薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
114 (12) 950-971 (1994)

水溶性薬物の中樞神経系内分布に関する速度論的解析：血液脳関門，
血液脳脊髄液関門透過性に基づく構築

鈴木洋史，杉山雄一*

東京大学薬学部，〒113 文京区本郷 7-3-1

**Kinetic Analysis of the Disposition of Hydrophilic Drugs in the
Central Nervous System (CNS): Prediction of the CNS
Disposition from the Transport Properties in the
Blood-Brain and Blood-Cerebrospinal
Fluid Barriers**

Hiroshi SUZUKI and Yuichi SUGIYAMA*

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo,
Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan*

(Received August 8, 1994)

The disposition of hydrophilic drugs in the central nervous system (CNS) was studied in relation to the transport properties across the brain capillaries which form the blood-brain barrier (BBB), and the choroidal epithelial cells which form the blood-cerebrospinal fluid (CSF) barrier, using β -lactam antibiotics as model compounds. The concentration profiles for cefodizime in the rat CNS were analyzed based on a pharmacokinetic model in which the physiological and anatomical aspects of the CNS were considered. The model analysis revealed that the drug penetration into the CSF after i.v. administration can be accounted for by permeation across the BBB and diffusion through the brain extracellular fluid and across the ependymal surface into the CSF. The drug molecules are eliminated from the CSF by the bulk flow and by the active transport system in the choroid plexus. In *in situ* and *in vivo* experiments, we found that the β -lactam antibiotics are transported across the BBB *via* a carrier-mediated mechanism. Comparison of kinetic parameters determined *in vivo* and *in vitro* experiments revealed (1) that the choroid plexus is the predominant site for the elimination of β -lactam antibiotics from the CSF and (2) that the isolated choroid plexus can be a useful tool to predict the *in vivo* elimination clearance. We also found that an anionic exchanger, at least in part, plays a role in the uphill transport of β -lactam antibiotics in the choroid plexus. Furthermore, the substrate specificity for the anion transporter was examined in the isolated choroid plexus. New quinolones (such as fleroxacin) are also transported by the mechanism shared by β -lactam antibiotics. Dideoxyinosine, a nucleoside derivative, can be a substrate for the transporter, whereas azidothymidine is recognized, but not transported by the transport system. Transport properties of cimetidine, a prototypic organic cation, in the choroid plexus was also characterized *in vivo*, *in situ* and *in vitro* experiments. An interaction was observed in the transport of cimetidine and that of organic anions. Molecular mechanisms for the CNS transport still remain to

be clarified.

Keywords—blood-brain barrier; blood-cerebrospinal fluid barrier; transport; cerebrospinal fluid; choroid plexus

1. はじめに

中枢神経系は、循環血とは、血液脳関門,¹⁻⁵⁾ 血液脳脊髄液関門^{1-3,6)}により隔てられており、この2つの関門の作用により、脳細胞外液のイオン組成が一定に保たれている。ここで、血液脳関門は、循環血と、脳実質組織の約20%を形成する脳細胞外液の間を隔てる関門である。血液脳関門を形成する血管内皮細胞は、他の末梢組織のものとは異なり、内皮細胞間がtight junctionにより結合されており、さらにfenestra, pinocytosisが存在しないという特徴を有している。したがって、循環血中のリガンドが、脳細胞外液スペースに移行するためには、経細胞輸送を介さなければならず、その結果として、水溶性の高い、あるいは分子量の大きい化合物の中枢移行は妨げられ、関門が形成されている。なお、glucoseや、いくつかのアミノ酸等の栄養物質に対しては、特異的な輸送系が存在し、血液脳関門透過を促進している。¹⁻⁵⁾

一方、脳実質組織は、脳脊髄液により浸された構造をとっており、脳細胞外液と脳脊髄液の間には、自由な物質交換が行われる。脳脊髄液と、血液の間を隔てる関門は、血液脳脊髄液関門と呼ばれており、脈絡叢組織により形成されている。^{1-3,6)} 脈絡叢は、脳脊髄液により満たされている左右側脳室、第3,4脳室に存在している。脈絡叢組織の内皮細胞間にはtight junctionは存在せず、上皮細胞間がtight junctionにより結合することにより、関門が形成されている。脈絡叢には、種々の無機イオン輸送系が存在することが知られており、脳脊髄液を産生する機能を備えているが、産生された脳脊髄液は、脳室系を巡り、矢状静脈洞を介して静脈血へと吸収される。また、脈絡叢には、脳脊髄液中の内在性有機アニオン(5-hydroxyindole acetic acid等のアミン代謝物など)や、choline等の内在性有機カチオンを血液側へと汲み出す機能も備わっており、腎尿細管上皮細胞と類似した輸送機能を有するものと考えられている。この汲み出し機能は、上述の脳脊髄液の生理的な“flow”と共に、脳実質に対してsinkの役割を果たしている。^{1-3,6)}

これらの生理解剖学的知見に基づくと、薬物分布について検討を加える上では、中枢神経系は単一のコンパートメントと見なしてはならないことが分かる。特に、中枢神経系と循環血との間で、瞬時平衡が成立しない水溶性薬物に関しては、血液-脳細胞外液-脳脊髄液間の物質交換を考慮した解析を行う必要がある。Collins and Dedrick⁷⁾及びCollins⁸⁾は、このfluid間の物質交換を考慮に入れた生理学的モデルを構築し、簡素化された場合について理論計算を行ったが、このような観点から、実際の化合物の中枢神経系内分布について検討が加えられた例はない。そこで、本報では、血液脳関門、血液脳脊髄液関門における薬物透過性に基づき、その中枢神経系内分布を構築する試みを報告する。モデル化合物としては、化膿性髄膜炎治療に使用される一連の β -ラクタム抗生物質を、実験動物としては、Wistar系雄性ラットを用いた。また、特に血液脳脊髄液関門における薬物輸送に関する研究はほとんどなされていないことから、併せていくつかの薬物の輸送系を*in vitro*実験系によりcharacterizeし、これらの*in vitro*情報を*in vivo*へ外挿した試みについても報告する。

2. β -ラクタム抗生物質の中枢神経系内における分布機構の解明: Distributed Modelに基づく解析^{9,10)}

まず、 β -ラクタム抗生物質の中枢神経系内分布の基本特性について知見を得るため、抗生物

Fig. 1. Plasma, Brain (Extracellular Fluid) and Cerebrospinal Fluid Concentration of [^{14}C]-Cefodizime as a Function of Time after 15 mg/kg i.v. Administration⁹⁾

(A) control, (B) +penicillin. The solid lines represent the best fit of the data to equations. *Significantly lower than the corresponding brain extracellular fluid concentration with $p < 0.05$. **Significantly lower than the corresponding brain extracellular fluid concentration with $p < 0.01$.

Fig. 2. Cerebrospinal Fluid Concentration Profiles of [^{14}C]Cefodizime and [^3H]Mannitol after Intracerebroventricular Administration⁹⁾

An intracerebroventricular tracer dose of [^{14}C]cefodizime ($\bullet$, $0.074 \mu\text{Ci}$) and [^3H]mannitol ($\circ$, $0.360 \mu\text{Ci}$) was administered into the rat lateral ventricle. At fixed times, the radioactivity remaining in the cerebrospinal fluid was determined.

Fig. 3. Schematic Diagram Illustrating the Distributed Model

J. D. Fenstermacher *et al.*, *Fed. Proc.*, **33**, 2070 (1974).

CDZM を i.v. 投与後の、血漿中非結合型濃度、脳脊髄液及び脳細胞外液中濃度推移を示す。ここで、実験終了時においても、得られたサンプル中の [^{14}C] 活性は、intact な [^{14}C]CDZM 活性を反映していた。また、脳細胞外液中濃度の算出に当たっては、屠殺 3 分前に [^{125}I]albumin を投与し、脳血管系中に残存する [^{14}C]CDZM を補正し、脳細胞外液スペースを 0.2 ml/g 脳と仮定した。図に示すように、静脈内投与後には、脳細胞外液から脳脊髄液への濃度勾配が観察され、抗生物質の脳脊髄液移行には、少なくとも一部、脳細胞外液からの流入が関与する可能性が示唆された。また、脳室内投与後には、[^{14}C]CDZM は、同時に投与した [^3H]mannitol よりも若干早い脊髄液からの消失が観察された (Fig. 2).⁹⁾

以上の結果を速度論解析することにより、CDZM の中枢内分布機構に関する知見を得ることができる。解析には、中枢神経系の生理解剖学的知見が組み込まれた速度論モデル (Fig. 3) に従った。^{7,8)} なお、以下のモデルでは、化合物は Fick の拡散則に従い、脳実質組織内を拡散することが仮定されているが、この仮定の妥当性は既に示されている。¹¹⁻¹³⁾

最初に [¹⁴C]CDZM を静脈内投与時の、中枢内分布に関する式を導いた。¹⁰⁾ 脳組織中の物質収支式は、式 (1) により与えられる。

$$\partial C_{br}(x,t)/\partial t = Dt \partial^2 C_{br}(x,t)/\partial x^2 + PS_1 \cdot Cp(t) - PS_2/V_{br} \cdot C_{br}(x,t) \quad (1)$$

ここで、 $C_{br}(x,t)$ は、脳脊髄液表層からの距離 x の点における脳中濃度、 Dt は脳中拡散定数、 PS_1 及び PS_2 は、血液から脳細胞外液へ、及びその逆方向の血液脳関門透過クリアランス、 V_{br} は脳内分布容積を、 $Cp(t)$ は血漿中非結合型濃度をそれぞれ示す。

