薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
117 (7) 415-434 (1997)

トランスポーターを介した薬物吸収の分子機構論的研究

玉井郁巳

金沢大学薬学部, 〒920 金沢市宝町 13-1

**Molecular Characterization of Intestinal Absorption of Drugs
by Carrier-Mediated Transport Mechanisms**

Ikumi TAMAI

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kanazawa University,
13-1 Takara-machi, Kanazawa 920, Japan*

(Received March 31, 1997)

It has long been thought that intestinal absorption of most of the drugs proceeds by passive diffusion mechanism, in which lipid solubility of the drug molecule is a determinant factor. However, water-soluble natural compounds such as amino acids and sugars can move across cell membranes by the specialized carrier-mediated transport mechanisms.

Although some drugs which are structurally analogous to natural compounds have been suggested to be absorbed by such transporters, no clear evidence for the involvement of carrier-mediated transport mechanisms has been obtained. In the present study, through the approaches by means of the molecular cloning and functional expression of drug transporters as well as membrane physiological analysis for the drug transport across the intestinal epithelial cell membranes, participation of the carrier-mediated transport mechanisms for the drug absorption was clarified. They include peptide transporter, monocarboxylic acid transporter, anion antiporter, and P-glycoprotein. Most of them have a function for the uptake of drugs into epithelial cells, leading to the increased absorption of drugs, whereas P-glycoprotein excludes drugs into the lumen, thereby decreasing the apparent absorbability of drugs.

A rat intestinal monocarboxylic acid-proton cotransporter, MCT1, and an anion antiporter, AE2, were suggested to contribute to the pH-dependent intestinal absorption of monocarboxylic acids such as benzoic acid, lactic acid, nicotinic acid, and valproic acid.

An involvement of such pH-dependent transporters in the intestinal absorption of weak organic acids is important, because they may have an alternative mechanism against passive diffusion according to the pH-partition hypothesis. PepT1 cloned from rat intestinal epithelial cells as a peptide transporter was clarified to localize at the intestinal epithelial brush-border membrane and to function for the absorption of β -lactam antibiotics by the proton-gradient energized mechanism. In contrast, P-glycoprotein functions for the secretion of drugs into the intestinal lumen, thereby decreasing intestinal absorption of an

immunosuppressive, cyclosporin A and a 5-HT₃ receptor antagonist, azasetron.

These lines of studies on the clarification of carrier-mediated drug absorption mechanisms will provide new knowledge for the strategies to the enhancement of intestinal absorption of drugs.

Key words—transporter; intestinal absorption; carrier-mediated transport; peptide; monocarboxylic acid; P-glycoprotein

はじめに

薬物の生体膜透過は、古くから薬物分子の脂溶性に従う単純拡散機構により進行し、イオン性薬物については非解離形分子のみが pH-分配仮説に従って膜透過するものと考えられてきた。したがって、例えば消化管吸収性や組織移行性を促進させるために、薬物分子の脂溶性を増大させる手法が一般的に試みられる。しかし、薬物分子の物理化学的性状値が同程度であっても実測される各薬物の小腸上皮細胞膜透過性や組織移行性は幅広い分布を示し、必ずしも一定ではない。すなわち薬物の生体膜透過過程にはより複雑な膜輸送機構の関与が推測され、生体特異的な担体介在輸送機構が関与している可能性が高い。水溶性の生理的物質である糖やアミノ酸などに対しては各組織は特異的な膜輸送媒体であるトランスポーターを備えており、積極的な栄養性物質の摂取あるいは細胞内外での物質交換が広く認められている。そのような生理的トランスポーターが構造類似薬物も基質として受け入れ、薬物の膜透過機構として機能していることは十分に考えられる。実際に、従来より腎臓の近位尿細管上皮細胞や肝臓の実質細胞膜を経た尿中あるいは胆汁中排泄過程におけるトランスポーターを介した特異的機構の存在が示されてきた。一方、小腸や胎盤あるいは脈絡叢などの上皮性細胞や脳毛細血管内皮細胞などにおいては、脂溶性に依存する単純拡散ではなく、トランスポーターが関与する特異的膜輸送機構によって薬物が細胞膜を透過することが一部示唆されている。しかし、それらトランスポーターの関与の有無については議論の対象となっており、また薬物動態影響因子としての重要性についても十分理解されないままであった。これら種々化合物の生体膜透過機構を明らかにすることは、生体機能の解明のみならず、薬物の消化管吸収性増大など臓器移行性制御手法を「脂溶性」という観点から「トランスポーターによる認識性」という観点到に転換するという新しい考え方を示すものとなる。^{1,2)} そこで本研究では、形態的・機能的に複雑な臓器で、しかも薬物の経口デリバリーに重要な小腸上皮細胞膜透過過程に焦点を当て、薬物動態におけるトランスポーターの役割について、その実体を分子レベルで解析し、機能特性並びに臓器間相関性を明らかにすることを試みた。なお、本研究では以下に述べるようなモノカルボン酸系化合物、並びにペプチド様化合物の消化管吸収に対して働くモノカルボン酸輸送系（プロトン共輸送体及びアニオン逆輸送体）、並びにペプチド／プロトン共輸送体について、さらに種々化合物の消化管腔内への分泌に働く P-糖蛋白質などの薬物トランスポーター群の分子論的解析を基に、その薬物動態的重要性を明らかにした。

モノカルボン酸系化合物の消化管吸収

弱酸・弱塩基性化合物の膜透過は、非イオン形分子が単純拡散によって細胞膜を透過するという、1950年代に提唱された pH-分配仮説によって説明されてきた。しかし、皮膚吸収などと異なり、小腸において観測される弱酸性化合物の小腸からの吸収-pH プロファイルから得られる各化合物の見かけの pK_a 値は、真の pK_a 値に比してアルカリ pH 側へシフトする。このように pH-分配仮説からの偏差が生じる理由として小腸の形態的・機能的特徴に基づいて、(1) vir-

tual pH の存在, (2) イオン化分子の膜透過, (3) 酸性 microclimate pH 環境の存在, (4) 上皮細胞膜近傍における非攪拌水層透過律速, などが提唱された。しかし, このような単純拡散機構による膜透過を基盤とした種々 pH-分配仮説の修正理論は必ずしもすべての偏差を説明するものではなかった。これらに対して, 本研究では, 「弱酸性化合物の消化管吸収に見られるみかけの pK_a 値のアルカリ pH 側へのシフトは, pH 依存的トランスポーターの関与に起因している」という新規な仮説を立て, その実証を試みた。

酢酸やプロピオン酸などの短鎖脂肪酸の消化管吸収機構については, 一部担体介在型輸送を示唆する報告はあったが, 一般的には受動拡散であることが広く受け入れられてきた。そこでまず酢酸の上皮細胞刷子縁膜輸送を測定した。

