

学位論文 (博士)

妊娠中における midazolam の使用の是非
-胎児における cytochrome P450 3A の活性と midazolam
の脳内分布から検証-

2018年3月

星薬科大学大学院 薬学研究科

薬学専攻

薬動学

北岡 諭

【目次】

掲載論文目録	1
略号リスト	2
序論	3
第一章	5
第二章	27
第三章	37
総括	54
謝辞	59
引用文献	60

【掲載論文目録】

本論文は、学術雑誌に掲載された次の報文を基礎とするものである。

Satoshi Kitaoka., Jo Hatogai., Ryuki Iimura., Yuka Yamamoto., Konomi Oba., Mami Nakai., Yoshiki Kusunoki., Wataru Ochiai., Kiyoshi Sugiyama., Relationship between Low Midazolam Metabolism by Cytochrome P450 3A in Mice and the High Incidence of Birth Defects, *J. Toxicol. Sci.*, (in press)

Satoshi Kitaoka., Jo Hatogai., Wataru Ochiai., Kiyoshi Sugiyama., Zonation of the drug-metabolizing enzyme cytochrome P450 3A in infants begins in pre-weaning period, *J. Toxicol. Sci.*, (in press)

Satoshi Kitaoka., Jo Hatogai., Nanako Niikura., Miho Hirata., Nanako Fukasawa., Satoru Miyazaki., Naoto Yamaguchi., Shohei Harada., Masanaho Sasatsu., Kiyoshi Sugiyama., Wataru Ochiai., Abundant migration of midazolam and 1'-hydroxymidazolam into the fetal brain following midazolam administration to pregnant mice in the second trimester, *Fundam. Toxicol. Sci.*, (in press)

【略号一覧】

本論文では、以下の略号を用いた。

AUC	area under the curve
CCD	charge coupled device
CYP	cytochrome P450
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ESI	electrospray ionization
EtBr	ethidium bromide
FBS	fetal bovine serum
HIF	hypoxia-inducible factor
HPLC	high performance liquid chromatography
KCl	potassium chloride
KH ₂ PO ₄	potassium dihydrogen phosphate
K ₂ HPO ₄	potassium hydrogen phosphate
LC-MS	liquid chromatography-mass spectrometry
MgCl ₂	magnesium chloride
NaOH	sodium hydroxide
NP-40	Nonidet P-40
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PVDF	polyvinylidene difluoride
SDC	sodium deoxycholate
SDS	sodium dodecyl sulfate
SIM	selected ion monitoring
SPE	solid phase extraction
SRY	sex determining region Y
TBS	Tris-Buffered Saline
Tris	2-amino-2-hydroxymethyl-1, 3-propanediol

【序 論】

妊娠中の医薬品の使用は、胎児への影響を考慮し、できる限り避けられている。しかしながら、慢性疾患を持つ女性や妊娠中にがんや痙攣発作の治療等、母体の生命を脅かす疾病と診断された場合、医薬品による治療が行われることがある。日本を含む世界各国では、やむを得ず妊婦に対して医薬品を使用する際には、独自のリスクカテゴリーをそれぞれに定めている。欧米では、妊婦に対するリスクカテゴリーは、医薬品の副作用よりも、医薬品を使用することで得られる主作用に主眼がおかれており、過去の臨床例や、患者の希望を考慮して、医師が医薬品を積極的に使用している。それに対して、日本における妊婦に対するリスクカテゴリーは、医薬品を使用することで得られる主作用よりも、動物実験で得られた医薬品を使用することによる副作用に主眼がおかれている。そのために、過去の報告によると、日本では調査した医薬品（全403種類）のうち、25.3%が妊婦に対して投与禁忌となっているのに対し、アメリカでは、それより少ない4.5%、オーストラリアでは、わずか2.5%であり、日本のリスクカテゴリーと欧米のリスクカテゴリーとで大きな差が生じている¹⁾。その結果として、日本においては、妊婦に対して投与禁忌となっている医薬品が欧米よりも多く、妊娠中に使用可能な医薬品の選択肢を狭めている。このような中、日本において、有用な薬理作用を有しているにも関わらず、妊婦に対して投与禁忌となっている医薬品を活かすには、妊娠中の薬物治療を積極的に行うための安全性に関するエビデンスが必要となる。

一般に、薬物の効果と副作用は、薬物が体内のどこに集積しているのかを明らかにすることで、おおよそ推定することが可能である。Benzodiazepine系の薬物midazolamは、痙攣発作の治療や手術時の麻酔の導入・維持を目的に、second trimester（妊娠3ヶ月）以降の妊婦に対して限定的ではあるものの依然使用されている²⁻⁴⁾。しかしながら、胎児に移行したmidazolamの薬物動態は、全く明らかになっておらず、現在のと

ころ胎児に対する安全性の予測は困難な状況にある。特に、midazolam は、脳に作用する薬物であることより、胎児の神経発生への影響が危惧されるため、妊婦がmidazolam を使用することに関する安全性を確立することが急務となっている。そこで本研究では、midazolam を妊娠中に使用した際の胎児における薬物動態を詳細に解析することにより、midazolam の胎児への影響を明らかにすることを試みた。

1. 胎児の肝臓における薬物代謝酵素 cytochrome P450 3A (CYP3A) の発現量の解析 (第一章)
2. 胎児期から乳児期のマウスの肝臓における薬物代謝酵素 CYP3A の zonation の形成時期の解析 (第二章)
3. 胎児における midazolam の薬物動態の検討 (第三章)

【第一章】

胎児期のマウスの肝臓における薬物代謝酵素 cytochrome P450 3A による midazolam の代謝活性が極めて低いことが、奇形の 発生率の高い要因となっているのか

1. 緒言

Midazolam 及び triazolam は benzodiazepine 系の薬物であり、睡眠薬や麻酔導入剤として多用されている。近年、これら benzodiazepine 系の薬物を妊娠中に使用すると、胎児の催奇形成のリスクが高くなることが報告された⁵⁾。これらの薬物は、ヒトの成体では、半減期が約 2 時間と短く、容易に体内から消失することが知られている⁶⁻⁸⁾。すなわち、ヒトの成体では主に肝臓の CYP3A4、マウスの成体では肝臓の CYP3A11 によって、1'-OH 体あるいは 4-OH 体に速やかに代謝される⁹⁻¹¹⁾。今のところ、benzodiazepine 系の薬物と催奇形成の因果関係は明確になっていない。我々は、胎児の肝臓において CYP3A の発現あるいは機能に何らかの障害があるため、benzodiazepine 系の薬物の代謝が正常に行われず、胎児中に高濃度で蓄積したことがその要因であると考えた。Benzodiazepine 系の薬物の服用と催奇形成との因果関係を解析することができれば、妊娠中における benzodiazepine 系の薬物の適正使用に役立つであろう。

我々は、本仮説を立証するにあたり、胎児期のマウスの肝臓に発現している CYP3A 分子種を同定した。さらに、我々は、胎児期に発現が見られた CYP3A 分子種の midazolam に対する代謝活性を調べた。マウスの CYP3A には、様々な特徴を持った分子種が存在する¹²⁻¹³⁾。本研究では CYP3A11、CYP3A13、CYP3A16、CYP3A25、CYP3A41 及び CYP3A44 を研究対象とした。CYP3A11 はヒトの CYP3A4 に相当し、成体マウスの肝臓に恒常的に発現

しており、薬物代謝の中心的な役割を担っている^{14, 15)}。CYP3A13 は小腸での発現が高く、消化管内での薬物代謝に重要な働きをしている^{16, 17)}。CYP3A16 は、ヒトの CYP3A7 に相当し、胎児期に多く発現し、胎児期の薬物代謝に関与していることが示唆されている^{15, 18)}。CYP3A25 は、成体マウスの肝臓に恒常的に発現し、薬物あるいは異物の代謝に関与している¹⁸⁻²⁰⁾。CYP3A41 と CYP3A44 はメスに特異的に発現することが明らかとなっている^{13, 14, 18)}。

本研究では、マウスの CYP3A 分子種の発現解析をタンパク質レベルで行うことを計画したため、まず、CYP3A11、CYP3A13、CYP3A16、CYP3A25、CYP3A41 及び CYP3A44 の強制発現系をそれぞれ構築した。次に、作成したそれぞれの CYP3A 分子種を指標とし、2 種類の抗体の特異性を利用し、マウスの胎児期から成体までの各ステージにおける肝臓の CYP3A 分子種のタンパク質発現量を western blotting により解析した。さらに、胎児期のマウスの肝臓に発現している CYP3A 分子種について、midazolam に対する代謝活性を、midazolam の 1'位の水酸化反応を指標とし、解析した²¹⁾。

2. 方法

2-1. 試薬

Midazolam、isoflurane、methanol、ultrapure water、phosphoric acid、acetonitrile、formic acid、dimethyl sulfoxide (DMSO)、ethidium bromide (EtBr)、2-amino-2-hydroxymethyl-1, 3-propanediol (Tris)、Nonidet P-40 (NP-40)、sodium dodecyl sulfate (SDS)、sodium deoxycholate (SDC)、sucrose、imidazole、ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)、sodium hydroxide (NaOH)、potassium chloride (KCl)、magnesium chloride (MgCl₂)、potassium dihydrogen phosphate (KH₂PO₄)、potassium hydrogen phosphate (K₂HPO₄)、isopropyl alcohol、glycerol、chloroform、Proteinase K Solution、bromophenol blue 及び acetic acid は、Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan) より購入した。 α -Hydroxymidazolam solution、 α -hydroxymidazolam-d4 solution、TRI reagent 及び Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM) は、Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO, USA) より購入した。Zero Blunt[®] TOPO[®] PCR Cloning Kit、PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit、Opti-MEM 及び fetal bovine serum (FBS) は、Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) より購入した。NADPH Regenerating System は、Corning Inc. (NY, USA) より購入した。Bacto tryptone 及び Bacto yeast extract は、Becton Dickinson and Company (Franklin Lakes, NJ, USA) より購入した。Phosphate buffered saline tablet (without magnesium, calcium)、TaKaRa Ex Taq[™]、10 × Ex Taq buffer、dNTP mixture 及び Trans IT-LT1 は、タカラバイオ株式会社 (Shiga, Japan) より購入した。High capacity cDNA synthesis kit は、Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) より購入した。各種 primer は、北海道システム・サイエンス株式会社 (Hokkaido, Japan) より購入した。6×Loading Buffer Orange、Agarose S 及び Tris-EDTA Buffer は、株式会社ニッポンジーン (Tokyo, Japan) より購入した。KOD Plus 及び KOD FX Neo は、東洋紡株式会社 (Osaka, Japan) より購入した。Phenol・chloroform・isoamyl alcohol (PCI) 及び Protease Inhibitor Cocktail はナカライテスク株式会社 (Kyoto, Japan) より

購入した。Rabbit anti-rat CYP3A2 antibody は日本農産工業株式会社（NOSAN）（Kanagawa, Japan）より購入した。Goat anti-mouse CYP3A antibody (L-14) は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) より購入した。Rabbit Anti-Goat IgG H&L (HRP) は、abcam (Tokyo, Japan) より購入した。Anti-Rabbit IgG, HRP-Linked Whole Ab Donkey 及び enhanced chemiluminescence system (ECL) plus Western blotting detection reagents は、GE Healthcare (Chalfont St. Giles, UK) から購入した。その他の試薬は、市販されている物の内、最もグレードの高いものを購入した。

2-2. 動物実験

妊娠 12.5 日目の雌性 ICR マウス及び 2, 4, 6, 8 週齢のマウスは日本エスエルシー株式会社（Shizuoka, Japan）より購入した。マウスは温度 $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 5\%$ の施設において飼育し、明暗条件は 8 : 00 点燈、20 : 00 消灯の条件下で飼育した。

本動物実験は、実験動物の適正な使用及び管理について定められた星薬科大学薬学部実験動物ガイドラインに準じて、同大学動物実験施設で行われた。

2-3. Total RNA の抽出

マウスの肝臓から TRI Reagent[®]を用いて、total RNA を精製した。得られた total RNA 溶液の一部を NanoDrop Lite (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) で 260 nm 及び 280 nm の吸光度を測定することで RNA 濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) の算出及び純度の確認を行った。

RNA 1 μg から High capacity cDNA synthesis kit を用いて cDNA を合成した。これを TE buffer で 20 倍希釈し、cDNA TE buffer 溶液とした。

2-4. RT-PCR

Table 1 に示すプライマーを作成し PCR を行い CYP3A11、CYP3A13、CYP3A16、CYP3A25、CYP3A41 及び CYP3A44 遺伝子の発現を検出した。PCR plates 96-well の各

well に TaKaRa Ex TaqTM 0.1 μ L、10 \times buffer 2.5 μ L、dNTP mixture 2.0 μ L、DMSO 1.0 μ L、cDNA 溶液 2.0 μ L、目的遺伝子の forward primer (20 μ M) 1.0 μ L、reverse primer (20 μ M) 1.0 μ L、ultrapure water 15.4 μ L をそれぞれ加えた。CFX ConnectTM Real-Time PCR detection system (Bio-Rad Laboratories, California, USA) で、最初に 98 $^{\circ}$ C で 10 秒間変性させ、55 \sim 58 $^{\circ}$ C で 30 秒間アニーリングし、72 $^{\circ}$ C で 1 分間伸長反応を行った。これを 1 サイクルとして、30 \sim 35 サイクル行い、目的遺伝子を増幅した。

PCR 産物に 6 \times Loading Buffer Orange G 5.0 μ L を加え、良く混合した。EtBr 含有の 1.2% agarose gel と TAE buffer を用いて 10 μ L/lane で室温で 20 min、100 volt、遮光条件下で agarose 電気泳動を行った。電気泳動後の agarose gel を冷却 charge coupled device (CCD) カメラ (LAS-3000mini, 富士写真フイルム株式会社, Tokyo, Japan) を用いて撮影し、image J analysis software version 1.51q. (Wayne Rasband, NIH, U.S.A.) で解析した。

Table 1 マウスの mRNA に対するプライマー配列

Target		Primer (5' to 3')	Product Size (bp)	NCBI Reference Sequence
CYP3A11	Forward	GAG GAG GAT CAC ACA CAC AGT TG	324	NM_007818.3
	Reverse	GTC TGT GAC AGC AAG GAG AGG CG		
CYP3A13	Forward	CCT CTG CCT TTC TTG GGG ACG AT	192	NM_007819.4
	Reverse	CCG CCG GTT TGT GAA GGT AGA GT		
CYP3A16	Forward	GGA GAA TGC CAA GAA GGT TTT AAG	1,010	NM_007820.2
	Reverse	GTT AAG CAC CAT TTC ATC TTG		
CYP3A25	Forward	GTG GGA TTC ATG AAAAAG GCC	898	NM_019792.2
	Reverse	CTG GCC AGT ACT CAG GAT TTC GG		
CYP3A41	Forward	TTC TTC AGC TGA TGA TGA ACG	727	AB033414.1
	Reverse	CAG CAG AAC TCC TTG AGG GAA AC		
CYP3A44	Forward	GGA GGA AGC CAAAAA GTT TTT AAG	518	NM_177380.3
	Reverse	CTC TCT CAA GTC TAG TAA C		

2-5. プラスミドの構築

PCR plates 96-well の各 well に KOD-Plus 1.0 μ L、10 \times KOD-Plus buffer 5.0 μ L、dNTP mixture 4.0 μ L、MgSO₄ 4.0 μ L、DMSO 2.0 μ L、cDNA 溶液 1.0 μ L、目的遺伝子の forward primer (20 μ M) 2.0 μ L、reverse primer (20 μ M) 2.0 μ L、ultrapure water 29 μ L を入れ混和した。CFX Connect™ Real-Time PCR detection system で、最初に 94°C で 2 分間熱変性させた。その後、98°C で 10 秒間変性させ、55~58°C で 30 秒間アニーリングし 68°C で 1 分 30 秒間伸長反応を行った。これを 1 サイクルとして、30 サイクル行い、目的遺伝子を増幅した。目的遺伝子 CYP3A11、CYP3A13、CYP3A16、CYP3A25、CYP3A41 及び CYP3A44 について、Table 2 に示す forward primer 及び reverse primer を使用した。

