



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	β ラクタム系抗生物質の消化管吸収に関する研究
Author(s)	井関, 健
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬学)
Dissertation Number	乙第3067号
Issue Date	1986-09-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/32598
Type	doctoral thesis
File Information	3067.pdf



β ラクタム系抗生物質の消化管
吸収に関する研究

井 関 健

目 次

総論の部

諸 言	-----	1
-----	-------	---

第 I 編	アミノβラクタム系抗生物質の消化管吸収と 薬物間および内因性物質の相互作用	-----	4
-------	--	-------	---

第一章	薬物の消化管吸収ならびにそれらに及ぼす他 のアミノβラクタム系抗生物質の影響	-----	4
-----	---	-------	---

第 1 節	アミノセファロスポリンの吸収に及ぼす他の アミノβラクタム系抗生物質の影響	-----	5
-------	--	-------	---

第 2 節	アミノペニシリンの吸収に及ぼす他のアミ ノβラクタム系抗生物質の影響	-----	8
-------	---------------------------------------	-------	---

第 3 節	薬物の消化管組織蓄積における相互作用	-----	10
-------	--------------------	-------	----

第 4 節	考 察	-----	12
-------	-----	-------	----

第二章	薬物の吸収におよぼすジペプチド、アミノ 酸の影響	-----	13
-----	-----------------------------	-------	----

第 1 節	薬物の吸収に及ぼすアミノ酸の効果	-----	13
-------	------------------	-------	----

第 2 節	薬物の吸収に及ぼすジペプチド影響	-----	17
-------	------------------	-------	----

第 3 節	腸管部位による吸収性の比較	-----	21
-------	---------------	-------	----

第 4 節	考 察	-----	23
-------	-----	-------	----

第Ⅱ編	小腸刷子縁膜小胞を用いた薬物の膜透過性	-----	25
第一章	小腸刷子縁膜小胞実験法の検討	-----	26
第1節	小腸刷子縁膜小胞の調製	-----	26
第2節	刷子縁膜小胞を用いたアミノ酸類の膜透過性	-----	27
第二章	薬物の小腸刷子縁膜小胞への取り込み	-----	28
第1節	薬物の刷子縁膜小胞への取り込み速度の比較	-----	30
第2節	初期取り込みにおける内向きの H^{+} 勾配の 影響	-----	34
第三章	考 察	-----	37
第Ⅲ編	小腸上皮細胞の構成成分への親和性と薬物の吸 収機構	-----	44
第一章	アミノ β ラクタム系抗生物質の小腸組織親和 性	-----	45
第1節	ラット腸管脈管同時還流法による吸収性と 組織への滞留	-----	46
第2節	薬物の吸収性と粘膜組織蓄積性	-----	49
第3節	薬物の小腸組織内分布の検討	-----	49
第4節	考 察	-----	53

第二章 小腸組織可溶性画分中の薬物結合成分の単離

と結合実験	-----	53
第1節 可溶性画分の分離精製	-----	54
1) DEAEイオン交換クロマトグラフィー	-----	54
2) セファデックス G-50 ゲルクロマトグラフィー	-----	56
3) SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動	-----	58
4) 精製の結果	-----	58
第2節 fb画分への薬物結合性	-----	61
第3節 考 察	-----	61

第三章 fb画分への薬物結合における相互作用と結合

特性	-----	63
第1節 薬物間相互の結合阻害	-----	64
第2節 薬物のfb画分への結合に対するアミノ酸、 ジペプチド類の影響	-----	67
第3節 生体高分子結合性蛍光プローブANSのfb 画分への結合	-----	67
第4節 薬物の結合様式と吸収特性	-----	69
第5節 考 察	-----	69

結 論	-----	73
-----	-------	----

謝 辞	-----	77
-----	-------	----

実験の部

第Ⅰ編	実験の部	-----	78
第Ⅱ編	実験の部	-----	84
第Ⅲ編	実験の部	-----	91
引用文献		-----	100

略 語 表

略 語	正 式 名
AB-PC	アンピシリン (ampicillin)
AM-PC	アモキシシリン (amoxicillin)
AC-PC	シクラシリン (cyclacillin)
CEX	セファレキシン (cephalixin)
CED	セフラジン (cephradine)
CDX	セファドロキシル (cefadroxil)
CEZ	セファゾリン (cefazolin)
CER	セファロリジン (cephaloridine)
L-Phe	L-フェニルアラニン (L-phenylalanine)
L-Met	L-メチオニン (L-methionine)
L-Pro	L-プロリン (L-proline)
L-Leu	L-ロイシン (L-leucine)
L-Cys	L-システイン (L-cysteine)
Gly	グリシン (glycine)
L-Phe-Gly	L-フェニルアラニルグリシン (L-phenylalanylglycine)
Gly-Gly	グリシルグリシン (glycylglycine)
L-Car	L-カルノシン (L-carnosine)
BBM	刷子縁膜 (brush border membrane)
HEPES	N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタン スルホン酸 (N-2-hydroxyethylpiperadine -N'-2-ethanesulfonic acid)
MES	2-(N-モルフォリノ)エタンスルホン酸 (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid)
Tris	トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン (tris(hydroxymethyl)aminomethane)
DEAE	ジエチルアミノエチル (diethylaminoethyl)
SDS	ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecylsulfate)
SDS-PAGE	SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-polyacrylamido gel electrophoresis)
ANS	1-アニリノ-8-ナフタレンスルホン酸 (1-anilino-8-naphthalene sulfonate)
HPLC	高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography)
DPO	2,5-ジフェニルオキサゾール (2,5-diphenyloxazole)
POPOP	1,4-ビス[2-(5-フェニルオキサゾリル)]ベン ゼン (1,4-bis[2-(5-phenyloxazolyl)]benzen)

総論の部

緒言

近年、耐性菌の出現や日和見感染の増加など起因菌の多様化にともない、種々の抗生物質が開発されてきた。とりわけ、 β -ラクタム系抗生物質の場合には、種々の化学修飾をほどこすことにより、数多くの化合物が開発され、これらはその消化管吸収の優劣にもとずき、経口剤、あるいは注射剤として、臨床的にも汎用されてきた。しかしながら、このように新たな経口用 β -ラクタム系抗生物質が開発されていく一方で、消化管から吸収され得るに必要な要因、すなわち吸収の優劣に深くかかわる機構に関しては、十分に解明されているとは言えず、アミノ酸、糖、ペプチド等の内因性物質についての研究^{1) - 10)}と比較しても報告は少ないのが現状である。

一般にこれまで多く薬物の消化管吸収はいわゆる“pH partition theory (pH分配仮説)¹¹⁾”によって説明されてきた。すなわち、溶液のpH変化に伴う薬物の解離の程度や脂溶性の尺度としての水-油間の分配係数(partition coefficient)と吸収性の間には良好な相関性が認められてきた。しかしながら、消化管内でイオン型として存在し、その脂溶性が極めて低いにもかかわらず、良好な吸収性を示す薬物の消化管吸収は本仮説では説明できない。

アミノ β -ラクタム系抗生物質は、両性イオン型構造をとり、すべてのpH領域においてイオン型として存在する薬物であるが、その消化管吸収はすぐれており、臨床的にも経口剤として汎用されている。したがって、これら薬物の吸収には単なる受動拡散や、pH分配仮説

では説明づけられない特殊な輸送機構の存在している可能性が十分考えられる。

これまでに、これらアミノβラクタム系抗生物質に関しては、*in vitro* 反転腸管法を用いて、Dixonら¹²⁾ がシクラシリンの担体輸送系の存在を明らかにしている他、Tsujiら¹³⁾、Kimuraら¹⁴⁾ によってNa⁺依存性あるいは非依存性の担体輸送系の寄与が報告されている。さらに、Quayら¹⁵⁾ はセファレキシンの吸収にGlycineの輸送担体が関与していることを指摘しているが、一方、Yamashitaら¹⁶⁾ によって、これら薬物の小腸組織透過における、アミノ酸輸送担体の寄与の程度は非常に小さいこと等が報告されている。

このように、これら薬物の優れた吸収性を説明づけるため、種々の機構が議論されているものの、薬物個々で検討されたものが多く、極めて類似した構造を持つこれら薬物に共通した機構を提示しうるには至っていないのが現状である。このため、これらの吸収機構を明らかにすることは、イオン型薬物の吸収動態を解明するうえにおいても、また、薬物吸収の難易度と構造との相関性を考察するうえにおいても、極めて重要な基礎的知見を得ることになり薬剤学的にも重要な寄与を成し得るものと考ええる。

これらのことから、本研究において著者は、アンピシリン、アモキシシリン、シクラシリン等の経口ペニシリン誘導体、およびセファレキシン、セフラジン、セファドロキシール等の経口セファロsporin類 (Chart.1) を用い、これら薬物の吸収機構を明らかにする目的で種々の検討を行った。

すなわち、先ず最初にこれら薬物の吸収挙動の全体像を薬物間および内因性物質との相互作用を通じて明らかにした。次いで、ラッ

ト小腸刷子縁膜小胞を用いて、膜透過機構についての検討を加えた。
さらに、これら薬物の吸収挙動を説明できると提案されていた小腸
粘膜組織の結合成分を、¹⁸⁾ 今回、単離精製すると同時に、本成分
との結合性について検討し、これら薬物のすぐれた吸収性を説明す
るに必要な要因の一つを明らかにすることができた。

以下、得られた結果を三編にわたり論述する。

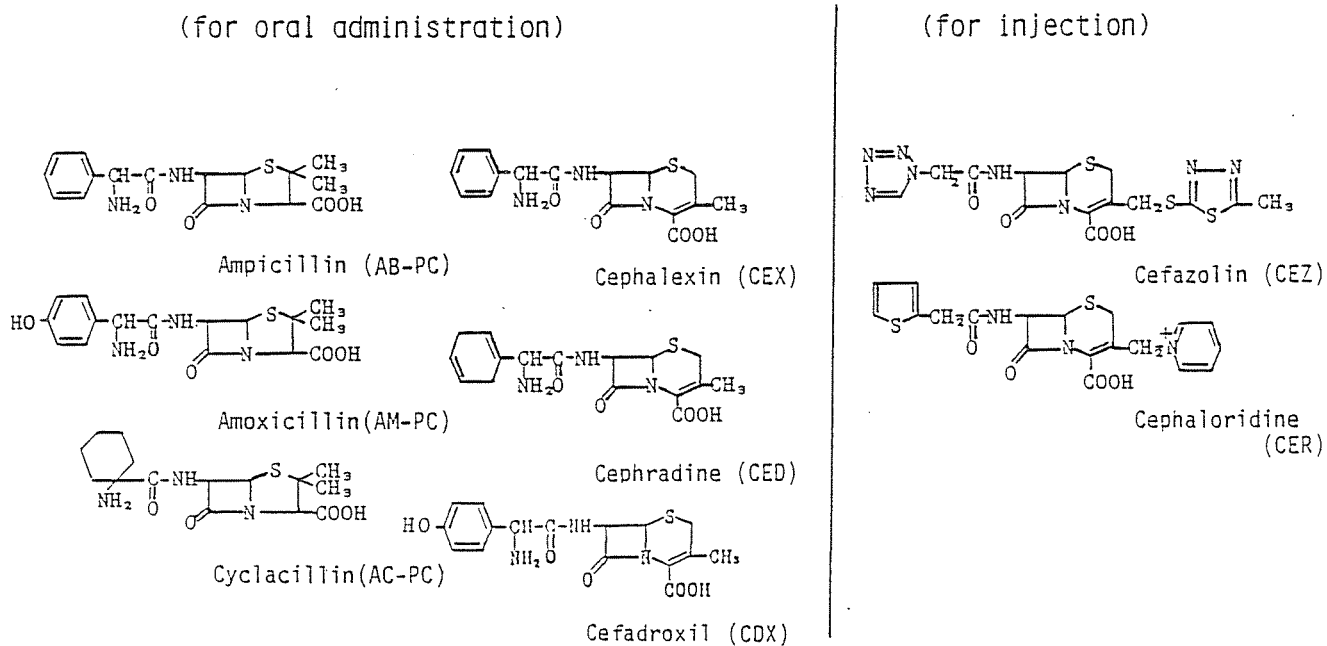


Chart. 1 Structures of β -Lactam Antibiotics tested

第 I 編 アミノβラクタム系抗生物質の消化管吸収と薬物間および内因性物質の相互作用

アミノβラクタム系抗生物質の小腸吸収については、従来、主にラットをもちいた反転腸管法、In situ 還流法、ループ法等により、その著しい易吸収性が報告され¹⁷⁾⁻²¹⁾、一部の薬物では Michaelis-Menten の速度式にしたがった吸収性を示すこと^{22), 23)} や、代謝阻害剤により影響を受けること²⁴⁾ 等が報告されてきた。また、これら薬物がその構造にアミノ基とカルボキシル基を有した zwitter-ion 型であることから、アミノ酸、ジペプチド類の小腸上皮細胞輸送担体が、その吸収に寄与していることを示唆する報告¹⁴⁾ も一部見られる。しかしながら、これらの薬物の消化管吸収機構の詳細に関しては未だ不明の点も多く、薬物に共通した吸収過程の実体について比較検討した例は見られない。

本編においては、これら薬物の小腸吸収機構における共通性を見い出すべくこれら薬物相互間での吸収抑制、およびアミノ酸、ジペプチド類による吸収抑制について検討した結果を論述する。

第一章 薬物の消化管吸収ならびに、それらに及ぼす他のアミノβラクタム系抗生物質の影響

アミノペニシリン系抗生物質であるシクラシリンとアモキシシリン

ンは、その消化管吸収において、相互に抑制することが明らかとなっている¹⁴⁾ が、これらペニシリン系薬物とセフラジン、セファレキシン等のアミノセファロスポリンとの吸収機構の類似性については不明な点が多い。シクラシリンについては、Dixon ら¹²⁾、Kimura ら²⁴⁾、Tsuji ら²⁵⁾⁻²⁷⁾ によって、飽和性の吸収挙動を示すことが報告されており、アミノ酸、ジペプチド等の担体輸送系の関与についても議論されている。²⁶⁾ しかしながら、これまでの報告では、極めて類似した構造を有する薬物間においてもその吸収性、あるいは吸収抑制効果が著しく異なるなど、共通した吸収機構を明示し得るまでには至っていない。したがって、これら薬物に共通する吸収特性を検討するためには、広くペニシリン系薬物、セファロスポリン系薬物を用いて、これらに共通する過程の有無を明らかにすることが必要である。

本章ではこのような目的から、ペニシリン系、セファロスポリン系のアミノ β ラクタム系抗生物質相互の吸収抑制効果をみることにより、その吸収挙動の共通性について検討した。

< 第 1 節 > アミノセファロスポリンの吸収に及ぼす他のアミノ β ラクタム系抗生物質の影響

実験動物はWistar系雄性ラット（体重180-230g）を使用し、小腸からの吸収実験は既に報告されているKakemiらの方法²⁸⁾ に準拠した。また、還流溶液には通常modified Ringer's 溶液（pH 6.8）²⁹⁾ を用いた。

薬物は、現在臨床で使われているアミノセファロスポリン類のなかから吸収性³⁰⁾と腸管内での安定性^{31), 32)}等を考慮してセファレキシン、セフラジンを選択した。検討した薬物の濃度は、吸収速度が薬物濃度に依存する範囲内であった³³⁾ 150 μ M を設定して行なった。共存させた薬物は、溶液の浸透圧、溶解度等を考慮して、3.0 mM として吸収実験を行なった。

その結果、アンピシリン、アモキシシリン、シクラシリンはいずれも有意にこれら薬物の吸収を抑制し、かつ、セファレキシン、セフラジンは相互にその吸収を抑制しあうことが認められた (Fig. 1, 2)。このうちシクラシリンの抑制効果は著しく、また相互に吸収抑制が認められたセフラジン、セファレキシンの抑制は経時的にその効果が増大する傾向がみられた。

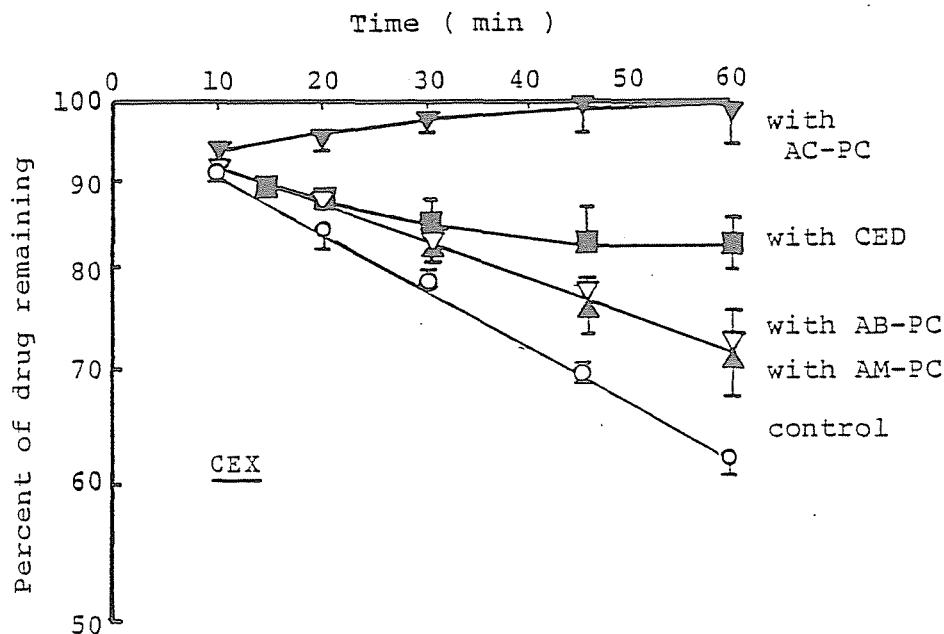


Fig.1 Effects of Amino β -Lactam Antibiotics (3.0 mM) on the Disappearance of Cephalexin (150 μ M) from Rat Intestinal Lumens at pH 6.8 by the Simultaneous Perfusion

Results are expressed as mean of 4-6 experiments with S.E.M.

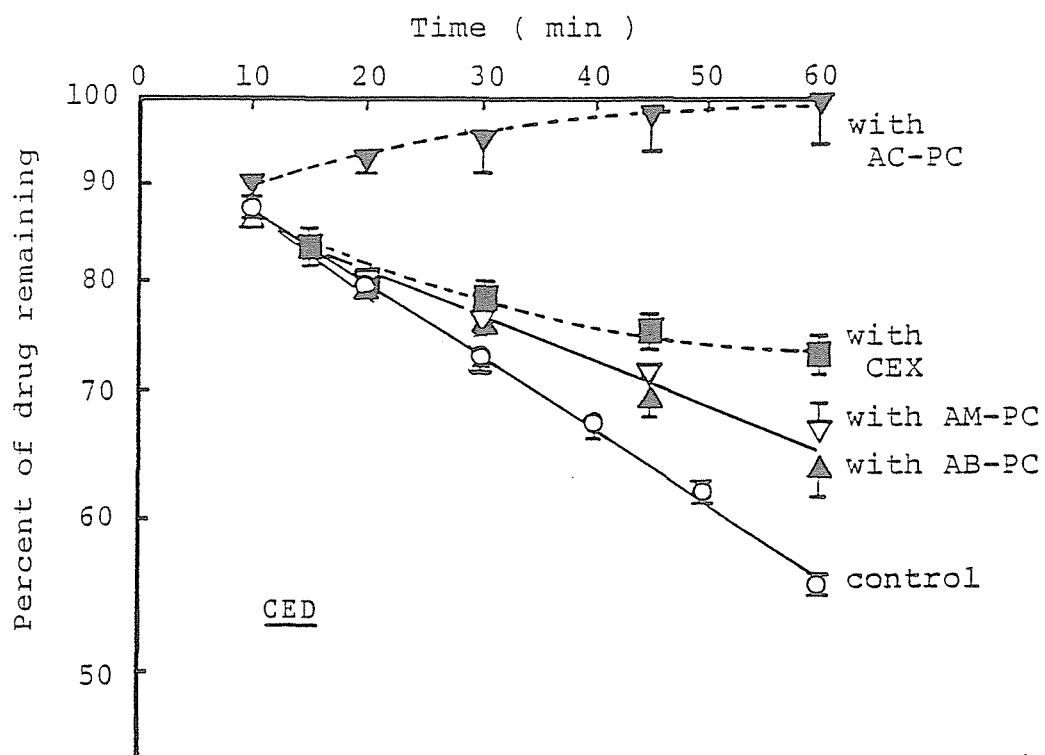


Fig.2 Effects of Amino β -Lactam Antibiotics (3.0 mM) on the Disappearance of Cephadrine (150 μ M) from Rat Intestinal Lumens at pH 6.8 by the Simultaneous Perfusion

Results are expressed as mean of 3-5 experiments with S.E.M.

< 第 2 節 > アミノペニシリン類の 吸収に及ぼす他のアミノ βラクタム系抗生物 質の影響

アミノペニシリン類の消化管吸収のうち、シクラシリンについてはジペプチド、あるいはアミノ酸の担体を介して吸収が行なわれているとする説^{14), 25)}が多い。Dixon ら¹²⁾は反転腸管法を用いて、その膜透過速度に飽和現象のあることを明らかにしており、また、Kimura ら²³⁾、Tsuji ら²⁸⁾によってその吸収はジペプチドにより吸収阻害を受けることが報告されている。しかしながら、同じアミノペニシリンであるアモキシシリン、アンピシリン等に関するこうした輸送担体の寄与については諸説^{12), 14), 17), 22)}があり、必ずしも統一された見解を得てはいない。

本研究においては、アンピシリン、アモキシシリンを用いて、これらの薬物とセファロスポリン系をも含め、その吸収の類似性を明らかにする目的で、第1節と同様の条件で吸収実験を行なった。

Fig. 3 はアモキシシリンの消化管吸収の時間的経過を示したものである。セファロスポリン類に比べ吸収量はさほど多くはないが、第1節同様の吸収抑制効果が共存させた各薬物により認められた。ここでシクラシリン共存下でアモキシシリンの管腔内残存量は100%を超える値を示したが、これは同時に吸収される水の影響によると考えられ、シクラシリンにより吸収の抑制されたアモキシシリンの濃度が結果的に高くなったものと思われる。また、アンピシリンの場合には、アミノペニシリン類の中でも吸収性は低く、経時的な変化を観察することが困難であるため、60分還流後の管腔内

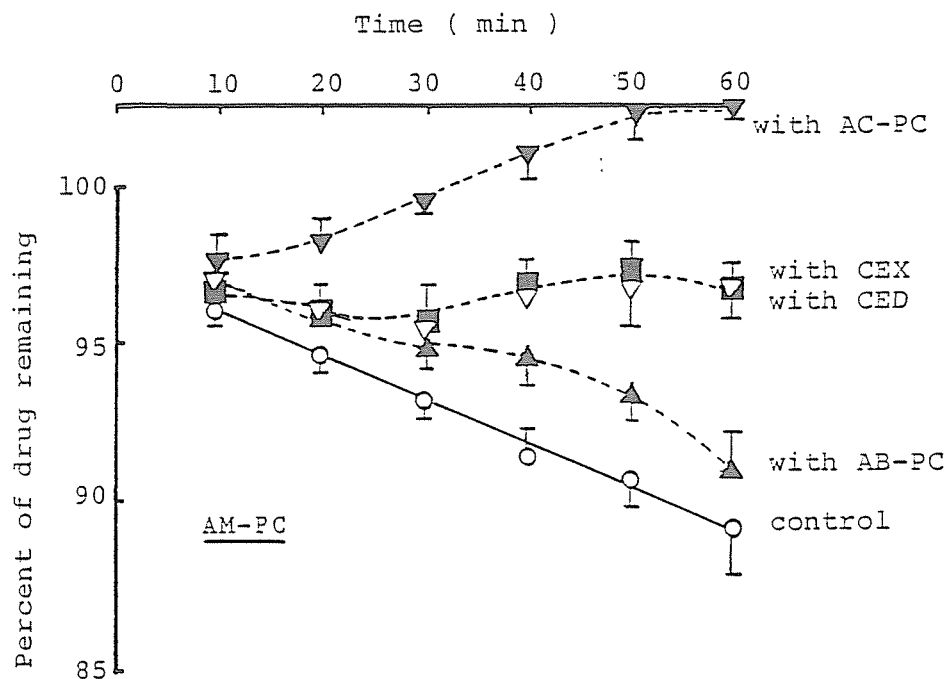


Fig.3 Effects of Amino β -Lactam Antibiotics (3.0 mM) on the Disappearance of Amoxicillin (150 μ M) from Intestinal Lumens at pH 6.8 by the Simultaneous Perfusion

Results are expressed as mean of 3-4 experiments with S.E.M.

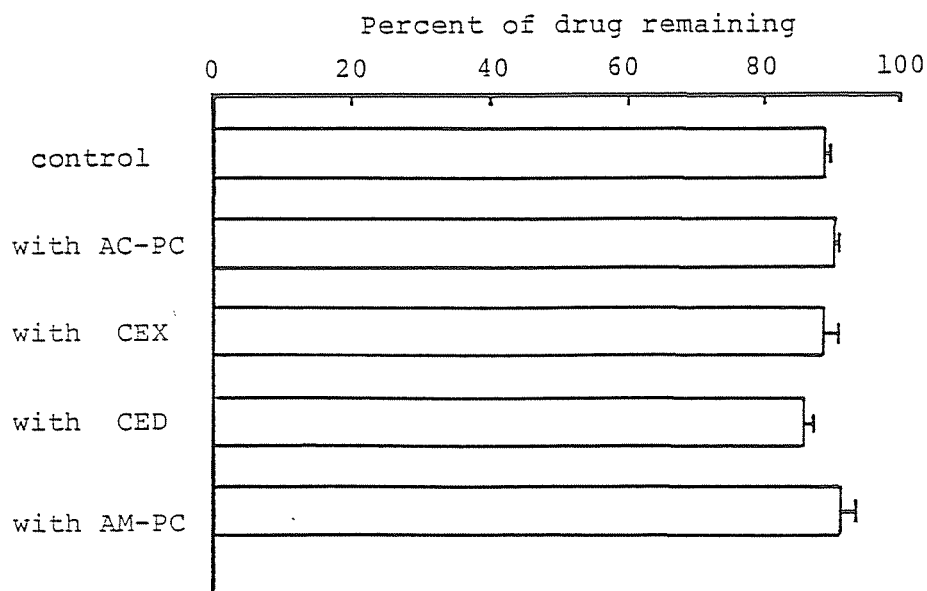


Fig.4 Effects of Amino β -Lactam Antibiotics on the Disappearance of Ampicillin from Rat Intestinal Lumens for 60 min

Concentrations of ampicillin and other β -lactam antibiotics were 150 μ M and 3.0 mM, respectively. Results are expressed as mean of 3-6 experiments with S.E.M.

