20S2-01

有機アニオン系薬物の血液胎盤関門の透過機構

○牛込文彦¹⁾、中村浩明¹⁾、江本晶子¹⁾、犬山正子¹⁾、高長ひとみ³⁾、
松尾浩民¹⁾、小松 一²⁾、柳井繁章²⁾、月森清巳²⁾、中野仁雄²⁾、澤田康文¹⁾
九州大学大学院薬学研究科臨床薬学講座¹⁾、九州大学大学院医学研究科生殖病態生理学講座²⁾
科学技術振興事業団³⁾

Transport mechanism of organic anion drug across the blood-placental barrier

Fumihiko Ushigome¹⁾, Hiroaki Nakamura¹⁾, Akiko Emoto¹⁾, Masako Inuyama¹⁾, Hitomi Takanaga³⁾, Hirotami Matsuo¹⁾, Hajime Komatsu²⁾, Shigeaki Yanai²⁾, Kiyomi Tsukimori²⁾,
Hitoo Nakano²⁾, Yasufumi Sawada¹⁾

1) Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University

2) Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

3) CREST

【目的】胎盤は胎児-母体系における母体血と胎児血との接点であり、胎盤絨毛膜に存在するトロホブラスト層により血液胎盤関門が形成されている。妊娠中に母体に侵入した異物は母体血循環から胎盤膜を経由し胎児血循環へと移行し、時に催奇形作用、胎児死亡など重篤な胎児毒性を惹起する場合があります。極めて重要な過程である。胎盤における物質輸送は消化管、腎臓、肝臓などの形質膜と同様に単純拡散、促進拡散、能動輸送などが存在している。この血液胎盤関門における物質透過性研究として、現在までにアミノ酸¹⁾や糖²⁾などの栄養物質を用いた報告は数多くなされているが、生体異物である薬物を用いた報告は少なく、その透過機構は殆ど明らかにされていない。薬物によっては胎児血中濃度が必ずしも母体血中濃度と対応せず、母体血中濃度よりも低い場合、高い場合があります^{3,4)}。この関門において制御されていると考えられる。本研究では有機アニオン系薬物、特に抗てんかん薬として妊婦においても繁用される一方で、その高い胎児移行性や催奇形性等の胎児毒性が問題となるバルプロ酸の血液胎盤関門における輸送機構についてヒト由来胎盤絨毛癌培養細胞系及び胎盤より調製した膜小胞系を用い検討した。

【方法】ヒト由来胎盤絨毛癌培養細胞系(BeWo細胞)：Liuらの方法⁵⁾に従いBeWo細胞をMulti-dishあるいはTranswell上に播種し日あるいは12日間培養した後、電気抵抗を測定

図1 Transcellular transport of [³H]valproic acid and [¹⁴C]mannitol across the BeWo monolayer.

し、常法に従い各種薬物の取り込みあるいは経細胞透過性を評価した。膜小胞系：微絨毛膜小胞はマグネシウム沈殿法により分離精製を行い、調製した膜小胞の純度は、微絨毛膜指標酵素であるアルカリホスファターゼ(AP), γ -GTPについて各酵素活性を測定し判定した。胎盤ホモジネート分画中の酵素活性に比較したところ、調整後の微絨毛膜小胞のAP活性は10-15倍、 γ -GTP活性は4-6倍に上昇した。取り込み実験は、急速濾過法により行った。以上の実験系において、輸送実験を行った化合物としては、[³H]L-アラニン、[³H]3- α -メチル D-グルコース、[³H]バルプロ酸などの放射性化合物を用いた。

【結果及び考察】薬物輸送を測定するため、主に簡便な方法としてヒト由来胎盤絨毛癌培養細胞系であるBeWo細胞を用いた。

バルプロ酸は、母親から胎児へ濃縮的に移行し、さらに催奇形性を有することから、そ

図2 pH-dependence, and the effects of self-inhibition on initial uptake of $[^3\text{H}]$ valproic acid by BeWo cells.