作成した PCR 産物を精製後、Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit を用いて、PCR 産物をクローニングベクターに組み込んだ。配列を確認後、インサートを切り出し、pEF-BOS vector に組み込み、それぞれの発現 vector とした²²⁾。

Table 2 CYP3A 各分子種のクローニングに使用したプライマー配列

Target		Primer (5' to 3')	Product Size (bp)	NCBI Reference Sequence
CYP3A11	Forward	TCT CGA GCT ACC ATG GAC CTG GTT TCA GCT CTC TCA	1,533	NM_007818.3
	Reverse	CTC GAG TCA TGC TCC AGT TAT GAC TGC ATC		
CYP3A13	Forward	TCT CGA GCT ACC ATG GAC CTG ATC CCA AAC TTT TCC	1,530	NM_007819.4
	Reverse	CTC GAG TCA TTC ATC ACT TAC AGT CTC ATC		
CYP3A16	Forward	TCT CGA GCT ACC ATG AAC CTA TTT TCA GCG CTC TCA	1,533	NM_007820.2
	Reverse	CTC GAG TCA CGC TCC AGT TAT GAC TGC ATC		
CYP3A25	Forward	TCT CGA GCT ACC ATG GAG CTC ATC CCC AAC CTT TCT	1,530	NM_019792.2
	Reverse	CTC GAG TCA TGA TCC AGT TCT GGG TTT ATC		
CYP3A41	Forward	TCT CGA GCT ACC ATG AAC CTG TTT TCA GCT CTC TCA	1,533	AB033414.1
	Reverse	CTC GAG TCA TGC TCC AGT TAT AAC TAC ATC		
CYP3A44	Forward	TCT CGA GCT ACC ATG AAC CTA TTT TCA GCT CTC TCA	1,533	NM_177380.3
	Reverse	CTC GAG TCA TGC TCC AGT TAT AAC TGC ATC		

2-6. Transfection

12well プレーットの各 well にカバーガラスを沈め、その上にアフリカミドリザル腎臓由来細胞株 COS7 細胞を 1.0×10^4 cell で播種し、24 時間後に遺伝子導入した²³⁾。pEF-BOS (vector)、pEF-BOS-CYP3A11、pEF-BOS-CYP3A13、pEF-BOS-CYP3A16、pEF-BOS-CYP3A25、pEF-BOS-CYP3A41 及び pEF-BOS-CYP3A44 をそれぞれ 1.0 μ g に OPTI-MEM 溶液 150 μ L に TransIT-LT1 を 2 μ L を混ぜたものと混合し、室温で 15 分間、インキュベート後 COS7 細胞に滴下した。

2-7. CYP3A タンパク質の調製

COS7 細胞を 6 cm dish に 1.0×10^5 cell で播種し、24 時間後に transfection と同様の方法で各 vector を 2 μ g 遺伝子導入した。その 24 時間後、培地を吸引し、氷上で PBS (-) 1 mL で 3 回細胞を洗浄し、Protease Inhibitor Cocktail (final conc. : 1% (v/v)) を添加

した。RIPA buffer (Tris-HCl 25 mM、NP-40 0.1% (v/v)、NaCl 150 mM、SDS 0.1% (w/v)、SDC 0.1% (w/v)) を 300 μ L を添加し、1.5 mL マイクロチューブに細胞を回収した。その後、ボルテックスミキサーと超音波破碎機 (UH-50, SMT Co., Ltd., Tokyo, Japan) に 1 分間ずつかけ、その後、15,000 rpm、4°C で 10 分間遠心分離し、上清を回収した。この溶液を CYP3A 各分子種の標準タンパク質とした。

2-8. ミクロソーム画分の調製

摘出した肝臓に Protease Inhibitor Cocktail (final conc.: 1% (v/v)) を添加した dissecting buffer (sucrose 300 mM、imidazole 25 mM、EDTA 1 mM) 1 mL を添加し、氷上でホモジナイズした。ホモジネートを 9,000 \times g、4°C で 20 分間遠心分離した後、上清 800 μ L を回収し、105,000 \times g、4°C で 1 時間超遠心分離 (日立工機株式会社, Tokyo, Japan) した。上清除去後、沈殿物に RIPA buffer を適量 (300~1,000 μ L) 加え、超音波破碎機で分散させ、ミクロソーム画分サンプルとした。

タンパク質濃度は、BSA を標準品として、bicinchoninic acid (BCA) 法により測定した²⁴⁾。

2-9. SDS-PAGE 及び Western blotting

サンプル溶液に等量の sample buffer を加え、よく混合し、ボイル (95°C、5 min) した後、10% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動 (5.0 g/lane、110 min、20 mA/枚) を行った。タンパク質を polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレンに転写 (60 min、70 mA/枚) し、ブロッキング (5% スキムミルク、10 min) を行った。次に、PVDF メンブレンを 1 次抗体溶液 (anti-rat CYP3A2 Ab 1 : 10,000, anti-mouse CYP3A Ab 1 : 500) と反応 (室温、1 hr) させた。TBS-Tween でよく洗浄した後、2 次抗体溶液 (donkey anti-rabbit IgG-HRP Ab 1 : 10,000, donkey anti-goat IgG-HRP Ab 1 : 2,000) と反応 (室温、1 hr) させた。PVDF メンブレンを TBS-Tween で洗浄した後、ECL prime Western blot detection reagents と反応させた。PVDF メンブレンを冷却 CCD カメラで撮影した。

2-10. CYP3A 活性試験

CYP3A 各分子種の発現ベクターを COS7 細胞に transfection した。24 時間後、buffer (10 mM Tris-HCl、10 mM KCl、1.5 mM MgCl₂、1% Protease Inhibitor Cocktail、pH 7.4) を用いて細胞を回収し、ミクロソーム画分を調製した。CYP3A の活性は、midazolam の 1'位の水酸化反応を指標として評価した。1.5 mL マイクロチューブに buffer (0.1mM potassium phosphate buffer、3 mM MgCl₂、pH 7.4) と CYP3A 各分子種のミクロソーム画分 (50 µg) と midazolam (final conc.: 0.2 µM) を加え、37°C で 5 分間、プレインキュベーションした。反応液に NADPH regeneration system A を加え、37°C で 60 分間、インキュベーションした。反応は、等量の 4%リン酸水溶液で停止させた。固相抽出でサンプルの前処理を行い、LC-MS で midazolam の代謝物 (1'-OH-midazolam) を定性分析した。

2-11. LC-MS 分析

分析は、LC-20A high performance liquid chromatography (HPLC) システム (SHIMADZU, Kyoto, Japan) と LCMS-2010 EV single quadrupole mass spectrometer (SHIMADZU) を組み合わせて行った。分析カラムは、XBridge C18 (3.5 µm, 21 mm x 150 mm) (Waters) を使用した。カラム温度は、40°C で分析を行った。移動相 A は、0.1%のギ酸を加えた超純水を使用した。移動相 B は、0.1%のギ酸を加えたアセトニトリルを使用した。分析は、以下に示す binary gradient モードで行った。(Gradient 条件 (% of B) : 0.00 min 10%, 10.00 min 70%, 12.00 min 70%, 12.01 min 10%, 16.00 min 40%) 流速は、0.2 mL/min で一定とした。

Interface は、positive モードの electrospray ionization (ESI) を使用した。ネプライザーガスの流量は、1.5 L/min に設定した。CDL 温度とヒートブロック温度は、それぞれ、250°C、200°C に設定した。検出器の電圧は、1.5 V に設定した。測定は、m/z 342 for 1'-hydroxymidazolam による SIM method で行った。

HPLC システムの制御及び MS クロマトグラムの解析は、LCMSsolution Ver.3.40

(SHIMADZU) を用いて行った。

3. 結果

3-1. 各ステージにおけるマウス肝臓中 CYP3A 分子種の mRNA 発現の変化

CYP は、雌雄で発現量に差があることが明らかとなっている。そこで各ステージのマウス胎児の尾から genomic DNA を抽出し、sex-determining region Y (SRY) gene を指標に雌雄を判別した (data not shown)²⁵⁾。また、使用したプライマーの配列は、Table 3 に示した。その後、それぞれのマウスについて肝臓中 CYP3A (11、13、16、25、41、44) の mRNA 発現量を RT-PCR 法で解析した。

解析の結果、マウスの胎児の肝臓において、mRNA レベルでは、CYP3A13 が優位に発現していた。CYP3A13 以外の CYP3A 分子種では、CYP3A16 及び CYP3A41 が胎生 13.5 日のメスの胎児の肝臓でわずかに発現しているのみであった。出生後では、生後 1 日目から 14 日目にかけて、CYP3A13 以外の分子種の発現量が上昇し始めた (Fig. 1)。

Table 3 マウスの SRY 遺伝子に対するプライマー配列

Target	Primer (5' to 3')	Product Size (bp)	NCBI Reference Sequence	
SRY	Forward	CCA TGT CAA GCG CCC CAT GA	132	NC_000087.7
	Reverse	GTA AGG CTT TTC CAC CTG CA		

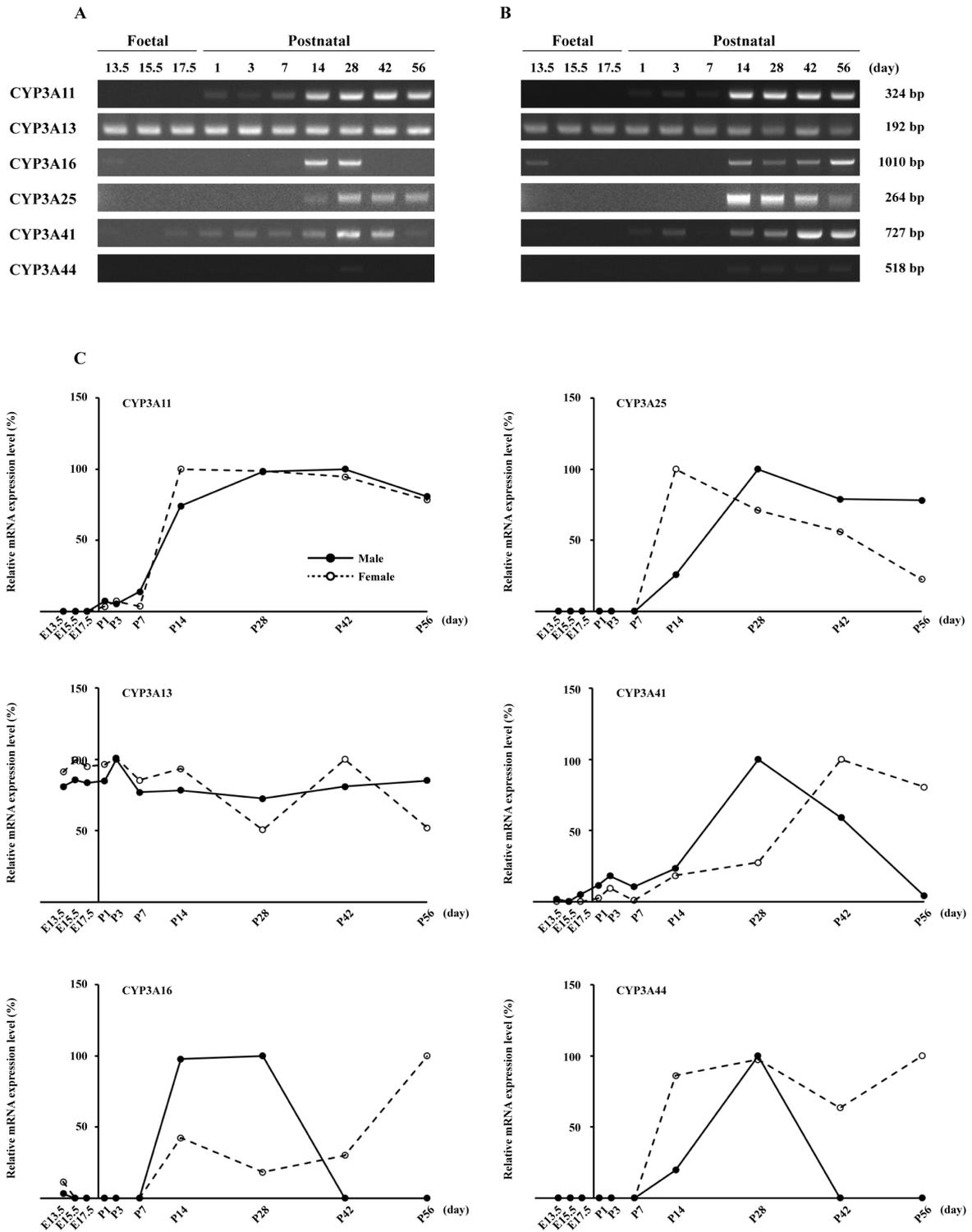


Fig. 1 マウスの発育過程の肝臓における CYP3A 分子種の mRNA 発現の変動

マウスの発育過程の肝臓より、total RNA を抽出し、RT-PCR 法により、CYP3A (11、13、16、25、41、44) の mRNA 発現量を測定した。A: 雄、B: 雌。さらに発現量の変化をグラフで示した (C)。

3-2. 肝ミクロソーム画分中の CYP3A 分子種の同定

市販されている 2 種類の抗体 (anti-rat CYP3A2 Ab 及び anti-mouse CYP3A Ab (L-14)) と、作成した CYP3A 分子種の標準タンパク質を用いて、マウスの肝臓より調製したミクロソーム画分中の CYP3A 分子種の同定を western blotting により行った。Fig.3 には、一例として 6 週齢 (生後 42 日) の雄のマウスの肝臓の western blotting を示す。Anti-rat CYP3A2 Ab に対しては、2 本の主要なバンドが検出された。これらのバンドを標準タンパク質の泳動度と比較したところ、高分子量側のバンドは、標準タンパク質の CYP3A11 の泳動度と一致した。また、低分子量側のバンドは、標準タンパク質の CYP3A13 あるいは CYP3A25 の泳動度と一致した。一方、CYP3A16、CYP3A41 及び CYP3A44 は、標準タンパク質の CYP3A11 と CYP3A13 (or CYP3A25) の中間の位置に検出されることがわかったものの、ミクロソーム画分中には、ほとんど存在しなかった (Fig. 2A)。

Anti-mouse CYP3A Ab (L-14) に対しては、anti-rat CYP3A2 Ab とは異なり標準タンパク質の CYP3A11 と泳動度が一致する 1 本のバンドが検出された。一方、この抗体は、CYP3A13 を強く検出することがわかったが、肝臓のミクロソーム画分中には、CYP3A13 に相当するバンドは見られなかった。さらに、この抗体は、CYP3A16 及び CYP3A25 はほとんど認識しないことが明らかになった (Fig. 2B)。

