薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
108 (10) 921-937 (1988)

小腸及び腎尿細管上皮細胞膜における薬物輸送機構に関する研究

乾 賢一

京都大学医学部附属病院薬剤部, 〒606 京都市左京区聖護院川原町 54

Transport Mechanisms of Drugs in Intestinal and Renal Epithelial Cell Membranes

KEN-ICHI INUI

Department of Pharmacy, Kyoto University Hospital, Faculty of Medicine, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto, 606, Japan

The isolated plasma membrane vesicles have been widely used as an *in vitro* model system for studying the transcellular transport of nutrients and electrolytes in the renal tubule and intestine, and the findings have generated a great deal of information about the mechanisms of the absorptive and the secretory processes. Active secretion of organic anions and cations in the proximal tubule is viewed as a means of eliminating many exogenous drugs and their metabolites from the body. The tubular secretion involves transport across contraluminal basolateral membranes, and accumulation in the epithelial cells, followed by efflux from the cells across luminal brush border membranes into the tubular fluid. The transport of *p*-aminohippurate (PAH), a prototype anion, and tetraethylammonium (TEA), a prototype cation, has been characterized using brush border and basolateral membrane vesicles. Data suggest that PAH is transported by a carrier-mediated system (anion exchange mechanism) in basolateral membranes and by a channel-like system in brush border membranes. In contrast, TEA is transported across basolateral membranes *via* carrier-mediated system, and this process is stimulated by an inside-negative membrane potential. TEA transport across brush border membranes is driven by an H^+ gradient *via* electroneutral H^+ /TEA antiport system. Furthermore, it has been demonstrated that aminoccephalosporins such as cephadrine and cephalixin, possessing an α -amino group and a carboxyl group, can be transported *via* a common carrier system with dipeptides in the intestinal and renal brush border membranes and that their transport is driven by an inward H^+ gradient. Thus, the vesicle studies provide new insights into our understanding of intestinal and renal tubular transport mechanisms of drugs.

Keywords—carrier-mediated transport; *p*-aminohippurate; tetraethylammonium; cephalosporin antibiotics; dipeptide; epithelial cell; cultured renal cell; brush border and basolateral membrane; intestinal absorption; tubular secretion

1. はじめに

医薬品の生体内動態の解明は、薬物療法の有効性・安全性達成のために現在その重要性が広く認識されている。薬物の吸収・分布・排泄などの生体内移行過程は、種々の形態及び機能を有する細胞膜を介した膜輸送現象が集積されたものである。¹⁾ 一般に薬物は、単純拡散によって生体膜を透過し、その速度は薬物のイオン化の程度と薬物分子の脂溶性によって決まることが多い (pH 分配仮説)。しかし腎臓や肝臓など薬物処理組織では、アニオン性及びカチオン性薬物がそれぞれ特殊な輸送系 (キャリアー) を介して能動輸送されることも知られている。特に小腸や腎尿細管のように物質輸送を主な生理機能としている上皮細胞では、特定物質の吸収・分泌という二方向性の経細胞性輸送 (transcellular transport) を営み、生体の恒常性維持に重要な役割を果している。上

本総説は、昭和63年度日本薬学会奨励賞の受賞業績を中心にして記述したものである。

皮細胞におけるグルコースやアミノ酸など栄養物質の能動輸送については、近年急速に解明が進み、 Na^+ の電気化学的ポテンシャルを駆動力とするエネルギー共役機構が明確にされ、またキャリアーの構造解析も進展している。従来、薬物の吸収・分泌に関する研究は、個体や組織レベルでの各種実験法を用いて行われたが、更に細胞膜レベルからのアプローチが次の進歩をもたらす鍵として望まれてきた。数年前より筆者らは、小腸及び腎尿細管における薬物動態の機構解明を目的として、細胞膜小胞系、培養細胞系等の新しい実験法を導入して薬物の膜輸送研究に取り組んできた。本総説はこれまでの成果をまとめたものである。

2. 腎尿細管上皮細胞における薬物輸送

2-1. 尿細管の構造と機能 腎臓は、細胞外液の電解質組成、pH、浸透圧、細胞外液量などの調節に重要な役割を果たしている。その生理的機能の産物である尿は、不要な物質を含む排泄液であり、投与された医薬品の多くも尿中に排泄される。腎臓はネフロンと呼ばれる構造・機能上の単位と血管系から構成され、ネフロンは糸球体 (glomerulus) とそれに続く尿細管 (tubule) から成り、集合管 (collecting duct) に接合している。ヒトの左右の腎臓にはそれぞれ約 100 万個のネフロンが存在するといわれている。尿細管は更に部位によって近位尿細管 (proximal tubule)、ヘンレ係蹄 (Henle's loop)、遠位尿細管 (distal tubule) に大別され、形態や機能も異なっている。特に近位尿細管ではグルコース、アミノ酸、リンなど栄養物質の再吸収並びに医薬品等の異物の分泌が営まれている。有機アニオンやカチオンは、それぞれ別々の輸送系を介して尿中に能動分泌されるが、これらの機構については *in vivo* クリアランス法、*in vitro* 腎皮質切片への取り込み実験法、摘出腎灌流法、単離尿細管灌流法などによって研究が進められてきた。^{2,3)} しかし尿細管上皮細胞は、形態的・機能的に非対称性 (極性) を示し、管腔側とそれ以外の側底部分とでは細胞の表面構造に差がみられると共に、両方の細胞膜の性質、特に物質輸送機構や局在酵素活性が異なっている (Fig. 1)。細胞は互いに隣接する細胞と特殊な密着結合 (tight junction) で接合しており、細胞膜はその部分で刷子縁膜 (brush border membrane, BBM) と側底膜 (basolateral membrane, BLM) に区分される。したがって、細胞層を通して物質が輸送 (吸収・分泌) される経細胞性輸送を解析する場合、両側の細胞膜を分離調製し、各々の膜輸送特性を明らかにする必要がある。

近年、膜輸送の解析手段として膜小胞 (membrane vesicle) を用いる実験法が開発され、微生物細胞、動物細胞における物質輸送研究に大きく貢献してきた。尿細管上皮細胞を介する輸送に関しても、刷子縁膜のみを小胞として取り出すことが可能になって以来、グルコースやアミノ酸の再吸収機序の解明が飛躍的に進展している。⁴⁻⁶⁾ 刷子縁膜は、分別沈澱法 (Ca 沈澱法) によって極めて効率よく調製される。⁷⁾ この方法の原理は、ミトコンドリア、リソゾーム、小胞体及び側底膜が Ca^{2+} 、 Mg^{2+} などの 2 価カチオン (5-10 mM) と複合体を形成して凝集・沈澱するが、刷子縁膜は上清に残るという事実に基づいている。すなわち、刷子縁膜では表面の負電荷密度が高いために 2 価カチオンの電荷を補償することができるが、側底膜や他の細胞内器官では負電荷が少なく、2 価カチオンによって cross-link し沈澱するものと考えられる。一方、側底膜の単離精製は刷子縁膜と比重が似ているため従来から困難とされ、無担体電気泳動法 (free-flow electrophoresis) が最も適した方法とされていた。

Fig. 1. Diagram of Nephron and Tubular Epithelium

しかしこの方法は高価な装置を必要とするだけでなく、条件設定や収量の点にも問題がある。そこで筆者らは Percoll 自己形成密度勾配遠心法を用い、迅速かつ簡便な側底膜調製法の確立を試みた。⁸⁾ その結果、ラット腎皮質のホモジネートを順次遠心分画して得られた粗膜画分を 10% Percoll 密度勾配遠心にかけることによって、側底膜と刷子縁膜を分離することができた。Percoll 密度勾配遠心後の側底膜指標酵素 ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase と、刷子縁膜指標酵素 aminopeptidase の分布パターンを Fig. 2 に示す。両酵素は比較的良好な分離を示しており、刷子縁膜の混入が最少となるように側底膜画分を分取した。次に得られた側底膜画分及び Ca 沈澱法によって調製した刷子縁膜画分における各指標酵素の比活性を、ホモジネートの比活性に対する比で表示し、膜の精製度を検討した。側底膜画分では ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase の比活性がホモジネートに対して 20 倍以上増加しており、一方、刷子縁膜画分では alkaline phosphatase, aminopeptidase の比活性が約 10 倍増加していた。^{8,9)} また他の指標酵素活性はいずれも小さく、得られた側底膜及び刷子縁膜画分は十分精製されているものと考えられた。Percoll 密度勾配遠心法による腎尿細管及び小腸上皮細胞の側底膜単離は、その後多数報告されており、現在では側底膜の一般的調製法となっている。

