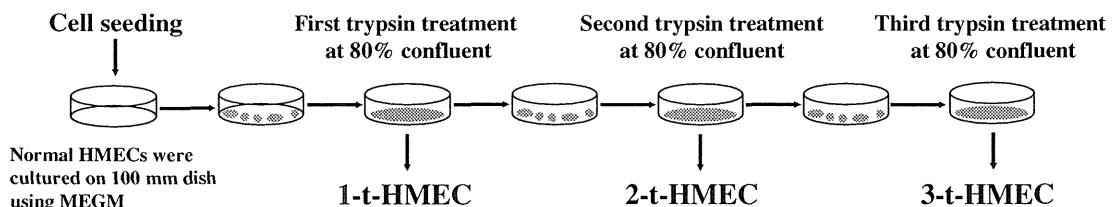


Fig. 1. Culture method for t-HMECs

80 % confluent の細胞は、顕微鏡(MO21, OLYMPUS, Tokyo)により観察し、TER は、チョップスティックエレクトロードを備えた Millicell ERS[®] (MILLIPORE, MA, U.S.A.)で測定した。

2.3 Trypsin 処理を応用したヒト乳腺上皮細胞培養法に関する検討

2.3.1 t-HMEC の形態学的評価

1 回から 4 回までの trypsin 処理を受けた細胞を Matrigel[®] コートした 60 mm ディッシュ上に播種し、単層膜を形成するまで培養した。そして、顕微鏡観察下、Polaroid PDMC II/OL により、光学顕微鏡写真を撮影した。

2.3.2 RT-PCR 法を用いた β -casein の発現に関する検討

Total RNA は、1-t-, 2-t-, および 3-t-HMECs から RNeasy Mini Kit[®] (QIAGEN) を用いて抽出した。

RT-PCR には、One-step RT-PCR Kit[®] (QIAGEN)を用い、マニュファクチャープロトコールにしたがって 0.5 μ g の total RNA を含む全量 50 μ L の反応混合液を調製した。

遺伝子特異的プライマーは、次に示すものを用いた。 β -casein sense : 5'-ATGAG GACCAGCAGCAAGGAGA-3' および antisense : 5'-GGAGCAGAGGCAGAGGA AGATG-3'。RT-PCR 反応スケジュールは、以下の条件で行った。初めに、50 °C、30 分間の逆転写反応、そして 95 °C、15 分間の DNA polymerase 初期活性化ステップを行なった。その後、40 サイクルの cDNA 増幅ステップは、95 °C で 45 秒間、60 °C で 45 秒間および 72 °C で 30 秒間行い、最終エクステンションを 72 °C、10 分間行なった後、解析まで 4 °C で保持した。今回のトランスporter 発現の検討では、ハウスキーピング遺伝子として β -actin を用いた。特異的プライマーは次に示すものを用いた。 β -actin sense : 5'-ATCTGGCACCACACCTTCTACAATGAG-3' , および antisense : 5'-CGCTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACA-3'。RT-PCR 反応は、上記の二つのトランスporter と同様のものを用い、タイムスケジュールは以下の条件

で行った. 初めに 50 °C, 30 分間の逆転写反応, そして 95 °C, 15 分間の DNA polymerase 初期活性化ステップ後, 95 °C で 1 分間, 53 °C で 1 分間および 72 °C で 1 分間からなる 25 サイクルの cDNA 増幅ステップを行い, 最終エクステンションを 72 °C, 10 分間行なった後, 解析まで 4 °C で保持した.

RT-PCR 産物は, tris-acetate EDTA buffer 中, 2 % agarose gel で電気泳動により検出した. ゲルを ethidium bromide で染色し, UV transilluminater により可視化し, ポラロイドカメラにより撮影した.

2. 3. 3 Western Blot 法を用いたβ-casein の発現に関する検討

1-t-, 2-t-, および 3-t-HMEC のそれぞれのサンプルは, 100 mm ディッシュ上で培養した細胞を PBS で 3 回洗い, サンプルバッファー 5 mL で溶解して調製した. サンプルを BCA Protein Assay kit (PIERCE, IL, U.S.A.) によりタンパク定量し, 等量のタンパクを 12.5 % Readygels J (BioRad) に適用し, ゲル電気泳動した. 泳動後, ゲルより電氣的に PVDF メンブレンに 4 °C で 30 V, 16 時間かけて転写した. そして, そのメンブレンを 3 % Gelatin を含む Tris Borate Saline Buffer (TBS, pH8.0) でブロッキングし, さらに 1:1000 で 1 % gelatin を含む TBS に希釈した mouse anti-human β-casein antibody で一晩インキュベートした. その後, 0.1 % Tween を含む TBS で 15 分, 3 回洗浄し, 1:5000 で希釈した horseradish peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG antibody (PIERCE) で 2 時間インキュベートした. 次に, 0.1 % Tween を含む TBS で 15 分, 3 回洗浄し, さらに Tween を含む TBS で 15 分, 1 回洗浄した. 目的のタンパク質を検出するために, SuperSignal® WestDura Extended Duration Substrate (PIERCE) を用いて発光させ, Image Reader LAS-1000 System (Fujiphoto Film Co., LTD. Tokyo, Japan) により観察した.