以上に結果から、6 週齢の雄のマウスの肝臓には、標準タンパク質の CYP3A11 及び CYP3A25 に一致するバンドがあることがわかった。

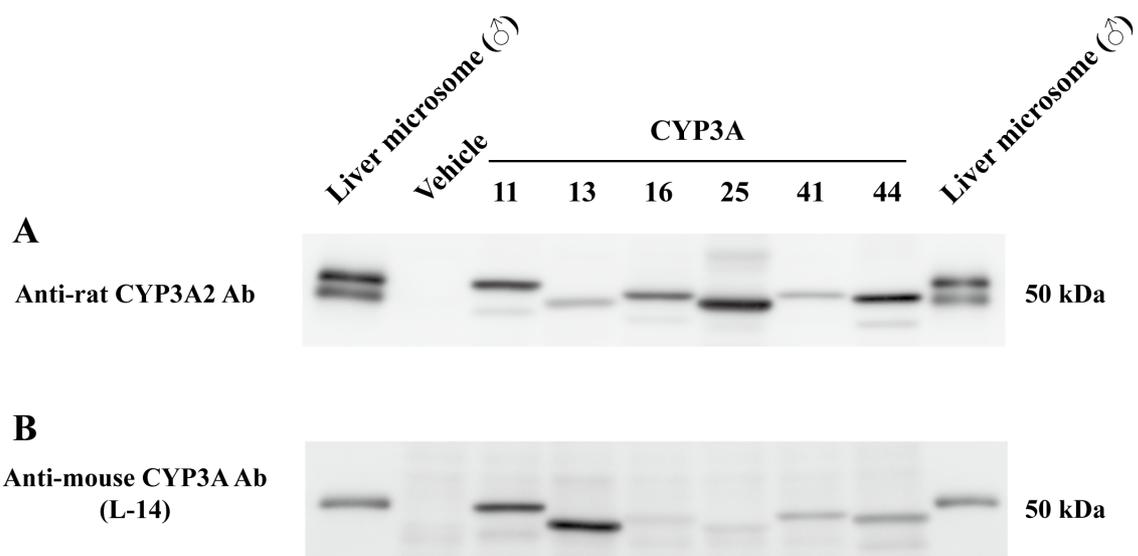


Fig. 2 6 週齢の雄のマウスの肝臓の CYP3A 分子種の同定

6 週齢の雄マウスの肝臓より調製したミクロソーム画分に発現している CYP3A 分子種を、CYP3A の標準タンパク質及び anti-rat CYP3A2 Ab (A) あるいは anti-mouse CYP3A Ab (L-14) (B) を用いて、western blotting により解析した。

3-3. 肝臓における CYP3A 分子種の発現パターンの変化

CYP3A の標準タンパク質と 2 種類の抗体の特性を利用して、western blotting でマウスの肝臓の CYP3A 分子種のタンパク質発現量を解析した。雄のマウスの肝臓においては、胎児期には、CYP3A16 が優位に発現しており、その他の CYP3A 分子種の発現は、確認できなかった。一方、生後 7 日目以降は、CYP3A11 が優位な CYP3A 分子種となり、28 日目移行からは、CYP3A25 も強く発現することがわかった (Fig. 3A, B)。雌のマウスの肝臓においては、CYP3A11、CYP3A16 及び CYP3A25 の発現パターンは、雄とほぼ同一であったものの、生後 28 日目以降には雌に特有な CYP3A41 及び CYP3A44 が見られた (Fig. 3C, D)。

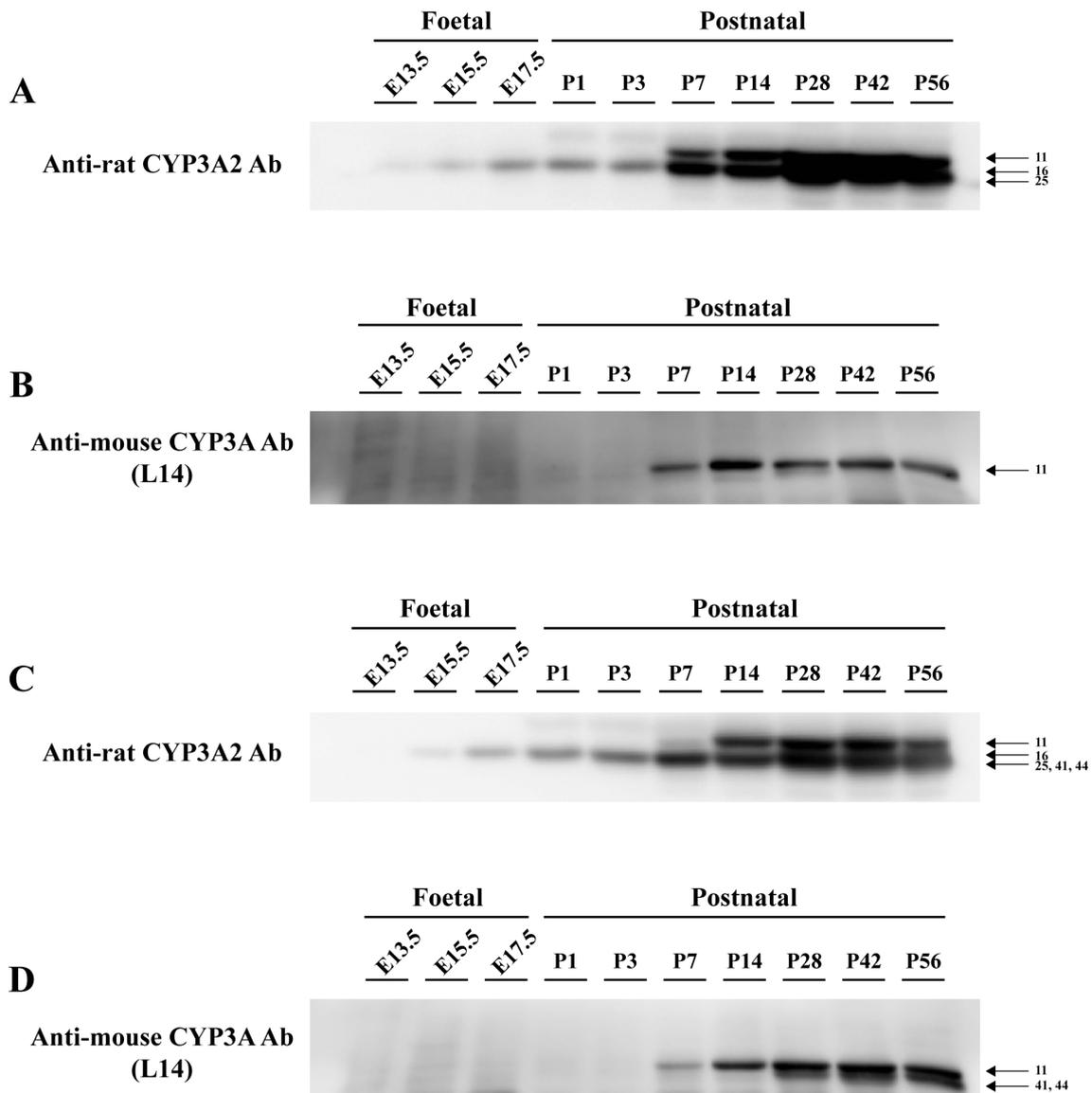


Fig. 3 マウス肝臓中 CYP3A の各ステージにおける発現量の変化

ステージの異なるマウスの肝臓より調製したマイクロソーム画分を、(A) (C) anti-rat CYP3A2 Ab、あるいは(B) (D) anti-mouse CYP3A Ab (L-14) の抗体を用いて、CYP3A 分子種の発現量の変化を western blotting により解析した。A, B : 雄、C, D : 雌。

3-4. CYP3A16 の midazolam に対する代謝活性

胎児期に CYP3A16 が優位に発現していることが明らかになったので、CYP3A16 の midazolam に対する代謝活性を調べた。Midazolam の代謝物 1'-hydroxymidazolam の産生量を指標に代謝活性を検討した。分析は、方法の部で示すように LC-MS で行った。1'-Hydroxymidazolam は、保持時間が 9.066 分にピークを示し、分子量は 342.0 であった。Fig. 4 の LC-MS プロファイルに示すように CYP3A16 には、midazolam を代謝する活性がほとんど見られなかった。なお、ポジティブコントロールとして用いた CYP3A11 は、文献記載のデータとほぼ同一の代謝活性を示した (Fig. 4)。

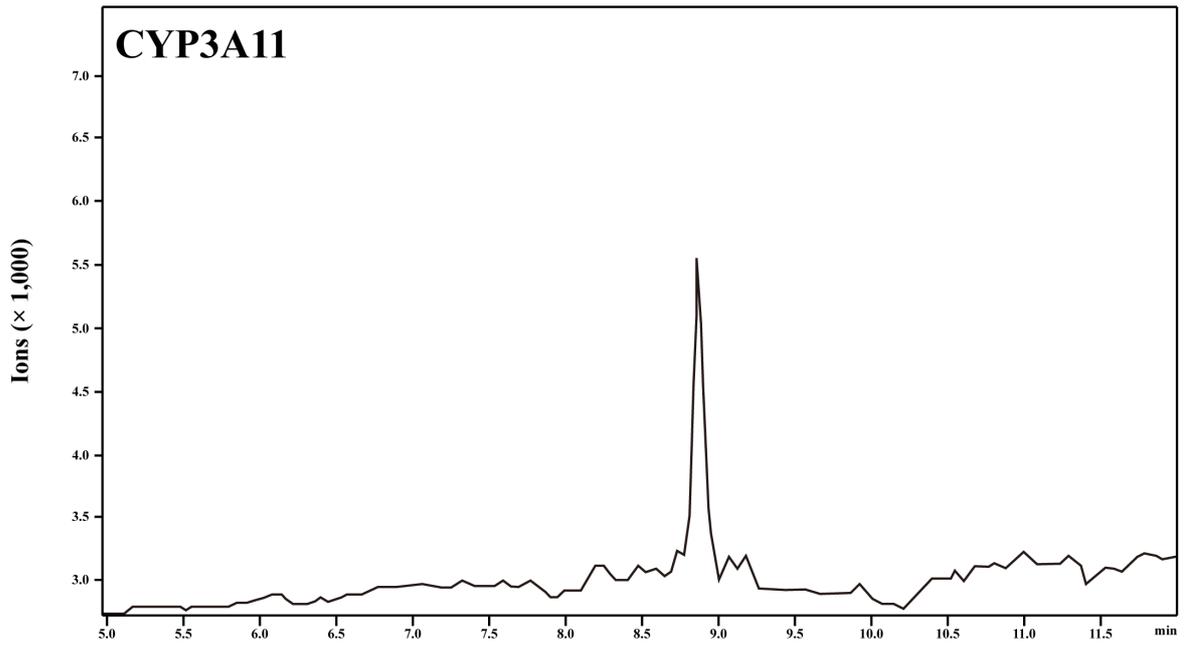
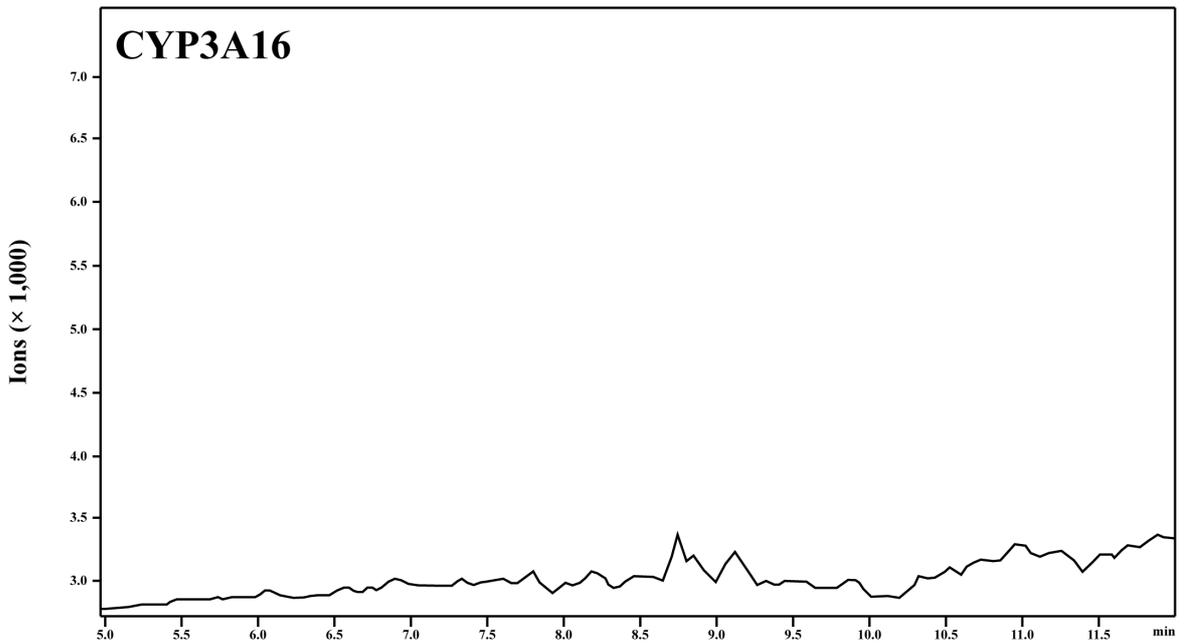
A**B**

Fig. 4 LC-MS による 1'-hydroxymidazolam の同定

CYP3A11 (A) 及び CYP3A16 (B) の標準タンパク質の midazolam に対する代謝活性を解析した。代謝活性は、反応液中の 1'-hydroxymidazolam の量を LC-MS で定量し、評価した。

4. 考察

本研究では、midazolam を含む benzodiazepine 系薬物を妊娠中に使用した際に、新生児に催奇形成が生じるリスクが上昇したことについて、胎児期の肝臓中の CYP3A 分子の発現と機能の低下したことが要因であるとの仮説を立て、その立証を試みた。

CYP3A 分子種のそれぞれアミノ酸配列は、ホモロジーが極めて高い。そこで我々は、mRNA レベルの解析に際して、使用する primer がターゲット以外の分子種に対して非特異的に結合していないことを十分に確認した。実際には、ホモロジーの極めて高い CYP3A 分子種 (11、13、16、25、41、44) の発現ベクターを構築し、これらに対する PCR 反応を行い、primer の特異性を評価した (data not shown)。その結果、胎児期のマウスの肝臓において、mRNA レベルでは、CYP3A13 が優位に発現していることを明らかにした (Fig. 1)。

次に我々は、胎児期のマウスの肝臓に発現している CYP3A 分子種についてタンパク質レベルで解析することを試みた。これまで、マウスの CYP3A 分子種をタンパク質レベルで解析した研究は乏しく、mRNA レベルでの解析がほとんどであった。その理由として、CYP3A 分子種間ではアミノ酸配列のホモロジーが高いため、western blotting による解析では、交差反応を考慮した解析が必要となることがあげられる。そこで我々は、CYP3A 分子種それぞれに対する抗体の作成を試みたが、それぞれの CYP3A 分子種を特異的に識別できる抗体を作成することはできなかった。そこで、CYP3A 分子種の発現系を構築し、CYP3A 分子種の標準タンパク質を作成し、これらの標準タンパク質と市販されている2つの抗 CYP3A 抗体を用いて、胎児期から 8 週齢にわたるマウスの肝臓の CYP3A 分子種の発現変動を調べた。

CYP3A 分子種の標準タンパク質は、SDS-PAGE によって 3 つの異なる泳動度に分離できた (Fig. 2)。なぜ、ほぼ同一の分子量である CYP3A 分子種が異なる泳動度を示すのか。この理由に関しては、以下のように考える。ポジティブチャージのアミノ

酸であるリジン、アルギニン及びヒスチジンは、SDS-PAGE での泳動速度を低下させることが知られている。CYP3A 分子種のリジン、アルギニン及びヒスチジンの割合を比較すると、最も高分子側に検出された CYP3A11 の値が他の分子種より高いことが報告されており、これが原因であろうと考えている。その他の CYP3A 分子種についても、同様の理由により、泳動度が変化したものと考察される。

mRNA レベルの解析においては、CYP3A16 の mRNA は検出されず、CYP3A13 の mRNA が胎児期に優位に発現していた (Fig. 1)。しかし、タンパク質レベルの解析では、雌雄ともに胎児期のマウスの肝臓では、CYP3A16 のみが発現していた (Fig. 3)。この理由については、以下のように考察した。過去の報告において、胎児期に CYP3A16 の mRNA が発現していることが示唆されているのにもかかわらず、我々の解析では、CYP3A16 の mRNA の発現は、雄の胎児期の肝臓では検出されず、雌では E13.5 日において一過性にみられた¹⁸⁾。さらに、新生児になると雄の CYP3A16 の mRNA も一過性の発現を示している (Fig. 1)。これらの結果から、胎児期の肝臓において、CYP3A16 の mRNA の発現はオシレーションしている可能性が示唆される。実際、CYP3A 分子種の中には、オシレーションを示す分子種が存在する^{26, 27)}。この点については、さらに詳細に解析する必要があるものと考えている。一方、CYP3A13 については、転写後遺伝子サイレンシングが関係していると考えているが、この点に関しても未解決のままであり、今後、詳細に解析しなければならない課題の一つであると考えている。

