

生体膜輸送の分子機構に関する生物薬剤学的研究

辻 彰

Biopharmaceutical Studies on Molecular Mechanisms of Membrane Transport

Akira TSUJI

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kanazawa University
13-1 Takara-machi, Kanazawa 920-0934, Japan

(Received August 27, 2002)

By incorporating the transporter-mediated or receptor-mediated transport process in physiologically based pharmacokinetic models, we succeeded in the quantitative prediction of plasma and tissue concentrations of β -lactam antibiotics, insulin, pentazocine, quinolone antibacterial agents, and inaperizone and digoxin. The author's research on transporter-mediated pharmacokinetics focuses on the molecular and functional characteristics of drug transporters such as oligopeptide transporter, monocarboxylic acid transporter, anion antiporter, organic anion transporters, organic cation/carnitine transporters (OCTNs), and the ATP-binding cassette transporters P-glycoprotein and MRP2. We have successfully demonstrated that these transporters play important roles in the influxes and/or effluxes of drugs in intestinal and renal epithelial cells, hepatocytes, and brain capillary endothelial cells that form the blood-brain barrier. In the systemic carnitine deficiency (SCD) phenotype mouse model, juvenile visceral steatosis (jvs) mouse, a mutation in the *OCTN2* gene was found. Furthermore, several types of mutation in human SCD patients were found, demonstrating that *OCTN2* is a physiologically important carnitine transporter. Interestingly, OCTNs transport carnitine in a sodium-dependent manner and various cationic drugs transport it in a sodium-independent manner. OCTNs are thought to be multifunctional transporters for the uptake of carnitine into tissue cells and for the elimination of intracellular organic cationic drugs.

Key words—transporters; P-glycoprotein; intestinal absorption; blood-brain barrier; β -lactam antibiotics; carnitine

1. はじめに

医薬品の適正使用並びに医薬品開発における薬物の体内動態特性の重要性が広く認識され、科学的実証に基づいた薬物動態影響因子を解明する研究に多大の関心が寄せられるようになった。多くの生体側因子の中で、薬物の組織細胞膜透過性は薬物動態影響因子として極めて重要である。

生体は細胞内外の栄養素や内因性物質の選択的物質交換によって必要物質の摂取と、生体異物や老廃物の排除を行っているが、その選択性は細胞膜に備わるトランスポーター群の輸送機能に依存している。最近になって、栄養物や内因性物質のトランスポーター群に関する分子生物学的研究成果が報告されるに伴い、体内の各組織細胞膜に備わるトランス

ポーター群の薬物構造認識・輸送機能は、それら遺伝子発現細胞や遺伝子欠損マウスなどの利用によって実証されつつある。生体にとって「必要なもの」を積極的に取り込み、「不要なもの」を細胞外へ排出する機能を担うトランスポーターの分子機構の解明に多大の関心が寄せられている。

1975年から生物薬剤学的研究に従事して今日に至るまで著者は、小腸、肝臓、腎臓及び血液脳関門 (blood-brain barrier, 以下 BBB と略す) の機能を備える脳毛細血管内皮細胞など生体各組織細胞膜において薬物輸送に関与するトランスポーター群の存在と薬物動態決定因子としてのその重要性を明らかにするとともに、トランスポーター遺伝子の単離・組織分布・局在性解析とその構造認識・輸送特性を利用した医薬品の適正使用並びに創薬への戦略を確立するために、分子生物学的手法を取り入れた生物薬剤学的研究を進めてきた。トランスポーターは、生体機能の維持に重要であると同時に、生体内に投

金沢大学薬学部 (〒920-0934 金沢市宝町 13-1)

e-mail: tsuji@kenroku.kanazawa-u.ac.jp

*本総説は、平成 14 年度日本薬学会学会賞の受賞を記念して記述したものである。

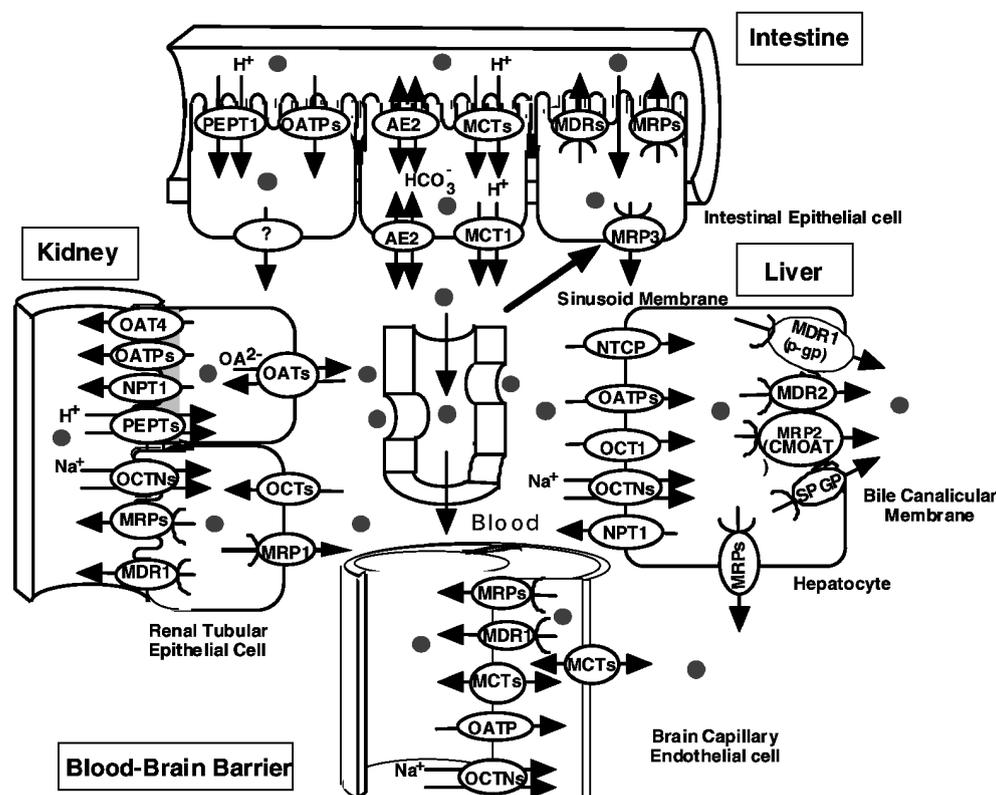


Fig. 1. Human Membrane Transporters Expressed in Intestine, Kidney, Liver, Blood-Brain Barrier and Tumor

与された薬物の(1)投与部位から循環血中への吸収過程, (2)組織への分布・移行過程, (3)薬効又は毒性発現部位との相互作用, (4)肝代謝・胆汁排泄及び腎尿細管分泌など薬物の吸収・分布・排泄の諸過程に参与している. 現在までに分子レベルで構造が明らかにされたトランスポーターの中で, 薬物又はその代謝物の輸送に関わる薬物トランスポーターは, 一次性能動輸送系, 二次性能動輸送系を含め, Fig. 1に示すように極めて多様である. これら取り込みと排出に関わるトランスポーター群に対する親和性とこれらによる輸送の大小を調節することによって, 体内動態上の特性を目的に適合させて制御できることになり, 臓器特異的なトランスポーターの性質を考慮した創薬分子デザインも可能になると考えられる.

以下に著者が歩んできた道を概説し, 薬物体内動態研究の将来について展望したい.

2. β -ラクタム抗生物質の体内動態支配因子の解明

薬物間の体内動態の違いを決定付ける主たる要因は, 毛細血管透過性, 組織細胞内外への輸送・排出動態, 特定組織での代謝, 血漿タンパク質及び組織

細胞内タンパク質との結合性, 血流速度, 細胞間液量などである.

ペニシリンやセファロスポリンなどの β -ラクタム抗生物質の水溶液中における安定性に関する速度論的研究で学位を1976年に取得した著者は, これらの抗生物質を生体内に投与した後の体内動態支配因子の解明に取りかかった. その研究の方向は, (1)静脈内投与後の分布容積が細胞間隙容量に近似しているのはなぜか, (2)多くの誘導体の中で経口吸収されるものの化学構造が α 位にアミノ基を有するものに限定されているのはなぜか, (3)体内からの排泄を尿中排泄と胆汁排泄に振り分ける分子機構はどのようなものか, (4)脳内に直接投与すると重篤な痙攣を誘発するにもかかわらず, 全身投与ではそのような中枢性の副作用が誘起されないのはなぜか, という疑問点を生物薬剤学的に解明することに向けた. これらの問題解決の鍵は β -ラクタム抗生物質の組織細胞膜透過性にあるとの考えに至り, 以下に述べる研究を着手した.

β -ラクタム抗生物質の分布容積が例外なく細胞間隙容量に近似していることに着目し, その組織分

布性は「各組織の細胞間液量と細胞間液中のアルブミン量とアルブミンに対する薬物の結合性により決まる」という仮説を立て「細胞外液モデル」を提案した。¹⁾ この組織分布の機構に加えて、肝臓及び腎臓ではそれぞれの固有クリアランスに従って胆汁中及び尿中に排泄されるという機構を生理学的モデルに組み込み、各組織毎に立てられた連立微分方程式をコンピュータを用いて数値積分することにより、 β -ラクタム抗生物質をラット、ウサギ及びヒトに静注後の組織濃度-時間推移を予測することに成功した。^{2,3)} さらに同モデルを用い、加齢に伴う β -ラクタム抗生物質の組織分布性の変動は組織細胞間液量の変化に依存していることを明らかにした。⁴⁻⁷⁾ 後にはこれらの成果を基礎に、高分子量ペプチド性薬物の体内動態解析に適用した。特に、インスリンが腎臓で受容体介在型エンドサイトーシスされることを灌流法を用いて実証した。⁸⁾ さらに、肝臓におけるインスリンの分布と消失を「受容体再循環モデル」により解析し、糖尿病時には肝細胞膜表面上のインスリン受容体が増加するために、インスリンの体内動態が変動することを明らかにした。⁹⁾

生理学的モデル解析法は、生理・解剖学的実体に即しているため、個々のパラメータを対象とする動物ごとにあらかじめ設定することが容易であり、したがって「動物からヒト」、「正常から病態」、「試験管内 (*in vitro*) から個体 (*in vivo*)」における薬物動態の予測を可能とする方法としての評価が定着しつつある。その特徴から、医薬品の有用性と安全性を考慮した医薬品開発のツールとして、合理的な投与設計の確立に、妊娠時における薬物の胎児への移行動態の予測、さらに副作用発現の予測とその回避など高い利用価値を有している。⁹⁻¹⁶⁾

一方、薬物の組織細胞間液中濃度は薬効を支配する要因であるが、これを組織微小透析法により実測する方法論の確立に成功した。^{17,18)} 本手法の確立によって、細胞内酵素により代謝されやすい不安定薬物の組織細胞間液中濃度を実測する道が開かれた。¹⁹⁾ さらに、脳などの瞬間平衡が成立しにくい組織中の細胞間液中非結合形薬物濃度の測定が可能となった。²⁰⁾

これらの一連の研究で、当時助教授として研究室の研究を指揮していた寺崎哲也博士（現東北大学大学院・教授）が本学会 1992 年度奨励賞を受賞した。

詳細は、寺崎博士の総説²¹⁾に記載されている。

3. 消化管吸収に関与する薬物トランスポーター群の分子認識・輸送特性

薬物の消化管吸収に関する研究は、1960年代の生物薬剤学 (biopharmaceutics) が誕生した初期のころから我が国を中心に行われ、生体外異物としての薬物は pH-分配仮説に従って小腸上皮細胞を単純拡散で透過するという薬物吸収機構が広く受け入れられてきた。したがって薬物の小腸吸収機構に関しては研究の余地がないと思われていた。しかし、生理的物質のトランスポーター介在輸送に関する細胞生理学的研究が活発になるにつれ、薬物の消化管上皮細胞における輸送機構は、従来考えられていたほど単純ではなく、トランスポーター群が薬物の吸収・分泌に関与するなど、極めて複雑であることが次第に明らかにされつつある。

3-1. オリゴペプチドトランスポーターを介する薬物吸収 β -ラクタム抗生物質の小腸からの吸収と消化管腔における分解を分離して評価する研究²²⁾を行っていた過程で、これらの β -ラクタム抗生物質の一部が小腸オリゴペプチドトランスポーターを介して吸収されることを発見し、その輸送系の実体解明に向けて今日まで研究を続けてきた。²³⁻⁴⁰⁾ 著者らを含め世界の多くの研究機関から、このオリゴペプチドトランスポーターがペプチド性薬物（構造式を Fig. 2 に示す）の吸収に関与していることが、刷子縁膜小胞や培養上皮細胞 Caco-2 を用いた実験系によって提唱されてきた。⁴¹⁻⁴³⁾ 一方、薬物との相互作用による小腸上皮細胞膜表面の荷電状態変化が見かけ上担体介在輸送様吸収現象を示すとの観点から 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が報告された。⁴¹⁻⁴³⁾