2. 3. 4 カチオン性およびアニオン性薬物の輸送方向性の検討

1-t-, 2-t-, および 3-t-HMEC を cell culture insert 上で培養し, 輸送実験に用いた. confluent 到達後の 3-t-HMEC を用いて行った. 透過実験は, apical 側 (A 側; 500 μL) から basal 側 (B 側; 1500 μL) あるいは B 側から A 側への二つの輸送方向性を比較するため, A 側あるいは B 側のどちらか一方に ¹⁴C-TEA あるいは ¹⁴C-PAH, および ³H-mannitol を添加した培地を入れた. ¹⁴C-TEA および ¹⁴C-PAH のそれぞれの添加

濃度は 1 μM に設定し、また、paracellular の輸送マーカである ^3H -mannitol を 20 nM で添加した。実験中、プレートはインキュベーター内で 37 $^{\circ}\text{C}$ に保ち、サンプリングは、receiver 側から 100 μL の培地を採取し、反応開始後 30 分、1、2 および 3 時間に行った。定量には、液体シンチレーションカウンター LCS5100 (ALOKA, Tokyo, Japan) を用いた。

モデル薬物および mannitol の見かけの透過係数 (P_{app}) は、eq. 1³⁵⁾ によって算出した。

$$P_{\text{app}} = \frac{[X]_{\text{receiver}}}{A \times t \times [C]_{\text{donor}}} \quad \cdots \text{eq. 1}$$

$[X]_{\text{receiver}}$: ある時間 t でのモデル薬物または mannitol のレシーバーチャンバー中の累積透過薬物量

A : cell culture insert の有効透過面積

$[C]_{\text{donor}}$: ドナーチャンバー中のモデル薬物または mannitol の濃度

mannitol の透過を内部標準として、モデル薬物の P_{app} ($P_{\text{app, model}}$) を mannitol の P_{app} ($P_{\text{app, mannitol}}$) で除することにより透過係数比 ($P_{\text{app ratio}}$) を算出した (eq. 2).³⁸⁾

$$P_{\text{app ratio}} = \frac{P_{\text{app, model}}}{P_{\text{app, mannitol}}} \quad \cdots \text{eq. 2}$$

2.3.5 TEA 取り込み研究

取り込み実験は、basal 側の培地を TEA 添加培地に置換し、それぞれの TEA 添加濃度における 1 分間あたりの取り込み量を測定した。

初めに、培養した 3-t-HMECs monolayer を MEBM[®] で 3 回洗浄し、新しい培地 (MEBM[®]) に置換した。それから、37 $^{\circ}\text{C}$ の水浴でプレインキュベートした。

反応後、apical 側の液を除去し、氷冷した PBS で 3 回洗浄し取り込みを止めた。次に、cell culture insert の細胞を 0.1N NaOH, 500 μL で溶解した。溶解液の 400 μL は、サンプルから細胞内に取り込まれた TEA 放射活性の測定に、そして残りの 100 μL をタンパク定量に用いた。放射活性は、細胞溶解液にシンチレーションカクテル 10 mL を加え、液体シンチレーションカウンターで測定した。また、タンパク定量は、BCA

Protein Assay kit[®]を用い、マニファクチャープロトコールに従い行なった。

TEA 取り込みの動態学的パラメータは、データを次の式にフィッティングすることにより見積もった。

$$V(\text{pmol/mg protein/min}) = \frac{V_{\text{max}}(\text{pmol/mg protein/min}) \cdot C(\mu\text{M})}{K_m(\mu\text{M}) + C(\mu\text{M})} + k_{\text{basal}}(\times 10^{-3} \text{ cm/min}) \cdot C(\mu\text{M})$$

2. 3. 6 RT-PCR 法による hOCT1 と hOCT3 の発現の検討

Total RNA の抽出、RT-PCR およびハウスキーピング遺伝子であるβ-actin は、上述したβ-casein mRNA の検出と同様の方法に従った。

RT-PCR には、One-step RT-PCR Kit[®] (QIAGEN)を用い、マニファクチャープロトコールにしたがって 0.5 μg の total RNA を含む全量 50 μL の反応混合液を調製した。ただし、hOCT1 には Q-solution を加えなかった。特異的プライマーは、次に示すものを用いた。hOCT1 sense : 5'-GATTCCTTTACTCCGCTCTGGTC -3'および antisense : 5'-TTTCTTTGGGCTTTGCTTTTCTCC-3' , また , hOCT3 sense : 5'-GTTTCGCTCTGTTCAGGTCTGTGT-3'および antisense:5'-TTATGTGTTCCCA GAAACTTC-3'。RT-PCR 反応は、Biometra[®] thermocycler (Biometra, Göttingen, Germany) を用いてつぎのタイムスケジュールで行った。50 °C, 30 分間の逆転写反応, そして 95 °C, 15 分間の DNA polymerase 初期活性化ステップ後, 40 サイクルの cDNA 増幅ステップは, 95 °C で 1 分間, 61 °C (hOCT3:60 °C) で 1 分間および 72 °C で 1 分間からなる。最終エクステンションを 72 °C, 10 分間行なった後, 解析まで 4 °C で保持した。