残存量を測定することより吸収量を比較した (Fig. 4)。

その結果、アンピシリンの吸収はいずれの薬物共存下においても有意な抑制効果を認めるには至らなかった。

< 第 3 節 > 薬物の消化管組織蓄積 における相互作用

アミノβラクタム系抗生物質はその吸収過程において、一過性の腸管組織蓄積性をもつ¹⁷⁾にもかかわらず、吸収機構と組織取り込みの過程について論じた報告は極めて少ない。そこで次に、著者は第1節、第2節で明らかになった吸収過程での薬物間の抑制作用が、組織内蓄積過程においても観察されるかどうかについて検討を加えた。

すなわち、比較的吸収の優れていたセフラジン、セファレキシンに対し、これらを相互に共存された場合、ならびにアミノペニシリンそれぞれを共存させた場合の組織内への取り込みを測定した (Fig. 5)。結果はIn situ 還流法による吸収実験開始後30分での全小腸粘膜組織中の薬物量を蛋白質量mg当りで比較した。なお、還流液の薬物濃度および阻害薬物濃度は第1節と同様、150 μM, 3.0 mMである。

その結果、シクラシリンは両薬物の組織内蓄積を強く抑制し、またセフラジン、セファレキシンは相互に蓄積を押えることが明らかとなった。

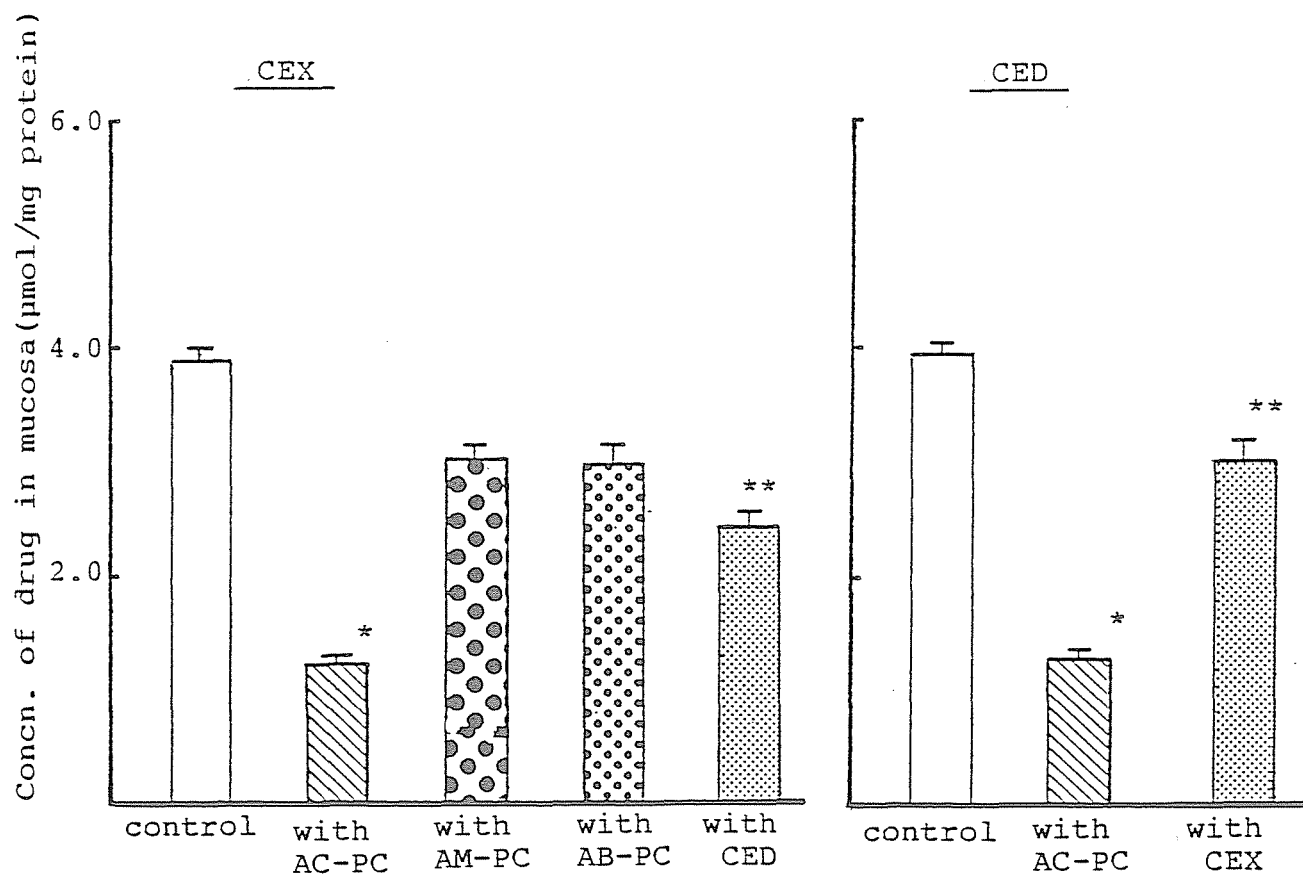


Fig.5 Effects of Amino β -Lactam Antibiotics on the Accumulation of Cephalexin and Cephadrine in Intestinal Mucosa by the Simultaneous Perfusion for 30 min

Results are expressed as mean of 3-4 experiments with S.E.M.
Significant difference from control value : * $P < 0.001$,
** $P < 0.02$

< 第 4 節 > 考 察

アミノβラクタム系抗生物質としてセフラジン、セファレキシン、アモキシシリン、アンピシリンを選び、吸収に及ぼす薬物相互の影響を検討した結果、アンピシリンを除きこれら薬物は同じアミノβラクタム系抗生物質であるシクラシリンによって著しい吸収抑制を受けることが明らかとなった。また、同時にアンピシリンに対する他薬物の影響を除いて、相互に吸収を抑制することが明らかとなった。Nakashima ら¹³⁾ は、セファレキシンの吸収におよぼすセフラジンの抑制効果が濃度依存性であることを指摘している。また、シクラシリンの消化管からの吸収は他のアミノβラクタム系抗生物質に比べて非常に早いことが知られており、ある種の担体輸送系が吸収に関与することも報告されている²⁴⁾。本研究において使用したセフラジン、セファレキシン、アモキシシリンはシクラシリン 3.0 mM 共存下で著しくその吸収が抑制されたことより、これら薬物の消化管吸収過程には担体輸送系をも含む何らかの共通した特殊な機構を有することが示唆された。また、この共通した吸収過程の存在は、組織内蓄積に対する薬物相互の抑制結果からも一層明らかとなった。なお、アンピシリンにおいては、他の薬物の吸収を抑えるものの、それ自体の吸収は有意に抑制されなかった。これは、アンピシリンの吸収自体がそれ程大きくないことに起因するものと思われる。

第二章 薬物の吸収に及ぼすジペ プチド、アミノ酸類の影響

ジペプチド、アミノ酸は、小腸にその輸送担体の存在することが知られており、消化管から効率よく吸収される。これまでに、これら生体由来の成分の小腸吸収に関する研究は数多くなされており、輸送のメカニズム^{34, 35)}や輸送担体の基質特異性³⁶⁾等が明らかにされてきている。

アミノβラクタム系抗生物質は、これら内因性 zwitter-ion と構造上類似しているため、その吸収性を比較検討することは極めて重要なことと考えられる。

これらジペプチド、アミノ酸類の薬物の吸収に及ぼす影響については、Quayら¹⁵⁾、Kimuraら¹⁴⁾、Dixonら¹²⁾、Tsujiら²⁶⁾の報告があるが、薬物個々について述べられたものが多く、実験手法の違いにより結果が異なるなど、いまだ定説を得るには至っていないのが現状である。したがって、本章では第一章で検討したと同様な手法に基づき、これら薬物の吸収に及ぼすジペプチドならびにアミノ酸の影響を検討し、考察した結果を述べる。

< 第 1 節 > 薬物の吸収に及ぼすア ミノ酸の影響

アミノ酸は主として小腸上皮細胞刷子縁膜に存在する輸送担体を介してNa依存性の能動輸送系によって取り込まれることが既に知られている。³⁷⁾ とりわけ、中性アミノ酸は近年までに最もよくその

輸送機構が明らかにされており、結合部位の特異性についても報告が見られる。^{38, 39)}

そこで本研究では、これら中性アミノ酸のいくつかを用いて薬物の吸収に及ぼす影響をIn situ 還流法を用いて検討した。これらの実験に先だち、アミノ酸どうしでの吸収阻害実験を行なった結果をFig. 6に示す。

すなわち、1.0 mM のL-フェニルアラニンに対し、その輸送担体の一部共有することが知られている⁴⁰⁾ L-メチオニンを10.0 mM の濃度で共存させ、L-フェニルアラニンの消化管内からの消失を経時的に測定した。その結果、L-フェニルアラニンは単独の場合、その吸収は第一章で記した薬物の場合に比べて早く、かつL-メチオニンの共存によって約40%もの阻害を受けることが認められた。この結果より、本実験系においても輸送担体を共有する物質間では、その吸収阻害効果を明確に示し得ることを確認した。

そこで、次に各薬物の吸収に対する数種アミノ酸の影響について検討した。薬物は吸収性の高いシクラシリン、セファレキシン、セフラジンを使用し、共存させたアミノ酸はいずれも10.0 mM 濃度を設定した。その結果、Fig. 7, 8, 9に示すごとく、いずれの薬物もこれら共存させたアミノ酸によっては何らの影響も受けず、抑制効果は認められなかった。

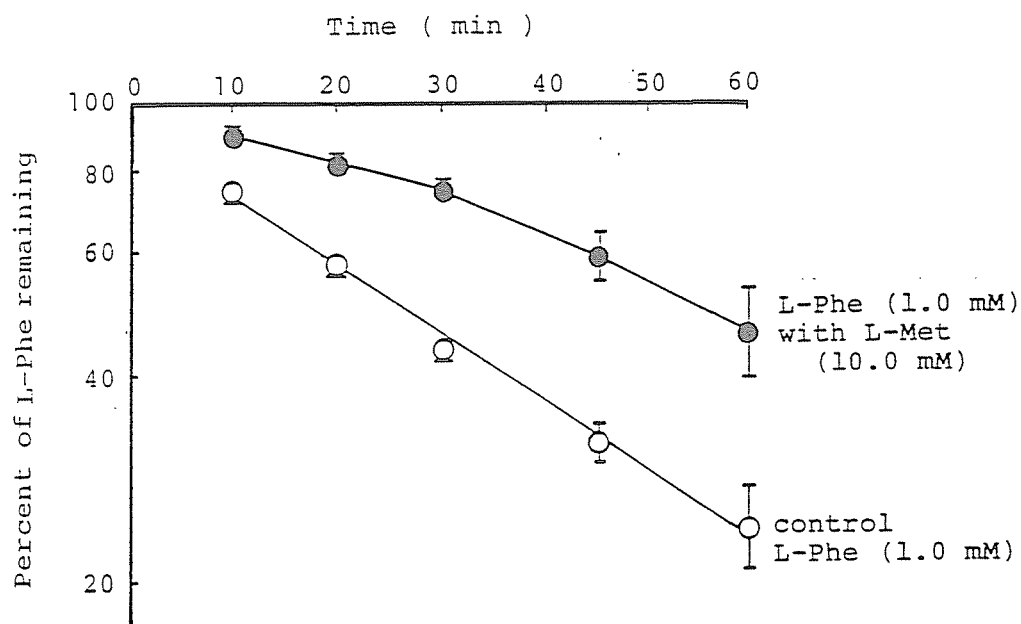


Fig.6 Effect of L-Methionine (10.0 mM) on the Disappearance of L-Phenylalanine (1.0 mM) from Rat Intestinal Lumen at pH 6.8 by the Simultaneous Perfusion

Results are expressed as mean of two experiments with range.

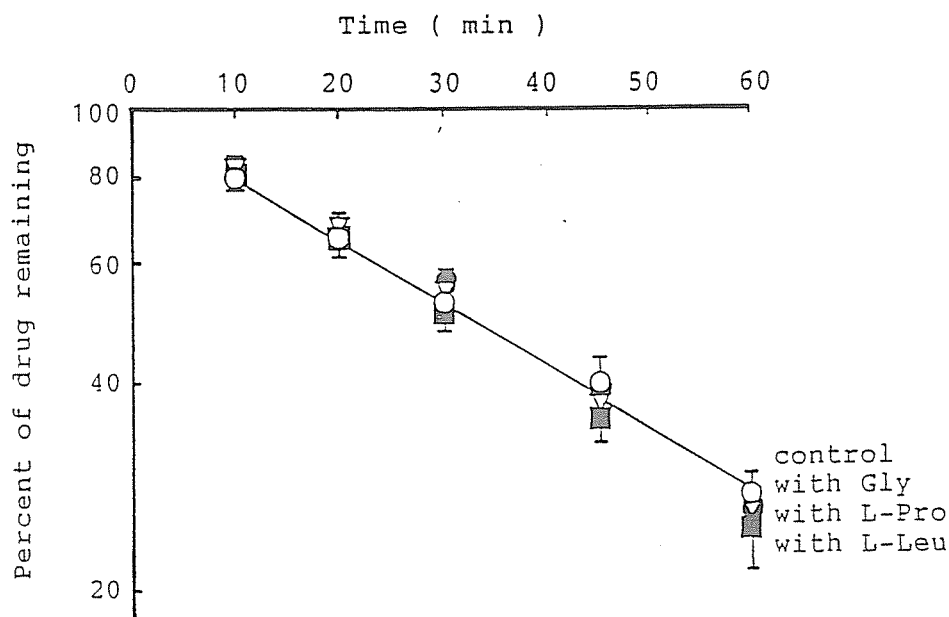


Fig.7 Intestinal Absorption of Cyclacillin (150 µM) Perfused in Combination with Amino Acids (10.0 mM, respectively)

Results are expressed as mean of 3-5 experiments with S.E.M.

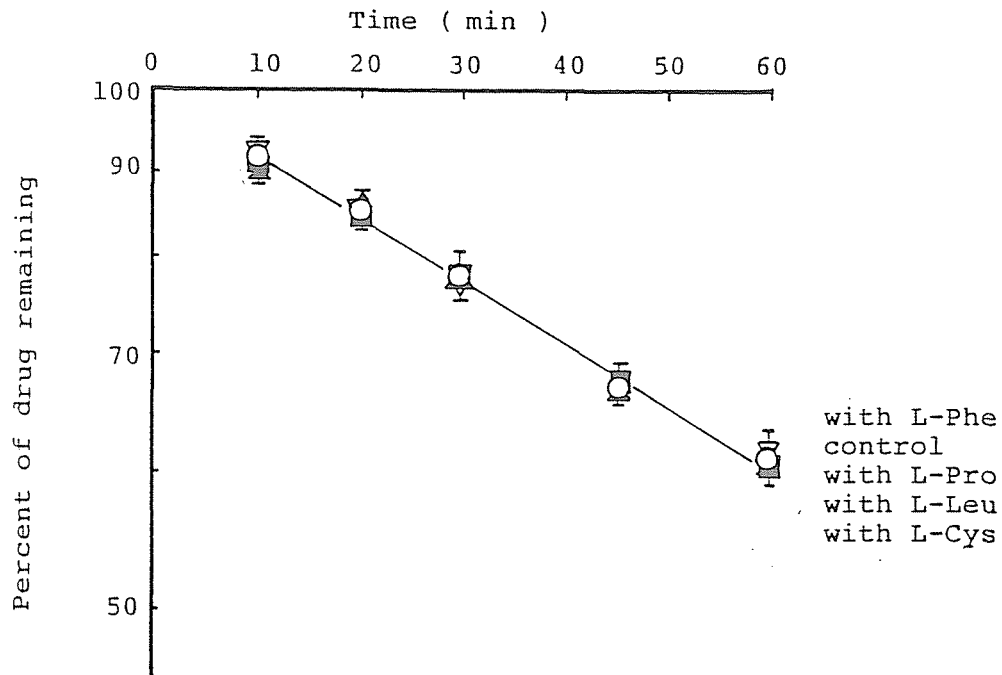


Fig.8 Intestinal Absorption of Cephalixin (150 μ M) Perfused in Combination with Amino Acids (10.0 mM, respectively)
Results are expressed as mean of 3-5 experiments with S.E.M.

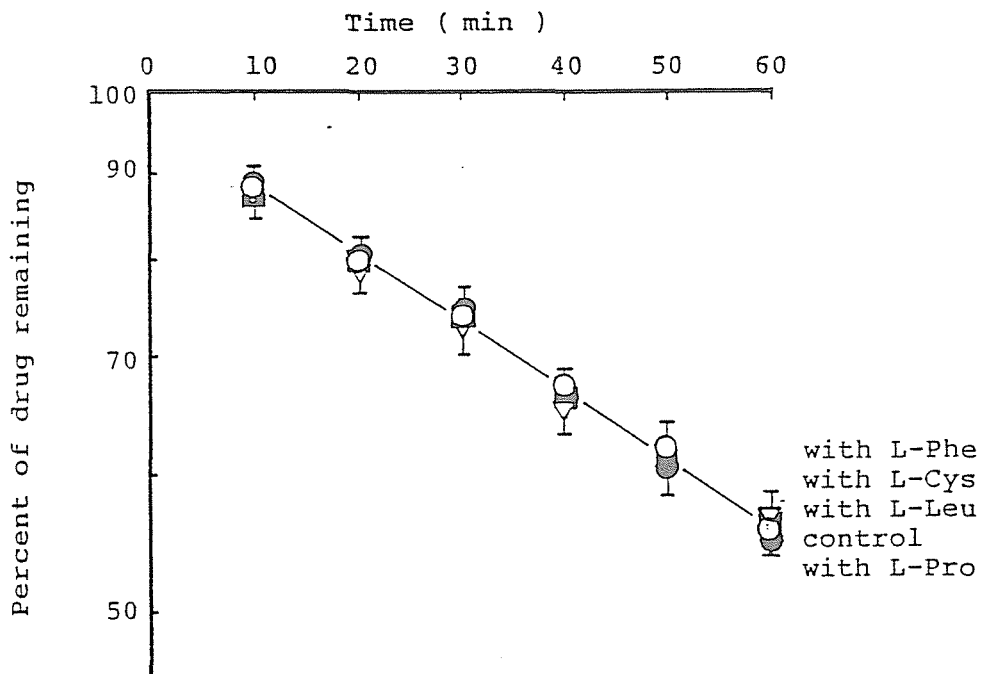


Fig.9 Intestinal Absorption of Cephradine (150 μ M) Perfused in Combination with Amino Acids (10.0 mM, respectively)
Results are expressed as mean of 4-6 experiments with S.E.M.

< 第 2 節 > 薬物の吸収に及ぼすジ ペプチドの影響

多くのジペプチドは消化管において、小腸刷子縁膜表面のジペプチダーゼの作用により速やかにその構成アミノ酸に加水分解され、アミノ酸として吸収される。^{1, 41)} しかしながら、グリシルグリシン (Gly-Gly)、L-カルノシン (L-Car) などの一部ジペプチドに対しては、消化管腔内では分解されずそのままの形で取り込まれている担体機構が存在するとの報告も見られる。^{42, 43)} したがって、本実験ではこれらジペプチドの消化管腔内での安定性、及び薬物との構造類似性を考慮して L-フェニルアラニルグリシン (L-Phe-Gly)、Gly-Gly、L-Car を選り第一章と同様の実験手法を用いて検討を加えた。薬物は、前節と同じ三種のアミノβラクタム系抗生物質 (シクラシリン、セフラジン、セファレキシン) を用いた。共存させたジペプチドの濃度は 3.0 mM から 10.0 mM の範囲に設定し、得られた結果をまとめて Fig. 10 (セファレキシン)、Fig. 11 (セフラジン)、Fig. 12 (シクラシリン) に示した。

その結果、薬物間では有意な抑制効果の得られた 3.0 mM 共存下においては、いずれのジペプチド共存の場合も何ら影響は認められなかった。次いで、6.0 mM のジペプチド類を共存させた場合には、Gly-Gly によってシクラシリンの吸収は抑制を受け (Fig. 12)、またセファレキシンは L-Car によって吸収が抑制されることを認めた (Fig. 10)。

しかしながらセファレキシンに対する L-Car の吸収抑制効果はその共存濃度を 10.0 mM に増大させても、6.0 mM 共存の時とほぼ同程度の効果しか示さなかった (Fig. 10)。また L-Car は他の薬物に

対して有為な抑制を示さなかったことから、これらジペプチドの抑制効果は先にみられた薬物間の吸収抑制ほどには強くないことが示唆された。

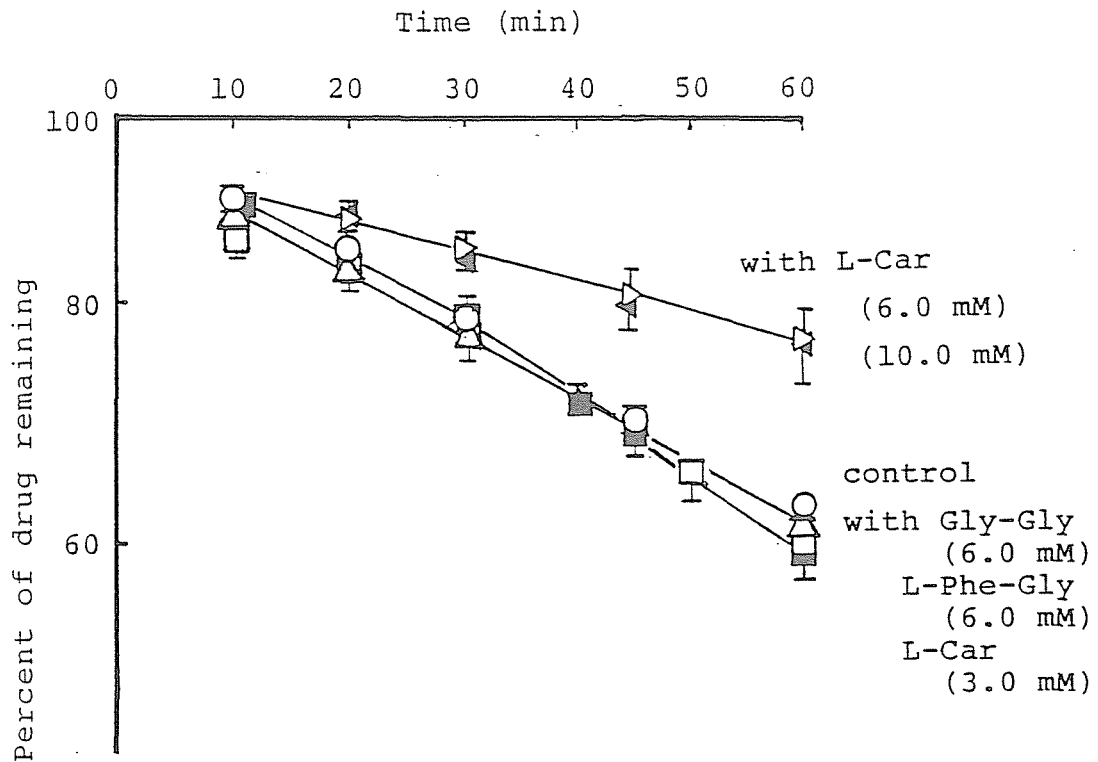


Fig.10 Intestinal Absorption of Cephalexin (150 μ M) Perfused in Combination with Dipeptides

○ : control, △ : with Gly-Gly (6.0 mM),
■, ▷, ◀ : with L-Car (3.0, 6.0, 10.0 mM),
□ : with L-Phe-Gly (6.0 mM)

Results are expressed as mean of 3-6 experiments with S.E.M.

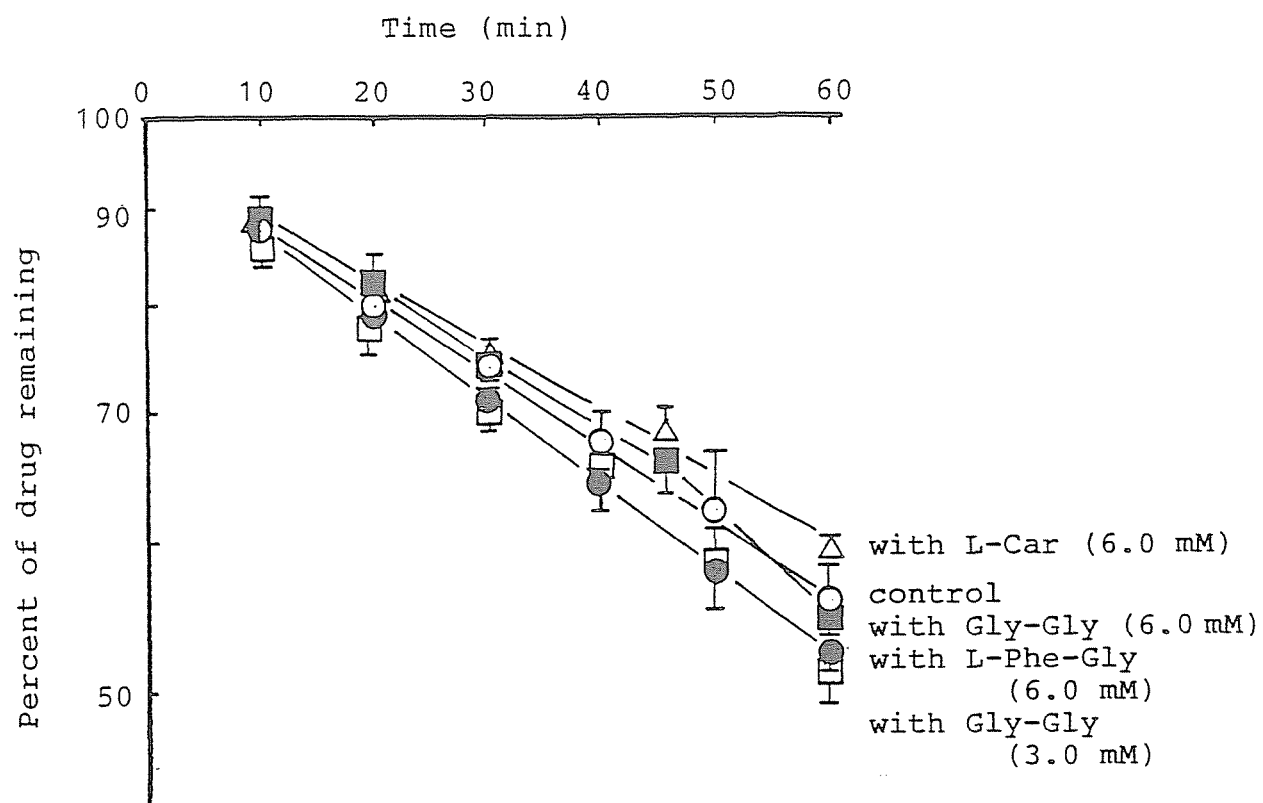


Fig.11 Intestinal Absorption of Cephadrine (150 μ M) Perfused in Combination with Dipeptides

○: control, △: with L-Car (6.0 mM),
 □, ■: with Gly-Gly (3.0, 6.0 mM),
 ●: with L-Phe-Gly (6.0 mM)

Results are expressed as mean of 3-5 experiments with S.E.M.