Fig. 1 にはウサギ小腸刷子縁膜小胞, 及びリン脂質から合成したリポソームへの放射性標識化した酢酸の初期取り込みに対する pH 効果を示す。いずれの場合にも取り込みには酸性領域で増大する著しい pH 依存性が観測された。また, 高濃度の非標識体存在下では, 刷子縁膜小胞への取り込みは著しく低下したが, リポソームへの取り込みには非標識体効果が見られなかった。この非標識体効果は, 刷子縁膜とリポソームの相違点として特徴的な, 膜タンパクの

関与, すなわちトランスポーターの関与を示唆するものである。³⁾ さらに, 放射性標識した酢酸及びニコチン酸のウサギ小腸刷子縁膜小胞への取り込みを継時的に測定した。⁴⁻⁶⁾ その結果を Fig. 2 に示すが, 膜小胞内へのプロトン勾配, あるいは膜小胞外への重炭酸イオン勾配存在下で初期取り込みが一過性に促進されるオーバーシュート現象が観測され, さらに両イオン勾配存在下では相乗的な取り込みの促進が観測された。乳酸については同様のプロトン勾配存在下での取り込み促進などの現象から, プロトン共輸送体を介した膜透過機構が報告されており,⁷⁾ 本結果はそれと対応するものであるが, 同様にニコチン酸もプロトン共輸送され, しかも両化合物とも重炭酸イオンと逆輸送されるという新しい輸送特性を見出すことができた。⁴⁻⁶⁾ さらに, 重炭酸イオン依存的取り込みの pH 依存性を測定したところ, Fig. 3 に示すように重炭酸イオン存在下及び非存在下の差として表された取り込み活性は酸性 pH で増加する傾向があり, 重炭酸イオン逆輸送系も酸性 pH で促進される pH 依存性を有することが示された。Table 1 にはニコチン酸取り込みに対する種々化合物の阻害効果を, プロトン共輸送と重炭酸イオン逆輸送とを区別して測定した結果を示す。用いたすべてのモノカルボン酸系化合物による競合阻害が観測されたが, ジカルボン酸, トリカルボン酸あるいは胆汁酸による阻害は観

Fig. 1. Effect of Outer Medium pH on the Initial Uptake of [^3H]Acetic Acid by Rabbit Intestinal Brush-Border Membrane Vesicles (A) and by Egg Yolk Liposomes (B)

The initial uptake rates of [^3H]acetic acid were determined at 10 s in the presence (closed) or absence (open) of an excess amount of unlabeled acetic acid. Each point represents mean $\pm$ S.E. of three to five experiments.

Fig. 2. Time Courses of [^{14}C]Nicotinic Acid and [^{14}C]Lactic Acid Uptake by Rabbit Intestinal Brush-Border Membrane Vesicles

Closed circle, open circle, and closed square represent the results obtained in the presence of both of bicarbonate ion and proton, proton, and bicarbonate ion gradients, respectively. Open square represents the results obtained in the absence of any ion gradient. Each point represents mean $\pm$ S.E. of three to four experiments.

測されず、さらに構造類似体のニコチンアミドも全く影響を及ぼさないため、モノカルボン酸に特異的な輸送機構であることが明らかになった。また、両輸送系とも極めて類似した基質認識特性を有するものと推測された。なお、阻害効果を示した化合物が必ずしもニコチン酸と同様に輸送されとは限らないため、阻害効果を示したモノカルボン酸について刷子縁膜小胞への初期取り込みを測定した。Fig. 4 には、プロトン勾配及び重炭酸イオン勾配存在下における初期取り込みを、いずれのイオン勾配も存在しない場合の取り込み値に対する相対値として示した。乳酸やニコチン酸と同様に、酢酸、安息香酸、バルプロ酸については程度に差はあるが、いずれの取り込みもプロトン勾配並びに重炭酸イオン勾配存在下で増大した。^{8,9)} 一方、高脂血症治療薬のプラバスタチン及びその部分構造を有するメバロン酸においては、プロトン勾配による取り込み促進は観測されたが、重炭酸イオンによる促進効果は得られなかった。本結果は Table 1 の阻害効果から推測される両輸送機構の基質認識性の共通性とは相反している。また、それまで得られていた結果からのみでは、プロトン及び重炭酸イオン勾配依存性を示す両モノカルボン酸輸送系が独立して存在するのか、あるいは単一のトランスポーターが両イオン勾配を同時に駆動力として利用しているかの明確な区別化はなされていなかった。したがって、化合物によっては一方のイオン勾配しか利用できないという Fig. 4 で得られた結果は、モ

Fig. 3. Extravesicular pH Dependence of [^{14}C]-Nicotinic Acid Uptake by Rabbit Intestinal Brush-Border Membrane Vesicles

Initial uptake of [^{14}C]nicotinic acid was measured in the presence (open circle) or absence (closed circle) of bicarbonate ion in the membrane vesicles. Uptake shown by triangle is the bicarbonate ion dependent uptake obtained as the difference between open and closed circles. Each point represents the mean $\pm$ S.E. of three to six experiments.

Table 1. Inhibitory Effects of Various Compounds on [14 C]Nicotinic Acid Uptake by Rabbit Jejunal BBMV's

Inhibitors	Relative Uptake (% of Control)	
	Bicarbonate-gradient	Proton-gradient
Acetic acid	15.4 $\pm$ 4.0*	20.2 $\pm$ 0.87*
Benzoic acid	(not detected)*	16.9 $\pm$ 1.3*
D-Lactic acid	37.1 $\pm$ 2.1*	28.4 $\pm$ 7.6*
L-Lactic acid	55.3 $\pm$ 3.5*	31.1 $\pm$ 1.4*
Pravastatin	48.1 $\pm$ 4.0*	9.72 $\pm$ 0.66*
Valproic acid	2.6 $\pm$ 2.2*	10.4 $\pm$ 0.4*
Citric acid	97.9 $\pm$ 3.5	103.4 $\pm$ 1.5
Nicotinamide	87.8 $\pm$ 5.1	97.4 $\pm$ 4.0
Phenylalanine	97.9 $\pm$ 6.6	104.7 $\pm$ 2.6
Phthalic acid	100.4 $\pm$ 7.5	96.0 $\pm$ 5.6
Succinic acid	97.3 $\pm$ 8.9	103.6 $\pm$ 5.5
Taurocholic acid	85.1 $\pm$ 4.0	101.7 $\pm$ 5.7

BBMV's were preloaded with 25 mM HEPES-Tris buffer (pH 7.5) containing, either 30 mM KHCO_3 (bicarbonate-gradient) or 30 mM potassium gluconate (proton-gradient). The uptake of [14 C]nicotinic acid was performed at 37°C by incubating in 25 mM HEPES-Tris buffer (pH 7.5) containing 30 mM potassium gluconate for the bicarbonate-gradient dependent uptake, or 25 mM Mes-Tris buffer (pH 6.0) containing 30 mM potassium gluconate for the proton-gradient dependent uptake, respectively. Each solution contained an appropriate concentration of mannitol to be an isotonic. Each point represents mean $\pm$ S.E. of three to four experiments as the percentage of the control uptake.