RT-PCR 産物は、β-casein と同様の方法で撮影した。

3. 結果および考察

これまでに機能分化した HMEC 単層膜に関する報告はなく、マウスやラットの乳腺上皮細胞 (MEC) を用いた研究では、単層培養系で機能分化させることは困難であると報告されてきた。³⁹⁾ しかし、Schmidhauser らは、COMMA-1D 細胞を用いた単層培養系において、細胞を trypsin 処理することにより授乳期乳腺と同等の分化状態に導くことに成功した。³³⁾ 彼らは、ディッシュ上で COMMA-1D 細胞を単層培養し、trypsin 処理時間を 4 段階に分け、それぞれの処理で剥がれてきた細胞を別のディッシュ上で培養した。その結果、もともと長時間の処理により剥がれてきた細胞、つまり trypsin に対して最も強い抵抗性を示した細胞のうち 37% が β -casein 産生細胞 (CID9 細胞) であったと報告した。このことは、trypsin 抵抗性をもつ細胞で β -casein を産生する授乳期特異的な機能が発現していることを示している。さらに、Toddywalla らは、フィルター上で CID9 細胞の単層膜を形成し、経上皮抵抗値 (TER) の高いグループを選択することによってタイトな上皮細胞単層膜の形成に成功した。³⁵⁾ その細胞を介した薬物輸送実験では、nitrofurantoin は乳汁方向へ能動輸送され、³⁵⁾ その輸送にナトリウム依存性トランスポーターが関与していることが明らかとなり、³⁶⁾ trypsin 処理培養系は受動拡散および能動輸送の両方を評価できる授乳期細胞培養モデルとなると考えられた。

我々らは、その trypsin を用いた方法を HMEC に応用した。その培養法を Fig. 1 に示す。オリジナルの HMEC をディッシュに播種し、ヒト乳腺上皮細胞培養専用培地 (MEGM) を用いて培養した。80 % confluent の状態で trypsin 処理し、剥離した HMEC は cell culture insert 上で培養し、剥離しなかった HMEC は継続してディッシュ上で培養した。Fig. 1 に示すように trypsin 処理と培養を繰り返すことにより、各回数 of trypsin 処理に抵抗性を示した HMEC (t-HMEC) を分取し、ディッシュおよび cell culture insert 上で培養した。細胞は、trypsin 処理回数に基づいて 1-t、2-t、および 3-t-HMEC と名づけた。

本章では、授乳期乳腺機能を有する細胞を培養するために、まず HMEC に対する trypsin 処理の効果について検討し、次に t-HMEC 培養細胞系の乳汁移行性評価系としての有用性について薬物を用いて検討した。

3.1 ヒト乳腺上皮細胞単層膜の形態学的特徴

一般に、上皮細胞は透過性メンブレン上に播種されると、細胞は培養容器表面に接着して、伸展し、上皮細胞の特徴として敷石状の単層膜を形成する。そして、バリアー機能を発達させ、輸送、拡散、分泌、および薬剤取り込みの研究を可能とする。

我々は、乳腺上皮細胞を介した輸送を評価できる単層膜を形成する t-HMEC を選択するために、それぞれの t-HMEC をディッシュ上に播種し、培養期間中の細胞の形態変化を観察した。

それぞれの単層膜の形態学的特徴を Fig. 12 に示す。顕微鏡写真は、1-t-, 2-t-,

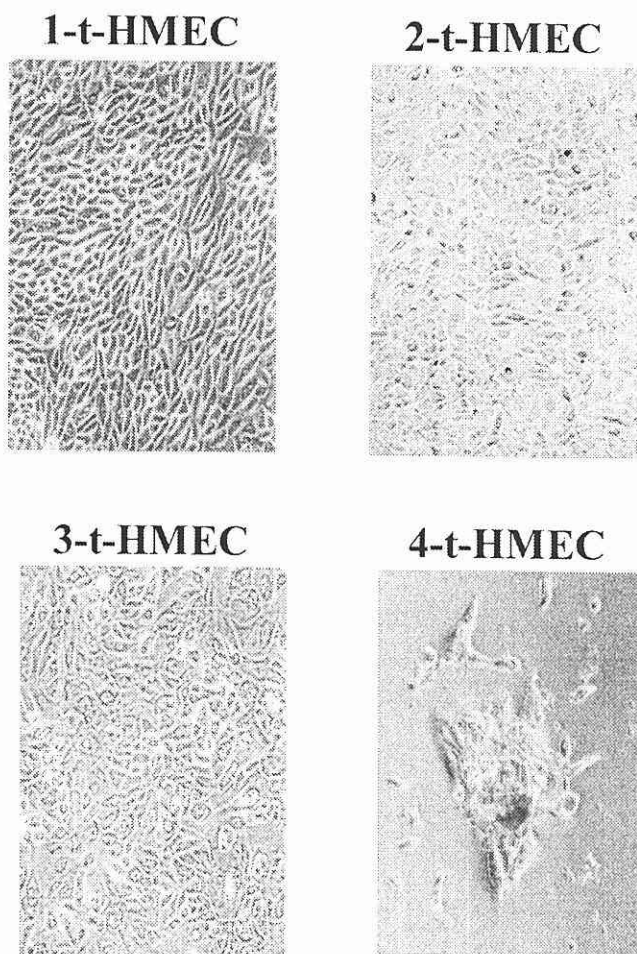


Fig. 2. Microscopic image of t-HMEC monolayers (100x magnification).

3-t-HMEC でそれぞれ培養 7, 10, および 14 日目に撮影した (Fig. 2a, b, c). これら細胞は, すべて敷石状の単層膜を形成し, 上皮細胞様の形態学的特性を維持していた. しかし, 4 回の trypsin 処理を受けた細胞では, 播種翌日から細胞同士が凝集してしまい, 培養 3 日目には凝集体のまま増殖し (Fig. 2d), 培養を継続しても単層膜を形成しなかった.

このことから trypsin 処理には最適な回数があり, 以降の検討では 3 回までの trypsin 処理を受けた細胞 (1-t, 2-t, および 3-t-HMEC) を用いて単層膜の授乳期乳腺機能の発現を評価した.