これらの議論の過程で著者は、薬物輸送の膜生理学的研究結果からのみでは、薬物動態を決定している因子が薬物と生体との物理的相互作用によるものであるのか、機能タンパク質との相互作用にあるのかを明らかにすることは困難であり、新しい研究手法を生物薬剤学の領域に取り込む必要性を痛感した。薬物投与後の血中濃度や組織内濃度の時間推移を薬物速度論的に捉える研究手法を用いて、異なる条件下で得られた実測値を定量的に予測し得たとしても、その事象を決定している真の要因を実証した

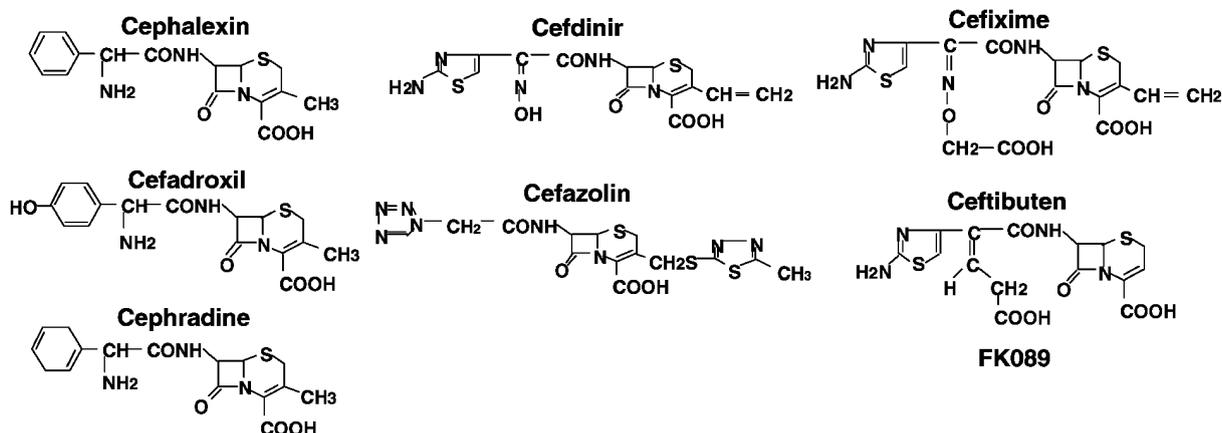
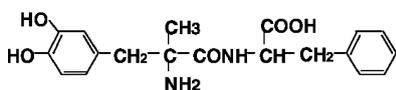
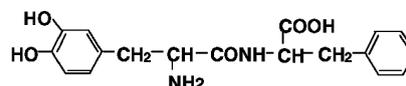
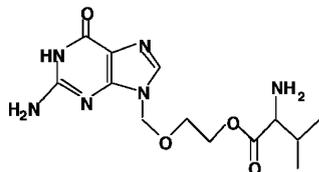
β -lactam antibiotics **α -Methyldopa-L-Phenylalanine****L-dopa-L-Phenylalanine****Val-acyclovir**

Fig. 2. Chemical Structures of β -Lactam Antibiotics and Drugs Transported by PEPT1

ことにはならない。分子生物学的手法を薬物動態研究の領域に取り入れることが今後の動態研究の発展に必須と判断し、分子生物薬剤学 (molecular biopharmaceutics) の誕生に向けて第一歩に踏み込んだ。P-450 に代表される代謝研究の領域においては既に導入されていた分子生物学的手法ではあったが、著者らがトランスポーター遺伝子発現系細胞系を導入した研究成果を本学会年会や雑誌で発表した 1992 年前後では世界のどの研究機関においても動態研究には採用されていなかった。その後、トランスポーター研究がその輸送系の実体を遺伝子など分子レベルで解明する方向に向けて急速な発展を遂げることとなった。

著者らはまず、ウサギ小腸上皮細胞に存在するヌクレオシドトランスポーターをアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、そのヌクレオシド誘導体に対する輸送能を測定するという、本番に向けた遺伝子

導入実験を行った。⁴⁴⁾ この経験を生かして、ラット、ウサギ、ヒト小腸上皮細胞由来の mRNA を注入した卵母細胞に、 β -ラクタム抗生物質を選択的に取り込むオリゴペプチド/ H^+ 共輸送系の発現を確認し、 β -ラクタム抗生物質の小腸細胞膜輸送において動物種に関わらずトランスポータータンパク質が関与していることを明らかにした。^{35,36)} しかし、残念ながらこのオリゴペプチドトランスポーター遺伝子をクローニングするには至らなかった。

1994 年 Fei らは、ウサギ小腸 mRNA の 2.9 kb 分画から 12 回膜貫通領域を有し、707 個のアミノ酸で構成されるオリゴペプチド/ H^+ トランスポーター PEPT1 遺伝子クローニングに成功した。⁴⁵⁾ PEPT1 遺伝子の単離は分子生物薬剤学の世界的発展に大きく貢献した業績といって過言ではない。この成果を受けて、著者ら及び Saito らはラット小腸より、Liang らはヒト小腸より PEPT1 遺伝子を単

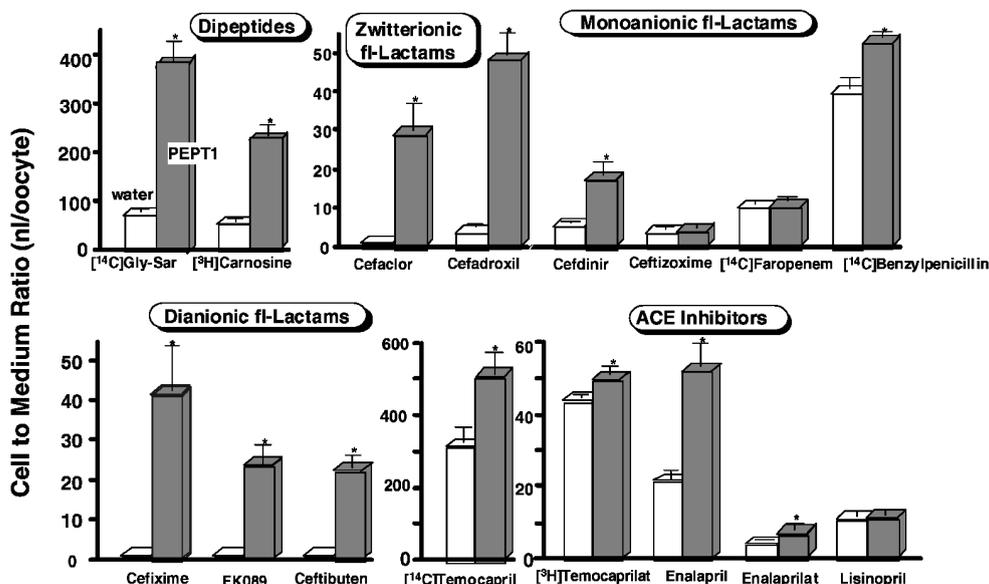


Fig. 3. Uptake of Dipeptides, β -Lactam Antibiotics and ACE Inhibitors by *Xenopus Laevis* Oocytes Injected with Human PEPT1 cRNA

Uptake of β -lactam antibiotics was measured at 25°C and pH 6.0 for 1 hr or 2 hr by *Xenopus laevis* oocytes injected with human PEPT1 cRNA (closed) or water alone (open). Substrate concentrations were: [³H]carnosine, 0.6 μ M; [¹⁴C]Gly-Sar, 50 μ M; [¹⁴C]faropenem, 20 μ M; [¹⁴C]benzylpenicillin, 55 μ M; [¹⁴C]temocapril, 10 μ M; [³H]temocaprilat: 0.1 μ M; ther others, 2 mM. Each column represents the mean +S.E. of three to fifteen experiments. *Significantly different compared with uptake by water-injected oocytes ($p < 0.05$).

離した.^{37,46,47)} 著者らはラット PEPT1cRNA をアフリカツメガエル卵母細胞に発現させその輸送機能を測定した。経口用 β -ラクタム抗生物質のセファロキシル、セファレキシシム、セフラジシム、セフィキシムにおいて、セフチブテンにおいてはそのシス幾何異性体に輸送活性が検出された。一方、セフチブテンのトランス異性体と注射剤として臨床適用されているセファゾリンにはそのような活性は観測されず、PEPT1の輸送活性と β -ラクタム抗生物質のラット小腸吸収性との間に良好な関連性が見られた。

Figure 3に示すように、ヒト PEPT1が β -ラクタム抗生物質に対してはラット PEPT1と同様の輸送活性を示すばかりでなく、エナラプリル、テモカプリルなどの ACE 阻害薬をも輸送することを実証した。さらに、PEPT1の部分塩基配列に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドにより mRNA 中に含まれる PEPT1 遺伝子の発現を特異的に抑制する hybrid depletion 実験を行った。その結果、mRNA を注入しない場合と同程度まで活性が低下した。³⁸⁾

以上の結果は、小腸上皮細胞オリゴペプチド輸送系を介する β -ラクタム抗生物質輸送をほぼすべて PEPT1 が担っていることを意味している。さらに著者らは PEPT1 に対するペプチド抗体を作製し、

本トランスポーターが刷子縁膜にのみ局在していることを明らかにした。³⁹⁾ ラット小腸においても同様の局在性が確認されている。PEPT1は、動物種によっても多少変わるが、小腸のほか、肝臓、腎臓に発現がある。PEPT1の転写開始点より 1.5 kb の 5'上流域を組み込んだ発現ベクターを細胞に発現させたところ、小腸及び腎由来の Caco-2 及び OK 細胞にのみプロモーター活性が確認された。したがって、この領域内に PEPT1の転写開始点より 350 bp 以内に臓器特異的発現に必須の領域が存在することが示唆された。また、転写開始点より 295/277 bp 領域にはアミノ酸による PEPT1 発現促進に関する領域が確認できた。⁴⁰⁾

β -ラクタム抗生物質以外のペプチド様化合物として、抗がん剤のベスタチン、一部のレニン阻害薬においてもオリゴペプチドトランスポーターの関与が示されている。⁴¹⁻⁴³⁾ 最近、ペプチド結合を有しない 4-アミノフェニル酢酸も PEPT1 によって認識・輸送されることが報告された。著者らも、抗ウイルス薬シクロピルの吸収向上を意図して開発されたバリントのエステル誘導体、バルアシクロピル (Fig. 2) が PEPT1 によって輸送されることを遺伝子発現細胞を用いて実証した。⁴⁸⁾

他の輸送系に比べ、オリゴペプチドトランスポーターの幅広い基質認識性を利用すれば、低吸収性の親化合物のペプチド化修飾によって薬物吸収促進が期待できる。この戦略を実証するため、アミノ酸トランスポーターによる輸送効率が劣るために経口後のバイオアベイラビリティに問題のある高血圧治療薬 α -メチルドーパ及びパーキンソン病治療薬 L-ドーパと L-フェニルアラニンとのジペプチドプロドラッグをデザインし (Fig. 2 参照), それぞれ親化合物の消化管吸収性の向上に成功した。^{49,50)}

3-2. モノカルボン酸トランスポーターを介する薬物吸収 弱酸性化合物の消化管吸収には酸性 pH で増大する pH 依存性が観測される。この pH 依存性は従来より pH-分配仮説によって説明されてきたが、酢酸のような短鎖乳酸に限らず、乳酸、ニコチン酸、安息香酸、サリチル酸、プラバスタチンなどのモノカルボン酸系化合物の小腸上皮細胞輸送に H⁺ 共輸送系が関与する吸収機構を刷子縁膜小胞又は Caco-2 細胞を用いた研究成果⁵²⁻⁶¹⁾に基づいて提唱した。

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* 遺伝子がクローニングされた。⁶²⁾ そこで 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。⁶³⁾ そこで、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行い、ラット *MCT1*cDNA を得ることができた。⁶⁴⁾ 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。ラット *MCT1* を発現させた細胞を用いて、その機能解析を行った結果、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、ニコチン酸のほか、アニオン性 β -ラクタム抗生物質の 1 つベンジルペニシリン、安息香酸やバルプロ酸も本トランスポーターによって運ばれ、薬物吸収にも働いていることが示された。^{64,65)} [¹⁴C]安息香酸の *MCT1* による時間依存的 (A) 及び pH 依存的 (B) 取り込みを Fig. 4 に示す。⁶⁶⁾

β -ラクタム抗生物質には前述したオリゴペプチドトランスポーターを介して吸収される誘導体があるが、一部モノカルボン酸トランスポーターを介する場合も考えられる。セフジニルはモノカルボン酸構造を有するセファロsporin 系抗生物質であるが、著者らはオリゴペプチドトランスポーター以外にアニオンとしての認識を受けることを示唆する結果を得ており、³⁴⁾ 本輸送系の関与が示唆される。また、ラット *MCT1* による取り込みは、乳酸やキラル構造を有する各種モノカルボン酸化合物に対する

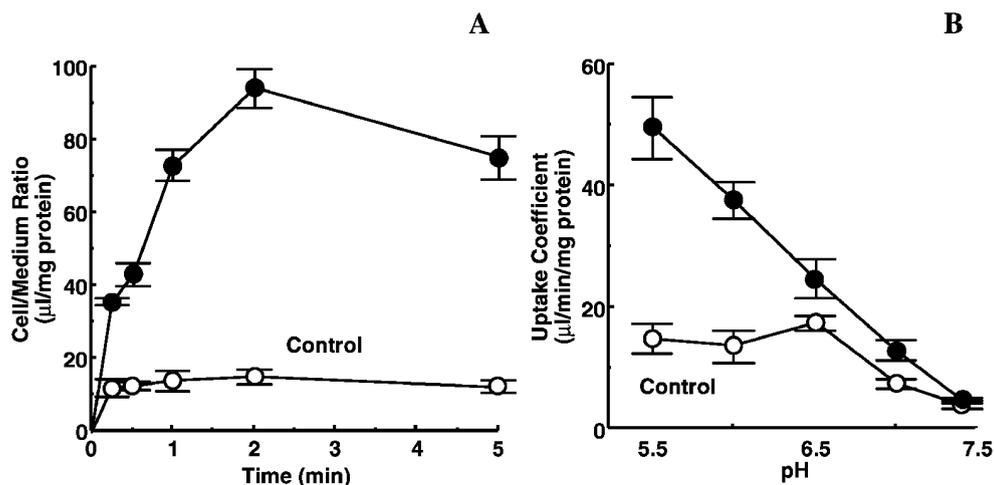


Fig. 4. Time Course (A) and pH-Dependence (B) of Uptake of [¹⁴C] Benzoic Acid by Rat *MCT1* Expressed in MDA-MB231 Cells. Uptake of [¹⁴C] benzoic acid was measured for MDA-17B231 cells transfected with rat *MCT1* (●) or with pRc-CMV vector alone (○). Each point represents the means + S.E. of four experiments.