次に、我々は、胎児期のマウスの肝臓で優位に発現していた CYP3A16 の標準タンパク質を用いて、CYP3A16 が midazolam を代謝するか否か調べた。その結果、CYP3A16 は midazolam の代謝活性をほとんど有していないことが明らかとなった (Fig. 4)。この結果から、胎児期のマウスの肝臓では、midazolam をほとんど代謝できないことが示唆された。ところで、ヒトの胎児の肝臓では、CYP3A7 が優位に発現している²⁸⁾。また、ヒトの CYP3A7 は、マウスの CYP3A16 に相当し、midazolam に対する代謝活性は、CYP3A4 と比較して、1/6 程度と低いことが報告されている^{14, 29)}。今後、詳細

に解析しなければならないが、ヒトの胎児期においても、マウスの場合と同様に midazolam を代謝する活性が極めて低いものと考えられる。それに対して、生後は、midazolam を代謝することのできる CYP3A11 などの分子種が増えるため、新生児における midazolam の蓄積量は減少することが示唆される。

これまでの CYP3A の研究は、mRNA レベルでの解析で議論されることがほとんどであった。また、タンパク質レベルでの研究では、CYP3A の各分子種を識別することなく CYP3As として解析されてきた。しかしながら、本研究の結果より、CYP3A 分子種の発現パターンや midazolam の代謝活性は、それぞれの分子種ごとに大きく異なることが明らかとなった。したがって、生体内での CYP3A 分子種の薬物代謝を正確に評価するためには、タンパク質レベルで解析することが必要であると考えられる。

本研究では、胎児期と成体のマウスの肝臓に発現している CYP3A 分子種について、タンパク質レベルで、発現量や代謝活性について比較検討した。その結果、胎児期の肝臓では、成体と比較して midazolam に対する代謝活性が著しく低いことが明らかになった。この点が、妊娠中に midazolam を服用した場合、胎児に奇形が生じた原因であろうと考える。本研究の結果は、妊娠中における benzodiazepine 系薬物の適正使用に役立つであろう。

【第二章】

薬物代謝酵素 cytochrome P450 3A の zonation は離乳前の乳児期より形成されはじめる

1. 緒言

妊婦や授乳婦への医薬品の使用は、胎児あるいは乳児への影響を考慮し、できる限り避けられている。その一方で、高血圧、糖尿病あるいは脂質異常症などに代表される慢性疾患や帝王切開の麻酔など、妊婦や授乳婦に医薬品を使用しなければならない場合がある。しかしながら、その場合における医薬品の安全性に関する科学的根拠は、ほとんどなかった。我々は、その安全性を確立すべく、薬物動態学の観点から種々の研究を行ってきた。その結果、胎児期のマウスの肝臓では、医薬品に対する代謝活性の低い CYP3A16 が優位に発現していること、及び、代謝活性の高い CYP3A11 は、生後 7 日目から発現し始めることを明らかにした。我々のこれらの発見は、胎児期及び授乳期において薬物代謝活性が低い一つの理由を説明し得るものであった。

ところで、最近、胎児期における薬物代謝活性が低い理由を説明し得る別の理由も明らかになってきた。CYP を含む薬物代謝に関連した酵素は、肝臓において門脈領域から中心静脈領域にかけて不均質性があり、zonation と呼ばれる特徴的な局在を示している³⁰⁻³³⁾。最近、この zonation が、肝臓における医薬品に対する代謝のエネルギー効率の向上に寄与しているのではないかと考えられている。また、胎児の肝臓では、この zonation が見られず、このことが胎児期の肝臓において医薬品に対する代謝活性を低下させている要因の一つであると考えられている³⁰⁾。

我々は、CYP3A16 及び CYP3A11 の発現と zonation の関係を明確にすることができ

れば、妊婦や授乳婦における医薬品の適正使用に関するより明確な科学的根拠を提示できるものと考え、胎児期から乳児期にわたるマウスを用いて、肝臓の CYP3A の zonation の形成過程について、免疫染色法により解析した。

2. 方法

2-1. 試薬

Isoflurane、sucrose、ultrapure water、Triton[®] X-100 及び dimethyl sulfoxide (DMSO) は、Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan) より購入した。Paraformaldehyde 及び Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM) は、Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO, USA) より購入した。Zero Blunt[®] TOPO[®] polymerase chain reaction (PCR) Cloning Kit、PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit、Opti-MEM、fetal bovine serum (FBS)、Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit IgG (A21206) 及び Alexa Fluor 594 donkey anti-goat IgG (A11058) は、Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) より購入した。Bacto tryptone 及び Bacto yeast extract は Becton Dickinson and Company (Franklin Lakes, NJ, USA) より購入した。Phosphate buffered saline tablet (without magnesium, calcium) 及び Trans IT-LT1 は、タカラバイオ株式会社 (Shiga, Japan) より購入した。各種 primer は、北海道システム・サイエンス株式会社 (Hokkaido, Japan) より購入した。6 x Loading Buffer Orange G、Agarose S 及び Tris-EDTA Buffer は、株式会社ニッポンジーン (Tokyo, Japan) より購入した。KOD Plus は、東洋紡株式会社 (Osaka, Japan) より購入した。Surgipath FSC22 Blue Frozen Section Compound は、Leica Biosystems (Wetzlar, German) より購入した。Rabbit anti-rat CYP3A2 Ab (R-PAP171) は、日本農産工業 (Kanagawa, Japan) より購入した。Goat anti-PECAM-1 Ab (M-20; sc-1506) は、Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) より購入した。Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit IgG (A21206) 及び Alexa Fluor 594 donkey anti-goat IgG (A11058) は、Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) より購入した。その他の試薬は、市販されている物の内、最もグレードの高いものを購入した。

2-2. 動物実験

妊娠した ICR マウス及び各週齢の ICR マウスは日本エスエルシー株式会社 (Shizuoka, Japan) より購入した。マウスは温度 $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 5\%$ の施設において飼育し、明暗条件は 8 : 00 点燈、20 : 00 消灯の条件下で飼育した。

本動物実験は、実験動物の適正な使用及び管理について定められた星薬科大学薬学部実験動物ガイドラインに準じて、同大学動物実験施設で行われた。

2-3. プラスミドの構築

PCR plates 96-well の各 well に KOD-Plus 1.0 μL 、10 \times KOD-Plus buffer 5.0 μL 、dNTP mixture 4.0 μL 、 MgSO_4 4.0 μL 、DMSO 2.0 μL 、cDNA 溶液 1.0 μL 、目的遺伝子の forward primer (20 μM) 2.0 μL 、reverse primer (20 μM) 2.0 μL 、ultrapure water 29 μL を入れ混合した。CFX Connect™ Real-Time PCR detection system で、最初に 94°C で 2 分間熱変性させた。その後、 98°C で 10 秒間変性させ、 $55\sim 58^{\circ}\text{C}$ で 30 秒間アニーリングし 68°C で 1 分 30 秒間伸長反応を行った。これを 1 サイクルとして、30 サイクル行い、目的遺伝子を増幅した。目的遺伝子 CYP3A11、CYP3A13、CYP3A16、CYP3A25、CYP3A41 及び CYP3A44 について、Table 4 に示す forward primer 及び reverse primer を使用した。

作成した PCR 産物を精製後、Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit を用いて、PCR 産物をクローニングベクターに組み込んだ。配列を確認後、インサートを切り出し、pEF-BOS vector に組み込み、それぞれの発現 vector とした²²⁾。

2-4. Transfection

12well プレートの各 well にカバーガラスを沈め、その上にアフリカミドリザル腎臓由来細胞株 COS7 細胞を 1.0×10^4 cell で播種し、24 時間後に遺伝子導入した²³⁾。pEF-BOS (vector)、pEF-BOS-CYP3A11、pEF-BOS-CYP3A13、pEF-BOS-CYP3A16、pEF-BOS-CYP3A25、pEF-BOS-CYP3A41 及び pEF-BOS-CYP3A44 をそれぞれ 1.0 μg に OPTI-

MEM 溶液 150 μ L に TransIT-LT1 を 2 μ L を混ぜたものと混合し、室温で 15 分間、インキュベート後 COS7 細胞に滴下した。

2-5. 免疫細胞化学染色

COS7 細胞を PBS(-) で洗浄後、4% PFA/PBS で室温、10 分間、固定した。PBS(-) で穏やかに 1 回洗浄した後、blocking buffer (0.1% TritonX-100, 3% FBS /PBS) を用いて、室温で、1 時間、その後、1 次抗体溶液を用いて、4°C で一晩インキュベートした。PBS(-) で穏やかに 3 回洗浄した後、2 次抗体溶液を用いて、遮光して室温で、1 時間、反応させた。PBS(-) で穏やかに 3 回洗浄した。その後、MICRO COVER GLASS を用いて VECTASHIELD (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) にて封入した。免疫染色した sections を FV1200 (Olympus, Tokyo, Japan) を用いて検出した。

2-6. 免疫組織化学染色

妊娠 13、15 及び 17 日目の ICR マウスをイソフルランで麻酔し、帝王切開により胎児を取り出した。4% PFA/PBS を用いて、4°C、20 分間、固定した。PBS(-) で洗浄後、サンプルを 4°C で、10% sucrose 溶液に浸し、組織が沈んだら 20% sucrose 溶液、30% sucrose 溶液と順で同様に浸した。Surgipath FSC22 Blue Frozen Section Compound で包埋し、-80°C で保存した。これを LEICA CM1850 (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany) で 12 μ m にカットし、MICRO SLIDE GLASS に接着させ、凍結切片とした。切片は室温で十分に乾燥させた後、-80°C にて使用まで保存した。その後、免疫染色は免疫細胞化学染色と同様に行った。

3. 結果

3-1. CYP3A 分子種に対する抗 CYP3A 抗体の特異性の解析

CYP3A には、多くの分子種が存在するが、CYP3A 分子種間のアミノ酸配列の相同性は非常に高く、それぞれの CYP3A 分子種に特異的に反応する抗体を作製することは困難である^{34,35)}。したがって、実験で使用する CYP3A に対する抗体が、CYP3A のどの分子種を認識することができるかについて解析することが重要な課題である。まず、我々は、本研究で使用する抗体 (rabbit anti-rat CYP3A2 Ab) の CYP3A 分子種に対する反応性を免疫細胞化学染色で解析した。

それぞれの CYP3A 分子種の発現 vector を COS7 細胞に transfection し、24 時間後に細胞を固定し、rabbit anti-rat CYP3A2 Ab で免疫細胞化学染色した。その結果、control vector を transfection した細胞を除くすべての細胞から細胞質に局在したシグナルが得られた (Fig. 5)。このことより、rabbit anti-rat CYP3A2 Ab は、使用した CYP3A 分子種を識別することはできないものの、CYP3A16、CYP3A11 を含むほとんどの CYP3A 分子種 (CYP3A11、13、16、25、41 及び 44) を認識できることが明らかとなった。そこで、本研究では、CYP3A 分子種を識別することなく、rabbit anti-rat CYP3A2 Ab を用いて免疫染色を行ない肝臓における CYP3A の zonation を解析することとした。

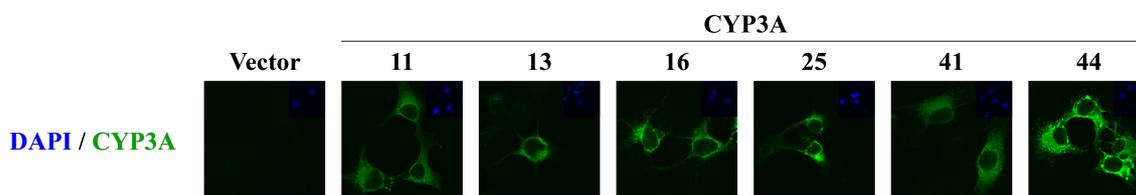


Fig. 5 Immunocytochemistry による抗体の認識分子種の解析

COS7 細胞に CYP3A11、CYP3A13、CYP3A16、CYP3A25、CYP3A41 及び CYP3A44 を強制発現させた。細胞を固定後、anti-rat CYP3A2 Ab を用いた immunocytochemistry により、反応性を検討した。(×1,200)

3-2. 成体マウスにおける肝臓組織切片の免疫組織化学染色

まず、zonation が確実に形成されていることが知られている 6 週齢のマウスの肝臓を用いて、rabbit anti-rat CYP3A2 Ab で CYP3A の zonation が過去の報告通り検出できるかどうかを確認した。その結果、血管内皮細胞のマーカ―の PECAM-1 が発現する中心静脈の周囲に、CYP3A の特徴的な局在が見られること、及びその局在は中心静脈から離れるにつれて減少していることが観察できた。このことより、rabbit anti-rat CYP3A2 Ab を用いた本法により、CYP3A の zonation を確認できることがわかった (Fig. 6)。

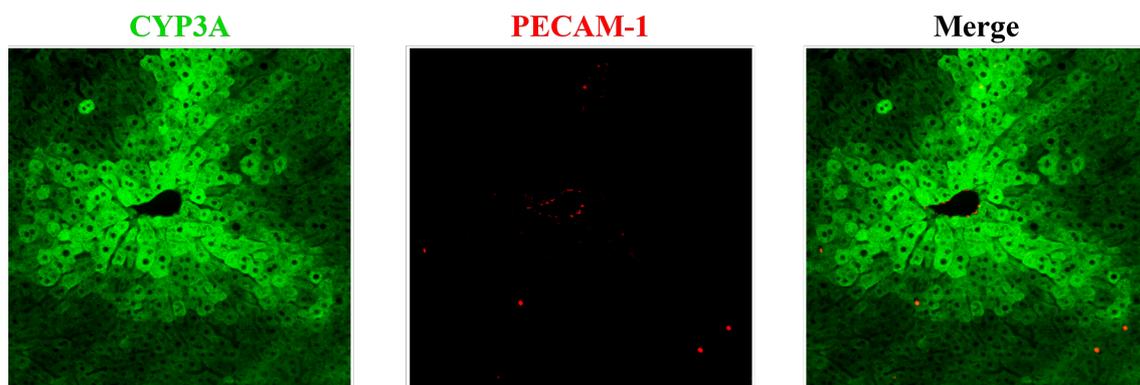


Fig. 6 成体マウスから摘出した肝臓組織切片の免疫組織化学染色

6 週齢の雄性マウスより肝臓を摘出し、組織切片を作製した。Rabbit anti-rat CYP3A2 antibody を用いた免疫組織化学染色法で、CYP3A の発現と、局在を確認した。また、血管内皮細胞のマーカ―タンパク質である PECAM-1 の染色も行った。(×200)

3-3. マウスの胎仔肝臓組織における CYP3A の発現変化

胎児期 13.5 日目 (E13.5) から乳児期 7 日目 (P7) のマウスの肝臓を摘出し、組織切片を作製し、rabbit anti-rat CYP3A2 Ab で免疫染色を行った。その結果、過去の報告と同様に、胎児期においては、CYP3A の zonation は見られなかった。さらに、生後 1 日目及び 3 日目においても胎児期と同様に、CYP3A の zonation は、認められなかった。一方、生後 7 日目には、中心静脈周囲の細胞において CYP3A の発現量が上昇し、特徴的な CYP3A の局在が観察された (Fig. 7)。これらの結果より、CYP3A の zonation は、生後 7 日目という離乳前の乳児期の肝臓において始めて形成されることが明らかになった。

