

## 消化管及び腎尿細管におけるポリカチオン型薬物の膜透過機構

小林 道也

The Transport Mechanism of Polycationic Compounds across  
Intestinal and Renal Cell Membrane

Michiya KOBAYASHI

Department of Pharmacy, Hokkaido University Hospital, School of Medicine, Hokkaido University,  
Kita-14-jo, Nishi-5-chome, Kita-ku, Sapporo 060-8648, Japan

(Received May 30, 2002)

This article reviewed the transport mechanism of polycationic compounds across rat intestinal and renal cell membranes. The inside-negative diffusion potential stimulated the initial uptake of dicationic compounds into intestinal brush-border membrane vesicles, and a good correlation was observed between lipophilicity and the amount of diffusion potential-dependent transport of the dications. On the other hand, tri- and tetracationic compounds were not affected by the diffusion potential because of their much lower lipophilicity. The membrane surface potential affected to the transport of polycationic compounds, similar to monocationic compounds. Therefore it appears that the membrane surface potential plays a common role in the transport of mono- and polycationic compounds across cell membranes. On the intestinal basolateral membrane, it was found that there was a  $\text{Na}^+$ /putrescine symporter. This recognized dicationic compounds and transported them from the blood into intestinal cells. This transporter did not recognize spermine and spermidine. Furthermore, we found a novel transport system, a  $\text{Na}^+$ /spermine antiporter, on the rat renal brush-border membrane. This transporter recognized aliphatic polycation, which has more than four amino groups, and actively secreted spermine and trientine into the renal proximal tubules *in vitro* and *in vivo*. However, this transporter did not recognize trientine-copper complex. These results are useful for the prediction of the intestinal absorption and renal excretion of polyamine derivatives.

**Key words**—polyamine; intestine; kidney; polycation; membrane transport

## 1. はじめに

分子内に解離性のアミノ基あるいはカルボキシル基などを有する薬物は、通常生体内においてはイオン型を呈する。このようなイオン型薬物の小腸上皮細胞膜透過性については、古くより薬物の脂溶性及び分子型分率と消化管吸収率との相関性、いわゆるpH分配仮説<sup>2)</sup>により説明づけられてきた。しかしながら、実際の吸収性がオクタノールなどの有機溶媒への分配係数から推測される値とは大きく異なるイオン型薬物も数多く存在し、脂溶性以外にも膜透過過程にいくつかの要因があるものと考えられる。一部のイオン型薬物は栄養素を能動的に細胞内へ輸送する輸送担体に誤認識され、良好な消化管吸収性

を示すことが知られているが、すべてのイオン型薬物の消化管吸収性を説明することはできない。一方、細胞内外には内部負の膜電位が生じており<sup>3,4)</sup>また細胞膜表面は酸性リン脂質やシアル酸等の存在により負に帯電している<sup>5-7)</sup>。当研究室ではこれまでに、これら静電的な因子がイオン型薬物の消化管吸収を制御する要因の1つと考え、アニオン並びにカチオン型薬物の小腸上皮細胞膜透過に及ぼす静電的な影響について検討してきた。その結果、アニオン型薬物は拡散電位の影響をほとんど受けなかった<sup>8)</sup>のに対し、モノカチオン型薬物は内部負の拡散電位により膜透過が促進される<sup>9-14)</sup>ことを見出した。また、負の膜表面電荷はアニオン型薬物の膜透過に対して抑制的に<sup>15,16)</sup>モノカチオン型薬物の膜透過に対して促進的に影響していること<sup>14,17)</sup>を報告した。これらの結果は、イオン型薬物の小腸上皮細胞膜透過における共通則となりうるものであった。

北海道大学医学部附属病院薬剤部 (〒060-8648 札幌市北区北14条西5丁目)