立体選択性も観測された。⁵⁸⁾ 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及び側基底膜に MCT1 が検出された。⁶⁵⁾ MCT1 のモノカルボン酸輸送の駆動力は内側に向けられたプロトン勾配であるので、ラット小腸上皮細胞において MCT1 は、刷子縁膜近傍の microclimate 酸性 pH 環境 (5.8—6.2) を利用してモノカルボン酸を消化管管腔から細胞内 (pH 約 7.2) に、細胞内から門脈系への吸収方向の輸送に関与していると推察される。

また、ノーザンブロット解析から、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。したがって、MCT1 は多くの臓器で生理的役割を有しており、⁶⁴⁾ 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 BBB 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、BBB 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。⁶⁶⁾

一方、著者らはモノカルボン酸化合物の小腸吸収においてアニオン交換輸送系が関与することを主張してきた。Figure 5 には種々モノカルボン酸系化合物のプロトンあるいは重炭酸イオン勾配存在下における、ウサギ小腸刷子縁膜小胞への初期取り込みを示す。点線で示してあるのはいずれのイオン勾配も与えない場合の取り込みであるが、プロトン勾配あるいは重炭酸イオン勾配それぞれの存在下で初期取り込みに促進が見られた。一方、興味深いことにモノカルボン酸構造を有する高脂血症治療薬のプラバスタチンや、その部分構造を形成するメバロン酸にはプロトンとの共輸送系を介した輸送が起こるが、アニオン逆輸送系に対してはほとんど親和性を持たないという結果が得られた。⁵⁹⁾ このような両輸送機構の基質認識性の違いは、アニオン交換輸送系がプロトン共輸送系とは独立した機構として存在することを示唆している。

アニオンとの逆輸送系としては、赤血球の塩素イオン/重炭酸イオン交換体であるアニオン交換輸送系ファミリーの 1 つである AE2 が小腸刷子縁膜に

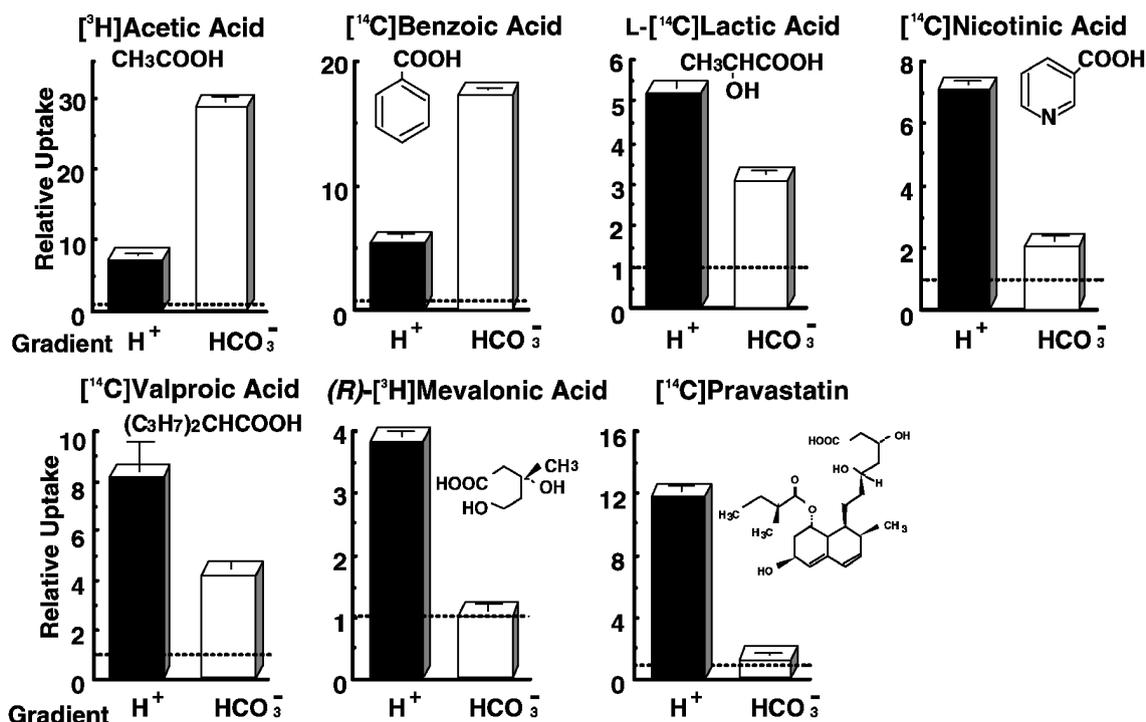


Fig. 5. Proton and Bicarbonate Dependencies for Transports of Various Monocarboxylic Acids

Initial uptake of various monocarboxylic acids was 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.

発現しているの、著者らはその一部を担うものと考えている。本研究を開始した当時では、AE2はバンド3タンパクと同様に塩素イオンや硫酸イオントランスポーターであると考えられている程度であった。著者らはマウスAE2遺伝子を米国スタンフォード大学Kopito教授から譲り受け、有機アニオン輸送活性について検討した。マウスAE2をヒト腎由来HEK293細胞に発現させ機能解析を行った結果、安息香酸、ニコチン酸などのモノカルボン酸系化合物に対し顕著な輸送活性を示した。⁷⁶⁾ 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いるの、したがってアニオン逆輸送系の1つとしてAE2がモノカルボン酸系化合物の吸収に働くことが示唆される。

モノカルボン酸系化合物の消化管吸収に寄与すると推測されるトランスポーターの同定は、今後の吸収—基質構造相関研究に有用な情報を与えるものと期待される。しかし、MCT1あるいはAE2に認識されないが、小腸刷子縁膜小胞やCaco-2において内向きのプロトン勾配を駆動力とするトランスポーターによって輸送されるメバロン酸やプラバスタチンのようなモノカルボン酸系化合物もある。恐らくモノカルボン酸トランスポーターには多様性があり、プロトン共輸送系としてのMCT1、アニオン逆輸送系としてのAE2以外のさらなる有機アニオン輸送系が存在し、化合物により役割分担して生理機能を維持していると同時に、弱酸性薬物のpH依存的消化管吸収に関与することを強く示すものである。なお、現在ではMCTファミリーとしてMCT1—MCT8までが報告されており、¹⁴⁴⁾ それらの組織分布とモノカルボン酸薬物輸送能との関係に関心が寄せられている。

3-3. リン酸トランスポーターを介する薬物吸収
抗ウィルス薬フォスカルネットは、ウサギで95%と薬物の水溶性から推測されるよりも高い吸収性と、ヒトやラット、マウスにおいては20—30%前後で、動物種差が大きい吸収特性を有している。⁶⁸⁾ 著者らは、ラット小腸刷子縁膜小胞へのフォスカルネットの取り込みを測定したところ、ナトリウムイオン勾配存在下で典型的なオーバーシュートを示し、またその初期取り込みには飽和性、リン酸輸送系阻害剤で阻害を観測した。⁶⁸⁾ これらの結果から、

フォスカルネットがリン酸輸送系を介して吸収されることが分かる。また著者らは、同様に分子内にリン酸基を有する抗生物質ホスホマイシンにおいても一部リン酸トランスポーターが関与する吸収機構を報告した。^{69,70)}

4. ABCトランスポーターを介する薬物排出

P-糖タンパク質はATPの加水分解により得られるエネルギーを駆動力とする薬剤排出ポンプとして機能するABC(ATP-binding cassette)スーパーファミリーに属するトランスポーターである。この糖タンパク質は、腫瘍細胞の多剤耐性化因子として見出され、ピンカアルカロイド、アントラサイクリン系抗がん剤など種々薬物を腫瘍細胞内から汲み出すことにより、耐性化を引き起こす。P-糖タンパク質は抗腫瘍薬のみならず、ステロイドホルモン、免疫抑制薬のシクロスポリンやタクロリムス、さらにベラパミルなどのカルシウム拮抗薬、抗不整脈薬ジゴキシンも輸送するなど、極めて幅広い基質認識性を有し、細胞外に輸送する。⁷¹⁾

著者は、1988年頃より腫瘍細胞が上記のように薬剤排出ポンプを細胞膜上に備えることによって細胞内の薬剤濃度を低下させ細胞を守る巧妙な機能に関心を持っていた。著者が薬物など生体異物に対する生体防御機構を解明したいとの思いを温めていた背景には、(1)大腸菌がβ-ラクタム抗生物質に接触した数時間の内に細胞膜透過性を低下させることによって耐性を獲得したと思われる現象を発見していたこと、^{72,73)} (2)数種のニューキロン系抗菌剤は、消化管上皮細胞、血球や筋肉、肺などの組織細胞膜を容易に透過するにも関わらず、BBBの透過性が極めて低く、脳脊髄液関門より排出輸送されるという現象を発見したこと、^{74,75)} があった。折しも1989年、β-ラクタム抗生物質の消化管・肝臓・腎臓におけるトランスポーター介在輸送の臓器間相関研究で薬学博士(東京大)の学位が授与された玉井郁巳助手は、P-糖タンパク質の基質認識に関する研究のためシカゴ大学医学部Safa博士の元に留学し、1990年シクロスポリンがP-糖タンパク質の基質となることを初めて明らかにした。⁷⁶⁾ はからずも、本トランスポーターは腫瘍細胞のみならず、腎臓、肝臓、腸管、副腎、一部の毛細血管内皮細胞など正常な組織にも発現していることが発見され、^{71,77—79)} その発現組織におけるP-糖タンパク質の生理的役割

と薬物輸送における役割の解明に関心が寄せられたが不明のままであった。

4-1. P-糖タンパク質のBBB機能 薬物の脳移行は、BBBを形成して多岐にわたる物質輸送機能を有する脳毛細血管内皮細胞によって厳密に制御されている。脳血液間の物質交換のメカニズムを理解した上での適切な薬物デザインが理想的である。

薬物などの非生理的物質においては、透過する分子の脂溶性と分子サイズによって決まる単純拡散が薬物の脳移行性の重要な決定因子であると考えられている。事実、Fig. 6に示されるように多くの化合物の見かけの脳移行性は、*n*-オクタノール/水間分配係数や拡散係数などの物理化学的特性と良い相関がある。⁷¹⁾しかし、水溶性薬物であっても後述のトランスポーターを介してBBBを効率的に透過することが明らかにされている。一方、シクロスポリン、ビンクリスチン、エピポドフィロトキシン、ドキソルビシンはいずれもそれらの脂溶性から予測されるよりはるかに低い透過性を示している。1980年以來この現象は、分子量500以上の物質のBBB透過が制限されるためと考えられてきた。^{71,77-79)}

上述のように玉井郁巳博士によってシクロスポリンがP-糖タンパク質の基質であることが発見されたことを契機に、1992年に著者らは同じく同年に鶴尾らは、これらの物質が脳毛細血管内皮細胞管腔側膜に存在するP-糖タンパク質によって能動的に内皮細胞から血液側に排出されるためであることを脳毛細血管内皮細胞培養系を用いて世界で初めて実証した。⁸⁰⁾また、著者らはラット脳虚血再灌流系を

