

# 博 士 論 文

皮膚に発現する P-gp と BCRP の経皮基質吸収

及び皮膚炎抑制への関与

金沢大学大学院医薬保健学総合研究科

創薬科学専攻

分子薬物治療学研究室

学 籍 番 号 1429012007

氏 名 橋本 直人

主任指導教員名 加藤 将夫

## 目次

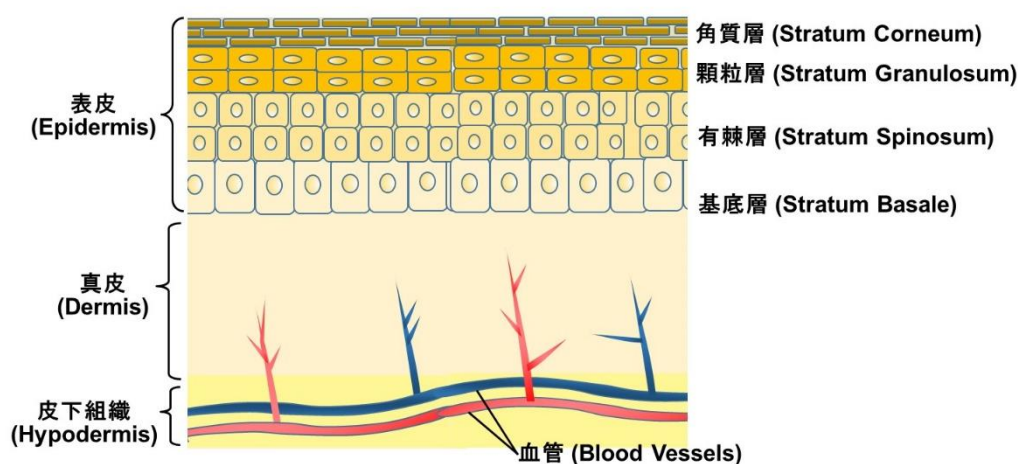
略語及び記号一覧 .....	3
第1章 序論 .....	4
第2章 典型基質の経皮吸収に対する P-gp 及び BCRP の関与 及びそれらを標的とした基質の皮内動態制御 .....	9
第1節 緒言 .....	9
第2節 実験方法 .....	12
第3節 結果 .....	19
第4節 考察 .....	29
第3章 P-gp を介した外用ステロイドの経皮吸収機構 .....	37
第1節 緒言 .....	37
第2節 実験方法 .....	39
第3節 結果 .....	45
第4節 考察 .....	54
第4章 Oxazolone 誘発皮膚炎における P-gp と BCRP を介した histamine の 皮内蓄積及び搔破行動の抑制 .....	60
第1節 緒言 .....	60
第2節 実験方法 .....	63
第3節 結果 .....	71
第4節 考察 .....	80
第5章 総括 .....	84
引用文献 .....	86
Supplementary Tables .....	97
謝辞 .....	115
参考文献 .....	116

略語及び記号一覧

ABC	ATP binding cassette
AP	Apical
BCRP	Breast cancer resistance protein
BL	Basal
BSA	Bovine serum albumin
CE-TOFMS	Capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry
CSA	D-Camphol-10-sulfonic acid
CYP	Cytochrome P450
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ER	Efflux ratio
FBS	Fetal bovine serum
Hdc	Histidine decarboxylase
Hnmt	Histamine <i>N</i> -methyltransferase
HPLC	High performance liquid chromatography
Ifn- $\gamma$	Interferon ganmma
$K_p$	組織-血漿間分配比
$K_{ps}$	表皮-真皮間分配比
LC/MS/MS	Liquid chromatography - tandem mass spectrometry
Mao	Monoamine oxidase
MDR1	Multidrug resistance protein 1
MES	2-Morpholinoethanesulfonate
MRP	Multidrug resistance associated protein
N.D.	Not detected
OCT	Organic cation transporter
OCTN	Carnitine/organic cation transporter
$P_{app}$	透過係数
PDMS	poly-dimethylsiloxane
PEPT	Oligopeptide transporter
P-gp	P-glycoprotein
Rho	Rhodamine
RT-PCR	Real time polymerase chain reaction
S.E.M.	Standard error of the mean
SGLT2	Sodium glucose co-transporter 2
URAT1	Urate transporter
36B4	Acidic ribosomal phosphoprotein P0

## 第1章 序論

皮膚は生体からの水分蒸散及び外界からの異物の侵入を防ぐ物理的及び生理的バリアとして機能し、生体の恒常性維持を担っている (Proksch *et al.*, 2008)。また、皮膚はその表面から表皮、真皮及び皮下組織の3層からなり、表皮はさらに皮膚表面から角質層、顆粒層、有棘層及び基底層の4層に分けられる (Fig. 1)。この内、皮膚最外層である角質層は、脱核したケラチノサイトとその周囲を細胞間脂質が満たす層であり、皮膚の物理的バリアを担っている (Elias, 1983; Madison *et al.*, 1987)。そのため、角質層の破綻は生体からの過剰な水分蒸散やアレルゲンの皮膚内侵入を引き起こし、アトピー性皮膚炎や乾皮症の発症要因となる (Ghadially *et al.*, 1995; Palmer *et al.*, 2006; Nomura *et al.*, 2008; Danby *et al.*, 2016)。また、角質層の物理的バリアは生体の恒常性維持に限らず、薬物の経皮吸収においても大きな障壁になることから、経皮吸収性改善を目的としてこれまでに様々な角質層の薬物透過性促進技術が開発されている (Schoellhammer *et al.*, 2014)。一方、表皮の基底層には薬物代謝酵素や薬物トランスポーターの発現も確認されており、物理的バリアに加えて、それらが構成する生物学的バリアも存在する (Baron *et al.*, 2001; Schiffer *et al.*, 2003; Ahmad *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2005; Svensson, 2009; Heise *et al.*, 2010)。そのため、薬物の皮内動態や皮膚の恒常性維持に対して、生物学的バリアと物理的バリアが協奏的に関与している可能性があるが、生物学的バリアの影響は十分に解明されていない。



**Fig. 1 The structure of skin.**

基質の細胞外排出を担う ABC トランスポーターである P-gp 及び BCRP は、血液脳関門、小腸、肝臓などの臓器に発現し、様々な医薬品の体内動態を制御している (Maliepaard *et al.*, 2001; Marzolini *et al.*, 2004; Mao *et al.*, 2015)。一方、皮膚においても、P-gp 及び BCRP はマウス及びヒト表皮ケラチノサイトに発現する (Sleeman *et al.*, 2000; Baron *et al.*, 2001; Triel *et al.*, 2004; Yano *et al.*, 2005) とともに、P-gp はヒト皮膚組織において表皮や毛包などの皮膚付属器官に発現している (Skazik *et al.*, 2011)。さらに、P-gp の基質である Rho123 及び itraconazole を経皮投与後の皮膚中濃度は、野生型 (wild-type) マウスに比べて P-gp ノックアウト (*Mdr1a/1b*<sup>-/-</sup>) マウスで低下することから、P-gp が経皮投与後の基質の皮膚移行に関与することが示されている (Ito *et al.*, 2008)。また、Li らは MRP1 が fluo3 及び grepafloxacin の皮膚からの排泄に寄与することを (Li *et al.*, 2005)、Heise らはヒト表皮ケラチノサイトにおいて、MRPs が eugenol などのアレルゲンやステロイドホルモンの細胞外排出に寄与すること (Heise *et al.*, 2010) を報告しており、様々なトランスポーターが薬物の経皮吸収に関与することが示唆されている。しかし、いずれの報告も経皮投与後の皮内分布のみの解析や、単離皮膚組織あるいは単離細胞を用いた動態解析であり、これらのトランスポーターが