* Significantly different from the control value by Student's *t*-test ($p < 0.05$).

Fig. 4. Proton and Bicarbonate Dependencies of Uptake of Various Monocarboxylic Acids

Initial uptake of various monocarboxylic acids were determined in the presence of proton (closed) or bicarbonate ion (open) gradient and shown by relative value to the uptake in the absence of any ion gradient. Each point represents the mean $\pm$ S.E. of three to four experiments.

ノカルボン酸に対して異なる認識性を有するトランスポーターが独立して存在し、複数のトランスポーターが小腸刷子縁膜輸送に関与することを示唆している。そこで、重炭酸イオン逆輸送系が独立して存在していることを確認するために、重炭酸イオンフラックスのモノカルボン酸依存性を測定した。ウサギ小腸組織切片を Ussing チャンバーに装着し、漿膜側に添加した重

Fig. 5. Effect of Mucosal Monocarboxylic Acids on the Mucosal Alkalinization Rate

Rabbit intestinal tissues were mounted on the Ussing chamber and the mucosal alkalinization which was dependent on the serosal bicarbonate ion was measured in the presence of mucosal acetic acid (A) or pravastatin (B). Each point represents the mean $\pm$ S.E. of five to six experiments.

炭酸イオンの粘膜側へのフラックスに対する粘膜側に存在するモノカルボン酸の効果を、重炭酸イオン分泌に伴う粘膜側へのアルカリ分泌により評価した。⁹⁾ プロトン共輸送系、及び重炭酸イオン逆輸送系の両輸送系に認識される化合物として酢酸を、プロトン共輸送系のみを介すると考えられる化合物としてプラバスタチンを選択し、それぞれの重炭酸イオン分泌に対する効果を測定した。その結果を Fig. 5 に示す。重炭酸イオン及びモノカルボン酸依存的なアルカリ分泌は酢酸では観測されたが、プラバスタチンによっては見られず、Fig. 4 で得られた輸送特性と対応する結果となった。なお、プロトンとの共輸送によっても見かけ上粘膜側がアルカリ化すると考えられるが、本検討は中性 pH で測定したため、プロトン/モノカルボン酸共輸送活性が低下し、プロトン共輸送に伴うアルカリ化が観測されなかったものと推測される。

以上の小腸刷子縁膜小胞あるいは腸管組織を用いて得られた結果は、いずれもモノカルボン酸の中にはプロトン共輸送系及び pH 依存的な重炭酸イオン逆輸送系を介して小腸上皮細胞刷子縁膜を透過する化合物があることを示すものである。このことは、pH 依存性を示す消化管吸収がトランスポーターの介在によって説明できることを示唆している。

ところで、吸収は小腸上皮細胞層の経細胞的透過現象であるため、刷子縁膜透過特性が必ずしも吸収上皮層透過特性を表すとは限らない。さらに、刷子縁膜小胞という輸送測定条件の任意な調節が可能な実験系で得られる輸送機構が、恒常性を維持した細胞、あるいは組織での経

細胞的な透過も説明できるか否かは吸収現象を考える上で極めて重要である。そこで、小腸上皮細胞層透過特性の機構論的解析に優れた *in vitro* 実験系として小腸様機能と形態を備えた Caco-2 細胞を用いた検討を加えた。¹⁰⁻¹²⁾

多孔性フィルター上に Caco-2 細胞を培養し、頂側膜から側底膜側への化合物の透過特性を測定した。なお、細胞内代謝が多い化合物の場合は、透過特性の評価が複雑になると推測されたため、Caco-2 細胞による代謝がほとんど無視でき、しかも pH-分配仮説からの偏差が比較的大きな安息香酸及びサリチル酸をモデル化合物として用いた。その結果、いずれの化合物についても pH 依存性、飽和性、モノカルボン酸による特異的阻害、タンパク分解酵素パパインを用いた膜タンパク消化による透過性低下現象などが観測された。さらに、生理的モノカルボン酸として乳酸を用いて検討したところ、L-体に対して高い親和性を示す立体特異性、安息香酸やサリチル酸と同様な pH 依存性、飽和性など担体介在輸送特性が観測された。また、頂側膜側から Caco-2 細胞内への安息香酸の初期取り込みを測定したところ、ミカエリス定数を含む種々細胞内取り込み特性が、経細胞的透過特性と一致した。以上の結果より、モノカルボン酸の Caco-2 細胞透過は頂側膜透過が律速となるものと推測されたことから、これまで単離刷子縁膜小胞を用いて得られた輸送特性は経細胞的な吸収現象を説明できることが示された。したがって、モノカルボン酸の消化管吸収に観測される pH 依存性は、pH-分配仮説に従う単純拡散というよりはむしろ、pH 依存性を示すトランスポーターの存在によって説明できることを示すことができた。本研究ではさらに、pH 依存的な担体介在輸送体の実体解明と、トランスポーターの機能特性及びその臓器分布性等を明らかにするために、分子レベルでの解析を試みた。

1994 年、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞から、乳酸及びピルビン酸のプロトン共輸送体として MCT1 がクローニングされた。^{13, 14)} そこで CHO 細胞への乳酸、酢酸及びニコチン酸の取り込みを検討したところ、小腸刷子縁膜小胞などを用いて得られたと同様の pH 依存

Fig. 6. Comparison of Amino Acid Sequence of Rat, Hamster and Human MCT1

性、競合阻害効果、飽和性などの輸送特性の存在を見出した。¹⁵⁾ さらに、CHO-MCT1 遺伝子によるノーザン解析によって、ラット及びウサギ小腸、及び Caco-2 細胞膜画分に MCT1 に対応するシグナルを確認し、小腸上皮細胞における MCT1 の存在を示すことができた。¹⁵⁾ 以上の結果より、MCT1 が小腸におけるモノカルボン酸輸送に関わる可能性が強く示されたため、ラット小腸遺伝子ライブラリーからの MCT1 遺伝子のクローニングを試みた。その結果、Fig. 6 に示すようなラット MCT1cDNA が得られた。¹⁶⁾ ラット MCT1 は 494 個のアミノ酸からなり、アミノ酸配列でハムスター及びヒト MCT1 と 93.1% 及び 84.6% の相同性を有するものと推測された。また、hydropathy plot 解析の結果、12 回膜貫通ドメインを有する、典型的なトランスポーターとしての構造を有していた。MCT1-cDNA より調製した cRNA をアフリカツメガエル卵母細胞に微量注入することによりラット MCT1 を発現させ、その機能解析を行った。その結果、L-乳酸、ピルビン酸に加え、酢酸、プロピオン酸、酪酸などの短鎖脂肪酸及びニコチン酸に対する輸送活性が発現した。また、L-乳酸のラット-MCT1 による取り込みは、酸性 pH で活性が増大する pH 依存性や D-乳酸に対する立体選択性も観測され、小腸上皮細胞刷子縁膜小胞などを用いて得られたモノカルボン酸輸送の膜生理学的解析結果と一致した。さらに、ラット MCT1 に対する抗ペプチド抗体を作製しウェスタン解析を行った結果、ラット小腸刷子縁膜画分中に分子量 43000 程度のバンドが検出され、MCT1 がラット小腸刷子縁膜においてモノカルボン酸の輸送に関与していることを明らかにすることができた。