脳脊髄液中の物質収支式 (式 (2)) は、式 (1) の境界条件となる。

$$V_{CSF} \partial C_{br}(0,t)/\partial t = -(Q + CL_{CP}) \cdot C_{br}(0,t) + Dt \cdot Ar \cdot V_{br} \partial C_{br}(0,t)/\partial x \quad (2)$$

ここで、 V_{CSF} は脳脊髄液の容積、 Q は脳脊髄液の流速、 CL_{CP} は血液脳脊髄液関門を介した、脳脊髄液から血液への透過クリアランス、 Ar は脳室上衣表面積をそれぞれ示す。もう 1 つの境界条件としては、脳脊髄液から十分離れた距離 (x^*) においては、脳脊髄液の影響は無視しようと仮定することにより得られる。

$$\partial C_{br}(x^*,t)/\partial t = PS_1 \cdot Cp(t) - PS_2/V_{br} \cdot C_{br}(x^*,t) \quad (3)$$

式 (1)–(3) を、初期条件 $C_{br}(x,0)=0$ のもとで、ラプラス変換により解くと、式 (4) に示される変換解が得られる。¹⁰⁾ ここで、 $Cp(t)=Ae^{-\alpha t}+Be^{-\beta t}$ により与えられるとして式を展開し、 $x^* \rightarrow \infty$ とした。

$$C_{br}(x,s) = \frac{-\left(s + \frac{Q + CL_{CP}}{V_{CSF}}\right) \frac{PS_1 A}{s + \alpha} + \frac{PS_1 B}{s + \beta}}{\left(s + \frac{Q + CL_{CP}}{V_{CSF}}\right) + \frac{Dt Ar V_{br}}{V_{CSF}} \sqrt{\frac{PS_2/V_{br} + s}{Dt}}} e^{\sqrt{\frac{PS_2/V_{br} + s}{Dt}}(-x)} + \frac{\frac{PS_1 A}{s + \alpha} + \frac{PS_1 B}{s + \beta}}{PS_2/V_{br} + s} \quad (4)$$

さらに、脳脊髄液を覆っている大脳皮質の厚みを L と定義し、式 (4) から式 (5) で示される脳細胞外液中平均濃度を求めた。¹⁰⁾

$$\bar{C}_{br}(s) = \frac{\left(s + \frac{Q + CL_{CP}}{V_{CSF}}\right) \frac{PS_1 A}{s + \alpha} + \frac{PS_1 B}{s + \beta}}{\left(s + \frac{Q + CL_{CP}}{V_{CSF}}\right) + \frac{Dt Ar V_{br}}{V_{CSF}} \sqrt{\frac{PS_2/V_{br} + s}{Dt}}} \frac{\left(e^{-\sqrt{\frac{PS_2/V_{br} + s}{Dt}} L} - 1\right)}{\sqrt{\frac{PS_2/V_{br} + s}{Dt}}} \cdot \frac{1}{L} + \frac{\frac{PS_1 A}{s + \alpha} + \frac{PS_1 B}{s + \beta}}{PS_2/V_{br} + s} \quad (5)$$

また、脳脊髄液中濃度推移は、式 (4) で、 $x=0$ とすることにより得られる。¹⁰⁾ すなわち、

$$C_{\text{CSF}}^{\text{iv}}(s) = \left(\frac{-\left(s + \frac{Q + CL_{\text{cp}}}{V_{\text{CSF}}}\right) \frac{\frac{PS_1 A}{s + \alpha} + \frac{PS_1 B}{s + \beta}}{PS_2/V_{\text{br}} + s} + \frac{\frac{PS_1 A}{s + \alpha} + \frac{PS_1 B}{s + \beta}}{PS_2/V_{\text{br}} + s}}{\left(s + \frac{Q + CL_{\text{cp}}}{V_{\text{CSF}}}\right) + \frac{DtArV_{\text{br}}}{V_{\text{CSF}} \sqrt{\frac{PS_2/V_{\text{br}} + s}{Dt}}}} \right) / V_{\text{br}} \quad (6)$$

同様に、脳室内投与後の物質収支式を書き下し、脳脊髄液中濃度推移を示すラプラス変換解を求めると、

$$C_{\text{CSF}}^{\text{iv}}(s) = \frac{\text{dose}/V_{\text{CSF}}}{\frac{DrAr}{V_{\text{CSF}}} V_{\text{br}} \sqrt{\frac{PS_2/V_{\text{br}}}{Dt}} + \left(s + \frac{Q + CL_{\text{cp}}}{V_{\text{CSF}}}\right)} \quad (7)$$

が得られる。¹⁰⁾

以上で得られた式を用い、実測値に対して当てはめ計算を行った。¹⁰⁾ ここで、実測値は、 $[^{14}\text{C}]\text{CFDZ}$ 投与後の脳細胞外液中濃度推移、脳脊髄液中濃度推移、並びに $[^{14}\text{C}]\text{CFDZ}$ 、 $[^3\text{H}]\text{-mannitol}$ 投与後の脳脊髄液中濃度推移の4種類のデータであり、これらを式(5)、(6)、(7)に同時に当てはめた。計算に当たっては、mannitolの PS_2 、 Dt は文献値に、CDZMの Dt は、拡散定数と分子量の関係から算出された値に固定し、生理解剖学的パラメーター(Ar 、 Q 、 V_{CSF})及びCDZMに固有のパラメーター(PS_1 、 PS_2 、 CL_{cp})を未知パラメーターとした。

当てはめ計算の結果を、Fig. 1, 2の実験で示す。¹⁰⁾ 比較的良好な結果が得られ、パラメーターの収束値も生理解剖学的値と同等(Q は実測値 $2.9 \mu\text{l}/\text{min}$ に対して、収束値 $4.2 \pm 0.3 \mu\text{l}/\text{min}$; V_{CSF} は実測値 $200\text{--}250 \mu\text{l}$ に対して、収束値 $211 \pm 18 \mu\text{l}$; Ar は実測値約 2cm^2 に対して、 $1.47 \pm 0.19 \text{cm}^2$)であったことから、モデルの妥当性が示されたものと考えられた。これらの結果は、静脈内投与されたCDZMが、以下のスキームにより中枢内に分布することを示唆している。すなわち、循環血中のCDZMは、血液脳関門を介して脳細胞外液中に分布し、脳組織を拡散後、脳脊髄液へと出現する。脳脊髄液中のCDZMは、脳脊髄液のbulk flow及び血液脳脊髄液関門における能動輸送により、血液へと移行するというスキームにより、中枢内に分布するものと考えられた。¹⁰⁾ なお、脈絡叢を介した、血液から脳脊髄液への直接の取り込みを考慮しても、モデルは改善されず、したがって、このルートの寄与は無視しうるものと考えられた。また、算出された PS_2 の値は PS_1 に比べて有意に大きく、血液脳関門には、PCGに対するasymmetricな輸送系が存在することが示唆されたが、この結果は、Cornfordら¹⁴⁾のvalproic acidを用いた解析、Dedrickらのグループによる¹⁵⁾ azidothymidineを用いた解析の結果により支持される。

最近、辻らのグループ¹⁶⁾、鶴尾らのグループ¹⁷⁾は、血液脳関門を形成する内皮細胞の血管側膜上に存在するP-糖蛋白が、ビンカアルカロイド等の化合物を、内皮細胞から血液へと、一次性能動輸送により汲み出す機能を有し、その結果として、これら化合物の血液脳関門透過性が制限されることを、*in vitro* 実験系により示唆している。すなわち、辻ら¹⁶⁾は、初代培養ウシ脳毛細血管内皮細胞を用い、 $[^3\text{H}]\text{vincristine}$ (VCR)の細胞からのeffluxが、P-糖蛋白輸送阻害剤のverapamilにより抑制されること、また定常状態における $[^3\text{H}]\text{VCR}$ の細胞内/外液濃度比が、輸送阻害剤共存下の他、細胞内ATP濃度を低下させる操作を行うことによっても、上昇すること等の結果を得ている。同様に、鶴尾らのグループ¹⁷⁾は、Bal b/c マウスより株化した脳毛細血管内皮細胞を単層培養し、脳細胞外液から血液側への $[^3\text{H}]\text{VCR}$ の経細胞輸送、並びに逆

方向の輸送を測定し、前者が後者よりも大きく、*asymmetric* な輸送が観察されること、さらにこの方向性を有する輸送は、*verapamil* 存在下で消失すること等を報告している。さらに、Schinkel ら¹⁸⁾ は、P-糖蛋白をコードする *mdr 1a* 遺伝子を、遺伝的に欠損したマウスを作成することに成功し、この欠損マウスでは、*vinblastine* 静脈内投与後 4 時間での脳/血漿中濃度比が、コントロールマウスに比べて約 10 倍上昇することを示した。上述の *in vitro* 及び *in vivo* 実験の結果により、ビンカアルカロイド等に対しては、血液脳関門上に存在する P-糖蛋白が、汲み出しポンプとして作用し、*asymmetric* な輸送系の実体を担うことが明らかとされている。筆者らが速度論解析により示唆した、血液脳関門における有機アニオンの *asymmetric* な輸送系は、基質特異性の点から、P-糖蛋白とは異なるものと考えられ、その実体については、今後の検討が必要である。