3. 2 経上皮抵抗値に対する trypsin 処理の影響

乳腺上皮細胞は, 非授乳期より授乳期で非常にタイトな細胞層を形成し, 授乳期間中の主要な物質透過ルートは経細胞輸送である.⁴⁰⁾ そのため, 授乳期機能を有する培養細胞系を構築するためには, タイトな単層膜の形成が必要である. Toddywalla らは,³⁵⁾ trypsin 抵抗性を有する CID9 細胞由来のタイトな単層膜の形成を成功させた.

我々は, HMEC を trypsin 処理することによって, CID9 細胞と同様にタイトな単層膜を培養できるかを検討するために, 培養中, TER を測定した.

Fig. 3a に各々の t-HMEC での TER のタイムコースを示す. 培養 0 日目は cell culture insert に播種した日を示し, trypsin 抵抗性のより強い細胞で TER の上昇の開始および最大値に到達するまでの培養期間が延長した. また, TER の最大値は, 1-t, 2-t, および 3-t-HMEC でそれぞれ培養 11, 14, および 19 日目に得られた.

Fig. 3b には, 最大 TER に対する trypsin 処理の影響について示す. 最大 TER は, trypsin 処理回数の増加に伴って有意に増加し, 3-t-HMEC で $227 \pm 11 \Omega \cdot \text{cm}^2$ と最も高い値が得られ, 輸送研究を行なうために 3-t-HMEC がもっとも有用であると考えられた.

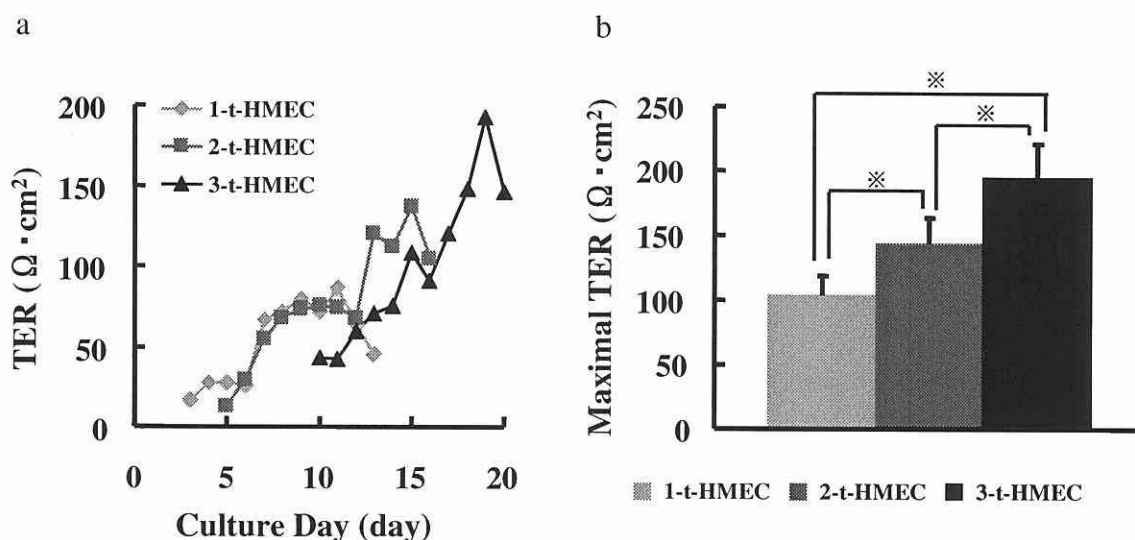


Fig. 3. Effect of trypsin treatment on time course of TER (a) and maximal TER (b)

Each value represents means \pm S.D. (n=8-10)

* $p < 0.05$ (ANOVA, Turkey test)

3.3 β -casein の発現に対する trypsin 処理の影響

ヒトの乳汁には、タンパク質や脂質が多く含まれており、授乳期間中に発達した HMEC では、 α -lactalbumin および乳脂質の産生の増加や casein の特異的な産生が観察される。⁴¹⁾ 授乳期の HMEC が特異的に産生する casein には、 α -、 β -、および γ -casein があり、そのうち β -casein が授乳期乳腺機能、すなわち機能分化の指標として認められてきた。³⁹⁾ そこで、HMEC 培養系が機能分化した実験系であるかどうかを明らかにするために、 β -casein の産生について RT-PCR 法および Western blot 法により検討した。

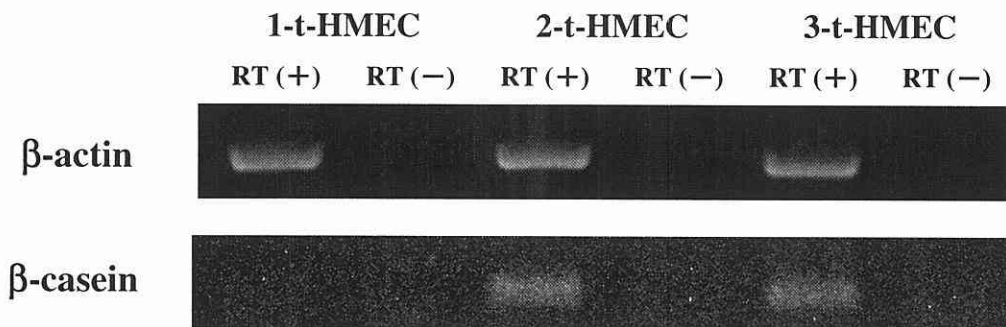
Fig. 4a に示すように、2-t および 3-t-HMEC で β -casein mRNA は発現していたが、1-t-HMEC では観察されなかった。このことは、繰り返しの trypsin 処理によって mRNA レベルでの発現が誘導されたことを示唆し、trypsin 処理により強い抵抗性を示す細胞グループにおいて casein 産生細胞が多いという Schmidhauser らの報告に一致する。³³⁾