MCT1 遺伝子のラット臓器分布性を明らかにするためにノーザン解析を行った。¹⁶⁾ MCT1 は脳、心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉など多くの臓器に存在し、特に心臓に多く存在した (Fig. 7)。したがって、MCT1 は多くの臓器で生理的役割を有しており、特に高い乳酸代謝活性が要求される心臓においてはその発現量が多くなっているものと考えられる。脳にも分布が見られたことから、物質の脳移行性にとって重要な血液脳関門における存在を検討した。ラット脳毛細血管内皮の初代培養細胞を調製し、得られた遺伝子及び膜画分を用いた RT-PCR 法、及びウェスタン解析を行った。その結果、血液脳関門にも MCT1 が存在することが確認され、モノカルボン酸の血液-脳間物質交換に MCT1 が一部機能していることを示すことができた。

一方、アニオン逆輸送系としては、バンド 3 に代表されるアニオン交換輸送体 AE ファミ

Fig. 7. Northern Blot Analysis of MCT1 in Various Tissues in Rats

Fig. 8. Uptake of [14 C]Benzoic Acid and [14 C]Nicotinic Acid by HEK293 Cells Transfected with Mouse AE2

The difference of the uptakes of monocarboxylic acids by HEK293 cells between transfected with AE2 (AE2) or vector alone (Mock) was shown by the line (AE2-Mock). Each point represents the mean $\pm$ S.E. of three to four experiments.

リーが関与するものと考えている。赤血球には乳酸などモノカルボン酸系化合物に働くプロトン共輸送体が存在するが、ホスホエノールピルビン酸のような有機アニオン性化合物をバンド3が輸送する可能性が示唆されている。また、本ファミリーの一つAE2は小腸上皮細胞刷子縁膜にも存在することが報告されており、またこれらファミリーは重炭酸イオンなどのアニオン逆輸送体として機能する。以上の結果より、小腸刷子縁膜に存在するAE2がアニオン逆輸送系の一部として機能しているものと考え、検討を進めた。米国スタンフォード大学Kopito教授より譲り受けたマウスAE2を用いて、そのモノカルボン酸輸送活性を測定した。¹⁷⁾ AE2様活性はアフリカツメガエル卵母細胞においても高い発現が見られるため、マウスAE2活性評価系としてヒト腎由来HEK293細胞を用いた一過性遺伝子発現系による機能解析を行った。その結果、Fig. 8に示すように対照として発現ベクターのみを導入したMockに比べ、AE2を発現させたHEK293細胞において、安息香酸及びニコチン酸の取り込み活性が増大した。また、その活性はpH 6付近で極大となるpH依存性も示し、プロピオン酸や酪酸のような短鎖脂肪酸やバルプロ酸輸送活性も観測された。さらに、RT-PCR法を用いた解析により小腸にはAEファミリーのうちAE2が最も多く発現しており、AE1の発現量は極めて低いことを確認した。以上のAE2遺伝子を用いた解析結果として、膜生理学的解析手法により得られたモノカルボン酸のアニオン逆輸送体として、アニオン交換輸送系ファミリーの一つ、AE2の関与が示唆された。

以上、モノカルボン酸系化合物の消化管吸収機構として、プロトン共輸送系及びアニオン逆輸送系の存在を、単離膜小胞、Caco-2細胞、及び小腸組織を用いた検討により明らかにすることができた。さらに、それらトランスポーターの実体としてそれぞれ、MCT1及びAE2の可能性を示唆した。得られた二種類のトランスポーターがモノカルボン酸の担体輸送のすべてを説明するわけではないが、このようなトランスポーターが存在することを実証することができたことは、弱酸性化合物のpH依存的消化管吸収に、pH-分配仮説に従う単純拡散ではなく、pH

依存性を示す担体輸送系が関与することを強く示すものである。

β -ラクタム抗生物質の消化管吸収機構

β -ラクタム抗生物質は臨床上繁用される安全性の高い抗菌薬であるが、構造的にはペプチド性化合物に分類される。本抗生物質には多くの誘導体があるが、すべて水溶性が高く、誘導体の多くは消化管吸収性に劣る。しかし、Fig. 9 に示すような側鎖 α 位にアミノ基を有する両性イオン型誘導体（アミノ- β -ラクタム抗生物質）の中には消化管吸収性の良好な誘導体の存在が示唆されていた。一方、1970 年代よりタンパク質の消化管からの摂取は、消化産物のアミノ酸としてだけではなく、中間代謝物のジペプチド、あるいはトリペプチドとしても行われるものと考えられており、その吸収に関与する生理機能としてペプチドトランスポーターの存在が示唆されていた。¹⁸⁾ ペプチド輸送系の基質認識性はジあるいはトリペプチドに限られ、ペプチドサイズについては高い特異性を有する。しかし、構成アミノ酸構造の影響は小さく、親和性は変動するが非天然のアミノ酸から構成されたペプチドも幅広く輸送するものと考えられた。¹⁸⁾ アミノ基を有するアミノ- β -ラクタム抗生物質は他の消化管吸収性に劣る誘導体に比べ天然のペプチドにより類似した構造を有するため、1970 年代半ばからペプチドトランスポーターを介した消化管吸収機構を示唆する研究成果が筆者らの研究グループを含め多くの機関により発表された。しかし、そのような担体介在輸送による吸収機構の実証、さらに β -ラクタム抗生物質に対する構造認識特性などの詳細は明らかではなかった。¹⁹⁾ 1980 年代に入ると、側鎖 α 位のアミノ基の代わりにカルボキシル基を有する消化管吸収性の良好な誘導体として、セフィキシム、FK089、及びセフチブテン (Fig. 9) が見い出された。いずれも吸収上皮細胞膜表面 pH での脂溶性は低いいためその吸収は単純拡散では説明できず、トランスポーターの関与の可能性が考えられた。このようなアミノ基を欠如する誘導体もアミノ- β -ラクタム抗生物質と共通した機構で吸収されるならば、それはペプチド輸送系の基質認識性に関する極めて新しい知見となる。そこで本研究では、このようなジカルボン酸型誘導体もアミノ- β -ラクタム抗生物質同様にペプ

Amino- β -Lactam Antibiotics

Monocarboxylic β -Lactam Antibiotics

Dicarboxylic β -Lactam Antibiotics

Fig. 9. Chemical Structure of β -Lactam Antibiotics

Fig. 10. Inhibitory Effect of Amino Acids, Peptide and β -Lactam Antibiotics on Cefixime Uptake by Rat Intestinal Brush-Border Membrane Vesicles

Uptake of cefixime was measured, at 30 s and the results were demonstrated as the % of control values. Each point represents the mean $\pm$ S.E. of three to five experiments.