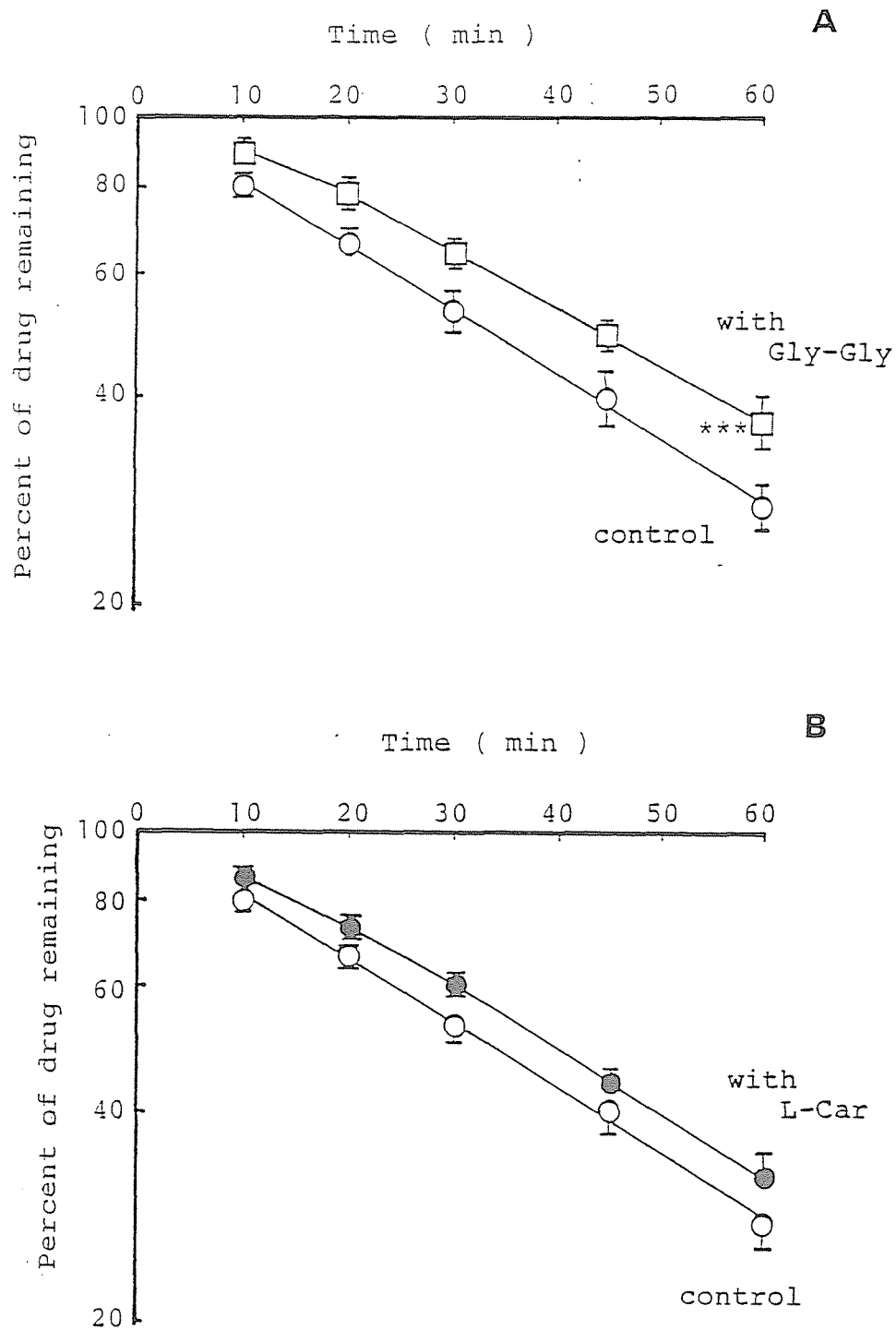


Fig.12 Intestinal Absorption of Cyclacillin (150 μ M) Perfused in Combination with Gly-Gly (A) and L-Car (B)

Concentrations of dipeptides were 6.0 mM.
Results are expressed as mean of 5-6 experiments with S.E.M.
Significant Difference from control value : *** $P < 0.01$

< 第 3 節 > 腸 管 部 位 に よ る 吸 収 性 の 比 較

これまで用いてきたIn situ 還流法では、ほぼ全腸（胃幽門直下より回腸－盲腸接合部の10cm手前まで）を用いて吸収実験を行なっているため、薬物吸収に関与する輸送担体が特定の部位に局在している場合には、その効果を明らかにし得ない可能性が考えられる。

そこで本実験では、ラット消化管の吸収部位を4つに区切り（十二指腸部、空腸上部、空腸下部、回腸部）、それぞれについてIn situ還流法により吸収抑制実験を行ない、部位による抑制効果の違いを検討した。

Fig.13はセフラジンに対するシクラシリン、及びGly-Glyの影響を検討した結果である。セフラジンの吸収に対するGly-Glyの抑制効果は、空腸上部でのみ認められたのに対し、シクラシリンは十二指腸部、空腸上部にわたって著しく吸収を抑制することが明らかとなった。

これらの結果より、薬物相互の吸収抑制は、ジペプチドの輸送系を介して行なわれるものではないことが強く示唆された。

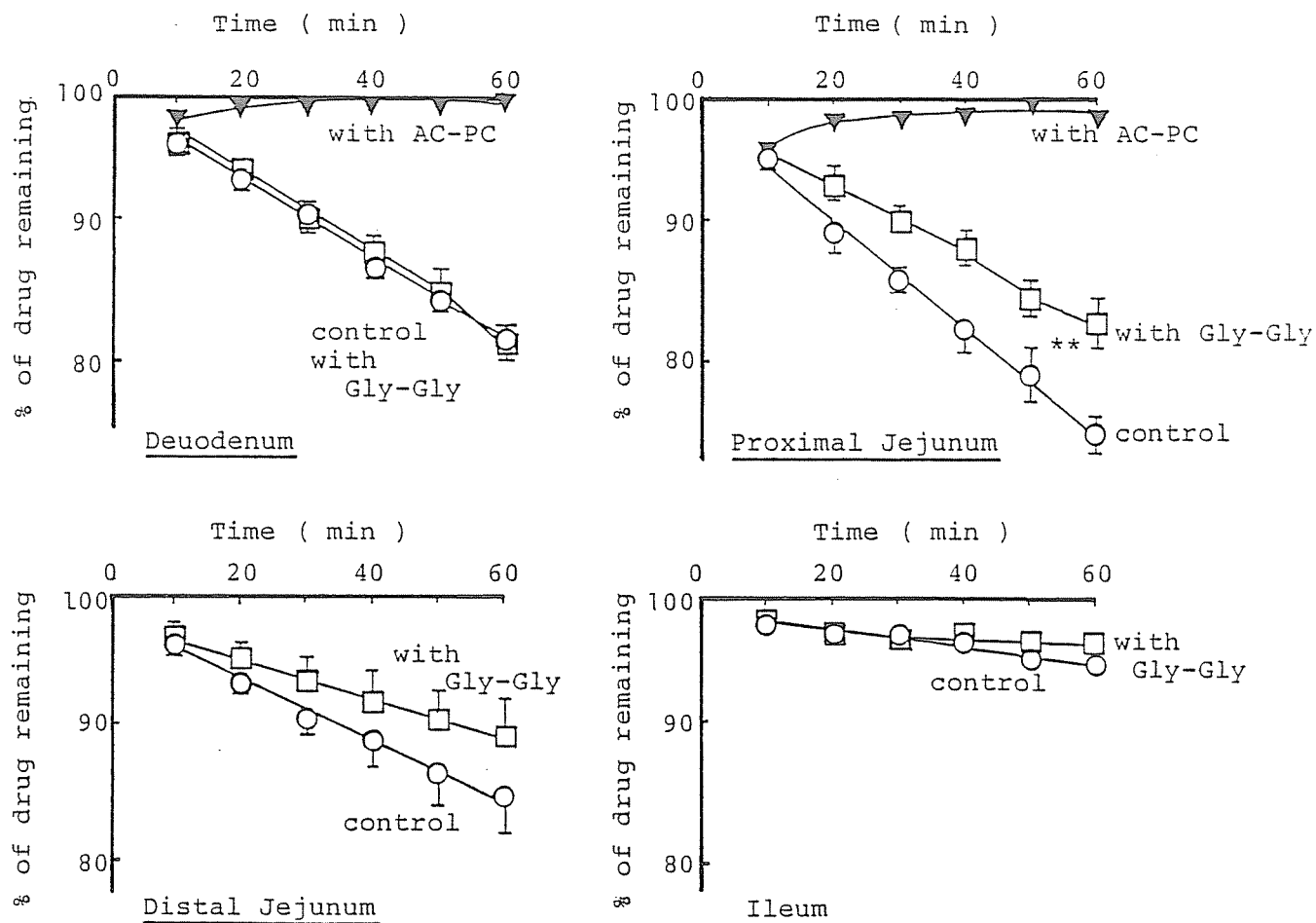


Fig.13 Comparison of Intestinal Absorption Characteristics of Cephadrine (150 μM) at Four Different Segments

○ : control, □ : with Gly-Gly (6.0 mM),
▼ : with AC-PC (3.0 mM)

Results are expressed as mean of 2-5 experiments with S.E.M. Significant difference from control value : ** $P < 0.025$. Each 10 cm of intestinal segment was used. Deuodenum segment was prepared under the pylorus. Proximal and distal jejunum segment were prepared at the beginning of 15 and 30 cm below the pylorus, respectively. And ileum segment was prepared at the beginning of 15 cm above the ileo-cecal junction.

< 第 4 節 > 考 察

薬物どうしの吸収抑制効果と異なり、ペプチド、アミノ酸の薬物の吸収に対する抑制効果は、シクラシリンに対する Gly-Gly、セファレキシンに対する L-Car で認められたに過ぎず、その効果も薬物による抑制効果に比べ大きなものではないことが明らかとなった。即ち、小腸管腔からの透過速度が担体輸送系による経路と単純拡散による経路の和で表わされると考えた場合、その透過速度 (J) は次の式に従うことになることは良く知られている¹³⁾。

$$J = \frac{J_{max} \cdot C}{K_t + C} + k \cdot C \quad (1)$$

ここで C は管腔内薬物濃度であり、K_t は担体が 50% 飽和する薬物濃度、k は一次の速度定数である。これに対して拮抗的に担体との結合を阻害する物質の濃度を I とし、その物質が担体輸送される時の 50% 飽和濃度を K_i とした時、J は次式で示される。

$$J = \frac{J_{max} \cdot C}{K_t (1 + I / K_i) + C} + k \cdot C \quad (2)$$

一方、ジペプチドの小腸吸収に関して、Himukai ら³⁵⁾ はモルモット小腸における Gly-Gly の K_t は約 1.7 mM であることを示しており、Tsuji らはラット小腸において Gly-Gly、L-Car はそれぞれ、6.0 mM、13.0 mM の K_t 値を示す^{13), 28)} ことを報告している。

したがって、シクラシリン、セファレキシン等の吸収過程においてその主たる吸収の経路がGly-Gly、L-Carの輸送担体を介して透過する場合には、シクラシリンの吸収はGly-Gly 6.0 mM 共存下で約50%の阻害が生じ、一方セファレキシンの阻害される程度は、L-Carの共存濃度に依存して増大することが予想される。しかしながら、本研究で得られた結果はこの予想に反したものであり、これらジペプチド、アミノ酸の輸送系がアミノβラクタム系抗生物質の主たる吸収経路ではないことが強く示唆された。

また、吸収部位を限定して行なった第3節での実験結果は、セフラジンの吸収に及ぼすシクラシリンとGly-Glyの影響度の違いを明示するものであり、従来論議されてきたシクラシリンの担体輸送系、すなわちジペプチド輸送系が必ずしもアミノβラクタム系抗生物質に共通した吸収経路であるとは言い難いことを示唆する知見と思われる。

なお、本編で用いたIn situ 還流法は、生体の脈管系を生かした、より生理的条件に近い系であるとはいえ、比較的Macroな実験系であるため、薬物間で認められた著しい吸収抑制が吸収過程のどの段階で生じているのかは明らかではない。しかしながら、吸収抑制の傾向は小腸粘膜組織への取り込みにおいても認められ、かつ、セファレキシン、セフラジンの相互抑制効果は、還流開始後20分以降に強く現われ、その効果も経時的に増大する傾向を示したことから(Fig. 1,2)、これら薬物間の吸収における共通する過程は、薬物が蓄積する部位に存在している可能性のあることが推察される。

第 II 編 小腸刷子縁膜小胞を用いた薬物の膜透過性

一般に、薬物の吸収、分布等の生体内移行過程は、種々の形態から成る生体膜を介しての薬物膜透過現象の集積された結果であり、特に消化管からの吸収を考える場合には、小腸上皮細胞の膜透過性を考慮することが重要である。

著者は、両性イオン型構造を有するアミノβラクタム系抗生物質の消化管吸収機構を解明する目的で、第 I 編において、薬物とその構造類似体であるアミノ酸、ジペプチドを取りあげ、その吸収抑制効果を検討し、それらの吸収性の共通性、相違点について考察を加えてきた。これに加えて、薬物吸収の律速段階と考えられている小腸刷子縁膜 (intestinal brush border membrane;BBM) に対する薬物の透過特性を検討することは、薬物吸収機構に関する基礎的知見を得るうえからも重要と考えられるが、第 I 編で言及したように、In situ 吸収実験法では様々な生体側の要因が関与するために、この手法を用いて膜透過性を考察することは技術的にも困難な問題が多い。これらのことから本編では、小腸上皮細胞の刷子縁小胞 (BBM 小胞) を調製し、この小胞内への薬物の取り込み速度、及び特性について検討し、同時にアミノ酸等の透過性と比較することより薬物の膜透過性について考察した結果を詳述する。

第一章 小腸刷子縁膜実験法の検討

担体輸送系の存在するグルコース、アミノ酸、ペプチドのBBM透過性を検討した報告には、U.Hopferら⁴⁴⁾⁻⁴⁶⁾、Kesslerら⁴⁷⁾、Ganapathyら⁴⁸⁾⁻⁵¹⁾、その他多くの研究⁵²⁾⁻⁵⁹⁾があり、いずれも小腸粘膜よりBBM小胞を調製し、それに対するグルコース、アミノ酸等の取り込みについて種々の検討を行なっている。

一方、薬物については、腎上皮細胞BBM小胞を用いたInuiらの報告⁶⁰⁾⁻⁶⁴⁾があるが、小腸に関してはKimuraら、Okanoらによってそれぞれセファドロキシル⁶⁵⁾、セフラジン⁶⁶⁾の輸送特性が検討されているに過ぎず、精製膜小胞を用いた報告は極めて少ないのが現状である。

したがって、本研究では、先ず最初に、調製したBBM小胞が、従来報告されているアミノ酸等の担体輸送機能を維持していることを確認した後、各薬物の小胞内取り込みの特性について検討した結果を述べる。

< 第 1 節 > 小腸刷子縁膜小胞の調製

BBM小胞の調製はKesslerらの方法⁴⁷⁾に準拠した。すなわち、ラット小腸より得た粘膜擦過物ホモジネートに CaCl_2 を添加することによってBBM以外の成分を凝集させ、次いで段階遠沈を行ない小腸BBM標品を得た。

Table 1に得られた膜標品を用いてBBMに局在する Alkaline-

phosphatase 及び側底形質膜にその大半が分布していると考えられている $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase 活性を測定した結果を示す。

B B M の精製度の指標である Alkaline-phosphatase 活性は、最初のホモジネートに比べ約 12 倍に比活性が増大し、一方側底形質膜の指標となる $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase は約 1/5 に減少した。このことから、本調製法により得られた膜画分の大部分が B B M であることを確認した。

Table 1 Marker Enzyme Activity of Intestinal Membrane

	Alkaline Phosphatase Activity		$\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase Activity	
	Specific Activity ¹⁾	Purification	Specific Activity ²⁾	Purification
Homogenate	0.847	1.0	0.136	1.0
Brush Borders	10.265	12.2	0.029	0.2

1) μmoles of phenol produced per min per mg of protein at 37°C and pH 10.0

2) μmoles of phosphate produced per min per mg of protein at 37°C pH 7.5

< 第 2 節 > B B M 小胞を用いたア ミノ酸類の膜透過特性

前節の方法にしたがって調製した膜標品が、担体輸送機能を維持しているかどうかを確認する目的で ^{14}C -L-アラニン、 ^{14}C -L-フェニルアラニンを用いて B B M 小胞に対する取り込みを検討した。実験は、Hopfer らの迅速濾過法⁸⁷⁾ にしたがって、メンブレンフィルター ($0.45\mu\text{m}$, HAWP02500, Millipore) に捕獲された放射活性を測定す

ることにより、各物質を定量した。

Fig.14はそれぞれ ^{14}C -L-アラニン (1.0 mM)、 ^{14}C -L-フェニルアラニン (1.0 mM) についてBBM小胞への取り込み量を経時的に測定した結果である。L-アラニン、L-フェニルアラニンはBBM小胞を用いた検討では、 Na^+ の濃度勾配 (膜外液 > 膜内液) 存在下で、一次的な取り込み蓄積、すなわち over shoot 現象を示すことが知られているが、これには Na^+ の electrochemical potential を主たる駆動力としている説が支配的である。

本実験においても、これらの物質は Na^+ 勾配依存性の over shoot 現象を呈し、調整したBBM小胞の標品に担体輸送の機能を保持していることが確認された。また、Fig.14,Aの右上に示したごとく、L-アラニンの取り込み平衡値は、Medium外液の浸透圧の逆数に比例したことにより、調整したBBMは確実に小胞化していることが確認された。

以上の結果より、得られたBBM小胞は、その担体輸送機能を十分に維持していることから、薬物の膜透過における特殊性を考察するうえにおいて、十分にたえ得る標品であることを確認した。

第二章 薬物の小腸刷子縁膜小胞への取り込み

薬物のBBM小胞への取り込みを検討した例は前述したように極めて少ない。Iuniらは、ラット腎尿細管上皮細胞のBBM小胞を調製し、有機カチオンであるテトラエチルアンモニウムの輸送が基質の輸送方向と対向する H^+ 勾配によって能動的に駆動されることを報告している。^{68, 69)} また、彼らはアミノβラクタム系抗生物質の

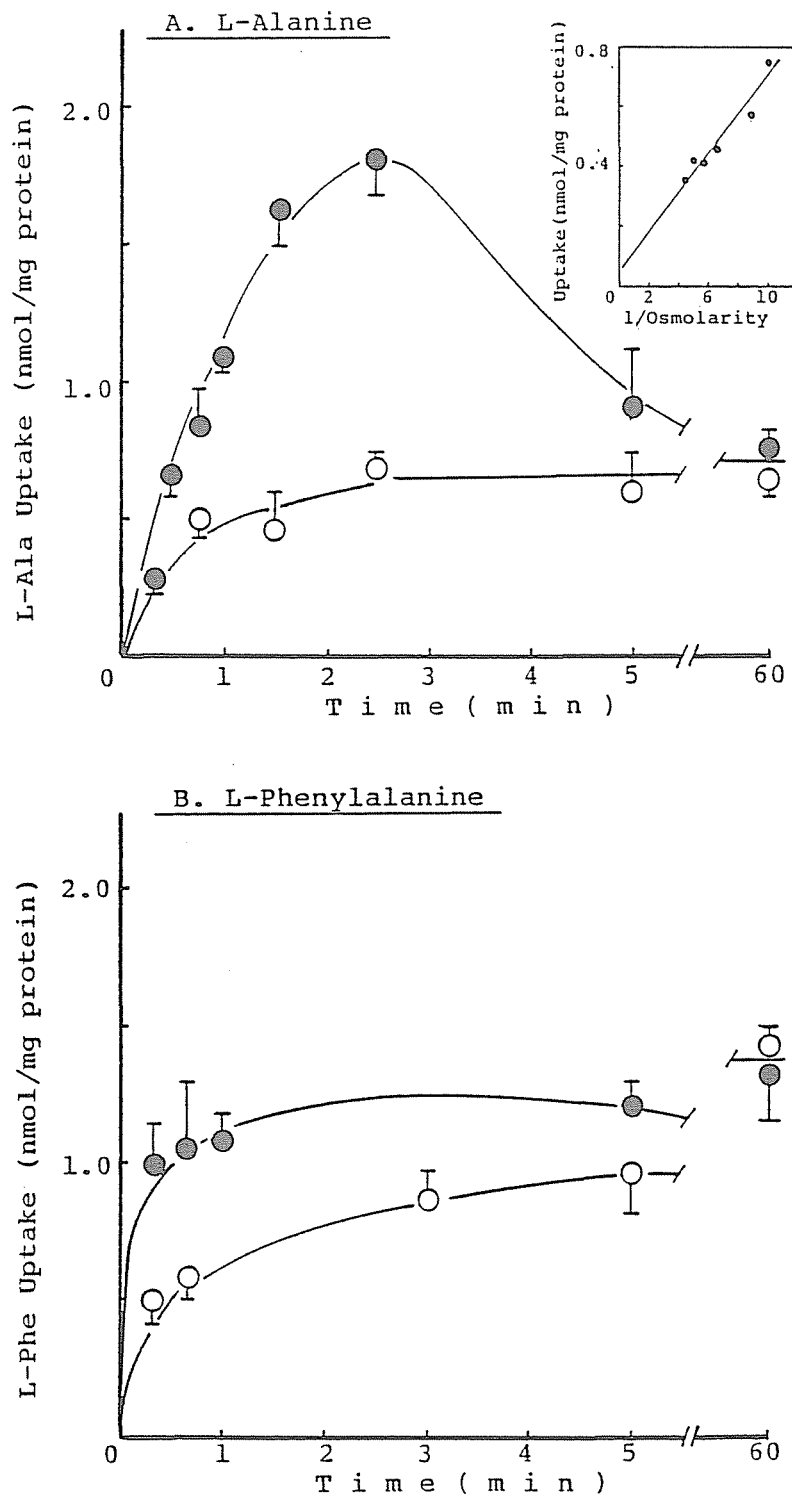


Fig.14 Uptake of L-Amino Acids by Intestinal Brush Border Membrane Vesicles

Membrane vesicles were prepared in 20 mM HEPES/Tris (pH 7.5) and 100 mM D-mannitol. Final concentrations were 100 mM NaCl(●) or 100 mM KCl(○) and 1.0 mM L-amino acids. Each point represents the mean $\pm$ S.E.M. of two or three experiments performed in duplicate determinations.

セファレキシン、セフラジンの腎尿細管輸送に関しても同様の手法で検討し、これらの輸送が有機カチオン輸送系(H^+ 対向輸送)とジペプチド輸送系(H^+ 共輸送)を介していると結論づけている。^{61, 62, 64)}

一方、小腸BBM小胞を用いての報告は少なく、kimura⁶⁵⁾らによってセファドロキシールの Na^+ 非依存性の担体輸送系が一部存在することが報告されている他、Okanoら⁶⁶⁾による、セフラジンの H^+ 共輸送系の報告があるのみである。

したがって、本研究では、前章で得られた結果に基づき、アミノβラクタム系の消化管吸収における膜系の寄与を確認する目的で、これらの薬物の小腸BBM小胞への取り込み挙動について検討した。薬物はセフラジン、セファレキシン、アンピシリンを用いたが、定量には当研究室で開発した蛍光-HPLC法にて行なった。

< 第 1 節 > 薬物の刷子縁膜小胞への取り込み速度の比較

前章に記した膜調製法に従って、ラット小腸よりBBM小胞を調製し、各薬物の取り込み実験を行なった。Fig.15にセフラジン、セファレキシン、アンピシリンの経時的な取り込みの結果を示す。

アミノ酸の場合と同様に 1.0 mM の薬物濃度で行なったが、前章第2節で示したアミノ酸に比べ取り込み平衡値に達する時間は遅く、かつ、 Na^+ 依存性のover shoot現象も認められなかった。また各々の薬物間でその取り込みの経時的变化はほとんど同様の傾向を示し、吸収性の優劣(ABPC<CEX≤CED)と膜透過性の間には何ら有意な相関性は認められなかった。

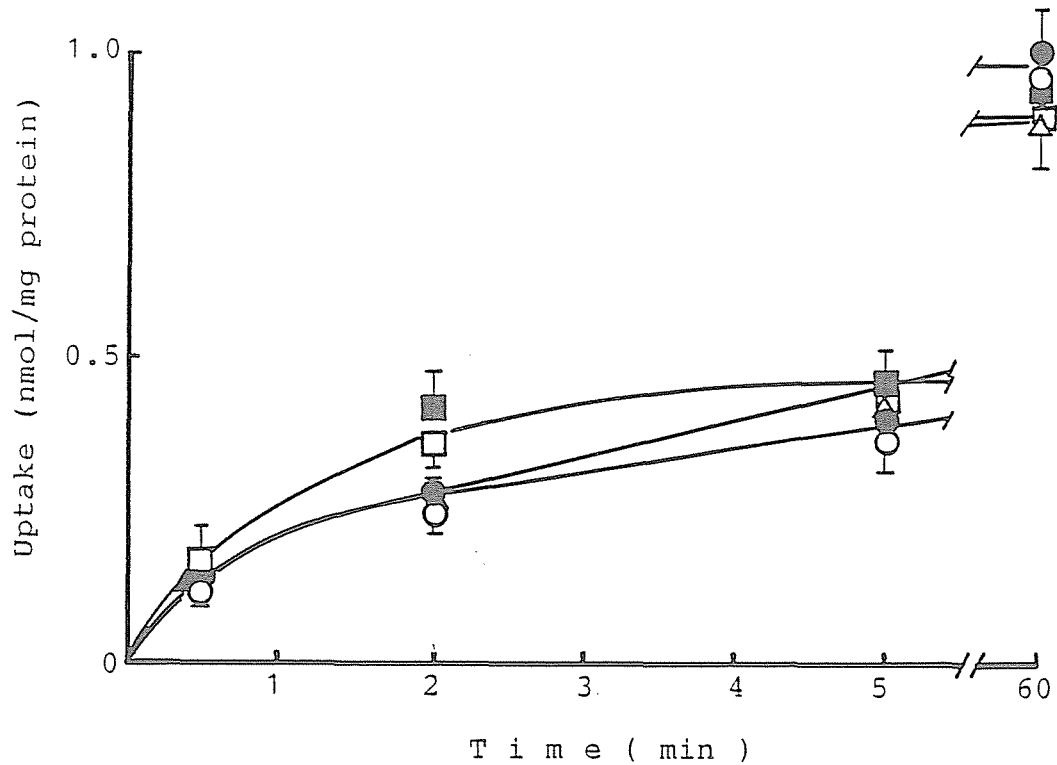


Fig.15 Uptake of Amino β -Lactam Antibiotics by Intestinal Brush border Membrane Vesicles

Membrane vesicles were prepared in 20 mM HEPES/Tris (pH 7.5) and 100 mM D-mannitol.

The vesicles (100 μ l) were incubated at 25°C with the substrate mixture (100 μ l) containing 20 mM HEPES/Tris (pH 7.5), 100 mM D-mannitol, 200 mM NaCl (■, ▲, ●) or KCl (□, △, ○), and either 2 mM CEX (■, □), CED (▲, △) or AB-PC (●, ○).

Final concentration : 100 mM NaCl or KCl, 1 mM antibiotics. Each point represents the mean $\pm$ S.D. of two or three experiments performed in triplicate or duplicate determinations, some S.D. values lie within the symbol area.

また、Fig.16にセフラジン、セファレキシンの取り込み平衡値とMedium外液の浸透圧の関係を示したが、L-アラニンの場合と同様に取り込み量は浸透圧の逆数に比例して増加しており、これら薬物の場合も小胞内への取り込み量を測定していることは明らかである。

なお、ここで得られた直線を縦軸へ外挿した値は、理論的には小胞内容積がゼロとなった時の取り込み量、すなわち、BBMへの吸着量を示す。したがって、両薬物の膜への吸着量はいずれも 0.15 nmol/mg protein と実質的な小胞内への取り込み量と比べて比較的小さいことが認められた。

これらの結果は、薬物のBBM透過過程において、アミノ酸や糖で報告されている Na^+ 依存性の担体輸送の寄与は小さいことを示唆するものであるが、このような膜小胞を用いた取り込み実験の場合、その Na^+ 依存性がそれ程大きくない場合には、見かけ上over shoot現象が明確に観察できないことも考えられる。その場合、Medium中の薬物濃度をより低濃度に行なうことによって、全輸送に対する Na^+ 存在性の寄与をより明らかにすることが可能となる。

したがって、著者は次に薬物のMedium中濃度を 0.1 mM としてBBMへの取り込みを検討した。

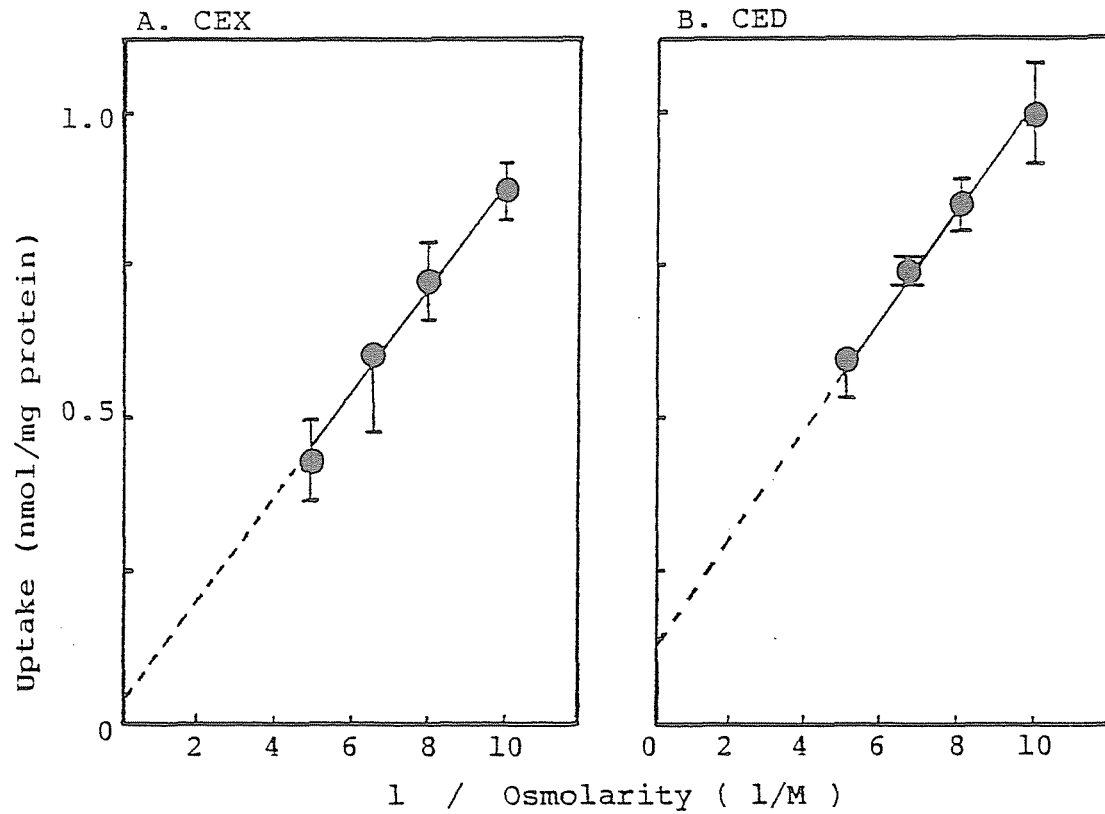


Fig.16 Effects of Medium Osmolarity on the Uptake of Cephalexin(A) and Cephradine(B) by the Brush Border Membrane Vesicles

Results are expressed as mean of 3-5 experiments with S.E.M. Membrane vesicles were prepared in 100 mM D-cellobiose instead of D-mannitol.

