

氏名	くろさわ けん 黒沢 健
学 位 の 種 類	博士（薬科学）
学 位 記 番 号	博士甲第 号
学位授与の日付	2022 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 目	定常状態ヒト胎児曝露量予測のための Ex vivo ヒト胎盤灌流試験に基づく経胎盤薬物動態モデルの構築
論 文 審 査 委 員	（主査）教授 登美 斉俊（博士（薬学）） （副査）教授 大谷 寿一（博士（薬学）） 教授 堀 里子（博士（薬学））

論文内容の要旨

【背景】

妊婦に薬物治療を行う際、母体及び胎児に対するリスクとベネフィットを考慮して慎重に投与されなければならない。しかし妊娠中に服用する薬物の、特に胎児に対する安全性の情報は限られ、そのリスク評価では、胎盤を透過し胎児に到達する薬物量が重要な情報となる。出産時における臍帯血の採取は、母体血-臍帯血中濃度比(*in vivo* F:M 比)の測定が、胎児薬物曝露量の指標として用いられている。ただし、*in vivo* F:M 比が得られるのは妊婦での安全性が既に確立した薬物に限られ、それ以外の薬物の曝露量は推定に基づき評価することになる。

この母体-臍帯血中濃度測定に加え、妊娠期間中の母体-胎児間の薬物移行を検討する際の有用な手法として、*ex vivo* ヒト胎盤灌流試験がある。この試験は、出産時に得られたヒト胎盤から胎盤小葉を切り取り、容器内で母体側では子宮胎盤動脈に、胎児側では臍帯動脈及び静脈にカテーテルを挿入し、薬物の灌流を行うことで母体-胎児間の薬物移行を検討する非侵襲的な方法であり、閉鎖(*close*)系及び開放(*open*)系の 2 種類の方法が報告されている。*Close* 系は、母体側、胎児側のいずれにおいても灌流液を再循環し、*open* 系では、灌流液の再循環は行われず、常に一定の薬物濃度で母体又は胎児側から薬液が供給される。

Hutson ら(2011)は既報の報告値を用いて、*in vivo* F:M 比と、*ex vivo* ヒト胎盤灌流試験の結果の比較を薬剤横断的に行った。灌流試験から得られた結果を、酸解離定数及び蛋白結合率で薬物濃度を補正し、*in vivo* 予測精度の向上を報告している。一方、*metformin* や *digoxin* を含む一部の薬物では、既報の *ex vivo* ヒト胎盤灌流試験から得られた母体-胎児濃度比(*ex vivo* F:M 比)と、*in vivo* F:M 比は一致しておらず、その原因についての詳細は明らかとなっていない。

In vivo における薬物相互作用(DDI)を予測するため、数多くの生理学的薬物速度論(PBPK)モデルが報告されている。PBPK モデルは、生体を主要な組織コンパートメントに分け、それらが血流によって連結した数理モデルである。代謝酵素活性やトランスポーター輸送活性など、

in vitro 試験から得られた素過程のデータをモデルに組み込むことが可能であり、血中濃度のみならず組織中薬物濃度を推定でき、薬物の吸収、分布、代謝及び排泄の定量的予測が可能とする。PBPK の手法は、*ex vivo* ヒト胎盤灌流試験に対しても同様に適応可能である。ヒト胎盤の実際の容量をモデルに反映し、経胎盤輸送における素過程の反応を組み込むことで、*in vitro* 試験のトランスポーター活性や受動拡散を組み込むことが可能となることや、close 系と open 系の違いなど、各灌流試験間の差異を理論式で記述することで、薬剤のヒト胎児移行性の予測が可能となる。これまでに *ex vivo* ヒト胎盤灌流試験から得られた薬物濃度データを基に構築されたヒト経胎盤 PK モデルの例は複数報告されているが、これらは素過程を容易に組み込めるモデルではなく、また生理学的な胎盤容量を用いたモデルではないことから、適用範囲が用いた灌流試験系及び各薬物に限定されている。