さらに、Western blot 法によってタンパクレベルでの発現を検討した (Fig. 4b)。

その発現は、3-t-HMEC のみで観察されたが、2-t-HMEC では mRNA が観察されたにもかかわらずタンパク発現が観察されないので、trypsin 処理は転写過程のみならず翻訳過程にも影響を及ぼしている可能性がある。

上記の検討より、3-t-HMEC において機能分化の指標である β -casein の発現が mRNA およびタンパクレベルの両方で確認されたので、この細胞は授乳期と同様の機能を有していることが示唆される。

a



b



Fig. 4. Effect of trypsinization on β -casein expression in t-HMEC monolayers. (a) Expression of β -casein mRNA was determined in 1-t-HMEC, 2-t-HMEC and 3-t-HMEC. RT-PCR analysis was performed with the specific primer sets. Reactions were performed against total RNA with (+) or without (-) reverse transcription (RT). (b) Expression of β -casein (26kDa) was determined in 3-t-HMEC. Western blot analysis was performed with specific antibody.

3. 4 単層膜を介したモデル薬物の輸送方向性の検討

3-t-HMEC は、最も高い TER を示し、機能分化していることから、授乳期乳腺細胞の特徴を反映していると考えられた。そこで、能動輸送系の基質を用いて t-HMEC を介した輸送特性を評価し、能動輸送の介在の可能性を検討した。

これまでにいくつかの薬物において、乳腺上皮細胞を介した能動輸送が示唆されている。ヒト臨床試験では、nitrofurantoin, ³¹⁾ cimetidine, ²⁸⁾ および acyclovir⁴¹⁾ が basal 側（血液側, B 側）から apical 側（乳汁側, A 側）へ能動的に輸送されることが示唆され、乳汁中へ蓄積しやすいと報告されている。医薬品の多くは弱電解質であり、生理的環境下ではカチオンあるいはアニオンとして存在するため、organic cation transporters (OCTs) あるいは organic anion transporters (OATs) の基質になる可能性がある。そこで、hOCTs および hOATs の基質を用い、それらの存在の可能性を調べた。モデル基質には、OCTs の基質として ¹⁴C-tetraethylammonium bromide (TEA), OATs の基質として ¹⁴C-*p*-aminohippuric acid (PAH) を用いた。

3-t-HMEC を介した TEA の輸送では、B 側から A 側方向への輸送が A 側から B 側方向より有意に高く ($p < 0.05\%$, Table 1), 1-t および 2-t-HMEC では、3-t-HMEC と同様の方向性は観察されたが、両方向の間に有意差は観察されなかった (Table 1)。このことから、3-t-HMEC では、TEA の A 側方向への移行に輸送担体が関与していると示唆され、乳汁方向へ輸送するトランスポーターの

Table 1. Permeability of model substances and mannitol across t-HMEC monolayers

		P_{app} ratio		P_{app} mannitol ($\times 10^{-6}$ cm/s)	
		Apical to Basal	Basal to Apical	Apical to Basal	Basal to Apical
TEA	1-t-HMEC	1.139 \pm 0.083	1.227 \pm 0.042	5.734 \pm 1.382	5.980 \pm 1.111
	2-t-HMEC	1.112 \pm 0.156	1.230 \pm 0.073	2.299 \pm 0.270	2.193 \pm 0.080
	3-t-HMEC	0.940 \pm 0.287	1.356 \pm 0.076*	1.395 \pm 0.256	1.622 \pm 0.230
PAH	1-t-HMEC	0.860 \pm 0.106	0.860 \pm 0.028	7.387 \pm 0.560	7.304 \pm 0.500
	2-t-HMEC	0.864 \pm 0.100	0.738 \pm 0.045	3.693 \pm 0.280	3.652 \pm 0.250
	3-t-HMEC	0.865 \pm 0.106	0.860 \pm 0.028	2.629 \pm 0.419	2.442 \pm 0.119

Each value represents means \pm S.D. (n=4-5).

* $p < 0.05$, compared with the value in apical to basal direction.

発現パターンとして、細胞内から乳汁方向への排出に関わるトランスポーターの apical membrane での発現、および/あるいは血液側から細胞内への取り込みに関わるトランスポーターの basal membrane での発現が推察される。

PAH ではすべての t-HMEC において輸送方向性は観察されなかった (Table 1). PAH を基質とする OATs に分類されるトランスポーターは, OAT1, OAT2, OAT3, OAT4, および multidrug resistant associated protein 2 (MRP2) であり, OAT1, OAT2, OAT3, および OAT4 はヒト授乳期乳腺上皮細胞に発現しておらず, MRP2 は mRNA レベルでの発現が明らかとなっている.³⁰⁾ これらのことから, 乳腺上皮細胞での MRP2 を介した PAH 輸送は, 方向性を生み出すほどの重要な働きはしていないと考えられる. しかし, 今回の実験のみでは, 他の OATs の存在の可能性を否定できるものではなく, トランスポーターに対する親和性の異なる数種の基質を用いて, さらなる検討を加える必要があると考えられた.

3.5 3-t-HMEC での basal membrane を介した TEA の取り込み

3-t-HMEC を介した TEA の輸送では, B 側から A 側への透過が A 側から B 側方向へのそれよりも有意に高く ($P < 0.05$), basal membrane を介した細胞内への取り込みの過程に担体を介した輸送系が寄与している可能性が考えられた. そこで, 3-t-HMEC での basal membrane を介した TEA の取り込み機能を評価するために取り込み実験を行った.