Incubation media contained 1 mM CEX or CED, 100 mM - 200 mM D-cellobiose and 20 mM HEPES/Tris (pH 7.5). The incubation time was 60 min.

Fig.17に 0.1 mM 濃度で行なったセファレキシン (A)、L-フェニルアラニン (B)の結果を示す。1.0mM濃度で行なった場合、アラニンに比べて明確なover shoot現象が見られなかったL-フェニルアラニンは 0.1 mM という低濃度で顕著な Na^+ 勾配の効果が確認されたのに対し、セファレキシンは Na^+ 勾配存在時と K^+ 勾配存在時とで何ら有意な差異は認められなかった。

また、各薬物のBBM小胞外液中の薬物濃度を変化させた場合の小胞内への取り込み初期速度はFig.18に示したごとく、直線的に増加し、薬物濃度 1.0 mM から15.0 mM の範囲で飽和過程を示さないことが明らかとなった。また、これら薬物の取り込み速度は吸収性の異なるアンピシリン、セファレキシン、セフラジンでほぼ同程度であり、これら薬物の吸収量の差異を反映するものではなかった。

< 第 2 節 > 初期取り込みにおける 内向きの H^+ 勾配の影響

Nakashima ら²⁶⁾ はテフロンチューブを挿入した反転腸管法を用いて、セファレキシン、セファドロキシールの初期取り込みが30.0 mMという高濃度のGly-Glyによって阻害されることを報告している。また、Ganapathy ら^{70, 71)} はL-Car、Gly-L-Pro、Gly-Sar等のジペプチドの輸送系が、細胞内への H^+ 勾配によって促進されることを見い出しており、 $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ 対向輸送系により生じた H^+ 勾配がその直接的な駆動力となっていることを報告している。

前節で示した結果はこれら薬物の膜透過に対する担体輸送の寄与は極めて小さいことを示唆するものであったが、第I編において、

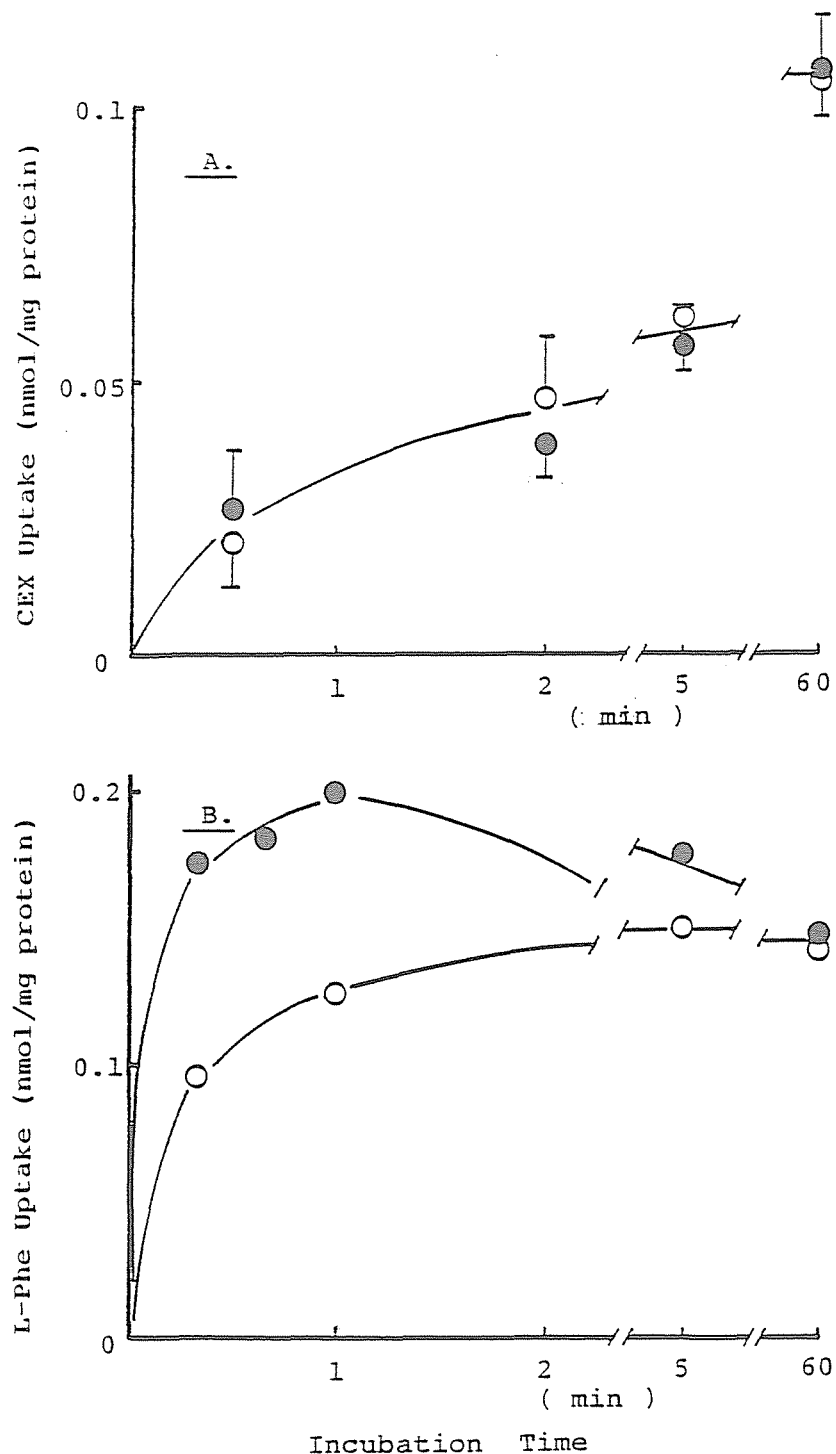


Fig.17 Uptake of Cephalexin(A) and L-Phenylalanine(B) by Brush Border Membrane Vesicles at Low Concentration of Substrate (0.1 mM).

Each point represents the mean $\pm$ S.E.M. of a single or two experiments done in duplicate.
 Concentration of CEX and L-Phe was 0.1 mM, respectively.
 Final incubation media prepared in 20 mM HEPES/Tris (pH 7.5) containing 100 mM NaCl (●) or KCl (○).

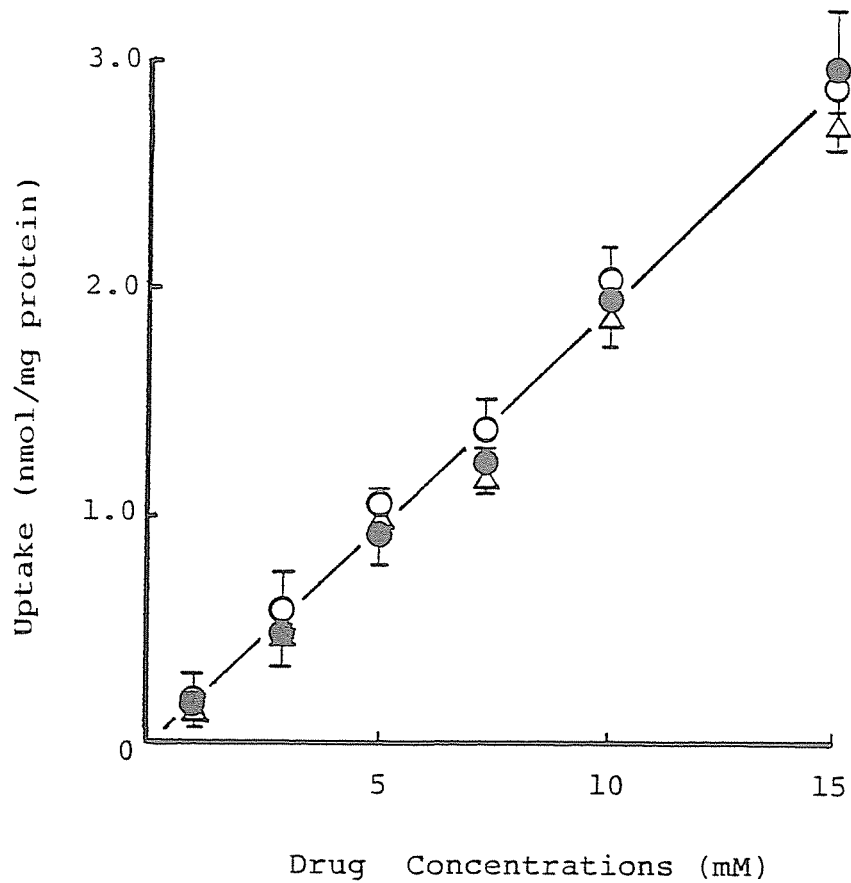


Fig.18 Effect of Drug Concentrations on the Initial Uptake by Intestinal Brush Border Membrane Vesicles

The uptake for 30 sec at concentration between 1 and 20 mM was determined.

Solid line indicates the uptake of CEX($\bigcirc$), CED($\bullet$), and AB-PC($\triangle$).

Results are expressed as mean of four experiments with S.E.M.

セファレキシンの吸収は一部 L-Car によって抑制されており、これら薬物の膜透過性におけるジペプチド輸送系の関与については、さらに検討する必要があるものと考えられる。

したがって、本節ではこれらジペプチド輸送系の関与について、 H^+ 勾配依存性の観点より検討した。Table 2 にセファレキシンの1分間での初期取り込みをMedium中のpHを変化させて検討した結果を示す。薬物濃度 1.0mM、2.5mMのいずれの場合も内向きのプロトン勾配存在下で約2倍程度の初期取り込み促進が認められ、セファレキシンはその膜透過において、一部ジペプチドの H^+ 勾配依存性担体輸送系を介している可能性も示された。

一方、セファレキシンの膜透過に対して電荷の移動を伴っているか否かを検討する目的で、バリノマイシン添加によって形成される K^+ の拡散電位の効果について検討したところ (Fig.19)、セファレキシンの取り込みには有意な変化は認められず、膜電位によって影響されないことが示唆された。一方、同時に行なったD-グルコースの場合には顕著な取り込み増加が観察され、 Na^+ 依存性の electro-genic な D-グルコース輸送系⁴⁴⁾ が機能していることが確認されたことから、セファレキシンの膜透過は、電荷の移動を伴わない electro-neutral なものであることが示唆され、 H^+ 勾配によるこの薬物の取り込み促進の結果 (Table 2) とは対応しないものであった。

第三章 考 察

刷子縁膜の調製法はいくつかの手法^{72, 73)} が知られていたが、Schmitz ら⁷⁴⁾ により報告された二価カチオン沈澱法は Kessler ら

Table 2 Effects of an Inward Proton Gradient on the Rates of Cephalexin Uptake into the Intestinal Brush Border Membrane Vesicles

Drug Concn. (mM)	External pH	Internal pH	Uptake (nmol/mg protein min)
1.0	7.5	7.5	0.472 $\pm$ 0.29
	5.5	7.5	1.098 $\pm$ 0.43
2.5	7.5	7.5	0.993 $\pm$ 0.25
	5.5	7.5	2.134 $\pm$ 1.27

Membrane vesicles were prepared in 100 mM D-mannitol, 100 mM KCl and 10 mM HEPES/Tris (pH 7.5).

The transport assay was initiated by adding 100 μ l of membrane vesicle suspension into 200 μ l of transport buffer containing CEX, 100 mM D-mannitol, 100 mM KCl and 10 mM HEPES/Tris, pH 7.5 (in the case of external pH 7.5) or 10 mM MES (in the case of external pH 5.5).

Each datum represent the mean $\pm$ S.E.M. for two experiments done in duplicate.

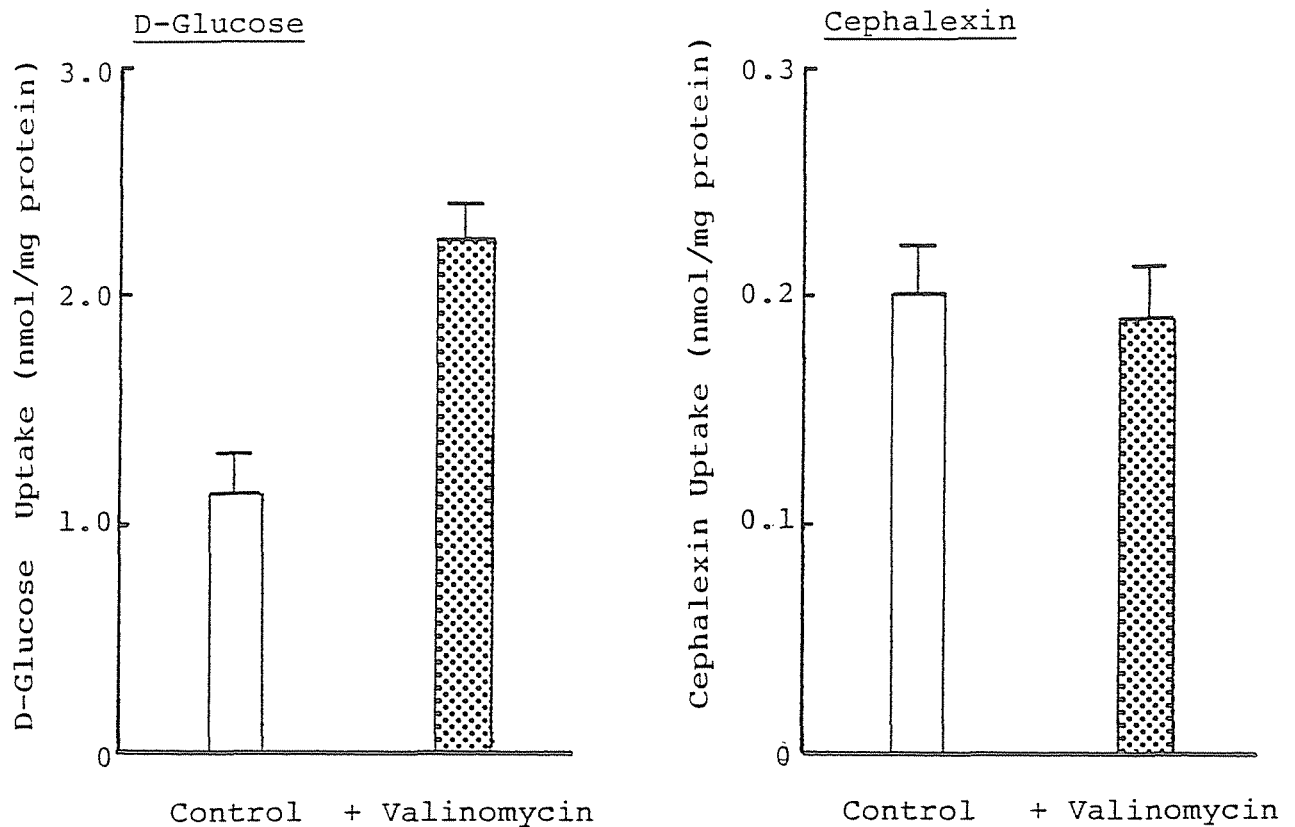


Fig.19 Effect of Valinomycin-Induced Potassium Diffusion Potential on D-Glucose and Cephalexin Uptake (Inside Negative)

Membrane vesicles were prepared in 100 mM D-mannitol, 100 mM potassium gluconate and 20 mM HEPES/Tris (pH 7.5). The incubation media contained 100 mM D-mannitol, 50 mM potassium gluconate, and 20 mM HEPES/Tris (pH 7.5). Valinomycin dissolved in absolute ethanol was added to the membrane suspension, with the addition of ethanol alone to the control. Final concentrations in the incubation medium of valinomycin and ethanol were 10 μ g/mg of membrane protein and 0.2 %, respectively, or 0.2 % ethanol alone. The incubation time was 30 seconds. Results are expressed as mean of 3-5 experiments with S.E.M.

⁴⁷⁾、Evers ら⁷⁵⁾ の改良による簡便な調製法が報告されて以来、広く用いられるようになった。

今回用いた Kessler らの方法は輸送系の検討に適当なものとして既に確立されたものであり、今回の実験でも、L-フェニルアラニンやD-グルコース、L-アラニンの取り込みにおいて、その担体輸送機能の保持が確認された。一方、セファレキシン、セフラジン、アンピシリン等のアミノβラクタム系抗生物質は、担体輸送系を介して透過する物質とは異なり、むしろ単純拡散系化合物としての透過性を示すものであった。

Inuiらはラット腎上皮細胞のBBM小胞を用いて、セファレキシン等のアミノセファロスポリン類が担体輸送により再吸収されることを報告しており、両性イオン構造を持たないmono-basicなセファロスポリンにくらべて、小胞内取り込み平衡値に達する時間は極めて早いことを指摘している。また、小腸BBMによる検討にはKimuraら⁸⁵⁾の報告があり、セファドロキシールのNa⁺依存性担体輸送系の存在を明らかにしている。本研究において行なった小腸BBM小胞への取り込みにおいては、そうした傾向は見られず、同時に行なったアミノ酸の取り込み速度と比較しても、遅いものであった。またこのことは、比較的溶性の高いフェノバルビタールを用いて予備検討した際の小胞内取り込み平衡値到達時間と比較しても同様に遅いものであったことより、これらアミノβラクタム系抗生物質の遅い膜透過性は、主に脂溶性等の物理化学的性質に基づいていることが推察された。これらの結果の違いは、一つには膜小胞を調製した臓器（腎と小腸）の違いに起因することもあるが、詳細な検討は行っていない。また、同じ小腸においてもセファ

ドロキシールと他薬物で担体への親和性が大きく異なることも推察されるが、Kimuraらの報告では初期取り込みにおける濃度依存性についてはふれていないため、現時点で詳しい比較はできない。しかしながら、これら薬物の担体輸送系が吸収の主経路であるとするならば、セフラジン、セファレキシンに比べ、セファドロキシールの吸収性はよりすぐれたものとなるはずである。ところが実際には、これら薬物はいずれも吸収性は良好であり、bioavailability も大きな差はないことが知られている。したがって、これら薬物の吸収において、その主たる共通経路として担体輸送を考えることは難しいと思われる。

Okano らは⁶⁸⁾ 小腸BBMを用いてセフラジンの吸収に H^+ 共輸送系が一部関与していることを報告しており、 H^+ 勾配の効果については興味のもたれるところである。本研究においても、セファレキシンの取り込みに対する内向きの H^+ 勾配の影響は有意にその取り込みを促進するものであったが、一方、バリノマイシン添加によって生じた K^+ 拡散電位（内部負）の効果に対しては何ら変化がみられず、この薬物の膜透過には電荷の移動を伴わないことが示唆された。

この相反する結果に対する考察の一つとして、以下の可能性が考えられる。すなわち、セファレキシンの本実験条件（pH 7.4の溶液中）における分子種の割合は、その pka （ $pka_1=2.67, pka_2=7.3$ ）から^{77, 78)}、アニオン型がその60~70%を占め、両性イオン型は30%程度であることが想定される（カチオン型は無視できる）。今、この薬物の膜透過が単純拡散であり、各イオン種で膜の透過速度に大きな差はないと仮定した場合、本条件下で内部が負となるような膜電位を付加すれば、小胞内取り込み量は減少することが考えられ

る。しかしながら、バリノマイシンを用いた実際の結果では何ら有意な差は認められなかったことより、この薬物の膜透加速度においては、アニオン型よりも両性イオンの方がかなり速いものであると推察される。

また、このような観点に基づき、 H^+ 勾配の影響を検討した結果を再考するならば、pH5.5 と pH7.5 の条件下での両性イオンの存在比率は、 $[S]_{pH5.5}/[S]_{pH7.5}=2.0$ ⁷⁶⁾ 程度であり、その小胞内取り込みの比率と良く一致している。したがって、初期時間での小胞内への取り込みが、もっぱら両性イオン種の取り込みを反映しているとするならば、仮に H^+ 勾配依存性の担体輸送が関与するとした場合には、今回得られた結果以上の促進効果が見られるものと考えられる。

以上のことより、これら薬物の膜透過において、 H^+ 勾配依存性の担体輸送の寄与は小さいと考えられるが、これに関しては勾配存在時での取り込み飽和性等、より詳細な検討が今後必要であると考えられる。しかしながら、本編での検討結果と第 I 編での吸収抑制効果を合わせて考えた場合、アミノβラクタム系抗生物質の主たる吸収機構としてはアミノ酸やジペプチドの担体輸送系の寄与は小さく、むしろ別の特殊な機構が共通する吸収経路として関与している可能性が示唆された。

Yamashita ら ^{16, 80)} は、最近ラット小腸を用いて短絡状態での薬物膜透過の研究を行ない、セファレキシンの吸収のうち飽和過程を示す割合はアミノ酸や糖に比べ非常に小さいことを明らかにしている。さらに、彼らは上皮細胞内への蓄積性について着目し、これは膜透過の飽和性とは別の K_m 値をもつ過程が存在することを報告している。これらのことから、粘膜組織への蓄積に対し、さらに詳細

な検討を加えることは、これら薬物の吸収機構を考慮するうえにおいて極めて重要なことであり、以下第Ⅲ編ではこれらについての種々の実験結果を論述する。

第 III 編 小腸上皮細胞の構成成分 への親和性と薬物の吸収 機構

薬物が消化内から吸収され脈管系に移行するまでには種々の過程が含まれることより、吸収を論じる場合にはその各過程、すなわち膜透過性の他、上皮細胞内での挙動及び、血液中への出現などを総合的に考慮することが重要である。第 I 編、第 II 編において、著者はアミノβラクタム系抗生物質の吸収に管して、その消化管からの吸収抑制効果、及び膜透過性の観点より考察を加えてきた。その結果、これら薬物が上皮細胞を通過する上で、最初の過程と考えられる小腸BBMの透過性には薬物間で大きな差異はなく、吸収性において明らかにされた差異や吸収抑制効果は膜透過性のみで説明できるものではないことが示唆された。

一方、第 I 編、第一章で論述したごとく、これら薬物の相互の抑制効果は粘膜組織中での蓄積においても同様に認められ、この両者に何らかの関連性のあることが示唆された。また、近年、Miyazaki¹⁸⁾ はアミノペニシリンであるアンピシリン、アモキシシリンが、小腸上皮細胞中の可溶性高分子画分の一つと親和性を有することを明らかにしており、Yamashita⁸⁰⁾ はセフラジン、セファレキシンの小腸吸収において、組織への蓄積が膜透過時とは別のKm値をもった飽和過程を有することを見い出している。

また、Metz⁸¹⁾ によって牛脾臓中の可溶性画分にlipidの細胞内輸送に寄与するタンパクの存在が明らかにされており、Levi⁸²⁾、Ockner⁸³⁾ によってその存在が認められたラット肝臓および小腸組織中の遊離脂肪酸結合タンパクは、種々の有機アニオンと

結合することとも明らかになりつつある。この様に物質の生体内移行に際しては、ある種の生体成分がその物質に対しての貯蔵庫あるいは運搬体として寄与している例が知られており、薬物とその親和性成分との相互作用を検討することは薬物の吸収機構を解明するうえで重要と考えられる。以上のことから、本編では、小腸粘膜組織の構成成分と薬物との親和性を検討し、消化管吸収との関連性について考察した。

第一章 アミノβラクタム系抗生物質の小腸組織親和性

既に記述したごとく、本研究で用いたアミノβラクタム系抗生物質間の吸収に見られる相互吸収阻害効果は、小腸組織内に取り込まれる程において認められるものであることが、第Ⅰ、Ⅱ編における検討結果から推察される。

薬物の消化管吸収性を、粘膜中の種々成分との結合性によって関連づけ、より詳細に説明しようとする試みは、その生体膜成分の単離、精製の手法が改良されるにつれてより多くの検討がなされてきた。

しかしながら、アミノβラクタム系抗生物質のように脂溶性が極めて劣っており、吸収されにくいと考えられる構造をもつ薬物に関して、そのすぐれた吸収性を粘膜組織中の成分との親和性の観点から検討し、考察を加えている報告は極めて少ない。

このようなことから、本章では第Ⅰ編で明らかにした粘膜組織内の蓄積性に対し、さらに詳細な検討を加える目的でこれら薬物の粘膜中での蓄積程度を、血液中への移行量と比較することによって、

一層明らかとし、あわせて蓄積性と吸収機構の関連性について考察した。

< 第 1 節 > ラット腸管、脈管同時還流法による吸収性と組織への滞留

薬物の吸収実験法に管しては、目的に応じて種々の手法が^{89, 90)}考案され、使い分けられている。このうち、血管側を還流する手法は、管腔側から組織への移行と組織から血液側への移行を同時に把握できるためこれらアミノβラクタム系抗生物質のような腸管組織滞留性の薬物の場合には有用な吸収実験法であると考えられる。

そこで本研究では、セファレキシン、セフラジン、アンピシリンの吸収についてこの脈管同時還流法を用いて検討し、消化管腔から消失、粘膜中での蓄積および血液側への移行速度の関連性について考察した。本手法を用いた場合の小腸の生理機能の維持に関しては、走査型電子顕微鏡（日立 S-450 型）による観察で微絨毛に形態学的変化は認められないこと、及び L-フェニルアラニンの能動輸送系が保持されていること等によって確認した。⁹¹⁾

その結果、Fig. 20 に示すように、空腸部を用い、人口血液であるフルオロカーボン FC-43 を血管側還流液に使用したこの手法においても、これら薬物の消失は全腸管を用いた場合の結果とよく一致し、かつ血液側への移行速度も、セフラジン > セファレキシン > アンピシリンの順であり、その管腔内からの消失挙動をよくあらわしていることが明らかとなった。

次に、小腸管腔内、組織中、血液側の薬物量を比較する目的で、

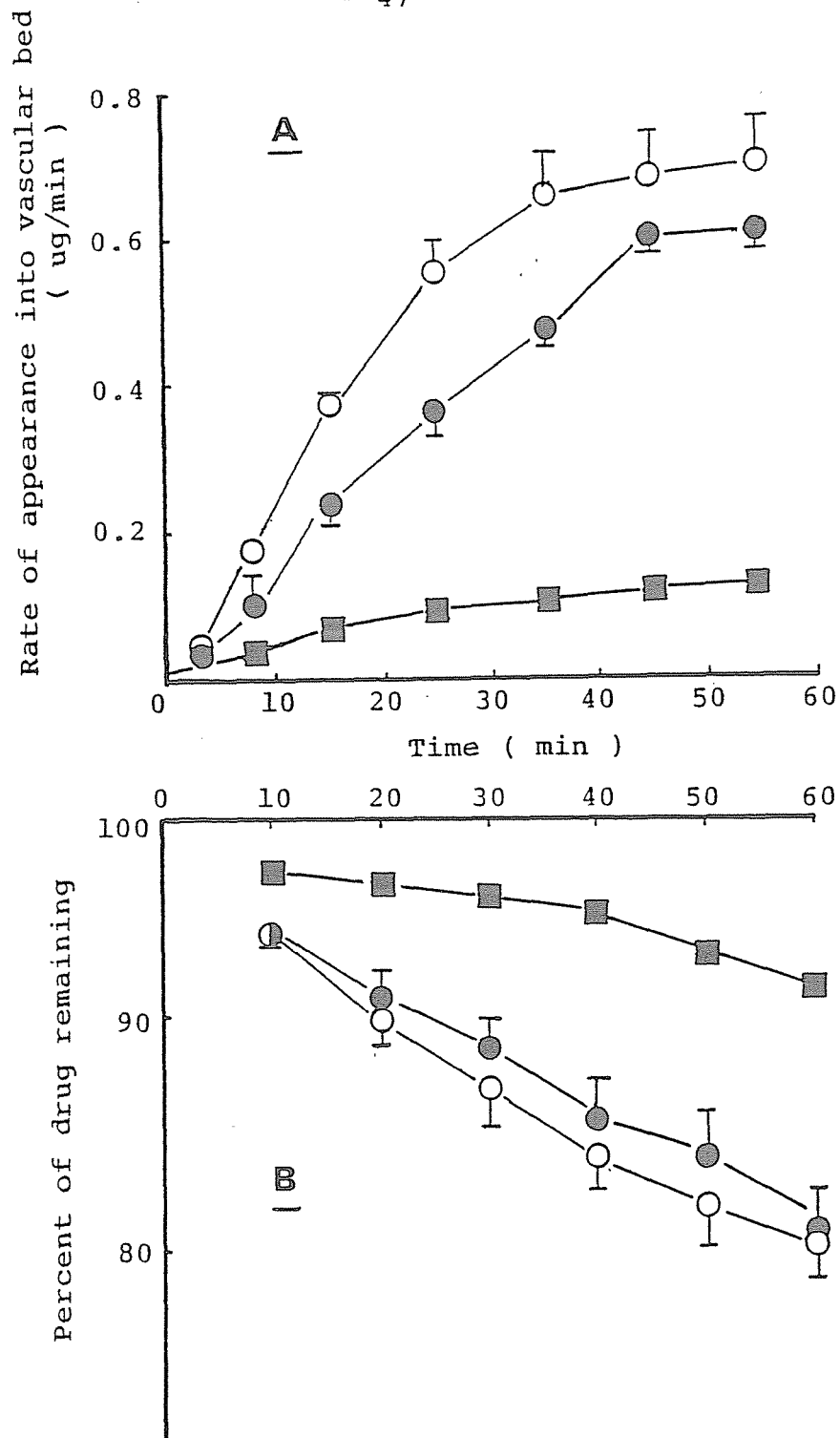


Fig.20 Intestinal Absorption of Ampicillin(■), Cephalexin(●) or Cephadrine(○) in the Vascularly Perfused Rat Jejunal Segments

Each drug (150 μ M) was recirculated through the intestine. Appearance in venous effluent(A) and Disappearance from lumen(B) are shown. Results are expressed as mean of two or three experiments with S.E.M.