以下、各関門におけるβ-ラクタム抗生物質の輸送系を *characterize* すると共に、上述のスキームに基づき、(i) 抗生物質併用時の脳脊髄液移行における薬物間相互作用、(ii) 抗生物質間における脳脊髄液移行性の差異、という 2 つの点に関して、定量的な評価を行った。

3. β-ラクタム抗生物質の血液脳関門透過機構の解明^{9,19-21)}

3-1. *In Situ* 脳灌流法を用いた解析^{20,21)} 上述の解析に基づき、循環血中に投与された抗生物質の、脳脊髄液への移行の第一段階となる血液脳関門透過性について検討を加えた。^{20,21)} 実験には、*in situ* 脳灌流法を用いたが、この方法は、派生する動脈系を結紮後、総頸動脈に施したカテーテルから、テスト化合物を含む緩衝液を注入し、大脳皮質を灌流するものである。屠殺後、大脳皮質を摘出し、残存するアイソトープ量より、次式に従って、血液脳関門透過性を求めた。^{20,21)}

$$PS_1 = -F \ln(1 - q_{br}(T)/F/T/C) \quad (8)$$

ここで、 F は大脳皮質を巡る灌流液の速度、 T は灌流時間、 C は灌流液中化合物濃度、 $q_{br}(T)$ は時間 T における脳内薬物量をそれぞれ示す。

60 秒の灌流実験により、 $[^3\text{H}]$ benzylpenicillin (PCG) の透過性を求めた結果を、Table I に示す。²⁰⁾ なお、 $[^3\text{H}]$ PCG は、使用直前に高速液体クロマトグラフィーにより精製したものを用い、*vascular reference* としては、セファデックス G-25 カラムにより精製した $[^{14}\text{C}]$ inulin を用いた。表に示すように、 $[^3\text{H}]$ PCG の血液脳関門透過性は、非標識体により阻害を受け (K_m 値は 8—30 μM 程度)、線形領域では、全輸送の約 75% が、この飽和性を有する機構に依存するものであった。また、有機アニオン輸送系の阻害剤である *probenecid* や、第三世代抗生物質 *ceftriaxone*²²⁾ による阻害効果も観察されたことから、血液脳関門には、これらβ-ラクタム抗生物質に対する輸送系が存在する可能性が示唆された。²⁰⁾

TABLE I. Permeability-Surface Area Product for the Transport of $[^3\text{H}]$ Benzylpenicillin and $[^{14}\text{C}]$ Imipenem across the Rat Blood-brain Barrier^{20,21)}

Conditions	PS product ($\times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$)
$[^3\text{H}]$ Benzylpenicillin	
Control	9.14 $\pm$ 0.21
+ Benzylpenicillin 8 μM	7.27 $\pm$ 0.50*
+ Benzylpenicillin 30 μM	3.99 $\pm$ 0.39*
+ Benzylpenicillin 2 mM	2.34 $\pm$ 0.25*
+ Probenecid 100 μM	3.01 $\pm$ 0.22*
+ Ceftriaxone 2 mM	4.30 $\pm$ 0.18*
$[^{14}\text{C}]$ Imipenem	
Control	3.23 $\pm$ 0.47
+ Imipenem 2 mM	2.67 $\pm$ 0.52
+ Cilastatin 2 mM	3.43 $\pm$ 0.20
+ Probenecid 1 mM	3.39 $\pm$ 0.49

Rat brain was perfused at 70 $\mu\text{l/s}$ for 66 s with perfusate containing $[^{14}\text{C}]$ imipenem (87 μM) or $[^3\text{H}]$ benzylpenicillin (70 nM). In some instances, inhibitors were added to the perfusate. * Significantly lower than the control $p < 0.05$).

Fig. 4. Central Nervous System (Brain (Extracellular Fluid), (A) and Cerebrospinal Fluid, (B))/Plasma Unbound Concentration Ratio of [^{14}C]Cefodizime as a Function of Time in Control and Benzylpenicillin-Treated Rats after 15 mg/kg i.v. Administration⁹⁾

Each point represents the mean $\pm$ S.E. with the number of determinations in parentheses. *Significantly lower than control value with $p < 0.05$. **Significantly lower than control value with $p < 0.01$. ***Significantly lower than control value with $p < 0.001$.

3-2. *In Vivo* 静脈内投与実験による解析^{9,23)} この *in situ* 実験により得られた実験結果をさらに確証するため、以下の *in vivo* 実験を行った。^{9,23)} 麻酔下ラットに、非標識 PCG を低速静注し、血漿中非結合型 PCG 濃度を $500 \mu\text{M}$ に保った状態で、[^{14}C]CDZM を静脈内投与し、その中枢神経系内分布について検討を加えた (Fig. 1, 4). Fig. 4 には、脳細胞外液中濃度/血漿中非結合型濃度比並びに脳脊髄液中濃度/血漿中非結合型濃度比を、PCG 存在下及び非存在下で比較した結果を示す。結果を速度論解析することにより、 PS_1 がコントロール実験の $1/15$ にまで低下しており、PCG 存在下における CDZM の脳細胞外液中濃度/血漿中非結合型濃度比の低下は、PCG が CDZM の血液脳関門透過を抑制したことによるものと考えられた。その結果として、脳脊髄液中濃度/血漿中非結合型濃度比の低下も観察されたものと考えられる。この実験の結果は、血液脳関門には、 β -ラクタム抗生物質に対する輸送系が存在することを示唆している。この輸送系により、血液脳関門透過が促進され、その結果として、CDZM が優れた脳脊髄液移行性を示すものと考えられた。^{9,23)}

これらの結果は、髄膜炎治療との関連性を有している。髄膜炎起炎菌判明前の初期治療においては、抗生物質の抗菌スペクトルを拡大するために、複数の抗生物質が併用されることがある。²⁴⁻²⁶⁾ 小林らの研究グループは、髄膜炎モデルラットを用い、脳脊髄液移行性における抗生物質間相互作用について検討を加えている。²⁶⁾ 例えば、ampicillin (100 mg/kg) を静脈内に投与した場合、その脳脊髄液/血漿中濃度比は、同時に投与された latamoxef や ceftazidime (各 100 mg/kg) により、有意に低下するものの、ceftriaxone や cefotaxime (各 100 mg/kg) によっては影響を受けないこと等を報告している。筆者らの研究結果をも考慮すると、これらの結果は、同時に投与された抗生物質が、血液脳関門上の輸送担体に対して競合する場合があります、その結果として脳脊髄液/血漿中濃度比が低下すると考えることにより説明される。⁹⁾

4. 血液脳脊髄液関門における β -ラクタム抗生物質輸送^{19, 21, 27-30)}

4-1. *In Vivo* 脳室内投与実験による解析²¹⁾ β -ラクタム抗生物質の血液脳関門における輸送系については、上述の知見を得ることができたが、一方で、内因性有機アニオンが、脳脊髄液から血液へと汲み出されること、また probenecid を腹腔内投与することにより、静脈内投与

された PCG の脳脊髄液／血漿中濃度比が上昇することが報告されているため、³¹⁻³³⁾ この汲み出し機構が、抗生物質の中枢内分布に影響を及ぼす可能性が考えられた。また、静脈内投与後、抗生物質の脳脊髄液移行性は、化合物間により大きく異なることが報告されていることから、^{26,33)} この差異の一因として、脳脊髄液からの汲み出しが寄与するか否かについて、以下の検討を加えた。²¹⁾ 化合物としては、良好な脳脊髄液移行性を示すカルバペネム系抗生物質 imipenem (IPM) を用いた。なお、IPM の dehydropeptidase I による分解を抑え、大量投与時の腎毒性を軽減するため、cilastatin を併用するため、cilastatin の影響についても検討を加えた。²¹⁾

IPM を cilastatin と共に、2 時間定速静注し、偽定常状態での、脳脊髄液中濃度／血漿中非結合型濃度比を測定したところ、 0.22 ± 0.03 (mean $\pm$ S.E., $n=5$) であった。PCG を用いて同様の実験を行った場合には、 0.017 ± 0.005 (mean $\pm$ S.E., $n=4$) が得られたことから、IPM の脳脊髄液移行性は、PCG の十数倍高いことが明らかとなった。²¹⁾

そこで、この差異が、血液脳関門を介した influx 過程の差により規定されるのか否かについて検討を加えるため、*in situ* 脳灌流法により、IPM の PS_1 を測定した。²¹⁾ 上述の *in vivo* 実験条件下での PCG の PS_1 は、約 4×10^{-5} ml/s/g 脳程度と見積られるのに対し (Table I), IPM の PS_1 は $(3.23 \pm 0.47) \times 10^{-5}$ ml/s/g 脳であり (Table I), 両者には差は観察されなかった。また、 $[^{14}\text{C}]$ -IPM の血液脳関門透過性は、飽和性を示さず、probenecid による阻害も観察されなかったことから、単純拡散によるものと考えられた (Table I)。また、cilastatin の影響も観察されなかった (Table I)。以上の結果から、両化合物の脳脊髄液分布性の差異は、血液脳関門を介した influx の差によっては説明されず、次に、脳脊髄液からの efflux の差について検討を加えた。²¹⁾

