

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12764

研究課題名(和文) 授乳婦薬物治療における授乳の可否判断の補助のための非臨床的アプローチ

研究課題名(英文) Nonclinical Approaches to Determining the Acceptability of Breastfeeding in the Pharmacotherapy of Lactating Women

研究代表者

小森 浩二 (Komori, koji)

摂南大学・薬学部・准教授

研究者番号：60611598

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：臨床試験が困難な周産期薬物治療の領域では、医薬品の乳汁移行性に関する情報は不十分である。本研究の目的は、マウスを用いた簡易型乳汁移行性試験とヒト乳腺上皮細胞単層膜の透過性試験を組み合わせた非臨床的なアプローチで、ヒトでの乳汁移行性に関する情報を補い、医薬品を再評価することである。助成いただいた期間で、これまで情報の無かったデアニン、ヒトでの情報が少なかったエドキサバン、共に乳汁移行性が低い可能性を示唆する結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トランスポーターの発現や乳汁の組成の違いから、マウスなどげっ歯類での乳汁移行性に関する情報は、ヒトでの移行性を評価するのに有用性が低いとされてきたが、ヒト乳腺上皮細胞の透過性と組み合わせて評価する本研究成果は、動物実験の結果に対する類似点や差異を明確に出来るなど学術的意義は大きい。また、本研究で得られた医薬品の乳汁移行性に関する結果は、授乳婦の薬物治療において、母乳育児と薬物治療の葛藤を解消できるため、社会的意義は極めて大きい。

研究成果の概要(英文)： In the field of perinatal pharmacotherapy, where clinical trials are challenging, information on the transfer of drugs into breast milk is insufficient. The aim of this study is to evaluate drugs using a non-clinical approach that combines In vivo tests with mice and In vitro tests with human mammary epithelial cells. During the grant period, we tested L-theanine, for which there was no information on milk transfer, and edoxaban, for which there was limited information on milk transfer in humans. The results suggested that the transfer of these two drugs into breast milk is likely to be low.

研究分野：医薬品評価学、臨床薬理学

キーワード：乳汁移行性 周産期薬物治療 母乳育児 ヒト乳腺上皮細胞

## 1. 研究開始当初の背景

母乳は、栄養学的には赤ちゃん(授乳児)にとって完全な栄養源であり、免疫系の発達など利点を挙げればキリがない。さらに母乳育児は、授乳児だけでなく母親(授乳婦)の心身の健康に対する良い影響についても数多く挙げられる。こうした考えの中、授乳婦が薬物治療を受ける際、児への授乳と自身の服薬の間では大きな葛藤が生まれる。1990年頃より UNICEF/WHO は、「ほとんどのくすりはわずかながら母乳に移行するが、赤ちゃんに影響のあるものはほとんどなく、授乳をやめることの方が、くすりを服用するより危険である」とし、薬物治療中における十分な議論の無い断乳について忠告し、母乳育児を強く押し進めてきた。しかし授乳の可否について評価できる医薬品の情報は、米国小児科学会の勧告や LactMed などの WEB サイトに加えて、Hale TW 著の“Medications and Mothers' Milk 2023”など、増えてきているが、本邦で開発された医薬品や比較的新しく開発された医薬品に関する乳汁移行性の情報は十分ではない。そういった状況で主治医の判断は慎重にならざるを得ないのが現状である。

いくつかの総説にも示されるように、薬物の乳汁移行は、主として乳腺上皮細胞を透過する pH 分配理論に沿った受動拡散によるもので、薬物の分子量やタンパク結合率などの物理化学的性質の寄与は大きいとされる<sup>1)</sup>。しかし、数少ないヒトの報告と薬物の物理化学的性質のみで、薬物治療中の授乳の可否を判断するのは極めて難しい。

そこで本研究は、2013年に確立した「マウスを用いた簡易型乳汁移行試験法」と、すでに木村らによって確立されている「ヒト乳腺上皮細胞単層膜の透過試験<sup>2)</sup>」を実施し、非臨床的アプローチによって得た情報でヒトでの情報を補完して、薬物治療における薬物選択の意思決定を補助する。

## 2. 研究の目的

本研究は、不必要な断乳を避けるだけでなく、授乳婦の薬物治療にとって有用であると考えられる医薬品の「(慎重な判断に基づいた結果)授乳婦への使用を避けるべきと認識される長い期間」を短縮させ、ヒトでの有益な情報が集まらない現状を改善することを目的とする。そのため、ヒトでのわずかな情報を補完するため、できるだけ多くの医薬品に対し、マウスを用いた簡易型乳汁移行性試験やヒト乳腺上皮細胞単層膜の透過性試験を実施し、非臨床的情報を収集する。