チド輸送系によって輸送されるのではないかと考え、検討を開始した。

前述のモノカルボン酸輸送に関する研究手法と同様なラット小腸刷子縁膜小胞、及び反転腸管法を用いてセフィキシムと FK089 の小腸上皮細胞膜透過機構について解析を行った。²⁰⁻²³⁾ その結果、両化合物とも酸性 pH で輸送活性の増大する pH 依存性、飽和性、ジペプチドによる特異的阻害などの輸送特性が観測され、アミノ- β -ラクタム抗生物質同様ペプチドトランスポーターの関与が強く示唆された。さらに、セフィキシムの刷子縁膜小胞内への取り込みが、ペプチドやアミノ- β -ラクタム抗生物質のみならず、従来ペプチドトランスポーターには認識されないと考えられていたアニオン型誘導体によっても阻害を受けた (Fig. 10)。本結果は、小腸ペプチド輸送系が β -ラクタム抗生物質を認識する際に側鎖 α 位アミノ基を必ずしも必要としないことを示しており、本輸送系を介した薬物吸収を考える上で新しい知見となった。その後セフチブテンについても、単離刷子縁膜小胞を用いた解析結果、ペプチド輸送系を介した吸収機構の存在が報告され、²⁴⁾ アミノ基の非必須性が確認された。なお、ペプチドトランスポーターは小腸と同様に腎においても存在するが、セフィキシムは近位尿細管上皮細胞刷子縁膜小胞系においてはアミノ- β -ラクタム抗生物質とは異なりペプチドとして輸送されなかった。²⁵⁾ これは、腎臓に発現する主要なペプチドトランスポーターが小腸とは異なる機能を有することが最近報告され、²⁶⁾ 両者での基質認識性の相異により説明されることが分かった。

一方、 β -ラクタム抗生物質の吸収におけるトランスポーターの関与に否定的な考え方もあった。すなわち、合成脂質膜リポソームにおけるイオン性化合物の輸送にもトランスポーターを介する場合と類似した競合阻害や pH 依存性が観測されること、吸収に動物種差が認められること、さらに β -ラクタム抗生物質誘導体間でトランスポーターが必ずしも共通とは言えない、などということであった。しかし、それまで得られていた薬物輸送の膜生理学的研究結果からのみではこれらの疑問点を明らかにするのは困難であった。そこで、担体介在型輸送であることの実証の一つとして、 β -ラクタム抗生物質トランスポーターをコードする遺伝子の小腸上皮

Fig. 11. Expression of Ceftibuten and Cefadroxil Uptakes by *Xenopus laevis* Oocytes Injected with Rat, Rabbit and Human Intestinal mRNA

Uptakes of ceftibuten and cefadroxil were measured at pH of 5.5 (closed) or 7.5 (dotted) for 2 h. Uptake shown by water (open) represents the uptake by oocytes injected with water alone. Each point represents the mean $\pm$ S.E. of four to eight experiments.

細胞中における存在の有無を調べた。すなわち、小腸上皮細胞から得た mRNA をアフリカツメガエル卵母細胞中で翻訳させ、その遺伝子産物による β -ラクタム抗生物質輸送活性を測定した。^{27, 28)} なお本検討においては、相互に異なる輸送系の関与が示唆されていたジカルボン酸型誘導体のセフトブテン及びアミノ- β -ラクタム抗生物質のセファドロキシルをモデル化合物として用いた。その結果、両化合物とも小腸上皮細胞から得た mRNA 注入により pH 依存的な輸送活性が現われ、飽和性やジ、トリペプチドによる特異的競合阻害効果など、刷子縁膜小胞実験系などと全く同様の輸送特性が観測された。ヒト及びウサギ小腸由来 mRNA を注入した場合にも同じく輸送活性が増大し、トランスポーターの関与という点においては種差がないことが示された (Fig. 11)。さらに、消化管吸収性の良好な他のアミノ- β -ラクタム抗生物質セファレキシンやセフラジン、及びジカルボン酸型のセフィキシムについてもラット小腸由来 mRNA

Fig. 12. Uptake of Various β -Lactam Antibiotics by *Xenopus laevis* Oocytes Injected with Rat Intestinal mRNA

Uptake of β -lactam antibiotics were measured for 2 h by *Xenopus laevis* oocytes injected with rat intestinal mRNA (closed) or water alone (open). Each point represents the mean $\pm$ S.E. of four to ten experiments.

らペプチドトランスポーターのクローニングを行った.³⁰⁾ ラットペプチドトランスポーター PepT1 は 710 個のアミノ酸からなり、ウサギ及び後にクローニングされたヒト PepT1 とそれぞれアミノ酸配列で 77%, 及び 83% の相同性を有していた (Fig. 13). 本遺伝子産物の機能を、合成した cRNA を用いて PepT1 をアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、検討した.³¹⁾ [¹⁴C] グリシルザルコシンの PepT1 を介した取り込みは、種々のジ及びトリペプチドにより阻害されたが、テトラあるいはペンタペプチド、及び構成アミノ酸によっては阻害されず、従来からの膜生理学的解析により示されていた基質認識特性と一致した (Fig. 14). さらに、最初にクローニングされたウサギ PepT1 のアミノ酸配列を基に抗ペプチド抗体を作製し、免疫組織化学的手法により小腸内分布を測定した. その結果、PepT1 は小腸上皮細胞刷子縁膜に局在し、細胞内あるいは側底膜にはほとんど存在しないことが明らかとなった.³²⁾ 以上の結果より、ラット小腸よりクローニングしたペプチドトランスポーター PepT1 は、従来から示唆されていたペプチド輸送系としての機能・細胞内分布性を有することが明らかとなった.