\*本総説は、平成13年度日本薬学会北海道支部奨励講演の受賞を記念して記述したものである。

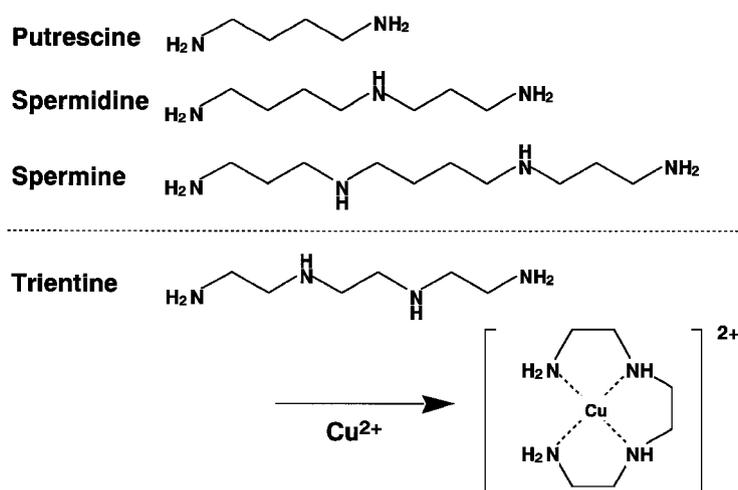


Fig. 1. Chemical Structure of Polycationic Compounds

一方、細胞の増殖・分化・成長に大きく関与している<sup>18,19)</sup> 生理活性ポリアミンであるスperlミン (SPM)、スperlミジン (SPD) 並びにプトレッシン (PUT) は、分子内に複数のカチオン性窒素を有するポリカチオン型化合物である (Fig. 1)。これらの誘導体は多様な生理活性作用を有することから、抗癌剤等<sup>20,21)</sup> のさまざまな疾患の治療薬としての開発が進められている。現在日本において臨床に供されているポリアミン類縁薬物としては、ウイルソン病治療薬であるトリエンチン並びに免疫抑制剤であるグスペリムスが挙げられる。これら生体内ポリアミン並びにポリアミン類縁薬物の消化管吸収における輸送担体の関与あるいは静電的な影響については、ほとんど明らかにされていなかった。そこで本稿では、筆者らがこれまでに検討してきたポリカチオン型薬物の小腸上皮細胞膜透過機構について、静電的な影響並びに輸送担体の関与の観点より概説する。

また、薬物の腎排泄においては、腎尿細管上皮細胞に存在する有機アニオン並びに有機カチオン輸送担体により、多くのイオン型薬物は能動的に尿細管へと分泌されることが知られている。<sup>22)</sup> しかしながら筆者らは、SPM等の生体内ポリアミンは、分子内に複数のカチオン性窒素原子を有するにも関わらず有機カチオン輸送担体には認識されず、SPMを特異的に認識する輸送担体の存在を示唆する結果を見出した。そこで本稿では、ポリカチオン型薬物の腎尿細管細胞膜透過機構についても併せて紹介す

る。

## 2. 小腸上皮細胞におけるポリカチオン型薬物の膜透過

### 2-1. 刷子縁膜透過における拡散電位・膜表面電位の影響

当研究室では、ラット小腸より単離・精製した刷子縁膜小胞 (iBBMV) やリポソームを用いて、種々のカチオン並びにアニオン型薬物の膜透過に及ぼす内部負のカリウム拡散電位の影響について検討してきた。その結果、アニオン型薬物 (セフィキシム, セフチブテン) は拡散電位の影響をほとんど受けなかった<sup>8)</sup> のに対し、モノカチオン型薬物 (トリプタミン誘導体,<sup>9,10)</sup> ジソピラミド,<sup>11)</sup> ニューキノロン系抗菌薬<sup>12-14)</sup> は内部負の拡散電位により膜透過が促進されることを見出した。一方筆者は、ポリカチオン型薬物について iBBMV を用いた検討を行ったところ、内部負の拡散電位はジカチオンである PUT の膜透過を促進させたものの、<sup>23)</sup> トリカチオンである SPD<sup>24)</sup> 並びにテトラカチオンである SPM やトリエンチン<sup>25)</sup> では全く影響が見られなかった。そこで、エチレンジアミンからデカンジアミンまで、アルキル鎖の長さが異なる 9 種のジアミン類を用い、iBBMV 内取り込みにおける内部負の拡散電位の影響を比較した。<sup>23)</sup> その結果、アルキル鎖が長くなるのに伴って拡散電位によるジアミン類の膜透過は促進された (Fig. 2a)。また、この促進効果の程度は、各ジアミン類の脂溶性 (オクタノール/水分配係数) と極めて良好な正の相関を示した (Fig. 2b)。さらに、拡散電位の影響を全く受