*in vivo* で基質の経皮吸収に及ぼす影響は明らかになっていない。そこで、第2章及び第3章では、皮膚以外の臓器で薬物の体内動態に対する関与が最も明らかになっており、皮膚にも発現する P-gp 及び BCRP に着目し、両トランスポーターが基質の経皮吸収に及ぼす影響を検討した。まず、第2章では P-gp と BCRP が典型基質の経皮吸収に及ぼす影響を明らかにするため、wild-type、*Mdr1a/1b*<sup>-/-</sup> 及び P-gp/BCRP ノックアウト (*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>) マウスを用いて、Rho123 の *in vivo* 経皮投与実験を行い、皮膚及び血漿中濃度を評価した。また、トランスポーターを介した経皮吸収機構を考察するため、免疫染色を行い、マウス及びヒト皮膚における両トランスポーターの発現部位を検討した。さらに、両トランスポーターの阻害剤を用いた *in vivo* 経皮投与実験を実施し、基質の皮内動態制御も試みた。第3章では、外用薬の経皮吸収に対する P-gp 及び BCRP の関与を明らかにするため、アトピー性皮膚炎の第1選択薬として使用される外用ステロイドについて、wild-type 及び *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> マウスを用いた *in vivo* 経皮投与実験及び点滴静注実験を行い、経皮投与時及び静注時におけるステロイドの皮内動態を評価した。また、P-gp 及び BCRP による外用ステロイドの輸送を確認するため、両トランスポーターの安定発現細胞を用いた経細胞輸送実験も実施した。

トランスポーターは薬物のみならず、内因性の生理活性物質の輸送も担い、その組織又は細胞内濃度を制御することで、生体の恒常性維持に寄与している。そのため、一部のトランスポーターについては機能異常と疾患との関係が明らかになっている。例えば、BCRP は消化管において尿酸の排泄を担っているため、その機能低下は高尿酸血症の発症原因の1つと考えられている (Ichida *et al.*, 2012)。また、OCTN2 は脂肪酸代謝の必須分子であるカルニチンの細胞内取り込みを担うため、その機能欠損は全身性カルニチン欠乏症を引き起こす (Nezu *et al.*, 1999)。さらに、一部の皮膚

疾患においてもトランスポーターの機能異常との関連が報告されている。例えば、ABCA12 はヒト表皮ケラチノサイトに発現して脂質の細胞外分泌に関与するが、致死性皮膚疾患である道化師様魚鱗癬の患者の多くは、ABCA12 の機能低下につながる変異を有している (Akiyama *et al.*, 2005)。そのため、ABCA12 の機能低下は道化師様魚鱗癬の発症原因の 1 つと推察されている。実際に、ABCA12 ノックアウトマウスは、皮膚の過角化や亀裂など道化師様魚鱗癬に似た皮膚症状を発症する (Yanagi *et al.*, 2008)。また、BCRP ノックアウト (*Bcrp*<sup>-/-</sup>) マウスは wild-type マウスに比べて、光毒性物質である pheophorbide a に対する感受性が増加しており、pheophorbide a の経口摂取後に光線過敏症に似た皮膚炎症状を示す (Jonker *et al.*, 2002)。さらに最近、Chang らは *Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスの創傷部位ではケラチノサイトの分化や増殖が低下し、創傷の治癒が遅れることを報告している (Chang *et al.*, 2016)。以上のように、トランスポーターは皮膚においても恒常性維持に寄与し、その機能異常は皮膚疾患につながる可能性がある。しかし、P-gp については皮膚疾患に及ぼす影響は明らかになっておらず、また BCRP についても創傷治癒以外の病態における役割は解明されていない。そこで、第 4 章では、P-gp 及び BCRP の機能低下が皮膚疾患に及ぼす影響を明らかにするため、代表的な皮膚疾患であるアトピー性皮膚炎に類似した皮膚炎を誘発する oxazolone を wild-type 及び *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスに反復塗布し、皮膚炎の推移及び重症度を比較した。また、両トランスポーターが皮膚炎に関与するメカニズムを明らかにするため、oxazolone 反復塗布後の両マウスの皮膚及び血漿を用いて、メタボローム解析を実施した。次に、P-gp 及び BCRP 安定発現細胞を用いた histamine の細胞内取り込み実験を実施するとともに、oxazolone 反復塗布後のマウス皮膚における histamine 生合成及び代謝酵素の遺伝子発現量を評価した。最後に、oxazolone 塗布

後のマウス炎症皮膚に加えて、アトピー性皮膚炎及び乾癬の患者皮膚における P-gp 及び BCRP の遺伝子発現量も評価した。

本研究は、基質の経皮吸収及び皮膚炎に対する P-gp と BCRP の役割の解明を目的とした。薬物の経皮吸収はこれまで角質層の透過が最大の障壁と考えられてきたため、トランスポーターの関与は考えられておらず、単純拡散に基づいて説明されてきた (Mitragotri *et al.*, 2011)。しかし、皮膚においても *in vitro* ではトランスポーターが基質の皮膚透過や皮膚細胞からの排出に関与することが示されており、薬物の経皮吸収に対する関与が示唆されている (Li *et al.*, 2005; Ito *et al.*, 2008; Heise *et al.*, 2010)。また、P-gp 及び BCRP は様々な薬物を基質として認識することから、経口薬などではそれらを標的にした体内動態制御も試みられている (Yamagata *et al.*, 2007; Callaghan *et al.*, 2014)。そのため、*in vivo* での経皮吸収に対する P-gp と BCRP の役割の解明は、外用薬や化粧品における経皮吸収機構の更なる解明及びその制御につながる有用な知見を与える可能性がある。また近年、高尿酸血症 (Ichida *et al.*, 2012) や全身性カルニチン欠乏症 (Nezu *et al.*, 1999) のようにトランスポーターの機能異常との関係が明らかとなった疾患が報告されており、皮膚においてもトランスポーターの機能異常が疾患の発症につながる可能性がある。したがって、本研究により皮膚疾患と薬物トランスポーターとの関係が解明されることにより、皮膚疾患における薬物治療に有用な知見が得られることが期待される。