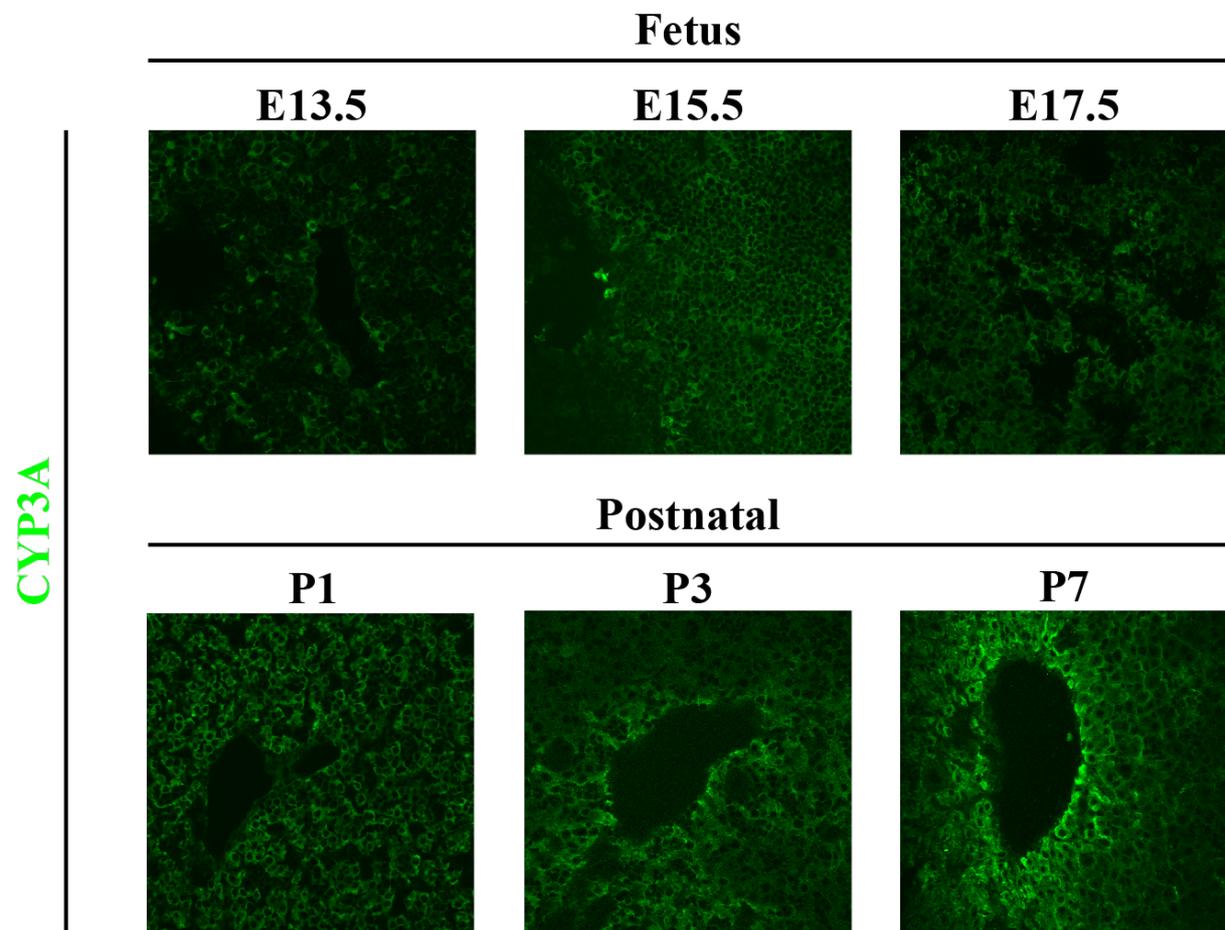


Fig. 7 各ステージにおけるマウスから摘出した、肝臓の組織切片の免疫組織染色
各ステージ (E13.5、E15.5、E17.5、P1、P3 及び P7) のマウスより肝臓を摘出し、組織切片を作製した。Rabbit anti-rat CYP3A2 antibody を用いた免疫組織化学染色法で、CYP3A の発現と、その局在を各ステージで解析を行った。(×400)

4. 考察

CYP を含む薬物代謝酵素は、肝臓において zonation を形成し、基質の代謝の効率化をはかっていると考えられている。我々は、胎児期及び乳児期における薬物の適正使用に関する科学的根拠を明確にするため、肝臓における CYP3A の発現と zonation 形成過程の関係を調べた。その結果、薬物代謝活性の低い CYP3A16 が優位に発現している胎児期には、CYP3A の zonation は見られず、薬物代謝活性の高い CYP3A11 が優位に発現しだす乳児期から、CYP3A11 の発現に符合して CYP3A の zonation も形成され始めることが明らかとなった (Fig. 7)。経口摂取した食物や医薬品等に含まれる CYP3A の基質は、門脈から肝臓に入り、中心静脈から全身血に送られる。門脈付近の CYP3A の基質濃度と中心静脈付近の基質濃度は異なり、代謝の不均質性が必然的に現れる。そのため、効率良く代謝を行うために、CYP3A の zonation が存在しているのではないかと考えられている。胎児期、乳児期、離乳期の順に CYP3A の基質の種類も量も増加するものと考えられる。また、離乳期以降の劇的な環境の変化に対応するため、肝臓においても多様な酵素が発現する。このような成長過程の変化に符合して、CYP3A の代謝活性の効率化も必要になるのではなかろうか。マウスにおいては、離乳が生後約 3 週目より始まることより、その離乳にそなえて、代謝活性の高い CYP3A11 の発現増加と CYP3A の zonation の形成が始まるものと考えられる。

本研究は、CYP3A の分子種を識別した zonation の研究ではないが、我々の過去の研究をもとに今回得られた免疫染色の結果を考察すると、胎児期における結果は、CYP3A16 を反映したものであり、乳児期における結果は、CYP3A11 を反映したものであると考えられる。今後、CYP3A の分子種を明確にする必要があるとは考えられるものの、本研究により、胎児期においては、CYP3A の代謝活性は極めて低いこと及び、乳児期から徐々に CYP3A の代謝活性が増加することが、CYP3A の分子種の面からだけでなく、zonation の面からも明らかにすることができたと考える。今後、さらなる研究を積み重ねることによって、妊婦及び授乳婦における医薬品の適正使用が

確立されるものとする。

【第三章】

Second trimester の妊娠マウスに midazolam を投与すると胎児マウスの脳内に midazolam 及び 1'-hydroxymidazolam が多量に移行する

1. 緒言

母親が first trimester に midazolam を含む benzodiazepine 系の薬物を服用した場合、先天性奇形が高頻度で見られることが報告されて以来、現在では、first trimester に benzodiazepine 系の薬物を服用することはほとんどなくなった⁵⁾。一方、second trimester 以降では、first trimester と比較して、薬物による胎児への先天性奇形のリスクが少なくなることもあり、benzodiazepine 系の薬物は、限定的ではあるが、依然、使用されている。例えば、妊娠高血圧症候群に関連した痙攣発作の治療や帝王切開時の麻酔薬として使用されている²⁻⁴⁾。しかしながら、この期間に midazolam を妊婦に使用する場合の胎児への安全性については十分に検証されていない。特に、midazolam は脳に移行しやすい薬物であるので、胎児の神経発生を障害することが危惧される。

Second trimester において胎児の脳は、神経幹細胞が非対称分裂を繰り返しながら、ニューロンへと分化する。胎児の脳は、成体の脳と比較して、恒常的に低酸素の状態にあり、低酸素誘導因子 hypoxia-inducible factor (HIF) -1 α が高発現している³⁶⁾。この HIF-1 α は、神経幹細胞からアストロサイトへの分化を促進するが、近年、third trimester に母体に midazolam を投与したところ、胎児の脳において HIF-1 α の機能が阻害されたとの報告がある³⁷⁾。この報告は、たとえ second trimester 以降でも妊娠中に midazolam を投与することは、HIF-1 α の機能を阻害する可能性があり、胎児の神経発

生に影響を及ぼすことを示唆している。

これまで、妊娠中に midazolam を含む benzodiazepine 系の薬物を母体に投与した際の胎児の脳への移行や蓄積を解析した研究は、皆無であった。そこで、我々は、妊娠中に midazolam を母体に投与した際に midazolam が胎児の脳にどの程度移行し、蓄積するかを調べることにした。Midazolam の脳への移行や蓄積が明らかになれば、second trimester 以降に妊婦に midazolam を投与した際の胎児の脳へのダメージを推測できるであろう。

まず、本研究では、妊娠マウスを用い、母体に投与した midazolam がどの程度胎児の脳に移行し、蓄積するのかについて調べた。また、midazolam は、母体の肝臓で速やかに代謝され、活性を有する代謝物 1'-hydroxymidazolam に変換されることより、1'-hydroxymidazolam の脳内移行についても検討した。

次に、midazolam と 1'-hydroxymidazolam が胎児の脳へどのような経路で移行し、蓄積したかを解析した。母体から胎児の血中に移行した midazolam は、胎児中において、ほとんど代謝されることなく、再び母体へ移行する循環をくり返す。一方、1'-hydroxymidazolam は、単純な母体と胎児間の循環のみならず、胎児の尿を介して羊水中に排泄される可能性が考えられる。そこで、本研究では、この胎児-羊水間の循環系にも着目して、midazolam 及び 1'-hydroxymidazolam の脳への移行メカニズムを解析した。

2. 方法

2-1. 試薬

Midazolam、isoflurane、methanol、ultrapure water、phosphoric acid、acetonitrile 及び formic acid は、Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan) より購入した。 α -Hydroxymidazolam solution、 α -Hydroxymidazolam-d4 solution 及び tween 80 は、Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO, USA) より購入した。生理食塩水は、Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc. (Tokushima, Japan) より購入した。4-Hydroxymidazolam は、Corning Inc. (NY, USA) より購入した。Phosphate buffered saline tablet (without magnesium, calcium)、はタカラバイオ株式会社 (Shiga, Japan) より購入した。ヘパリンナトリウム注射液 (10,000 単位) は、清水製薬株式会社 (Shizuoka, Japan) より購入した。その他の試薬は、市販されている物の内、最もグレードの高いものを購入した。

2-2. 動物実験

妊娠 12.5 日目の ICR マウスは日本エスエルシー株式会社 (Shizuoka, Japan) より購入した。マウスは温度 $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 5\%$ の施設において飼育し、明暗条件は 8 : 00 点燈、20 : 00 消灯の条件下で飼育した。

本動物実験は、実験動物の適正な使用及び管理について定められた星薬科大学薬学部実験動物ガイドラインに準じて、同大学動物実験施設で行われた。

2-3. 薬液投与

Midazolam の薬液は、10 mg/mL となるように polyoxyethylene (80) sorbitan monolaurate に溶解し、stock solution とした。Stock solution を生理食塩水で 50 倍希釈し、midazolam 溶液 (0.2 mg/mL) とした。イソフルラン麻酔下でマウスの体重 10 g あたり midazolam 溶液を 100 μL となるように静脈内に投与した。

2-4. 解剖

マウスは、midazolam 投与から各時間（10、15、30、45、60、90、120、180、240 及び 300 min）にイソフルラン麻酔下で、中心静脈から採血した。次に、母体の血液が胎児に付着することを避けるために、子宮周囲の血管を電気メス（Beaver-Visitec International, Tokyo, Japan）で焼くことで止血した。羊水は、子宮に 26G 1/2 の注射シリンジを穿刺して採取した。また、子宮から胎児を摘出する際、臍帯を、電気メスで止血した。胎児は、実体顕微鏡（MDG33, Leica Microsystems, Wetzlar, German）下で解剖し、脳及び肝臓に分けた。その後、母体を開胸し、左心室から PBS (-) を注入しすることで体内の血液を洗い流した後、母体の脳及び肝臓を摘出した。各サンプルは、使用時まで-80°Cで保存した。

2-5. LC-MS sample preparation

胎児は、4 mL の 2%リン酸水溶液でホモジナイズし、1 分間、ボルテックスした。その際、内標準物質として 200 ng の 1'-hydroxymidazolam-d4 を 10 µL のメタノールに溶解し、スパイクした。ホモジネート液を 9,000×g、RT で 10 分間、遠心分離した。上清を 3.8 mL を Solid-phase extraction (SPE) columns Oasis[®] HLB PRiME 3 cc (60 mg) (Waters, Milford, MA, USA) に充填した。SPE columns は、あらかじめ 1 mL のメタノールでコンディショニングし、500 µL の超純水と 2%リン酸水溶液で平衡化したものを用いた。洗浄は、1 mL のメタノール：超純水（5：95, v/v）で行った。サンプルの溶出は、2 mL のアセトニトリル：メタノール（90：10, v/v）で行った。溶出液は、窒素灌流下、50°Cで溶媒を留去した。100 µL のグラジエント開始時の移動相で再溶解し、LC-MS サンプルとした。

胎児の脳及び肝臓は、1 mL の 2%リン酸水溶液でホモジナイズし、胎児と同様の方法で前処理した。

母体の血液から調製した血漿 100 µL と羊水 500 µL に同量の 4%リン酸水溶液を加え、1 分間、ボルテックスした。そして、上述した胎児のサンプルと同様の方法で、

前処理した。

検量線は、コントロールの各サンプルに midazolam、1'-hydroxymidazolam あるいは 4-hydroxymidazolam の標準液をスパイクし、同様の方法で前処理し、作製した。検量線の定量域は、母体の血漿 : 1.953~5,000 ng/mL、母体の脳 : 9.765625~5,000 ng/tissue、whole の胎児 : 1.953~500 ng/embryo、胎児の脳 : 1.5625~100 ng/tissue、羊水 : 1.953~125 ng/mL の範囲で作製した。

2-6. LC-MS analysis

分析は、LC-20A HPLC システム (SHIMADZU) と LCMS-2010 EV single quadrupole mass spectrometer (SHIMADZU) を組み合わせて行った。分析カラムは、XBridge C18 (3.5 μ m, 21 mm x 150 mm) (Waters) を使用した。カラム温度は、40°C で分析を行った。移動相 A は、0.1% のギ酸を加えた超純水を使用した。移動相 B は、0.1% のギ酸を加えたアセトニトリルを使用した。分析は、以下に示す binary gradient モードで行った。(Gradient 条件 (% of B) : 0.00 min 10%, 10.00 min 70%, 12.00 min 70%, 12.01 min 10%, 16.00 min 40%) 流速は、0.2 mL/min で一定とした。

Interface は、positive モードの ESI を使用した。ネプライザーガスの流量は、1.5 L/min に設定した。CDL 温度とヒートブロック温度は、それぞれ、250°C、200°C に設定した。検出器の電圧は、1.5 V に設定した。測定は、m/z 326 for midazolam、m/z 342 for 1'-hydroxymidazolam and 4-hydroxymidazolam、m/z 346 for 1'-hydroxymidazolam-d4 による selected ion monitoring (SIM) method で行った。

HPLC システムの制御及び MS クロマトグラムの解析は、LCMSsolution Ver.3.40 (SHIMADZU) を用いて行った。

以上の分析条件の元で、それぞれの薬物の標準品を分析した際の MS クロマトグラムと保持時間を、Fig. 8 と Table 4 に示した。

2-7. Statistics

実験値は、平均値±標準偏差として表記した。その際、外れ値は、Smirnov-Grubbs の棄却検定により算出した。有意差は、Student's *t*-test で算出した。薬物動態学の各種パラメータは、解析ソフト Numeric Analysis Program for Pharmacokinetics を用いて算出した³⁸⁾。