の膜輸送機構を解明することは重要である。そこで、培養細胞系を用い経細胞輸送及び取り込み実験を行った。 $[^3\text{H}]$ バルプロ酸の経細胞輸送は明らかに apical-to-basolateral (A-to-B) 方向において優位であった(図1)。A-to-B 方向及び B-to-A 方向への輸送における透過速度はそれぞれ 3.56 ± 0.05 ($\mu\text{L}/\text{mg protein}/\text{min}$)、 1.63 ± 0.10 であった。paracellular 透過マーカーである $[^{14}\text{C}]$ マンニトールの透過速度はそれぞれ 0.73 ± 0.03 及び 0.77 ± 0.01 であり、 $[^3\text{H}]$ バルプロ酸のそれと比較し有意に低い値を示した。また、取り込み実験において酸性状況下での取り込みは亢進し、高濃度バルプロ酸存在下と比較し、その差は酸性領域においてより大きかった(図2)。また、膜小胞系による検討においても外側酸性状況下においてバルプロ酸の取り込みは有意に上昇し、pH 5.5 において一過性の取り込み亢進現象が示された(図3)。 $[^3\text{H}]$ バルプロ酸の取り込みは非飽和性輸送系に

図3 Effect of pH gradient on uptake of valproic acid into BBMV.

加え飽和性を示す輸送系の存在が示され(図4)、pH 6.5 での K_m 値は 10.8 (mM)、pH 7.4 では 26.0 であり、酸性条件下におけるより高い親和性が示された。また、代謝阻害剤存在下において取り込みの有意な低下が示され、酢酸や中鎖脂肪酸、*p*-アミノ馬尿酸により取り込み阻害現象が示された。このように、バルプロ酸の胎盤輸送において、トロホプラスト細胞膜上に何らかの少なくとも pH 依存性を有する膜輸送機構が機能していることが推測された。現在、細胞系及び膜小胞系により輸送機構について詳細な検討を行っている。

図4 Concentration dependence of initial uptake of valproic acid at pH 6.5 and pH 7.4.

【Abstract】 Valproic acid is an anticonvulsant drug used for the treatment of epilepsy, but it shows fetal toxicity, including teratogenicity. In the present study, to elucidate the transport mechanisms of valproic acid across the blood-placental barrier, we carried out the transcellular transport and uptake experiments with human placental choriocarcinoma epithelial cells (BeWo) in culture. Transcellular transport of $[^3\text{H}]$ valproic acid across BeWo cell monolayer was unidirectional transport from maternal to fetal circulation. Uptake of $[^3\text{H}]$ valproic acid by cells was temperature- and pH-dependent, and increased at acidic pH. Furthermore, various experiments are carrying to evaluate the transport mechanisms of organic anion drugs across the blood-placental barrier.

【reference】 1) Moe, A.J., Placental amino acid transport, *Am. J. Physiol.*, 268, C1321-C1331 (1993). 2) Gordon, M.C., Zimmerman, P.D., Landon, M.B., Babbe, S.G., Kniss, D.A., Insulin and glucose modulate glucose transporter messenger ribonucleic acid expression and glucose uptake in trophoblasts isolated from first-trimester chorionic villi, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 173, 1089-1097 (1995). 3) Pacifici, G. M., and R. Nottoli. Placental transfer of drugs administered to the mother. *Clin. Pharmacokinetic Concept*, 28, 235-269 (1995). 4) van der Aa, E. M., J. H. J. C. Peereboom-Stegeman, J. Noordhoek, F. W. J. Gribnau, and G. M. Russel. Mechanisms of drug transfer across the human placenta. *Pharmacy World and Science*, 20, 139-148 (1998). 5) Lin, F., Soares, M.J., Audus, K.L., Permeability properties of monolayers of the human trophoblast cell line BeWo, *Am. J. Physiol.*, 273, C1596-1604 (1997).