用い、シクロスポリンとドキソルビシンの脳移行がATP依存的なP-糖タンパク質の機能によって制御されていることを実証することに成功した⁸¹⁻⁸³⁾が、残念ながらP-糖タンパク質が*in vivo*において実際に排出ポンプとして機能していることを分子レベルで証明するに至らなかったため、1992年以來2年間は空白の時代を迎えた。しかし1994年に至り、オランダ癌研究所のグループによって、脳におけるP-糖タンパク質をコードする遺伝子*mdr1a*をノックアウトしたマウスにおいてビンブラスチン及びイベルネクチンの脳移行が正常マウスのそれぞれ20倍及び80倍以上に増大することが発見された⁸⁴⁾ので、上記に示す著者ら及び鶴尾らの「P-糖タンパク質のBBB機能」仮説が正しいことが裏付けされた。^{71,77-79)}このノックアウトマウスを用いてデキサメサゾン、ジゴキシン、シクロスポリン、オンダンセトロンなどの脳内移行が*mdr1a*欠損マウスにおいて有意に増大することを示すSchinkelらの実験成績が蓄積した。^{71,77-79)}最近著者らは、*mdr1a/mdr1b*遺伝子欠損マウスを用いた検討により脂溶性のニューキノロン系抗菌薬のグレパフロキサシン、HSR-903、シプロフロキサシン (Fig. 7) 及び免疫抑制薬タクロリムスのBBB透過がP-糖タンパク質の排出によって制限されていることを確認した。^{85,86)}

したがって、BBBは静的な脂質膜バリエーではなく、生体必須物質やその構造類似薬物を特異的輸送機構により脳内に取り込み、積極的な汲み出し機構によって高脂溶性の細胞毒性物質や生体異物の脳

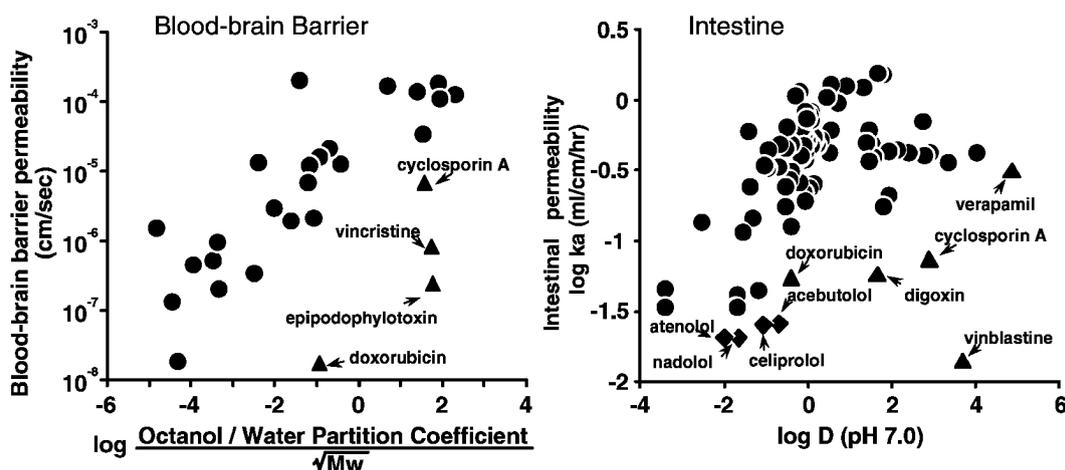


Fig. 6. Relationship between Lipophilicity and Blood-Brain Barrier or Intestinal Epithelial Permeability of Various Drugs

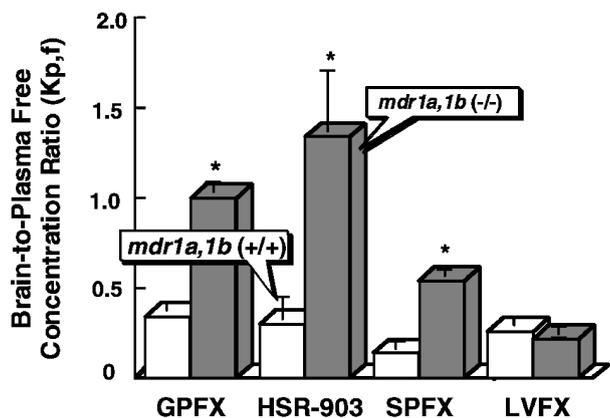


Fig. 7. Brain-to-Plasma Free Concentration Ratio ($K_{p,f}$) of New Quinolones, Grepafloxacin (GPFX), HSR-903, Spal-floxacin (SPFX) and Levofloxacin (LVFX), after I.V. Administration in *mdr1a,1b* (+/+) and *mdr1a,1b* (-/-) Mice

Dose: [14 C]GPFX, 34 nmol/head; [14 C]HSR-903, 0.36 μ mol/head; [14 C]SPFX, 0.11 μ mol/head; [14 C]LVFX, 19 nmol/head. Each column represents the mean \pm S.E. of three to six experiments. *Significantly different compared with *mdr1a,1b* (+/+) mice ($p < 0.05$).

内への侵入を防ぐなど、血液中と脳実質細胞間液中の物質輸送を制御するダイナミックインターフェイスとして機能しているものと考えられる。

BBBには *mdr1* 以外に、MRP (multidrug resistance-associated protein) のような ABC transporter superfamily のほか、 β -ラクタム抗生物質やプロベネシド、PAH など多くの有機アニオンを排出するトランスポーター群が存在する。 β -ラクタム抗生物質は、BBB のみならず血液脳脊髄液関門 (脈絡叢上皮細胞) に存在する両有機アニオントランスポーターによって排出されるために脳に移行し難いと考えられている。⁷⁹⁾

脳毛細血管内皮細胞に発現するこれらの排出輸送系は、脳における生理的恒常性を維持するための生体異物解毒機構として機能している。したがって、中枢作用型薬物にあっては、排出トランスポーターに認識・輸送され難い薬物をデザインすることが有用である。脳腫瘍に抗がん剤が効を奏しない場合には、薬剤排出機能を阻害する薬物との併用が考えられる。一方、中枢において副作用が問題となる薬物にあっては、上述のニューキノロン系抗菌薬のように排出トランスポーターに認識・輸送されやすい化合物を選択することは1つの創薬戦略である。

4-2. ABC トランスポーターを介した小腸管腔内分泌 P-糖タンパク質は小腸上皮細胞刷子縁

膜側に発現しており、種々化合物の吸収障壁として働いていることは容易に推測される。Figure 6 は多くの化合物の吸収速度と各化合物の脂溶性との関係をプロットした結果である。⁸¹⁾ 黒丸で示される化合物群においては脂溶性の増大とともに吸収性も増大し、次第に最大吸収速度に達していると解釈できる。これに対して三角又は菱形で示したいくつかの化合物は、黒丸について得られる相関曲線と比較すると著しく吸収性が低い。その中には、 β ブロッカー、シクロスポリン、ビンブラスチン、ジゴキシンなど P-糖タンパク質によって輸送される化合物が多く含まれている。⁸⁷⁾

5-HT₃ レセプターアンタゴニストであるアザセトロンは、健常人に経口投与後のバイオアベイラビリティは 87% 以上であり、58% が未変化体として尿中に排泄される。アザセトロンは極めて水溶性でありながら、さらに脂溶性の高い同効薬オンダセトロンよりも吸収性が優れている。ラットにおける経口バイオアベイラビリティは、10 mg/kg の低用量では 30% に過ぎないが、投与量の増大と共に非線形的に増大し、30 mg/kg では 90% にもなる。静脈内投与後の体内動態は線形性を示すことから、吸収と分泌の過程にトランスポーターの関与が考えられた。⁸⁸⁾ アザセトロンの *in situ* ラット消化管吸収速度定数は、濃度の上昇とともに増大するが、一定濃度以上になると減少するという、極めて複雑な非線形的消化管吸収現象が観測された。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. 8 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

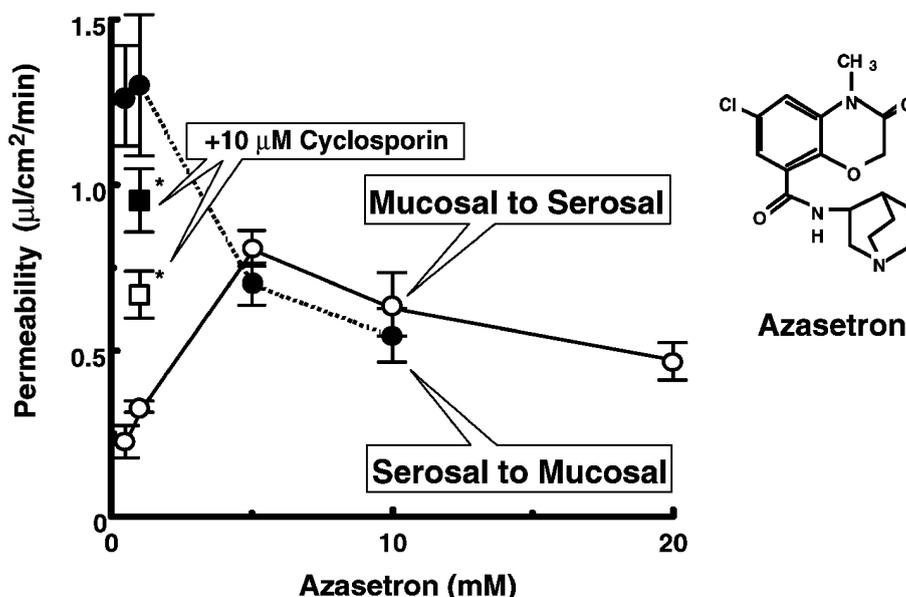


Fig. 8. Concentration Dependence of Permeability of Azasetron across Rat Ileal Tissue Mounted on Ussing Chamber

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. Each point represents the mean \pm S.E. of three to four experiments. *Significantly different compared with the flux in the absence of cyclosporin ($p < 0.05$).

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-糖タンパク質の関与の可能性について、P-糖タンパク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。シクロスポリン 10 μ M 存在下での低濃度アザセトロン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。Caco-2 細胞においてもP-糖タンパク質による分泌輸送を確認すると同時に、取り込みに働くトランスポーターの関与が示唆された。⁸⁸⁾

以上の結果から、小腸において薬物の一部はP-糖タンパク質を介して分泌され、P-糖タンパク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の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。分泌輸送のみの場合にはバイオアベイラビリティの低下が予想されるが、吸収方向にトランスポーターの関与がある場合には良好な吸収が期待される。アザセトロンヒトにおける良好で個体差の少ないバイオアベイラビリティは、吸収方向のトランスポーターの関与があるためと思われる。

小腸上皮細胞刷子縁膜にはP-糖タンパク質の他

にMRP2が発現している。Caco-2細胞を用いた実験から、MRP2がパラアミノ馬尿酸(PAH)などの有機アニオンの小腸管腔への排出に関与していると推測される結果を得ている。⁸⁹⁾ グレパフロキサシンやHSR-903などのニューキノロン系抗菌薬はP-糖タンパク質とMRP2の基質であるが、両排出ポンプによって消化管管腔に分泌されるにもかかわらず、経口バイオアベイラビリティが良好である。これは、小腸上皮細胞にはニューキノロン系抗菌薬の吸収に働くトランスポーターが備わっているためである。^{90,91)}

なお、最近著者はこのような吸収方向に機能するトランスポーターをパスポートタンパク質 passport protein、生体異物の解毒に関わる排出トランスポーターや代謝酵素をゲートウェイタンパク質 gateway protein と呼称している。これらのタンパク質が、それぞれ生体にとって「必要なもの」を細胞内に取り込み、「不要なもの」を細胞外に排除する分子機構を担っていると思われる。

5. 薬物のBBB透過制御機構

水溶性のグルコース、アミノ酸、モノカルボン酸、アミン、カルニチンなどの栄養物質やT3などのホルモンを循環血液中から選択的に取り込むために、BBBにはそれぞれ独立したトランスポーター

が備わっている。これらの栄養物トランスポーターは、親水性の基質を比較的高い透過速度で運ぶことができるので、基質の構造認識特性が高いという制約はあるが脳へのドラッグデリバリーに利用できる。^{71,77-79,92-94)}

以下に、薬物のトランスポーター介在 BBB 透過が確認できた著者らの最新の研究成果を述べる。

5-1. トランスポーターが介在する酸性薬物輸送 乳酸、短鎖脂肪酸などの弱酸性化合物は、モノカルボン酸輸送系を介して BBB を透過する。⁹⁵⁻¹⁰⁰⁾ 著者らがラット小腸からクローニングしたモノカルボン酸トランスポーター MCT1 は、脳毛細血管内皮細胞中にも存在し、弱酸性化合物輸送機能の一部を担っている。^{57,97)} モノカルボン酸輸送系については脳からの排出方向の活性が高いという示唆もある。著者らは一部の HMG-CoA 還元酵素阻害薬、サリチル酸やバルプロ酸などもモノカルボン酸系化合物特異的なトランスポーターを介して脳内に取り込まれることを明らかにした。⁹⁸⁻¹⁰⁰⁾

5-2. トランスポーターが介在する塩基性薬物輸送 塩基性薬物は、細胞が有する負の膜電位あるいは細胞表面の負電荷と薬物分子の正電荷との複雑な相互作用による単純拡散とトランスポーターが関与する BBB 透過があるが、その区別はしばしば困難である。高脂溶性のプロプラノロールやリドカインの BBB 透過には単純拡散と塩基性薬物特異的な促進拡散の関与が示唆されている。¹⁰¹⁻¹⁰⁶⁾