2-2. 腎尿細管刷子縁膜と側底膜におけるグルコース輸送 上皮細胞内外の Na^+ , K^+ 濃度は、側底膜に局在する ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase によって制御されており、 Na^+ は内向きの、 K^+ は外向きの濃度勾配を生ずる。細胞内外で形成されるこのイオン勾配が、細胞膜を介する物質輸送の駆動力になり得ることが広く知られている。1960 年 Crane は、¹⁰⁾ 小腸吸収細胞での Na^+ と共役したグルコース能動輸送仮説 (sodium-gradient hypothesis) を提出したが、膜レベルでグルコースと Na^+ の共輸送を実証したのは Hopfer ら¹¹⁾ による小腸刷子縁膜小胞を

Fig. 2. Distribution of Marker Enzymes for Basolateral and Brush Border Membranes on Percoll Gradient⁸⁾

The crude plasma membranes, suspended in 0.25 M sucrose/1 mM EDTA/10 mM Tris-HCl (pH 7.5)/10% (v/v) Percoll, were centrifuged in a Hitachi RP50T rotor at $48000 \times g$ for 30 min. The Percoll gradient was collected from the top into 30 fractions of 1 ml.

Fig. 3. Time Course of D- and L-Glucose Uptake by Brush Border (A) and Basolateral Membrane Vesicles (B) from Rat Kidney Cortex⁸⁾

Membrane vesicles were preincubated at 25°C in 100 mM mannitol and 20 mM Tris-Hepes, pH 7.5 (buffer A) for 10 min. The vesicles (20 μl , A, 61 μg protein; B, 45 μg protein) were incubated with substrate medium (20 μl) of buffer A containing either D-[^3H]glucose (50 mCi/mmol, $\bullet$, $\circ$) or L-[^3H]glucose ($\blacktriangle$), and with NaCl ($\bullet$, $\blacktriangle$) or KCl ($\circ$) (final concentration; 1 mM glucose; 100 mM NaCl; 100 mM KCl). Each point represents the mean value of three experiments.

用いた研究が最初である。それ以後、近位尿細管や小腸の上皮細胞には、アミノ酸、水溶性ビタミン、リンなど Na^+ と連結した種々の輸送系が存在することが報告されている。^{4,5)}

Figure 3 は膜小胞を用いて尿細管上皮細胞のグルコース輸送特性について解析した結果である。⁸⁾ 刷子縁膜小胞に $[^3\text{H}]$ D-グルコースと 100 mM NaCl を同時に加えて Na^+ 勾配 ($[\text{Na}^+]_{\text{外}} > [\text{Na}^+]_{\text{内}}$) を人工的に与えた場合、一時的な D-グルコースの uphill 輸送、いわゆる overshoot 現象が認められた。刷子縁膜小胞系では Na^+ 勾配を維持できないため D-グルコースの取り込みは Fig. 3 のような経時変化を示し、平衡値は K^+ 勾配存在の場合と一致する。一方、側底膜では促進拡散 (受動輸送) によって D-グルコースが輸送されるため overshoot 現象は認められない。刷子縁膜の Na^+ 依存性 D-グルコース輸送は小胞内の電位が相対的に負であるほど取り込み速度が増大することから、electrogenic な $\text{Na}^+/\text{D-グルコース}$ 共輸送であることが分かる。また刷子縁膜の Na^+ 依存性 D-グルコース輸送はフロリジンによって阻害され、側底膜の D-グルコース輸送はフロレチンやサイトカラシン B によって特異的に阻害される。¹²⁾ Na^+ 非依存性及び阻害剤に対する特異性等の結果から明らかなように、側底膜における D-グルコースの輸送特性は、線維芽細胞や赤血球の場合と類似している。^{13,14)} 更に赤血球のグルコースキャリアーに対するウサギ抗体を用いてイムノブロッティングを行ったところ、側底膜では 48K の交叉物質が検出できたが、刷子縁膜では抗体と交叉する物質は検出できなかった。¹²⁾ このように側底膜における D-グルコース輸送系は、線維芽細胞や赤血球のグルコースキャリアーとほぼ同一であると結論される。

2-3. 尿細管刷子縁膜と側底膜におけるアニオン性薬物輸送 近位尿細管における薬物の分泌は、側底膜を介する血管側から細胞内への取り込みと、刷子縁膜を介する細胞内から管腔への放出という二段階の膜輸送によって進行する。1976 年 Berner ら¹⁵⁾ は、ラット腎皮質から無担体電気泳動法によって調製した膜小胞を用いて、代表的アニオン *p*-aminohippurate (PAH) 輸送を検討した。その結果、刷子縁膜では単純拡散であるのに対して、側底膜では probenecid によって拮抗阻害されるキャリアー輸送系が関与することを示し、尿細管の有機イオン分泌研究における膜小胞系の有用性を最初に報告した。

筆者らは、ラット腎皮質から前述の方法によって調製した刷子縁膜、側底膜小胞を用いて PAH 輸送を検討した。^{9,16-18)} 刷子縁膜及び側底膜小胞に非標識 PAH を負荷した後、 $[^3\text{H}]$ PAH の取り込みを測定したところ、側底膜では $[^3\text{H}]$ PAH の取り込み初速度が顕著に増加したが、刷子縁膜では変化しなかった (Fig. 4).¹⁶⁾ この促進効果

Fig. 4. Countertransport Effects on *p*-Aminohippurate Uptake by Brush Border (BBM) and Basolateral Membrane (BLM) Vesicles¹⁶⁾

Membrane vesicles were preincubated in 100 mM mannitol/20 mM Hepes-Tris (pH 7.5), with (●) or without (○) 0.5 mM unlabeled *p*-aminohippurate for 30 min, and then the aliquots (20 μ l) were incubated with the substrate mixture (200 μ l) comprising 100 mM mannitol/20 mM Hepes-Tris (pH 7.5)/0.05 mM *p*-amino $[^3\text{H}]$ -hippurate/100 mM NaCl during the indicated periods. Each point represents mean $\pm$ S.E. of two experiments performed in duplicate determinations.

はキャリアを介する輸送に特徴的にみられる現象で、countertransport 効果 (trans-stimulation 効果) と呼ばれる。これらの結果は、PAH 輸送が側底膜でのみ濃度依存性を示すことや、PAH 輸送の Arrhenius plot が刷子縁膜ではほぼ直線であるが、側底膜では約 25°C で折れ曲がることと符合する。したがって PAH は側底膜においてキャリア輸送されると結論できる。一方、刷子縁膜での PAH 輸送は countertransport 効果を認めなかったものの、アニオン輸送阻害剤である probenecid, 4,4'-diisothiocyano-2,2'-disulfonic stilbene (DIDS) によって阻害されたことから、単純拡散のみでは説明できない。そこで PAH 輸送に関与する因子として、膜電位について調べたところ、側底膜に比べ刷子縁膜においてより強く膜電位の影響が認められ、刷子縁膜小胞の内部が相対的に正の膜電位 (細胞内負) が輸送の駆動力として働くものと考えられる (Fig. 13)。

側底膜における PAH 輸送系の駆動力や調節因子に関する研究は、現在多数のグループによって精力的に進められている。Kasher ら¹⁹⁾は Na^+ 勾配に依存した PAH/アニオン交換輸送系が関与すること、Shimada ら²⁰⁾はジカルボン酸が内因性アニオンとして PAH 輸送に関与することを指摘している。筆者らは、無機アニオンとして Cl^- (100 mM, 小胞内外平衡) が存在する場合に、側底膜における PAH 交換輸送能が増大するという知見を得ている。¹⁸⁾ 細胞外液中の Cl^- 濃度は 110 mM 程度であり、PAH の血管側から細胞内への移行に際し、生理的濃度の Cl^- が調節因子として関与している可能性が推察される。