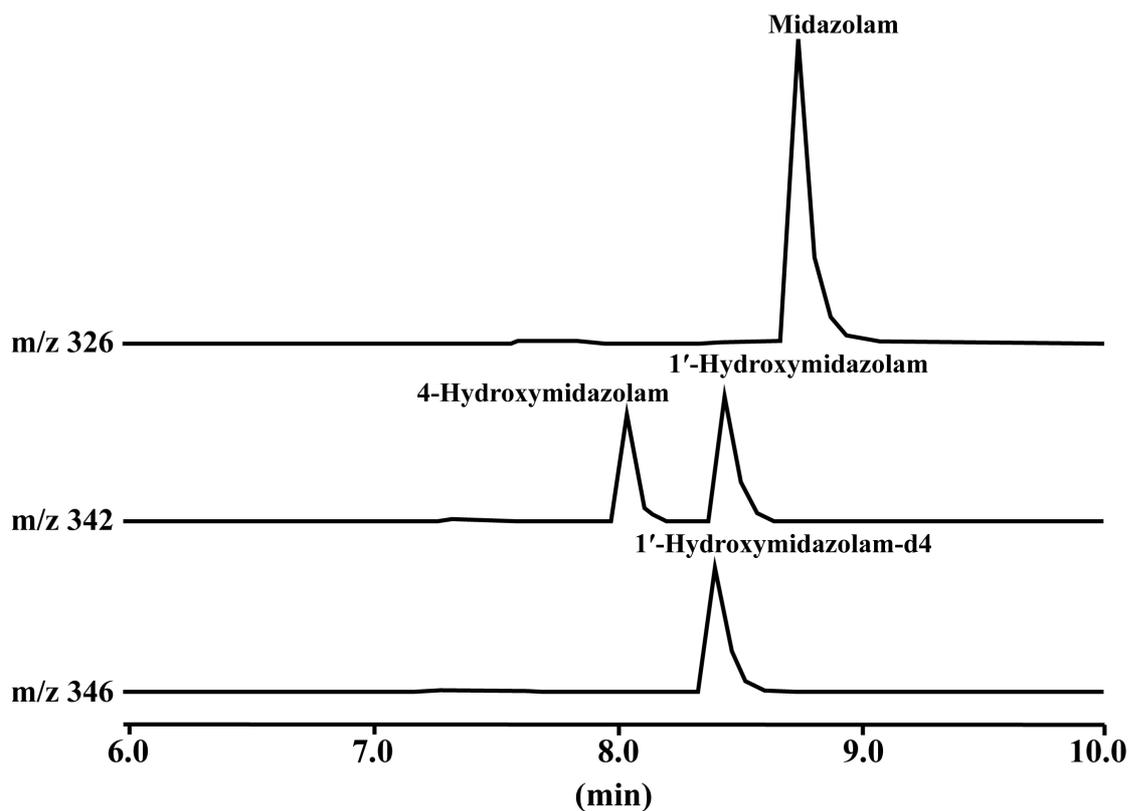


Fig. 8 各標準品の MS クロマトグラム

Midazolam、1'-hydroxymidazolam、4-hydroxymidazolam 及び 1'-hydroxymidazolam-d4 の濃度がそれぞれ 100 ng/mL になるように移動相 (0.1% formic acid/water : 0.1% formic acid/acetonitrile = 9 : 1) に溶解し、5 μ L をインジェクションした。

Table 4 各標準物質の保持時間

	Compound			
	Midazolam	1'-Hydroxymidazolam	4-Hydroxymidazolam	1'-Hydroxymidazolam-d4
Retention time (min)	8.734	8.467	8.067	8.400

3. 結果

3-1. 母体及び胎児の脳中 midazolam 及び 1'-hydroxymidazolam の経時変化及び薬物動態学的解析

妊娠 14.5 日の母マウスに midazolam (2.0 mg/kg) を尾静脈内に投与したところ、投与 5 分後から約 20 分間にわたり、睡眠状態を呈した。Midazolam 投与後、母体及び胎児から脳を摘出し、脳内 midazolam 及び 1'-hydroxymidazolam 濃度を測定した。母体の脳内 midazolam 濃度は、投与直後から急激に低下し、投与 180 分後以降では、検出限界以下であった。一方、1'-hydroxymidazolam は、投与 10 分後には、すでに母体の脳内に認められ、それ以降は midazolam に類似した推移を示した (Fig. 9A)。

それに対して、胎児の脳内における midazolam 濃度は、母体の脳内濃度の推移とは異なり、投与 15 分後に最大となり、120 分後移行では検出限界以下であった。一方、胎児の脳内における 1'-hydroxymidazolam の濃度は、投与 15 分後に最大となったものの、midazolam とは異なり、300 分後まで、脳内で検出された (Fig. 9B)。

母体と胎児の脳における midazolam 及び 1'-hydroxymidazolam の薬物動態パラメータ (AUC (area under the curve)、 AUC_{inf} 、 AUC_{inf} ratio (midazolam / 1'-hydroxymidazolam)、 $t_{1/2}$) を Table 5 に示す。Midazolam に対する 1'-hydroxymidazolam の脳内における存在比 (AUC_{inf} ratio) は、母体及び胎児において、ともに 1:1 であり、両者の存在比に差は認められなかった。一方、胎児の脳における midazolam 及び 1'-hydroxymidazolam の存在量は、母体の脳における存在量の、それぞれ 44.7%及び 44.5%であり、胎児の脳にも両化合物が多量に移行することが明らかになった。

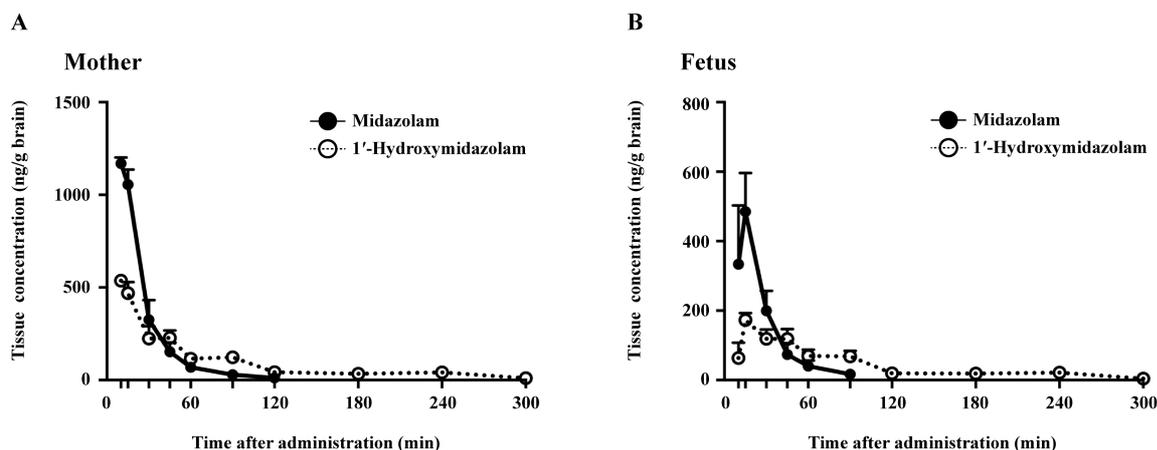


Fig. 9 母体と胎児の脳内 midazolam 及び 1'-hydroxymidazolam の経時変化と脳・体重比

Midazolam (2.0 mg/kg) を尾静脈から投与し、各時間 (10、15、30、60、90、120、180、240、及び 300 min) の母体の脳 (A) と胎児の脳 (B) の midazolam 及び 1'-hydroxymidazolam の濃度を LC-MS で測定した。脳内 midazolam 濃度と 1'-hydroxymidazolam 濃度の変化は、それぞれ実線と点線で示した。分析結果は、中央値 ±標準偏差 (母体 : n = 5, 胎児 : n = 15) で示した。

Table 5 母体と胎児の脳における midazolam あるいは 1'-hydroxymidazolam に関する薬物動態パラメータ

Sample	Compound	AUC ₀₋₃₀₀ (ng*min/g Tissue)	AUC _{inf} (ng*min/g Tissue)	AUC _{inf} ratio (1'-hydroxymidazolam / midazolam)	t _{1/2} (min)
Maternal Sample					
Brain (n = 5)	Midazolam	27697	28135	1.04	24.3
	1'-Hydroxymidazolam	27910	29287		69.5
Fetal Sample					
Brain (n = 15)	Midazolam	12071	12573	1.04	21.3
	1'-Hydroxymidazolam	12531	13022		57.1

3-2. 母体の血漿中 midazolam 及び 1'-hydroxymidazolam の経時変化

母体の血漿中の midazolam 及び 1'-hydroxymidazolam の濃度を定量分析した。Midazolam の血漿中濃度は、母体の脳内濃度と同様に、投与直後から急激に低下した (Fig. 10)。一方、1'-hydroxymidazolam の血漿中濃度は、母体の脳内における 1'-hydroxymidazolam 濃度の推移とは異なり、投与 15 分後が最も高くなり、それ以降は緩やかに減少した。Midazolam と 1'-hydroxymidazolam の血漿中濃度を比較すると、投与 15 分後までは、midazolam の方が高いが、投与 15 分後以降では、1'-hydroxymidazolam の方が高かった (Fig. 10)。なお、4-hydroxymidazolam については、すべてのサンプルで検出できなかった。

母体の血漿中における midazolam 及び 1'-hydroxymidazolam の薬物動態パラメータ (AUC、 AUC_{inf} 、 AUC_{inf} ratio、 $t_{1/2}$) を Table 6 の上段のカラムに示す。Midazolam に対する 1'-hydroxymidazolam の AUC_{inf} ratio は 1.92 であり、血漿中では、1'-hydroxymidazolam の方が midazolam に比べ約 2 倍多く存在することがわかった。一方、母体の血漿中の midazolam の AUC_{inf} と母体の脳内の midazolam の AUC_{inf} を比較すると、脳内の AUC_{inf} の方が 1.86 倍高かった。それに対して、1'-hydroxymidazolam は、血漿と脳内の AUC_{inf} にほとんど差は見られなかった。これらのことより、母体に投与した midazolam は、速やかに代謝され、1'-hydroxymidazolam を生成するが、母体の血漿から脳内への移行率は、1'-hydroxymidazolam に比べ、midazolam の方が高いことがわかった。さらに、母体の血漿中の midazolam 及び 1'-hydroxymidazolam の AUC_{inf} と胎児の脳内における両者の AUC_{inf} を比べると、胎児は母体の、それぞれ 83.3%及び 44.9%であった。

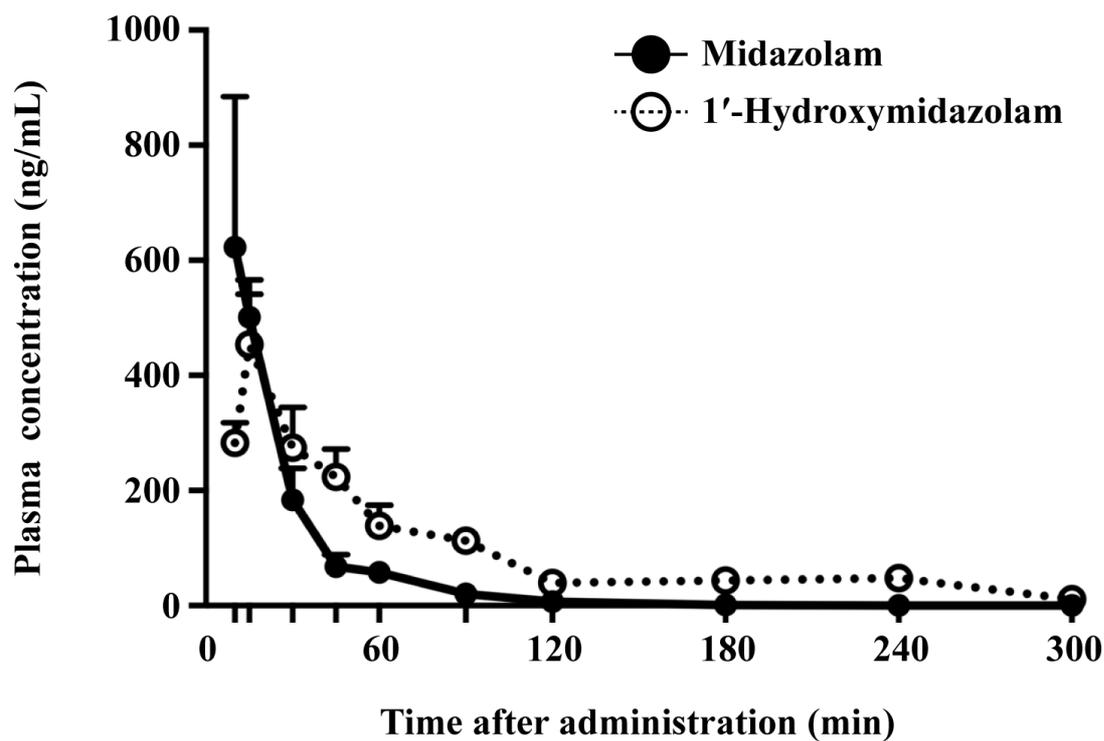


Fig. 10 母体の血漿中 midazolam 及び 1'-hydroxymidazolam の経時変化

Midazolam (2.0 mg/kg) を尾静脈から投与し、各時間 (10、15、30、60、90、120、180、240、及び 300 min) の血漿中の midazolam 及び 1'-hydroxymidazolam の濃度を LC-MS で測定した。分析結果は、中央値±標準偏差 (n = 5) で示した。

3-3. 胎児中 midazolam あるいは 1'-hydroxymidazolam の経時変化

胎児の血漿中の midazolam 及び 1'-hydroxymidazolam 濃度を測定することはできなかったため、脳を含む胎児全体における midazolam 及び 1'-hydroxymidazolam の濃度を定量分析した。母体に midazolam を投与してから 15 分後に胎児中の midazolam 濃度が最高値となり、それ以降は急激に減少した。一方、1'-hydroxymidazolam の濃度は、15 分後に最高値となったものの、midazolam とは異なり、300 分まで胎児中に検出できた (Fig. 11)。なお、4-hydroxymidazolam については、胎児中では検出できなかった。

Midazolam 及び 1'-hydroxymidazolam の薬物動態パラメータ (AUC、 AUC_{inf} 、 AUC_{inf} ratio、 $t_{1/2}$) を Table 6 中段のカラムに示す。胎児全体における midazolam に対する 1'-hydroxymidazolam の AUC_{inf} ratio は 2.46 であり、母体の血漿中における両者の AUC_{inf} ratio (1.92) よりも高かった。胎児全体の midazolam の AUC_{inf} と胎児の脳内の midazolam の AUC_{inf} を比較すると、胎児の脳内の AUC_{inf} の方が 1.78 倍高かった。この値は、母体の血漿中の AUC_{inf} と母体の脳中の AUC_{inf} の関係 (1.86) と近似していた。一方、1'-hydroxymidazolam では、胎児の脳内の AUC_{inf} は、胎児全体の 75.4%であった。この値は、母体の血漿中の AUC_{inf} に対する母体の脳中の AUC_{inf} の関係に比べ、小さかった。

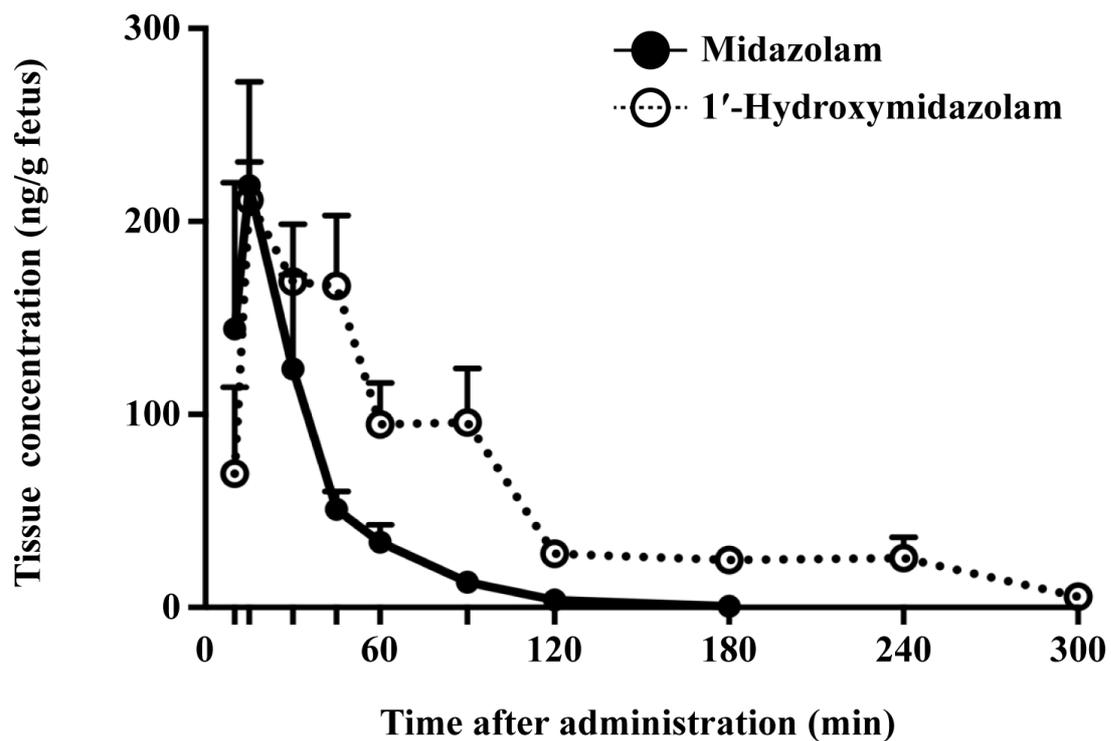


Fig. 11 胎児中 midazolam 及び 1'-hydroxymidazolam の経時変化

Midazolam (2.0 mg/kg) を尾静脈から投与し、各時間 (10、15、30、60、90、120、180、240、及び 300 min) の胎児中の midazolam 及び 1'-hydroxymidazolam の濃度を LC-MS で測定した。分析結果は、中央値±標準偏差 (n = 15) で示した。