## 第2章 典型基質の経皮吸収に対する P-gp 及び BCRP の関与 及びそれらを標的とした基質の皮内動態の制御

### 第1節 緒言

薬物の経皮投与は適用面積の広さに加え、投与及びその中断が簡便であること、初回通過効果を回避できること、さらには血中濃度の維持が可能であることなど、経口投与や静脈内投与に比べて、様々なメリットを有している (Prausnitz *et al.*, 2008)。そのため、経皮投与は皮膚疾患に対する局所外用薬のみならず、全身作用を期待する医薬品においても有用な投与経路として注目されている。しかし、皮膚は生体からの水分蒸散と外界からの異物の侵入を防ぐ物理的及び生物的バリアとして機能するため、薬物の経皮吸収に対しても大きな障壁になる (Proksch *et al.*, 2008)。また、皮膚の物理的バリアは皮膚最外層の角質層が担っているため、角質層の物理的バリアの回避を目指して、これまでに様々な経皮吸収促進技術が開発されている (Schoellhammer *et al.*, 2014)。一方、皮膚には薬物代謝酵素や薬物トランスポーターが発現し、それらが構成する生物的バリアも存在する (Baron *et al.*, 2001; Schiffer *et al.*, 2003; Ahmad *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2005; Svensson, 2009; Heise *et al.*, 2010)。そのため、薬物の経皮吸収に対して、物理的バリアのみならず生物的バリアも関与する可能性があるが、生物的バリアの影響は十分に解明されていない。

薬物トランスポーターである P-gp 及び BCRP は血液脳関門、小腸、肝臓や胎盤など様々な臓器に発現し、数多くの医薬品の体内動態に関与している (Maliepaard *et al.*, 2001; Marzolini *et al.*, 2004; Mao *et al.*, 2015)。一方、P-gp 及び BCRP は皮膚にも発現している (Sleeman *et al.*, 2000; Baron *et al.*, 2001; Triel *et al.*, 2004; Yano *et al.*, 2005; Skazik *et al.*, 2011)。さらに、Itoらは P-gp の基質である Rho123 及び itraconazole を経皮投与後の皮膚中濃度は wild-type マウスに比べて、*Mdr1a/1b*<sup>-/-</sup>マウスで低下す

ることを示し、P-gp が経皮投与後の基質の皮膚移行に関与することを報告している (Ito *et al.*, 2008)。また、*Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスでは wild-type マウスに比べて、光増感剤である pheophorbide a に対する感受性が増加し、ポルフィリン症に類似した皮膚の光線過敏症を発症することが知られている (Jonker *et al.*, 2002)。しかし、P-gp については経皮投与後の皮内分布のみの解析であり、BCRP については *in vivo* で基質の経皮吸収における役割は明らかになっていない。そのため、P-gp 及び BCRP の皮膚における発現や経皮吸収に対する寄与を明らかにすることは重要である。特に両トランスポーターは広い基質認識性を有することから、そのような知見は外用薬や化粧品の経皮吸収に関して、重要な知見を与える可能性がある。

これまでに角質層の透過を改善するため、経皮吸収促進剤、エレクトロポレーションやイオントフォレーシスなど、様々な経皮吸収促進技術が開発されている (Prausnitz *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2012)。しかし、これらの技術はいずれも角質層の透過に焦点を絞った技術であり、角質層を透過後の薬物の皮内動態を制御する技術は検討されていない。一方、皮膚疾患には、表皮に病巣を有する基底細胞癌など、皮膚内の特定部位に病巣を有する疾患も存在する。そのため、皮膚の疾患部位選択的な薬物送達技術は、さらなる薬効の持続や最大化、副作用の軽減を可能にする有用な皮内動態制御法になることが期待される。さらに、P-gp 及び BCRP は幅広い基質認識性を有していること、さらに皮膚での発現が確認されていることから、それらの機能を制御することで、薬物の皮内動態を制御できる可能性が期待される。

そこで本章では、P-gp 及び BCRP が *in vivo* で基質の経皮吸収に及ぼす影響を明らかにするとともに、両トランスポーターの機能制御による基質の皮内動態制御を試みた。まず、トランスポーターが基質の経皮吸収に及ぼす影響を評価するため、

wild-type マウス、*Mdr1a/1b*<sup>-/-</sup>マウス及び *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスに Rho123 の経皮投与及び点滴静注を行い、皮膚及び血漿中濃度を評価した。併せて、Ussing-type chamber を用いた *in vitro* 皮膚透過実験も行い、wild-type 及び *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスにおける Rho123 の皮膚透過性を評価した。また、マウス及びヒト皮膚の免疫染色を行い、両トランスポーターの発現部位も検討した。さらにトランスポーターの阻害剤を用いて、Rho123 を経皮投与時の皮内動態制御も試みた。

## 第2節 実験方法

### 2-2-1. 試薬

Rho123 及び inulin は Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan) より、itraconazole は LKT Laboratories Inc. (St. Paul, MN) より、Rho6G は Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan) よりそれぞれ購入した。抗 mouse/human P-gp ポリクローナル抗体 (clone; C19) 及び抗 mouse CD31 ポリクローナル抗体 (clone; M-20) は Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA) より、抗 mouse/human BCRP モノクローナル抗体 (clone; BXP-53) は Thermo Fisher Scientific Inc. (Malvern, PA) より、抗 human CD31 モノクローナル抗体 (clone; JC/70A) は Dako Inc. (Carpinteria, CA) より、抗 human keratin5 ポリクローナル抗体 (clone; Poly19055) 及び抗 human keratin10 ポリクローナル抗体 (clone; Poly19054) は Covance Inc. (Princeton, NJ) よりそれぞれ購入した。その他の試薬はすべて特級試薬を用いた。

### 2-2-2. 実験動物

FVB/NJcl マウス (wild-type、雄性、7~9 週齢) は CLEA Japan Inc. (Tokyo, Japan) より、*Mdr1a/1b*<sup>-/-</sup> 及び *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> マウス (雄性、7~9 週齢) は Taconic Biosciences Inc. (Hudson, NY) より購入した。動物は標準食で飼育し、水及び食餌は自由摂取とした。すべての動物実験はマルホ株式会社及び金沢大学の動物実験指針に従って実施した。

### 2-2-3. マウスの除毛

*In vivo* 経皮投与実験及び Ussing-type chamber 法による皮膚透過実験時には、実

験開始 72 時間前にマウスの除毛を行った。ペントバルビタールナトリウム (ソムノペンチル、共立製薬、64.8 mg/mL) の皮下投与 (1.3  $\mu$ L/g weight) による麻酔下で、動物用バリカン (HAIR CLIPPER MODEL 6000AD, THRIVE, Osaka, Japan) を用いて、体毛を除毛した。続いて、除毛クリーム (エピラット除毛クリーム E、カネボウホームプロダクツ) を体部に塗り、5 分後に温水で洗い流した。その後、再度、除毛クリームを体部に塗り、2 分後に温水で洗い流し、体毛を完全に除去した。