本血管還流法をループ吸収実験法に適用し、これら各コンパートメント中の薬物量を測定した。Table 3 にセファレキシンの結果を示す。60分の吸収実験において、血管側への移行量の2倍以上が粘膜組織内に蓄積していることが明らかとなった。また、この傾向は、吸収実験30分の場合にはさらに顕著であり、投与量の7割が組織中に存在していることを確認している。

Table 3 Recovery and Distribution of Cephalexin in the Vascular Perfused Intestinal Loop of the Rat

	Percent of drug
Remained in intestinal lumen	23.6 $\pm$ 1.5
Accumulated in intestinal mucosa	52.0 $\pm$ 1.2
Appearance in vascular bed	23.2 $\pm$ 1.2
Total percent of drug recovery	98.8 $\pm$ 1.0

Results are expressed as mean of five experiments with S.E.M.
Absorption time was 60 min. Dose into the loop was 150 μ M of cephalexin (1.0 ml).

< 第 2 節 > 薬物の吸収性と粘膜組織蓄積性

これら薬物の吸収性と組織蓄積性との関連を明らかにする目的で、さらにアミノβラクタム系抗生物質の吸収とその蓄積についてループ吸収実験法により検討した。Fig. 21に示したように、各薬物ともに、粘膜組織中への蓄積が見られ、かつ、吸収の優劣と組織蓄積の間には良い相関性が認められ、これら薬物の易吸収性には小腸組織への蓄積過程が何らかの寄与をしていることが示唆された。

< 第 3 節 > 薬物の小腸組織内分布の検討

前節で認められた組織内取り込みを更に詳細にみる目的で、ループ吸収実験法により薬物を組織中に取り込ませた後、粘膜中に蓄積した薬物の細胞内分布について検討した (Table 4)。その結果、核、ミトコンドリア、側底形質膜及び刷子縁膜を含む画分に分布している薬物量は少なく、主として細胞質画分にその大半が存在していることが認められた。

また、小腸粘膜組織の擦過物をホモジナイズし、105,000xgの遠心分離により、可溶性画分と不溶性沈澱物に分離した後、沈澱物に対する薬物の結合性を検討した。その結果、セフラジンのみ若干の親和性が認められたに過ぎず、しかもこのこの親和性は次章に述べられる可溶性画分に比べ、著しく小さいものであった (Fig. 22)。さらに Fig. 23に示したように、小腸粘膜ホモジネートを triton X-100で処理し、可溶化させた場合と未処理のホモジネートの 105,000

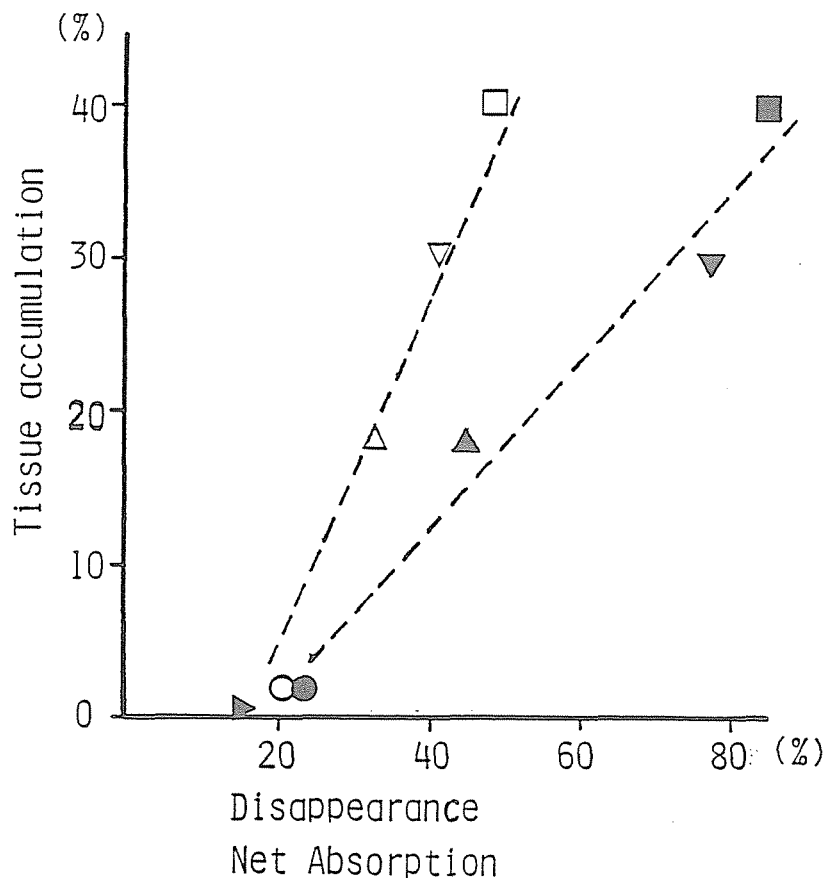


Fig.21 Relationship between the Accumulation in Mucosa and the Disappearance or the Net Absorption from Intestinal Loop

Absorption time was 30 min from jejunal loop (10 cm).
Doses were 1 ml of 300 μ M CEX(▽ , ▼), CED(□ , ■),
AB-PC(○ , ●), AM-PC(△ , ▲) or CEZ(▶).
Disappearance and Net Absorption are shown by the closed
symbol and the open symbol, respectively.
Results are expressed as mean of 3-8 experiments.

Table 4 Drug Distribution in the Various Components of Intestinal Mucosa

	Initial homogenate	Pellet 1 (nuclei,Mt,BLM)	Supernatant 2 (diluted cytosol)	Pellet 2 (BBM)
ampicillin (%)	100	1.2	79.7	0.77
(μ g drug/mg protein)	0.04	0.002	0.10	0.01
amoxicillin(%)	100	1.3	82.3	1.2
(μ g drug/mg protein)	0.51	0.011	0.97	0.16
cephalexin (%)	100	0.9	95.4	2.1
(μ g drug/mg protein)	0.63	0.015	1.96	0.15
cephradine (%)	100	1.4	103.5	1.3
(μ g drug/mg protein)	1.04	0.028	2.78	0.41

Drug in 1 ml of 300 μ M in modified Ringer's solution was administered.

Absorption time was 30 min from jejunal loop (10 cm).

Results are expressed as mean of four experiments. Protein was determined by Lowry's method.

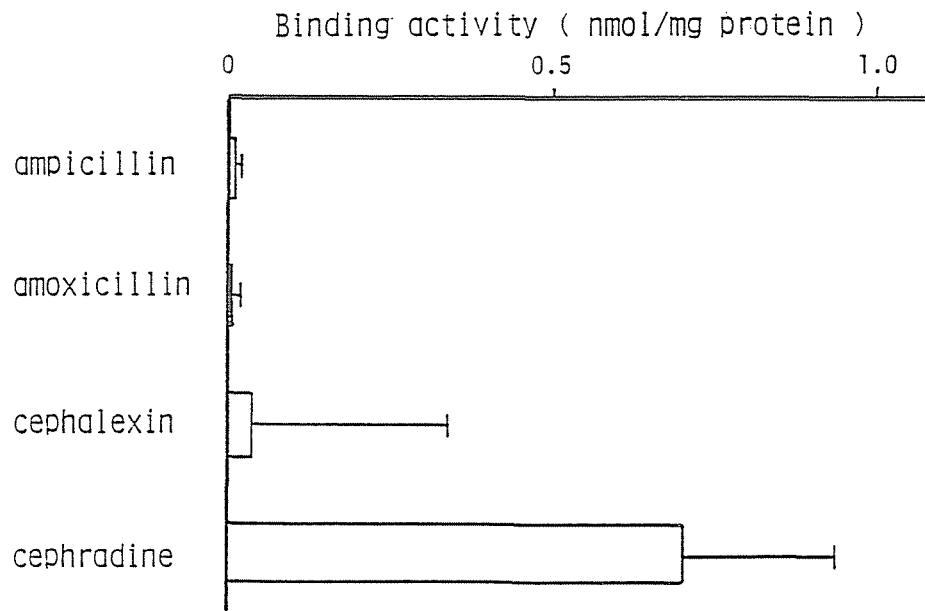


Fig.22 The Results of Binding Experiments using the Suspension of 105,000 xg Pellet from Rat Intestinal Mucosa

Results are expressed as mean of three experiments with S.E.M.

血清上清について、セファレキシン、セフラジンの結合性を比較検討したところ、両者で結合能に差異は認められなかった。

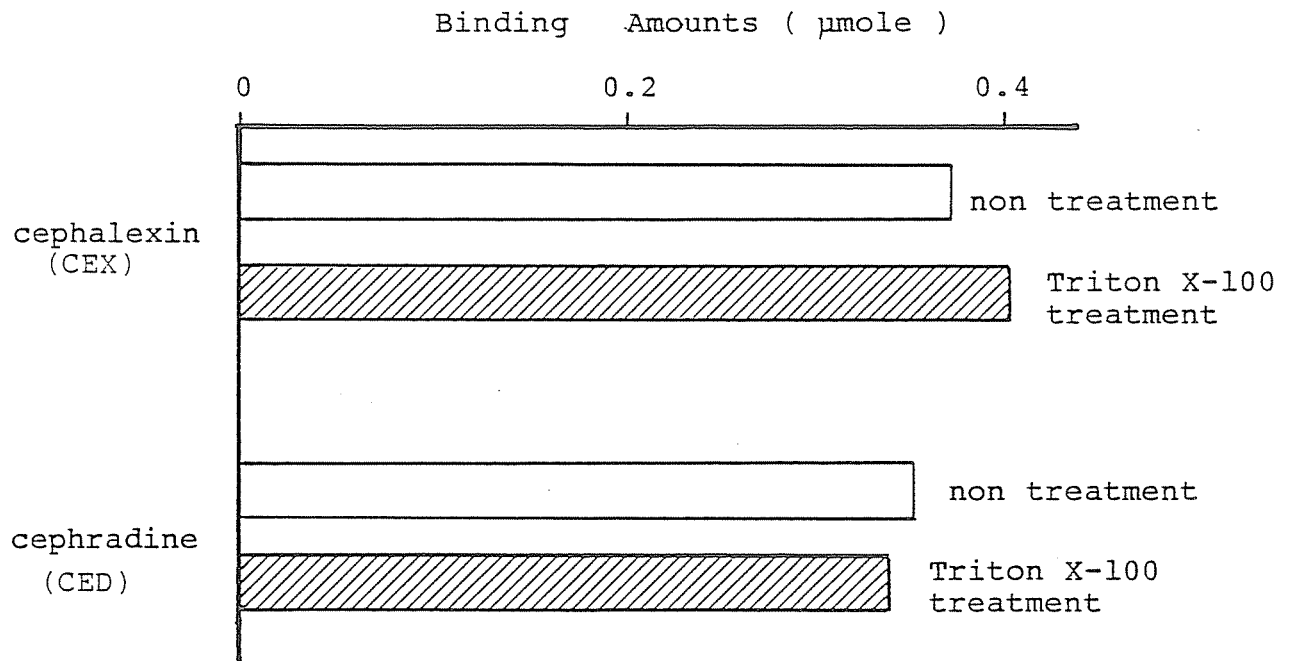


Fig.23 Effect of Triton X-100 Treatment on Binding of Cephalexin
Cephradine

Results are expressed as mean of two experiments.

< 第 4 節 > 考 察

アミノβラクタム系抗生物質の吸収過程において、これら薬物は一過性の粘膜組織への蓄積が生じていることが明らかとなった。さらに、この組織内へ蓄積する程度の差がそのまま吸収の差異を反映するものであったことより、この組織への蓄積が吸収における共通の過程であることが示唆された。

さらに、腸管脈同時還流法による結果において、血管側への薬物出現速度が定常状態に達するまでに30～40分要したことは（Fig. 20）、第I編で示したセフラジン、セファレキシン間の相互吸収抑制が20～30分以降で強く認められたことと対応しており、かつ組織蓄積における薬物間の抑制効果に対しても説明しうるものと考えられる。

また、この薬物組織蓄積性は、第3節で述べたごとく、可溶性画分への親和性に由来するものであることが示唆された。従って次章では、これら薬物と細胞質成分との結合性について検討した結果を述べる。

第二章 小腸組織可溶性画分の薬物結合成分の単離と結合実験

前章において、薬物の吸収と小腸組織への蓄積には良い相関があり、この組織への蓄積性が吸収過程の中で何らかの寄与をしていることが示唆された。

Ocknerら⁸³⁾は小腸組織可溶性画分の中に遊離脂肪酸と結合するZ蛋白の存在を明らかにしたが、このZ蛋白は、近年、スルホプロ

モフタレイン等の色素やビリルビン等、種々の有機アニオンと結合することが報告され⁹²⁾⁻⁹⁵⁾、その結合様式や生理的意義に関してもしだいに明らかにされつつある。また Feher⁹⁶⁾ はビタミン D 依存性の機構によって吸収された Ca^{2+} の細胞内結合タンパクに関して検討し、その吸収における役割について考察しているが、近年このような細胞内輸送や貯蔵蛋白として機能する生体側の因子が数多く報告されている。

本研究において、アミノβラクタム系抗生物質は消化管から体循環へ移行する過程で小腸組織内に一過性に蓄積することが明らかとなったが、この点について、さらに結合性成分と物質吸収との関連性を検討することは、水溶性薬物の吸収機構を解明するうえで、極めて重要な基礎的知見を与えるものと考えられる。したがって、本研究では前章で得られた結果をもとに、ラット小腸粘膜組織可溶性成分について薬物結合性成分の単離精製を行ない、次いでこのものへの薬物の結合性について検討した。

< 第 1 節 > 可溶性画分の分離精製

1) DEAE イオン交換クロマトグラフィー

ラット小腸粘膜組織ホモジネートより得た 105,000 xg 上清に対し、DEAE セルロファイン (AMタイプ、i.d. 1.6 X 70 cm) カラムを用いて分画し、吸着画分と非吸着画分を得た。すなわち、上清をカラムに添加し、10 mMリン酸緩衝液 (pH 8.0) にて非吸着成分を溶出させた後、0.5 Mの KCl を含む緩衝液にて吸着成分をカラムより溶出させた。

その結果、Fig.24に示したようにタンパク量及び280nmにおける

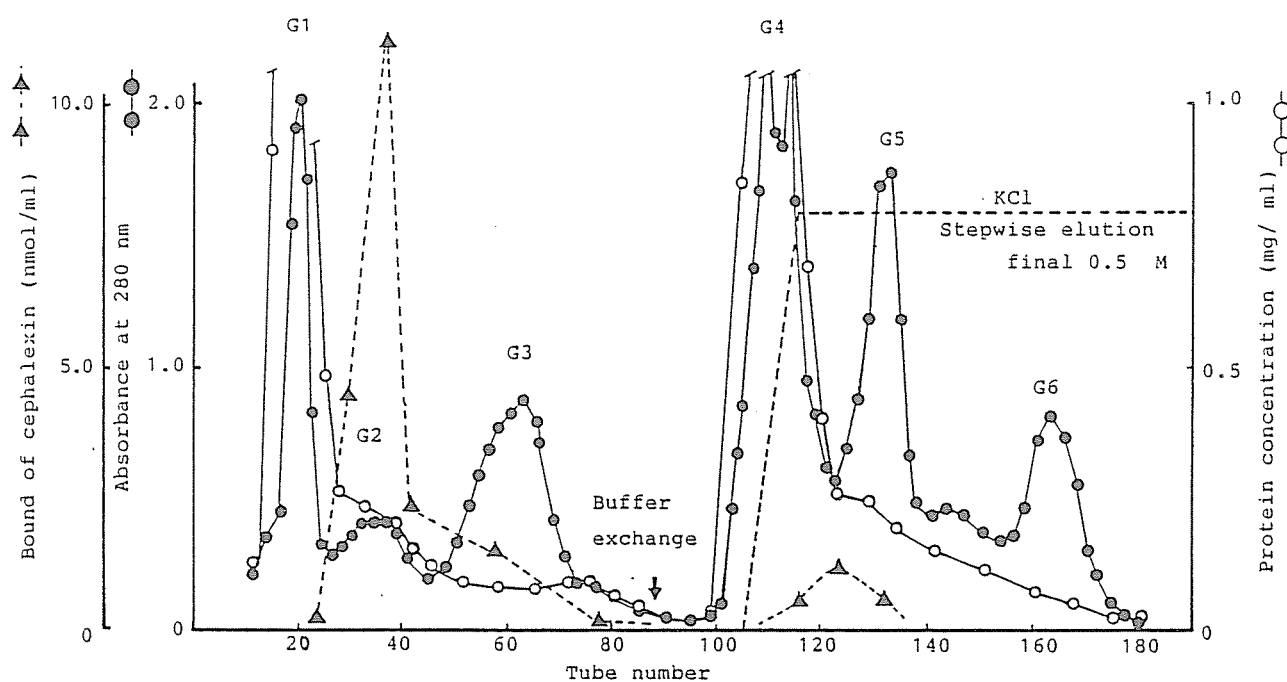


Fig.24 DEAE Cellulofine Ion Exchange Chromatography of Rat Intestinal 105,000 xg Supernatant

Equilibration buffer was 10 mM phosphate buffer (pH 8.0). Flow rate was 40 ml/hr and 4.0 ml of fractions were collected.

Protein was measured by Lowry method and cephalixin binding activity was determined by equilibrium dialysis method.

吸光度より求めたクロマトグラムは、非吸着画分としてG1からG3、吸着画分としてはG4からG6の6つに分画された。さらに、薬物結合活性の指標として測定したセファレキシンの結合活性は、G2画分にその大半が認められた。また、この条件で吸着成分を溶出させた後、2.0M までKCl濃度を上げてカラムを洗浄しても溶出されるタンパク成分はなく、かつ添加した上清の総OD 280nmの85%以上がこの条件で溶出されることを確認したことより、上清に含まれる大半の成分が本実験条件下で回収、分離され、カラムに吸着し溶出されない成分は少ないことが推察された。また、セフラジン、アンピシリン、アモキシシリンの結合活性もG2画分にその大部分が認められ、他の画分には結合しないことも確認している。

したがって、次にこのG2画分を集め、セファデックスG-50によるゲル濾過を行なった。

2) セファデックスG-50ゲルクロマトグラフィー

前項で得られたセファレキシン結合性画分（G2画分）に対し、スペクトラ／ポア6（m.w.cutoff 2,000）透析膜を用いて脱塩、凍結乾燥後、セファデックスG-50（Fine, i.d. 2.5 x 65cm）カラムにてゲル濾過を行なった。

Fig.25にその結果を示したが、測定波長 280nm、215nmでの吸光度、及びLowry法によるタンパク濃度のクロマトグラムからfa、fb、fcの三つの画分に分離することができた。これら三つの画分のうち、fa、fbは280nm、215nmでの吸光度及びタンパク濃度ともにそのクロマトグラムが一致することからタンパク性の物質であることが示唆された。

一方、これら三画分をそれぞれプール、そのセファレキシン結合

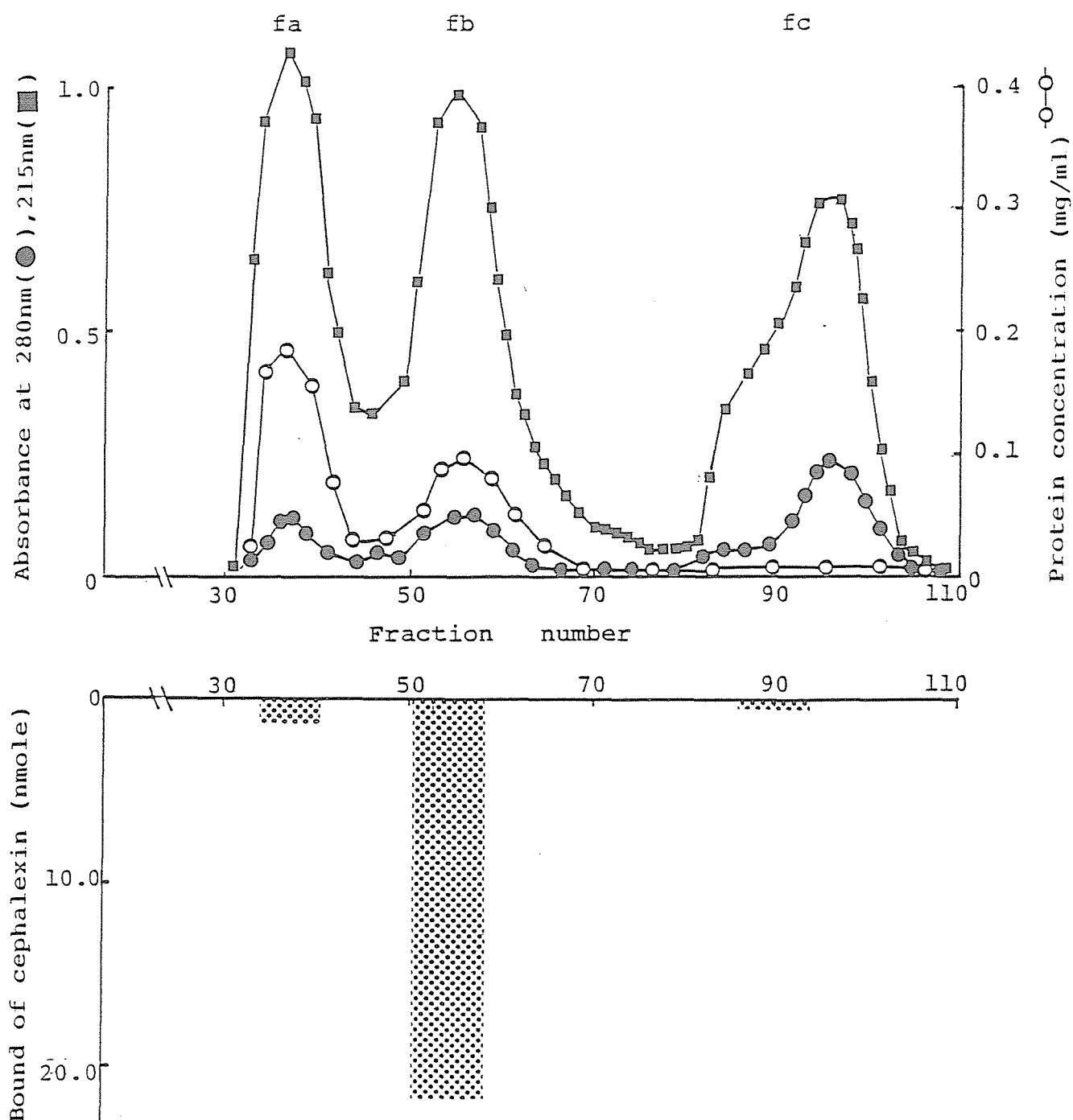


Fig.25 Gel Filtration Chromatography of G2 Fraction from DEAE Ion Exchange Chromatography of Rat Intestinal 105,000 xg Supernatant on Column of Sephadex G-50

Flow rate was 10-12 ml/hr and the effluent was collected in 4.0 ml fractions.
Effluent was 10 mM phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.1 M NaCl. Protein was determined by Lowry method.