2-4. 尿管細管刷子縁膜と側底膜におけるカチオン性薬物輸送 カチオン性薬物は一般に強い薬理作用を有するため、個体や組織レベルでの輸送実験を行うことが困難な場合が多い。しかし最近、膜小胞系の導入によって有機カチオン輸送の駆動力が明らかになるなど、カチオンの能動分泌機構はアニオンよりも一層明確にされつつある。筆者らは代表的カチオンとして tetraethylammonium (TEA) を用い、詳細に検討を加えた。^{17,21-23)}

刷子縁膜及び側底膜小胞による TEA 輸送は、いずれも濃度依存性、countertransport 効果が認められ、Arrhenius plot も不連続であることから、両細胞膜においてキャリア輸送系が関与していると考えられた。動物細胞膜における物質輸送は、前述のように Na^+ の電気化学的ポテンシャルによって駆動される例が数多く知られている。そこで NaCl, KCl を用いて小胞内外のイオン組成を変化させ、TEA の取り込みに及ぼす影響について検討した (Fig. 5).²¹⁾ 側底膜における TEA の取り込みはほとんど影響を受けなかったが、刷子縁膜では小胞内 NaCl, 外 KCl 勾配が存在する場合に、TEA の取り込みは有意に増加した。この現象は主として小胞内 Na^+ に

Fig. 5. Effect of Various Ionic Conditions on Tetraethylammonium Uptake by Brush Border (BBM) and Basolateral Membrane (BLM) Vesicles²¹⁾

Membrane vesicles (20 μl), suspended in 100 mM mannitol, 20 mM Hepes-Tris (pH 7.5) and either 100 mM KCl ($\circ$, $\blacktriangle$) or 100 mM NaCl ($\bullet$, $\triangle$), were incubated with the substrate mixture (80 μl) comprising 100 mM mannitol, 20 mM Hepes-Tris (pH 7.5), 0.125 mM [^3H]tetraethylammonium and either 100 mM KCl ($\circ$, $\bullet$) or 100 mM NaCl ($\triangle$, $\blacktriangle$). Each point represents the mean $\pm$ S.E. of 1–2 experiments performed in duplicate determinations.

Fig. 6. Effect of H^+ Gradient on Tetraethylammonium Uptake by Brush Border (BBM) and Basolateral Membrane (BLM) Vesicles²¹⁾

Membrane vesicles (20 μ l), suspended in 100 mM mannitol, 100 mM KCl and either 10 mM Hepes (pH 7.5) ($\circ$, $\blacktriangle$) or 10 mM Mes (pH 6.0) ($\bullet$, $\triangle$), were incubated with the substrate mixture (80 μ l) comprising 100 mM mannitol, 100 mM KCl, 0.125 mM [3H]tetraethylammonium and either 10 mM Hepes (pH 7.5) ($\circ$, $\bullet$) or 10 mM Mes (pH 6.0) ($\triangle$, $\blacktriangle$). Each point represents the mean $\pm$ S.E. of two or three experiments performed in two or three determinations for BBM, and of three determinations from a typical experiment for BLM.

よること、また Li^+ も Na^+ と同様の効果を持つことが明らかになった。²²⁾ 刷子縁膜には Na^+/H^+ 対向輸送系が局在し、 Li^+ もこの輸送系の基質になり得ることから、TEA 輸送の促進効果は Na^+ 自体によるものではなく、 Na^+/H^+ 対向輸送系によって形成された H^+ 勾配に起因することが示唆された。すなわち Na^+ を負荷した刷子縁膜小胞では、小胞内に H^+ が移行し、 H^+ 勾配 (小胞内酸性) が形成されていることが、アクリジンオレンジの蛍光消光法によって確認された。更に刷子縁膜小胞による TEA の取り込みは、小胞内 pH 6.0, 外 pH 7.5 の条件下で、外向きの H^+ 勾配を与えた場合に顕著に促進され、overshoot 現象が認められた (Fig. 6).²¹⁾ プロトノフォアである carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) の存在下では、 H^+ 勾配による取り込み促進効果は完全に消失した。²²⁾ したがって刷子縁膜における TEA 輸送は、基質と逆方向の H^+ 勾配によって能動的に駆動されると結論できる。一方、側底膜においては、 H^+ 勾配による TEA 取り込みの促進効果や overshoot 現象は認められなかった。また刷子縁膜小胞からの [3H]TEA の efflux は、小胞内 pH 7.5, 外 pH 6.0 の条件下で内向きの H^+ 勾配を与えた場合に促進された (Fig. 7). 刷子縁膜の orientation は right side out であ

Fig. 7. Effect of H^+ Gradient on Tetraethylammonium Efflux out of Brush Border Membrane Vesicles

Membrane vesicles were preincubated for 40 min at 25°C in a buffer comprising 100 mM mannitol, 10 mM Hepes (pH 7.5), 100 mM KCl and 0.25 mM [3H]tetraethylammonium. Then the aliquots (20 μ l) were incubated at 25°C with buffer (180 μ l) comprising 100 mM mannitol, 100 mM KCl and either 10 mM Mes (pH 6.0, $\bullet$) or 10 mM Hepes (pH 7.5, $\circ$). At the stated times, the incubation was stopped by diluting a reaction mixture with 1 ml of ice-cold stop solution, comprising 150 mM LiCl, 20 mM Hepes/Tris (pH 7.5) and 0.1 mM $HgCl_2$.

ることから、小胞内を細胞内、小胞外を管腔と見なすことができ、生理的条件下においても TEA の分泌は管腔側酸性の H^+ 勾配によって駆動されていると考えられる。更に刷子縁膜での TEA 輸送は膜電位の影響を受けなかったことから、 H^+ 勾配による TEA の能動輸送は electroneutral な H^+/TEA 対向輸送系であることが分かった。一方、側底膜における TEA の取り込みは膜電位依存性であり、内側負の膜電位が駆動力になっていることが示された。²¹⁾

以上の結果より、尿細管上皮細胞における TEA 輸送は次のように結論できる (Fig. 13). 血管側の TEA は側底膜に存在するキャリアーを介して細胞内へ輸送され、この過程は細胞内負の膜電位によって駆動される。更に細胞内の TEA は、刷子縁膜において electroneutral な H^+/TEA 対向輸送系によって輸送され、 Na^+/H^+ 対向輸送系や H^+ ポンプを介して形成された管腔側酸性の H^+ 勾配によって能動的に管腔内へ分泌される。生理的条件下において、近位尿細管の管腔側は細胞内に比べより酸性であることが知られており、この酸性 pH が有機カチオンの能動分泌に対して重要な役割を果しているものと考えられる。

他のカチオン性薬物として cimetidine について検討したところ、両細胞膜において有機カチオン輸送系を介して輸送されることが明らかになり、またキャリアーに対する親和性は TEA よりも強いことが分かった。²⁴⁾ なお Ross のグループは、²⁵⁻²⁸⁾ イヌの腎皮質細胞膜を用いて N^1 -methylnicotinamide 輸送を検討し、筆者らのラット腎皮質細胞膜における TEA 輸送と類似した結論に達している。

次に刷子縁膜に局在する H^+ /有機カチオン対向輸送系の分子特性について解析を進めた。この輸送系は、有機アニオンや D-グルコース輸送系に比べ pH 感受性が極めて高いことが示唆された。すなわち H^+ 勾配非存在下での TEA 取り込みに及ぼす pH の影響について検討したところ、30 分間の TEA 取り込み (平衡値) には差が認められなかったが、TEA の初期取り込みは pH 7 付近で最大となった (Fig. 8).²⁹⁾ pH による輸送活性変化は可逆的であり、酸性領域では K_m が上昇し、アルカリ性領域では V_{max} が低下することが明らかになった (Table I).²⁹⁾ したがって刷子縁膜における H^+ /有機カチオン対向輸送系の活性調節には、駆動力である H^+ 勾配のみならず、膜内外の pH が密接に関連しており、中性 pH 領域が至適であると考えられる。

Fig. 8. pH Dependence of Tetraethylammonium Uptake by Brush Border Membrane Vesicles (Without H^+ Gradient)²⁹⁾

Membrane vesicles (20 μ l), suspended in 100 mM mannitol, 10 mM Mes (pH 5.0–6.0) or Hepes (pH 6.5–8.5) and 100 mM KCl, were incubated at 25°C for 30 s (A) or 30 min (B) with the substrate mixture (20 μ l), consisting of 100 mM mannitol, 10 mM Mes (pH 5.0–6.0) or Hepes (pH 6.5–8.5), 100 mM KCl and 2 mM [14 C]-tetraethylammonium. Intravesicular and extravesicular pHs were the same. Each point represents the mean $\pm$ S.E. of four determinations.