#### **2-2-4. In vivo 経皮投与実験**

経皮投与実験は Ito らの方法を参考に実施した (Ito *et al.*, 2008)。ジエチルエーテル吸入麻酔下でセロテープ (Nichiban Co. Ltd., Tokyo, Japan) を用いて、マウスの脇腹皮膚の角質層を剥離した。Rho123 溶液 (0.4 mg/mL) 又は Rho123/itraconazole 混液 (それぞれ 0.4 mg/mL 及び 1 mmol/L) 100  $\mu$ L を染み込ませたパッチ (直径 16 mm, Torii Pharmaceutical Co. Ltd., Tokyo, Japan) を脇腹皮膚に 1 枚貼付し、その上からエラストポアを巻き付けた。なお、投与液は Rho123 及び itraconazole をそれぞれ DMSO に溶かした後、生理食塩水を用いて 100 倍希釈して調製した。投与後 6 時間にジエチルエーテル吸入麻酔下で尾静脈より、ヘパリン処理済毛細管を用いて採血後、遠心 (1500  $\times$  g, 10 min, 4°C) して血漿を採取した。また採血後、70%エタノールを含ませたティッシュで投与部位の皮膚を拭き、皮膚を採取した。表皮及び真皮中 Rho123 濃度の評価時には、Surber らの方法を参考に、採取した皮膚を表皮及び真皮に分離した (Surber *et al.*, 1990)。採取した皮膚をアルミホイルで包み、55°C に温めたガラスシャーレで 1 分間挟んだ後、18G の注射針を用いて皮膚表面をこそぎとり、表皮を採取した。また、表皮採取後の試料を真皮として回収した。採取した試料はすべて分析時ま

で-30°Cで保存した。

#### **2-2-5. Ussing-type chamber 法による皮膚透過実験**

皮膚透過実験は Ito らの方法を参考に実施した (Ito *et al.*, 2007)。セロテープを用いてマウスの腹部皮膚の角質層を剥離後、皮膚を採取した。皮膚は ice-cold HBSS (pH 7.4) で洗浄し、Ussing-type chamber (有効透過面積: 0.766 cm<sup>2</sup>) に挟んだ後、donor 側に 37°C で加温した Rho123/inulin 混液 (それぞれ 0.5 μmol/L 及び 10 mg/mL; HBSS, pH 7.4) を、receptor 側には 37°C で加温した HBSS (pH 7.4) をそれぞれ 1.2 mL ずつ添加して透過実験を開始した。なお、吸収方向の透過を評価した際は表皮側が donor 側に、排泄方向の透過を評価した際は皮下組織側が donor 側になるように皮膚を chamber に挟んだ。また、Rho123 の皮膚透過阻害実験においては、表皮側に itraconazole (10 μmol/L) を添加した。なお、透過実験中は donor 側及び receptor 側のセルにそれぞれ O<sub>2</sub> ガスを通気した。実験開始後 5、30、60、120、180 及び 240 分に receptor 側から試料溶液 300 μL を採取し、37°C に加温した HBSS (pH 7.4) を同量補充した。採取した試料溶液は分析時まで -30°C で保存した。Rho123 及び inulin の透過係数 (μL/cm<sup>2</sup>) は累積透過量 (pmol/cm<sup>2</sup> 又は mg/cm<sup>2</sup>) を投与液の初期濃度 (μmol/L 又は mg/mL) で除して算出した。

### 〈Hanks' Balanced salt solution (HBSS, pH 7.4)〉

NaCl	136.7 mmol/L
KCl	5.36 mmol/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.441 mmol/L
D-Glucose	25 mmol/L
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.952 mmol/L
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.812 mmol/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	0.385 mmol/L
HEPES	10 mmol/L
NaHCO <sub>3</sub>	4.17 mmol/L

#### **2-2-6. *In vivo* 静脈内定速注入実験**

Rho123 溶液 (7.6 mg/mL) を 40 pmol/min にてマウス頸静脈より静脈内投与した。投与液は Rho123 を生理食塩水に溶解して調製した。静脈内投与開始後 30、60、120、150、180 及び 210 分に尾静脈よりヘパリン処理済毛細管を用いて採血し、遠心 (1500×g, 10 min, 4°C) して血漿を採取した。また、投与開始後 210 分では採血後、皮膚及び脳を採取した。採取した試料はすべて分析時まで-30°C で保存した。Rho123 の  $K_p$  は各組織中 Rho123 濃度を静脈内投与後 120 分から 210 分における平均血漿中濃度で除して算出した。

#### **2-2-7. 試料中 Rho123 濃度測定**

Iqbal らの方法を参考にして、以下の方法で試料中 Rho123 濃度を定量した (Iqbal *et al.*, 2005)。

### **2-2-7-1. 皮膚組織及び脳の前処理**

皮膚組織及び脳は重量を測定後、10 当量 (w/v) の移動相、1/100 当量 (w/v) の HBSS (pH 7.4) 及び内標準物質 (10  $\mu\text{mol/L}$  Rho6G) 溶液をそれぞれ添加した。氷冷下ではさみを用いて試料を裁断後、ポリtronホモジナイザー (T-10 basic ULTRA-TURRAX, IKA, Staufen, Germany) で破碎し、遠心 (12000 $\times g$ , 10 min, 4°C) して上清 20  $\mu\text{L}$  を回収した。回収した上清に移動相 80  $\mu\text{L}$  を添加して1分間攪拌後、再度同様に遠心し、上清 20  $\mu\text{L}$  を回収した。回収した上清は移動相で10倍希釈後、HPLC分析に供した。

### **2-2-7-2. 血漿及び receptor 試料の前処理**

血漿試料及び receptor 試料 10  $\mu\text{L}$  に HBSS (pH 7.4) 10  $\mu\text{L}$  及び 1  $\mu\text{mol/L}$  Rho6G 溶液 5  $\mu\text{L}$  を添加後、酢酸エチル 900  $\mu\text{L}$  と 1-ブタノール 100  $\mu\text{L}$  を添加した。試料は1分間攪拌後、遠心 (12000 $\times g$ , 10 min, 4°C) し、有機層を回収した。有機層はエバポレーターを用いて 50°C で乾固後、移動相に再溶解して HPLC 分析に供した。

### **2-2-7-3. HPLC 測定条件**

Instrument: LC-10A series (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan)

Column: COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-AR-II

(5  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm  $\times$  150 mm; Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan)

Mobile Phase: 20 mmol/L sodium acetate (pH 4.0) : 1.5 mmol/L tetra butylammonium bromide): methanol = 2:3:15 (v/v/v)

Fluorescent Detection: 498 nm/525 nm (excitation/emission)



Flow Rate: 1 mL/min

Column Temperature: 40°C

#### **2-2-8. Receptor 試料中 inulin 濃度の定量**

Frier らの方法を参考に比色法を用いて定量した (Frier *et al.*, 1969)。Receptor 試料 25  $\mu$ L を 96 穴プレートにとり、塩酸システイン 1.5% 溶液 5  $\mu$ L、70% 硫酸 0.15 mL 及び 0.12% カルバゾールエタノール溶液 5  $\mu$ L をそれぞれ添加し、混和した。室温で 2 時間静置後、波長 560 nm の吸光度を測定した。