第 1 世代抗ヒスタミンであるメピラミンはプロプラノロール、イミプラミン、リドカインと同様にアミン輸送系を介して BBB を透過する。¹⁰³⁻¹⁰⁴⁾ セチリジンのように分子内にアミノ基とカルボキシル基を有する両性イオン型の抗ヒスタミン薬は第 1 世代のカチオン型抗ヒスタミン薬（シプロヘプタジン、ケトチフェンなど）に比してメピラミンを輸送するトランスポーターに対する親和性が低く、中枢神経系への移行性が低下する。¹⁰⁵⁾ 第 2 世代抗ヒスタミン薬のテルフェナジンとエバスチンは一種のプロドラッグであり経口投与後活性体である両性型のカルボン酸代謝物（前者はヘキサフェナジン、後者はカレバスチン）となる。カレバスチンはメピラミントランスポーターに対する親和性が低いばかりでなく、P-糖タンパク質によって脳内血管内皮細胞より排出される（すなわち BBB を透過し難い）ため、副

作用としての鎮静作用が回避される。^{105,106)} このように小腸と BBB に備わるトランスポーターに対する親和性の相違を利用すれば、経口投与後、小腸上皮細胞を効率よく透過させ、かつ脳移行性を制限することによって中枢神経系での副作用を軽減できる。

5-3. 吸着介在型エンドサイトーシスを利用したペプチドの脳デリバリー レセプター介在型エンドサイトーシスに比べ特異性が低い、様々なペプチドの脳デリバリーに応用性が高いと期待できる手法が、ペプチドの正電荷と細胞膜表面に存在する糖鎖等の負電荷との相互作用を利用する吸着介在型エンドサイトーシス (adsorptive-mediated endocytosis, AME) である。著者らは、生理活性薬物として分子量約 1,000、等電点 10 の κ -受容体への結合性を保ったままで安定性を向上させたダイノルフィン類似ペプチド E-2078 (H-MeTyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-MeArg-D-Leu-CONHEt) 及び ACTH の類似体でアルツハイマー型抗痲呆薬として期待された ebiratide (H-Met(O₂)-Glu-His-Phe-D-Lys-Phe-CONH(CH₂)₈NH₂) の塩基性ペプチドが、初代培養ウシ脳毛細血管内皮細胞を用いた取り込み実験により、両ペプチドが AME の基質となることを実証し、さらに脳微小透析法を用いて実際に両塩基性ペプチドが未変化体として脳細胞間液中にまでトランスサイトーシスされていることを確認した。¹⁰⁷⁻¹¹⁰⁾ 一方、著者らはモデルペプチドとして 001-C₈ (H-MeTyr-Arg-MeArg-D-Leu-CONH(CH₂)₈NH₂) と名付けた塩基性ペプチドを基に種々誘導体を合成し、そのエンドサイトーシス活性を測定した。その結果、AME には塩基性度、脂溶性とも適度な特性が重要であり、過度な脂溶性、塩基性は本機構を介した脳デリバリーには適さないと思われた。^{111,112)} AME は小腸、腎や肝でも進行するので脳特異性をもたらすことは困難であるが、上記のモデル塩基性ペプチドが小腸上皮細胞を AME 機構を介して輸送されることを実証できたので、¹¹³⁻¹¹⁵⁾ PEPT1 により吸収が期待できないテトラペプチド以上のペプチドの経口による脳デリバリー戦略として応用できる。

6. 肝臓、腎臓における薬物膜輸送の機構論的解析

薬物消失組織として体内動態への影響が大きい肝臓及び腎臓においても、組織抽出法、遊離細胞及び単離膜小胞の手法を用い、 β -ラクタム抗生物質の

膜輸送機構を検討した。その結果、肝実質細胞の側基底膜及び胆管膜、腎尿管上皮細胞の側基底膜及び刷子縁膜において機能するトランスポーターに対する誘導体間での親和性の違いが、胆汁排泄あるいは尿中排泄に選択性を引き起こしていることを示すことができた。¹¹⁶⁻¹²²⁾

著者らはリン酸トランスポーターとしてクローニングしたマウス及びヒト NPT1 が Na⁺ 依存的にリン酸を輸送すると同時に PAH のみならず、ファロペナムなどの β -ラクタム抗生物質を Na⁺ 非依存的に輸送する多機能性トランスポーターであることを発見した。^{123,124)} 抗マウス NPT1 抗体を用いた組織免疫染色の結果より、肝実質細胞では側基底膜側に、腎尿管上皮細胞では刷子縁膜側に発現していることが確認されているので、NPT1 は腎尿管刷子縁膜上に発現して PAH を輸送することが特定できた最初のトランスポーターとなろう。NPT1 遺伝子発現 HEK293 細胞への [³H] PAH, [¹⁴C] ベンジルペニシリン, [³H] ファロペナムの取り込みが、細胞外に 140 mM Cl⁻ の存在により完全に阻害されることから、NPT1 はこれらの有機アニオンの細胞からの排出輸送に関わっていると推察される。^{123,124)} 一方、腎尿管上皮細胞に発現し、PAH や β -ラクタム抗生物質などの有機アニオンを輸送するトランスポーターとして OAT1 が確認されているが、これは側基底膜側に発現して 2-ケトグルタル酸などジカルボン酸との交換輸送によりこれら有機アニオンを細胞内に上り坂輸送することが明らかにされている。¹²⁵⁾ また、有機アニオントランスポーターとしてヒト OATP ファミリーをクローニングし、それぞれ OATP-A, OATP-B, OATP-C, OATP-D, OATP-E と命名し、それらの輸送機能を解析した。^{126,127)} OATP-A と OATP-C は既にそれぞれ OATP¹²⁸⁾ 及び LST-1¹²⁹⁾ として単離されていたものと同じものであったが、OATP-B, OATP-D 及び OATP-E は新規の有機アニオントランスポーターであった。脳に発現する OATP-A を除く OATP ファミリーはいずれも肝臓に発現しているが、OATP-C (LST-1, OATP-2) は肝臓のみに発現があるのに対し、他の OATPs は肝臓以外の組織にも発現していた。¹²⁷⁻¹²⁹⁾ OATP-B, -C, -D, -E はいずれも estrone-3-sulfate を基質とするが、肝細胞血液側膜にのみ発現する OATP-C はベンジルペ

ニシンを輸送し、¹²⁶⁾ その estrone-3-sulfate の取り込みは胆汁排泄型の β -ラクタム抗生物質によって強く阻害された。

以上の知見に基づいて、 β -ラクタム抗生物質の肝・腎排泄経路の選択性は次のように説明できる。循環血中にある β -ラクタム抗生物質は、肝臓においては側基底膜上に発現する有機アニオントランスポーター OATP-C (LST-1) を介して肝実質細胞内に取り込まれるが、NPT1 を介して循環血液系に、肝胆管膜上に発現する MRP2 を介して胆汁中に排出されるものと推察される。胆汁排泄型のセフォペラゾンの胆汁排泄クリアランスが正常ラットと比較して、MRP2 遺伝子を欠損した EHBR (Eizai Hyperbilirubinomia Rat) で著しく減少することから胆汁排泄における MRP2 の関与が明らかとなっている。一方、腎尿管側基底膜上に発現する OAT1 は血中の β -ラクタム抗生物質や PAH など有機アニオンを細胞内に取り込み、刷子縁膜上に発現する NPT1 又は MRP2 を介して、これらを尿中に排出するものと推察される。セファゾリンに代表される誘導体が尿中に排泄されるのに対し、セフォペラゾンやセフピラミドなどの一部のものが胆汁中に排泄されるという β -ラクタム抗生物質の排泄経路に関わる体内動態上の特徴は、これらトランスポーターに対する親和性の相違によって生じているものと思われる。¹²⁵⁾

ニューキノロン系抗菌薬についても誘導体間で排泄経路に選択性があることから、排泄機構についても検討した。その結果、その多くは未変化体として尿中に排泄される⁷⁵⁾ が、グレパフロキサシンや HSR-903 などの誘導体は、肝実質細胞の側基底膜に備わるトランスポーターによって細胞内に取り込まれグルクロン酸抱合され、未変化体と共に MRP2 を介して胆汁中に排泄されることを明らかにした。¹³⁰⁻¹³⁴⁾

このようにトランスポーターの薬物に対する親和性が組織間で異なることの発見は、トランスポーターを利用した薬物の組織移行性や排泄経路を合理的に制御できる可能性を見出したものとして、新薬開発の新しい戦略として注目に値する。

7. カルニチントランスポーター OCTN2 の遺伝子変異に起因する全身性カルニチン欠乏症

カルニチン (β -hydroxy- γ -trimethylaminobutyric

acid) はあらゆる生物の各組織に存在し、極めて水溶性の内因性物質であり、特に脂肪酸代謝において重要な役割を担っていることが知られている。脂肪酸は細胞内へ移行した後、ミトコンドリア内膜へ運搬され、 β -酸化を受けることによりエネルギー生成に重要な ATP を生成するが、脂肪酸単独ではミトコンドリア膜を通過する事ができず、カルニチンと結合して始めてミトコンドリア膜内シャトル機構により輸送される。ヒトでのカルニチンの供給は肝、腎などにおける生合成(約 25%)と魚、肉類などの食事からの摂取(約 75%)により行われており、栄養学的にはビタミン T とも呼ばれている。¹³⁵⁾

全身性カルニチン欠乏症 (Systemic Carnitine Deficiency; SCD) は血液、組織中カルニチン濃度の著しい低下を引き起こす遺伝性疾患である。それゆえ SCD 患者では細胞内カルニチン含量の著しい低下を導き、脂肪酸代謝によるエネルギー供給が得られず、特に心筋、骨格筋などのエネルギー産生を脂肪酸代謝に依存している組織において、進行性の拡張型心筋症や骨格筋症などの重篤な症状が現れる。カルニチンは極めて水溶性の物質であることから、脂質二重層で形成されている細胞膜を通過し難いはずであるが、実際にはその透過性は良好である。このことはこれら細胞膜表面にカルニチンを濃縮的に輸送する「カルニチントランスポーター」が存在しているためと推測され、SCD 患者ではこの推定上の「カルニチントランスポーター」の機能異常が発症原因であると考えられていた。

糸球体濾過されたカルニチンは腎尿細管において約 90% が再吸収されるが、このカルニチントランスポーターは腎臓においてカルニチンの再吸収にも関わっており、体内カルニチンの恒常性維持に対して大きく寄与していることが示唆されている。この機能異常が全身的な血中カルニチンの低下を招いているものと推測されていたが、その分子の実体については長い間明らかにされず、SCD 発症の分子メカニズムは謎に包まれていた。¹³⁵⁾

1988 年、金沢大学動物実験施設で自然発症的にカルニチン欠乏症状を引き起こす Juvenile Visceral Steatosis (jvs) mouse が発見された。¹³⁶⁾ この jvs マウスの病態並びに生化学的所見はヒト SCD と良く一致していることから SCD のモデル動物として位

置付けられ、第 11 番染色体の領域にマウス SCD の原因となるカルニチントランスポーターをコードする遺伝子が存在すると推測された。一方、1998 年小泉らは一人の患者を含むただ 1 つの家系を用いて変異遺伝子の染色体上の位置を非常に細かく絞り込むことに成功した。^{135,136)} この絞り込まれた位置は CDSP (Carnitine Deficiency Systemic Primary Locus) 遺伝子座と命名され、ヒト第 5 番染色体の q31.1 にマップされた。この位置は jvs マウスで推定された領域に相当するものであり、ヒトとマウスは同一の遺伝子変異、すなわちカルニチントランスポーターの機能異常により SCD 症状が惹起されることを強く示唆するものであった。

7-1. 有機カチオントランスポーター OCTN ファミリーの構造と機能 新規な有機カチオントランスポーター遺伝子の単離を模索していた著者らは、有機カチオン系薬物及び内因性物質を輸送する新規トランスポーターファミリー OCTN の遺伝子を発見し、その機能解析に成功した。¹³⁷⁻¹⁴⁶⁾

最初に発見したヒト OCTN1 (hOCTN1) は既存の有機カチオントランスポーター OCT ファミリーや有機アニオントランスポーター OAT ファミリーとそれぞれ約 30% の相同性を有し、さらに 1 つの ATP 結合サイト (nucleoside 結合部位) を所有していることから OCTN と命名した。¹³⁷⁾ hOCTN1 はその発現が肝臓や腎臓など組織特異性の高い OCT, OAT ファミリーと異なり、腎臓、小腸、骨格筋、脳、肺など広い組織分布を示したが、成人の肝臓には認められなかった。hOCTN1 はそのアミノ酸配列から推測されたように、種々の有機カチオン性化合物に対する輸送活性を有しており、その特性は pH 感受性でありかつ膜電位非依存性であることが確認された。^{137,138)} さらに、著者らはヒト腎臓に hOCTN1 と高い相同性 (75.8%) を有する新規な遺伝子が存在することを見出し、クローニング並びに機能解析を行った。¹³⁸⁾ 新規遺伝子のコードするタンパク質は hOCTN1 との相同性の高さからヒト OCTN2 (hOCTN2) と名付けたが、hOCTN2 においては hOCTN1 の良い基質であったテトラエチルアンモニウム (TEA) の輸送活性は hOCTN1 のそれと比較し低いものであった。また、 H^+ /有機カチオンアンチポーターの基質として報告されているグアニジンの輸送は全く認められなかった (Fig. 9)。