3-4. 母体の羊水中 midazolam 及び 1'-hydroxymidazolam の経時変化

Midazolam と 1'-hydroxymidazolam の母体の血漿中における AUC_{inf} ratio と胎児全体における AUC_{inf} ratio が、それぞれ、1.92 と 2.46 と異なる値となった。本研究では、この差がどうして生じたのか検討した。検討に際して、我々は、胎児からの midazolam と 1'-hydroxymidazolam の消失過程に注目した。母体では、midazolam と 1'-hydroxymidazolam は、尿中に排泄される。この際の排泄率は、1'-hydroxymidazolam の方が高いことが報告されている³⁹⁾。母体と同様に、胎児において、midazolam と 1'-hydroxymidazolam が尿中に排泄されると、母体の場合とは異なり、midazolam と 1'-hydroxymidazolam は羊水中に移行する。薬物が羊水中に移行した場合、胎児が羊水を飲むことで再び胎児の体内に薬物が移行する。我々は、このような胎児と羊水の循環系が、上述の差が生じた主な理由ではないかと推察した。そこで、羊水中における midazolam 及び 1'-hydroxymidazolam の推移を解析した。

羊水中の midazolam 濃度は、投与 15 分後に最大となり、その後は急速に減少した。一方、羊水中の 1'-hydroxymidazolam 濃度は、投与 30 分後に最大となり、その後は、緩やかに減少した (Fig. 12)。この羊水中の 1'-hydroxymidazolam の推移には、胎児全体における 1'-hydroxymidazolam の推移に比べ、約 15 分間のタイムラグがあった。

Midazolam 及び 1'-hydroxymidazolam の薬物動態パラメータ (AUC 、 AUC_{inf} 、 AUC_{inf} ratio、 $t_{1/2}$) を Table 6 下段のカラムに示す。Midazolam に対する 1'-hydroxymidazolam の羊水における AUC_{inf} ratio は、2.65 であり、母体の血漿や胎児全体における両者の AUC_{inf} ratio よりも高かった。

以上の結果より、胎児において、1'-hydroxymidazolam は、羊水と胎児間を循環していることがわかった。加えて、この羊水と胎児間の循環は、midazolam に比べ 1'-hydroxymidazolam の方が多いことも明らかになった。

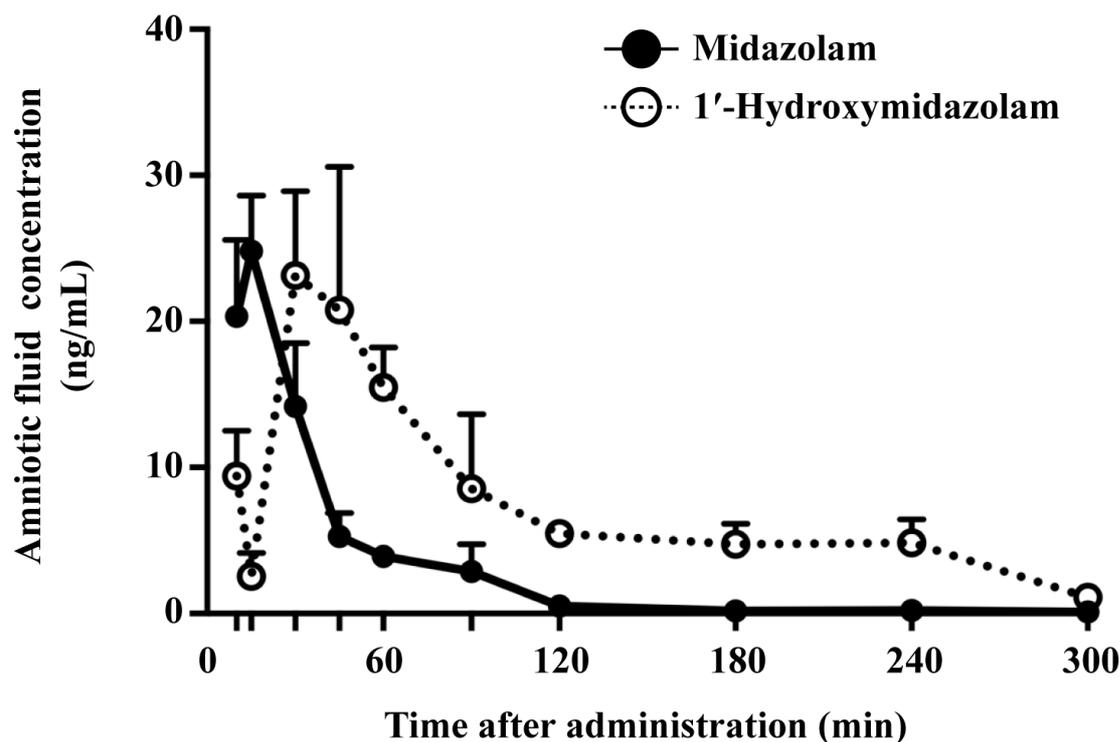


Fig. 12 母体の羊水中 midazolam 及び 1'-hydroxymidazolam の経時変化

Midazolam (2.0 mg/kg) を尾静脈から投与し、各時間 (10、15、30、60、90、120、180、240、及び 300 min) の羊水中の midazolam 及び 1'-hydroxymidazolam の濃度を LC-MS で測定した。分析結果は、中央値±標準偏差 (n = 5) で示した。

Table 6 母体と胎児の各組織における midazolam 及び 1'-hydroxymidazolam に関する薬物動態パラメータ

Sample	Compound	AUC ₀₋₃₀₀ (ng*min/mL or g Tissue)	AUC _{inf} (ng*min/mL or g Tissue)	AUC _{inf} ratio (1'-hydroxymidazolam / midazolam)	t _{1/2} (min)
Maternal Sample					
Plasma (n = 5)	Midazolam	15071	15100	1.92	64.5
	1'-Hydroxymidazolam	27637	28973		62.4
Fetal Sample					
Whole (n = 15)	Midazolam	7011	7033	2.46	40.0
	1'-Hydroxymidazolam	16697	17280		55.9
In Utero Sample					
Amniotic Fluid (n = 5)	Midazolam	846	865	2.65	21.1
	1'-Hydroxymidazolam	2171	2291		57.8

4. 考察

妊娠中の midazolam の使用は、子癇発作や帝王切開等の手術時の麻酔薬に限られている²⁻⁴⁾。また、妊娠中の midazolam の使用は、胎児への安全性が懸念されるために、積極的な使用は認められていない。さらに、胎児の薬物動態に関する研究は、血液-胎盤関門の透過性に焦点が置かれていることが多く、胎児自身の薬物動態は、ほとんど調べられていない。我々は、胎児における midazolam の薬物動態を明らかにすることで、妊娠中の midazolam の適正使用につながるものと考え、midazolam の作用部位である脳を中心に解析を行った。

本研究の結果、脳内における midazolam 及び 1'-hydroxymidazolam の存在比は、母体においても胎児においても、ほぼ 1:1 であり、両者に差がないことがわかった。この結果ならびに母体の血漿における midazolam 及び 1'-hydroxymidazolam の AUC_{inf} から考えると、midazolam の方が 1'-hydroxymidazolam に比べ、脳内に移行しやすいことが示唆された。一方、脳における midazolam と 1'-hydroxymidazolam の存在量は、胎児においては、ともに母体の約 1/2 であることがわかった。この結果は、midazolam と 1'-hydroxymidazolam の血液-胎盤関門の透過性の差に起因しているものと考えられる。ヒトを対象にした研究では、midazolam の透過性は、約 50~60%と報告されていることから、本推論は妥当であると考え^{40,41)}。

母体の血漿における midazolam に対する 1'-hydroxymidazolam の AUC_{inf} ratio は、1.92 であった。それに対して、胎児全体の midazolam に対する 1'-hydroxymidazolam の AUC_{inf} ratio は、2.46 であった。母体の肝臓においては、midazolam は、cytochrome P450 (CYP) 3A によって代謝され、1'-hydroxymidazolam を産生するが、胎児の肝臓では、midazolam を代謝する活性がほとんどないことを、我々は明らかにしている。また、多くの研究において、胎児の肝臓においては、midazolam の代謝活性の低いことが報告されている⁴²⁻⁴⁶⁾。そこで、母体の血漿に比べ胎児全体において 1'-hydroxymidazolam の存在比

が多いことについて、その理由を調べた。その結果、midazolam に比べ 1'-hydroxymidazolam の方が、胎児-羊水間の循環が多いことがわかり、これが 1'-hydroxymidazolam の存在比が多い理由であると考えられた。

以上の結果をまとめると、母体に投与した midazolam は、速やかに代謝され、1'-hydroxymidazolam に変換される。両者ともに、母体及び胎児の脳内へ、ほぼ 1:1 の割合で移行することが明らかになった。また、両者の脳内での存在量は、母体の脳に比べ、胎児の脳では約 1/2 という高値であることがわかった。神経の発達期である脳へ、母体の脳約 1/2 の midazolam 及び 1'-hydroxymidazolam が移行することは、神経の発生において何らかの影響を及ぼす可能性は否定できず、たとえ妊娠の second trimester 以降でも、妊婦の midazolam の使用には、十分注意が必要だと考える。

さらに、母体の血漿中の midazolam 及び 1'-hydroxymidazolam の AUC_{inf} に比べ、胎児の脳 AUC_{inf} は、それぞれ、83.3%及び 44.9%であることも明らかになった。この結果は、midazolam 及び 1'-hydroxymidazolam について、母体の血漿中の AUC_{inf} がわかれば、胎児の脳における AUC_{inf} が予測できる可能性を示唆している。この点に関しては、今後、検討すべき課題であると考えられる。

【総括】

妊娠中の医薬品の使用は、胎児への影響を考慮し、できる限り避けられている。しかしながら、慢性疾患を持つ女性や妊娠中にかんや痙攣発作の治療等、母体の生命を脅かす疾病と診断された場合、医薬品による治療が行われることがある。日本を含む世界各国では、やむを得ず妊婦に対して医薬品を使用する際には、独自のリスクカテゴリーをそれぞれに定めている。欧米では、妊婦に対するリスクカテゴリーは、医薬品の副作用よりも、医薬品を使用することで得られる主作用に主眼がおかれており、過去の臨床例や、患者の希望を考慮して、医師が医薬品を積極的に使用している。それに対して、日本における妊婦に対するリスクカテゴリーは、医薬品を使用することで得られる主作用よりも、動物実験で得られた医薬品を使用することによる副作用に主眼がおかれている。その結果として、日本においては、妊婦に対して投与禁忌となっている医薬品が欧米よりも多く、妊娠期に使用可能な医薬品の選択肢を狭めている¹⁾。このような中、日本において、有用な薬理作用を有しているにも関わらず、妊婦に対して投与禁忌となっている医薬品を活かすには、妊娠中の薬物治療を積極的に行うための安全性に関するエビデンスが必要となる。

一般に、薬物の効果と副作用は、薬物が体内のどこに集積しているのかを明らかにすることで、おおよそ推定することが可能である。Benzodiazepine 系の薬物 midazolam は、痙攣発作の治療や手術時の麻酔の導入・維持を目的に、second trimester（妊娠3ヶ月）以降の妊婦に対して限定的ではあるものの依然使用されている²⁻⁴⁾。しかしながら、胎児に移行した midazolam の薬物動態は、全く明らかになっておらず、現在のところ胎児に対する安全性の予測は困難な状況にある。特に、midazolam は、脳に作用する薬物であることより、胎児の神経発生への影響が危惧されるため、妊婦が midazolam を使用することに関する安全性を確立することが急務となっている。そこで本研究では、midazolam を妊娠中に使用した際の胎児における薬物動態を詳細に解

析することにより、midazolam の胎児への影響を明らかにすることを試みた。

1) 胎児の肝臓における薬物代謝酵素 cytochrome P450 3A (CYP3A) の発現量の解析 (第一章)

Midazolam を含む現行の医薬品の約半数は、CYP3A によって代謝される。Midazolam の胎児における薬物動態を明確にするためには、胎児における CYP3A の発現状態を明らかにする必要がある。そこで、まず、胎児期の肝臓における CYP3A の発現量の変化を調べた。

CYP3A には、アミノ酸配列の高い相同性を有した分子種が多く存在し、その発現量は、性別や年齢によってダイナミックに変化することが知られている。しかしながら、胎児期の肝臓において、どの CYP3A 分子が発現しているのかをタンパク質レベルで解析した研究は皆無であった。本研究では CYP3A11、CYP3A13、CYP3A16、CYP3A25、CYP3A41 及び CYP3A44 の標準タンパク質を作成するとともに、CYP3A 分子種に対する反応性の大きく異なる 2 種類の抗体を駆使し、マウスの CYP3A 分子種の発現量をタンパク質レベルで解析した。その結果、胎児期から新生児期の肝臓において優位に発現している CYP3A 分子種は、CYP3A16 であること及び出生直後から CYP3A11 が強発現することを明らかにした。

これまで、midazolam は CYP3A によって代謝されることはわかっていたものの、CYP3A のどの分子種によって代謝されるかについては、明確にされていなかった。そこで、胎児期に優位に発現している CYP3A16 並びに生後発現が急速に増加する CYP3A11 について、midazolam に対する代謝活性を *in vitro* の系で解析した。その結果、CYP3A16 は、midazolam をほとんど代謝できないこと並びに CYP3A11 は midazolam に対する代謝活性が非常に高い分子種であることが明らかになった。

以上の結果より、胎児期の肝臓においては、代謝活性の低い CYP3A16 が主要な CYP3A 分子種であり、薬物代謝活性は極めて未熟な状態にあり、その役割を母体の肝臓に依存している可能性が示唆された。

2) 胎児期から乳児期のマウスの肝臓における薬物代謝酵素 CYP3A の zonation の形成時期の解析 (第二章)

Midazolam を代謝する CYP3A を含む薬物代謝酵素の多くは、門脈領域から中心静脈領域にかけて不均質に分布し、zonation と呼ばれる特徴的な発現局在を形成している。CYP3A16 や CYP3A11 を含む種々の薬物代謝酵素は zonation を形成することによって、代謝に関連したエネルギー効率を向上させ、効率よく基質を代謝しているものと考えられている。したがって、胎児期の肝臓における CYP16 及び CYP3A11 の zonation の形成過程を明確にすることは、CYP3A の分子種の面ばかりではなく、代謝の効率の面からも midazolam の胎児への影響を推定する上で重要な知見となる。

胎児期 13.5 日目から生後 7 日目にわたるマウスを用いて zonation 形成過程を解析した結果、胎児期、生後 1 日目及び生後 3 日目においては、CYP3A の zonation は、認められなかった。一方、生後 7 日目には、中心静脈周囲の細胞において CYP3A の発現量が上昇し、特徴的な CYP3A の局在が観察された。これらの結果より、CYP3A の zonation は、生後 7 日目という離乳前の乳児期の肝臓において始めて形成されることが明らかになった。