#### **2-2-9. マウス及びヒト皮膚における P-gp 及び BCRP の免疫染色**

健常成人のヒト皮膚はマルホ株式会社及び金沢大学のヒト倫理委員会の承認を得て、HAB 研究機構 (Human and Animal Bridge Research Organization; Chiba, Japan) より入手した。マウス及びヒト皮膚は OCT Compound (Sakura Finetek, Tokyo, Japan) に包埋後、液体窒素に浸して凍結切片を作製した。マウス及びヒトの凍結切片はそれぞれ 8  $\mu$ m 及び 40  $\mu$ m の厚さに薄切し、Morita らの方法を参考に、室温でエタノール処理 (30 min) 及びアセトン処理 (1 min) を行い、スライドガラスに固定した (Morita *et al.*, 2003)。P-gp 又は BCRP と CD31 の共染色時にはブロッキング剤として、マウス皮膚の薄切切片では 1% BSA/PBS 溶液、ヒト皮膚の薄切切片では PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal (Toyobo Co. Ltd., Osaka, Japan) を使用した。いずれもブロッキング剤を添加して室温で 15 分間静置後、1 次抗体溶液を添加して室温で 1 時間静置した。PBS で 3 回洗浄後、Alexa 標識 2 次抗体 (Molecular Probes Inc., Eugene, OR) を添加して室温で 30 分間静置した。さらに PBS で 3 回洗浄後、VECTASHIELD

mounting medium with DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA) を用いて封入及び各染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM 710; Carl Zeiss, Jena, Germany) を用いて観察した。BCRP と keratin5 又は keratin10 との共染色時には、ブロッキング剤として PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal を用いて室温で 120 分間静置した。また、1 次抗体の添加後は 4°C で一晩静置した。以後は CD31 との共染色時と同様に操作した。

#### **Phosphate buffered saline (PBS; pH7.4)**

NaCl	137 mmol/L
KCl	2.68 mmol/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 mmol/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mmol/L

#### **2-2-10. データ解析法**

有意差の検定は Student の *t*-検定を用いて行い、 $p < 0.05$  を満たす時に有意差があると判断した。

### 第3節 結果

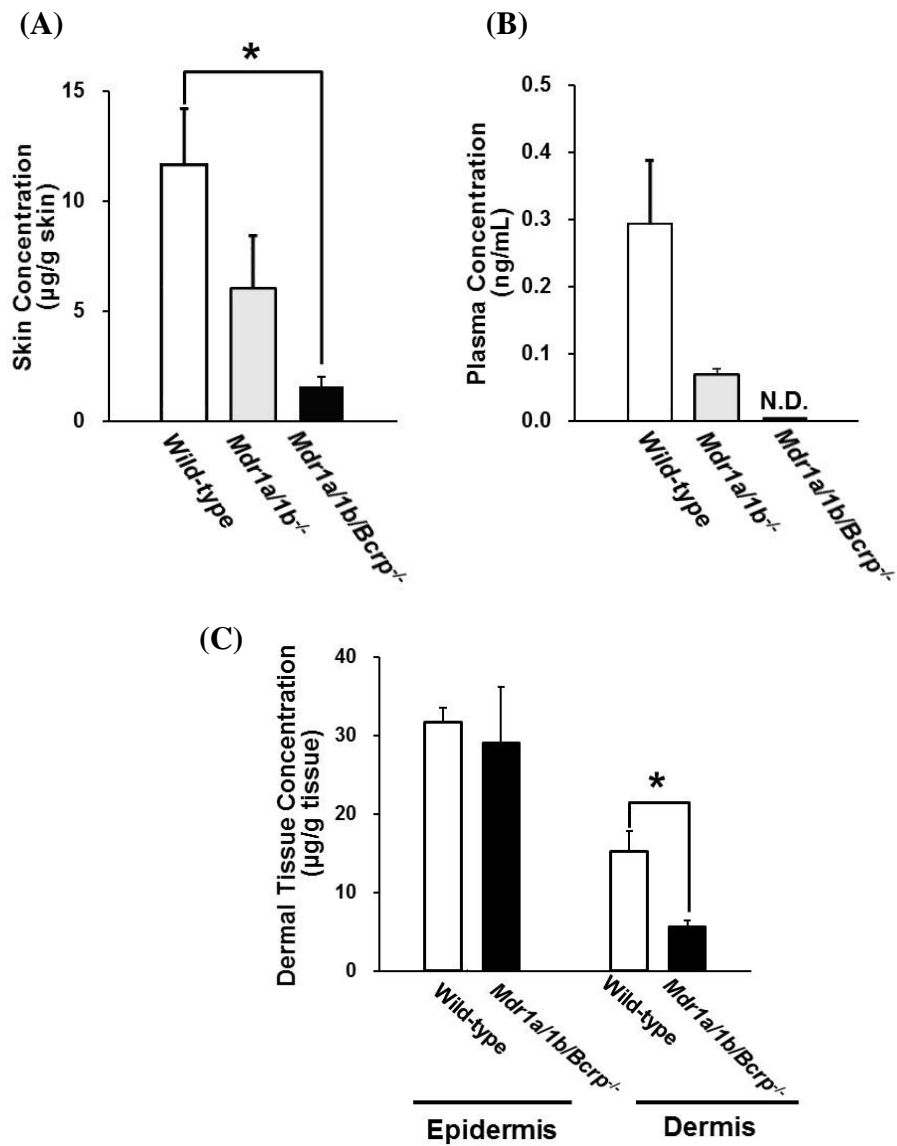
#### 2-3-1. *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスにおけるRho123の経皮吸収性の評価

Wild-type 及び *Mdr1a/1b*<sup>-/-</sup>マウスを用いて、P-gp の典型基質である Rho123 の *in vivo* 経皮投与実験を実施した (Fig. 2)。さらに、BCRP 及びそのアダプター蛋白質である PDZK1 の共発現細胞を用いた予備検討において、BCRP による Rho123 の細胞外排出を確認したことから (data not shown)、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスを用いた Rho123 の経皮投与実験も実施した (Fig. 2)。Rho123 溶液を経皮投与後 6 時間における皮膚中 Rho123 濃度は wild-type マウスに比べて、*Mdr1a/1b*<sup>-/-</sup>マウスで低下する傾向が認められ、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスでは顕著な低下が認められた (Fig. 2A)。さらに投与後 6 時間における血漿中濃度も同様に wild-type マウスに比べて、*Mdr1a/1b*<sup>-/-</sup>マウスで低下する傾向が認められ、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスでは定量下限 (0.04 ng/mL) 以下まで低下した (Fig. 2B)。

次に、Ussing-type chamber 法を用いて Rho123 の皮膚透過性を評価した (Fig. 3)。Rho123 の皮膚透過は、wild-type マウスでは真皮から表皮方向 (排出方向) の透過に比べて、表皮から真皮方向 (吸収方向) の透過が高く推移した (Fig. 3A, 3B)。一方、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスにおいては wild-type マウスに比べて、吸収方向の透過は低下し、排出方向の透過は増加した (Fig. 3A, 3B)。したがって、wild-type マウスで認めた Rho123 の吸収方向優位な透過は、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスではその方向性が減少し、*in vivo* 経皮投与実験 (Fig. 2) と同様の傾向を認めた。なお、細胞間隙透過マーカーである inulin の皮膚透過は吸収方向と排出方向で差は認められず、両マウスでも差は認められなかった (Fig. 3A, 3B)。