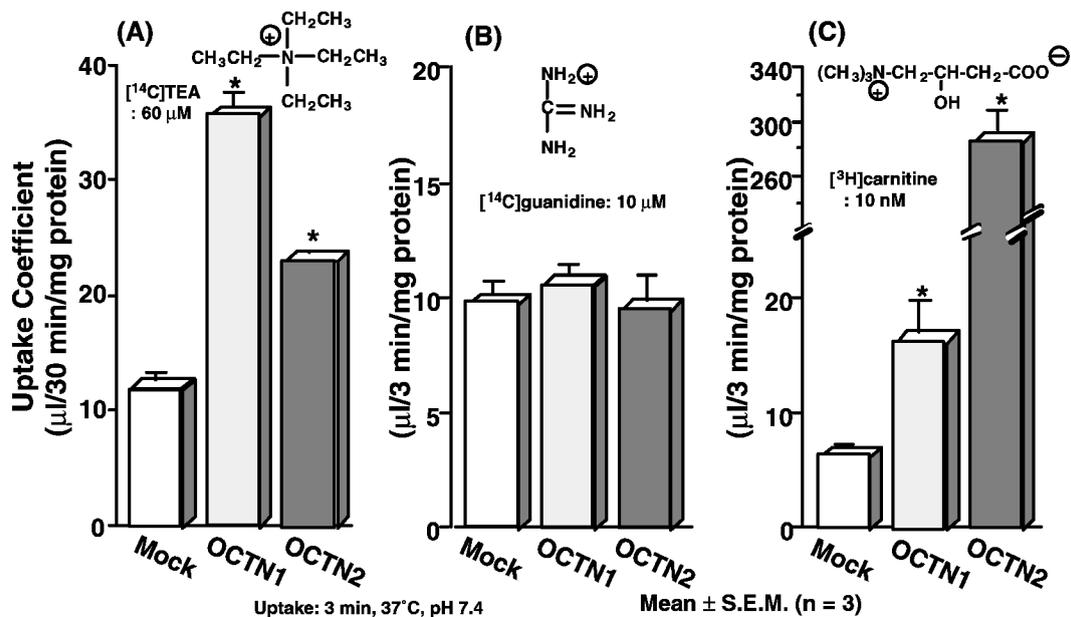


Fig. 9. Uptake of $[^{14}\text{C}]$ Tetraethylammonium (A), $[^{14}\text{C}]$ Guanidine (B) and L- $[^3\text{H}]$ Carnitine (C) by OCTN1 or OCTN2 Transfected HEK293 Cells

著者らは hOCTN2 のノーザンブロット解析から腎臓、骨格筋、胎盤、心臓などに強く発現し、その他肝臓、脳、小腸などあらゆる組織に発現していることから、生体内で重要な働きをする内因性物質の輸送に関わっていることかつエネルギー要求性の高い組織に高発現していることに着目し、脂肪酸代謝に重要な両性イオン化合物であるカルニチンをその候補として挙げた。その結果、hOCTN2 のカルニチン取り込みは著しく、さらにこの取り込みは Na^+ に完全に依存する特性を示した。しかも、親和性 (K_m : $4.3 \mu\text{M}$)、基質認識性など種々の輸送特性は過去に組織・細胞レベルで報告されている Na^+ 依存性の高親和性カルニチントランスポーターの特性と一致するものであり、「幻のカルニチントランスポーター」の実体をつかんだことを確信した。¹³⁸⁾

著者らは OCTN2 の腎臓での発現部位を調べるためにマウス OCTN2 抗体を用いたマウス腎臓切片の免疫染色を行い、OCTN2 が腎尿細管刷子縁膜側に発現していることを確認した。¹⁴⁷⁾ すなわち、OCTN2 が腎尿細管で実際にカルニチンの効率的な再吸収に関わっていることを強く示唆するものである。

7-2. OCTN2 遺伝子変異が引き起こす SCD
カルニチントランスポーター OCTN2 の発見で最も興味を持たれたのは、SCD 患者や jvs マウスにお

いてこの遺伝子変異が原因となっているか否かであった。そこで、初めに hOCTN2 の配列情報を基に正常及び jvs マウス OCTN2 遺伝子クローニングを行い、遺伝子並びに機能解析を試みた。その結果、Fig. 10 に示されるように jvs マウス OCTN2 では正常マウスと比較し、352 番目のロイシンをコードしているコドン (CTG) がアルギニンをコードするコドン (CGG) へと一塩基置換が起こっていた。また、jvs マウスの OCTN2 発現細胞では Na^+ 存在下でもカルニチン輸送活性は著しく低く、カルニチントランスポーターとしての機能を欠損していることが明らかとなった。¹³⁹⁻¹⁴¹⁾ すなわち、jvs マウスでは OCTN2 遺伝子のたった 1 つの塩基置換が全身性カルニチン欠乏症を引き起こす原因となっているものと考えられた。¹³⁹⁾

ヒトについては 3 組の互いに血縁関係のない SCD 家系における OCTN2 遺伝子の解析を行った。その結果、いずれの家系においても OCTN2 遺伝子の変異が存在することが明らかとなった。変異はフレームシフトに基づくストップコドンの出現により不完全なタンパク質が生成する変異、一部配列の欠損、スプライシング部位の変異が見出された (Fig. 10) が、いずれも成熟タンパク合成及び輸送機能を失っているものと考えられた。また、すべての家系において SCD 患者は両親からそれぞれ受け

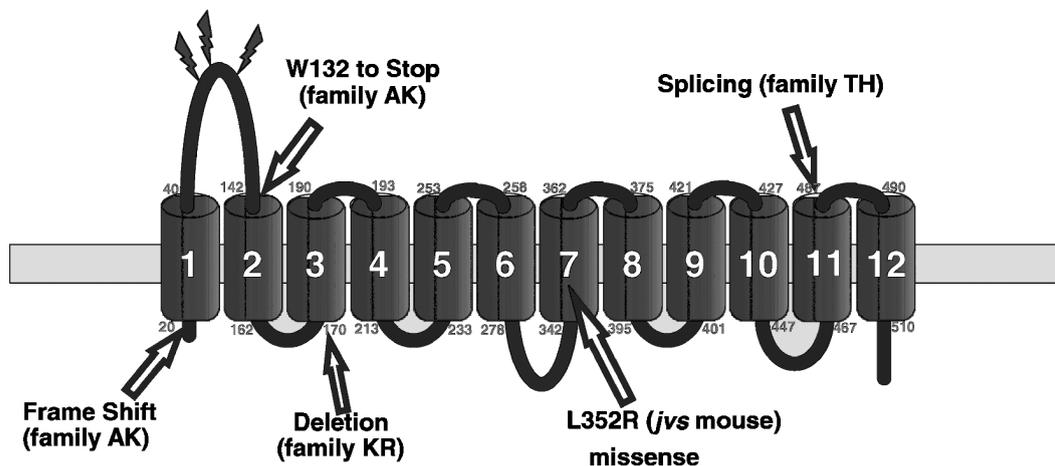


Fig. 10. Predicted Secondary Structure of OCTN2 and Mutations in JVS Mouse and in Japanese Patients with Systemic Carnitine Deficiency (SCD)

継いだ2つの *OCTN2* 遺伝子の両方に変異を持ち、*OCTN2* のカルニチン輸送機能の完全な損失がSCD発症の原因であることが示された。こうして、著者らはSCDがカルニチントランスポーター *OCTN2* の機能損失変異により発症していることを世界で初めて証明することに成功した。¹³⁶⁾ その後、種々の研究グループによりSCD患者の様々な *OCTN2* 変異が次々と報告されるに至っている。^{135,144)}

7-3. SCDの遺伝子診断と *OCTN2* 遺伝子変異の発現頻度 SCDの正確な疫学的調査は現在まで行われておらず、その発現頻度については謎に包まれており、比較的低い頻度であると考えられていた。しかし、変異 *OCTN2* 遺伝子の頻度について秋田県で自動車販売を担当する男女を対象に分析した結果、*OCTN2* 遺伝子変異の頻度は1.01%と予想以上に高い結果を得た。¹⁴⁵⁾ この頻度は一般正常人中においてヘテロで変異 *OCTN2* 遺伝子を持っている頻度であり、この値からSCD発現頻度を見積もると、新生児約1/4万人という驚くべき高さであった。この概算を確認するためには全国的な大規模疫学調査による詳細な検討が必要であると考えている。

OCTN2 遺伝子変異の頻度はSCDのリスクのみならずヘテロで変異を持つことによる健康障害リスクという観点からも重要な問題である。ヘテロで変異を持つ人は正常人と比較し明らかに血中カルニチンレベルが低いことが分かっているが、その恒常的に低い血中カルニチンレベルが長期的にどのような健康

障害をもたらすかについては明らかではない。少なくとも高齢者においては心臓、骨格筋機能などの低下が想定され、特に正常高齢者より機能低下の促進が予想される。これらの謎については *OCTN2* 遺伝子変異スクリーニングシステムの開発、それを用いた全国レベルの大規模な疫学調査の実施とその結果を待たねばならない。

7-4. *OCTN2* のカルニチン及び有機カチオン輸送における多機能性 著者らはhOCTN2が両性イオン化合物であるカルニチン類をNa⁺ 依存的に輸送することのみならず抗ヒスタミン薬ピリラミン、Ca拮抗薬ベラパミルなどの種々の有機カチオン類をNa⁺ 非依存的に輸送することを見出している。¹⁴⁶⁾ すなわち、1つのトランスポーターが異なる輸送駆動力によりそれぞれ異なる基質を輸送するという多機能性を有するものである。著者らはこのような多機能性を示すトランスポーターをNPT1においても発見している。^{123,124)} NPT1は、Na⁺ 依存的に無機リン酸を細胞内に取り込むと同時に、Na⁺ 非依存的にPAHやβ-ラクタム抗生物質など有機アニオンを細胞内から排出する。これまで機能が明らかにされたトランスポーターのなかでも *OCTN2* 及びNPT1以外には見られない、極めて興味深い輸送特性である。また、hOCTN2によるNa⁺ 依存的なカルニチン輸送は有機カチオンのみならず、バルプロ酸のような有機アニオンなど種々の薬物により阻害されることから、高投与量による長期服用における薬物誘導型カルニチン欠乏症あるいはそれに

基づく腎毒性との部分的関与が示唆されており、¹⁴⁶⁾ 遺伝学的のみならず薬理学並びに毒性学的にも重要なトランスポーターであると考えられる。

8. おわりに

薬物の生体認識と化学構造との関連性が解明できるかどうかは薬物の体内動態の理解、特に経口剤の開発戦略にとって重要な鍵となる。内因性物質を輸送するトランスポーター群が上述のように、薬物を認識・輸送する分子の実体が次々と明らかにされてきている。しかし、組織細胞膜に備わるトランスポーター群の構造・機能解明に関する分子生物学的研究はやっと端緒をついたばかりである。トランスポーター研究は、生体にとって「必要なもの」と「不要なもの」とに選別輸送する生体機能の解明に重要である。また、小腸など限定された組織に発現するペプチドトランスポーターが腫瘍細胞において発現していることを利用すれば腫瘍組織のみにペプチド系抗癌剤をデリバリーすることは可能であるとする著者らの戦略¹⁴⁸⁾からも理解できるように、将来は臓器特異的なトランスポーターをターゲットとした創薬・創剤の研究開発が発展するものと期待される。

謝辞 本研究は、 β -ラクタム抗生物質の安定性に関する化学反応速度論的研究を進めたことに端を発して、種々の新規な発見につながったものであり、本抗生物質に関する研究テーマと大学で研究者としての道を与えていただき、終始暖かく御支援と励ましをいただきました恩師山名月中金沢大学名誉教授に深甚なる謝意を表します。学生としてあるいは同僚として本研究プロジェクトに参加し、協力いただいた北陸大薬学部 宮本悦子教授、共立薬科大学 中島恵美教授、東北大大学院薬学研究科 寺崎哲也教授、東京理科大学薬学部 玉井郁巳教授、昭和大学薬学部 佐藤 均教授、帝京大学薬学部 出口 芳春助教授、金沢大学薬学部 崔 吉道博士に感謝致します。生理学的モデル構築に協力いただいた故市村藤雄・金沢大学名誉教授、金沢大学医学部附属病院薬剤部 河原昌美氏に深謝します。ペプチドトランスポーター研究に協力と助言を頂いた星猛元静岡県立大学長、米国ジョージア医科大学 F. H. Leibach 教授、米国ミシガン大学薬学部 G. L. Amidon 教授、米国ラトガー大学薬学部 P. J.