実験は、 $[^{14}\text{C}]$ IPM あるいは $[^3\text{H}]$ PCG と、放射ラベルした mannitol を、同時に脳脊髄液中に投与することにより開始し、30 分後に脳脊髄液中のアイソトープ濃度を測定した。その結果を Table II に示すが、PCG の脳脊髄液からの消失は、mannitol に比較して極めて早く、probenecid による阻害を受けた。この結果は、IPM が、probenecid による阻害の程度も少なく、また mannitol とほぼ同時の消失を受けるのとは対照的であった。なお、上述の定速静注実験条件下では、cilastatin は IPM の脳脊髄液からの消失には、影響を与えないことが示唆された (後述)。この実験結果により、PCG と IPM 脳脊髄液分布性の差異は、主として脳脊髄液からの消失過程の差異に基づくことが定性的に示唆された。²¹⁾

4-2. *In Vitro* 単離脈絡叢を用いた輸送実験による解析 そこで、この消失を担う実体について検討を加えた。前述のように、従来より、脈絡叢は、生体内因性有機アニオンを脳脊髄液から血液へと汲み出す能力を備えていることが報告されている^{1,6)} ことから、これら抗生物質も、脈絡叢を介して血液へと輸送される可能性が考えられた。そこで、常法により、側脳室

TABLE II. Percentage of Recovery of $[^3\text{H}]$ -Benzylpenicillin and $[^{14}\text{C}]$ Imipenem in the Cerebrospinal Fluid after Intracerebro-Ventricular Administration²¹⁾

Conditions	Ratio values
$[^{14}\text{C}]$ Imipenem	
Control	0.95 ± 0.03
+ Probenecid	$1.32 \pm 0.10^*$
$[^3\text{H}]$ Benzylpenicillin	
Control	0.12 ± 0.01
+ Probenecid	$0.92 \pm 0.03^{**}$

An intracerebroventricular tracer dose of $[^{14}\text{C}]$ imipenem and $[^3\text{H}]$ mannitol or $[^3\text{H}]$ benzylpenicillin and $[^{14}\text{C}]$ mannitol was administered into the rat lateral ventricles. Injection was performed with or without 0.1 mg of probenecid. After 30 min, the radioactivity remaining in the CSF was determined. The values of the ligand to mannitol concentration ratio in the CSF divided by the same ratio in the injectate are shown. *Significantly lower than the control ($p < 0.05$). **Significantly lower than the control ($p < 0.01$).

Fig. 5. Time Profiles for the Accumulation of $[^3\text{H}]$ Benzylpenicillin and $[^{14}\text{C}]$ Imipenem by the Rat Choroid Plexus²¹⁾

Choroid plexus was incubated at 37°C in the medium containing $[^3\text{H}]$ benzylpenicillin ($50\text{ }\mu\text{M}$) or $[^{14}\text{C}]$ imipenem ($50\text{ }\mu\text{M}$).

より脈絡叢を摘出し、輸送実験を行った。アイソトープ体のテスト化合物、及び細胞容積のマーカと共に incubate し、脈絡叢への取り込みを centrifugal filtration 法により、測定した。なお、細胞容積のマーカとしては、 $[^{14}\text{C}]$, $[^3\text{H}]$ 標識した化合物に対して、それぞれ $[^3\text{H}]\text{-H}_2\text{O}$, $[^{14}\text{C}]\text{butanol}$ を用いた。付着水を $[^3\text{H}]$ 又は $[^{14}\text{C}]\text{inulin}$ により測定し、補正後、tissue to medium concentration (T/M) ratio を求めた。なお、後述のように、この単離組織へのリガンド取り込みは、*in vivo* での、脳脊髄液から血液への汲み出しに対応するものと考えられる。

実験結果を Fig. 5 に示すが、単離脈絡叢への取り込みは、PCGの方がIPMよりも速く、*in vivo* 実験における速やかな消失と対応していた。²¹⁾ そこで、以下、さらにこの輸送系について検討を加えた。^{21,27)}

Fig. 6 に示すように、PCG 輸送は、代謝阻害剤 (2,4-dinitrophenol, KCN) により阻害を受け、 27°C での実験結果から、 $Q_{10}=3.3$ と求まり、輸送におけるエネルギー要求性が示唆された。²⁷⁾ また、SH 基修飾剤 (*p*-hydromercuribenzoic acid, *N*-ethylmaleimide) の効果から、蛋白性の輸送担体の関与も示唆された。²⁷⁾ なお、ouabain による阻害効果は観察されず、medium 中の Na^+ を Tris, *N*-methyl-D-glucamine, choline, mannitol に置換しても、取り込みの変化がなかったことから、この能動輸送系は、主として Na^+ 非依存的であることが示された (Fig. 7).²⁷⁾ また、こ

Fig. 6. Effect of Metabolic Inhibitors, Sulfhydryl Reagents, Anion Exchange Inhibitors and Incubation Temperature on the Tissue to Medium Concentration of $[^3\text{H}]$ Benzylpenicillin²⁷⁾

Choroid plexus was incubated with or without inhibitors for 3 min at 37 or 27°C in the medium containing $[^3\text{H}]$ benzylpenicillin ($0.30\text{ }\mu\text{M}$). *Significantly lower than control value with $p < 0.05$.

Fig. 7. Effect of the Inward Na^+ Gradient on the Tissue to Medium Concentration Ratio of $[^3\text{H}]$ Benzylpenicillin²⁷⁾

Choroid plexus was incubated with ouabain (0.52 mM) or in the incubation medium in which Na^+ was replaced by either mannitol, Tris, *N*-methyl-D-glucamine or choline for 3 min at 37°C . The concentration of $[^3\text{H}]$ benzylpenicillin in the medium was $0.30\text{ }\mu\text{M}$. *Significantly lower than control value with $p < 0.05$.

Fig. 8. Concentration Dependency of the Tissue to Medium Concentration of [^3H]Benzylpenicillin²⁷⁾

Inhibitory effect of phenoxymethylpenicillin (A) and cefpiramide (B) is also shown. Choroid plexus was incubated with or without phenoxymethylpenicillin (0.06 mM) or cefpiramide (0.10 mM) for 3 min at 37°C in the medium containing [^3H]benzylpenicillin (0.30 μM). $\circ$, control; $\bullet$, with phenoxymethylpenicillin or cefpiramide.

Fig. 9. Concentration Dependency of the Tissue to Medium Concentration of [^{14}C]Cefodizime²⁸⁾

Inhibitory effect of benzylpenicillin is also shown. Choroid plexus was incubated with or without unlabeled benzylpenicillin (80 μM) for 5 min at 37°C in the medium containing [^{14}C]cefodizime (180 μM). $\bullet$, control; $\circ$, with benzylpenicillin.

の輸送は、有機アニオン輸送系の阻害剤となる probenecid や、生体内因性有機アニオン (5-hydroxyindoleacetic acid, homovanilic acid) による阻害の他、飽和性を有し ($K_m=58 \mu\text{M}$)、構造類似体の phenoxymethylpenicillin, cefpiramide による競合阻害を受けたことから (Fig. 8), PCG が、脈絡叢における有機アニオン能動輸送機構により認識される可能性が示唆された.²⁷⁾

一方、IPM の取り込みは、PCG と同様に、代謝阻害剤、SH 基修飾剤の影響を受けたものの、その K_m 値は、2 mM 以上であり、輸送系に対する親和性が低く、その結果として輸送性が低くなるものと考えられた.²¹⁾ なお、cilastatin による濃度依存的な阻害効果も観察されたが、*in vivo* 静脈内投与実験で検出された、脳脊髄液中 cilastatin 最大濃度にほぼ対応する 2 μM では、[^{14}C]IPM 取り込みに対し、有意な阻害効果を示さなかった.²¹⁾ したがって、*in vivo* 静脈内投与実験の条件下では cilastatin は IPM の脳脊髄液からの汲み出しに影響を与えないものと考えられた。

また、この輸送系により他の β -ラクタム抗生物質も輸送されることが、以下の検討により明らかとなった.²⁸⁾ すなわち、[^{14}C]CDZM も能動輸送により脈絡叢に取り込まれたが、(i) [^{14}C]CDZM の取り込みは、PCG により競合的に阻害され、その K_i 値 (101 μM) は PCG 輸送の K_m 値 (58 μM)²⁷⁾ とほぼ同等であること (Fig. 9), (ii) [^3H]PCG の取り込みは、CDZM により濃度依存的に阻害され、その IC_{50} (522 μM) は、CDZM 輸送の K_m 値 (470 μM) とほぼ同等であることが明らかとなり、これら抗生物質は、共通した輸送系により認識されるものと考えられた.²⁸⁾ さらに、16 種類の抗生物質の、[^3H]PCG 及び [^{14}C]CDZM に対する IC_{50} 値を決定し、比較したところ、両者には良好な相関 ($r=0.97, p<0.05$) が観察されたことから、一連の β -ラクタム抗生物質が、共通した輸送機構により認識されることが示唆された.²⁸⁾

Fig. 10. Relationship between the Lipophilicity and the Affinity for the Benzylpenicillin Transport System in the Choroid Plexus²⁷⁾

The lipophilicity was determined by determining the partition of antibiotics between isobutylalcohol and buffer (pH 7.3). The affinity was defined as $1/K_i$, where K_i represents the inhibition constant of antibiotics for the transport of benzylpenicillin. ○, penicillin derivatives without dissociating groups in the side chain; △, penicillin derivatives with negative charge in the side chain; □, penicillin derivatives with positive charge in the side chain; ●, cephalosporin derivatives without dissociating groups in the side chain; ▲, cephalosporin derivatives with negative charge in the side chain; ■, cephalosporin derivatives with positive charge in the side chain.