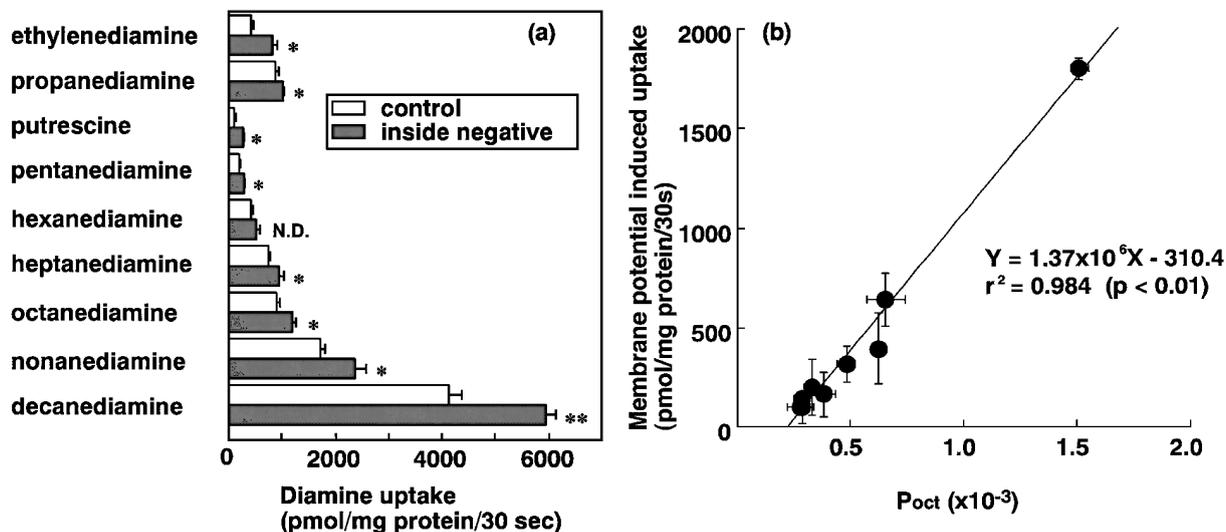


Fig. 2. Effect of Valinomycin Induced Membrane Potential on the Initial Uptake (30 sec) of 1 mM of Various Diamine Compounds by Rat Intestinal BBMV (a) and Correlation between the Membrane Potential Induced Uptake and the Partition Coefficient in n-Octanol/pH 7.5 Buffer (b)

Membrane vesicles (20  $\mu$ l) were suspended in 100 mM potassium gluconate, 100 mM D-mannitol, 20 mM Hepes/Tris buffer (pH 7.5) and with (inside negative) or without (control) 7  $\mu$ g/mg protein of valinomycin. Uptake study was performed by adding an incubation medium (100  $\mu$ l) containing 20 mM Hepes/Tris buffer (pH 7.5), 100 mM D-mannitol, 100 mM sodium gluconate and 1.2 mM diamines. Each column represents the mean with S.E. of 6-12 determinations.

\*: Significantly different from control,  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , N.D.: not different.

けなかった SPD 等のトリ・テトラカチオン型薬物の脂溶性は、ジアミン類の中で最も脂溶性の低かったペンタンジアミンの 1/30 以下であったことより、カチオン型薬物の膜透過における拡散電位の影響は、その薬物の脂溶性が大きく関与していることが明らかとなった。

次に、ポリカチオン型薬物の膜透過における膜表面電位の影響について検討した。Sugawara らはこれまでに、負に帯電した生体膜表面電位をテトラカインやイミプラミンを添加することにより相対的に正に傾け、各種イオン型薬物の膜透過に対する影響を検討したところ、モノカチオン型薬物（トリプタミン、スパルフロキサシン）の膜透過は減少し<sup>14,17</sup>逆にアニオン型薬物（セフィキシム、セフチブテン、インドール酢酸誘導体）の膜透過は促進される<sup>8,15</sup>ことを報告している。そこで、ジカチオン型薬物としてノナンジアミンを、またトリ・テトラカチオン型薬物として SPD, SPM を用い、テトラカイン共存におけるこれらポリカチオンの iBBMV 取り込み挙動を検討した。<sup>23</sup> その結果、いずれのポリカチオン型薬物の膜透過量はテトラカイン共存によって著しく減少し、またその程度はジカチオンに比べてトリ・テトラカチオンにおいて強い傾向が示された (Fig. 3)。

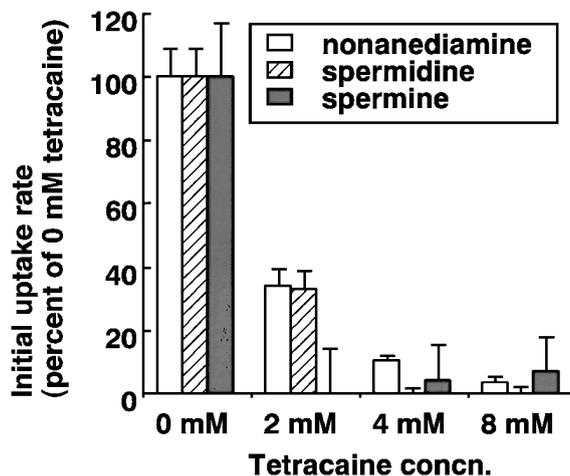


Fig. 3. Inhibitory Effect of Tetracaine on the Initial Uptake Rate (30 sec) of Nonanediamine, Spermidine and Spermine (1 mM) by Rat Intestinal BBMV

Membrane vesicles (20  $\mu$ l) were suspended in 100 mM KCl, 100 mM D-mannitol and 20 mM Hepes/Tris buffer (pH 7.5). Uptake study was performed by adding an incubation medium (100  $\mu$ l) containing 20 mM Hepes/Tris buffer (pH 7.5), 100 mM D-mannitol, 100 mM KCl, 1.2 mM polyamines and various concentration of tetracaine. Each column represents the mean with S.E. of 6-14 determinations.