活性を検討した結果、fb画分に最も大きな活性が認められたことより、G2画分で得られた薬物結合活性はfb画分に由来するものであることが明らかとなった。

また、Miyazakiら¹⁸⁾は、ラット小腸組織可溶性画分をセファデックスG-75にて分画し、その中の低分子量フラクションF1にこれら薬物が結合することを見い出している。そこで本研究で得られたfb画分とこのF1の相同性を検討するため、セファデックスG-75により分取したF1をさらにセファデックスG-50カラムにてゲル濾過を行なったところ、fb画分の溶出する位置にその大半が溶出され、加えて高い結合性を有することが認められた。この結果より、今回得られたfb画分はF1中の主要成分であることが明らかである。

3) SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動

得られたfb画分についてSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を行ない、分子量の推定と純度検定を行なった。SDS-PAGEはStankら⁹⁷⁾の方法に準拠し、染色はクマシーブリリアントブルー染色法を用いた。

その結果、fb画分は推定分子量15,000の単一な主要バンドとして検出された(Fig.26)。

4) 精製の結果

105,000 xg 上清からのfb画分の精製結果をTable 5にまとめて示した。Lowry法によって求めたタンパク質量を分母とする結合比活性は、上清に比べ最終的に約100倍の上昇が認められ、高度に精製されていることを確認した。

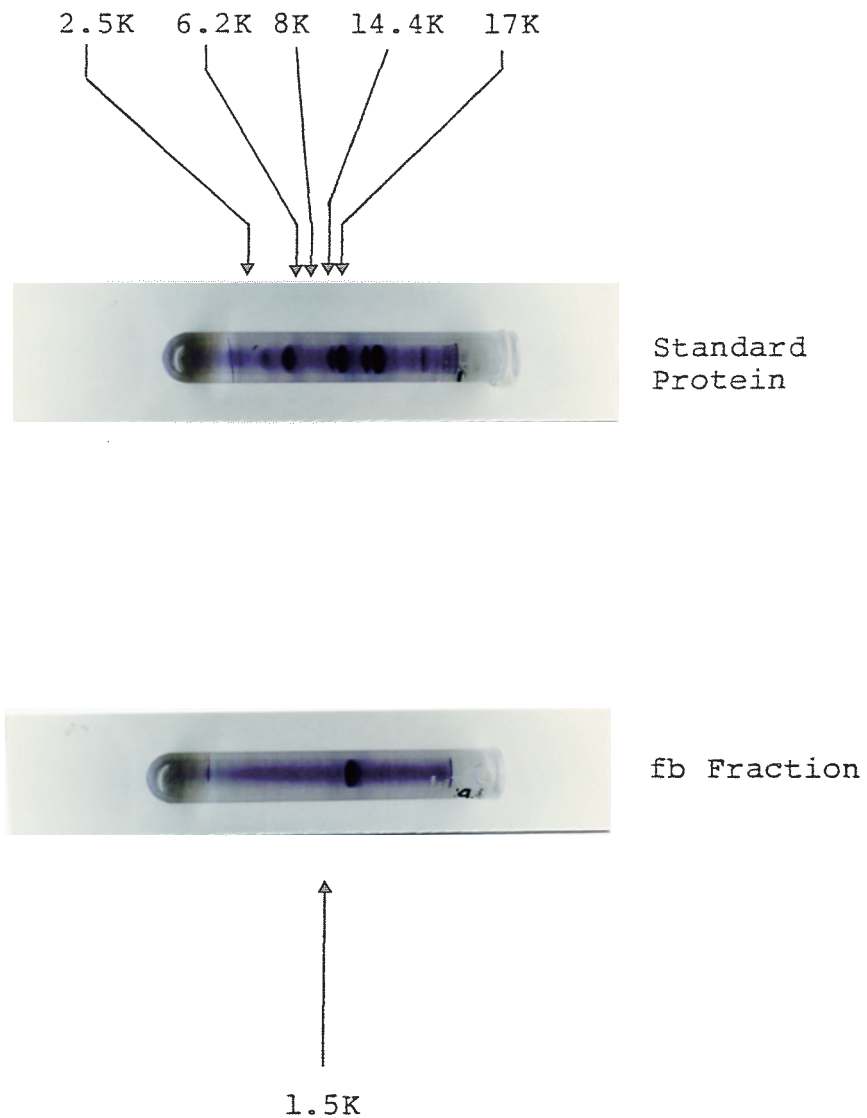


Fig.26 SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of fb Fraction
obtained by Gel Filtration on Sephadex G-50 Column

12.5 % acrylamide gel (acrylamide:Bis, 20:1) contained
8 M urea. Running buffer was 0.1 % SDS, 0.1 M H_3PO_4 /Tris
(pH 6.8).

Molecular Weight Marker III (Fulka AG,) was used as standard
protein. Sample was dissolved in 0.01 M H_3PO_4 /Tris (pH 6.8)
containing 1 % SDS, 8 M urea and 1 % 2-mercaptoethanol and
heated to 60°C for 10 min.

Table 5 Purification of Cephallexin-Binding Protein from the Rat Intestinal Soluble Fraction

Purification step	Total Protein (mg)	Yield (%)	Specific Activity (nmol/mg)	Purification (fold)
105,000 xg Sup.	305.2	100.0	1.56	1
DEAE-Cellulofine (G2 fraction)	5.61	19.4	16.47	10.6
Lyophilized prepn.	4.76	18.5	18.49	11.9
Sephadex G-50 (fb fraction)	0.52	18.0	168.0	107.7

Specific activity was measured by equilibrium dialysis using the dialysis cell. The concentration of protein was determined by the method of Lowry et al.

< 第 2 節 > fb画分への薬物結合性

前節で得られたfb画分への薬物結合の特異性を、種々の β ラクタム系抗生物質を用いて検討した。

それらの結果をFig. 27に示す。消化管から容易に吸収される両性イオン型 β ラクタム系抗生物質は、ペニシリン系、セファロスポリン系ともに高い結合性を示すことが認められた。一方、これに対して消化管からの吸収が悪く、臨床的には注射剤として使用されているセファゾリン、セファロリジンの結合は全く認められなかった。

このことより、これら薬物の消化管吸収過程において認められた粘膜組織内への蓄積は、このfb画分との結合に起因するものであり、同時にこの結合性は薬物吸収の難易性を良く反映することが強く示唆された。

< 第 3 節 > 考 察

薬物の小腸粘膜組織可溶性画分への親和性について検討した結果、これら両性イオン型のアミノ β ラクタム系抗生物質は、可溶性画分中の一つであるfb画分に高い結合性を示すことが明らかとなった。このfb画分は、可溶性画分からDEAEイオン交換クロマトグラフィー、セファデックスG-50ゲルクロマトグラフィーにて高度に精製され得る、推定分子量約15,000のポリペプチドであり、このものとの薬物結合が、吸収機構に大きな役割を担っていることが十分に推察された。また、この結合性は、アミノ β ラクタム系抗生物質に共通したものであることも第2節の結果により示され、これら薬物の吸収機構を明らかにするうえで極めて重要な知見と考えられる。

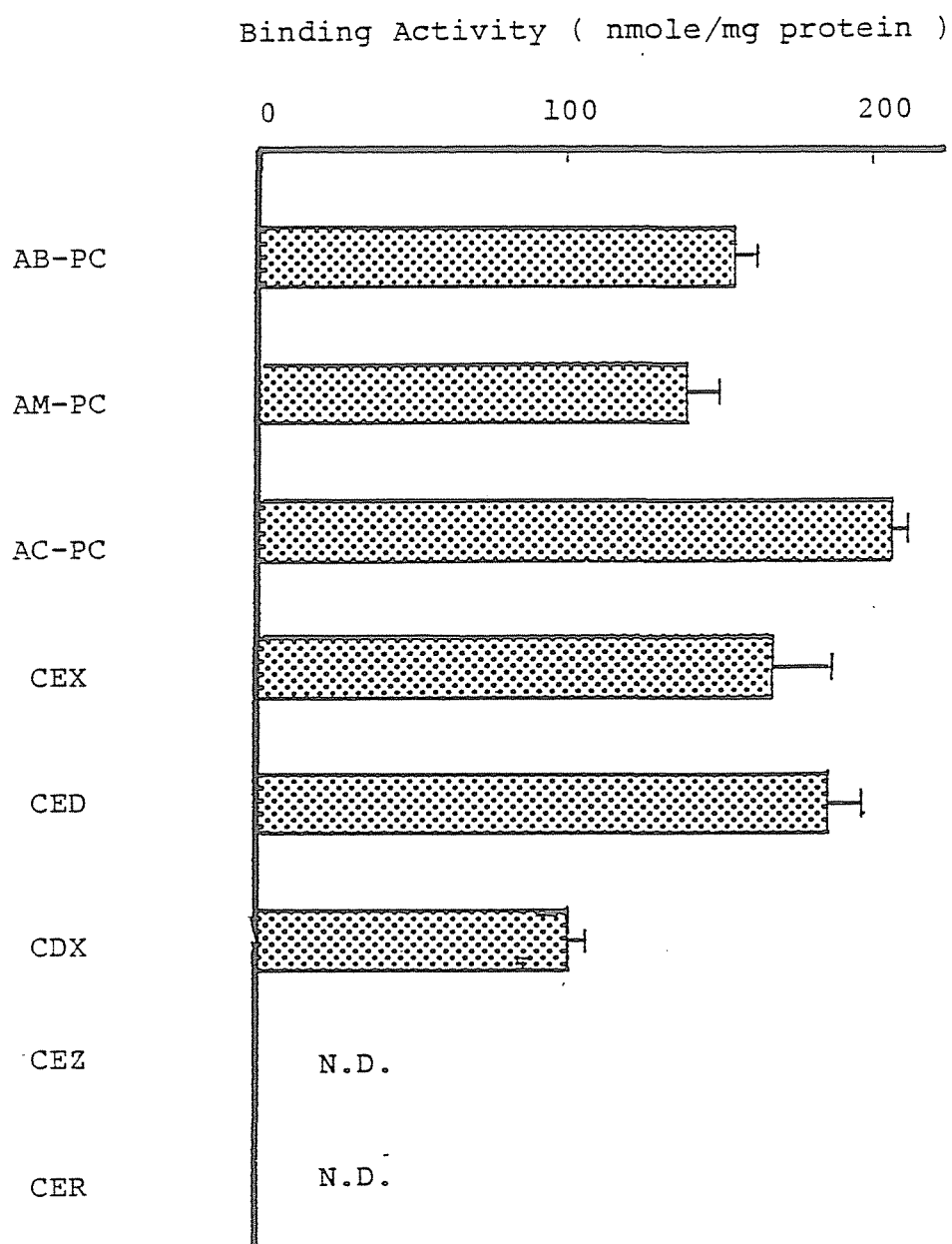


Fig.27 Binding Behaviour of β -Lactam Antibiotics to fb fraction
Results are expressed as mean of 6-12 experiments with
S.E.M.

しかしながら、結合のみられた薬物間において、結合量と吸収性との間に明確な相関性は見られず、吸収程度の差異を一部反映していない面も認められた。すなわち、アンピシリン、アモキシシリンの結合量は、その吸収性から考えた場合、セフラジン、セファレキシシンよりも小さくなることが予想されるが、実際の結果はほぼ同程度の結合性を示した。このことより、薬物に対するfb画分の最大結合能、及び結合定数の違い等、結合の特性をさらに考察する必要があるものと考え、次の第三章において、結合特性の点より検討を加えた。

第三章 fb画分への薬物結合における相互作用と結合特性

第Ⅰ編、第Ⅱ編において、著者はアミノβラクタム系抗生物質の消化管吸収で認められた薬物相互の吸収抑制の主要因が、アミノ酸やジペプチドの担体輸送系を介した現象とは考えにくい点について言及した。これらのことについて、さらに、本研究で明らかとなったfb画分への薬物結合性の観点から検討を加えることは、吸収における共通した機構を明らかにするうえで極めて重要と思われる。

また、それと同時にこの結合性に関する特異性、すなわち、最大結合能や、結合定数等のパラメーターを得て、その親和性を定量的に解析することは、これら薬物の細胞内移行過程を解明する一助となり得るものと思われる。

これらのことより、本研究では薬物のfb画分の結合特性について、主に薬物間相互の結合阻害及びジペプチド等の影響等の観点より検討した。また同時に、結合定数等の算出を通じて吸収に及ぼす結合

性の寄与についても考察した。

< 第 1 節 > 薬物間相互の結合阻害

先ず最初、第 I 編における吸収実験で、相互にその吸収を顕著に抑制したセファレキシン、セフラジンをを用いて結合阻害実験を行なった。すなわち、セフラジンを阻害物質とし、共存濃度を種々変化させて、セファレキシンの fb 画分への結合に及ぼす阻害効果を検討した。その結果を Fig. 28 に示す。

セファレキシン濃度 $20 \mu\text{M}$ に対し、セフラジンをその 5 倍、10 倍、25 倍量 ($100 \mu\text{M}$ 、 $200 \mu\text{M}$ 、 $500 \mu\text{M}$) 共存させた時、セファレキシンの fb 画分への結合は有意に抑えられ、かつ、その阻害は共存セフラジン濃度に強く依存することが認められた。

したがって、次に各薬物間における結合阻害について検討を進めた。阻害薬物の濃度は、セファレキシンに対するセフラジンの抑制結果に基づき、各々 $500 \mu\text{M}$ として行なった。アンピシリン、アモキシシリン、セフラジン、セファレキシンの各々について検討した結果を Fig. 29 に示す。

fb 画分に対する各薬物の結合は、in situ 還流法による吸収実験の結果と同様に、いずれの薬物も相互に結合を阻害することが明らかとなった。一方、fb 画分に対し何ら結合性を示さず、かつ、消化管から吸収されないセファゾリンは、セファレキシンの結合に関して全く影響を及ぼさないことが認められた。これらの結果は、吸収抑制をみた第 I 編における実験事実を説明しうるものであり、また同時に、吸収性と fb 画分への結合能の有意な相互関係を裏づけるものとして非常に興味ある知見と思われる。

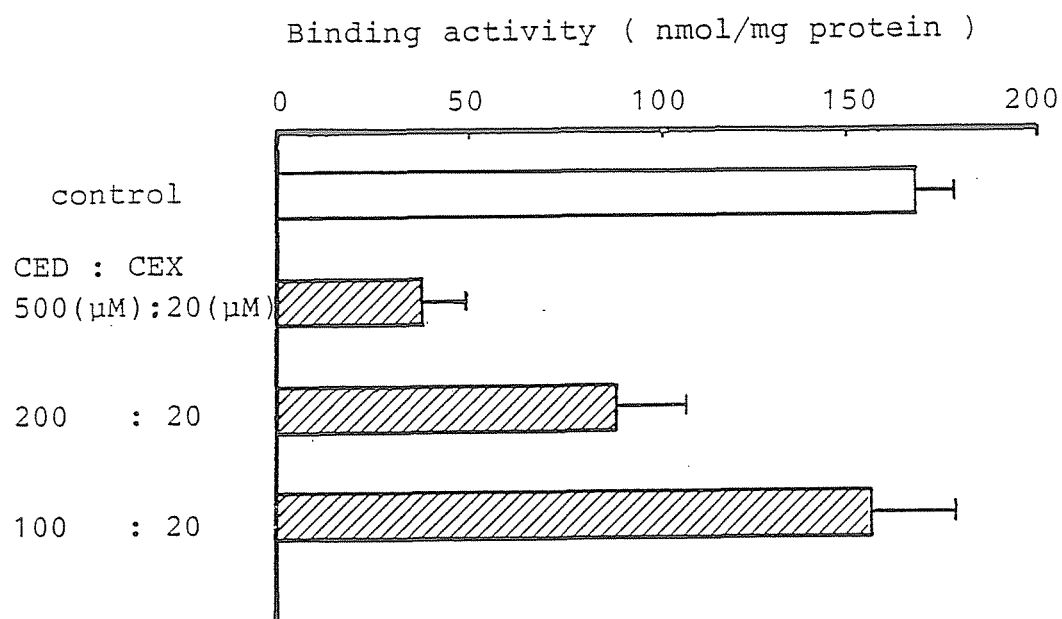


Fig.28 Effects of Various Concentrations of Cephadrine on the Binding of Cephalexin to fb Fraction

Results are expressed as mean of 3-4 experiments with S.E.M.

Binding activity was measured by equilibrium dialysis method.

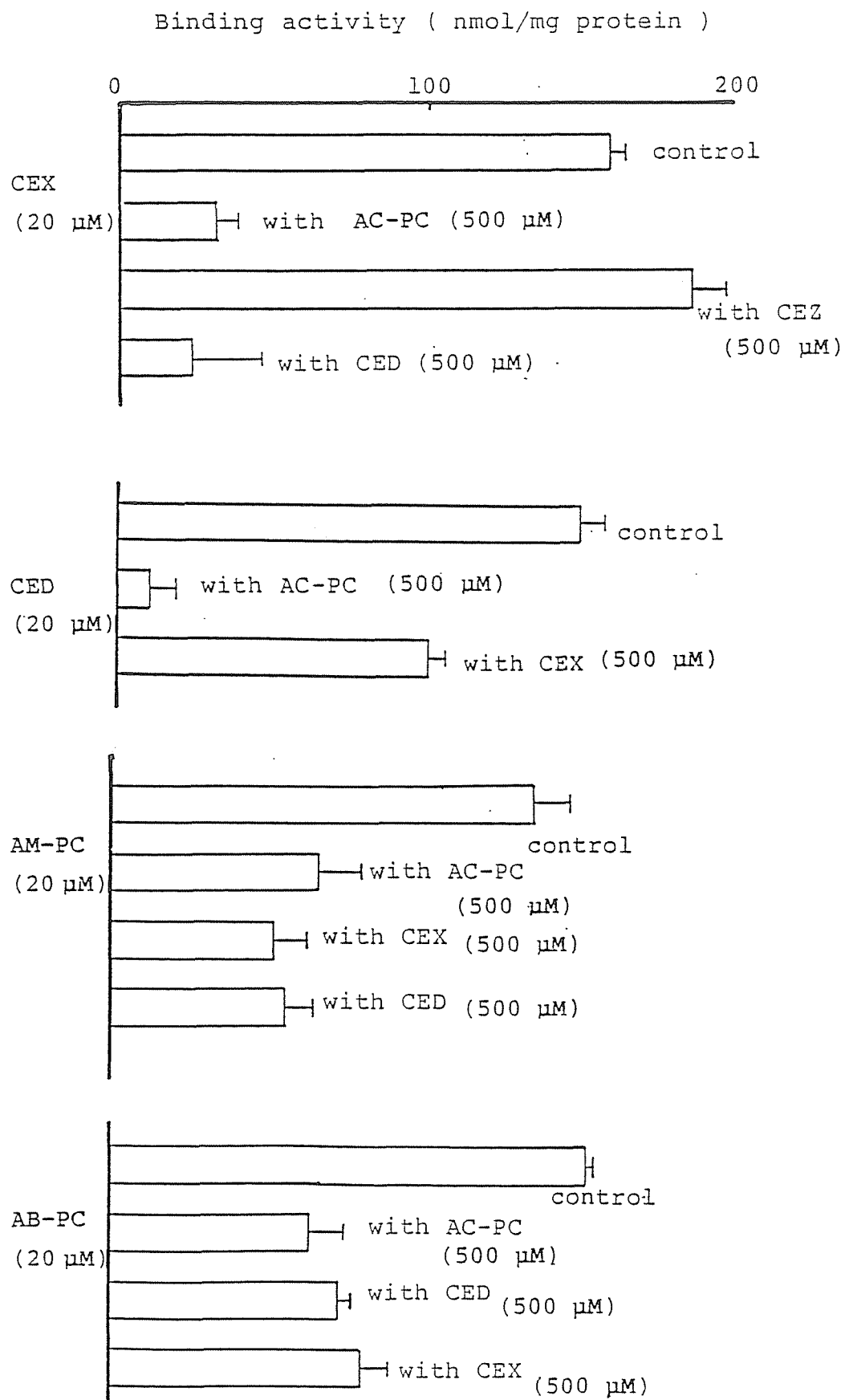


Fig.29 Inhibition Behaviour among amino β -Lactam Antibiotics
Results are expressed as mean of 3-8 experiments with S.E.M.

< 第 2 節 > 薬物の fb 画分への結合 に対するアミノ酸、ジ ペプチド類の影響

薬物の吸収特性とfb画分への結合性との関連をより明らかにする
目的で、セフラジン、セファレキシンのfb結合に及ぼす 2.3のアミ
ノ酸、ジペプチドの影響について検討を加えた。その結果、Fig. 30
に示したように、セファレキシンの結合に対してジペプチドのL-
Car、Gly-Gly は共存濃度 2.5 mM、500 μ M とともに著しい結合抑
制を示し、アミノ酸であるL-Phe、Gly は殆ど影響を与えないこと
が認められた。一方、セフラジンの結合に関しては、セファレキシ
ンと同様な傾向は示すものの、その阻害の程度については、大きい
ものではなく、むしろ吸収実験の結果と対応することが認められた。
(Fig. 31)

< 第 3 節 > 生体高分子結合性蛍光 プローブ ANS の fb 画分 への結合

fb画分と薬物の結合様式を明らかにする目的で、近年、このよう
な種々の生体高分子との結合性について検討されている蛍光性プロ
ーブ ANS^{98, 99)} (1-Anilino-8-naphthalene-sulfonate)を用いて
検討した。ANSは高分子の疎水性領域に結合することにより、そ
の蛍光強度を増大させる⁹⁸⁾ことから、種々の高分子-低分子間の
相互作用を解析する手段として汎用されている⁹²⁾。

これらの結果、ANSは他の生体高分子同様にfbに結合したものの、
これら薬物を高濃度に存在させた場合でも、その結合に由来した蛍

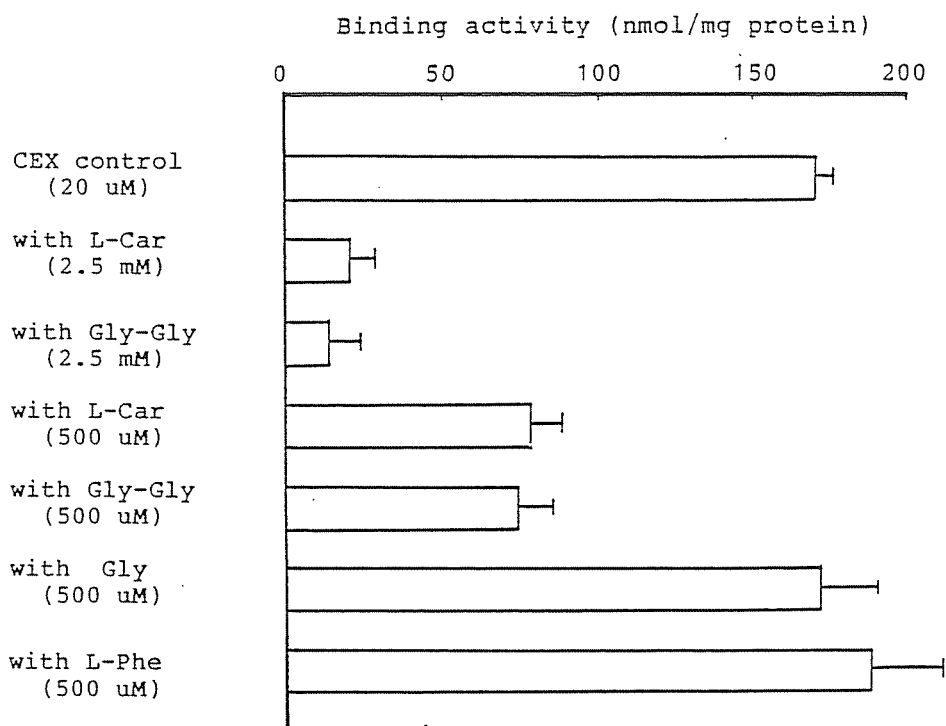


Fig.30 Effects of L-Car, Gly-Gly, Gly and L-Phe on Binding to fb Fraction of Cephalixin

Results are expressed as mean of 3-4 experiments with S.E.M.

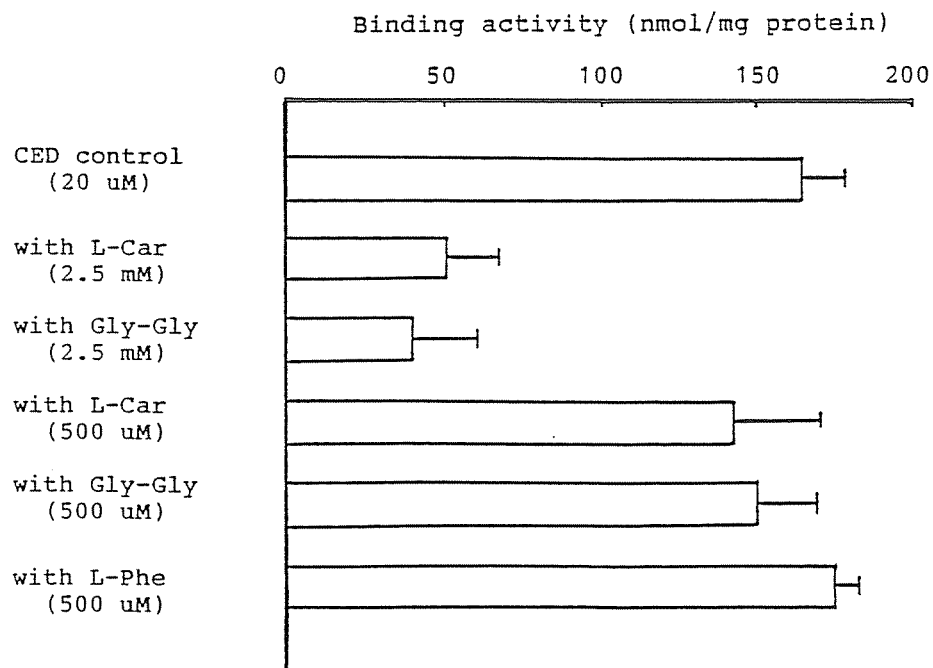


Fig.31 Effects of L-Car, Gly-Gly, Gly and L-Phe on Binding to fb Fraction of Cephradine

Results are expressed as mean of 3-6 experiments with S.E.M.

光強度変化量の増大は認められず、これら薬物の結合様式は ANS の結合様式とは異なるものであることが明らかであった。

< 第 4 節 > 薬物の結合様式と吸収特性

第Ⅲ編、第二章において既に述べたように、fb画分への各薬物の結合性は、その吸収の難易性をよく反映するものの、薬物間での吸収性の差異との相関においては一部相違していることが認められた。この理由として、fb画分の薬物に対する結合特異性（最大結合能、親和性）が異なることに基づく可能性が考えられる。そこで薬物としてセファレキシン、アンピシリンを選び、種々の薬物濃度における結合量を求めることにより、これら薬物のfb画分に対する結合能について定量的な解析を行なった。その結果Fig.32に示す。

スキッチャードプロットにより示されたこれらの結果において、セファレキシンはその結合に二相性が認められたのに対し、アンピシリンにはセファレキシンの低い親和性に相当する結合様式のみが存在していることが明らかとなった。このことは、両薬物における吸収性の優劣をよく説明し得るものと思われる。

< 第 5 節 > 考 察

本章では、先ず初めに薬物の相互吸収抑制に対する機構を説明することを目的として、fb画分を用いて薬物の相互結合阻害について検討を加えた。

In situ 吸収実験で相互に吸収を抑制することが認められたこれ

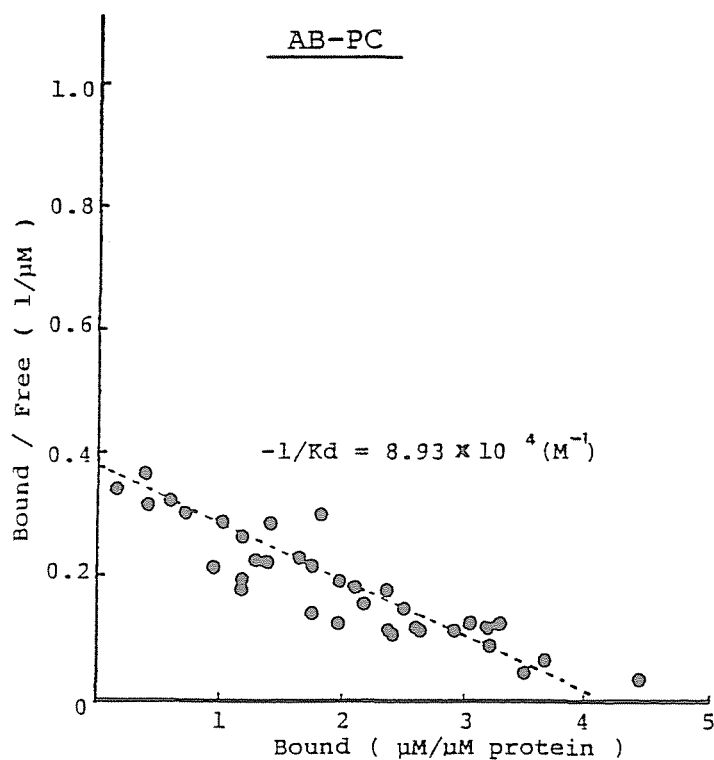
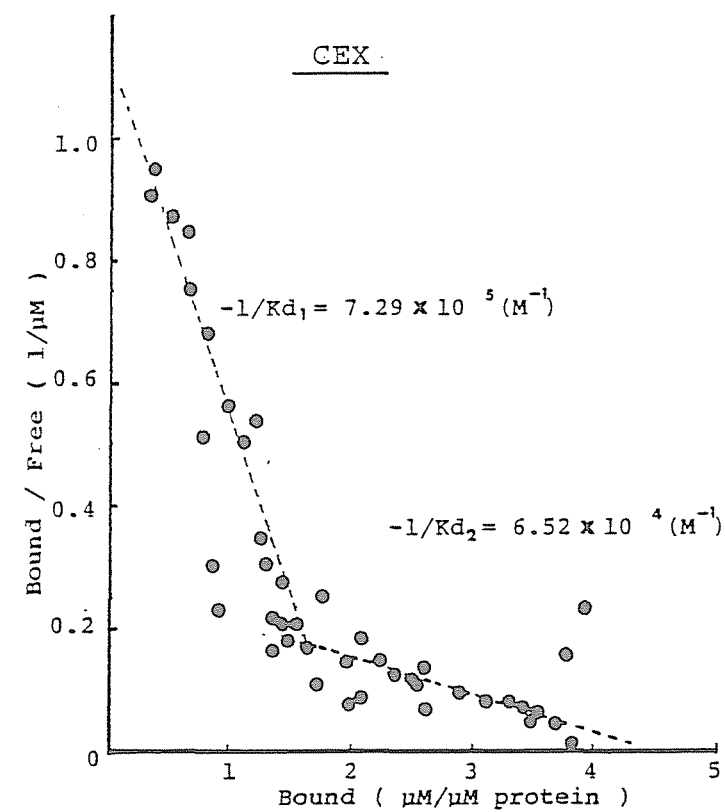


Fig.32 Scatchard Plots of Ampicillin and Cephalexin Binding to fb Fraction

Concentration of AB-PC or CEX was 3-100 μM.
Binding of drugs were determined by equilibrium dialysis method using the dialysis cell.