【目的】

本研究では、既報の *ex vivo* ヒト胎盤灌流試験から得られた情報を基に、生理学的に共通なヒト経胎盤 PK モデルの構築を行うこととした。Metformin 及び digoxin についてモデル構築を行い、これらで報告されている *ex vivo* 及び *in vivo* の差違の原因を明らかにすると共に、ヒト胎児曝露量を予測した。さらに、他の薬剤にも同様のモデルを適用し、この予測法が多くの化合物に共通して適用できることを示すことで、新たな胎児薬物曝露量予測法を確立し、妊婦の薬物治療に資することを目的とした。

【方法】

1. *Ex vivo* ヒト胎盤灌流試験データに基づく metformin のヒト経胎盤 PK モデルの構築

過去に close 系で実施された *ex vivo* ヒト胎盤灌流試験で報告されている metformin 濃度-時間データを用いて、model fitting を行い、metformin のヒト経胎盤 PK モデルを構築した。Metformin は灌流液中でほぼイオン化されるため、ヒト胎盤中の微絨毛膜(MVM)及び基底細胞膜(BM)を通過する受動拡散($PS_{MVM,diff}$ 及び $PS_{BM,diff}$)はほとんど無視できる。そのため、metformin のヒト経胎盤 PK モデルは、双方向トランスポーターの OCT3 を介した BM での取り込み及び排出クリアランス($PS_{BM,act,inf}$ 及び $PS_{BM,act,eff}$)と仮想トランスポーターを介した MVM でのクリアランス($PS_{MVM,act,inf}$ 及び $PS_{MVM,act,eff}$)を用いて構築した。既報の他の open 及び close 系灌流試験を再現することでモデルの妥当性を確認した。構築したモデルで F:M 比を予測し、既報の *in vivo* F:M 比と比較した。

2. *Ex vivo* ヒト胎盤灌流試験データに基づく digoxin のヒト経胎盤 PK モデルの構築

既報の *ex vivo* ヒト胎盤灌流試験で報告されている digoxin 濃度-時間データを基に、digoxin のヒト経胎盤 PK モデルを構築した。Digoxin では、metformin のモデルを基に、新たに非灌流組織コンパートメントを追加し、より灌流実験に則したモデル改良を行った。ヒト胎盤 MVM では排出トランスポーターの MDR1 が知られており、 $PS_{MVM,act,eff}$ として組み込んだ。BM では MDR1 及び/又は MDR3 が胎児方向への輸送に関与する可能性が示されており、排出トランスポーターを介

したクリアランス($PS_{BM,act,eff}$)を仮定した。Digoxin の受動拡散は限定的でまた MDR1 で排出されるが、灌流試験では digoxin のヒト胎盤組織中濃度は高値であった。そのため、MVM 及び BM における取り込みについても受動拡散のみならずトランスポーターを介したクリアランス($PS_{MVM,act,inf}$ 及び $PS_{BM,act,inf}$)を仮定した。モデルの妥当性は、既報の他の灌流試験で得られたデータを再現して確認した。構築したモデルを用いて、既報の *ex vivo* ヒト胎盤灌流試験で行われている MDR1 阻害剤(quinidine 及び verapamil)と digoxin 併用の DDI 予測を行った。最後に、構築したモデルで digoxin の F:M 比を予測し、既報の *in vivo* F:M 比と比較した。

3. ヒト経胎盤 PK モデルの他剤への適用

改良したヒト経胎盤 PK モデルと同様のモデルを用いて、種々の薬剤(carbamazepine、oxcarbazepine、phenobarbital、phenytoin、theophylline 及び valproic acid)で報告されている close 系の *ex vivo* ヒト胎盤灌流試験の結果に基づき、それら薬剤においてもヒト経胎盤 PK モデルを構築した。Metformin についても同様のモデル構造を設定して、改良を行った。それら薬剤で構築したモデルを用いて、定常状態における F:M 比を予測し、*in vivo* F:M 比及び Hutson らの予測手法との比較を行った。