また、上述の阻害実験の結果から、IPM の他、ampicillin, amoxicillin 等の脳脊髄液移行性の高い抗生物質の、efflux 輸送系に対する親和性は低く、逆に PCG の他、cephalothin 等の脳脊髄液移行性の低い抗生物質の親和性は高いことから、脈絡叢を用いた輸送実験が、一連のβ-ラクタムの脳脊髄液移行性を定性的に判断する上でのスクリーニング系となりうることを示唆された。^{27,28)}

さらに、13 種類のペニシリン誘導体、16 種類のセファロスポリン誘導体の、 $[^3\text{H}]\text{PCG}$ 輸送に対する IC_{50} 値を決定し、各抗生物質の輸送系に対する親和性を求めた。Fig. 10 に示すように、セファロスポリン誘導体とは異なり、ペニシリン誘導体では、その脂溶性と親和性の間に、良好な相関が観察され、ペニシリン系抗生物質の基質認識には、母核 6 位測鎖の脂溶性が関与することが示唆された。また、この結果は、脂溶性の高い抗生物質ほど、脈絡叢を介して、脳脊髄液から循環血へと汲み出されやすいことを意味している。ここで、薬物の脳脊髄液移行が、血液から中枢への influx と、中枢から血液への efflux という、2 つの因子により規定されることを考慮すると、これらの実験結果は、脂溶性の高い（すなわち血液脳関門透過性の良好な）抗生物質の脳脊髄液移行性が、必ずしも高いとは限らないという従来からの観察結果²⁶⁾とも一致している。

4-3. In Vitro 及び in Vivo 実験系の定量的評価²⁹⁾ それでは、in vivo 脳室内投与実験で観察された PCG の汲み出しが、脈絡叢を介したものにより、定量的に説明されるであろうか。また、単離脈絡叢を用いた in vitro 実験の結果は、実際に脳脊髄液からの汲み出しを反映しており、この実験結果を in vivo へ外挿することができるのであろうか。これらの点については、in vivo 脳室内投与後の汲み出しの速度論パラメーターと、in vitro 取り込み実験で得られる輸送パラメーターを比較することにより検討を加えた。²⁹⁾

$[^3\text{H}]\text{PCG}$ 及び $[^{14}\text{C}]\text{mannitol}$ を、種々の投与量の probenecid, PCG あるいは 4 種類の抗生物

Fig. 11. Inhibitory Effect of Unlabeled Benzylpenicillin (A) and Probenecid (B) on the Transport of [^3H]Benzylpenicillin from the Cerebrospinal Fluid *in Vivo*²⁹⁾

An intracerebroventricular tracer dose of [^3H]benzylpenicillin ($0.60\ \mu\text{Ci}$) and [^{14}C]mannitol ($0.020\ \mu\text{Ci}$) with or without inhibitors was administered into the rat lateral ventricle. After 30 min, the radioactivity remaining in the cerebrospinal fluid was determined. ●, benzylpenicillin; ○, mannitol.

質 (CDZM, ampicillin, ceftriaxone, cefotaxime) と共に脳室内投与し、30 分後に脳脊髄液中のアイソトープ体、及び阻害剤濃度を測定した。また、PCG は、脳室内投与後 30 分までは、ほぼ mono-exponential 式に従って、脳脊髄液から消失する性質を利用し、[^3H]PCG の消失クリアランス CL_{CSF} を求めた。なお、解析に当たっては、 $V_{\text{CSF}}=250\ \mu\text{l}$ を仮定した。図に示すように、PCG の汲み出しは非標識 PCG, probenecid により濃度依存的に抑制され、過剰量存在下では、mannitol の消失クリアランスとほぼ同等にまで低下した。非標識体による飽和実験の結果を、

$$\frac{dC_{\text{CSF}}(t)}{dt} = \frac{-1}{V_{\text{CSF}}} \left(\frac{V_{\text{max}}}{K_m + C_{\text{CSF}}(t)} + CL_{\text{diff}} \right) \cdot C_{\text{CSF}}(t) \quad (9)$$

に、非線形最小二乗法により当てはめたところ (ここで $C_{\text{CSF}}(t)$ は、時間 t における脳脊髄液中濃度を、 CL_{diff} は、単純拡散による消失クリアランスをそれぞれ示す)、 $K_m=43.0 \pm 17.8\ \mu\text{M}$ 、 $V_{\text{max}}=619 \pm 286\ \text{pmol/min/rat}$ と求められた。上述の *in vivo* 実験により得られた K_m 値は、*in vitro* 実験から求められた値 $K_m=58\ \mu\text{M}$ ²⁷⁾ と同等であった。また、ラット当たりの脈絡叢組織量 ($6\ \mu\text{l}$) を考慮して *in vitro* 実験から得られた V_{max} を *in vivo* へ外挿すると、 $V_{\text{max}}=504\ \text{pmol/min/rat}$ と算出され、^{27,29)} これは *in vivo* 実験での結果と同等であった。²⁹⁾

さらに、同様な *in vivo* 阻害実験から求められた種々の抗生物質の K_i 値を、*in vitro* 実験で求められた値 (Fig. 12) と比較すると、両者には良好な一致がみられた (Fig 13).²⁹⁾ これらの結果から、主として脈絡叢が、 β -ラクタム抗生物質の脳脊髄液からの汲み出しを担っていること、また、単離脈絡叢を用いた *in vitro* 輸送実験が、脳脊髄液からの汲み出し輸送系を反映しており、*in vivo* での汲み出しを定量的に予測する上で有用な手法となりうることを示唆された。²⁹⁾

なお、脳室内に投与された PCG は、脈絡叢を介した汲み出しの他、(i) 脳脊髄液の bulk flow, (ii) 脳実質へ拡散後、血液脳関門を介した汲み出しによっても、脳脊髄液から消失するが、上述の結果を速度論解析することにより、それぞれのルートの寄与率は、64%, 12%, 24% となることが示され、脈絡叢を介した汲み出しを考慮することの重要性が示唆された。²⁹⁾

脈絡叢を介した汲み出しは、脳室内投与された抗生物質のみならず、静脈内投与された抗生物質の、脳脊髄液分布性に対しても影響を与える。²⁹⁾ 前述の distributed model に従うと、定常

Fig. 12. Effect of Organic Anions on the Tissue to Medium Concentration Ratio of $[^3\text{H}]$ -Benzylpenicillin²⁹⁾

Choroid plexus was incubated with or without organic anions for 3 min at 37°C in the medium containing $[^3\text{H}]$ benzylpenicillin ($0.10\ \mu\text{M}$). ▲, benzylpenicillin; △, probenecid; ●, cefodizime; ■, cefotaxime; ○, ampicillin; □, ceftriaxone.

Fig. 13. Relationship between the log Inhibitory Constant (K_i) Values Determined *in Vivo* and *in Vitro*²⁹⁾

Data for *in vivo* and *in vitro* experiments are taken from Figs. 11 and 12. Prob, probenecid; PCG, benzylpenicillin; ABPC, ampicillin; CDZM, cefodizime; CTX, cefotaxime; CTRX, ceftriaxone.

状態における脳脊髄液／血漿中非結合型濃度比 ($C_{\text{CSF}}/C_{\text{p,u}}$) は,

$$\frac{C_{\text{CSF}}}{C_{\text{p,u}}} = \frac{PS_1}{PS_2} \frac{Ar\sqrt{DtPS_2V_{\text{br}}}}{(Q_{\text{CSF}} + CL_{\text{CP}} + Ar\sqrt{DtPS_2V_{\text{br}}})} \quad (10)$$

により、与えられる。なお、この式は、式 (6) に極限定理を適用して求めたものである。式 (10) に、生理解剖学的パラメーター値 (Ar , Dt), PCG 固有のパラメーター値 (PS , Dt , CL_{CP}) を代入することにより、 $C_{\text{CSF}}/C_{\text{p,u}}$ を算出し、実測値との比較を試みた。その結果、脈絡叢における輸送を無視した場合、($CL_{\text{CP}}=0\ \mu\text{l/min}$), 予測値 (0.51) は、実測値 (0.017) を大幅に過大評価するのに対し、脈絡叢輸送を考慮すると、予測値は、0.14 にまで低下した。²⁹⁾ この結果は、循環血中に投与された抗生物質の脳脊髄液移行分布性を考える上でも、脈絡叢における汲み出し機構を考慮する必要性を示唆するものである。²⁹⁾ また、実測値と予測値の数倍の差は、上述のように、血液脳関門における asymmetric な輸送 ($PS_2 > PS_1$) を仮定することにより説明できる可能性もある。

4-4. 輸送機構の解析³⁰⁾ さらに、脈絡叢における有機アニオン輸送の機構について検討を加えた。従来より、輸送駆動力の決定には、膜小胞を作成し、*in vitro* 輸送実験を行う方法が用いられてきた。^{34,35)} しかしながら、脈絡叢のような組織では、動物当たり採取可能な組織量に限りがあるため、小胞の作成は困難である。そこで、細胞を代謝阻害剤で処理して ATP を枯渇させ、細胞内イオン組成を変える試みを行った。³⁰⁾ 腎尿細管上皮細胞では、有機アニオン輸送の駆動力として、anion exchanger が考えられていることから、³⁵⁾ 脈絡叢においても同様な輸送系が関与するものと考え、以下の検討を行った。