ら薬物においては、いずれも相互にfb画分への結合を阻害し、かつ、その阻害の程度は阻害物質の濃度に依存していることが示唆された。さらにまた、fb画分への結合が全く認められず、その吸収性も著しく劣っているセファゾリンは、これら結合阻害効果に対して全く影響を与えないことも明らかとなり、相互の吸収抑制効果を良く説明し得るものであった。これらの結果より、薬物の吸収機構における共通する過程として、fb画分への結合が大きく寄与しており、かつ、吸収の優劣に対し重要な役割を担っていることが強く示唆された。

一方、セファレキシン及びセフラジンに対し、L-Car、Gly-Glyが高濃度共存下で、著しい結合阻害を示したことから、第I編で明らかとなったセファレキシンに対するL-Carの吸収抑制は、このfb画分との結合を抑制したことに基づいている可能性も考えられる。ここで、L-Car、Gly-Glyは消化管内で加水分解を受けにくいジペプチドであるが^{10 0, 10 1)}、このうち、Gly-Glyは管腔から上皮細胞内に取り込まれた後、ジペプチダーゼによって、速やかにGlyに分解されることが知られている^{10 0)}。したがって、細胞内にGly-Glyの形で存在する割合は少なく、in vivoにおける実験では、結果的にGly-Glyによる吸収抑制は生じ得ないと考えられる。この点、in vitroにおけるGly-Gly及びGlyの結合実験の結果は、空腸上部での結果を除き吸収実験の結果と矛盾するものではない。

しかしながら、セファレキシンに対するL-Carの吸収抑制効果は6.0mM共存時と10.0mM共存時で同程度であり、明確な濃度依存性は見られていないこと、また第II編での膜小胞を用いた検討により、セファレキシンは H^+ 勾配による取り込み促進が認められ、かつ、この H^+ 勾配の効果はジペプチドにおいても報告されていること等

を考慮すれば、セファレキシンは一部ジペプチドの輸送系によって吸収される可能性もあり、現段階では明確に結論づけることはできない。

したがって、本研究で得られたfb画分への薬物結合に対するジペプチド高濃度共存時の影響については、今後更に詳細な検討が必要であると思われる。

さらに、このfb画分への結合を薬物濃度を変えて結合能を求めた実験結果において、セファレキシンとアンピシリンでその結合様式に違いが見られたことは、 $20\ \mu\text{M}$ 濃度においてfb画分との結合性が吸収性の差異を一部反映していないことに関して、一つの説明を成し得るものであった。

また、これら薬物のfbへの結合様式は、蛍光性プローブANSの結合に代表される疎水性の相互作用とは異なるものであったこと、さらに、両性イオン型薬物に特異的なものであったことより、解離基の双方がその結合にあずかっている可能性も考えられ、極めて興味ある知見と思われる。

結 論

以上、著者は三編にわたり、アミノβラクタム系抗生物質の消化管吸収機構を明らかにする目的で種々検討した結果を記述したが、以下にこれらを要約する。

I. アミノβラクタム系抗生物質の吸収における相互作用

薬物の吸収機構を解明する目的で、薬物の吸収に及ぼす種々の物質の影響についてIn situ 腸管還流法を用いて検討した。その結果、薬物間相互において吸収抑制効果が認められ、とりわけシクラシリンによる抑制効果は極めて著しいものであった。また、この相互作用は薬物の粘膜組織内への蓄積においても同時に認められ、これらの薬物は組織内への蓄積過程において、何らかの共通した機構を有すると考えられた。

一方、これら薬物の吸収に対してアミノ酸やジペプチドは一部を除き有意な影響を及ぼさなかった。一般に担体輸送系においては、物質の吸収阻害を速度論的に解析する場合、阻害物質の濃度はその K_i 値を考慮して選択しなければ、顕著な阻害効果を観察できないと考えられる。本研究で用いた阻害物質の濃度は、文献値からではあるが、十分にその効果を確認できうる濃度であり、この条件で阻害効果が見られなかったことは、これらアミノ酸やジペプチドの輸送系を介して薬物が吸収される可能性は極めて小さいことが示唆された。加えて、小腸部位を限定して各部位での吸収性を検討した結果、十二指腸、空腸上部でシクラシリンセフラジンの吸収を著しく抑制したのに対し、Gly-Gly は空腸上部においてのみセフラジンの吸収

を阻害したに過ぎなかった。

以上の結果から、薬物個々にみた場合若干の違いはあるとしても、これら一連のアミノβラクタム系抗生物質の吸収における共通した過程には、ジペプチド等の担体輸送系とは異なった機構の存在することが示唆された。

Ⅱ．小腸刷子縁膜小胞を用いた薬物の膜透過性

次に、これら薬物の膜透過における担体輸送系の関与についてさらに詳細に考慮する目的で、小腸刷子縁膜小胞を用いて薬物の取り込みについて検討を加えた。本手法は細胞成分のうち膜系だけを取り出して検討できる点で直接的に膜透過性を考察できる方法であることが認められている。

その結果、従来より担体輸送系の存在が明らかとなっているL-Ala、L-Pheに比べ、検討した薬物はいずれも担体輸送系の存在を示すものではなく、むしろその脂溶性等、物理化学的性質に依存した単純拡散により膜を透過するものであることが強く示唆された。この結果は、第Ⅰ編で得られた結果と合わせて考察した場合、薬物の相互吸収抑制は、担体輸送系とは異なった別の機序を想定しなければ説明し得ないことを示唆するものであった。

Ⅲ．小腸上皮細胞の構成成分への親和性と薬物の吸収機構

薬物の吸収抑制効果が粘膜組織内取り込みにおいても認められたことより、薬物の組織蓄積性と吸収との関連について、ループ吸収実験法、腸管脈管同時還流法を用いて検討を加えた。その結果、

アミノβラクタム系抗生物質はいずれも消化管腔より速やかな消失を示す一方、その2/3近くが組織内に蓄積することが明らかとなった。また、この蓄積はその大半が組織ホモジネート105,000 xg上清（可溶性画分）に由来するものであったことより、この可溶性画分について薬物結合性成分の単離を試みた。その結果、最終的にセファデックスG-50によりゲル濾過を行ない、分離した画分（fb画分）に高い結合活性が見いだされた。また、このものに対する各薬物の結合性は、その吸収実験の結果を良く説明し得るものであった。これらの結果より、このfb画分と薬物の相互作用が、これら薬物の吸収機構において、共通した特性であると考えられた。

即ち、このfb画分との結合性は、小腸組織への薬物の蓄積の大きく寄与していることが認められたが、このことは同時に薬物間相互の吸収抑制効果とfb画分への結合特性が、良く一致していたことによっても裏づけられた。一方、吸収性の劣るmono-basicなβラクタム系抗生物質は、fb画分に対して殆ど結合を示さず、この点からもfb画分との結合性がこれら薬物の吸収性に大きく寄与している要因の一つであることが強く示唆された。

以上、著者は両性イオン型構造を有するアミノβラクタム系抗生物質の消化管からの吸収性を支配する要因に関して種々の検討を行ない、その結果について考察してきたが、想定しうる吸収機構についてFig.33に模式図として示した。

既に述べたように、近年、物質の細胞内移行に際し、ある種の生体高分子が物質の貯蔵、あるいは輸送に大きく寄与する例が多く認められてきた。本研究において得られた薬物とfb画分との結合に関する種々の結果は、こうした薬物の細胞内移行過程を考察するうえで極めて重要な知見であり、薬物の吸収性やbioavailabilityの

評価、並びに消化管吸収機構の解明に、貢献し得るものと考ええる。

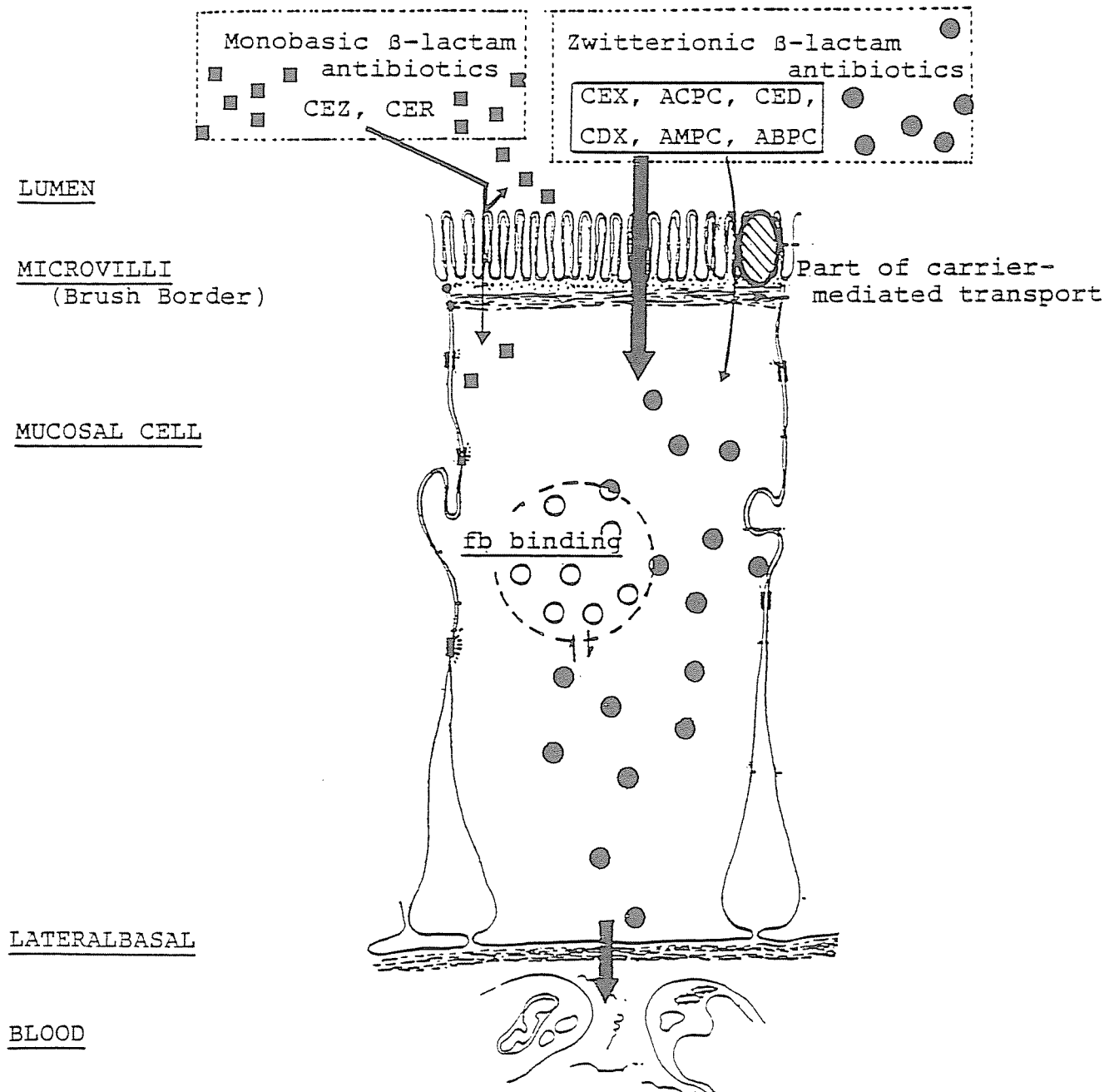


Fig.33 Schematic Diagram of Possible Absorption Mechanism

謝 辞

終りに臨み、本研究に際して終始御懇篤なる御指導、御鞭達を賜
わりました北海道大学 有田隆一教授、並びに北海道大学 石井信
一教授に衷心より深甚なる謝意を表します。

また、種々の有益な御教示と御指導を戴いた北海道大学 宮崎勝
己助教授に深謝いたしますとともに、多くの御助言御鞭達をいただ
きました北海道大学医学部附属病院薬剤部の諸先生方に厚く御礼申
し上げます。

さらに、実験の一部に御協力戴いた宮本美恵学士、家村明宏修士、
世良仁美学士、砂田恭子修士、森 健一修士、古川卓哉学士に深く
感謝いたします。

実 験 の 部

第 I 編 実 験 の 部

[I] 薬物の消化管吸収ならびに他のアミノβラクタム系抗生物質 の影響

(1) 薬物ラット小腸からの吸収と薬物間の吸収抑制

a) 試薬及び試料の調製

アンピシリン (Ampicillin anhydrous)、シクラシリン (Cyclacillin anhydrous) は武田薬品より供与されたもの、アモキシシリン (Amoxicillin trihydrate)、セファレキシン (Cephalexin monohydrate)、セフラジン (Cephhradine dihydrate) はそれぞれ協和発酵、塩野義製薬、三共より供与されたものを用いた。他の薬物、試薬は全て局方品あるいは市販特級品を用い、その溶液は蒸留水 (比抵抗約 $500 \times 10^4 \Omega \cdot \text{cm}$ 以上) にて調製した。通常薬物は Modified Ringer's 溶液に溶解し、試料溶液とした。

b) In Situ 吸収実験法

体重160-220gのWistar系雄性ラットを実験前16~20時間絶食し、エーテル及びペントバルビタール (30-45 mg/kg) で麻酔後固定する。腹部正中線に沿って開腹し幽門部と回盲接合部より10cm手前に

カテーテルを挿入し、結紮する。胆汁の影響を除外するため胆管も同時に結紮しておく。生理食塩水で小腸内を洗浄後、カテーテルを還流ポンプ（東京理化学器械社製ガラス微量定量ポンプ）に接続し、薬物を含まない Modified Ringer's 30 ml で腸管腔内を洗浄する（流速 5.0 ml/min）。次いで、37℃ に加温した薬物試料溶液 50 ml を毎分 5 min の速度で連続還流する。還流開始 10、20、30、45、60 分後または 10、20、30、40、50、60 分後に液溜めより 0.2 ml 採取し、薬物の定量に供した。

尚、アンピシリンの吸収実験では、還流開始 60 分後に腸管内の還流液をできるだけ回収し、次いで生理食塩水で装置及び腸管内を洗浄後、洗液を還流液に加え全量を 100 ml とし定量に供した。吸収量は、原液と回収液中の薬物量の差から算出した。

実験中は、ラット背部をヒーターにて加温し、体温を 37℃ 前後に保った。

c) 薬物の定量法

採取した還流液試料は、それぞれの薬物の内部標準溶液と 1:1 に混合した後、メンブレンフィルター（TM-2, 0.45 μ m, TOYO, Co.,）にて濾過し定量した。

薬物は全て、以下の条件下、UV モニター（日立 638-41 型）を検知器とした高速液体クロマトグラフィー（HPLC）にて分離定量した。

以下にその分析条件を示す。

apparatus : Hitachi 638-50 high performance liquid chromatography

stationary phase : ODS reversed phase column

column temp. : 55°C

flow rate : 0.7 ml/min

detector : Hitachi 638-41 type variable wavelength UV monitor

conditions of mobile phase and wavelength for drug separation :

cephalexin	—————	ERC-ODS (3u, i.d. 6 x 100 mm) column
cephradine		mobile phase; 0.1 M acetate:MeOH (83:17)
cefazolin		pH 6.0
		wavelength; 262 nm
ampicillin	—————	Hitachi #3053 (5u, i.d. 4 x 250 mm) column
cyclacillin		mobile phase; 0.05 M KH ₂ PO ₄ :MeOH (85:15)
		pH 6.0
		wavelength; 210 nm
amoxicillin	—————	Zorbax ODS (5u, i.d. 4.6 x 250 mm) column
cefadroxil		mobile phase; 0.05 M KH ₂ PO ₄ :MeOH (88:12)
		pH 6.0
		wavelength; 210 nm, 262 nm
cephaloridine	—————	Hitachi #3056 (5u, i.d. 4 x 250 mm) column
		mobile phase; 0.1 M acetate:MeOH (7:3)
		pH 6.8
		wavelength; 240 nm

Chart. 1 HPLC Condition on Analysis of β -Lactam Antibiotics

d) 薬物の小腸からの吸収

b) の方法に従って、pH 6.8における各薬物の1時間までの吸収率を経時的に測定した。薬物共存下での吸収抑制実験は、試料濃度 150 μ M、阻害薬物濃度 3.0 mM として試料を調整し、同様の手法にて行なった。結果は総論の部 Fig. 1、Fig. 2、Fig. 3、Fig. 4に示した。

(2) 薬物の消化管組織への蓄積における相互作用

a) 試薬

牛血清アルブミンはSigma社製を用いた。

b) In Situ 吸収実験法による粘膜内蓄積性

[I] - b) に記載した方法に従って、セファレキシン、セフラジンをを用いて30分の還流実験を行なった後、速やかに吸収部位に使用した腸管を摘出した。腸管内を冷生理食塩水で洗浄後、粘膜組織をスライドグラスでかきとり、ホモジナイズ後、生理食塩水にて全容10 mlとし、その2 mlを用いて粘膜中の薬物量を定量した。以下にその方法を示す。

Mucosa suspension(2 ml)

3 ml of MeOH added

stood at 4℃

centrifuged at 12,000xg at 4℃ for 15min

supernatant

filtered through membrane filter(0.45 μ m)

Filtrate

20 μ l injected into HPLC

HPLCの条件は(1) - c) に従い、ホモジネート中の蛋白量は、牛血清アルブミンを標準としてLowry^{10 2)}らの方法により定量した。

粘膜内に蓄積した薬物量は蛋白~~等~~当たりとして求めた。結果は、総論の部 Fig. 5に示した。

〔Ⅱ〕薬物の吸収に及ぼすアミノ酸、ジペプチドの影響

（１）アミノ酸、ジペプチド共存による影響

a) 試薬

グルシルグリシン、L-フェニルアラニルグリシンはSigma社製のもの、L-カルシノンはFluka社製のもの、L-システインは半井化学、L-フェニルアラニンは協和発酵の製品をそれぞれ用いた。またL-ロイシン、L-メチオニン、L-プロリンは和光純薬のものを使用した。

b) 薬物及びL-フェニルアラニンの定量

薬物の定量は〔Ⅰ〕－（１）－c)に記載した方法により定量した。

L-フェニルアラニンの定量はUVモニターを用いたHPLC法によって行なった。固定相はHITACHI GEL #3053カラムを用い、移動相としては、0.05 M リン酸緩衝液：メタノール（85:15, pH 6.0）を使用した。uv測定波長は254 nmとしセフテゾールを内部標準としたピーク高さ比よりL-フェニルアラニンの濃度を求めた。

c) アミノ酸、ジペプチド共存下での薬物の吸収

[I] - (1) - b) に記した方法に従ってジペプチド、アミノ酸共存時におけるセファレキシン、セフラジンの吸収実験を行なった。通常、共存させるアミノ酸は 10 mMとし、ジペプチドは6 mMとした。尚、L-カルノシンについてはその共存濃度を 3.0, 6.0, 10.0 mMと変化させて行なった。

結果は総論の部 Fig. 7、Fig. 8、Fig. 9、Fig.10、Fig.11、Fig. 12に示した。またL-フェニルアラニンの吸収に及ぼすL-メチオニンの影響についてはFig. 6にその結果を示した。

(2) 腸管部位による吸収特異性の比較

[I] - (1) - b) に記載した方法に基づき、ラット小腸部分還流法を行ない、薬物の吸収量を比較した。

吸収部位は幽門直下から10cmを十二指腸部 (duodenum)、そこから約 5 cm離れた次の10cmを空腸上部 (proximal jejunum)、幽門下30cmのところから10cmを空腸下部 (distal jejunum) とし、回腸部 (ileum) としては、回盲接合部より10cm手前までを使用した。

環流液は全腸管連続環流の場合と同濃度の試料 10 mlを用いて、毎分 4 mlの速度で環流する。経時的に採取する試料容積は 0.1 mlとし、[I] に記載した方法により定量に供した。結果は総論の部 Fig.13に示した。

第 II 編 実験の部

[I] 小腸刷子縁膜実験法の検討

(1) 小腸刷子縁膜小胞の調製

a) 試薬

N-2-ヒドロキシピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸 (HEPES) 、トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (Tris) 2- (N-モルホリノ) エタンスルホン酸 (MES) は、いずれも半井化学のもの、バリノマイシンはSigma 社製を用いた。

D- [U-¹⁴ C] グルコース (274mCi/mmol)、L- [U-¹⁴ C] アラニン (165mCi/mmol)、L- [U-¹⁴ C] フェニルアラニン (504mCi/mmol) は R.C.C. Amersham 製を使用し、非放射性の同一試薬で適宜希釈して用いた。

その他の試薬は市販特級、生化学用を使用した。

b) ラット小腸刷子縁膜調製法

刷子縁膜の調整はKessler ら⁴⁷⁾の方法に準じた。体重180-260g のラットをペントバルビタール麻酔下、小腸を摘出し、腸管内外を冷生理食塩水で洗浄し、スライドガラスで粘膜層を剥離する。通常、ラット3, 4匹分の小腸粘膜擦過物に対し 100ml の50 mM-D-mannitolを含む緩衝液にて懸濁し、Waring Blendor (日本精器) を用いてホモジナイズ後、最終 10 mMとなるよう塩化カルシウムを添加し、

刷子縁膜以外の成分を凝集、沈澱させる。次いで、低速遠心により、成分を除き、その上清を高速遠心分離し、刷子縁膜標品 pellet を得た。この pellet に実験に用いる緩衝液を加え、十分に懸濁後、種々の実験に供した。

尚、調製法の概略を Chart. 2 に示す。

Rat intestinal mucosa scraped (3-4 rats)

suspended in 100 ml of 50 mM D-mannitol and 2 mM Tris/HCl
(pH 7.1)
homogenized with Waring blender at 16,500 rpm for 4 min.
added 2 ml of 0.5 M CaCl_2 and left for 20 min
centrifuged at 3,000 xg for 15 min

Supernatant

centrifuged at 27,000 xg for 30 min

Pellet

resuspended in 40 ml of experimental buffer
using Dounce-type homogenizer
centrifuged at 27,000 xg for 30 min

Pellet

resuspended in the experimental buffer with Dounce-type
homogenizer

Brush border membrane vesicles

Chart.2 Procedure for the Preparation of Brush Border Membrane
Vesicles from Rat Intestine

c) 膜酵素活性を指標とした精製度の検定

調製した膜製品の精製度は、刷子縁膜に存在する Alkaline Phosphatase と側底形質膜に局在する $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase の酵素活性を測定することによって確認した。

Alkaline phosphatase 活性の測定は市販測定キット（アルカリ性ホスファテーステストワコー）を用いて行ない、蛋白量当たりの活性値として精製前のホモジネートと比較した。

$\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase の測定は、Proverbio とCastilloの方法^{10 3)}に準拠した。ウバイン添加時（1.0mM）と非常添加時で精製するリン酸を、Fiske-Subbarow法^{10 4)}によって定量し、その差より本酵素活性を測定した。結果は総論の部Table 1に示した。尚、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase測定手順について以下にまとめて示す。

0.1 ml of sample sol.

0.1 ml of 12 mM ouabain or H_2O
1.0 ml of substrate sol (pH 7.5)*
incubation at 37°C for 15 min
8 % trichloroacetic acid 1.0 ml
centrifuged

1.0 ml of supernatant

0.5 ml of 4 N H_2SO_4
0.5 ml of 2.5 % ammonium molybdate
3.0 ml of H_2O
0.1 ml of Reduction reagent**
incubation at 30°C for 15 min

Absorbance at 660 nm

* substrate sol.