以上の結果より、ポリカチオン型薬物の生体膜透過における拡散電位・膜表面電位の影響は、モノカチオン型薬物の膜透過における特徴とほぼ同じであるが、拡散電位の影響には各薬物の脂溶性が、また膜表面電位の影響には各薬物の電荷量（カチオン性

窒素の数) が大きく関与していることが明らかとなった。

**2-2. 基底膜透過における PUT 輸送担体の関与**  
 ほ乳類由来の各種細胞における生体内ポリアミンの取り込みには、一部  $\text{Na}^+$ /ポリアミン共輸送系が関与することが知られている。<sup>26)</sup> 一方、筆者らはラット小腸 **BBMV** を用いた検討より、ポリアミン類の小腸上皮細胞刷子縁膜透過には  $\text{Na}^+$  依存性の輸送担体はほとんど関与していないことを報告した。<sup>27,28)</sup> そこで次に、小腸上皮細胞基底膜小胞 (**iBLMV**) を用いて、各ポリアミン類の膜透過における輸送担体の関与について検討した。その結果、内向きの  $\text{Na}^+$  勾配存在下、PUT の初期取り込みは有意に増大した<sup>29)</sup>。また、PUT の **iBLMV** 取り込みはあらかじめ小胞内に PUT を存在させることにより有意に促進された (counter-transport 効果) ことより、 $\text{Na}^+$ /PUT 共輸送系の存在が示唆された。これに対し、SPD や SPM は内向きの  $\text{Na}^+$  勾配の影響を全く受けず、それぞれを小胞内に取り込ませた条件においても counter-transport 効果は認められなかったことより、これらの基底膜透過に輸送担体は関与していないことが示唆された。

この  $\text{Na}^+$  勾配依存性の PUT 取り込みについて速度論的な検討を行ったところ、 $K_m$  値は  $1.95 \mu\text{M}$ 、 $V_{\max}$  値は  $0.20 \text{ pmol/mg protein/sec}$  と算出され、

これまで他の細胞において報告されている輸送担体の基質親和性とほぼ一致した値を示した。また、この  $\text{Na}^+$  勾配依存性の PUT 輸送系の基質認識性を明らかにする目的で、各種ポリカチオンによる阻害効果について検討したところ、 $\text{Na}^+$  勾配依存性の PUT の膜透過は同じジアミン類 (プロパンジアミン、ペンタンジアミン、ヘキサンジアミン) によって有意に阻害された (Fig. 4)。また、ビスグアニジル型抗白血病薬であるメチルグリオキサリビスグアニルヒドラゾン (MGBG) もジアミン類と同程度の阻害を示した。一方、内向き  $\text{Na}^+$  勾配の影響を全く受けなかった SPM, SPD は  $\text{Na}^+$  勾配依存性の PUT の膜透過には何ら影響を与えなかった。以上の結果より、ラット小腸上皮細胞基底膜には内向きの  $\text{Na}^+$  勾配を駆動力とする  $\text{Na}^+$ /PUT 共輸送系が存在していることが強く示唆された。また、この輸送系はトリ及びテトラカチオン型薬物である SPD, SPM は認識せず、ジカチオン型薬物のみを認識していることが強く示唆された。

### 3. 腎尿管上皮細胞におけるポリカチオン型薬物の膜透過

腎近位尿管上皮細胞の刷子縁膜並びに基底膜には、有機カチオンあるいは有機アニオンを能動的に尿管管腔へ分泌する輸送担体が存在し、多くのカチオン・アニオン型薬物の尿管分泌に関与してい

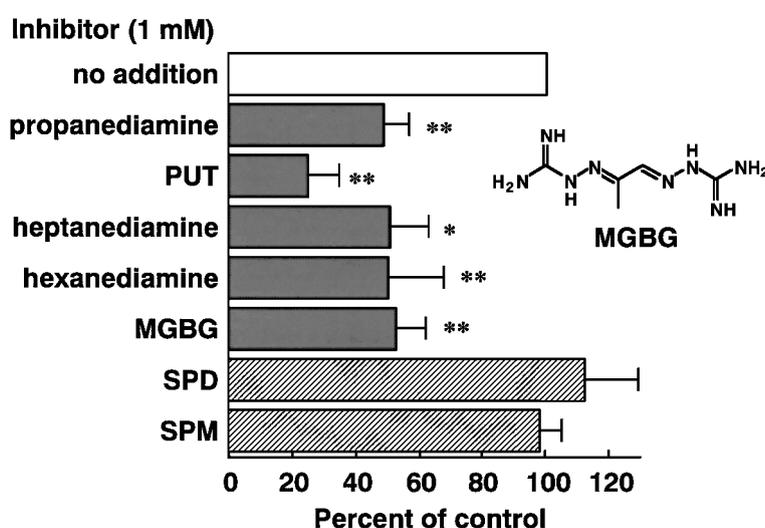


Fig. 4. Inhibitory Effect of Various Polyamine Compounds (1 mM) on the Initial Uptake of Putrescine ( $2 \mu\text{M}$ ) by Rat Intestinal BLMV in the Presence of an Inward  $\text{Na}^+$  Gradient