単離した脈絡叢を、rotenone $25\ \mu\text{M}$ 存在下で 20 分間処理したところ、ATP 量は $0.971 \pm 0.095\ \text{nmol/mg}$ 蛋白 (mean $\pm$ S.E., $n=12$) と、非処理群 ($27.4 \pm 3.1\ \text{nmol/mg}$ 蛋白) の 3.5% にまで低下した。³⁰⁾ 組織細胞内に KCl あるいは K-gluconate を preload した後、組織を $[^3\text{H}]$ PCG を含む

Fig. 14. Effect of an Inwardly Directed Cl^- Gradient on the Accumulation of Benzylpenicillin by the ATP-Depleted Choroid Plexus³⁰⁾

Choroid plexuses were preloaded with solution containing 25 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid-Tris, pH 7.4, 40 mM mannitol and 120 mM KCl (○) or 120 mM K gluconate (●). Accumulation of benzylpenicillin ($0.09 \mu\text{M}$) was then assayed in a medium containing 25 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid-Tris, pH 7.4, 40 mM mannitol and 120 mM K gluconate.

inside positive な膜電位によるものでないことを示すために、細胞内に Cl^- よりも膜透過性の高い SCN^- を負荷し、より inside negative な条件下で輸送実験を行った。その結果、外向き SCN^- による促進は、 Cl^- による促進ほど大きくないことが示され、 Cl^- の flux と直接連結した PCG 輸送が生じることが示された。³⁰⁾ この Cl^- により促進される輸送系は、 $K_m = 13.6 \mu\text{M}$ の飽和性を有し、さらに probenecid の他、anion exchange inhibitor の DIDS, SITS による阻害を受けたことから、anion exchanger の関与が示唆された。あわせて、この輸送系は、 Cl^- の他にも、陰イオンとして HCO_3^- , OH^- などをも受け入れることが示されたが、内向き Na^+ 勾配による促進効果は受けないことから、 Na^+ 非依存的なアニオン交換輸送系が関与することが示唆された。³⁰⁾

上述の実験結果を、脈絡叢における生理的なイオン濃度と考えあわせると、輸送スキームは、Fig. 15 のように示されるものと考えられる。³⁰⁾ すなわち、刷子縁膜上に存在する Na^+ , K^+ -AT-Pase の作用により、細胞内の Na^+ 濃度は低く保たれ、その結果として側底膜上に存在する Na^+ / H^+ 交換輸送系が駆動され、細胞内の H^+ の電気化学的ポテンシャルが低く保たれる。したがって、細胞内の OH^- 、さらに HCO_3^- の電気化学的ポテンシャルが増大し、これらの陰イオンのポテンシャル差に伴うエネルギーを、刷子縁膜上のアニオン交換輸送系が利用することにより、PCG 輸送が生じることが示唆された。³⁰⁾ しかしながら、輸送の thermodynamics を考慮した場合、単離脈絡叢で観察された PCG 輸送のすべてが、上述の anion exchanger により説明されるとは考えられないことから、³⁶⁾ 他の機構の関与等も含めた今後の検討を要する。

Fig. 15. Schematic Diagram Illustrating the Transport Systems in the Choroid Plexus³⁰⁾

K-gluconate 溶液中に移すことにより実験を開始した。Fig. 14 には、PCG 取り込みの経時変化を示すが、外向き Cl^- 濃度勾配存在下での overshoot が観察され、 Cl^- との交換輸送系の存在が示唆された。³⁰⁾ また、この overshoot は、プロトノフォア FCCP 存在下でも観察されたことから、外向き Cl^- 勾配により二次的に発生しうる pH 勾配による促進効果に依存するものではないことが確かめられた。³⁰⁾ さらに、overshoot が、外向き Cl^- 勾配により発生する

5. 脈絡叢における有機アニオン輸送系の基質特異性^{37,38)}

上述のように characterize された有機アニオン輸送系の基質特異性について検討を加えるため、さらに、キノロン系抗生物質の他、後天性免疫不全症候群の治療に用いられる核酸誘導体を用いて以下の解析を行った。

5-1. 脈絡叢におけるキノロン系抗生物質の輸送³⁷⁾ キノロン系抗生物質は、特に非ステロイド性抗炎症薬と併用した場合に、重篤な中枢性副作用を示すことが知られており、その中枢移行動態に関心が集められている。一連のキノロン系抗生物質は、物性の上からは有機アニオンに分類され、腎尿細管分泌を受ける³⁹⁾ことから、脈絡叢においても、上述の有機アニオン輸送系により認識される可能性が考えられたため、 $[^{14}\text{C}]$ Fleroxacin (FLRX) をモデル化合物として選び、検討を加えた。

FLRX の脈絡叢への取り込みは、代謝阻害剤 (rotenone $30\mu\text{M}$, FCCP $10\mu\text{M}$), SH 基修飾剤 (PCMBs $100\mu\text{M}$) により阻害され、飽和性を示したものの ($K_m=610\mu\text{M}$, $V_{\max}=213\text{ pmol/min}/\mu\text{l tissue}$), ouabain の効果は観察されず、 Na^+ 非依存性の能動輸送に基づくことが示唆された。³⁷⁾ また、PCG による濃度依存的な阻害も観察され、その IC_{50} は $32\mu\text{M}$ と、PCG の K_m とほぼ同等であり、さらに、 $[^3\text{H}]$ PCG 及び $[^{14}\text{C}]$ FLRX 取り込みに対する sparfloxacin, ofloxacin, AM-1155, probenecid の IC_{50} 値を決定し、比較したところ、両者には良好な相関がみられたことから (Fig. 16), これらのキノロン系抗生物質は、PCG と同様に、有機アニオン輸送系により輸送されることが示唆された。³⁷⁾ 上述の *in vitro*

Fig. 16. Correlation between the Inhibitory Effects of Benzylpenicillin, Probenecid, and Four Kinds of New Quinolones on the Accumulation of $[^{14}\text{C}]$ Fleroxacin and Those on the Accumulation of $[^3\text{H}]$ Benzylpenicillin

FLRX, fleroxacin; SPFX, sparfloxacin; OFLX, ofloxacin.

実験により求められた FLRX の速度論パラメーターを、*in vivo* へと外挿すると、治療濃度 (線形領域) においては、脈絡叢における能動的汲み出しクリアランス ($3.5\mu\text{l/min}$) は、脳脊髄液の bulk flow rate ($2.9\mu\text{l/min}$) とほぼ同等であることから、この輸送系は、キノロン系抗生物質の脳脊髄液分布を低下させる機能を、少なくとも一部、担うものと考えられた。

5-2. 脈絡叢における核酸誘導体の輸送³⁸⁾ Azidothymidine (AZT), dideoxyinosine (DDI) は、いずれも後天性免疫不全症候群の治療に用いられ、付随して生ずる痴呆症の症状を軽減させる目的で用いられるため、その中枢内移行に興味をもたれている。

静脈内投与後の偽定常状態における、脳脊髄液/血漿中濃度比は、AZT では約 0.2 である⁴⁰⁾のに対し、DDI では約 0.02 程度⁴¹⁾と、十倍の差が認められている。また、probenecid 併用時には、両化合物の脳脊髄液移行性は上昇し、上述の比の値は、AZT, DDI それぞれに対して約 0.3, 0.06 程度にまで上昇することが報告されている。^{40,41)} これらの結果は、両化合物とも、脳脊髄液から有機アニオン輸送系により、能動的に汲み出されると考えることにより、説明される。また、この汲み出し機構に対する親和性の差により、両化合物の脳脊髄液移行性の差が生ずる可能性も考えられたことから、以下の検討を加えた。³⁸⁾

まず、PCG 取り込みに対する AZT, DDI の阻害様式を決定したところ、両化合物は競合阻害を示し (Fig. 17; それぞれの K_i 値は $85 \pm 13\mu\text{M}$ 並びに $155 \pm 22\mu\text{M}$)、これら核酸誘導体も有機

Fig. 17. Concentration Dependency of the Tissue to Medium Concentration of [^3H]Benzylpenicillin

Inhibitory effect of azidothymidine (AZT, A) and dideoxyinosine (DDI, B) is also shown. Choroid plexus was incubated with or without AZT ($100\ \mu\text{M}$) or DDI ($100\ \mu\text{M}$) for 3 min at 37°C in the medium containing [^3H]benzylpenicillin ($0.30\ \mu\text{M}$). ●, control; ○, with azidothymidine or dideoxyinosine.

Fig. 18. Time Profiles for the Accumulation of [^3H]Azidothymidine (AZT, A) and [^3H]-Dideoxyinosine (DDI, B) by the Rat Choroid Plexus

Choroid plexus was incubated at 37°C in the medium containing [^3H]azidothymidine ($0.37\ \mu\text{M}$) or [^3H]dideoxyinosine ($0.025\ \mu\text{M}$). Left panel shows the accumulation of [^3H]-AZT in the presence (○) and absence (●) of unlabeled AZT ($1\ \text{mM}$). Right panel shows the accumulation of [^3H]DDI in the presence (□) and absence (■) of unlabeled DDI ($1\ \text{mM}$).