TEA の添加濃度 $1 \mu\text{M}$ での取り込みは, 1 分まで直線的に増加した (Fig. 5). そのため, TEA の初期取り込み速度の濃度依存性は, 1 分間での 0.5 から $25 \mu\text{M}$ の範囲の TEA 添加濃度で検討した. それぞれの TEA 濃度における 1 分間あたりの B 側からの細胞内取り込み量から, 能動的および受動的取り込み速度を見積もった (Fig. 6).

各 TEA 添加濃度での能動的取り込み速度をプロットすると, 初期取り込み速度は濃度依存性を示し, K_m 値は $3.904 \mu\text{M}$, V_{max} 値は $2.03 \text{ pmol/mg protein/min}$ であり (Fig. 7), basal membrane を介した能動輸送系の介在が示された. このことから, basal

membrane を介した細胞内への TEA の能動的取り込み過程が, B 側から A 側への輸送方向性に関与していると考えられる.

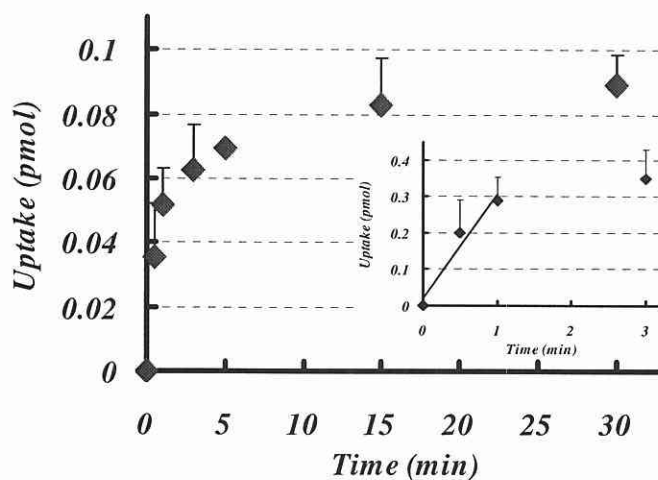


Fig. 5. Time course of TEA uptake in 3-t-HMEC

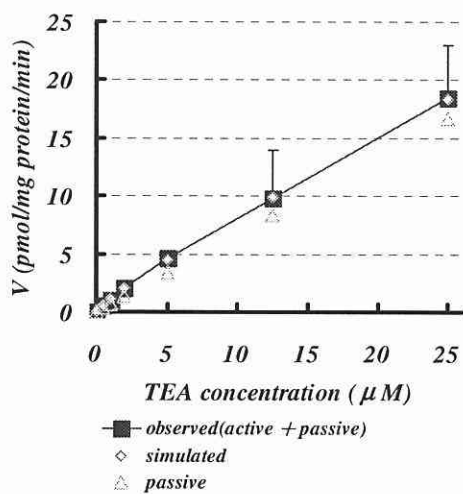


Fig. 6. Fitting for calculation of passive transport across basal membrane

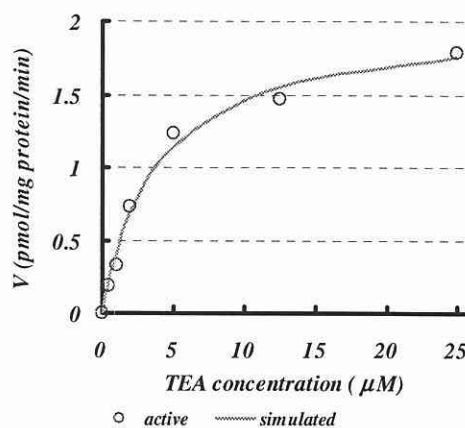


Fig. 7. Concentration dependence of TEA uptake in 3-t-HMEC

3. 6 培養単層膜での vectorial transport に関するトランスポーターの発現

3-t-HMEC を介した TEA 輸送において能動輸送系の関与が示唆された。

Alcorn らは、授乳期および非授乳期 HMEC でのトランスポーターの発現をリアルタイム RT-PCR 法により検討し、授乳期および非授乳期 HMEC での human organic cation transporter 1 (hOCT1) mRNA および human organic cation transporter 3 (hOCT3) mRNA の発現を明らかにした。³⁰⁾ hOCT1 は、TEA を基質とするトランスポーターであることが明らかである一方で、hOCT3 は、一部の研究者により TEA を基質とすると報告されている。⁴²⁾ さらに、hOCT1 は肝臓や腎臓で発見され、basal membrane に局在し、⁴³⁾ その機能は細胞内へ有機カチオンを取り込むプロトンとの交換輸送系である。⁴⁴⁾ また hOCT3 は、ヒトではその局在は明らかになっていないが、胎盤、肝臓および腸管などを含む広範囲の組織に発現しており、⁴⁵⁾ マウスでは血液中から胎盤への取り込みトランスポーターとして報告されていることから、⁴⁶⁾ basal membrane での発現が推察され、これらトランスポーターによる basal membrane を介した TEA 取り込みが輸送方向性に寄与しているかもしれない。

これらのことから、hOCT1 および hOCT3 が 3-t-HMEC を介した TEA の輸送方向性に関与していると考えられ、t-HMEC での hOCT1 および hOCT3 の発現を RT-PCR 法により検討した。