## 3. 研究の方法

### (1) マウスを用いた簡易型乳汁移行性試験

購入した妊娠マウス(Std-ddY系)を飼育し、出産後10日~16日の泌乳マウスをモデルマウスとして用いた。検討対象医薬品を精製水で懸濁した溶液を経口投与し、投与後0、30、60、90、120、150、180分に乳汁および血液を採取した。特に乳汁採取時、乳汁の分泌が十分でない場合は、オキシトシンを0.05単位皮下投与してから乳汁を採取した。

### (2) ヒト乳腺上皮細胞単層膜の透過性試験

木村らによって2006年に報告された方法<sup>2)</sup>に則って実施した。購入したヒト乳腺上皮細胞(HMEC)を前培養する際、80%コンフルエントになる度に0.025%トリプシン/0.1%EDTAを加える処理を1~3回繰り返してトリプシン耐性のHMECを得た。培養面積0.9cm<sup>2</sup>、孔径0.4μm、ポリエチレンテレフタレート製のセルカルチャーインサートに約20×10<sup>4</sup> Cellを播種、約3週間培養し、経上皮電気抵抗(TEER)の上昇を確認しながら単層膜を形成させた。

透過試験は、セルカルチャーインサートの内側をapical側とし、検討対象医薬品を含むHanks'平衡塩溶液(HBSS)を500μL添加し、basal側を2500μLのHBSSで満たして実施した。37℃でインキュベートしながら、0、30、60、90、120、150、180分のapical側とbasal側のHanks'平衡塩溶液を採取し試料した。なお、apical側に添加するHBSSには、検討対象医薬品以外に、終濃度1mg/mLのフルオレセインイソチオシアナートデキストラン4000(FITC-D4000)を含んでおり、採取した試料は、医薬品の定量的他、FITC-D4000の移行量も確認した。

### (3) 医薬品濃度定量法

簡易型乳汁移行性試験で得られた血液ないし乳汁試料は、2倍量の無水エタノールを添加、混和したあと、12000g 15分間遠心分離した上清を試料とした。また、単層膜透過性試験で採取したHBSS溶液は、そのまま試料とした。試料を、逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分析し、主薬成分のピークを測定した。各医薬品は検量線を作成し

定量した。なお HPLC の分析条件は、各医薬品によって異なるためここでは割愛するが、アミノ酸である L-Theanine を分析した際は、PTC アミノ酸分析法で定量した。なお PTC アミノ酸分析法とは、アミノ酸をイソチオシアン酸フェニル (PITC) という標識試薬でプレラベル化して逆相カラムで分析するアミノ酸分析法の一つである。

#### (4) 投与量の設定と乳汁移行性と透過性の評価

マウスを用いた簡易型乳汁移行性試験で投与する医薬品の投与量は、我々が本方法を構築した際の考えに基づき、ヒトでの投与量のおよそ 10 倍量を投与量とした。その実験で得られた最高血中濃度を、ヒト乳腺上皮細胞単層膜の透過性試験の際、乳汁側 (今回は apical 側) に添加する HBSS 溶液に含まれる対象医薬品の終濃度と設定した。

簡易型乳汁移行性試験や透過性試験で得られたそれぞれの試料中医薬品濃度は、0 ~ 180 分までの濃度の和を  $AUC_{0-180}$  とし、乳汁側を血中側で除した M/P 比として算出した。

### 4. 研究成果

#### (1) ヒト乳腺上皮細胞単層膜の透過性試験法の構築と導入

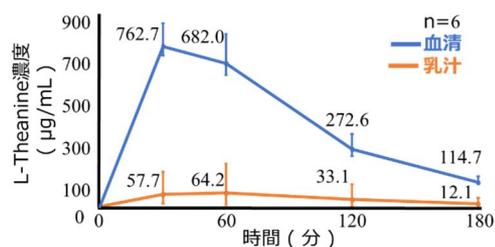
今回、ヒト乳腺上皮細胞単層膜を構築するために購入した HMEC 細胞株は不活化されており、培養期間も限られた細胞株であった。加えて性質は想定していたよりもデリケートであるため、トリプシン耐性株を得るのには難渋した。TEER はそのばらつきは大きく、木村らによって報告されているほど上昇しなかったが  $30 \sim 70 \text{ } \Omega \cdot \text{cm}^2$  の上昇を確認し、180 分間の FITC-D4000 の透過率は 2% 未満であったことを確認した。そうして約 1 年半をかけて、ヒト乳腺上皮細胞単層膜を作成し、透過性試験に使用した。