そこで、本トランスポーターの β -ラクタム抗生物質輸送特性について検討を進めた. Fig. 15 には、アフリカツメガエル卵母細胞にラット PepT1 を発現させ、種々 β -ラクタム抗生物質に対する輸送活性を検討した結果を示す. Fig. 12 で得られた小腸全 mRNA 注入により観測された結果と対応し、吸収性の良好な誘導体について顕著な輸送活性増大が観測された. セフチブテンについては幾何異性体が存在するが、吸収性の低いセフチブテンのトランス体やセファゾリンについては活性は見られず、*in vivo* における吸収性と良い一致を示した. 本結果より、 β -ラクタム抗生物質は共通してペプチドトランスポーター PepT1 を介して吸収されることが明らかとなった.

さらに明確にする必要があるのは、トランスポーターの多様性の問題であった. ペプチドあるいは β -ラクタム抗生物質の小腸輸送における PepT1 以外のトランスポーターの関与については依然不明であった. その解決法の一つとして、アンチセンスオリゴヌクレオチドを利用した hybrid depletion 法を用い、小腸全 mRNA 中に含まれる PepT1 遺伝子の発現を抑制させ

Fig. 15. Uptake of Various β -Lactam Antibiotics by *Xenopus laevis* Oocytes Injected with Rat PepT1 cRNA

Uptake of β -lactam antibiotics were measured for 2 h by *Xenopus laevis* oocytes injected with rat PepT1 cRNA (closed) or water alone (open). Each point represents the mean $\pm$ S.E. of three to eight experiments.

Fig. 16. Hybrid Depletion of Rat and Rabbit Intestinal mRNA-Induced Uptakes of [¹⁴C]-Glycylsarcosine and β -Lactam Antibiotics

Uptakes of [¹⁴C]glycylsarcosine and β -lactam antibiotics were measured in *Xenopus laevis* oocytes injected with water alone (open), intestinal mRNA alone (hatched), intestinal mRNA and sense oligonucleotide against PepT1 (dotted), or intestinal mRNA and antisense oligonucleotide against PepT1 (closed). Each point represents the mean $\pm$ S.E. of three to nine experiments. *Significantly different compared with the uptake by water injected oocytes ($p < 0.05$).

た.^{31, 32)} ラット小腸 mRNA により卵母細胞に発現したグリシルサルコシン輸送活性は、アンチセンス DNA (+Antisense) とあらかじめハイブリダイズさせた mRNA を注入した時は、対照として用いた水注入時とほぼ同レベルまで低下した (Fig. 16)。一方、アンチセンス DNA をデザインした同一部位に対して合成したセンスオリゴヌクレオチド (+Sense) とともに mRNA を注入した際には、mRNA のみ注入時と同様の取り込み活性が維持されており、アンチセンス DNA 効果が特異的であることが裏付けられた。同様のアンチセンス DNA 効果が、セフトブテン並びにセファドロキシルの輸送においても観測され、ペプチドのみならず β -ラクタム抗生物質の小腸担体輸送がほぼ PepT1 によって説明できることを示すことができた。しかし、アンチセンス DNA 合成部分と相同性の高い遺伝子配列を有する他のトランスポーターや、本実験系では活性発現の低いトランスポーターの関与が否定できない。これまでに研究対象となった β -ラクタム抗生物質の吸収は PepT1 でほぼ説明できるが、経口投与されるモノカルボン酸型誘導体セフジニルについては、ペプチド以外にモノカルボン酸としても認識される可能性を示してきたように、³³⁾ 一部の誘導体については PepT1 以外の輸送系の関与を否定できない。

上述した結果は、ラットあるいはウサギのペプチドトランスポーターを用いた検討結果であるが、薬物の消化管吸収という点ではヒトにおける吸収が最も重要である。そこで、クローニングされたヒト PepT1 を米国ジョージア医科大学 Leibach 教授から譲り受け、同じく卵母細胞を用い輸送特性を調べた。その結果、ヒト PepT1 は基質認識性などについてラットやウサギ PepT1 と全く同じ輸送特性を持つことが確認された。

以上、消化管吸収に関する膜生理学的、及び分子論的研究成果によって、 β -ラクタム抗生物質の消化管吸収は、誘導体、動物種を問わず小腸上皮細胞刷子縁膜に存在するペプチドラン

スポンター PepT1 が重要な役割を果たしていることを実証することができた。

P-糖蛋白質を介した管腔内分泌

小腸には吸収方向のみならず分泌方向に働くトランスポーターも存在する。

P-糖蛋白質は耐性化した腫瘍細胞に発現するトランスポーターとして見い出され、種々抗癌剤を細胞内から細胞外へと排出方向に輸送する機能を有しており、多剤耐性化の主因と考えられている。³⁴⁾ P-糖蛋白質は抗癌剤のみならず免疫抑制剤やカルシウムブロッカーを含む様々な化合物をも認識・輸送し、³⁵⁻³⁹⁾ また、腫瘍細胞のみならず正常組織にも存在するため、⁴⁰⁾ 種々薬物の体内動態に少なからぬ影響を与えるものと考えられる。筆者らのグループでは既に血液脳関門を形成する脳毛細血管内皮細胞の血管側膜に P-糖蛋白質が存在し、脳（毛細血管内皮細胞）内に侵入した抗癌剤ビンクリスチンや免疫抑制剤シクロスポリンなどの生体異物を、血液中へと排出することにより脳内移行を制限する生体防御機能を有していることを初めて明らかにした。⁴¹⁻⁴⁴⁾ 小腸上皮細胞刷子縁膜にも P-糖蛋白質は存在しており、種々化合物の小腸管腔内分泌に働いているものと考えられる。Fig. 17 には種々化合物の脂溶性と脳内移行性あるいは消化管吸収性の関係を示す。脳、消化管とも▲あるいは◆で示した化合物は P-糖蛋白質の基質となることが示されたものである。それらの脳移行性、あるいは吸収性は、●で示した他の多くの化合物から推測されるよりも低い傾向があり、脳移行性制限と同様、低吸収性の一因として P-糖蛋白質が寄与するものと考えられる。⁴⁵⁾

Fig. 18A はシクロスポリンのラットにおける消化管吸収性を Doluisio 法によって測定した結果であるが、投与液中シクロスポリン濃度の上昇とともに吸収性が増大した。また、シクロスポリンの低濃度での吸収性は、P-糖蛋白質阻害剤としてセファランチンを同時投与したときにも増加し、脳移行性と同様、シクロスポリンの消化管吸収性も P-糖蛋白質によって制限されたものと考えられる。

さらに、5-HT₃ レセプターアンタゴニストのアザセトロン消化管吸収速度定数の濃度依存性を、Doluisio 法により測定した結果を Fig. 18B に示す。⁴⁶⁾ 濃度の上昇とともにアザセトロンの吸収速度定数も増大するが、一定濃度になると吸収速度定数は減少し、極めて複雑な非線形的消化管吸収現象が観測された。薬物はすべて溶解しており、また高速液体クロマトグラ

Fig. 17. Relationship between Lipophilicity and Blood-Brain Barrier or Intestinal Epithelial Permeability of Various Drugs

Fig. 18. Concentration Dependent Intestinal Absorption of Cyclosporin A (A) and Azasetron (B) Determined by Doluisio Method in Rats

Absorption rate constant was determined from the time course of the disappearance of cyclosporin A or azasetron from the administered solution in the intestinal loop. Each point represents the mean $\pm$ S.E. of three to five experiments.