【結果】

1. *Ex vivo* ヒト胎盤灌流試験データに基づく metformin のヒト経胎盤 PK モデルの構築

Trimethoprim(OCT3 阻害剤)を灌流液中に含む metformin の灌流試験(close 系)で報告されている metformin 濃度-時間データに対する model fitting の結果、報告値を良好に反映した。Open 系及び close 系で行われた他の灌流試験について本モデルでシミュレーションしたところ、いずれの試験も再現可能であり、モデルの妥当性が示された。

In vivo ヒト胎児曝露量を予測するため、構築した PK モデルを用いて長時間の灌流試験における metformin 濃度推移をシミュレーションした(灌流液中の OCT3 阻害剤は除いた)。その結果、close 系では灌流後 1,000 分-1,500 分程度で定常状態に、open 系では約 30 分で達した。定常状態での F:M 比の予測値はいずれの系においても 0.88 と算出され、この値は *in vivo* F:M 比[変量効果の平均値(95%信頼区間):1.10(0.69-1.51)]と一致した。

2. *Ex vivo* ヒト胎盤灌流試験データに基づく digoxin のヒト経胎盤 PK モデルの構築

Digoxin のヒト胎盤灌流試験で報告されている digoxin 濃度-時間データに対する model fitting の結果、報告値を適切に反映した。他の灌流試験も再現可能であり、モデルの妥当性が示された。このモデルでは、metformin のモデルを基に非灌流組織コンパートメントを新たに組み込んでおり、その必要性が明らかとなった。構築したモデルを用いて、灌流試験で行われた MDR1 阻害剤(quinidine 及び verapamil)との併用における digoxin 濃度をシミュレーションした結果、MVM の MDR1 及び BM の排出トランスポーターの両方が阻害されたとき、digoxin 濃度の報告値を再現した。

Digoxin の *in vivo* F:M 比を予測するため、構築したモデルを用いて長時間の灌流試験をシミュレーションした。その結果、約 1,500 分で定常状態に達し、F:M 比は 0.66 であり、*in vivo* F:M 比[変量効果の平均値(95%信頼区間): 0.77(0.64-0.91)]と一致した。

3. ヒト経胎盤 PK モデルの他剤への適用

7 種の薬物(carbamazepine、metformin、oxcarbazepine、phenobarbital、phenytoin、theophylline 及び valproic acid)について、*ex vivo* ヒト胎盤灌流試験から得られた薬物濃度-時間データを基に、ヒト経胎盤 PK モデルを構築した。いずれも灌流試験の報告値を良く反映した。

Digoxin を含む 4 薬物(phenobarbital、phenytoin 及び valproic acid)の F:M 比の予測値は *in vivo* F:M 比と良好な相関を示した($R^2=0.93$ 、 $p<0.05$)。それ以外の薬物においても *in vivo* F:M 比の報告値の 0.80-1.25 倍の範囲内であり、良好な予測精度が得られた。

【考察】

Metformin のヒト経胎盤 PK モデルは、close 系及び open 系のいずれの *ex vivo* ヒト胎盤灌流試験も再現し、また *in vivo* ヒト胎児曝露予測が可能であった。close 系と open 系の間で認められていた F:M 比の違いは定常状態に到達する時間(t_{ss})の違いによることが明らかとなった。Metformin は Biopharmaceutics Classification System(BCS) class 3 に分類される低膜透過性の薬剤であり、close 系試験の t_{ss} は 1,000-1,500 分と予測された。実際の灌流試験では 180 分又は 240 分しか灌流は行われず、観察された F:M 比(0.17 又は 0.55)は *in vivo* F:M 比(1.10)及びモデルで予測した F:M 比(0.88)よりも低値であった。一方、open 系試験のシミュレーションでは、metformin の t_{ss} は 30 分であり、F:M 比の予測値も *in vivo* F:M 比と同程度であった。Open 系では、薬物がリザーバーなしで連続的に灌流されることから t_{ss} はリザーバーを有する close 系に比して短いと考えられた。