我々の実施する単層膜透過試験法で使用する医薬品の濃度はマウスを用いた簡易型乳汁移行性試験で得られた最高血中濃度を用いることを想定していたため、当初、検討予定であった抗がん剤 5-フルオロウラシル (5-FU) の評価・検討は、細胞障害性を鑑み、細胞への影響が少ないと考えられるアミノ酸、L-テアニンの評価・検討を行い、我々が作成したヒト乳腺上皮細胞単層膜を検証するなど、他の医薬品で試験経験を積んでからを実施することとした。

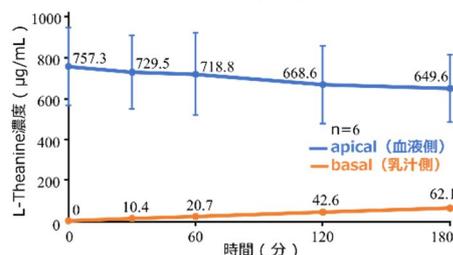
#### (2) 緑茶アミノ酸成分 L-テアニンの乳汁移行性について

約 70 年前に日本人によって発見された緑茶特有の L-テアニンは、近年、睡眠改善を目的にしたアミノ酸サプリメントとして販売されている。授乳婦の産後うつなどの睡眠障害に対して使用されることが想定されながらも、乳汁移行性に関する報告は無い。そこで我々は、ヒト乳腺上皮細胞単層膜を用いた透過試験を実施する初めての対象医薬品として適切であると判断し、マウスを用いた簡易型乳汁移行性試験ならびにヒト乳腺上皮細胞単層膜の透過性試験を実施した。

マウスを用いた簡易型乳汁移行性試験  
1000 mg / kg の投与量にて投与した結果、血中濃度は投与後 30 分に、平均  $762.7 \text{ } \mu\text{g/mL}$  の最高濃度を示し、乳汁中濃度は投与後 60 分に平均  $64.2 \text{ } \mu\text{g/mL}$  の最高濃度を示した。  
M/P 比 ( $AUC_{0-180}$ ) は、0.09 であった。



ヒト乳腺上皮細胞単層膜の透過性試験  
apical 側に終濃度  $750 \text{ } \mu\text{g/mL}$  の L-テアニンを添加し、180 分間の透過量を定量した。  
その結果、apical 側の L-テアニンは 180 分後も 90% 弱残存していた。  
M/P 比 ( $AUC_{0-180}$ ) は、0.05 であった。



本検討により、動物実験とヒト乳腺上皮細胞を用いた評価では似た傾向が示され、乳汁の移行性が低いことが示唆された。これまで L-テアニンは中性アミノ酸トランスポーターで輸送されることが報告されており、LAT1 などの中性アミノ酸トランスポーターはヒト乳腺上皮細胞でも発現されていることから、今回の結果は、乳汁への移行には何等かのアミノ酸選択性の存在が示唆された。

#### (3) 直接経口抗凝固薬エドキサバンの乳汁移行性について

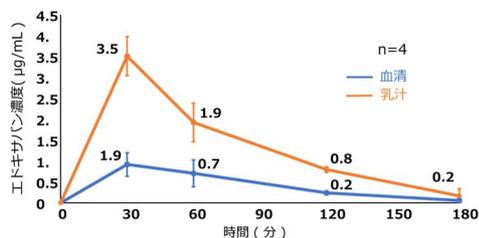
我が国で開発されたエドキサバンは、ワルファリンに代わる比較的安全性も高いとされる直接経口抗凝固薬 (DOAC) であり、現在では幅広い適応症で使用されている。エドキサバンの乳汁移行性に関しては、ヒトにおいて意図せず使用した一例あるのみである。この他、

妊娠中に合併する疾患の一つに抗リン脂質抗体症候群があるが、ワルファリンが第一選択薬であるものの、母乳移行性の問題からリバロキサバンが用いられた報告がある。このように DOAC が授乳婦に使用される例は存在するにも関わらず、検討は進んでいない。そこで我々は DOAC を対象とし、その端緒としてエドキサバンを我々の評価系で評価した。

マウスを用いた簡易型乳汁移行性試験

50 mg / kg の投与量にて投与した結果、血中濃度は投与後 30 分に、平均 1.9  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の最高濃度を示す一方、乳汁中濃度は投与後 30 分に平均 3.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の最高濃度を示した。

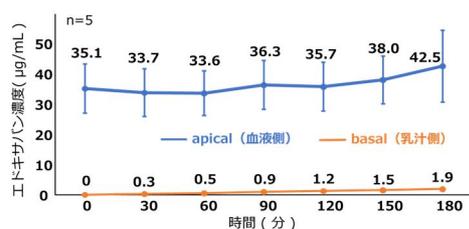
M/P 比 ( $\text{AUC}_{0-180}$ ) は、3.4 であった。