フィーによる分離定量を行っているため代謝物の影響は無視できる。そこで、観測される非線形的吸収現象は、「アザセトロン 10 mM 程度までの吸収速度定数の増加はシクロスポリンと同様な管腔内排出型輸送系の飽和によって、さらに 10 mM 以上の濃度で見られる速度の減少は吸収方向に働く輸送系の飽和によって生じる」という仮説を立て、その実証を行った。

筋層を剥離したラット小腸切片を装着した Ussing チャンバーの粘膜側、及び漿膜側それぞれからのアザセトロンのフラックスの濃度依存性を測定した。その結果を Fig. 19 に示すが、漿膜側から粘膜側へのフラックスは濃度の上昇とともに低下したが、逆方向のフラックスは 5 mM 前後までは増大し、それ以上の濃度では減少傾向を示した。さらに低濃度領域では分泌方向のフラックスが吸収方向に比べ顕著に高い値を示した。したがって、分泌方向のフラックスの濃度依存的低下は、低濃度側で高い活性を示す分泌に働くトランスポーターの飽和によって説明できる。一方、粘膜側から漿膜側へのフ

ラックスの低濃度側での上昇は同じく分泌機構の飽和、及び高濃度領域での低下は吸収機構の飽和によって説明できる。分泌機構として P-糖蛋白質の関与の可能性について、P-糖蛋白質の特異的阻害剤シクロスポリンを用いた検討を加えた (Fig. 19)。シクロスポリン 10 μM 存在下での低濃度アザセトロンのフラックスは分泌方向は低下し、逆に吸収方向は増加した。アザセト

Fig. 19. Concentration Dependence of Permeability of Azasetron across Rat Ileal Tissue Mounted on Ussing Chamber

Permeability of azasetron across rat intestinal tissue from serosal-to-mucosal (closed) or mucosal-to-serosal (open) directions were measured in the presence (square) or absence (circle) of cyclosporin A. Each point represents the mean $\pm$ S.E. of three to four experiments. *Significantly different compared with the flux in the absence of cyclosporin A ($p < 0.05$).

ロンの小腸輸送についてさらに機構論的解析を進めるために、Caco-2細胞を用いた解析を行った。Caco-2頂側膜側から側底膜側へのフラックス、及びその逆方向のフラックスはともにFig. 19に示した消化管組織切片を用いた場合と同様な濃度依存的な変動を示した。また、Caco-2細胞内への低濃度アザセトロン初期取り込みは変化しないが、定常状態における取り込み量はシクロスポリン存在下、及び代謝阻害剤を用いたATP枯渇下上昇した (Fig. 20)。さらに、Caco-2細胞への初期取り込み速度は濃度依存的に減少し、またセロトニンなどの塩基性化合物による阻害効果も観測され、取り込みに働くトランスポーターの関与が示唆された。

以上の結果はいずれも、アザセトロンは小腸においてP-糖蛋白質を介して分泌され、P-糖蛋白質は管腔内排出に働くことによって吸収障壁となり、種々生体異物に対する防御機構として機能しているものと推測される。また、その実体は明らかではないがアザセトロンは吸収方向にもトランスポーターが関与することが示唆された。このような両方向に働く複数のトランスポーターの関与によって、Fig. 18のような複雑な消化管吸収現象が観測されたものと考えられ、トランスポーターの薬物動態的重要性を示すことができた。

おわりに

以上、薬物の小腸上皮細胞膜透過の膜生理学的及び分子機構論的解析によって、薬物の生体膜透過におけるトランスポーターの重要性を示した。本総説において述べた以外にも薬物吸収には小腸リン酸輸送系など様々な輸送系の関与が推測される。⁴⁷⁻⁴⁹⁾ 本研究は、そのような種々トランスポーターに対する認識性変換によって薬物の消化管吸収性の制御が可能となることを示す成果であり、今後の消化管吸収を中心とした薬物動態の解析とその制御手法の開発のための基礎的知見になるものと信じる。

本総説においては薬物の消化管吸収に関わるトランスポーターを中心に得られた成果を述べたが、一部記したように薬物動態に重要と考えられる多くのトランスポーターが血液脳関門を形成する脳毛細血管内皮細胞、肝・腎などの種々組織・臓器においても存在している。本来の生理的役割は明らかではない場合も多いが、これら未だ同定されていないものも含め、各臓器に発現するトランスポーター群は生理的物質の体内での処理を合理的にコントロールしているものと推測される。そのような生理機構のネットワークの中であって、構造的類似性のある薬物が認識され、吸収、分布あるいは排泄という処理を受けているものと推測される。トランスポーターの分子機構を深く理解することにより、薬物動態的な薬物間相互作用、あるいは薬物-生理的物質間相互作用が機構論的に明らかにされ、最適な薬物投与計画が可能となるとともに、治療目的に応じた好ましい薬物動態的特性を有する新規薬物の合理的な開発が可能になるものと信じる。

Fig. 20. Time Course of [^{14}C]Azasetron Uptake by Cultured Monolayers of Caco-2 cells.

Uptakes of [^{14}C]azasetron by Caco-2 cells were measured in the presence of cyclosporin A (triangle) or in the ATP-depleted condition (closed circle). Each point represents the mean $\pm$ S.E. of three to four experiments.

謝辞 本研究を遂行するに際して終始あたたかい御指導, 御鞭撻を賜りました金沢大学薬学部教授辻 彰先生, 並びに現東北大学薬学部教授寺崎哲也先生に深く感謝申し上げます. 本研究成果は, 金沢大学薬学部製剤学教室において得られたものであり, 御助言, 御協力をいただきました教室員及び卒・修了生の皆様に改めて心より御礼申し上げます.