アニオン輸送系により認識されることが示唆された。

次に, [^3H]AZT, [^3H]DDI の輸送を測定した (Fig. 18). [^3H]DDI の輸送は, 飽和性を有し, ($K_m = 30 \pm 5\ \mu\text{M}$), 代謝阻害剤 (FCCP $10\ \mu\text{M}$, rotenone $30\ \mu\text{M}$), SH 基修飾剤 (PCMB, PCMBS 各 $100\ \mu\text{M}$) により阻害されたものの, 外液の Na^+ を *N*-methyl-D-glucamine に置換しても影響を受けないことから, Na^+ 非依存性の能動輸送によるものと考えられた。また, PCG により, 濃度依存的な阻害 ($\text{IC}_{50} = 86 \pm 12\ \mu\text{M}$) を受けたことから, PCG と同様, 有機アニオン輸送系により, 輸送されるものと考えられた。一方, [^3H]AZT の取り込みは全く観察されず (Fig. 18), AZT はこの輸送系により認識はされるものの, 輸送は受けないことが示された。これらの *in*

vitro 実験結果を *in vivo* へ外挿すると, AZT の脳脊髄液からの消失クリアランスは, 脳脊髄液の bulk flow rate と等しい ($2.9 \mu\text{l}/\text{min}$) のに対し, DDI の場合には, 能動輸送系の関与も考慮する必要がある, AZT の約 2 倍 ($5.6 \mu\text{l}/\text{min}$) と見積られた. したがって, 静脈内投与後に観察された両化合物の脳脊髄液移行性の差は, 脈絡叢を介した汲み出しの差のみによっては説明されず, 血液脳関門を介した取り込み (influx) 及び排出 (efflux) 能力の差など, 他の因子をも考慮する必要がある. 最近, Dedrick らのグループ¹⁵⁾ は, microdialysis の手法を用いて, (i) AZT が血液脳関門において, 脳細胞外液から血液の方向に, probenecid 感受性の機構により輸送されること, (ii) 上述の向きのクリアランスが, 血液から脳細胞外液への透過クリアランスを, 4 倍程度上回る可能性があることを示し, 血液脳関門における, AZT の asymmetric な輸送系の存在を示唆した. このような輸送系を仮定することにより, probenecid 併用時の AZT の脳脊髄液移行性の上昇も説明することができるものと考えられる. また, 血液から脳脊髄液への取り込み過程に対しても, 特異的な機構が, 恐らくは, 脈絡叢に存在する可能性も示唆されており,^{42,43)} これらの因子の影響に対してもさらに定量的な評価が必要となろう.

6. 脈絡叢における有機カチオン輸送系の解析

次に, 脈絡叢における有機カチオン輸送系について知見を得るため, ヒスタミン H_2 受容体遮断剤 cimetidine (CMD) をモデル化合物として検討を加えた. CMD は, 消化性潰瘍治療薬として用いられるが, 中枢性副作用を有することが報告されている. Ziemniak ら⁴⁴⁾ は, イヌに CMD を静脈内投与後の脳脊髄液中濃度の推移を測定し, 得られた結果を速度論解析することにより, CMD は脳脊髄液から能動的に汲み出される可能性を示唆した.⁴⁴⁾ この輸送機構について, 以下のようにさらに検討を加えた.

まず, CMD が脳脊髄液から血液へと汲み出されることを直接示すために, *in situ* 脳脊髄液灌流を行った.⁴⁵⁾ この方法では, 側脳室に inflow の, 延髄小脳溝に outflow のカテーテルを施し, 脳室系を灌流するものである. 灌流液には, [^3H]CMD の他, 単純拡散のマーカーとして, [^{14}C]sucrose を含めた. Sucrose により補正された CMD の抽出率 (E_{corr}) を

$$E_{\text{corr}} = 1 - (C_{\text{out}}/C_{\text{in}})_{\text{CMD}} / (C_{\text{out}}/C_{\text{in}})_{\text{sucrose}} \quad (11)$$

により定義したが, ここで, C_{in} 及び C_{out} は, それぞれ調製した灌流液及び流出液中化合物濃度を示す. Fig. 19 に示すように, CMD の E_{corr} は, 非標識体 4 mM 存在下で, 有意に低下したことから, CMD が脳脊髄液から飽和性を有する機構により消失することが示された.⁴⁵⁾

そこで, この飽和性を有する汲み出し機構を担うと考えられる脈絡叢を単離し, [^3H]CMD 輸送実験を行った.^{46,47)} その結果, CMD 輸送は, $K_m = 53 \mu\text{M}$ の飽和性を有し, 代謝阻害剤 (KCN, 2,4-dinitrophenol 各 1 mM), SH 基修飾剤 (PHMB $100 \mu\text{M}$) による阻害を受け, さらに $Q_{10} = 4.5$ と観察されたことから, 能動輸送によるものと考えられた.⁴⁶⁾ CMD 輸送は ouabain による影響を受けないことから, この輸送系

Fig. 19. Time profiles for the Extraction Ratio of [^3H]Cimetidine⁴⁵⁾

Ventriculo-cisternal perfusion was carried out using the medium containing [^3H]cimetidine (14 nM). The extraction ratio was determined according to eq. 11. ○, control; ●, unlabeled cimetidine (4 mM) was added to the perfusate. * Significantly lower than control value with $p < 0.05$. ** Significantly lower than control value with $p < 0.01$.

Fig. 20. Effect of Organic Cations on the Tissue to Medium Concentration Ratio of $[^3\text{H}]$ -Cimetidine⁴⁶⁾

Choroid plexus was incubated with or without inhibitors for 3 min at 37°C in the medium containing $[^3\text{H}]$ cimetidine (0.22 μM). *Significantly lower than control value with $p < 0.05$. **Significantly lower than control value with $p < 0.01$.

Fig. 21. Effect of Organic Anions on the Tissue to Medium Concentration Ratio of $[^3\text{H}]$ -Cimetidine⁴⁶⁾

Choroid plexus was incubated with or without inhibitors for 3 min at 37°C in the medium containing $[^3\text{H}]$ cimetidine (0.22 μM). *Significantly lower than control value with $p < 0.05$. **Significantly lower than control value with $p < 0.01$.

は、 Na^+ 非依存性であることが示された。⁴⁶⁾

CMD 輸送に及ぼす種々化合物の阻害効果についても検討を加えた。N¹-Methylnicotinamide (NMN), choline, tetraethylammonium (TEA) 等の水溶性有機カチオンは、20 mM においても CMD 輸送に影響を与えなかったが、quinine, quinidine 等の脂溶性カチオン 100 μM による阻害が観察された (Fig. 20). また、 $[^{14}\text{C}]$ TEA 取り込みに対して、CMD (1 mM) は影響を及ぼさなかった。一方、有機アニオン 5-hydroxyindoleacetic acid, *p*-aminohippuric acid, homovanillic acid 等の内在性有機アニオンの他、PCG, salicylic acid 等の有機アニオン各 1 mM による阻害効果も観察された (Fig. 21). さらに、 $[^3\text{H}]$ PCG, $[^{14}\text{C}]$ salicylic acid の取り込みに対して、CMD (1 mM) は阻害効果を示した。この *in vitro* 実験結果は、*in vivo* 脳室内投与実験によっても確認された (Fig. 22).⁴⁸⁾ すなわち、 $[^3\text{H}]$ CMD と共に、非標識の NMN, PCG を同時に脳室内に投与し、 $[^3\text{H}]$ CMD の脳脊髄液中濃度推移を測定したところ、NMN の効果は観察されず、PCG による阻害が観察された。

従来より、脈絡叢は、腎尿細管上皮細胞と類似した輸送系を有するものと考えられてきた。腎尿細管上皮細胞膜上には、一部若干の基質特異性のオーバーラップが見られるものの、^{49, 50)} 有機カチオン及び有機アニオンに対するそれぞれ独立した輸送系が存在し、前者の輸送系は、CMD をはじめとして NMN, TEA, quinine, quinidine 等を基質として認識することが明らかとされている。本研究結果を考慮すると、脈絡叢上皮細胞と、腎尿細管上皮細胞における有機カチオン輸送系の基質認識性の差が認められたものと考えられる。

なお、Giacomini らのグループ⁵¹⁾ は、ウシ脈絡叢より、刷子縁膜小胞を作成し、 $[^3\text{H}]$ CMD の

Fig. 22. Effect of Unlabeled Cimetidine, *N*¹-Methylnicotinamide (NMN) and Benzylpenicillin on the Efflux of [³H]Cimetidine from the Cerebrospinal Fluid⁴⁷⁾

An intracerebroventricular tracer dose of [³H]cimetidine (1.2 μ Ci) and [¹⁴C]inulin (0.004 μ Ci) was administered into the rat lateral ventricle with or without unlabeled cimetidine (80 μ mol; a), NMN (80 μ mol; b) and benzylpenicillin (80 μ mol; c). At fixed times, the radioactivity remaining in the cerebrospinal fluid was determined. Circles, [³H]cimetidine concentration; Triangles, [¹⁴C]inulin concentration; Open symbols, without unlabeled substrates; Closed symbols, with unlabeled substrates.