TABLE I. Kinetic Parameters of Tetraethylammonium Uptake by Brush Border Membrane Vesicles in the Absence of H^+ Gradient²⁹⁾

pH	K_m (mM)	V_{max} (nmol/mg protein/ min)	K_d (nmol/mg protein/ min/mM)
6.0	$3.6 \pm 0.9^a)$	8.3 ± 1.9	0.5 ± 0.1
6.5	2.7 ± 0.6	13.8 ± 1.4	0.7 ± 0.1
7.0	1.0 ± 0.1	10.7 ± 0.8	0.5 ± 0.1
7.5	1.0 ± 0.3	$5.7 \pm 0.6^a)$	0.5 ± 0.1
8.0	0.6 ± 0.1	$2.1 \pm 0.2^a)$	0.7 ± 0.1

Each value represents the mean $\pm$ S.E. of three (pH 6.5) or four (pHs 6.0, 7.0, 7.5 and 8.0) separate experiments.

a) $p < 0.05$, significant difference from pH 7.0 using Dunnett's t test.

更に種々の膜蛋白修飾試薬を用いて H^+ /有機カチオン対向輸送系の特性を調べた。^{28,30)} SH 阻害剤の影響を検討したところ、TEA 輸送系は PAH やグルコース輸送系に比べて SH 阻害剤に対する感受性が極めて高く、輸送キャリアー分子中の SH 基の重要性が示唆された。また、*p*-chloromercuribenzenesulfonate (PCMBS) で前処理した刷子縁膜小胞を dithiothreitol, glutathione, cysteine で処理することによって、TEA 輸送に対する阻害効果はほぼ完全に消失した (Fig. 9).²⁸⁾

尿細管上皮細胞では glutathione が合成され管腔内に分泌されることから、生理的条件下では glutathione やその構成アミノ酸 cysteine が、有機カチオン輸送キャリアーの SH 基保護に関与しているものと推察される。

次にヒスチジン残基修飾試薬である diethylpyrocarbonate によって刷子縁膜を処理した場合、PAH 輸送には影響が認められなかったが、TEA 輸送は著しく阻害された。³⁰⁾ また、ヒスチジン残基は有機カチオンの結合部位としてよりも、 H^+ /有機カチオン対向輸送系の調節部位として関与していることを示唆する知見を得ている。その他、刷子縁膜の有機カチオンキャリアーの官能基としてチロシン残基³¹⁾やカルボキシル基³²⁾が関与しているという報告もある。現在、TEA, *N*¹-methylnicotinamide, cimetidine, procainamide 等を用いて、刷子縁膜における H^+ /有機カチオン対向輸送系の解析が種々のグループによって進められており、多数の報告がなされている。³³⁻³⁹⁾

2-5. 尿細管刷子縁膜におけるアミノ- β -ラクタム抗生物質 (両性イオン) 輸送 β -ラクタム抗生物質 (Fig. 10) は、主として腎臓に移行し排泄される。これら薬物の腎動態解析は従来 *in vivo* クリアランス実験⁴⁰⁾や、*in vitro* 腎皮質切片への取り込み実験⁴¹⁾によって進められ、糸球体濾過並びに尿細管アニオン輸送系によって能動分泌されることが明らかにされてきた。しかし膜小胞による輸送実験から、筆者らは cephalexin などのアミノ基とカルボキシル基を有する両性イオン型薬物 (経口用) は、刷子縁膜においてアニオン輸送系だけでなく、有機カチオン輸送系とジペプチド輸送系をも介して輸送されることを見出した。⁴²⁻⁴⁴⁾

Cephalexin, cephradine などアミノ- β -ラクタム抗生物質の刷子縁膜小胞による取り込みは、probenecid や PAH 共存によって阻害されアニオン輸送系の関与が示唆されたが、飽和現象や countertransport 効果も見られるなど、PAH 輸送の場合とは異なりキャリアー輸送系の関与が示された。⁴²⁾ また刷子縁膜小胞による cephalexin の取り込みは、有機カチオン類によって阻害され、逆に TEA の取り込みは cephalexin によって阻害された。⁴⁴⁾ アミノ基を持たず、生理的 pH でアニオンとして存在する cefazolin (注射用) の場合には、カチオン性薬物との相互作用は認められない。Cephalexin を負荷した刷子縁膜小胞では TEA の取り込みが対照に比べて促進

Fig. 9. Tetraethylammonium Uptake by Brush Border Membrane Vesicles Pretreated with PCMBS and Dithiothreitol (DTT) (with H^+ Gradient)²⁸⁾

Membrane vesicles (20 μ l) were pretreated with or without PCMBS and dithiothreitol. After washing the membranes, uptake of 0.1 mM [H^+]tetraethylammonium was measured in the presence of H^+ gradient: control ($\circ$); 10 mM DTT (Δ); 0.1 mM PCMBS ($\bullet$); 0.1 mM PCMBS and then 10 mM DTT ($\blacktriangle$). Each point represents the mean $\pm$ S.E. of three determinations.

	administration route
	R ₁	R ₂	
cephalexin		-CH ₃	oral
cephradine		-CH ₃	
cefaclor		-Cl	
cefadroxil		-CH ₃	
cefazolin			parenteral
cefotiam
cefixime		-CH=CH ₂	oral

Fig. 10. Structures of β -Lactam Antibiotics

され、countertransport 効果が認められた。更に cephalexin の取り込みは、TEA の場合と同様に刷子縁膜小胞内 pH 6.0, 外 pH 7.5 の外向きの H^+ 勾配存在下で顕著に促進された (Fig. 11).⁴⁴⁾ 従来、cephalexin はアニオン輸送系を介して尿細管分泌されと考えられていたが、以上の結果から、刷子縁膜においてアニオン輸送系のみならず H^+ /有機カチオン対向輸送系をも介することが明確となった。これは *in vivo* における cephalexin の顕著な能動分泌と良く対応している。

Kasher ら⁴⁵⁾ は刷子縁膜小胞を用い、cephaloridine が有機カチオン輸送系を介して輸送されると報告している。しかし筆者らの実験では、TEA の取り込みに対する阻害効果や countertransport 効果から判断して、cephaloridine 輸送に対する有機カチオン輸送系の寄与は、極めて小さいと考えられる。⁴⁴⁾ Cephaloridine は β -ラクタム抗生物質の中で最も腎毒性が強く、これは cephaloridine の上皮細胞内蓄積によるものと報告されており、筆者らの結果もこの細胞内蓄積機構を一部説明し得るものである。

Cephalexin などのアミノ- β -ラクタム抗生物質は、生理的 pH で両性イオンとして存在するため、アミノ酸やジペプチドと類似した物理化学的性質を示す。そこで刷子縁膜に局在するアミノ酸、ジペプチドの輸送系と、cephalexin の輸送キャリアーとの関連性について検討した。刷子縁膜小胞による cephalexin の取り込みは、ジペプチドの共存によって拮抗阻害され (Fig. 12),⁴⁸⁾ またジペプチドを負荷した小胞では countertransport 効果が認められるなど、両基質に共通なキャリアー輸送系の存在が示唆された。更に刷子縁膜におけるジペプチド L-carnosine(β -alanyl-L-histidine) の取り込みは cephalexin, cephadrine などのアミノ- β -ラクタム抗生物質によってのみ阻害され、PAH, TEA によっては全く影響されなかった (Table II).⁴⁴⁾ したがってジペプチド輸送系はアニオン及びカチオン輸送系とは独立しており、アミノ- β -ラクタム抗生物質は、ジペプチド輸送系を介して尿細管再吸収され得るものと考えられる (Fig. 13)。ところでジペプチドは、近位尿細管、小腸刷子縁膜においてアミノ酸輸送系とは異なるキャリアーによって輸送されることが知られている。この輸送系は Na^+ には依存せず、代

Fig. 11. Effect of H^+ Gradient on Cephalixin Uptake by Brush Border Membrane Vesicles⁴⁴⁾

Membrane vesicles (20 μ l, 186 μ g of protein for pH 7.5, 172 μ g of protein for pH 6.0), suspended in 100 mM mannitol, 100 mM KCl and either 10 mM Hepes (pH 7.5) ($\circ$, $\blacktriangle$) or 10 mM Mes (pH 6.0) ($\bullet$, $\triangle$), were incubated with the substrate mixture (200 μ l) comprising 100 mM mannitol, 100 mM KCl, 2.5 mM cephalixin and either 10 mM Hepes (pH 7.5) ($\circ$, $\bullet$) or 10 mM Mes (pH 6.0) ($\triangle$, $\blacktriangle$). Each point represents the mean $\pm$ S.E. of triplicate determinations from a typical experiment.