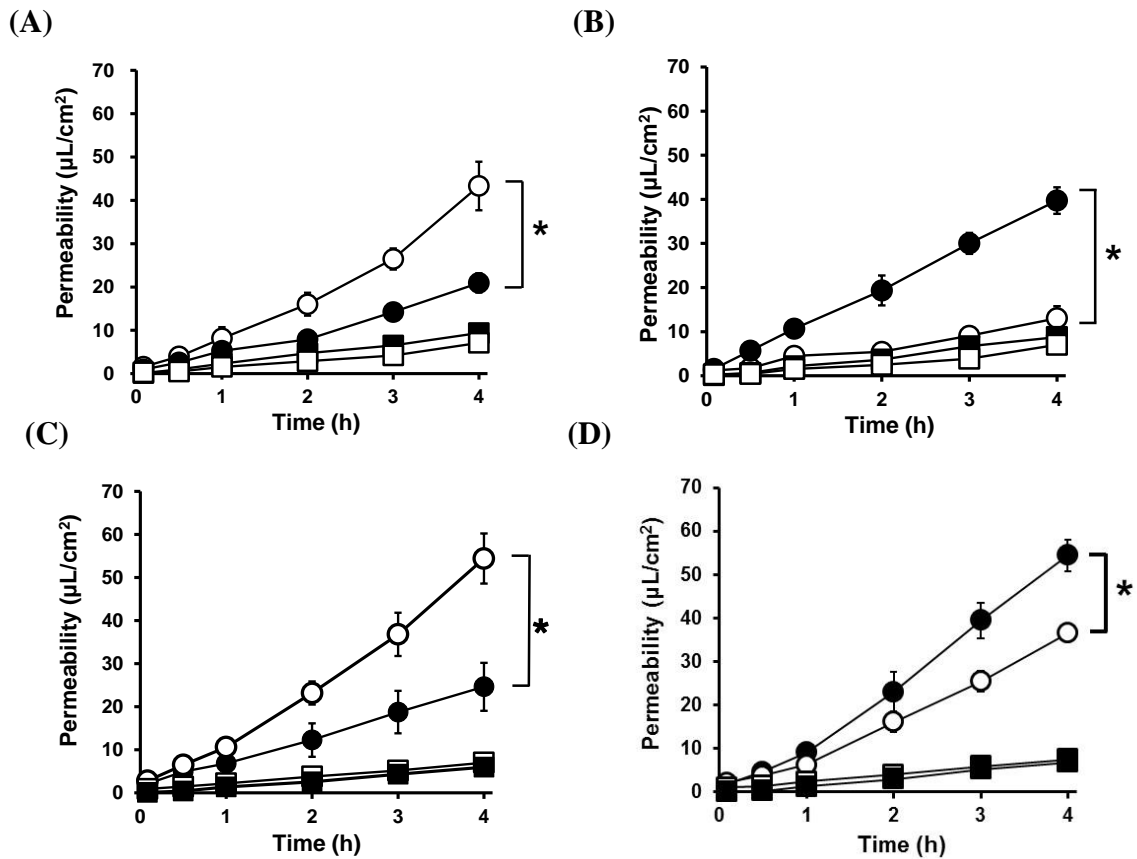
さらに Rho123 の経皮吸収に対する P-gp 及び BCRP の関与をより詳細に評価する

ため、皮膚を表皮と真皮に分離して各組織中濃度を評価した (Fig. 2C)。Rho123 を経皮投与後 6 時間における表皮中 Rho123 濃度は wild-type マウスと *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> マウスで差は認められなかったが、真皮中 Rho123 濃度は wild-type マウスに比べて、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> マウスで低値を示した (Fig. 2C)。



**Fig. 2 Transdermal absorption of Rho123 in mice after topical application to the tape-stripped skin.**

Rho123 dissolved in saline (100  $\mu\text{L}$  of 0.4 mg/mL) was first applied to a patch for topical administration, and then the patch was applied to the tape-stripped abdominal skin. Concentrations of Rho123 in skin (A) and plasma (B) were measured at 6 h after the start of topical application. Further, the skin was divided into epidermis and dermis, and the amount of Rho123 in each was determined (C). Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (n=4). \*Significantly different from the wild-type mice ( $p < 0.05$ ). N.D., not detected.



**Fig. 3 Transdermal permeation of Rho123 through the tape-stripped skin in an Ussing-type chamber.**

Transdermal permeation of Rho123 (0.5  $\mu\text{mol/L}$ ) (circles) and inulin (10 mg/mL) (squares) from the epidermal to hypodermal side (A, C) and from the hypodermal to epidermal side (B, D) was measured at 37°C in HBSS. In panels A and B, open and closed symbols represent transdermal permeation in the wild-type and *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> mice, respectively. In panels C and D, open and closed symbols represent transdermal permeation in the wild-type in the absence or presence of itraconazole (10  $\mu\text{mol/L}$ ), respectively. Data are expressed as means  $\pm$  S.E.M. (n=3–4). When error bars are not shown, they are smaller than the symbols. \*Significantly different from the wild-type mice or the permeation in absence of itraconazole ( $p < 0.05$ ).