引用文献

- 1) Tamai I., Tsuji A., *Adv. Drug Delivery Rev.*, **20**, 5 (1996).
- 2) Tsuji A., Tamai I., *Pharm. Res.*, **13**, 963 (1996).
- 3) Tsuji A., Simanjuntak M. T., Tamai I., Terasaki T., *J. Pharm. Sci.*, **79**, 1123 (1990).
- 4) Simanjuntak M. T., Tamai I., Terasaki T., Tsuji A., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **13**, 301 (1990).
- 5) Simanjuntak M. T., Terasaki T., Tamai I., Tsuji A., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **14**, 501 (1991).
- 6) Takanaga H., Maeda H., Yabuuchi H., Tamai I., Higashida H., Tsuji A., *J. Pharm. Pharmacol.*, **48**, 1073 (1996).
- 7) Tiruppathi C., Balkovetz D. F., Ganapathy V., Miyamoto Y., Leibach F. H., *Biochem. J.*, **256**, 219 (1988).
- 8) Tamai I., Takanaga H., Ogihara T., Yoneda M., Tsuji A., *Pharm. Res.*, **12**, 1727 (1995).
- 9) Tamai I., Takanaga H., Maeda H., Yabuuchi H., Sai Y., Suzuki Y., Tsuji A., *J. Pharm. Pharmacol.*, **49**, 108 (1997).
- 10) Tsuji A., Takanaga H., Tamai I., Terasaki T., *Pharm. Res.*, **11**, 30 (1994).
- 11) Takanaga H., Tamai I., Tsuji A., *J. Pharm. Pharmacol.*, **46**, 567 (1994).
- 12) Ogihara T., Tamai I., Takanaga H., Sai Y., Tsuji A., *Pharm. Res.*, **13**, 1827 (1996).
- 13) Garcia C. K., Goldstein J. L., Pathak, R. K., Anderson, R.G.W., Brown M. S., *Cell*, **76**, 755 (1994).
- 14) Kim C. M., Goldstein J. L., Brown M. S., *J. Biol. Chem.*, **267**, 23113 (1992).
- 15) Tamai I., Takanaga H., Maeda H., Sai Y., Ogihara T., Higashida H., Tsuji A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **214**, 482 (1995).
- 16) Takanaga H., Tamai I., Inaba S., Sai Y., Higashida H., Yamamoto H., Tsuji A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **217**, 370 (1995).
- 17) Yabuuchi H., Tamai I., Sai Y., Tsuji A., submitted.
- 18) Matthews D. M., "Protein Absorption," Wiley-Liss, New York, 1991.
- 19) Tsuji A., "Peptide-Based Drug Design: Controlling Transport and Metabolism," ed. by Taylor M. D., Amidon G. L., American Chemical Society, Washington D. C., 1995, p. 101.
- 20) Tsuji A., Hirooka H., Tamai I., Terasaki T., *J. Antibiotics*, **39**, 1592 (1986).
- 21) Tsuji A., Hirooka H., Terasaki T., Tamai I., Nakashima E., *J. Pharm. Pharmacol.*, **39**, 272 (1987).
- 22) Tsuji A., Terasaki T., Tamai I., Hirooka H., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **241**, 594 (1987).
- 23) Tsuji A., Tamai I., Hirooka H., Terasaki T., *Biochem. Pharmacol.*, **36**, 565 (1987).
- 24) Yoshikawa T., Muranushi N., Yoshida M., Oguma T., Hirano K., Yamada H., *Pharm. Res.*, **6**, 302 (1989).
- 25) Tamai I., Tsuji A., Kin Y., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **246**, 338 (1988).
- 26) Ganapathy M. E., Brandsch M., Prasad P. D., Ganapathy V., Leibach F. H., *J. Biol. Chem.*,

- 270, 25672 (1995).
- 27) Tamai I., Tomizawa N., Kadowaki A., Terasaki T., Nakashima K., Higashida H., Tsuji A., *Biochem. Pharmacol.*, **48**, 881 (1994).
 - 28) Tamai I., Tomizawa N., Takeuchi T., Nakayama K., Higashida H., Tsuji A., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **273**, 26 (1995).
 - 29) Fei Y.-J., Kanai Y., Nussberger S., Ganapathy V., Leibach F. H., Romero M. F., Singh S. K., Boron W. F., Hediger M. A., *Nature (London)*, **368**, 563 (1994).
 - 30) Miyamoto K., Shiraga T., Morita K., Yamamoto H., Haga H., Taketani Y., Tamai I., Sai Y., Tsuji A., Takeda E., *Biochim. Biophys. Acta*, **1305**, 34 (1996).
 - 31) Tamai I., Hayashi K., Terao T., Sai Y., Shiraga T., Miyamoto K., Takeda E., Higashida H., Tsuji A., *J. Pharm. Pharmacol.*, in press.
 - 32) Sai Y., Tamai I., Sumikawa H., Hayashi K., Amano O., Numata M., Iseki S., Tsuji A., *FEBS Lett.*, **392**, 25 (1996).
 - 33) Tsuji A., Tamai I., Nakanishi M., Terasaki T., Hamano S., *J. Pharm. Pharmacol.*, **45**, 996 (1993).
 - 34) Endicott J. A., Ling V., *Annu. Rev. Biochem.*, **58**, 137 (1989).
 - 35) Safa A. R., Stern R. K., Choi K., Agresti M., Tamai I., Mehta N. D., Roninson I. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 7225 (1990).
 - 36) Safa A. R., Agresti M., Tamai I., Mehta N. D., Vahabi S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **166**, 259 (1990).
 - 37) Safa A. R., Agresti M., Bryk D., Tamai I., *Biochemistry*, **33**, 256 (1994).
 - 38) Tamai I., Safa A. R., *J. Biol. Chem.*, **265**, 16509 (1990).
 - 39) Tamai I., Safa A. R., *J. Biol. Chem.*, **266**, 16796 (1991).
 - 40) Thiebaut F., Tsuruo T., Hamada H., Gottesman M. M., Pastan I., Willingham M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 7735 (1987).
 - 41) Tsuji A., Terasaki T., Takabatake Y., Tenda Y., Tamai I., Yamashita T., Moritani S., Tsuruo T., Yamashita J., *Life Sci.*, **51**, 1427 (1992).
 - 42) Tsuji A., Tamai I., Sakata A., Tenda Y., Terasaki T., *Biochem. Pharmacol.*, **46**, 1096 (1993).
 - 43) Sakata A., Tamai I., Kawazu K., Deguchi Y., Ohnishi T., Saheki A., Tsuji A., *Biochem. Pharmacol.*, **48**, 1989 (1994).
 - 44) Ohnishi T., Tamai I., Sakanaka K., Sakata A., Yamashita T., Yamashita J., Tsuji A., *Biochem. Pharmacol.*, **49**, 1541 (1995).
 - 45) Terao T., Hisanaga E., Sai Y., Tamai I., Tsuji A., *J. Pharm. Pharmacol.*, **48**, 1083 (1996).
 - 46) Tamai I., Saheki A., Saitoh R., Sai Y., Yamada I., Tsuji A., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, in press.
 - 47) Tsuji A., Tamai I., *Biochem. Pharmacol.*, **38**, 1019 (1989).
 - 48) Ishizawa T., Tsuji A., Tamai I., Terasaki T., Hosoi K., Fukatsu S., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **13**, 292 (1990).
 - 49) Ishizawa T., Sadahiro S., Hosoi K., Tamai I., Terasaki T., Tsuji A., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **15**, 481 (1992).