わりに H^+ 勾配によって駆動されること (H^+ /ジペプチド共輸送) が Leibach^{46,47)} や Hoshi^{ら^{48,49)}} の刷子縁膜小胞実験によって明らかにされ、また最近、*in vivo* microperfusion 法によってもジペプチド輸送における H^+ 勾配の関与が証明されている。⁵⁰⁾ 尿細管刷子縁膜におけるアミノ- β -ラクタム抗生物質の輸送は、有機カチオン輸送系 (H^+ 対向輸送) とジペプチド輸送系 (H^+ 共輸送) を介するが、有機カチオン輸送系が強力であるために、Fig. 11 に示した H^+ 勾配の影響についての実験では、 H^+ との共輸送は検出しにくい。⁴⁴⁾ これに対して後述の小腸刷子縁膜では、 H^+ /有機カチオン対向輸送系が存在しないために、 H^+ との共輸送現象を実証することができた。

2-6. 腎不全時における尿細管輸送変化 急性腎不全 (acute renal failure, ARF) とは、腎機能が急激に低下し、血清尿素窒素や血清クレアチニン値が上昇した臨床状態をいう。また尿細管での生体必須成分の再吸収能及び薬物能動分泌能が低下することも知られている。⁵¹⁾ しかし、物質輸送障害の機序については情報が乏しく、これらの点を究明することは病態生理学的見地のみならず、薬物療法上からも重要である。現在、最も広く用いられている病態モデルは、発症機序の面から虚血性腎不全、腎毒性腎不全に分類される。そこで硝酸ウラニル (10 mg/kg s.c.) による腎毒性腎不全モデルラットを作成し、尿細管細胞膜の輸送能変化について検討を加えた。¹⁷⁾ ウラニル処置群では、血清中のクレアチ

Fig. 12. Lineweaver-Burk Plot of Cephalixin Uptake by Brush Border Membrane Vesicles⁴³⁾

Cephalixin uptake for 1 min at concentrations between 1 and 20 mM was determined in the presence of 20 mM dipeptide: control ($\circ$), 20 mM L-phenylalanylglycine ($\triangle$) and 20 mM L-carnosine ($\bullet$). Uptake rate was corrected for the nonsaturable component. Each point represents the mean $\pm$ S.E. of triplicate determinations.

TABLE II. Effect of Cephalosporins, *p*-Aminohippurate, Tetraethylammonium and $HgCl_2$ on L-Carnosine Uptake by Brush Border Membrane Vesicles⁴⁴⁾

Addition	L-Carnosine uptake pmol/mg of protein/15 s	%
None	54 $\pm$ 1	100
L-Carnosine	19 $\pm$ 1 ^{a)}	35
Cephadrine	23 $\pm$ 0 ^{a)}	43
Cephalixin	26 $\pm$ 0 ^{a)}	48
Cefazolin	52 $\pm$ 1	96
<i>p</i> -Aminohippurate	51 $\pm$ 1	94
Tetraethylammonium	54 $\pm$ 1	100
$HgCl_2$	55 $\pm$ 1	102

Membrane vesicles (20 μ l, 86 μ g of protein), suspended in 100 mM mannitol and 20 mM Hepes-Tris (pH 7.5), were incubated at 25°C for 15 s with substrate mixture (20 μ l) comprising 100 mM mannitol, 20 mM Hepes-Tris (pH 7.5), 200 mM NaCl, 0.2 mM L-[³H]carnosine and 10 mM added compounds except 0.2 mM $HgCl_2$. Final concentration: 0.1 mM L-[³H]carnosine and 5 mM added compounds except 0.1 mM $HgCl_2$. Each value represents the mean $\pm$ S.E. of four to eight determinations from a typical experiment.

a) $p < 0.001$, significant difference from control using a two-tailed *t* test.

Fig. 13. Transport Systems of Organic Ions in Proximal Tubular Cells

ニンや尿素窒素レベル、及び尿中の alkaline phosphatase, 蛋白, グルコースレベルが正常群に比べて上昇しており、更にグルコース再吸収能の低下など種々の機能障害がみられたことから、腎不全の発症が確認された。刷子縁膜小胞による D-グルコースの取り込みは、 Na^+ 勾配存在下で実験を行った場合、ウラニル処置群 (ARF) で有意に低下したが、 K^+ 勾配存在下あるいは小胞内外を Na^+ で平衡にした場合には、正常群とウラニル処置群の間で差は認められなかった。したがって、ウラニル処置群で認められた D-グルコース輸送活性の低下は、キャリアー自身の変化ではなく、 Na^+ 勾配消失速度増大によるものと考えられる。

次に刷子縁膜における TEA 取り込みを外向き H^+ 勾配存在下 (内側 $\text{pH} < \text{外側 pH}$) で測定したところ、ウラニル処置群では取り込み初速度や overshoot のピークが有意に低下し (Fig. 14),¹⁷⁾ また H^+ 勾配非存在下での TEA 取り込みも、ウラニル処置群で減少した。更にアクリジンオレンジを用い、刷子縁膜を介する H^+ 勾配の消失速度を測定したところ、正常群とウラニル処置群の間に有意な差は認められなかった。これらの結果よりウラニル処置群における TEA 輸送活性の低下は、駆動力であ

Fig. 14. Tetraethylammonium Uptake by Brush Border Membrane Vesicles in the Presence of H^+ Gradient¹⁷⁾

Membrane vesicles (20 μl), suspended in 100 mM mannitol, 100 mM KCl and either 10 mM Hepes (pH 7.5) (Δ , $\blacktriangle$) or 10 mM 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (pH 6.0) ($\circ$, $\bullet$), were incubated with the substrate mixture (80 μl) comprising 100 mM mannitol, 100 mM KCl, 0.125 mM [^3H]tetraethylammonium and either 10 mM Hepes (pH 7.5) ($\circ$, $\bullet$) or 10 mM 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (pH 6.0) (Δ , $\blacktriangle$). Membrane vesicles were isolated from normal ($\circ$, Δ) or ARF ($\bullet$, $\blacktriangle$) rats. Each point represents the mean $\pm$ S.E. of three to four experiments performed in two to three determinations. a) $p < 0.01$; b) $p < 0.001$, significant difference from normal using a two-tailed t test.

る H^+ 勾配の消失速度変化によるものではなく、TEA キャリアーの availability 低下によるものと推察される。なお、正常ラットから調製した刷子縁膜小胞を硝酸ウラニルで処理しても D-グルコースや TEA の取り込みには影響が認められなかった。したがってウラニル処置群における D-グルコースや TEA の輸送活性低下は、硝酸ウラニルによる直接的な効果ではなく、二次的に誘発された効果と考えられる。一方、有機アニオン PAH の刷子縁膜輸送には影響が認められなかった。

更に側底膜輸送についても検討を行ったところ、ウラニル処置群の側底膜では、正常群に比べ PAH 輸送能（対向輸送の条件下）が有意に低下していることが示された。このようにウラニル処置の影響は、刷子縁膜及び側底膜の各輸送系によって異なることが示唆され、腎不全時における薬物の尿細管分泌低下を解析するためには、今後更に詳細な検討が必要である。