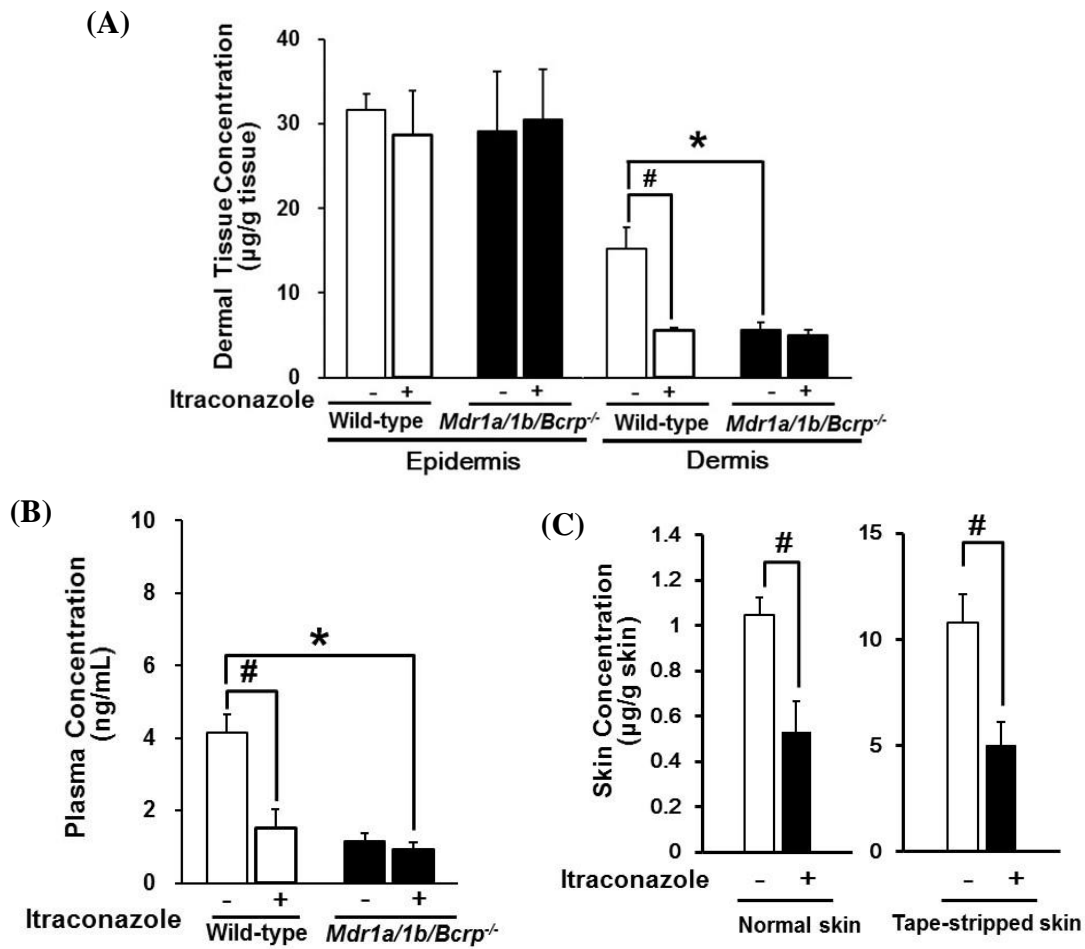
**2-3-2. P-gp/BCRP阻害剤によるRho123の皮内動態制御**

次に、P-gp/BCRP 阻害剤を用いて、Rho123 の経皮吸収に対する両トランスポーターの関与を確認するとともに、両トランスポーターの機能制御による Rho123 の皮内動態制御を試みた。まず P-gp/BCRP 阻害剤である itraconazole 併用時における Rho123 の *in vitro* 皮膚透過性を評価した (Fig. 3C, 3D)。Rho123 の吸収方向の皮膚透過は、Rho123 単独投与時に比べて、itraconazole 併用時で低下し、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスにおける吸収方向の皮膚透過と同程度の推移を示した (Fig. 3A, 3C)。一方、排出方向の透過は、Rho123 単独投与時に比べて、itraconazole 併用時で増加した (Fig. 3D)。なお、細胞間隙透過マーカーである inulin の皮膚透過には itraconazole の影響は認められなかった (Fig. 3C, 3D)。

次に、Rho123 と itraconazole を同時に経皮投与時の皮膚及び血漿中 Rho123 濃度を評価した (Fig. 4)。Wild-type マウスにおける表皮中 Rho123 濃度は、itraconazole による影響は認められなかった (Fig. 4A)。一方、真皮中濃度は Rho123 単独投与時に

比べて、itraconazole 併用時で低下した (Fig. 4A)。また、血漿中 Rho123 濃度も同様に Rho123 単独投与時に比べて、itraconazole 併用時で低下した (Fig. 4B)。なお、itraconazole の併用により、wild-type マウスの真皮及び血漿中 Rho123 濃度は *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> マウスと同程度まで低下した (Fig. 4A, 4B)。一方、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> マウスの表皮、真皮及び血漿中 Rho123 濃度は、itraconazole による影響は認められなかった (Fig. 4A, 4B)。したがって、P-gp 及び BCRP が *in vivo* で Rho123 の経皮吸収に寄与するとともに、それらの阻害剤を用いて、基質の皮内動態を制御できる可能性が示された。

角質層は薬物の経皮吸収に対するバリアとして機能することから、本検討ではトランスポーターの影響をより容易に評価するため、角質層を剥離して Rho123 の皮内動態を検討した。しかし、角質層を剥離していない正常皮膚においても、トランスポーター阻害剤による基質の皮内動態制御の可能性を考察するため、角質層を剥離せず、Rho123 の *in vivo* 経皮投与実験を実施した (Fig. 4C)。Wild-type マウスに Rho123 及び itraconazole を経皮投与後の皮膚中 Rho123 濃度は、角質層剥離皮膚に比べて、正常皮膚では 1/10 程度まで低下した。したがって、Rho123 の経皮吸収に対しても角質層の物理的バリアによる影響が認められた。しかしながら、Rho123 単独投与時に比べて、itraconazole 併用時には、角質層剥離皮膚のみならず、正常皮膚においても皮膚中 Rho123 濃度が低下した。そのため、角質層を含む正常皮膚においてもトランスポーター阻害剤を用いて、基質の皮内動態を制御できる可能性が示された。



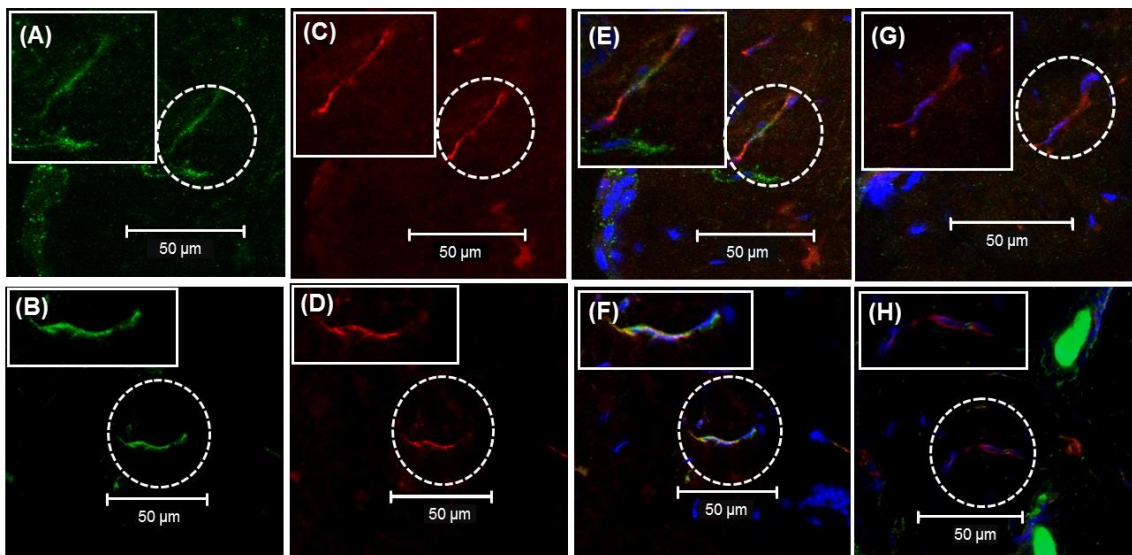
**Fig. 4 Inhibitory effect of itraconazole on transdermal absorption of Rho123 in the wild-type mice, but not *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> mice.**

Rho123 dissolved in saline (100  $\mu\text{L}$  of 0.4 mg/mL) with or without itraconazole (1 mmol/L) was first applied to a patch, and then the patch was applied to the tape-stripped abdominal skin in panels A and B. In panel C, Rho123 at the same dose was also applied to abdominal skin without tape-stripping (normal skin). Skin and plasma were collected at 6 h after the start of topical application. In panel A, skin was separated into epidermis and dermis parts. Concentrations of Rho123 in epidermis (A), dermis (A), plasma (B) and whole skin (C) were measured. Open and closed bars represent the data obtained in the wild-type mice and *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> mice, respectively. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (n=4). \*Significantly different from the wild-type mice ( $p < 0.05$ ). #Significantly different from control mice without itraconazole ( $p < 0.05$ ).