Sinko 教授、徳島大学医学部 武田英二教授・宮本賢一教授・白神俊幸博士、金沢大学がん研究所 佐々木琢磨教授に感謝致します。塩基性ペプチドの合成と吸着介在エンドサイトーシス研究に協力いただいた近畿大学理工学部 若宮 建昭教授、アベンティス・ファーマ(株)・志村武貞博士・田端 滋博士に感謝します。P-糖タンパク質、トランスポーター遺伝子やその発現系に関する研究では、金沢大学医学部 山本 博教授・東田 陽博教授・山下純宏教授・井関 尚一教授・山嶋哲盛助教授、福井県立大学 森谷修三教授、エーザイ(株)・加藤 晃良博士、キノロン抗菌薬に関する研究では、東京大学大学院薬学系研究科・杉山 雄一教授、加藤 将夫博士(現金沢大学薬学部助教授)、大塚製薬(株)・笹部裕行博士、北陸製薬(株)・加藤 日出男博士・永田 治博士・桶崎 英一博士、村田 光夫氏、持田製薬(株)萩原 琢男博士に、OCTN2 とカルニチン欠乏症の関連研究では、早川純一郎・金沢大学名誉教授、金沢大学医学部附属動物実験施設 浅野雅秀教授・橋本憲佳博士・二階堂 浩子博士、金沢大学医学部附属病院薬剤部 宮本謙一教授・横川弘一助教授、中外製薬(株)・根津淳一博士・奥 飛鳥、嶋根みゆき氏、京都大学医学部 小泉昭夫教授、東北大学医学部大浦敏博助教授、久留米大学医学部 松石豊次郎助教授、京都大学大学院薬学研究科 辻本豪三教授、田辺製薬(株)大橋 力也博士にそれぞれ多大の協力をいただいた。ここに厚く御礼を申し上げます。

製剤学研究室(現創剤科学研究室)にて本研究に参加された多くの博士課程、修士課程、学部における学生諸氏と研究生、その他多くの共同研究者の協力によって本研究が達成できたものであり、これらの諸氏に深く感謝します。

さらに、研究費の一部は文部省科学研究費、厚生省がん研究助成金、ヒューマンサイエンス財団創薬科学総合研究事業及び創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業研究費、戦略的基礎研究推進事業(CREST)研究費、武田科学振興財団助成金、東京生化学研究会研究助成金、臨床薬理研究振興財団研究奨励金、上原記念生命科学財団研究助成金、中富健康科学振興財団研究助成金によった。ここに記して深く感謝の意を表します。

REFERENCES

- 1) Tsuji A., Yoshikawa T., Nishide K., Minami H., Kimura M., Nakashima E., Terasaki T., Miyamoto E., Nightingale C. H., Yamana T., *J. Pharm. Sci.*, **72**, 1239–1252 (1983).
- 2) Tsuji A., Nishide K., Minami H., Nakashima E., Terasaki T., Yamana, T., *Drug Metab. Dispos.*, **13**, 729–739 (1985).
- 3) Tsuji A., Sato H., Tamai I., Adachi H., Nishihara T., Ishiguro M., Ohnuma N., Noguchi T., *Drug Metab. Dispos.*, **18**, 245–252 (1990).
- 4) Tsuji A., Terasaki T., Imaeda N., Nishide K., Nakashima E., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **8**, 167–174 (1985).
- 5) Deguchi Y., Koshida R., Nakashima E., Watanabe R., Taniguchi N., Ichimura F., Tsuji A., *J. Pharm. Sci.*, **77**, 674–678 (1988).
- 6) Tsuji A., Terasaki T., Imaeda N., Nishide K., Tamai I., *J. Pharm. Sci.*, **78**, 535–540 (1989).
- 7) Koshida R., Nakashima E., Taniguchi N., Tsuji A., Benet L. Z., Ichimura F., *Pharm. Res.*, **6**, 486–491 (1989).
- 8) Sato H., Yoshioka K., Terasaki T., Tsuji A., *Biochim. Biophys. Acta*, **1073**, 442–450 (1991).
- 9) Sato H., Terasaki T., Okumura K., Tsuji A., *Pharm. Res.*, **8**, 563–569 (1991).
- 10) Ichimura F., Yokogawa K., Yamana T., Tsuji A., Mizukami Y., *Int. J. Pharm.*, **15**, 321–333 (1983).
- 11) Ichimura F., Yokogawa K., Yamana T., Tsuji A., Yamamoto K., Murakami S., Mizukami Y., *Int. J. Pharm.*, **19**, 75–88 (1984).
- 12) Okezaki E., Terasaki T., Nakamura M., Nagata O., Kato H., Tsuji A., *Drug Metab. Dispos.*, **16**, 865–874 (1988).
- 13) Nagata O., Murata M., Kato H., Terasaki T., Sato H., Tsuji A., *Drug Metab. Dispos.*, **18**, 902–910 (1990).
- 14) Nakashima E., Matsushita R., Ohshima T., Tsuji A., Ichimura F., *Drug Metab. Dispos.*, **23**, 1220–1224 (1995).
- 15) Kawahara M., Nanbo T., Tsuji A., *Biopharm. Drug Dispos.*, **19**, 445–453 (1998).
- 16) Kawahara M., Sakata A., Miyashita T., Tamai I., Tsuji A., *J. Pharm. Sci.*, **88**, 1281–1287 (2000).
- 17) Deguchi Y., Terasaki T., Kawasaki S., Tsuji A., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **14**, 483–492 (1991).
- 18) Deguchi Y., Terasaki T., Yamada H., Tsuji A., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **15**, 79–89 (1992).
- 19) Araki H., Ogake N., Minami S., Watanabe Y., Narita H., Tamai I., Tsuji A., *J. Pharm. Pharmacol.*, **49**, 1141–1144 (1997).
- 20) Terasaki T., Deguchi Y., Kasama Y., Pardridge W. M., Tsuji A., *Int. J. Pharm.*, **81**, 143–152 (1992).
- 21) Terasaki T., *Yakubutsu Dotai*, **7**, 89–98 (1995).
- 22) Tsuji A., Miyamoto E., Kagami I., Sakaguchi H., Yamana, T., *J. Pharm. Sci.*, **67**, 1701–1704 (1978).
- 23) Tsuji A., Nakashima E., Kagami I., Honjo N., Yamana, T., *J. Pharm. Pharmacol.*, **29**, 707–708 (1977).
- 24) Tsuji A., Nakashima E., Asano T., Nakashima R., Yamana, T., *J. Pharm. Pharmacol.*, **31**, 718–720 (1979).
- 25) Tsuji A., Nakashima E., Kagami I., Yamana T., *J. Pharm. Sci.*, **70**, 768–772 (1981).
- 26) Tsuji A., Nakashima E., Kagami I., Yamana Y., *J. Pharm. Sci.*, **70**, 772–777 (1981).
- 27) Nakashima E., Tsuji A., Kagatani S., Yamana, T., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **7**, 452–464 (1984).
- 28) Nakashima E., Tsuji A., Mizuo H., Yamana T., *Biochem. Pharmacol.*, **33**, 3345–3352 (1984).
- 29) Tsuji A., Hirooka H., Tamai I., Terasaki T., *J. Antibiotics*, **39**, 1592–1597 (1986).
- 30) Tsuji A., Tamai I., Hirooka H., Terasaki T., *Biochem. Pharmacol.*, **36**, 565–567 (1987).
- 31) Tsuji A., Hirooka H., Terasaki T., Tamai I., Nakashima, E., *J. Pharm. Pharmacol.*, **39**, 272–277 (1987).
- 32) Tsuji A., Terasaki T., Tamai I., Hirooka H., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **241**, 594–601 (1987).
- 33) Tamai I., Ling H.-Y., Simanjuntak M. T., Nishikido J., Tsuji A., *J. Pharm. Pharmacol.*, **40**, 320–324 (1988).
- 34) Tsuji A., Tamai I., Nakanishi M., Terasaki T., Hamano S., *J. Pharm. Pharmacol.*, **45**, 996–998 (1993).
- 35) Tamai I., Tomizawa N., Kadowaki A., Terasaki T., Nakayama K., Higashida H., Tsuji

- A., *Biochem. Pharmacol.*, **48**, 881–888 (1994).
- 36) Tamai I., Tomizawa N., Takeuchi T., Nakayama K., Higashida H., Tsuji A., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **273**, 26–31 (1995).
- 37) Miyamoto K., Shiraga T., Morita K., Yamamoto H., Haga H., Taketani Y., Tamai I., Sai Y., Tsuji A., Takeda E., *Biochim. Biophys. Acta*, **1305**, 34–38 (1996).
- 38) Tamai I., Nakanishi T., Hayashi K., Terao T., Sai Y., Shiraga T., Miyamoto K., Takeda E., Higashida H., Tsuji, A., *J. Pharm. Pharmacol.*, **49**, 796–801 (1997).
- 39) Sai Y., Tamai I., Sumikawa H., Hayashi K., Amano O., Numata M., Iseki S., Tsuji, A., *FEBS Lett*, **392**, 25–29 (1996).
- 40) Shiraga T., Miyamoto K., Tanaka H., Yamamoto H., Taketani Y., Moriya K., Tamai I., Tsuji A., Takeda, E., *Gastroenterology*, **116**, 354–362 (1999).
- 41) Tsuji A., “Peptide-Based Drug Design: Controlling Transport and Metabolism,” eds. by Taylor M. D., Amidon G. L., American Chemical Society, Washington D.C., 1995, pp. 101–134.
- 42) Tsuji A., Tamai I., *Pharm. Res.*, **13**, 964–977 (1996).
- 43) Tamai I., Tsuji A., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **20**, 5–32 (1996).
- 44) Terasaki T., Kadowaki A., Higashida H., Nakayama K., Tamai I., Tsuji A., *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 493–496 (1993).
- 45) 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*, **368**, 563 (1994).
- 46) Saito H., Okuda M., Terada T., Sasaki S., Inui K., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **275**, 1631–1637 (1995).
- 47) Liang R., Fei Y.-J., Presad P. D., Ramamoorthy S., Han H., Yang-Feng T. L., Hediger M. A., Ganapathy V., Leibach, F. H., *J. Biol. Chem.*, **270**, 6456–6463 (1995).
- 48) Balimanen P. V., Tamai I., Guo A., Nakanishi T., Kitada H., Leibach F. H., Tsuji A., Sinko, P. J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **250**, 246–251 (1998).
- 49) Tsuji A., Tamai I., Nakanishi M., Amidon G. L., *Pharm. Res.*, **7**, 308–309 (1990).
- 50) Tamai I., Nakanishi T., Nakahara H., Sai Y., Ganapathy V., Leibach F. H., Tsuji A., *J. Pharm. Sci.*, **87**, 1542–1546 (1998).
- 51) Tsuji A., Simanjuntak M. T., Tamai I., Terasaki T., *J. Pharm. Sci.*, **79**, 1123–1124 (1990).
- 52) Simanjuntak M. T., Tamai I., Terasaki T., Tsuji A., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **13**, 301–309 (1990).
- 53) Simanjuntak M. T., Terasaki T., Tamai I., Tsuji A., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **14**, 501–508 (1991).
- 54) Tsuji A., Takanaga H., Tamai I., Terasaki T., *Pharm. Res.*, **11**, 30–37 (1994).
- 55) Takanaga H., Tamai I., Tsuji A., *J. Pharm. Pharmacol.*, **46**, 567–570 (1994).
- 56) Tamai I., Takanaga H., Ogihara T., Yoneda M., Tsuji A., *Pharm. Res.*, **12**, 1727–1732 (1995).
- 57) Takanaga H., Maeda H., Yabuuchi H., Tamai I., Higashida H., Tsuji A., *J. Pharm. Pharmacol.*, **48**, 1073–1077 (1996).
- 58) Ogihara T., Tamai I., Takanaga H., Sai Y., Tsuji A., *Pharm. Res.*, **13**, 1828–1832 (1996).
- 59) Tamai I., Takanaga H., Maeda H., Yabuuchi H., Sai Y., Suzuki Y., Tsuji A., *J. Pharm. Pharmacol.*, **49**, 108–112 (1997).
- 60) Ogihara T., Tamai I., Tsuji A., *Pharm. Res.*, **15**, 620–625 (1998).
- 61) Ogihara T., Tamai I., Tsuji A., *J. Pharm. Sci.*, **88**, 1217–1221 (1999).
- 62) Garcia C. K., Goldstein J. L., Pathak R. K., Anderson R. G. W., Brown M. S., *Cell*, **76**, 755 (1994).
- 63) Tamai I., Takanaga H., Maeda H., Sai Y., Ogihara T., Higashida H., Tsuji A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **214**, 482–489 (1995).
- 64) Takanaga H., Tamai I., Inaba S., Sai Y., Higashida H., Yamamoto H., Tsuji A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **217**, 370–377 (1995).
- 65) Tamai I., Sai Y., Ono A., Kido Y., Yabuuchi H., Takanaga H., Satoh E., Ogihara T., Amano O., Iseki S., Tsuji A., *J. Pharm. Pharmacol.*, **51**, 1113–1121 (1999).
- 66) Kido Y., Tamai I., Okamoto M., Suzuki F., Tsuji A., *Pharm. Res.*, **17**, 55–62 (2000).
- 67) Yabuuchi H., Tamai I., Sai Y., Tsuji A.,