2-7. 培養腎上皮細胞における物質輸送 腎尿細管における物質輸送及びその制御機構を解明するためには、単離上皮細胞を用いた研究も必要である。しかし尿細管自体が不均一であるため、単一の上皮細胞を分離することが困難であり、また細胞の viability や極性の維持に制約があるなど多くの問題点が残されている。近年、培養腎上皮細胞に関する研究が急速に進展し、尿細管上皮細胞の形態並びに生理的機能の解析に有用であることが報告されてきた。⁵²⁾ 代表的な株化細胞として、ブタ腎臓由来の LLC-PK₁ 細胞、イヌ腎臓由来の MDCK 細胞、フクロネズミ腎臓由来の OK 細胞が用いられているが、ここでは LLC-PK₁ 細胞について述べる。

Confluent に達した LLC-PK₁ 細胞では、水や電解質の輸送に伴ってドームが形成される。更に培養液に接する頂側膜 (apical membrane, 刷子縁膜に相当する) では微絨毛が発達し、細胞間には tight junction が見られるなど、上皮細胞特有の形態学的特徴を示し、いわゆる極性を維持している。⁵³⁾ また LLC-PK₁ 細胞は、近位尿細管特有のグルコース、アミノ酸、リンなどの輸送能を保持している。グルコース輸送については多数の報告があり、細胞の増殖・分化に伴う Na^+ 依存性グルコース輸送系の活性発現や調節についての研究が進んでいる。^{54,55)} Figure 15 は、細胞膜指標酵素活性及び D-グルコース輸送に対する培養期間の影響を示している。⁵⁴⁾ 細胞が confluent (4-5 日後) に達した後に、aminopeptidase, γ -glutamyltransferase 活性や Na^+ 依存性 D-グルコース輸送能が著しく増大することから、頂側膜の機能は細胞の増殖・分化と密接に関連していることが分かる。筆者らは、LLC-PK₁ 細胞のホモジネートから分別沈澱法 (Mg/ethylene glycol bis(2-aminoethylether)*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA) 沈澱法) を用いて、頂側膜小胞を分離した。⁵⁶⁾ 頂側膜小胞による D-グルコース輸送は、 Na^+ 濃度勾配を与えた場

Fig. 15. Marker Enzyme and D-Glucose Transport Activities in the LLC-PK₁ Cells during Growth in Culture⁵⁴⁾

A, growth curve of the LLC-PK₁ cells. The cells were plated at density of 1.4×10^4 cells/cm² on day 0 and were cultured for 11 d with medium change every 4 d. B, γ -glutamyltransferase, amino-peptidase and ($Na^+ + K^+$)-adenosine triphosphatase (ATPase) activities during growth in culture. The specific activities of the enzymes in homogenate of the LLC-PK₁ cells were expressed as nanomoles per milligram of protein per minute. Each point represents the mean $\pm$ S.E. of four determinations. C, D-[³H]glucose transport activity by apical membrane vesicles isolated from the LLC-PK₁ cells as a function of days in culture. Apical membrane vesicles were isolated from the LLC-PK₁ cells of different culture periods, and D-[³H]glucose (0.05 mM) uptake for 15 s was determined in the presence of 100 mM NaSCN (●) or KSCN (○). Each point represents the mean $\pm$ S.E. of four determinations.

合に uphill 輸送を示し、また TEA 輸送は、小胞内 pH 6.0, 外 pH 7.5 の条件下で顕著に促進され、overshoot 現象を認めた。^{56,57)} したがって LLC-PK₁ 細胞は、尿細管刷子縁膜と同様の Na⁺/D-グルコース共輸送系や H⁺/有機カチオン対向輸送系を保持していると考えられる。また多孔性フィルター上に培養した単層 LLC-PK₁ 細胞を用いることによって経細胞性輸送実験も可能である。このように LLC-PK₁ 細胞は近位尿細管上皮細胞における薬物動態を解析する上で有用なモデル系と考えられる。

3. 小腸上皮細胞における薬物輸送

3-1. 小腸上皮細胞の構造と機能 小腸上皮細胞は、腎尿細管の場合と同様に吸収・分泌という二方向性の経細胞性輸送を営んでいるが、有機イオンに対する能動分泌能はほとんどないと考えられている。小腸上皮細胞の刷子縁膜は、グルコース、アミノ酸、水溶性ビタミン、胆汁酸、リンなどに対する Na⁺ との共輸送系や Na⁺/H⁺ 対向輸送系を有しており、これらはいずれも側底膜に局在する Na⁺ ポンプによって維持された Na⁺ の電気化学的ポテンシャルを能動輸送のエネルギー源としている。⁵⁸⁾ 更に刷子縁膜にはジペプチドのキャリアー輸送系が存在し、これは管腔側酸性の H⁺ 勾配 (microclimate pH) によって駆動される electrogenic な共輸送系であることが明らかにされている。^{46,49)} このように生体成分の吸収に関して、小腸と近位尿細管の刷子縁膜は基本的に共通した機能を営んでいる。

3-2. 小腸刷子縁膜における β -ラクタム抗生物質輸送 腸管吸収過程において、薬物は一般に pH 分配仮説に従う単純拡散によって上皮細胞を透過し脈管系へ移行するが、生理的 pH でイオン化し低脂溶性であるにもかかわらず良好に腸管吸収される薬物もある。現在繁用されている経口用アミノ- β -ラクタム抗生物質 (Fig. 10) はその代表例で、これら薬物の腸管吸収機構に興味を持たれてきた。In situ 連続灌流法やループ法、in vitro 反転腸管法を用いて詳細な解析が行われた結果、基本的にアミノ- β -ラクタム抗生物質は小腸においてキャリアー輸送されること、またこの輸送系はジペプチドと共通の輸送系であることが明らかにされた。^{59,60)} 更にこれら薬物の吸収において、小腸粘膜可溶性画分が関与することも指摘されている。⁶¹⁾ しかし物質吸収の最も重要な過程である刷子縁膜における輸送機構については未だ明らかではない。

そこで筆者らは小腸刷子縁膜を用いて、 β -ラクタム抗生物質の輸送特性について検討し、腎尿細管の場合と比較考察した。⁶²⁻⁶⁵⁾ Cephalixin, cephradine, cefaclor, cefadroxil など両性イオン型のアミノ- β -ラクタム抗生物質の取り込み速度は、アニオン型の β -ラクタム抗生物質 (cefazolin, cefotiam) に比べて大きく、取り込みには濃度依存性が認められた。またアミノ酸ではなくジペプチドによってこれら薬物の取り込みが阻害され、counter-transport 効果が認められることから、小腸刷子縁膜においてアミノ- β -ラクタム抗生物質はジペプチドと共通のキャリアーを介することが示唆された。また小胞内 pH 7.5, 外 pH 6.0 の条件下で内向きの H⁺ 勾配を与えた場合に cephradine の取り込みが促進され overshoot 現象が認められた。この促進効果は、小胞内負の膜電位を与えた場合、あるいは小胞内外の Δ pH が大きくなるにつれて増強され、一方、プロトノフォア FCCP によって著しく抑制された (Fig. 16).⁶³⁾ Cefadroxil, cefaclor 及び cephalixin の取り込み速度は、内向きの H⁺ 勾配により顕著に促進されたが、cefazolin, cefotiam では H⁺ 勾配による影響は認められなかった (Fig. 17).⁶³⁾ また H⁺ 勾配存在下での刷子縁膜小胞による薬物取り込み速度と小腸からの吸収速度との間には、極めて良好な相関性が認められた (Fig. 18).⁶⁴⁾ これらの結果より、アミノ- β -ラクタム抗生物質は、小腸刷子縁膜においてジペプチド輸送系を介して輸送され、これは H⁺ 勾配を駆動力とする electrogenic な共輸送系であることが証明された。小腸組織を用いた実験系では、ジペプチド並びにアミノ- β -ラクタム抗生物質の輸送が Na⁺ 依存性であるという報告もなされてきた。しかしこれは刷子縁膜に局在する Na⁺/H⁺ 対向輸送系に連結した現象で、能動輸送の直接の駆動力は、管腔側酸性 (pH 5.5—6.0) の H⁺ 勾配であると結論できる (Fig. 20)。このように、従来より virtual pH (microclimate pH) として提唱されてきた管腔側酸性の H⁺ 勾配は、^{66,67)} アミノ- β -ラクタム抗生物質吸収の駆動力として重要な役割を果たしていると考えられる。