4.0 mM ATP·2Na in 100 mM
Tris/HCl (pH 7.5) buffer
containing 6 mM EDTA,
160 mM NaCl, 16 mM KCl,
and 12 mM MgCl_2

** Reduction reagent

1-amino-2-naphthol 0.2 g
-4-sulfonic acid

NaHSO_4 1.2 g

Na_2SO_4 1.2 g

add H_2O total 100 ml

Chart.3 Procedure of $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase Assay

(2) アミノ酸の刷子縁膜小胞内への取り込み

a) 小胞内取り込み実験法

実験方法はHopferらの迅速濾過法⁴⁸⁾に準じた。操作手順の概略をChart. 4に示す。膜小胞サスペンション溶液 (3-4mg/ml protein) は通常、100mM-D-mannitol、20mM-HEPES/Tris(pH 7.5)を用いて調製し、基質溶液 (transport solution) と1:1で混和することにより反応を開始する。一定時間後に8 mlの氷冷した150 mM-NaCl、1 mM- Tris/HCl(pH 7.5)bufferを加え、ただちにメンブレンフィルター (0.45 μ m、2.5cm、Millipore) で濾過する。その後速やかにフィルターを5 mlの氷冷bufferにて洗浄した後、フィルターに捕獲した膜小胞内の基質量を測定する。取り込み量は全て、別途に行なって求めたフィルターへの吸着量を差し引き、膜小胞含有蛋白質当たりの量として示した。

```
100  $\mu$ l of Vesicle suspension
|   preincubation at 25°C
|   100  $\mu$ l of the transport solution at 25°C
|   incubated at 25°C
|   8.0 ml of ice-cold buffer
|       (100 mM NaCl, 1 mM Tris/HCl (pH 7.5))
|   rapidly filtered through the membrane filter
|
Vesicles trapped on the filter
|   washed with 5.0 ml of ice-cold buffer
|
Assay
```

Chart.4 Procedure of the Uptake Experiment into Brush Border
Membrane Vesicles

b) アミノ酸の小胞内取り込み量の測定

[Ⅱ] - (1) - b) にしたがって調整した膜小胞を用いて ^{14}C -標識した L-アラニン、L-フェニルアラニンの取り込みを測定した。方法は (2) - a) に準じた。但し、反応停止に加える氷冷 buffer 中に非標識アミノ酸を添加して使用した。

アミノ酸の定量は取り込み実験後のフィルターを液体シンチレーションカクテル (1%-DP0、0.05%-POP0P in toluene-Triton X-100 (2:1)) に浸し放射活性を測定することにより行なった。結果は総論の部 Fig. 14、Fig. 17 (B) に示した。

[Ⅱ] 薬物の小腸刷子縁膜小胞への取り込み

(1) 薬物の刷子縁膜小胞への取り込み速度の比較

a) 試薬の調製

クエン酸緩衝液は 0.1M クエン酸-ナトリウムと 0.1M-HCl を適当な比率で混合し、それぞれ pH 2.0 (セファレキシン、アンピシリン用)、pH 2.5 (セフラジン用) となる様調製した。

b) 薬物の定量法

小胞に取り込まれた薬物の定量法は、Miyazakiらの方法^{10 5)}に準拠した。[Ⅰ] - (2) - a) の方法に準じて行なった取り込み実験後のフィルターを試験管に投じ蒸溜水 1 ml を加える。次いで

0.1% 過酸化水素を含むクエン酸緩衝液 5 ml を加え沸騰水浴中で加温し、蛍光物質^{10⁻⁸, 10⁻⁷}へと変換させる。加温時間はアンピシリンの場合 40 分、セファレキシンでは 70 分、セフラジンは 55 分とする。その後、流水で冷却後、1 ml の 0.5 M Na₂HPO₄ を添加し、この時点でフィルターを除く。次いで 7 ml のアセトン：クロロホルム (2:3) で蛍光物質を抽出し、有機層の一定量を乾固 HPLC の試料とした。HPLC の条件を Chart. 5 に示す。

stationary phase : HITACHI GEL #3053 (i.d. 4x250mm)
mobile phase : MeOH : H₂O (45:55)
flow rate : 0.7 ml/min
column temperature : 55°C
detector : HITACHI F-1000 fluorometric detector
wavelength : Ex. 345nm , Em. 420nm

Chart. 5 HPLC Condition for Drug Assay Trapped Brush Border Membrane vesicles

c) 薬物の膜小胞への取り込み速度の比較

[I] - (1) - b) 、 [I] - (2) - a) に従ってアンピシリン、セフラジン、セファレキシンの取り込み経時変化を測定した。取り込み平衡値と浸透圧変化の関係を測定する場合には、D-mannitol の代わりに膜不透過性の D-cellobiose を用いて行なった。結果は総論の部 Fig. 15、Fig. 16、Fig. 17、Fig. 18 に示した。

d) 初期取り込みにおける内向き H⁺ 勾配の影響

[I] - (1) - b) 、 [I] - (2) - a) に従って内向きの

H^+ 勾配の影響、及びバリノマイシン添加によって形成される K^+ 拡散電位の効果を測定した。セファレキシンの定量は [II] - (1) - b) に記載した方法に従って行ない、C-グルコースの定量は、[I] - (2) - b) 記載した放射活性の測定方法に準拠した。尚、バリノマイシンの添加量は $20 \mu g / ml$ (最終反応液中) として行った。

結果は総論の部 Fig.19、Table. 2に示した。

第 III 編 実験の部

[I] アミノβラクタム系抗生物質の小腸組織親和性

(1) ラット腸管脈管同時還流法による吸収性と組織への滞留

a) フルオロカーボン溶液はミドリ十字社製 FC- Emulsion を使用した。その組成を Table. 1 に示す。FC- Emulsion、Annex solution A、Annex solution B は使用時、40:3:7 の比で混合し、1M-HCl にて pH 7.4 に調整した。

Table 1 Composition of Fluorocarbon FC-43 Emulsion

FC-43 emulsion	FC-43(perfluorotributylamine)	25.0w/v%
	Pluronic F-68 (polyoxypropylene-polyoxyethylene copolymer)	3.2 w/v%
	in distilled water	
Annex solution A	KCl	0.56w/v%
	NaHCO ₃	3.50w/v%
Annex solution B	NaCl	4.28w/v%
	CaCl ₂	0.20w/v%
	MgCl ₂	0.14w/v%
	Hydroxyethylstarch	21.43w/v%

in pyrogen-free distilled water, autoclave-sterilized.

b) ラット腸管脈管同時還流法

体重200g前後のラットをペントバルビタール麻酔下、腹部正中線に沿って開腹し、幽門より20cm下部の空腸10cmを生理食塩水10mlで洗浄する。次いで、洗浄した腸管近傍に流入する不必要な血管を結紮し、目的部の腸間膜動脈及び静脈を周辺組織より剥離する。頸静脈からヘパリン（0.05 ml、50units）を注入し血液をヘパリン化した後、腸間膜動脈の門脈に近い部位を結紮した後、腸管側の腸間膜動脈にカテーテル（ヒビキポリエチレン細管No.3）を挿入固定する。この際カテーテルは送液ポンプ（東京理化学器械社製マイクロチューブポンプ）に接続しておき、カテーテル先端から血管還流液が流れている状態で挿入し、血管内に空気がはいらない様にする。この状態で一度血管還流液の流速を落とし、腸間膜静脈の門脈に近い方を結紮し、腸管側にカテーテルを挿入した後、流速を元に戻し血管側の還流を開始する。血管還流は通常In Situ一回還流により行ない、流出してきた還流液を10分毎に集め、薬物の定量に供した。腸管腔側はIn situ連続還流法で吸収実験を行なう場合は、第I編、[I]-(1)-b)に記載した方法に準拠し、薬物還流液は10mlとして行なった。また、ループ吸収実験に適用する場合はLevineらの方法^{10,7)}に準じて行なった。

c) 薬物の定量

血管同時還流法を用いた場合の管腔側残存薬物量、組織内蓄積量の定量は、第I編[I]-(1)-c)及び[I]-(2)-b)に記載した方法に従った。血管還流液中の薬物定量は、採取した還

流液を 25,000 xgで20分遠沈した後、その上清2 mlをクロロホルム2 mlと振盪し、遠沈分離して得た水槽をHPLCの試料とした。

d) 薬物の吸収と血管還流

結果は総論の部 Fig.20、Table 3 に示した。

(2) 薬物の吸収性と粘膜組織蓄積性

a) In Situ ループ吸収実験法

吸収実験は、Levineらの方法^{10 5)}に準じた。吸収部位は、空腸部とし、一ヶ所または二ヶ所の10cmループを作成し、薬物溶液(Modified Ringer's 溶液で調製)1 mlをループ内に注入する。一定時間後、小腸ループを摘出し、回収した内容液と洗液を合わせ、全25 mlとした後定量に供した。腸管ループは粘膜を剥離し、ホモジナイズ後、常法に従って各画分に遠沈分離し、それぞれ定量に供した。

b) 薬物の小腸ループからの吸収と組織蓄積

[I] - (2) - a) に記載した方法にしたがって行なった。結果は総論の部 Fig.21、Table 4 に示した。

(3) 薬物の小腸組織内分布の検討

a) 試料の調製

調製は全て 0.1 M-NaCl を含む 10 mMリン酸緩衝液 (pH 7.4) を用いた。

b) 薬物の結合実験法

(i) 限外濾過法

装置はアミコン社の攪拌式限外濾過用セル12型 (10 ml) を用いて透析チューブを装着して行なった。窒素圧は 2-3 Kg/cm²以下とし、37℃に保った状態で濾液を採取し定量に供した。結合量は濾過される前の添加薬物濃度との差より求めた。定量は第I編 [I] - (2) - b) に準拠した。

(ii) ゲル平衡法

Hummelらの方法^{10, 8)} に準拠した。ゲル濾過用の担体は、主にBio-Gel P2(100-200mesh)を道い、一定薬物濃度で平衡化した後、全薬物濃度が平衡薬物濃度と等しくなる様調製した試料を最大2 mlまでカラムに添加する。溶出液を分画 (1.5-2.0ml/tube) し、各tube中の薬物濃度を定量し平衡濃度からの減少分を結合量として算出した。

(iii) 平衡透析法

透析セル (5連式、アベ科学) を用いて行なった。透析膜はspe-

ctrum 社のスペクトラノポア 6 (分画分子量 8,000) を使用し、両サイドの溶液中の薬物量の差から結合量を求めた。通常、試料はマイクロシリンジを用いて高濃度の薬物溶液を小容量 (5-20 μ l) 蛋白試料側に加え、よく攪拌し、37℃に調整した振とう器中で約 120 サイクル/分で振とうし平衡に達させた後、緩衝液側と蛋白試料側の薬物量を第 I 編 [I] - (2) - b) に従って定量した。

c) 薬物の組織成分への結合

ラット小腸粘膜組織ホモジネートを 105,000 xg、1.5 hr の超遠沈分離後、上清、pellet について薬物の結合量を測定した。上清については前項 b) - (ii) に記載した方法に従い、pellet は懸濁させ、更に超遠沈した後の pellet について再懸濁した試料を用いて b) - (i) に従って行なった。結果は総論の部 Fig. 22、Fig. 23 に示した。

[II] 小腸組織可溶性画分の薬物結合成分の単離

(1) 小腸可溶性画分の分離精製

a) 試薬

イオン交換担体は D E A E セルロファイン (AM, 生化学工業) を用い、ゲル濾過用担体はファルマシア社のセファデックス G-75 (superfine) G-50 (fine) を使用した。薬物はアンピシリン、セフラジン、セファレキシン、アモキシシリン、シクラシリン、については、第 I 編、[I] - (1) - a) に記載した各社より提供を受けたもの

を用い

た。尚、セファドロキシル (Cefadroxil monohydrate) は萬有製薬より、セファロリジン (Cephaloridine-Na) は塩野義製薬、セファゾリン (Cefazolin anhydrous) は藤沢薬品より供与されたものを用いた。その他の試薬は全て市販生化学用、又はそれと同等の純度のものを用いた。

b) DEAE イオン交換クロマトグラフィー

DEAE セルロファインカラム (i.d. 1.6 x 70 cm) は 10 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) にて初期平衡化する。ラット小腸組織ホモジネートより得られた 105,000 $\times$ g 上清をカラムへ添加し、初期緩衝液にて非吸着画分を溶出させる。その後 0.5M の KCl を含む 10 mM リン酸緩衝液を用いて吸着画分を溶出させる。流速は通常 40 ml/h に設定し、すべての操作は 4℃で行なう。分画はフラクションコレクターを用いて一定容量ずつ分画し、各 tube 内容について 280 nm における吸光度、蛋白質濃度、セファレキシンの結合活性を測定した。

c) ゲル濾過クロマトグラフィー

[II] - (1) - b) によって得られた薬物結合活性画分 G2 についてセファデックス G-50 カラム (i.d. 2.5 x 65 cm) によるゲル濾過を行なった。DEAE セルロファインカラムにより得られた G2 画分をスペクトラノポア 6 (分画分子量 2,000) チューブを用いて蒸留水中で透析後、凍結乾燥する。凍結乾燥粉末を 0.1 M-NaCl を含む 10mM

リン酸緩衝液 (pH 7.4) に再溶解する。20,000 xg、20分の遠心分離により得た上清をG-50カラムに添加する。溶出は同じ緩衝液で行ない、フラクションコレクターにて分画した各フラクションについて、吸光度、タンパク質量、薬物結合活性を測定した。セファデックスG-75を用いての105,000 xg、上清分離についても同様の方法で行ない目的とする画分を集めて定量に供した。

d) SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法

Swank、Munkres らの方法⁹⁷⁾ に準拠した。泳動装置はディスク電気泳動装置CD-1 (東洋科学産業) を用い、8 cm長のゲル管 (i.d. 5 mm) を使用する。泳動用bufferは 0.1 %-SDS、0.1 M- H_3PO_4 / Tris (pH 6.8) とし、ゲル組成は、アクリルアミド12.5 %、ビス (N,N'- methylene bis acrylamide)、0.625 %となるよう 0.1 % SDS-8MUrea-0.1 M- H_3PO_4 /Tris (pH 6.8) を用いて調製する。通常、試料は1 %-SDS, 8M-urea, 1 %-2-mercaptoethanol を含む 0.01 M - H_3PO_4 /Tris(pH 6.8) に溶解し、泳動ゲルへの添加量は10-30 μ l とし、ゲル当たり 4.5-5 mA で泳動させる。泳動後の染色はクーマシーブリリアントブルーによる蛋白染色法で行ない、分子量既知の蛋白の相対泳動度から分子量を算出した。標準とした分子量既知蛋白は市販の電気泳動用分子測定マーカー (SDS-PAGE Marker III、Fulka, AG.) を用いた。

e) セファレキシン結合成分の分離精製

結果は総論の部 Fig.24、Fig.25、Fig.26に示した。またこれらの

結果を総論の部 Table 5 にまとめて示した。

尚、セファレキシンの活性は $20 \mu\text{M}$ における結合をみることより求めた。

(2) fb画分の薬物結合性

[Ⅱ] - (1) - b), c) に記載した方法に従い、得られたfb画分について、[Ⅰ] - (3) - b), (iii) に記した平衡透析法を用いて各薬物のfb画分への結合性を測定した。通常 $20 \mu\text{M}$ 平衡時での結合活性としてあらわし、スキッチャードプロットを行なう場合は 3から $100 \mu\text{M}$ までの範囲で結合量を求めた。結果は総論の部 Fig.27、Fig.32に示した。

[Ⅲ] fb画分への薬物結合における相互作用と薬物結合特性

(1) 薬物間相互の結合阻害

[Ⅰ] - (3) - b), (iii) に記載した方法に準拠して他薬物共存時でのfb画分への結合量を測定した。共存させる薬物は透析セルの緩衝液側、蛋白試料側の両方に初めから加えて行なった。結果は総論の部 Fig.28、Fig.29に示した。

(2) アミノ酸、ジペプチドの影響

[Ⅲ] - (1) の方法に従ってアミノ酸、ジペプチド共存下での薬物結合活性を測定した。共存させるアミノ酸、ジペプチドは 500

μM 、 2.5 mM を設定し透析セルの両方に共存させた。結果は総論の部 Fig.30、Fig.31に示した。

(3) ANSを用いての高分子結合実験

a) 試薬

ANS-Mg塩は半井化学のものを用いた。

b) ANS結合実験法

結合実験はSugiyamaらの方法⁹⁵⁾に準じた。試料溶液 2 ml を石英製蛍光測定用キュベットに入れ 2 mM あるいは 4 mM ANS溶液をマイクロシリンジにて $5\text{ }\mu\text{l}$ ずつ加え、マグネチックマイクロスターラーで1分間攪拌した後、蛍光強度を測定した。蛍光の測定は日立650-60型分光蛍光光度計を使用し、励起波長 400 nm 、測定波長 480 nm で測定した。測定温度は恒温セルホルダーを用いて 25°C または 37°C に設定した。最終的に加えるANS溶液の全容積は $40\text{ }\mu\text{l}$ までとし、試料容積の2%を超えないようにした。

また、薬物共存下でのANSの結合実験は、タイトレーション法を用いた⁹⁸⁾。試料溶液 2 ml に 2.5 mM ANS溶液を $10\text{ }\mu\text{l}$ 加え、ANS濃度 $12.5\text{ }\mu\text{M}$ における蛍光強度を測定する。次いで、 26.0 mM の薬物溶液を $5\text{ }\mu\text{l}$ ずつ添加し蛍光強度変化を測定した。加えた薬物溶液は全体の3%以下となるようにした。結果は、総論の部、第三編、第三章第3節に記述した。

引用文献

- 1) D.M.Matthews, *Physiol. Rev.*, 55, 537 (1975).
- 2) K.Sigrist-Nelson, H.Murer and U.Hopfer, *J. Biol. Chem.*, 250, 5764 (1975).
- 3) G.Semenza, M.Kessler, M.Hosang, J.Weber and U.Schmidt, *Biochim. Biophys. Acta*, 779, 343 (1984).
- 4) G.Munck, *J. Membrane Biol.*, 83, 1 (1985).
- 5) H.Murer and R.Kinne, *J. Membrane Biol.*, 55, 81 (1980).
- 6) C.I. Cheeseman and G.Johnson, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 60, 1177 (1982).
- 7) A.M.Hoyumpa, Jr., R.Strickland, J.J.Sheehan, G.Yarborough and S.Nicols, *J. Lab. Clin. Med.*, 99, 701 (1982).
- 8) M.Das and A.N.Radhakrishnan, *Biochem. J.*, 146, 133 (1975).
- 9) G.A.Kimmich and J.Randles, *Am. J. Physiol.*, 237, C56 (1979).
- 10) M.Himukai, A.Kameyama and T.Hoshi, *Biochim. Biophys. Acta*, 732, 659 (1983).
- 11) C.A.M.Hogben, D.J.Tocco and B.B.Brodie, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 125, 275 (1959).
- 12) C.Dixon and L.W.Mizen, *J. Physiol.*, 269, 287 (1977).
- 13) E.Nakashima, A.Tsuji, S.Kagatani and T.Yamana, *J. Pharmacobio-Dyn.*, 7, 452 (1984).
- 14) T.Kimura, H.Endo, M.Yoshikawa, S.Muranishi and H.Sezaki, *J. Pharmacobio-Dyn.*, 1, 262 (1978).
- 15) J.F.Quay and L.Foster, *Physiologist, Wash.*, 13, 287 (1970).
- 16) S.Yamashita, Y.Yamazaki, M.Mizuno, M.Masada, T.Nadai, T.Kimura and H.Sezaki, *J. Pharmacobio-Dyn.*, 7, 227 (1984).
- 17) K.Umeniwa, O.Ogino, K.Miyazaki and T.Arita, *Chem. Pharm. Bull.*, 27, 2127 (1979).
- 18) 宮崎勝巳、荻野 修、有田隆一、日本薬学会第99年会講演要旨集 p557(1979).
- 19) K.Miyazaki, O.Ogino, M.Nakano and T.Arita, *Chem. Pharm. Bull.*, 25, 246 (1977).
- 20) J.Nakamura, Y.Yoshizaki, M.Yashuhara, T.Kimura, S.Muranishi and H.Sezaki, *Chem. Pharm. Bull.*, 24, 683 (1976).
- 21) A.Tsuji, E.Nakashima, I.Kagami, T.Asano, R.Nakashima and T.Yamana, *J. Pharm. Pharmacol.*, 30, 508 (1978).
- 22) T.Kimura, M.Yoshikawa, M.Yasuhara and H.Sezaki, *J. Pharm. Pharmacol.*, 32, 394 (1980).
- 23) T.Kimura, T.Yamamoto, M.Mizuno, Y.Suga, S.Kitade and H.Sezaki, *J. Pharmacobio-Dyn.*, 6, 246 (1983).
- 24) T.Kimura, H.Kobayashi and H.Sezaki, *Life Sci.*, 27, 1667 (1980).

- 25) A.Tsuji, E. Nakashima, I.Kagami and T.Yamana, J. Pharm. Sci., 70, 772 (1981).
- 26) E.Nakashima, A.Tsuji, H.Mizuo and T.Yamana, Biochem. Pharmacol., 33, 3345 (1984).
- 27) A.Tsuji, E.Nakashima, T.Asano, R.Nakashima and T.Yamana, J. Pharm. Pharmacol., 31, 718 (1978).
- 28) K.Kakemi, T.Arita and T.Koizumi, Chem. Pharm. Bull., 12, 241 (1964).
- 29) S.G.Schultz, R.E.Fuisz and P.F.Curran, J. Gen. Physiol., 49, 849 (1966).
- 30) 有田隆一、宮崎勝巳; "抗生物質の動態解析"臨床化学の進歩、p109、学会出版センター(1979).
- 31) H.Bundgaard, Arch. Pharm. Chemi. Sci. Ed., 4, 25 (1976).
- 32) A.I.Cohen, P.T.Funke and M.S.Puar, J. Pharm. Sci., 62, 1559 (1973).
- 33) K.Miyazaki, K.Ohtani, K.Umeniwa and T.Arita, J.Pharmacobio-Dyn., 5, 593 (1982).
- 34) B.R.Stevens, J.D.Kaunitz and E.M.Wright, Ann. Rev. Physiol., 46, 417 (1984).
- 35) M.Himukai and T.Hoshi, J. Physiol., 302, 155 (1980).
- 36) B.R.Stevens and E.M.Wright, J. Membrane Biol., 87, 27 (1985).
- 37) H.Murer and G.Burckhardt, Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., 96, 1 (1983).
- 38) S.G.Schultz, L.Yu-Yu and C.K.Strecker, Biochim. Biophys. Acta, 288, 367 (1972).
- 39) M.A. Shotell, M.S.Kilberg and D.L.Oxender, Biochim. Biophys. Acta, 737, 267 (1983).
- 40) J.A.Antonioli, C.Joseph and J.W.L.Robinson, Biochim. Biophys. Acta, 512, 172 (1978).
- 41) C.I.Cheeseman, Can. J. Physiol. Pharmacol., 58, 1236 (1980).
- 42) D.M.Matthews, R.H.Gandy, E.Taylor and D.Burston, Clin. Sci., 56, 15 (1979).
- 43) M.Himukai, A.Kano-Kameyama and T.Hoshi, Biochim. Biophys. Acta, 687, 170 (1982).
- 44) U.Hopfer, K.Nelson, J.Perroto and K.J.Isselbacher, J. Biol. Chem., 248, 25 (1973).
- 45) H.Murer and U.Hopfer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71, 484 (1974).
- 46) U.Hopfer, K.Sigrist-Nelson and R.Groseclose, Biochim. Biophys. Acta, 426, 349 (1976).
- 47) M.Kessler, O.Acuto, C.Strelli, H.Murer, M.Müller and G.Sememza, Biochim. Biophys. Acta, 506, 136 (1978)
- 48) V.Ganapathy, J.F.Mendicino and F.H.Leibach, Life Sci., 29, 2451 (1981).
- 49) V.Ganapathy, J.F.Mendicino, D.H.Passley and F.H.Leibach, Biochem. Biophys. Res. Comm., 97, 1133 (1980).

- 50) V.Ganapathy, J.F.Mendicino and F.H.Leibach, J. Biol. Chem., 256, 118 (1981).
- 51) V.Ganapathy and F.H.Leibach, Life Sci., 30, 2137 (1982).
- 52) K.Sigrist-Nelson, Biochim. Biophys. Acta, 394, 220 (1975).
- 53) A.Berteloot, A.H.Khan and K.Ramaswamy, Biochim. Biophys. Acta, 649, 179 (1981).
- 54) A.Berteloot, A.H.Khan and K.Ramaswamy, Biochim. Biophys. Acta, 686, 47 (1982).
- 55) K.Hayashi, S.Yamamoto, K.Ohe, A.Miyoshi and T.Kawasaki, Biochim. Biophys. Acta, 601, 654 (1980).
- 56) R.C.Beesley and R.G.Faust, Biochem. J., 178, 299 (1979).
- 57) M.Peterlik, R.Fuchs and H.S.Cross, Biochim. Biophys. Acta, 649, 138 (1981).
- 58) B.Stieger, G.Buckhardt and H.Murer, Biochim. Biophys. Acta, 732, 324 (1983).
- 59) J.D.Kaunitz, R.Gunther and E.M.Wright, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 3215 (1982).
- 60) K.Inui, T.Okano, M.Takano, S.Kitazawa and R.Hori, Biochim. Biophys. Acta, 647, 150 (1981).
- 61) K.Inui, T.Okano, M.Takano, S.Kitazawa and R.Hori, Biochem. Pharmacol., 32, 621 (1983).
- 62) K.Inui, T.Okano, M.Takano, H.Saito and R.Hori, Biochim. Biophys. Acta, 769, 449 (1984).
- 63) M.Takano, K.Inui, T.Okano and R.Hori, Life Sci., 37, 1579 (1985).
- 64) K.Inui, T.Okano, M.Takano and R.Hori, J. Pharmacol. Exp. Ther., 233, 181 (1986).
- 65) T.Kimura, T.Yamamoto, R.Ishizuka and H.Sezaki, Biochem. Pharmacol., 34, 81 (1985).
- 66) T.Okano, K.Inui, M.Takano and R.Hori, Biochem. Pharmacol., 35, 1781 (1986).
- 67) K.Sigrist-Nelson, H.Murer and U.Hopfer, J. Biol. Chem., 250, 5674 (1975).
- 68) R.Hori, M.Takano, T.Okano, S.Kitazawa and K.Inui, Biochim. Biophys. Acta, 692, 97 (1982).
- 69) M.Takano, K.Inui, T.Okano, H.Saito and R.Hori, Biochim. Biophys. Acta, 773, 113 (1984).
- 70) V.Ganapathy and F.H.Leibach, J. Biol. Chem., 258, 14192 (1983).
- 71) V.Ganapathy, G.Burckhardt and F.H.Leibach, J. Biol. Chem., 259, 8954 (1984).
- 72) D.Miller and R.K.Crane, Anal. Biochem., 2, 284 (1964).
- 73) Y.Takesue and R.Sato, J. Biochem., 64, 885 (1968).
- 74) J.Shumitz, H.Preiser, D.Maestrci, B.K.Ghosh, J.J.Cerda and R.K.Crane, Biochim. Biophys. Acta, 323, 98 (1973).
- 75) C.Evers, W.Haase, H.Murer and R.Kinne, Membrane Biochem., 1, 203 (1978).

- 76) E.D.Purich, J.L.Colaizzi and R.I.Poust, J. Pharm. Sci., 62, 545 (1973).
- 77) A.Tsuji, E.Nakashima and T.Yamana, J. Pharm. Sci., 68, 308 (1979).
- 78) W.H. Streng, J. Pharm. Sci., 67, 666 (1978).
- 79) 山下伸二、第3回 生物薬剤学研究会講演要旨集 p31(1985).
- 80) S.Yamashita, Y.Yamazaki, M.Masada, T.Nadai, T.Kimura and H. Sezaki, J. Pharmacobio-Dyn., 9, 368 (1986).
- 81) R.J.Metz and N.S.Radin, J. Biol. Chem., 257, 12901 (1982).
- 82) A.J.Levi, Z.Getmantan and I.M.Arias, J. Clin. Invest., 48, 2156 (1969).
- 83) R.K.Ockner and J.A.Manning, J. Clin. Invest., 54, 326 (1974).
- 84) R.C.Strange, I.A.Nimmo and I.W.Percy-Robb, Biochem. J., 162, 659 (1977).
- 85) E.J.Friedlander, I.W.Caras, L.F.Hou Lin and K.Bloch, J. Biol. Chem., 255, 8042 (1980).
- 86) D.M.Davies, H.H.Liem, E.F.Johnson and U.Muller-Eberhard, Biochem. J., 202, 211 (1982).
- 87) R.J.Cook and C.Wagner, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 3631, (1984).
- 88) Y.Sugiyama, T.Yamada and N.Kaplowitz, J. Biol. Chem., 258, 3602 (1983).
- 89) H.Ochsenfahrt and D.Winne, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 281, 197 (1974).
- 90) P.M.Savina, A.E.Staubus, T.S.Gaginella and D.F.Smith, J. Pharma. Sci., 70, 239 (1981).
- 91) K.Miyazaki, K.Sunada, K.Iseki and T.Arita, Chem. Pharm. Bull., 34, 3830 (1986).
- 92) Y.Sugiyama, T.Iga, S.Awazu and M.Hanano, Biochem. Pharmacol., 29, 2063 (1980).
- 93) B.Ketterer, E.Tipping, J.F.Hackney and D.B.Eale, Biochem. J., 155, 511 (1980).
- 94) Y.Sugiyama, T.Yamada and N.Kaplowitz, Biochem. J., 203, 377 (1982).
- 95) Y.Sugiyama, A.Stolz, J.M.Hershman and N.Kaplowitz, Biochim. Biophys. Acta, 801, 184 (1984).
- 96) J.J.Feher, Am. J. Physiol., 244, C303 (1983).
- 97) R.T.Swank and K.D.Munkres, Anal. Biochem., 39, 462 (1970).
- 98) C.F.Chingnell, Method in Pharmacol.(Ed. by C.F.Chingnell) Vol.2, p.33, Appleton-Century-Crofts, N.Y. (1972).
- 99) D.R.Ferguson, E.K.Matthews and D.Burston, Clin. Sci. Mol. Med., 46, 707 (1974).
- 100) D.M.Matthews, FRCPath and S.A.Adibi, Gastroenterology, 71, 151 (1976).
- 101) J.M.Addison, D.M.Matthews and D.Burston, Clin. Sci. Mol. Med., 46, 707 (1974).

- 102) O.H.Lowry, N.J.Rosebrough. A.L.Farr and R.J.Randall, J. Biol. Chem., 193, 265 (1951).
- 103) F.Proverbio and J.R.Del Castillo, Biochim. Biophys. Acta, 646, 99 (1981).
- 104) C.H.Fiske and Y.Subbarow, J. Biol. Chem., 66, 375 (1925).
- 105) K.Miyazaki, K.Ohtani, K.Sunada and T.Arita, J. Chromatogr., 276, 478 (1983).
- 106) M.J.Lebelle, A.Vilim and W.L.Wilson, J. Pharm. Pharmacol., 31, 441 (1979).
- 107) R.H.Barbhaiya, R.C.Brown, D.W.Payling and P.Turner, J. Pharm. Pharmacol., 30, 224 (1978).
- 108) R.R.Levine and E.W.Pelinken, J. Pharmacol. Exp. Ther., 131, 319 (1961).
- 109) J.P.Hummel and W.J.Dreyer, Biochim. Biophys. Acta, 63, 530 (1962).