経口摂取した食物や医薬品等に含まれる CYP3A の基質は、門脈から肝臓に入り、中心静脈から全身血に送られる。門脈付近の CYP3A の基質濃度と中心静脈付近の基質濃度は異なり、代謝の不均質性が必然的に現れる。そのため、効率良く代謝を行うために、CYP3A の zonation が存在しているのではないかと考えられている。胎児期、乳児期、離乳期の順に CYP3A の基質の種類も量も増加するものと考えられる。また、離乳期以降の劇的な環境の変化に対応するため、肝臓においても多様な酵素が発現する。このような成長過程の変化に符合して、CYP3A の代謝活性の効率化も必要になるのではなかろうか。マウスにおいては、離乳が生後約 3 週目より始まることより、その離乳にそなえて、代謝活性の低い CYP3A16 から代謝活性の高い CYP3A11 への発現変換と CYP3A11 の zonation の形成が始まるものと考えられる。

3) 胎児における midazolam の薬物動態の検討 (第三章)

第一章及び第二章において、second trimester 以降の胎児であっても、midazolam の代謝活性が低いことを明らかにした。そこで、本章では、second trimester の妊婦に midazolam を使用した際の胎児における薬物動態を解析する目的で、妊娠期のマウスを用いて、種々検討した。

Second trimester (妊娠 14.5 日) のマウスに、midazolam (2.0 mg/kg) を尾静脈より処置した。投与後、10-300 分目にマウスを解剖し、母体の脳及び血漿並びに胎児全体あるいは胎児の脳における midazolam 及びその代謝物 1'-hydroxymidazolam の移行量を LC-MS で定量分析した。さらに、定量結果をもとに薬物速度論解析を行い、両薬物の脳への移行性を母体と胎児で比較検討した。その結果、胎児の脳における midazolam あるいは 1'-hydroxymidazolam の時間-濃度曲線下面積 (AUC_{inf}) は、母体の脳における AUC_{inf} と比較すると、それぞれ 44.7% と 44.5% であり、両薬物ともに母体の脳の約 1/2 の量が胎児の脳に移行していることが明らかになった。Midazolam と 1'-hydroxymidazolam の血液-胎盤関門の透過性が、約 50~60% であるとの報告がある。したがって、本結果は、midazolam の血液-胎盤関門の透過性を反映したものと考えられる。

一方、midazolam 及び 1'-hydroxymidazolam の母体における血中から脳への移行性と、胎児における全身から脳への移行性を比較したところ、母体では血中に比べ脳のそれぞれの濃度が 1.86 倍及び 1.02 倍高かった。胎児においてもそれぞれ 1.79 倍と 0.75 倍となり、midazolam と 1'-hydroxymidazolam の末梢から脳への移行性は、母体と胎児で差がないことが示唆された。一般に、薬物が末梢血から脳に移行する場合、血液-脳関門を透過しなければならない。これまで、胎児の血液-脳関門は成体と比較して未熟であり、薬物の末梢から脳への移行性は成体と比較して胎児の方が高いという見解が一般的であった。しかしながら、近年、胎児の血液-脳関門は、脳の発生の早い時期から形成されており、その機能も十分に持っていることが明らかになってきている。本研究においても、母体と胎児で、midazolam の末梢から脳への移行性に差が見られなか

ったことは、胎児の血液-脳関門が母体とほぼ同等の機能を有していたためであると考察できる。

以上、本研究では、妊婦に midazolam を使用した際の胎児への影響を薬物動態学の観点から詳細に解析した。その結果、第一章及び第二章において、second trimester 以降の胎児の肝臓における CYP3A の代謝活性は、発現している CYP3A の分子種の面からも、zonation を形成していないという面からも、極めて脆弱であることが明らかになった。また、第三章において、second trimester に midazolam を使用した場合にも、母体の脳の約 1/2 の量の midazolam が、胎児の脳へと移行することが明らかになった。これまで、second trimester 以降の妊婦に対して、限定的ではあるが midazolam が使用されてきた。胎児の肝臓における midazolam の代謝活性は母体と比較して著しく低いことに鑑みると、母体の脳の 1/2 という量は、胎児に奇形や何らかの障害を引き起こす可能性のある蓄積量であると推測される。今後、second trimester 以降であっても妊婦の midazolam 使用については、十分注意する必要があると考える。最後に、本研究の成果は、母体の血中 midazolam 濃度のデータから胎児の脳に移行する midazolam の量を推測できる可能性を示唆している。今後、さらに詳細な解析を行うことによって、妊娠中の midazolam の投与設計に対して明確な科学的根拠を与えることができると期待される。

【謝 辞】

本研究に際し、終始懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました星薬科大学食品動態学研究室 杉山 清 教授に深く感謝致しますと共に、謹んで御礼申し上げます。

本研究にあたり、多分の御指導、御助言及び御協力を賜りました星薬科大学薬動学教室 落合 和 准教授に深く感謝致しますと共に、心より御礼申し上げます。

本研究にあたり、多分の御指導と御助言を賜りました同教室 五十嵐信智 講師に深く感謝致しますと共に、厚く御礼申し上げます。

本研究にあたり、多大なる御協力、御助言を戴きました星薬科大学薬動学教室 今 理紗子 氏、楠 欣己 氏、鳩貝 壤 氏、山本裕果 氏に感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、様々な所で御協力を戴きました薬動学教室の学部生の皆様に深く感謝致します。

本研究を行うにあたり、多数の動物たちがその生命を捧げてくれたことに対して、畏敬の念を表します。

【引用論文】

- 1) 濱田 洋: 【妊娠とくすり】 医薬品添付文書と FDA 分類、オーストラリア分類との比較. *産科と婦人科*, **74**, 293-300 (2007).
- 2) Esmaoglu A, Ulgey A, Akin A, Boyaci A: Comparison between dexmedetomidine and midazolam for sedation of eclampsia patients in the intensive care unit. *J Crit Care*, **24**, 551-555 (2009).
- 3) Dodawad R, G BS, Pandarpurkar S, Jajee P: Intrathecal Midazolam as an Adjuvant in Pregnancy-Induced Hypertensive Patients Undergoing an Elective Caesarean Section: A Clinical Comparative Study. *Anesth Pain Med*, **6**, e38550 (2016).
- 4) Danielak-Nowak M, Musiol E, Arct-Danielak D, Duda I, Ludwik K: A comparison of subhypnotic doses of propofol and midazolam during spinal anaesthesia for elective Caesarean section. *Anaesthesiol Intensive Ther*, **48**, 13-18 (2016).
- 5) Wikner BN, Stiller CO, Bergman U, Asker C, Kallen B: Use of benzodiazepines and benzodiazepine receptor agonists during pregnancy: neonatal outcome and congenital malformations. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, **16**, 1203-1210 (2007).
- 6) Handel J, Ziegler G, Gemeinhardt A, Stuber H, Fischer C, Klotz U: Lack of effect of nitrendipine on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of midazolam during steady state. *Br J Clin Pharmacol*, **25**, 243-250 (1988).
- 7) Klotz U, Arvela P, Rosenkranz B: Effect of single doses of cimetidine and ranitidine on the steady-state plasma levels of midazolam. *Clin Pharmacol Ther*, **38**, 652-655 (1985).
- 8) Eberts FS, Jr., Philopoulos Y, Reineke LM, Vliek RW: Triazolam disposition. *Clin Pharmacol Ther*, **29**, 81-93 (1981).
- 9) Kronbach T, Mathys D, Umeno M, Gonzalez FJ, Meyer UA: Oxidation of midazolam and triazolam by human liver cytochrome P450III A4. *Mol Pharmacol*, **36**, 89-96 (1989).
- 10) Thummel KE, Wilkinson GR: In vitro and in vivo drug interactions involving human CYP3A. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **38**, 389-430 (1998).
- 11) Hyland R, Osborne T, Payne A, Kempshall S, Logan YR, Ezzeddine K, Jones B: In vitro and in vivo glucuronidation of midazolam in humans. *Br J Clin Pharmacol*, **67**, 445-454 (2009).
- 12) Anakk S, Kalsotra A, Kikuta Y, Huang W, Zhang J, Staudinger JL, Moore DD, Strobel HW: CAR/PXR provide directives for Cyp3a41 gene regulation differently from Cyp3a11. *Pharmacogenomics J*, **4**, 91-101 (2004).
- 13) Nelson DR, Zeldin DC, Hoffman SM, Maltais LJ, Wain HM, Nebert DW: Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including

- nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics*, **14**, 1-18 (2004).
- 14) Sakuma T, Takai M, Endo Y, Kuroiwa M, Ohara A, Jarukamjorn K, Honma R, Nemoto N: A novel female-specific member of the CYP3A gene subfamily in the mouse liver. *Arch Biochem Biophys*, **377**, 153-162 (2000).
 - 15) Li Y, Cui Y, Hart SN, Klaassen CD, Zhong XB: Dynamic patterns of histone methylation are associated with ontogenic expression of the Cyp3a genes during mouse liver maturation. *Mol Pharmacol*, **75**, 1171-1179 (2009).
 - 16) Martignoni M, Groothuis G, de Kanter R: Comparison of mouse and rat cytochrome P450-mediated metabolism in liver and intestine. *Drug Metab Dispos*, **34**, 1047-1054 (2006).
 - 17) Komura H, Iwaki M: In vitro and in vivo small intestinal metabolism of CYP3A and UGT substrates in preclinical animals species and humans: species differences. *Drug Metab Rev*, **43**, 476-498 (2011).
 - 18) Hart SN, Cui Y, Klaassen CD, Zhong XB: Three patterns of cytochrome P450 gene expression during liver maturation in mice. *Drug Metab Dispos*, **37**, 116-121 (2009).
 - 19) Dai D, Bai R, Hodgson E, Rose RL: Cloning, sequencing, heterologous expression, and characterization of murine cytochrome P450 3a25*(Cyp3a25), a testosterone 6beta-hydroxylase. *J Biochem Mol Toxicol*, **15**, 90-99 (2001).
 - 20) Peng L, Yoo B, Gunewardena SS, Lu H, Klaassen CD, Zhong XB: RNA sequencing reveals dynamic changes of mRNA abundance of cytochromes P450 and their alternative transcripts during mouse liver development. *Drug Metab Dispos*, **40**, 1198-1209 (2012).
 - 21) Takenaka T, Kazuki K, Harada N, Kuze J, Chiba M, Iwao T, Matsunaga T, Abe S, Oshimura M, Kazuki Y: Development of Caco-2 cells co-expressing CYP3A4 and NADPH-cytochrome P450 reductase using a human artificial chromosome for the prediction of intestinal extraction ratio of CYP3A4 substrates. *Drug Metab Pharmacokinet*, **32**, 61-68 (2017).
 - 22) Mizushima S, Nagata S: pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucleic Acids Res*, **18**, 5322 (1990).
 - 23) Gluzman Y: SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell*, **23**, 175-182 (1981).
 - 24) Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, **150**, 76-85 (1985).
 - 25) Nakagome Y, Seki S, Fukutani K, Nagafuchi S, Nakahori Y, Tamura T: PCR detection of distal Yp sequences in an XX true hermaphrodite. *Am J Med Genet*, **41**, 112-114 (1991).
 - 26) Sugihara N, Ise H, Negishi N, Nikaido T, Akaike T: Drug metabolic activity of

- cultured hepatocytes can synchronize with bile acid concentration in the medium. *Cell Biochem Funct*, **20**, 11-17 (2002).
- 27) Takiguchi T, Tomita M, Matsunaga N, Nakagawa H, Koyanagi S, Ohdo S: Molecular basis for rhythmic expression of CYP3A4 in serum-shocked HepG2 cells. *Pharmacogenet Genomics*, **17**, 1047-1056 (2007).
 - 28) Betts S, Bjorkhem-Bergman L, Rane A, Ekstrom L: Expression of CYP3A4 and CYP3A7 in Human Foetal Tissues and its Correlation with Nuclear Receptors. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, **117**, 261-266 (2015).
 - 29) Vyhlidal CA, Pearce RE, Gaedigk R, Calamia JC, Shuster DL, Thummel KE, Leeder JS: Variability in Expression of CYP3A5 in Human Fetal Liver. *Drug Metab Dispos*, **43**, 1286-1293 (2015).
 - 30) Ring JA, Ghabrial H, Ching MS, Smallwood RA, Morgan DJ: Fetal hepatic drug elimination. *Pharmacol Ther*, **84**, 429-445 (1999).
 - 31) Braeuning A, Schwarz M: Zonation of heme synthesis enzymes in mouse liver and their regulation by beta-catenin and Ha-ras. *Biol Chem*, **391**, 1305-1313 (2010).
 - 32) Gebhardt R, Matz-Soja M: Liver zonation: Novel aspects of its regulation and its impact on homeostasis. *World J Gastroenterol*, **20**, 8491-8504 (2014).
 - 33) Man K, Kutuyavin VI, Chawla A: Tissue Immunometabolism: Development, Physiology, and Pathobiology. *Cell Metab*, **25**, 11-26 (2017).
 - 34) Zaphiropoulos PG: A map of the mouse Cyp3a locus. *DNA Seq*, **14**, 155-162 (2003).
 - 35) Cui JY, Renaud HJ, Klaassen CD: Ontogeny of novel cytochrome P450 gene isoforms during postnatal liver maturation in mice. *Drug Metab Dispos*, **40**, 1226-1237 (2012).
 - 36) Mutoh T, Sanosaka T, Ito K, Nakashima K: Oxygen levels epigenetically regulate fate switching of neural precursor cells via hypoxia-inducible factor 1alpha-notch signal interaction in the developing brain. *Stem Cells*, **30**, 561-569 (2012).
 - 37) Matsuyama T, Tanaka T, Tatsumi K, Daijo H, Kai S, Harada H, Fukuda K: Midazolam inhibits the hypoxia-induced up-regulation of erythropoietin in the central nervous system. *Eur J Pharmacol*, **761**, 189-198 (2015).
 - 38) Hisaka A, Sugiyama Y: Analysis of nonlinear and nonsteady state hepatic extraction with the dispersion model using the finite difference method. *J Pharmacokinet Biopharm*, **26**, 495-519 (1998).
 - 39) Heizmann P, Eckert M, Ziegler WH: Pharmacokinetics and bioavailability of midazolam in man. *Br J Clin Pharmacol*, **16 Suppl 1**, 43S-49S (1983).
 - 40) Kanto J, Sjoval S, Erkkola R, Himberg JJ, Kangas L: Placental transfer and maternal midazolam kinetics. *Clin Pharmacol Ther*, **33**, 786-791 (1983).
 - 41) Bach V, Carl P, Ravlo O, Crawford ME, Jensen AG, Mikkelsen BO, Crevoisier C, Heizmann P, Fattinger K: A randomized comparison between midazolam and thiopental for elective cesarean section anesthesia: III. Placental transfer and elimination in neonates. *Anesth Analg*, **68**, 238-242 (1989).

- 42) Gandhi AS, Guo T, Shah P, Moorthy B, Chow DS, Hu M, Ghose R: CYP3A-dependent drug metabolism is reduced in bacterial inflammation in mice. *Br J Pharmacol*, **166**, 2176-2187 (2012).
- 43) Johnson TN, Rostami-Hodjegan A, Goddard JM, Tanner MS, Tucker GT: Contribution of midazolam and its 1-hydroxy metabolite to preoperative sedation in children: a pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis. *Br J Anaesth*, **89**, 428-437 (2002).
- 44) Reves JG, Fragen RJ, Vinik HR, Greenblatt DJ: Midazolam: pharmacology and uses. *Anesthesiology*, **62**, 310-324 (1985).
- 45) Shi R, Wu J, Meng C, Ma B, Wang T, Li Y, Ma Y: Cyp3a11-mediated testosterone-6beta-hydroxylation decreased, while UGT1a9-mediated propofol O-glucuronidation increased, in mice with diabetes mellitus. *Biopharm Drug Dispos*, **37**, 433-443 (2016).
- 46) Williams JA, Ring BJ, Cantrell VE, Jones DR, Eckstein J, Ruterbories K, Hamman MA, Hall SD, Wrighton SA: Comparative metabolic capabilities of CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A7. *Drug Metab Dispos*, **30**, 883-891 (2002).