また、アミノ基を持たず 2 つのカルボキシル基を有する新規経口用 β -ラクタム抗生物質 cefixime (Fig. 10) もジペプチドと共通の輸送系を介して輸送されることが明らかになった。^{65,68)} しかし刷子縁膜における cefixime と cephradine の輸送を比較した場合、pH 依存性が全く異なること (Fig. 19), cefixime は pH 5 においてジペプチドキャリアーを介して輸送されるが pH 7.5 では輸送されないこと、cephradine はいずれの pH でもジペプチドキャリアーを介して輸送されることが示された。⁶⁵⁾ これらの結果より至適 pH の異なる 2 種類のジペプチ

Fig. 16. Effect of FCCP on H^+ Gradient-Dependent Cephadrine Uptake by Intestinal Brush Border Membrane Vesicles⁶³⁾

Membrane vesicles (20 μ l), suspended in 100 mM mannitol, 100 mM KCl, and either 10 mM Hepes (pH 7.5) ($\circ$, $\bullet$) or 10 mM Mes (pH 6.0) ($\triangle$, $\blacktriangle$), were incubated with the substrate mixture (200 μ l) comprising 100 mM mannitol, 100 mM KCl, 10 mM Mes (pH 6.0), 1 mM cephadrine, and 0.5% ethyl alcohol in the presence ($\bullet$, $\blacktriangle$) or absence ($\circ$, $\triangle$) of 50 μ M FCCP. Each point represents the mean $\pm$ S.E. of three determinations.

Fig. 18. Correlation between Intestinal Absorption (A) and Brush Border Membrane Transport (B) of Cephalosporin Antibiotics⁶⁴⁾

(A) Intestinal absorption. Cephalosporins were dissolved in the phosphate buffered saline (pH 7.4), and 5 ml of drug solution was injected into the intestinal loop. Absorption rate was estimated by the disappearance of cephalosporins from the loop 20 min after administration. Each point represents the mean of five rats. (B) Brush-border membrane transport. The uptake of cephalosporins by brush-border membrane vesicles was measured as described in the text. Each point represents the mean of four determinations. The line was fitted to the data by means of linear regression analysis ($r=0.954$, $p<0.001$).

Fig. 17. Effect of H^+ Gradient on the Uptake of Various Cephalosporin Antibiotics by Intestinal Brush Border Membranes⁶³⁾

Membrane vesicles (20 μ l), suspended in 100 mM mannitol, 100 mM KCl, and either 10 mM Hepes (pH 7.5) (dotted column) or 10 mM Mes (pH 6.0) (open column), were incubated with the substrate mixture (200 μ l) comprising 100 mM mannitol, 100 mM KCl, 10 mM Mes (pH 6.0), and 1 mM cephalosporins. CDX, cefadroxil; CCL, cefaclor; CED, cephadrine; CEX, cephalixin; CEZ, cefazolin; CTM, cefotiam. Each value represents the mean $\pm$ S.E. of four determinations.

Fig. 19. Effect of Extravesicular pH on Cefixime and Cephadrine Uptake by Intestinal Brush Border Membrane Vesicles⁶⁵⁾

Membrane vesicles were suspended in 100 mM mannitol, 100 mM KCl, and 10 mM Hepes (pH 7.5), and then aliquots (20 μ l, 314 μ g protein) were incubated at 37°C for 15 s with the substrate mixture (200 μ l) consisting of 100 mM mannitol, 100 mM KCl, and either 10 mM Mes (pH 4.5–6.0) or 10 mM Hepes (pH 6.5–7.5). The concentration of cefixime ($\bullet$) and cephadrine ($\circ$) was 1 mM. Each point represents the mean $\pm$ S.E. of three determinations.

Fig. 20. Transport Mechanisms of β -Lactam Antibiotics in Intestinal Epithelial Cells

ド輸送系 (type I, 中性; type II, 酸性) が存在することが推察された (Fig. 20).

小腸刷子縁膜を diethylpyrocarbonate で処理したところ cephadrine 輸送の著しい減少が認められた. 尿管刷子縁膜の H^+ /有機カチオン対向輸送系の場合と同様に, H^+ /アミノ- β -ラクタム抗生物質 (ジペプチド) 共輸送系もヒスチジン残基が重要な役割を果たしているものと推察される. ここに述べた β -ラクタム抗生物質は, 刷子縁膜の加水分解酵素に対して強い抵抗性を示すので膜輸送の研究には好都合であり, ジペプチド輸送系解析の良い probe になるものと思われる.

4. おわりに

小腸や腎尿管は, 高度に分化した物質輸送能を保持しているために, 膜輸送研究の宝庫とされてきた. グルコースやアミノ酸の能動輸送機構は, 膜小胞系によって急速に解明が進み, Na^+ の電気化学的ポテンシャルを駆動力とするエネルギー共役機構が明らかにされた. 現在, 小腸や腎尿管における経上皮細胞性の物質輸送研究の中では, 刷子縁膜の Na^+ /グルコース共輸送系の解析が最も進んでおり, キャリアーの単離・同定, モノクローナル抗体の作成, 能動輸送系の再構成などの報告もみられる. 最近, Wright のグループは小腸粘膜から部分精製した messenger ribonucleic acid をアフリカツメガエルの卵母細胞に注入し, Na^+ 依存性グルコース輸送活性を発現させることに成功し,⁶⁹⁾ 更にまたこのグルコースキャリアーの一次構造を報告している.⁷⁰⁾

一方, 特殊輸送系を介した薬物の上皮細胞膜輸送の解析は, 学際的な研究領域であるために生体成分の膜輸送に比べ未だ初歩的段階にある. しかし小腸や腎尿管において営まれている薬物の吸収・分泌についても, 膜小胞系や培養細胞系の導入によって, 輸送キャリアーの局在性, 能動輸送の駆動力, 基質認識能等が次第に明らかになってきた (Fig. 13, 20). H^+ /ジペプチド共輸送系を介する経口用 β -ラクタム抗生物質の吸収や H^+ /有機カチオン対向輸送系によるカチオン性薬物の尿管分泌など, 刷子縁膜上の Na^+/H^+ 対向輸送系や H^+ ポンプによって形成された管腔側酸性の H^+ 勾配が薬物輸送の駆動力として重要な役割を果たしていることは, 薬物動態と生理的輸送系との関係を考える上で極めて興味深い. 今後更に, 薬物輸送キャリアーの構造と機能, エネルギー共役・調節機構などの分子的機序, 膜疾患における薬物輸送変化, 膜レベルにおける薬物相互作用等へと研究が発展するものと期待される. これらの成果は細胞膜輸送に関する基礎的研究のみならず, *in vivo* 薬物速度論解析におけるモデル構築や, 薬物構造活性相関の研究にも有用であり, また *in vivo* における研究成果とを総合することによって薬物治療や製剤設計にも新たな情報が提供できるものと考えられる.

謝辞 本研究を進めるにあたり、終始御指導いただきました京都大学医学部 堀了平教授に深謝致します。本研究は京都大学医学部附属病院薬剤部研究室における石川安範、高野幹久、岡野友信、高野恭子、斎藤秀之、前川仁志、松川泰久、岩田登志雄、加藤みや子諸氏との協同研究であり、ここに感謝致します。また、本研究費の一部は文部省科学研究費補助金、薬学研究奨励財団研究助成金によるものであり、感謝致します。