検討したすべての t-HMEC で hOCT1 および hOCT3 mRNA の両者の発現が確認され (Fig. 8)、これら二つのトランスポーターが、3-t-HMEC を介した TEA 輸送の一部に関与していると考えられた。また、本研究では検討していないが、organic cation/carnitine transporter 1 (OCTN1)、および OCTN2 が、TEA を基質として認識し、さらに授乳期乳腺で発現が確認されているので、乳腺での TEA 輸送にそれらトランスポーターが関与している可能性がある。

さらに本研究での RT-PCR 条件下では、hOCT1 mRNA は trypsin 処理回数の増加に伴って発現も増大し、hOCT3 mRNA は、trypsin 処理回数の増加により発現が減少する傾向にあった (Fig. 8)。Alcorn らは、授乳期 HMEC での hOCT1

mRNA および hOCT3 mRNA の発現レベルは、非授乳期に比べてそれぞれ増加 (7.8 倍) および減少 (0.3 倍) すると報告しており、³⁰⁾ この知見と本研究での trypsin 処理の繰り返しによる発現の変化は一致している。このことから、HMEC の trypsin 処理は、未分化状態から、より分化した授乳期 HMEC を選択するための重要なツールとなっていることがうかがえ、3-t-HMEC は授乳期乳腺機能を有する単層膜であり、薬物の経細胞輸送を評価するための有用なツールになり得るかもしれない。

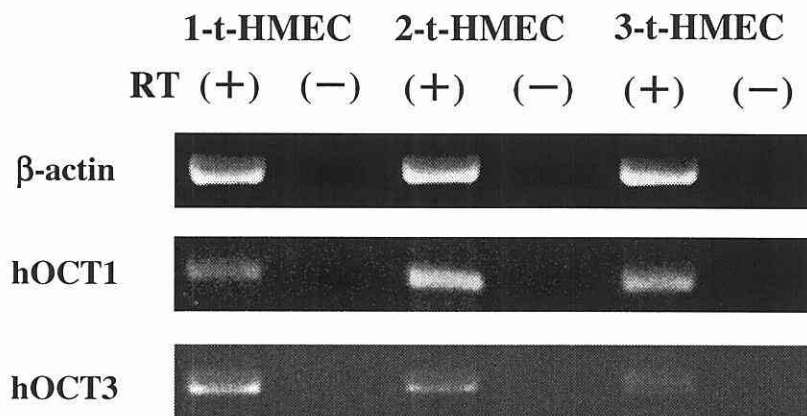


Fig. 8. Expression of trypsin treatment on the transporters related to vectorial transport. RT-PCR analysis was performed with the specific primer sets for the detection of hOCT1 mRNA and hOCT3 mRNA in t-HMEC. Reactions were performed against total RNA with (+) or without (-) reverse transcription (RT).

4. 結論

授乳婦が薬物を服用してそのときの乳汁を採取することは倫理的にも入手困難であることが予想されるため、*in vitro* 乳汁移行性予測法の必要性が高く、HMEC を用いてその方法の構築を試みた。その結果、授乳期機能を有する単層膜の形成に成功した。ヒト細胞での成功は本研究が初めてである。

我々は、Schmidhauser らの培養方法³³⁾ を改良し、HMEC を trypsin 処理することによって t-HMEC を培養した。3 回までの trypsin 処理を受けた HMEC (1-t, 2-t, および 3-t-HMEC) を単層培養してそれぞれの細胞単層膜の機能を評価した。3-t-HMEC は、最もタイトな単層膜を形成し、 β -casein を発現しており、授乳期機能を有する単層膜であることが明らかとなった。さらに、その単層膜を介した TEA 輸送は、血液側方向より乳汁側方向への有意な方向性が観察され、さらに basal membrane を介した TEA 取り込みに輸送担体の関与が示唆された。また、TEA を基質とする hOCT1 および hOCT3 の発現も観察された。このことから、3-t-HMEC 単層膜は、授乳期機能を有する能動輸送系を発現していると考えられた。

以上のことより、*in vitro* 培養モデルを用いて薬物の乳汁移行性を評価できる可能性が示唆された。今後、培養モデルでの定量的な評価を可能にするためには、さらに詳細な検討が必要である。

本研究において実験系の構築に成功した際には、本実験系が臨床上および医薬品の開発段階において授乳の安全性を評価するために有用であり、利用されることが期待される。

引用文献

- 1) American Academy of Pediatrics, Work Group on Breastfeeding., *Pediatrics.*, **100**, 1035-1039 (1997).
- 2) Anderson P. O., *Clin. Pharm.*, **10**, 594-624 (1991).
- 3) Kramer M. S., Chalmers B., Hodnett E. D., Sevkovskaya Z., Dzikovich I., Shapiro S., Collet J. P., Vanilovich I., Mezen I., Ducruet T., Shishko G., Zubovich V., Mknuk D., Gluchanina E., Dombrovskiy V., Ustinovitch A., Kot T., Bogdanovich N., Ovchinkova L., Helsing E., *JAMA.*, **285**, 413-420 (2001).
- 4) American Academy of Pediatrics, Section on Breastfeeding., *Pediatrics*, **115**, 496-506 (2005).
- 5) American Academy of Family Physicians. *AAFP Policy Statement on Breastfeeding*. Leawood K. S., *American Academy of Family Physicians*, 2001.
- 6) American College of Obstetricians and Gynecologists. Breastfeeding: maternal and infant aspects., *ACOG Educational Bulletin Number 258.*, Washington, DC, American College of Obstetricians and Gynecologists, 2000.
- 7) Fifty-Fourth World Health Assembly. *Global Strategy for Infant and Young Child Feeding. The Optimal Duration of Exclusive Breastfeeding*. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2001.
- 8) United Nations Children's Fund. *Breastfeeding: Foundation for a Healthy Future*. New York, NY: United Nations Children's Fund; 1999.
- 9) Alan S. R., Zhou W., Andrew A., *Pediatrics.*, **110**, 1103-1109 (2002).
- 10) Hatcher S. L., *Psychiatry.*, **45**, 172-181 (1982).
- 11) Atkinson H. C., Begg E. J., Darlow B. A., *Clin. Pharmacokinet.*, **14**, 217-240 (1988).
- 12) Wilson J. T., Brown R. D., Cherek D. R., Dailey J. W., Hilman B., Jobe P. C., Manno B. R., Redetzki H. M., Stewart J. J., *Clin. Pharmacokinet.*, **5**, 1-66 (1980).
- 13) Wilson J. T., *Drug Metab. Rev.*, **14**, 619-652 (1983).
- 14) Matheson I., *Br. Med. J.*, **290**, 1588-1589 (1985).