ヒト乳腺上皮細胞単層膜の透過性試験  
apical 側に終濃度 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のエドキサバンを添加し、180 分間の透過量を定量した。

その結果、apical 側のエドキサバンは 180 分後も 95% 以上残存していた。

M/P 比 ( $\text{AUC}_{0-180}$ ) は、0.03 であった。



本検討により、動物実験とヒト乳腺上皮細胞の結果では全く異なる傾向が示され、エドキサバンの乳汁移行性にはマウスに発現し、ヒトでは発現していないトランスポーターの関与が示唆された。本研究の研究協力者である河田が 2017 年に報告したヒトにおいて意図せず使用された報告<sup>3)</sup>では、エドキサバン 60mg 服用後 6 時間後の母体血中濃度は 51.3 ng/mL であり、服用後 7 時間の乳汁中濃度は 1 ng/mL、M/P 比は 0.02 未満とされており、今回のヒト乳腺上皮細胞の透過試験の結果と近い傾向であった。エドキサバンはマウス乳汁にトランスポーターなどの能動輸送の可能性があるとともにヒトでは移行しにくい可能性が示唆された。

#### (4) その他の検討医薬品について

上記、L-テアニンとエドキサバンの検討では、未だ検討すべき項目はあるものの、ヒトでの乳汁移行性は低い可能性が示唆された。このことは授乳婦のサプリメントの使用や DOAC の使用に対する判断の一助となり社会的意義は大きい。

また現在、上記 2 つ以外に、禁煙補助剤であるバレニクリン、DOAC であるリバロキサバン、抗うつ剤であるミルタザピンを検討している。これら 3 つの医薬品は試験個数が十分でなく、その結果の詳細は本報告では割愛するが、いずれも社会的意義の高い医薬品を優先的に選んでいる。特に、令和 4 年度の報告にも示したように、当初予定していた対象医薬品をミルタザピン、トピラマート、エドキサバン、アルプラゾラム、ガバペンチン、リバロキサバンの 6 品目と (5-FU) としていたが、5-FU の代わりに緑茶アミノ酸の L-テアニンを候補に加え、トピラマート、ガバペンチンなどの抗てんかん薬は妊婦・授乳婦や新生児など、ヒトでの使用に関する報告が増えつつあることを再確認し、検討する順番を遅らせるなど優先性を見直した。

本研究は、今後も、妊婦・授乳婦や新生児などのヒトでの使用に関する報告を確認して優先性を見直しながら、検討すべき医薬品の乳汁移行性を評価し続けなくてはならない

#### < 引用文献 >

- Anderson O.P., Drugs in Lactation, Pharm Res., 35, 2018, 45
- 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, 424-429
- 小森 浩二ら、薬物の乳汁移行性を検討するための HPLC を用いた一手法 ~ 泌乳マウスを用いた一般用医薬品(ロキソニン-S 錠、パファリン A 錠)の検討、薬学雑誌、133 巻、2013、905-911
- 河田 興ら、エドキサバンのヒト乳汁移行の検討 妊娠・産褥期に処方する経口抗凝固薬 (NOAC) における問題点、日本小児臨床薬理学会雑誌、30 巻、2018、12-14

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamaura Shinnosuke, Sadamori Koki, Konishi Reiko, Majima Takashi, Mukai Akira, Uno Kyosuke, Kinjo Toshihiko, Komori Koji, Kuramoto Nobuyuki, Kawada Kou	4. 巻 56
2. 論文標題 Pharmacokinetics of L-theanine and the effect on amino acid composition in mice administered with L-theanine	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Amino Acids	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00726-024-03389-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉野 愛、山浦慎之介、小西麗子、向井 啓、宇野恭介、金城俊彦、倉本展行、小森浩二、河田 興
2. 発表標題 緑茶成分L-Theanineの乳汁移行性に関する非臨床的検討
3. 学会等名 第49回 日本小児臨床薬理学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉野 愛、山浦慎之介、小西麗子、向井 啓、宇野恭介、金城俊彦、倉本展行、小森浩二、河田 興
2. 発表標題 授乳期におけるリラックスサプリメントであるL-Theanineの乳汁移行性に関する in vitro試験
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 野村 舞衣、井上 明珠、山浦 慎之介、小西 麗子、向井 啓、河田 興、小森 浩二
2. 発表標題 エドキサバンの乳汁移行性に関する非臨床的検討
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	河田 興  (Kawada Kou)	摂南大学・薬学部・教授	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------