Membrane vesicles ( $20 \mu\text{l}$ ) were suspended in  $100 \text{ mM KCl}$ ,  $100 \text{ mM D-mannitol}$  and  $20 \text{ mM Hepes/Tris}$  buffer (pH 7.5). Uptake study was performed by adding an incubation medium ( $100 \mu\text{l}$ ) containing  $20 \text{ mM Hepes/Tris}$  buffer (pH 7.5),  $100 \text{ mM D-mannitol}$ ,  $100 \text{ mM NaCl}$ ,  $2.4 \mu\text{M}$  putrescine and  $1.2 \text{ mM}$  polyamines. Each column represents the mean with S.E. of 9 determinations.

\*: Significantly different from control,  $p < 0.01$ , \*\*:  $p < 0.001$ .

ることが知られている。<sup>22)</sup> また、分子内にカチオン性窒素あるいはカルボキシル基を有さない薬物であっても、肝臓等において代謝・抱合を受け、これら輸送担体の基質となり、効率よく尿中へ排泄されている薬物も多い。一方、ポリカチオン型薬物の腎排泄に関してはこれまでほとんど検討されていない。そこで筆者は、ウイルソン病治療薬であるトリエンチン並びに生体内ポリアミンの腎排泄機構について、ラット腎刷子縁膜小胞を用いた *in vitro* の検討、及び静注後の尿中排泄挙動より、これらポリカチオン型薬物の腎排泄機構の解明を行った。

**3-1. トリエンチンの尿中排泄における特殊輸送担体の関与** ラットにトリエンチンを静脈内投与した後の腎クリアランスはクレアチニンクリアランスの約 1.3 倍大きいことが認められた。<sup>30)</sup> また、トリエンチンと特異的にキレートを形成する銅イオンを同モル共存させ、静脈内投与した際のトリエンチンの腎クリアランスはクレアチニンクリアランスとほぼ一致した。これらの結果より、トリエンチンは能動的に尿細管分泌を受けていることが示唆された。トリエンチンは分子内に複数のカチオン性窒素を有することから、 $H^+$ /有機カチオン逆輸送担体に認識されることが考えられたため、まずはじめにラット腎尿細管刷子縁膜小胞 (rBBMV) を用いて、

有機カチオン輸送担体の関与について検討した。その結果、外向きの  $H^+$  勾配はトリエンチン並びに SPM の取り込みに何ら影響を与えなかった。<sup>30)</sup> そこで rBBMV 内にあらかじめ SPM を取り込ませた後にトリエンチンの取り込み挙動を検討したところ、有意な取り込み促進 (counter-transport 効果) が認められた。これに対し、トリエンチンと同濃度の銅イオンを共存させた場合にはこの効果は消失した。この結果より、トリエンチンは  $H^+$ /有機カチオン逆輸送担体とは異なる輸送系に認識され、能動的に尿細管分泌を受けていることが示唆された。一方、SPD 並びに PUT をあらかじめ rBBMV 内に取り込ませても SPD, PUT の取り込みには何ら変化は認められなかったことから、SPD や PUT は担体輸送されていないことが示唆された。

**3-2.  $Na^+$ /SPM 逆輸送担体の特徴** そこで次に、トリエンチン及び SPM を共通の基質として認識する輸送担体の駆動力について種々検討した。その結果、外向きの  $Na^+$  勾配を負荷した条件においてトリエンチン、SPM の取り込みは有意に促進された (Fig. 5).<sup>31)</sup> 一方、外向き  $Na^+$  勾配依存的なトリエンチンの取り込み促進は、銅イオンを共存させることにより完全に抑制された。これらの結果は *in vivo* におけるトリエンチンの腎排泄挙動と一致