Metformin のモデルでは BM での取り込みと排出の双方向に OCT3 を仮定した。モデル構築に用いた *ex vivo* ヒト胎盤灌流試験では、灌流液中に抗生剤として trimethoprim を用いている。Trimethoprim は OCT3 阻害剤であることから、OCT3 を介した metformin の双方向性輸送の阻害をモデルに組み込む必要があった。本研究で OCT3 阻害剤の trimethoprim 存在下で推定したパラメータは、 $PS_{BM,act,inf}$ 及び $PS_{BM,act,eff}$ を除き、阻害剤非存在下を仮定して得られたパラメータ推定値と同様であった。これらのパラメータ推定値を用いたシミュレーションの結果、OCT3 阻害の有無にかかわらず、close 系及び open 系で行われた他の灌流試験の再現が可能であった。既報の *ex vivo* ヒト胎盤灌流試験で OCT 阻害剤である cimetidine が、metformin のヒト胎盤膜透過性に影響を及ぼさないことが報告されているが、新規モデル解析においても、OCT3 阻害剤の trimethoprim が metformin のヒト胎児移行性に影響しないことが示された。

Digoxin のヒト経胎盤 PK モデルは *in vivo* ヒト胎児曝露予測が可能であった。Digoxin の *ex vivo* と *in vivo* F:M 比が異なる理由も、*ex vivo* ヒト胎盤灌流試験での t_{ss} が実際に行われている灌流時間よりも長いことによるものと考えられた。Digoxin も BCS class 3 の低膜透過性の薬物であることから、 t_{ss} が長くなるものと考えられた(1,500 分)。モデル中の MVM と BM にトランスポーターに

よる取り込み及び排出クリアランスをそれぞれ設定することで、digoxin のヒト胎盤における膜透過律速過程を説明することができた。

これまでに *ex vivo* ヒト胎盤灌流試験における DDI の検討で、quinidine 又は verapamil による digoxin のヒト胎盤膜透過の阻害は認められないことが報告されている。我々が構築したモデルによるシミュレーションでは、MVM の MDR1 及び BM 側の排出トランスポーターが quinidine 及び verapamil により阻害されることでその結果が説明可能であった。しかし、それら阻害剤非併用下でのシミュレーションも、阻害剤併用下において報告された digoxin 濃度とほぼ同様の結果を示したことから、MVM と BM での排出トランスポーターが quinidine 及び verapamil のいずれに対しても非感受性である可能性は否定できない。本研究でヒト胎盤 BM 側での MDR1 及び又は MDR3 といった排出トランスポーターの関与が示唆される結果が得られたことから、BM における排出トランスポーターの機能的役割を明らかにするために、更なる検討が必要である。

Metformin を含む 7 種の薬物に digoxin で構築したモデルと同様の構造を有するヒト経胎盤 PK モデルを応用したところ、F:M 比の予測値は *in vivo* F:M 比と一致した。

Metformin 及び digoxin 以外、いずれの薬剤も BCS class 1 又は 2 に分類され、高膜透過性で、 t_{ss} が短く、Hutson らの予測においても比較的良好に予測されていた。

以上より、*ex vivo* ヒト胎盤灌流試験データに基づく、ヒト経胎盤 PK モデルの構築により、薬剤の膜透過性に関わらず様々な薬物における定常状態の *in vivo* ヒト胎児曝露予測が可能であった。また、モデル中にトランスポーターによる取り込み及び排出クリアランスを組み込むことで DDI の予測にも有用であると考えられた。本モデルは灌流試験の差違によらず、いずれの薬剤にも共通して用いることが可能であったことから、生理学的なヒト経胎盤 PK モデルが構築できたものと考えられる。