- 15) Bennett P. N., *Drugs and Human Lactation*. Elsevier, Amsterdam, 1988.
- 16) ICH harmonized tripartite Guideline, General Considerations for Clinical trials E8., Available from: URL:<http://www.ich.org/cache/comp/276-254-1.html>
- 17) Beaulac-Baillargeon L., Allard G., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **36**, 413-416 (1993).
- 18) Notarianni L. J., Belk D., Aird S. A., Bennett P. N., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **40**, 333-337 (1995).
- 19) Beaulac-Baillargeon L., Auclair A., Matte L., Gaudreult R. C., Forest J. C., *Drug Invest.*, **7**, 57-62 (1994).
- 20) Fleishaker J. C., Desai N., McNamara P. J., *J. Pharm. Sci.*, **76**, 189-193 (1987).
- 21) Fleishaker J. C., McNamara P. J., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **244**, 919-924 (1988).
- 22) McNamara P. J., Burgio D., Yoo S. D., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **109**, 149-160 (1991).
- 23) McNamara P. J., Burgio D., Yoo S. D., *Drug Metab. Disp.*, **20**, 302-308 (1992).
- 24) Begg E. J., Atkinson H. C., *Pharmac. Ther.*, **59**, 301-310 (1993).
- 25) Atkinson H. C., Begg E. J., *Clin. Pharmacokinet.*, **18**, 151-167 (1990).
- 26) Meskin M. S., Lien E. J., *J. Clin. Hosp. Pharm.*, **10**, 269-278 (1985).
- 27) Agatonovic-Kustrin S., Tucker I. G., Zecevic M., Zivanovic L. J., *Anal. Chim. Acta.*, **418**, 181-195 (2000).
- 28) Oo C. Y., Kuhn R. J., Desai N., McNamara P. J., *Clin. Pharmacol. Ther.*, **58**, 548-555 (1995).
- 29) Gerk P. M., Kuhn R. J., Desai N. S., McNamara P. J., *Pharmacotherapy.*, **21**, 669-675 (2001).
- 30) Alcorn J., Lu X., Moscow J. A., McNamara P. J., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **303**, 487-496 (2002).
- 31) Gerk P. M., Oo C. Y., Paxton E. W., Moscow J. A., McNamara P. J., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **296**, 175-180 (2001).
- 32) Neville M. C., Morton J., Umemura S., *Pediatr. Clin. North. Am.*, **48**, 35-52 (2001).
- 33) Schmidhauser C., Bissell M. J., Myers C. A., Casperson G. F., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **87**, 9118-9122, (1990).

- 34) Danielson K. G., Osborn C. J., Durban E. M., Butel J. S., Medina D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 3756-3760 (1984).
- 35) Toddywalla V. S., Kari F. W., Neville M. C., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **280**, 669-676 (1997).
- 36) Gerk P. M., Moscow J. A., McNamara P. J., *Drug Metab. Dispos.*, **31**, 691-693 (2003).
- 37) McNamara P. J., Burgio D., Yoo S. D., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **261**, 918-923 (1992).
- 38) Marks G. J., Ryan F. M., Hidalgo I. J., Smith P. L., *Gastroenterology*, **100**, suppl, A697, (1991).
- 39) Hahm H. A., IP M. M., Darcy K., Black J. D., Shea W. K., Forczek S., Yosimura M., Oka T., *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, **26**, 803-814, (1990).
- 40) Shennan D. B., Peaker M., *Physiol. Rev.*, **80**, 925-951 (2000).
- 41) Bork K., Kaiser T., Benes P., *Arzneimittelforschung.*, **50**, 656-658, (2000).
- 42) Wu X., Hung W., Ganapathy M. E., Wang H., Kekuda R., Conway S. J., Leibach F. H., Ganapathy V., *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, **279**, F449-F458, (2000).
- 43) Pritchard J. B., Miller D. S., *Physiol. Rev.*, **73**, 765-796, (1993).
- 44) Gorboulev V., Ulzheimer J. C., Akhoundova A., Ulzheimer-Teuber I., Karbach U., Quester S., Baumann C., Lang F., Busch A. E., Koepsell H., *DNA Cell Biol*, **16**, 871-881, (1997).
- 45) Verhaagh S., Schweifer N., Barlow D.P., Zwart R., *Genomics.*, **55**, 209-218, (1999).
- 46) Hasannejad H., Takeda M., Narikawa S., Huang X. L., Enomoto A., Taki K., Niwa T., Jung S. H., Onozato M. L., Tojo A., Endou H., *Eur. J. Pharmacol.*, **499**, 45-51, (2004).