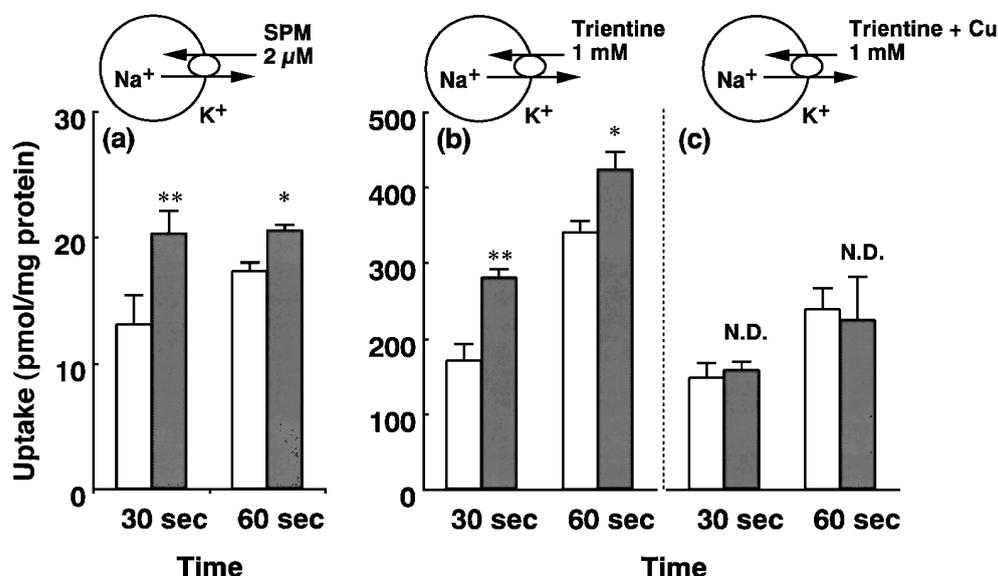


Fig. 5. Effect of an Outward  $Na^+$  Gradient on the Uptake of Spermine (a), Trientine (b) and Trientine-Cu by Rat Renal BBMV. Membrane vesicles (20  $\mu$ l) were suspended in 100 mM NaCl, 100 mM D-mannitol and 20 mM HEPES/Tris buffer (pH 7.0). Uptake study was performed by adding an incubation medium (100  $\mu$ l) containing 100 mM D-mannitol, 20 mM HEPES/Tris (pH 7.0), 2.4  $\mu$ M spermine or 1.2 mM trientine with or without  $CuSO_4$ , and 100 mM NaCl (open column) or KCl (hatched column). Each column represents the mean with S. E. of 3 preparations.

\*: Significantly different from  $Na_{out}/Na_{in}$ ,  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , N. D.: not different.

したことより、腎近位尿細管刷子縁膜上には SPM やトリエンチンを能動的に尿細管管腔へ分泌する Na<sup>+</sup>/SPM 逆輸送担体が存在していることが強く示唆された。

これまでに生体内ポリアミンを輸送する担体に関する報告は数多くあるものの、Na<sup>+</sup> とアンチポートする輸送系は全く報告されていない。そこで、この Na<sup>+</sup>/SPM 逆輸送担体の基質認識性等の特徴について検討を加えた。<sup>31)</sup> 外向き Na<sup>+</sup> 勾配存在下における SPM の初期取り込み値から、受動拡散による取り込み値を差し引くことにより担体輸送された正味の膜透過量を算出したところ、担体による SPM の膜透過量は基質濃度を増加させることにより飽和性を示した ( $K_m$  値: 1.44  $\mu$ M,  $V_{max}$ : 0.21 pmol/mg protein/sec)。トリエンチンのこの輸送系への親和性に関する速度論的解析は、定量限界のため直接的に検討することはできなかったが、SPM 輸送に対する競合的な阻害から求められた  $K_i$  値は 30.6  $\mu$ M であった。次に、この輸送担体の基質認識性を明らかにする目的で、各種カチオン型薬物を用いた阻害実験を行った。Figure 6 左に示したように、SPM の受動拡散による BBMVs への取り込みは、い

ずれのカチオン型薬物を共存させても何ら変化が認められなかった。一方、Fig. 6 右に示したように、外向き Na<sup>+</sup> 勾配依存的な SPM の取り込みは、SPM との対向輸送が認められた SPM 自身、トリエンチン及び高濃度のテトラエチレンペンタミン (TEPA) によって、ほぼ受動拡散による取り込み値まで減少した。これに対し、同じく Fig. 6 右にみられるように分子内のアミノ基が 3 つ以下の生体内ポリアミンである PUT 及び SPD、分子内に 4 つ以上のアミノ基を有するアミカシン (AMK) 及びトブラマイシン (TOB)、H<sup>+</sup>/有機カチオン逆輸送担体の代表的な基質であるテトラエチルアンモニウム (TEA)、シメチジン (CMD)、N<sup>1</sup>-メチルニコチンアミド (NMN)、小腸基底膜小胞に存在する PUT 輸送担体の基質である MGBG は、いずれも Na<sup>+</sup> 勾配依存的な SPM の取り込みに影響を与えなかった。以上の結果より、Na<sup>+</sup>/SPM 逆輸送担体は、分子内に 4 つ以上のアミノ基を有する直鎖脂肪族ポリカチオン型薬物を認識していることが明らかとなった。さらに、ラットを用いた *in vivo* の検討において、尿中の Na 濃度を増加させるアセタゾラミドやフロセミドはトリエンチンの尿中排泄を促進