【結論】

本研究ではこれまでに *ex vivo* と *in vivo* F:M 比が一致しない薬剤として報告されていた metformin 及び digoxin について既報の *ex vivo* ヒト胎盤灌流試験から得られた結果を基に、ヒト胎盤膜透過過程に取り込み及び排出トランスポーターを組み込んだヒト経胎盤 PK モデルを構築した。いずれも低膜透過性の薬物であり、*ex vivo* ヒト胎盤灌流試験では、定常状態に到達するのに長時間を要し、*ex vivo* と *in vivo* に差違が生じていた。Metformin は、trimethoprim により OCT3 が阻害されるものの、双方向輸送が阻害されることで、ヒト胎盤膜透過性に影響がなかったものと考えられた。Digoxin は、quinidine 及び verapamil により、MVM の MDR1 と BM の排出トランスポーターが阻害されることで、ヒト胎盤膜透過性にほとんど影響がなかった可能性が明らかとなった。さらに、本研究で構築したヒト経胎盤 PK モデルは幅広い物性を有した薬物に対して共通して用いることが可能であり、生理学的なヒト胎盤モデルと考えられる。

以上より、本研究における *ex vivo* ヒト胎盤灌流試験データを基にしたヒト経胎盤 PK モデリング&シミュレーションの手法により、ヒト胎児曝露の予測ができていなかった薬剤においても予測が可能となり、またヒト胎盤における DDI 予測にも有用であると考えられた。今後、本手法を

各種薬物のヒト胎児曝露量予測法の一つとして用いることで、妊婦への薬物治療に役立つことが期待される。

論文審査結果の要旨

Ex vivo ヒト胎盤灌流試験は母体-胎児間の薬物移行を検討する際の最も有用な代替手法であり、ヒト胎児薬物曝露量(母体血-臍帯血中濃度比として)の推定に用いられてきた。これまでの報告において、薬剤横断的に *ex vivo* ヒト胎盤灌流試験から得られた結果を酸解離定数や血漿中タンパク結合率で補正することにより、*in vivo* に対する予測性が向上することが報告されていたものの、*metformin* や *digoxin* など一部薬物において適切に予測ができていないことが課題であった。本研究は、*ex vivo* ヒト胎盤灌流試験のデータに基づき、生理学的に共通なヒト経胎盤薬物動態(PK)モデルを構築することで課題の解決に取り組み、構築したモデルを用いたシミュレーションを行うことで、検討したいずれの薬物においても *in vivo* の母体血-臍帯血中濃度比の精緻な予測を可能とした。構築したモデルを用いたシミュレーションの結果、実際の *ex vivo* ヒト胎盤灌流試験では、低膜透過性薬物である *metformin* や *digoxin* の灌流液中濃度は定常状態に至っていないため、母体血-臍帯血中濃度比が過小評価されていたことが明らかとなった。さらに、本研究で構築したヒト経胎盤PKモデルではトランスポーターを組み込み、ヒト胎盤における薬物相互作用の検討を行った。検討の結果、*metformin* ではヒト胎盤中の基底細胞膜の OCT3、*digoxin* では微絨毛膜の MDR1 及び基底細胞膜の排出トランスポーターを介した薬物相互作用を適切に評価することができた。本研究で提案された *ex vivo* ヒト胎盤灌流試験のデータを基にしたヒト経胎盤PKモデリング&シミュレーションの手法は、ヒト胎児曝露の予測及びヒト胎盤における薬物相互作用予測に対する新たな方法であり、薬物の胎児移行性を定量的に予測するための重要な知見となる。

本研究は学術誌へ掲載され、さらに申請者の博士論文の内容および博士論文審査会における発表は、基準を満たすものであった。以上から本論文は博士(薬科学)の学位論文に値すると認める。

論文目録

K Kurosawa, K Chiba, S Noguchi, T Nishimura, M Tomi: Development of a Pharmacokinetic Model of Transplacental Transfer of Metformin to Predict In Vivo Fetal Exposure. *Drug Metab Dispos*, 48:1293-1302 (2020).

K Kurosawa, S Noguchi, T Nishimura, M Tomi, K Chiba: Transplacental pharmacokinetic model of digoxin based on ex vivo human placental perfusion study. *Drug Metab Dispos*, Accepted on Dec 2021: In press. doi: 10.1124/dmd.121.000648.