引用文献

- 1) 堀了平, 乾賢一, 代謝, **23**, 435 (1986).
- 2) 堀了平, “生物薬剤学,” 村田敏郎, 有田隆一(編), 南江堂, 東京, 1982, pp. 175—202.
- 3) J. M. Irish, III, J. J. Grantham, “The Kidney,” ed. by B. M. Brenner, F. C. Reactor, Jr., W. B. Saunders Co., Philadelphia, 1981, pp. 619—649.
- 4) R. Kinne, “Renal Biochemistry Cells, Membranes, Molecules,” ed. by R. K. H. Kinne, Elsevier, Amsterdam, 1985, pp. 99—142.
- 5) H. Murer, P. Gmaj, *Kidney Int.*, **30**, 171 (1986).
- 6) 堀了平, 乾賢一, “膜学実験法,” 中垣正幸(編), 喜多見書房, 東京, 1984, pp. 155—169.
- 7) C. Evers, W. Haase, H. Murer, R. Kinne, *Membrane Biochem.*, **1**, 203 (1978).
- 8) K. Inui, T. Okano, M. Takano, S. Kitazawa, R. Hori, *Biochim. Biophys. Acta*, **647**, 150 (1981).
- 9) R. Hori, K. Inui, M. Takano, T. Okano, “Membranes and Membrane Processes,” ed. by E. Drioli, M. Nakagaki, Plenum Press, New York, 1986, pp. 1—7.
- 10) R. K. Crane, *Fed. Proc.*, **21**, 891 (1962).
- 11) U. Hopfer, K. Nelson, J. Perroto, K. J. Isselbacher, *J. Biol. Chem.*, **248**, 25 (1973).
- 12) M. Kasahara, K. Inui, M. Takano, R. Hori, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **132**, 490 (1985).
- 13) K. Inui, D. E. Moller, L. G. Tillotson, K. J. Isselbacher, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 3972 (1979).
- 14) K. Inui, L. G. Tillotson, K. J. Isselbacher, *Biochim. Biophys. Acta*, **598**, 616 (1980).
- 15) W. Berner, R. Kinne, *Pflugers Arch.*, **361**, 269 (1976).
- 16) R. Hori, M. Takano, T. Okano, S. Kitazawa, K. Inui, *Biochim. Biophys. Acta*, **692**, 97 (1982).
- 17) R. Hori, M. Takano, T. Okano, K. Inui, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **233**, 776 (1985).
- 18) K. Inui, M. Takano, T. Okano, R. Hori, *Biochim. Biophys. Acta*, **855**, 425 (1986).
- 19) J. S. Kashner, P. D. Holohan, C. R. Ross, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **227**, 122 (1983).
- 20) H. Shimada, B. Moewes, G. Burckhardt, *Am. J. Physiol.*, **253**, F795 (1987).
- 21) M. Takano, K. Inui, T. Okano, H. Saito, R. Hori, *Biochim. Biophys. Acta*, **773**, 113 (1984).
- 22) K. Inui, M. Takano, T. Okano, H. Saito, H. Maegawa, R. Hori, “Ion Gradient-Coupled Transport,” INSERM Symposium No. 26, ed. by F. Alvarado, C. H. van Os, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, 1986, pp. 287—290.
- 23) R. Hori, H. Maegawa, T. Okano, M. Takano, K. Inui, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **241**, 1010 (1987).
- 24) M. Takano, K. Inui, T. Okano, R. Hori, *Life Sci.*, **37**, 1579 (1985).
- 25) P. D. Holohan, C. R. Ross, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **215**, 191 (1980).
- 26) P. D. Holohan, C. R. Ross, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **216**, 294 (1981).
- 27) P. P. Sokol, P. D. Holohan, C. R. Ross, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **233**, 694 (1985).
- 28) P. P. Sokol, P. D. Holohan, C. R. Ross, *J. Biol. Chem.*, **261**, 3282 (1986).
- 29) H. Maegawa, M. Kato, K. Inui, R. Hori, *J. Biol. Chem.*, **263**, 11150 (1988).
- 30) H. Maegawa, M. Kato, K. Inui, R. Hori, submitted.
- 31) P.-H. Hsyu, K. M. Giacomini, *Am. J. Physiol.*, **252**, F 1065 (1987).
- 32) P. P. Sokol, P. D. Holohan, C. R. Ross, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **243**, 455 (1987).
- 33) T. D. McKinney, M. E. Kunnemann, *Am. J. Physiol.*, **249**, F 532 (1985).
- 34) T. D. McKinney, M. E. Kunnemann, *Am. J. Physiol.*, **252**, F 525 (1987).
- 35) L. Gisclon, F. M. Wong, K. M. Giacomini, *Am. J. Physiol.*, **253**, F 141 (1987).
- 36) P.-H. Hsyu, K. M. Giacomini, *J. Biol. Chem.*, **262**, 3964 (1987).
- 37) C. Rafizadeh, F. Roch-Ramel, C. Schäli, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **240**, 308 (1987).
- 38) C. Montrose-Rafizadeh, F. Roch-Ramel, C. Schäli, *Biochim. Biophys. Acta*, **904**, 175 (1987).

-
- 39) S. H. Wright, T. M. Wunz, *Am. J. Physiol.*, **253**, F 1040 (1987).
- 40) A. Kamiya, K. Okumura, R. Hori, *J. Pharm. Sci.*, **72**, 440 (1983).
- 41) R. Hori, Y. Ishikawa, M. Takano, T. Okano, S. Kitazawa, K. Inui, *Biochem. Pharmacol.*, **31**, 2267 (1982).
- 42) K. Inui, T. Okano, M. Takano, S. Kitazawa, R. Hori, *Biochem. Pharmacol.*, **32**, 621 (1983).
- 43) K. Inui, T. Okano, M. Takano, H. Saito, R. Hori, *Biochim. Biophys. Acta*, **769**, 449 (1984).
- 44) K. Inui, M. Takano, T. Okano, R. Hori, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **233**, 182 (1985).
- 45) J. S. Kashner, P. D. Holohan, C. R. Ross, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **225**, 606 (1983).
- 46) V. Ganapathy, F. H. Leibach, *Am. J. Physiol.*, **249**, G 153 (1985).
- 47) V. Ganapathy, F. H. Leibach, *Am. J. Physiol.*, **251**, F 945 (1986).
- 48) N. Takuwa, T. Shimada, H. Matsumoto, T. Hoshi, *Biochim. Biophys. Acta*, **814**, 186 (1985).
- 49) T. Hoshi, *Jpn. J. Physiol.*, **35**, 179 (1985).
- 50) S. Silbernagl, V. Ganapathy, F. H. Leibach, *Am. J. Physiol.*, **253**, F 448 (1987).
- 51) K. Solez, A. Whelton, "Acute Renal Failure," Marcel Dekker, Inc., New York, 1984.
- 52) J. S. Handler, *Kidney Int.*, **30**, 208 (1986).
- 53) R. Hori, K. Yamamoto, H. Saito, M. Kohno, K. Inui, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **230**, 742 (1984).
- 54) H. Saito, K. Inui, R. Hori, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **238**, 1071 (1986).
- 55) K. Inui, H. Saito, T. Iwata, R. Hori, *Am. J. Physiol.*, **254**, C 251 (1988).
- 56) K. Inui, H. Saito, M. Takano, T. Okano, S. Kitazawa, R. Hori, *Biochim. Biophys. Acta*, **769**, 514 (1984).
- 57) K. Inui, H. Saito, R. Hori, *Biochem. J.*, **227**, 199 (1985).
- 58) B. R. Stevens, J. D. Kaunitz, E. M. Wright, *Ann. Rev. Physiol.*, **46**, 417 (1984).
- 59) T. Kimura, T. Yamamoto, M. Mizuno, Y. Suga, S. Kitade, H. Sezaki, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **6**, 246 (1983).
- 60) E. Nakashima, A. Tsuji, H. Mizuo, T. Yamana, *Biochem. Pharmacol.*, **33**, 3345 (1984).
- 61) K. Miyazaki, K. Iseki, T. Arita, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **5**, 593 (1982).
- 62) T. Okano, K. Inui, M. Takano, R. Hori, *Biochem. Pharmacol.*, **35**, 1781 (1986).
- 63) T. Okano, K. Inui, H. Maegawa, M. Takano, R. Hori, *J. Biol. Chem.*, **261**, 14130 (1986).
- 64) R. Hori, T. Okano, M. Kato, H. Maegawa, K. Inui, *J. Pharm. Pharmacol.*, in press.
- 65) K. Inui, T. Okano, H. Maegawa, M. Kato, M. Takano, R. Hori, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **246**, in press.
- 66) C. A. M. Hogben, D. J. Tocco, B. B. Brodie, L. S. Schanker, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **125**, 275 (1959).
- 67) M. Lucas, *Gut*, **24**, 734 (1983).
- 68) A. Tsuji, T. Terasaki, I. Tamai, H. Hirooka, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **241**, 594 (1987).
- 69) M. A. Hediger, T. Ikeda, M. Coady, C. B. Gundersen, E. M. Wright, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 2634 (1987).
- 70) M. A. Hediger, M. J. Coady, T. S. Ikeda, E. M. Wright, *Nature* (London), **330**, 379 (1987).