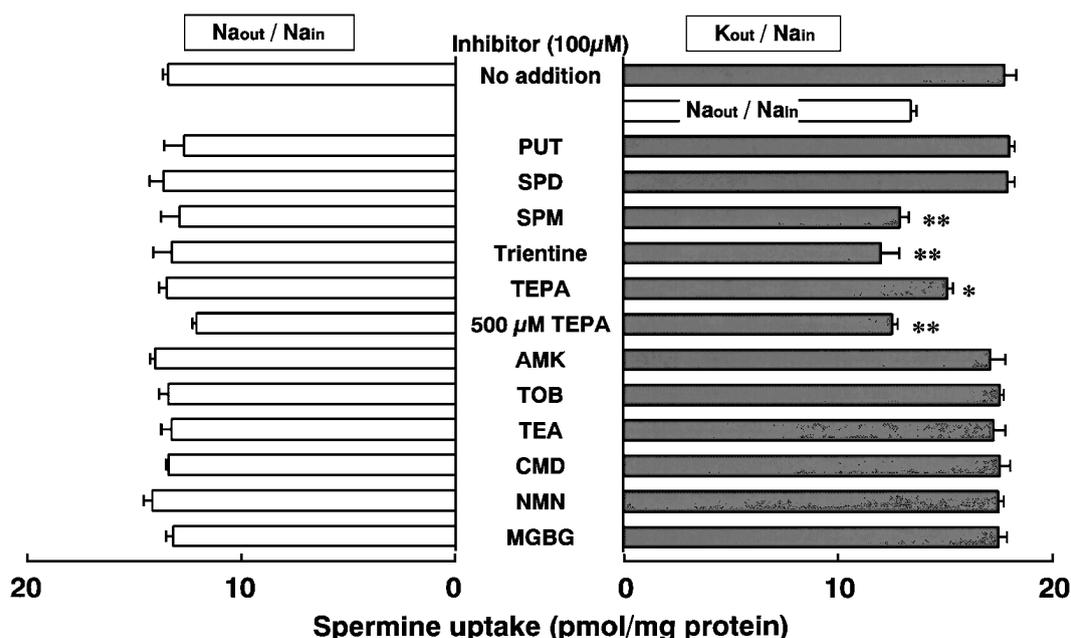


Fig. 6. Inhibitory Effect of Various Polyamines on the Initial Uptake (30 sec) of Spermine (2  $\mu$ M) by Rat Renal BBMVs

Membrane vesicles (20  $\mu$ l) were suspended in 100 mM NaCl, 100 mM D-mannitol and 20 mM HEPES/Tris buffer (pH 7.0). Uptake study was performed by adding an incubation medium (100  $\mu$ l) containing 100 mM D-mannitol, 20 mM HEPES/Tris (pH 7.0), 2.4  $\mu$ M spermine, and 100 mM NaCl (open column) or KCl (hatched column) with various cationic compounds. Each column represents the mean with S. E. of 3 preparations. Each column represents the mean with S. E. of 9 determinations.

\*: Significantly different from no addition,  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ .

し、この効果は銅イオンを併用することにより完全に消失した。<sup>32)</sup>したがって、トリエンチンの腎排泄におけるこの輸送担体の寄与は臨床的にも重要であることが示唆された。

#### 4. 結語

以上の結果より、ポリカチオン型薬物の生体膜透過に対する静電的な影響はモノカチオン型薬物と共通するものであった。すなわち、細胞内負の膜電位はカチオン型薬物の膜透過を促進させる影響を持ち、その効果は薬物の脂溶性を高めることによって増強されること、並びに負の膜表面電位はカチオン型薬物の膜透過を促進させ、薬物のカチオン性窒素が増えることよりその効果は増強されることが新たに明らかとなった。また、小腸基底膜にはジカチオンを細胞内に輸送する Na<sup>+</sup>/PUT 共輸送担体、並びに腎刷子縁膜には直鎖テトラカチオン型薬物を能動的に尿細管分泌する Na<sup>+</sup>/SPM 逆輸送担体が存在することが強く示唆された。これらの結果は、新規ポリカチオン型薬物をデザインする際の消化管吸収性の改善、あるいは腎排泄の制御において有益な知見であると思われる。

**謝辞** 本総説で紹介させていただいた研究成果は、北海道大学医学部附属病院薬剤部において行われたものであり、ご指導ご助言を賜りました宮崎勝巳教授をはじめ、ご協力を頂きました皆様に厚く御礼申し上げます。なお、本研究の一部は文部省科学研究費補助金並びに秋山記念生命科学振興財団研究助成金によって行われたものであり、併せて感謝の意を表します。