輸送について検討を加えている。膜小胞レベルにおいても、quinidine (100 μ M) の阻害効果は認められるものの、NMN, TEA (各 20 mM) の効果は認められず、筆者らの結果と同様な結論が得られている。しかしながら、膜小胞を用いた研究では、有機アニオンの効果が観察されていないことから、今後、種差等も含め、両輸送系の多様性、基質認識特異性に関する検討が必要となろう。

おわりに

中枢神経系への異物侵入を防御する機構の実体として、血液脳関門を形成する内皮細胞間の **tight junction** の存在が明らかとされたため、薬物の中枢移行研究は、主としてこの関門を介した **influx** に焦点をあてたものが展開されてきた。一方で、最近では、P-糖蛋白が血液脳関門にも存在することが明らかとされ、内皮細胞が、ピンカアルカロイド等を汲み出すことによって、関門としての機能が形成されることが示唆されている。筆者らの解析の結果からも、有機アニオンに対する **efflux** ポンプが、血液脳関門、血液脳脊髄液関門に存在することが示されてきた。これらを考慮すると、血液脳関門、血液脳脊髄液関門は、従来提唱されてきたように、単に、中枢への侵入を防ぐ壁としての機能を有するのみならず、ひとたび関門を通り超えて侵入した異物を、積極的に排除する機能を有することにより、中枢神経系の恒常性を保つ上での、重要な役割を果たすものと考えられる。したがって、これらの排除機能を特異的に阻害することによっても、薬物の中枢移行性を上昇させることが可能となろう。このような方法論を開発する上でも、輸送担体の分子的理解が必要である。また、本文中でも強調したように、中枢神経系における薬物分布を総合的に捉えるためには、各関門透過性の理解のみならず、脳実質組織内拡散、細胞成分との相互作用をも考慮する必要がある。本報で展開した生理学的速度論モデルは、これらの諸因子を統合して、薬物の中枢神経系内分布を記述する上で有用であり、薬物治療に対し、新たな指針を与えうるものと考えられる。

謝辞 本研究は、東京大学薬学部名誉教授（現 日本大学薬学部教授）花野 学先生、東京大学医学部教授 伊賀立二先生、東京大学医学部助教授 澤田康文先生、東京大学薬学部助教授 寺崎哲也先生の御指導により展開したもので、深く感謝致します。引用文献で共著者となられた方々に深く感謝致します。

引用文献

- 1) E. A. Neuwelt, "Implication of the Blood-Brain Barrier and Its Manipulation", Plenum, New York, 1989.
- 2) W. M. Pardridge, "Peptide Drug Delivery to the Brain", Raven Press, New York, 1991.
- 3) a) 杉山雄一, 薬物動態, 1, 87 (1986); b) 鈴木洋史, *ibid.*, 4, 211 (1989).
- 4) 杉山雄一, 鈴木洋史, "医薬品の開発第 17 巻," 中島輝躬, 永井恒司 (編), 広川書店, 東京, 1990, pp. 177—204.
- 5) 鈴木洋史, "ファーマコキネティクス研究の方法と技術," 杉山雄一 (編), 日本薬物動態学会, 東京, 1993, pp. 227—244.
- 6) C. E. Johanson, "Neuromethods: The Neuronal Microenvironment," ed. by A. A. Boulton, G. B. Backer, Humana Press, New Jersey, 1988, pp. 33—104.
- 7) J. M. Collins, R. L. Dedrick, *Am. J. Physiol.*, 245, R303 (1983).
- 8) J. M. Collins, *J. Neuro-Oncol.*, 1, 283 (1983).
- 9) H. Matsushita, H. Suzuki, Y. Sugiyama, Y. Sawada, T. Iga, Y. Kawaguchi, M. Hanano, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 259, 620 (1991).
- 10) 鈴木洋史, 花野 学, 杉山雄一, 第 13 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム講演要旨集, 1991, pp. 70—73.
- 11) C. S. Patlak, J. D. Fenstermacher, *Am. J. Physiol.*, 229, 877 (1975).
- 12) J. D. Fenstermacher, T. Kaye, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 531, 29 (1988).
- 13) P. F. Morrison, P. M. Bungay, J. K. Hsiao, I. N. Mefford, K. H. Dykstra, R. L. Dedrick, "Microdialysis in the Neurosciences," ed. by T. E. Robinson, J. B. Justice, Elsevier, Amsterdam, 1991, pp. 47—80.
- 14) E. M. Cornford, C. P. Diep, W. M. Pardridge, *J. Neurochem.*, 44, 1541 (1985).
- 15) K. H. Dykstra, A. Arya, E. M. Arriola, P. M. Bungay, P. F. Morrison, R. L. Dedrick, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 267, 1227 (1993).
- 16) T. Tsuji, T. Terasaki, T. Takabatake, Y. Tenda, I. Tamai, T. Yamashita, S. Moritani, T. Tsuruo, J. Yamashita, *Life Sci.*, 51, 1427 (1992).
- 17) T. Tatsuta, M. Naito, T. Oh-hara, I. Sugawara, T. Tsuruo, *J. Biol. Chem.*, 267, 20383 (1992).
- 18) A. H. Schinkel, J. J. M. Smit, O. van Tellingen, J. H. Beijnen, E. Wagenaar, L. van Deemter, C. A. A. M. Mol, M. A. van der Valk, E. C. Rovanus-Maandag, J. P. J. te Riele, A. J. M. Berns, P. Borst, *Cell*, 77, 491 (1994).
- 19) 鈴木洋史, "生物薬剤学 最近の進歩," 伊賀立二, 奥村勝彦 (編), 薬業時報社, 東京, 1989, pp. 262—273.
- 20) H. Suzuki, Y. Sawada, Y. Sugiyama, T. Iga, M. Hanano, *J. Pharmacobio-Dyn.*, 12, 182 (1989).
- 21) H. Suzuki, Y. Sawada, Y. Sugiyama, T. Iga, M. Hanano, R. Spector, *J. Pharmacol. Exp.*

- Ther.*, **250**, 979 (1989).
- 22) R. Spector, *J. Infect. Dis.*, **156**, 209 (1987).
- 23) H. Matsushita, H. Suzuki, Y. Sugiyama, Y. Sawada, T. Iga, Y. Kawaguchi, M. Hanano, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **260**, 499 (1992).
- 24) J. R. Lapointe, C. Beliveau, L. Chicoine, J. H. Joncas, *J. Antimicrobial. Chemother.*, **14** (suppl. B), 167 (1984).
- 25) G. H. McCracken, J. D. Nelson, S. L. Kaplan, G. D. Overturf, W. H. Rodrigues, R. W. Steel, *Pediatr. Infect. Dis. J.*, **6**, 501 (1987).
- 26) 小林 裕, 臨床と研究, **63**, 2160 (1986).
- 27) H. Suzuki, Y. Sawada, Y. Sugiyama, T. Iga, M. Hanano, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **242**, 660 (1987).
- 28) T. Nohjoh, H. Suzuki, Y. Sawada, Y. Sugiyama, T. Iga, M. Hanano, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **250**, 324 (1989).
- 29) M. Ogawa, H. Suzuki, Y. Sawada, M. Hanano, Y. Sugiyama, *Am. J. Physiol.*, **266**, R392 (1994).
- 30) H. Suzuki, Y. Sawada, Y. Sugiyama, T. Iga, M. Hanano, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **243**, 1147 (1987).
- 31) R. Spector, A. V. Lorenzo, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **188**, 55 (1974).
- 32) R. Spector, A. V. Lorenzo, *J. Clin. Invest.*, **54**, 316 (1974).
- 33) R. Spector, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **236**, 380 (1986).
- 34) 乾 賢一, 薬誌, **108**, 921 (1988).
- 35) J. B. Pritchard, D. S. Miller, *Physiol. Rev.*, **73**, 765 (1993).
- 36) P. S. Aronson, *Am. J. Physiol.*, **240**, F1 (1981).
- 37) 大家 毅, 鈴木洋史, 寺崎哲也, 杉山雄一, 日本薬学会第 113 年会講演要旨集, 1993, p. 12.
- 38) 高沢克子, 鈴木洋史, 寺崎哲也, 杉山雄一, 日本薬学会第 113 年会講演要旨集, 1993, p. 12.
- 39) F. Sorgel, U. Jaehde, K. Naber, U. Stephan, *Clin. Pharmacokin.*, **16** (suppl. 1), 5 (1989).
- 40) R. J. Sawchuk, M. A. Hedaya, *Pharm. Res.*, **7**, 332 (1990).
- 41) R. E. Galinsky, K. K. Flaharty, B. L. Hoesterey, B. D. Aronson, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **257**, 972 (1991).
- 42) J. M. Collins, R. W. Klecker, Jr, J. A. Kelley, J. S. Roth, C. L. McCully, F. M. Balis, D. G. Poplack, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **245**, 466 (1988).
- 43) T. Terasaki, W. M. Pardridge, *J. Infect. Dis.*, **158**, 630 (1988).
- 44) J. A. Ziemniak, R. G. Shank, J. J. Schentag, *Drug Metab. Dispos.*, **12**, 217 (1984).
- 45) H. Suzuki, Y. Sawada, Y. Sugiyama, T. Iga, M. Hanano, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **8**, 73 (1985).
- 46) H. Suzuki, Y. Sawada, Y. Sugiyama, T. Iga, M. Hanano, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **239**, 927 (1986).
- 47) H. Suzuki, Y. Sawada, Y. Sugiyama, T. Iga, M. Hanano, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **9**, 327 (1986).
- 48) H. Suzuki, Y. Sawada, Y. Sugiyama, T. Iga, M. Hanano, *Drug Metab. Dispos.*, **16**, 328

(1988).

- 49) T. D. McKinney, P. Myers, K. V. Speeg, Jr, *Am. J. Physiol.*, **241**, F69 (1981).
- 50) L. Gisclon, F. M. Wong, K. M. Giacomini, *Am. J. Physiol.*, **253**, F141 (1987).
- 51) M. T. Whittico, G. Yuan, K. M. Giacomini, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **255**, 615 (1990).