- Pharm. Res.*, **15**, 411–416 (1998).
- 68) Tsuji A., Tamai I., *Biochem. Pharmacol.*, **38**, 1019–1022 (1989).
- 69) Ishizawa T., Tsuji A., Tamai I., Terasaki T., Hosoi K., Fukatsu, S., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **13**, 292–300 (1990).
- 70) Ishizawa T., Sadahiro S., Hosoi K., Tamai I., Terasaki T., Tsuji A., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **15**, 481–489 (1992).
- 71) Tamai I., Tsuji A., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **19**, 401–424 (1996).
- 72) Tsuji A., Hamano S., Asano T., Nakashima E., Yamana T., Mitsuhashi S., *J. Pharm. Sci.*, **73**, 1418–1422 (1984).
- 73) Hamano S., Tsuji A., Asano T., Tamai I., Nakashima E., Yamana T., Mitsuhashi S., *J. Pharm. Sci.*, **73**, 1422–1427 (1984).
- 74) Sato H., Okezaki E., Yamamoto S., Nagata O., Kato H., Tsuji A., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **11**, 386–394 (1988).
- 75) Okezaki E., Terasaki T., Nakamura M., Nagata O., Kato H., Tsuji A., *Drug Metab. Dispos.*, **16**, 865–874 (1988).
- 76) Tamai I., Safa A. R., *J. Biol. Chem.*, **265**, 16509–16513 (1990).
- 77) Tsuji A., Tamai I., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **25**, 287–298 (1997).
- 78) Tsuji A., Tamai I., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **36**, 277–290 (1999).
- 79) Tamai A., Tsuji A., *J. Pharm. Sci.*, **89**, 1371–1388 (2000).
- 80) Yamashima T., Moritani S., Tsuruo T., Yamashita J., *Life Sci.*, **51**, 1427–1437 (1992).
- 81) Tsuji A., Tamai I., Sakata A., *Biochem. Pharmacol.*, **46**, 1096–1099 (1993).
- 82) Sakata A., Tamai I., Kawazu K., Deguchi Y., Ohnishi T., Saheki A., Tsuji A., *Biochem. Pharmacol.*, **48**, 1989–1992 (1994).
- 83) Ohnishi T., Tamai I., Sakanaka K., Sakata A., Yamashima T., Yamashita J., Tsuji A., *Biochem. Pharmacol.*, **49**, 1541–1544 (1995).
- 84) Schinkel A. H., Smit J. J. M., Tellinghen O van, Beijnen J. H., Wagenaar E., Deemter L van, Mol C. A. A. M., van der Valk M. A., Robanus-Maandag E. C., te Riele H. P. J., Berns A. Borst J. M. P., *Cell*, **77**, 491–502 (1994).
- 85) Murata M., Tamai I., Kato H., Nagata O., Kato H., Tsuji A., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **290**, 51–57 (1999).
- 86) Yokogawa K., Takahashi M., Tamai I., Konishi H., Nomura M., Moritani S., Miyamoto K., Tsuji A., *Pharm. Res.*, **16**, 1213–1218 (1999).
- 87) Terao T., Hisanaga E., Sai Y., Tamai I., Tsuji A., *J. Pharm. Pharmacol.*, **48**, 1083–1089 (1996).
- 88) Tamai I., Saheki A., Saitoh R., Sai Y., Yamada I., Tsuji A., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **283**, 108–115 (1997).
- 89) Naruhashi K., Tamai I., Sai Y., Suzuki N., Tsuji A., *J. Pharm. Pharmacol.*, **53**, 73–81 (2001).
- 90) Naruhashi K., Tamai I., Inoue N., Muraoka H., Sai Y., Suzuki N., Tsuji A., *J. Pharm. Pharmacol.*, **53**, 699–709 (2001).
- 91) Naruhashi K., Tamai I., Inoue N., Muraoka H., Sai Y., Suzuki N., Tsuji A., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**, 344–349 (2002).
- 92) Kido Y., Tamai I., Uchino H., Sai Y., Suzuki F., Tsuji A., *J. Pharm. Pharmacol.*, **53**, 497–503 (2001).
- 93) Kido Y., Tamai I., Ohnari A., Sai Y., Kagami T., Nezu J., Nikaido H., Hashimoto N., Asano M., Tsuji A., *J. Neurochem.*, **79**, 959–969 (2001).
- 94) Kido Y., Tamai I., Nakanishi T., Kagami T., Hirose I., Sai Y., Tsuji A., *Drug Metabol. Pharmacokin.*, **17**, 34–41 (2002).
- 95) Kang Y. S., Terasaki T., Tsuji A., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **13**, 158–163 (1990).
- 96) Terasaki T., Kang Y. S., Ohnishi T., Tsuji A., *J. Pharm. Pharmacol.*, **43**, 172–176 (1991).
- 97) Kido Y., Tamai I., Okamoto M., Suzuki F., Tsuji A., *Pharm. Res.*, **17**, 55–62 (2000).
- 98) Terasaki T., Takakuwa S., Moritani S., Tsuji A., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **258**, 932–937 (1991).
- 99) Tsuji A., Saheki A., Tamai I., Terasaki T., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **267**, 1085–1090 (1993).
- 100) Saheki A., Terasaki T., Tamai I., Tsuji A., *Pharm. Res.*, **11**, 305–311 (1994).
- 101) Kang Y. S., Terasaki T., Ohnishi T., Tsuji A., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **13**, 353–360 (1990).
- 102) Kang Y. S., Terasaki T., Tsuji A., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **13**, 10–19 (1990).
- 103) Yamazaki M., Fukuoka H., Nagata O., Kato

- H., Ito Y., Terasaki T., Tsuji A., *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 676–679 (1994).
- 104) Yamazaki M., Terasaki T., Yoshioka K., Nagata O., Kato H., Ito Y., Tsuji A., *Pharm. Res.*, **11**, 975–978 (1994).
- 105) Yamazaki M., Terasaki T., Yoshioka K., Nagata O., Kato H., Ito Y., Tsuji A., *Pharm. Res.*, **11**, 1516–1518 (1994).
- 106) Tamai I., Kido Y., Yamashita J., Sai Y., Tsuji A., *J. Drug Targeting*, **8**, 383–393 (2000).
- 107) Terasaki T., Deguchi Y., Sato H., Hirai K., Tsuji A., *Pharm. Res.*, **8**, 815–820 (1991).
- 108) Shimura T., Tabata S., Ohnishi T., Terasaki T., Tsuji A., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **258**, 459–465 (1991).
- 109) Terasaki T., Takakuwa S., Saheki A., Moritani S., Shimura T., Tabata S., Tsuji A., *Pharm. Res.*, **9**, 529–534 (1992).
- 110) Shimura T., Tabata S., Terasaki T., Deguchi Y., Tsuji A., *J. Pharm. Pharmacol.*, **44**, 583–588 (1992).
- 111) Tamai I., Sai Y., Kobayashi H., Kamata M., Wakamiya T., Tsuji A., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **280**, 410–415 (1997).
- 112) Wakamiya T., Kamata M., Kusumoto S., Kobayashi H., Sai Y., Tamai I., Tsuji A., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **71**, 699–709 (1998).
- 113) Sai Y., Kajita M., Tamai I., Kamata M., Wakama J., Wakamiya T., Tsuji A., *Bioorg. Med. Chem.*, **6**, 841–848 (1998).
- 114) Sai Y., Kajita M., Tamai I., Wakama J., Wakamiya T., Tsuji A., *Pharm. Res.*, **15**, 1305–1309 (1998).
- 115) Sai Y., Kajita M., Tamai I., Wakama J., Wakamiya T., Tsuji A., *Am. J. Physiol.*, **275**, G514–520 (1998).
- 116) Tsuji A., Terasaki T., Tamai I., Nakashima E., Takanosu K., *J. Pharm. Pharmacol.*, **37**, 55–57 (1985).
- 117) Tsuji A., Terasaki T., Takanosu K., Tamai I., Nakashima E., *Biochem. Pharmacol.*, **35**, 151–158 (1986).
- 118) Terasaki T., Tamai I., Takanosu K., Nakashima E., Tsuji A., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **9**, 18–28 (1986).
- 119) Tamai I., Tsuji A., *J. Antibiotics*, **40**, 533–541 (1987).
- 120) Tamai I., Tsuji A., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **246**, 338–344 (1988).
- 121) Tsuji A., Terasaki T., Tamai I., Takeda K., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **253**, 315–320 (1990).
- 122) Tamai I., Maekawa T., Tsuji A., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **253**, 537–544 (1990).
- 123) Yabuuchi H., Tamai I., Morita K., Kouda K., Miyamoto K., Takeda E., Tsuji A., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **286**, 1391–1396 (1998).
- 124) Uchino H., Tamai I., Yabuuchi H., China K., Miyamoto K., Takeda E., Tsuji A., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **44**, 574–577 (2000).
- 125) Tsuji A., Tamai I., ‘‘Membrane Transporters as Drug Targets,’’ eds. by Amidon G. L., Sadee W., Pharmaceutical Biotechnology, 12: Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 1999, pp. 471–491.
- 126) Tamai I., Nezu J., Uchino H., Sai Y., Oku A., Shimane M., Tsuji A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **273**, 251–260 (2000).
- 127) Tamai I., Nozawa T., Koshida M., Nezu J., Sai Y., Tsuji A., *Pharm. Res.*, **18**, 1262–1269 (2001).
- 128) Bossuyt X., Mueller M., Meier P.J., *J. Hepatol.*, **25**, 733–738 (1996).
- 129) Abe T., Kakyō M., Tokui T., Nakagomi R., Nishio T., Nakai D., Nomura H., Unno M., Suzuki M., Naitoh T., Matsuno S., Yawo H., *J. Biol. Chem.*, **274**, 17159–17163 (1999).
- 130) Sasabe H., Terasaki T., Tsuji A., Sugiyama Y., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **282**, 162–171 (1997).
- 131) Sasabe H., Tsuji A., Sugiyama Y., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **284**, 1033–1039 (1998).
- 132) Murata M., Tamai I., Sai Y., Nagata O., Kato H., Sugiyama Y., Tsuji A., *Drug Metab. Dispos.*, **26**, 1113–1119 (1998).
- 133) Sasabe H., Kato Y., Terasaki T., Tsuji A., Sugiyama Y., *Biopharm. Drug Dispos.*, **20**, 151–158 (1999).
- 134) Murata M., Tamai T., Kato H., Nagata O., Kato H., Tsuji A., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **290**, 51–57 (1999).
- 135) Sai Y., Tamai I., Tsuji A., *KASEAA*, **38**, 432–438 (2000).
- 136) Koizumi H., Nikaido H., Hayakawa J., Nonomura A., Yoneda T., *Lab. Anim.*, **22**, 83–87 (1988).
- 137) Tamai I., Yabuuchi H., Nezu J., Sai Y., Oku A., Shimane M., Tsuji A., *FEBS Lett.*, **419**,

- 107–111 (1997).
- 138) Tamai I., Ohashi R., Nezu J., Yabuuchi H., Oku A., Shimane M., Sai Y., Tsuji A., *J. Biol. Chem.*, **273**, 20378–20382 (1998).
- 139) Nezu J., Tamai I., Oku A., Ohashi R., Yabuuchi R., Hashimoto N., Nikaido H., Sai Y., Koizumi A., Shoji Y., Takada G., Matsuishi T., Yoshino M., Kato H., Ohura T., Tsujimoto G., Hayakawa J., Shimane M., Tsuji A., *Nature Genet.*, **21**, 91–94 (1999).
- 140) Yabuuchi H., Tamai I., Nezu J., Sakamoto K., Oku A., Shimane M., Sai Y., Tsuji A., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **289**, 768–773 (1999).
- 141) Hashimoto N., Suzuki F., Tamai I., Nikaido H., Kuwajima M., Hayakawa J., Tsuji A., *Biochem. Pharmacol.*, **55**, 1729–1732 (1998).
- 142) Yokogawa K., Miya K., Tamai I., Higashi Y., Nomura M., Miyamoto K., Tsuji A., *J. Pharm. Pharmacol.*, **51**, 935–940 (1999).
- 143) Yokogawa K., Yonekawa M., Tamai I., Ohashi R., Tatsumi Y., Higashi Y., Nomura M., Hashimoto N., Nikaido H., Hayakawa J., Nezu J., Oku A., Shimane M., Miyamoto K., Tsuji A., *Hepatology*, **30**, 997–1001 (1999).
- 144) Mayatepek E., Nezu J., Tamai I., Oku A., Katsura M., Shimane M., Tsuji A., *Human Mutation*, **15**, 118 (2000).
- 145) Koizumi A., Nozaki J., Ohura T., Kayo T., Wada Y., Nezu J., Ohashi R., Tamai I., Shoji Y., Takada G., Kibira S., Matsuishi T., Tsuji A., *Am. J. Human Genetics*, **8**, 2247–2254 (1999).
- 146) Ohashi R., Tamai I., Yabuuchi H., Nezu J., Oku A., Sai Y., Shimane M., Tsuji A., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **291**, 778–784 (1999).
- 147) Tamai I., China K., Sai Y., Kobayashi D., Nezu J., Kawahara E., Tsuji A., *Biochim. Biophys. Acta*, **1512**, 273–284 (2001).
- 148) Nakanishi T., Tamai I., Sai Y., Sasaki T., Tsuji, A., *Can. Res.*, **57**, 4118–4132 (1999).