#### REFERENCES

- 1) Present address: 1757 Kanazawa, Tobetsu-cho, Ishikari-gun 061-0293, Hokkaido, Department of Pharmaceutics Faculty of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences University of Hokkaido. e-mail: platypus@hoku-iryo-u.ac.jp
- 2) Brodie B. B., Hogben C. A. M., *J. Pharm. Pharmacol.*, **9**, 345-380 (1957).
- 3) Rose R. C., Schultz S. G., *J. Gen. Physiol.*, **57**, 639-663 (1971).
- 4) White J. F., Armstrong W. McD., *Am. J. Physiol.*, **221**, 194-201 (1971).
- 5) Forstner G. G., Tanaka K., Isselbacher K. J., *Biochem. J.*, **109**, 51-59 (1968).
- 6) Forstner G. G., Wherret J. R., *Biochim. Biophys. Acta*, **306**, 446-459 (1973).
- 7) Egberts H. J., Koninkx J. F., van Dijk J. E., Mouwen J. M., *Veter. Quart.*, **6**, 186-199 (1984).
- 8) Sugawara M., Hashimoto A., Toda T., Takahashi M., Kobayashi M., Iseki K., Miyazaki K., *Biochim. Biophys. Acta*, **1190**, 85-90 (1994).
- 9) Sugawara M., Sasaki M., Iseki K., Miyazaki K., *Biochim. Biophys. Acta*, **1111**, 145-150 (1992).
- 10) Iseki K., Sugawara M., Saitoh N., Miyazaki K., *Biochim. Biophys. Acta*, **1152**, 9-14 (1993).
- 11) Takahashi Y., Itoh T., Kobayashi M., Sugawara M., Saitoh H., Iseki K., Miyazaki K., Miyazaki S., Takada M., Kawashima Y., *J. Pharm. Pharmacol.*, **45**, 419-424 (1993).
- 12) Hirano T., Iseki K., Miyazaki S., Takada M., Kobayashi M., Sugawara M., Miyazaki K., *J. Pharm. Pharmacol.*, **46**, 676-679 (1994).
- 13) Hirano T., Iseki K., Sato I., Miyazaki S., Takada M., Kobayashi M., Sugawara M., Miyazaki K., *Pharm. Res.*, **12**, 1299-1303 (1995).
- 14) Iseki K., Hirano T., Tsuji K., Miyazaki S., Takada M., Kobayashi M., Sugawara M., Miyazaki K., *J. Pharm. Pharmacol.*, **50**, 627-634 (1998).
- 15) Sugawara M., Hashimoto A., Kobayashi M., Iseki K., Miyazaki K., *Biochim. Biophys. Acta*, **1192**, 241-246 (1994).
- 16) Iseki K., Kaido K., Kobayashi M., Sugawara M., Miyazaki K., *Biol. Pharm. Bull.*, **20**, 794-799 (1997).
- 17) Sugawara M., Oikawa H., Kobayashi M., Iseki K., Miyazaki K., *Biochim. Biophys. Acta*, **1234**, 22-28 (1995).
- 18) Pegg A. E., McCann P. P., *Am. J. Physiol.*, **243**, C212-221 (1982).
- 19) Bayers T. L., Pegg A. E., *Am. J. Physiol.*, **257**, C545-553 (1989).
- 20) Porter C. W., Bernacki R. J., Miller J., Bergeron R. J., *Cancer Res.*, **53**, 581-586 (1993).
- 21) Igarashi K., Koga K., He Y., Shimogori T., Ekimoto H., Kashiwagi K., Shirahata A.,

- Cancer Res.*, **55**, 2615–2619 (1995).
- 22) Saito H., *Yakugaku Zasshi*, **117**, 522–541 (1997).
- 23) Kobayashi M., Suruga S., Takeuchi H., Sugawara M., Iseki K., Miyazaki K., *J. Pharm. Pharmacol.*, **49**, 511–515 (1997).
- 24) Kobayashi M., Iseki K., Sugawara M., Miyazaki K., *Biochim. Biophys. Acta*, **1151**, 161–167 (1993).
- 25) Tanabe R., Kobayashi M., Sugawara M., Iseki K., Miyazaki K., *J. Pharm. Pharmacol.*, **48**, 517–521 (1996).
- 26) Seiler N., Dezeure F., *Int. J. Biochem.*, **22**, 211–218 (1990).
- 27) Iseki K., Kobayashi M., Miyazaki K., *Biochim. Biophys. Acta*, **1068**, 105–110 (1991).
- 28) Kobayashi M., Iseki K., Saitoh H., Miyazaki K., *Biochim. Biophys. Acta*, **1105**, 177–183 (1992).
- 29) Kobayashi M., Tanabe R., Sugawara M., Iseki K., Miyazaki K., *Pharm. Sci.*, **1**, 337–339 (1995).
- 30) Kobayashi M., Tanabe R., Sugawara M., Iseki K., Miyazaki K., *J. Pharm. Pharmacol.*, **49**, 426–429 (1997).
- 31) Kobayashi M., Fujisaki H., Sugawara M., Iseki K., Miyazaki K., *J. Pharm. Pharmacol.*, **51**, 279–284 (1999).
- 32) Kobayashi M., Fujisaki H., Sugawara M., Iseki K., Miyazaki K., *Pharm. Res.*, **16**, 1888–1892 (1999).