### 2-3-3. マウス皮膚におけるP-gp及びBCRPの発現部位の解析

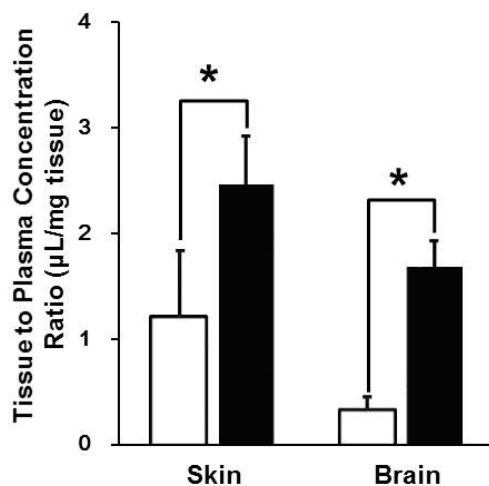
マウス皮膚における P-gp 及び BCRP の発現部位を明らかにするため、両トランスポーターの免疫染色を実施した。P-gp 及び BCRP は wild-type マウスの真皮に発現が認められた (Fig. 5A, 5B)。次に真皮における発現部位を明らかにするため、両トランスポーター (Fig. 5A, 5B) と血管内皮細胞のマーカー分子である CD31 (Fig. 5C, 5D) との共染色を行った。その結果、P-gp 及び BCRP は CD31 と同位置に発現を認めた (Fig. 5E, 5F)。一方、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスでは、P-gp 及び BCRP の蛍光シグナルは認められなかった (Fig. 5G, 5H)。



**Fig. 5. Localization of P-gp and BCRP in mouse dermal endothelial cells.** Cryosections (8  $\mu$ m) of abdominal skin from the wild-type (A–F) and *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> mice (G, H) were incubated with anti-P-gp (A, E, G) or anti-BCRP (B, F, H) antibodies and anti-CD31 (C, D, E, F) antibody, followed by incubation with the corresponding secondary antibody. P-gp and BCRP were detected as green signals, while CD31 was detected as red signals. Double staining images are shown in panels E–H. Sections were counter-stained for nuclei with DAPI (blue signal). The dotted circles indicated endothelial cells stained with anti-CD31 antibody (enlarged in the inset of each panel).

#### 2-3-4. *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスにRho123を点滴静注時の皮膚移行性の評価

マウスの真皮血管内皮細胞における P-gp 及び BCRP の発現を認めたことから、Rho123 の血液中から皮膚への移行に両トランスポーターが及ぼす影響を検討した。Wild-type マウス及び *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> マウスに Rho123 を点滴静注時の皮膚及び血漿中 Rho123 濃度を評価した (Fig. 6)。点滴静注開始後 210 分の皮膚における  $K_p$  は wild-type マウスに比べて、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> マウスで高値を示した。なお、脳における  $K_p$  も wild-type マウスに比べて、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> マウスで増加したが、本結果は P-gp が Rho123 の脳移行を制御することを示した de Lange らの報告と一致した結果であった (de Lange *et al.*, 1998)。



**Fig. 6. Distribution of Rho123 in the wild-type and *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> mice during intravenous infusion.**

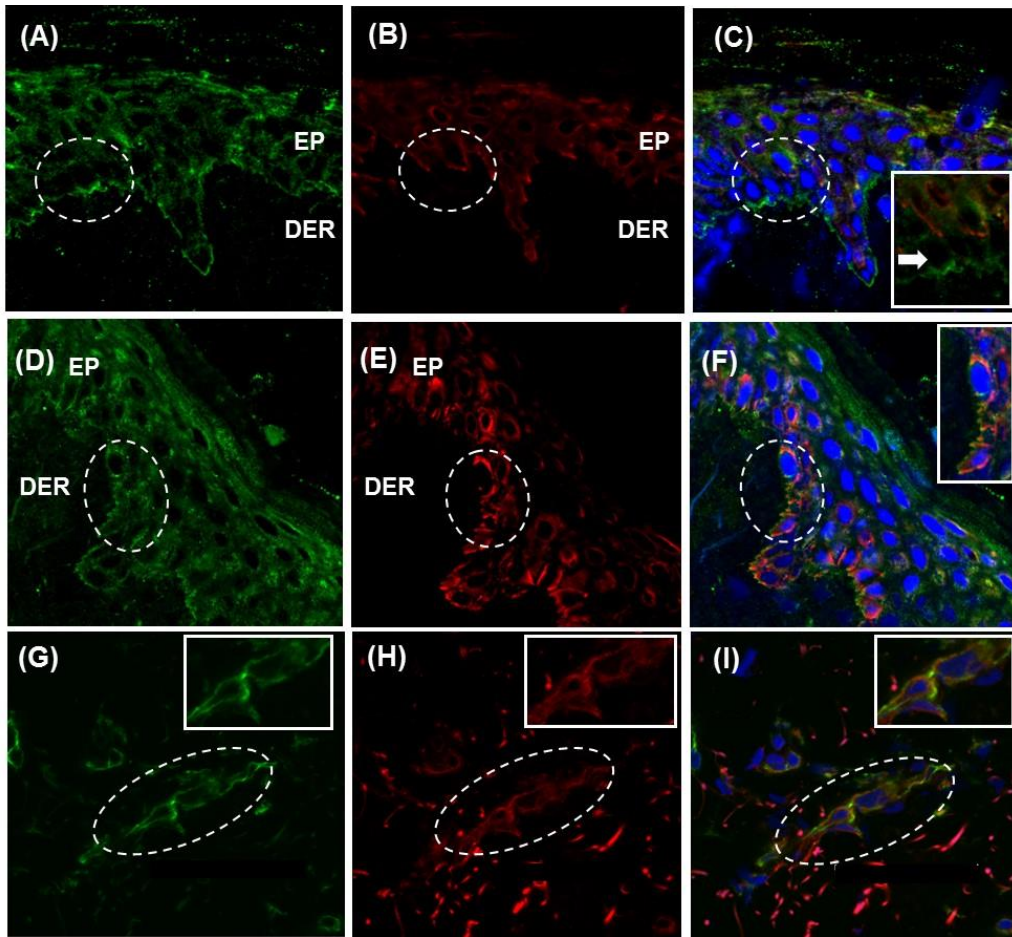
Rho123 was intravenously infused at a rate of 40 pmol/min. Tissue-to-plasma concentration ratio was determined in the wild-type (open columns) and *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> (closed columns) mice. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M (n=3).

\*Significantly different from the wild-type mice ( $p < 0.05$ ).

### 2-3-5. ヒト皮膚におけるBCRPの発現部位の解析

ヒト皮膚において、P-gp の表皮及び真皮血管内皮細胞における発現は報告されている (Skazik *et al.*, 2011)。一方、BCRP のヒト皮膚における発現部位は明らかになっていない。そこで、ヒト皮膚における BCRP の免疫染色を実施し、まず、表皮における発現を検討した。BCRP は表皮において、基底層及びその上層に発現が認められた (Fig. 7A)。表皮は真皮側から基底層、有棘層、顆粒層及び角質層の 4 層から構成される。そこで BCRP の表皮における発現部位を明らかにすべく、顆粒層及び有棘層のマーカー分子である keratin10 (Fig. 7B) との共染色を行い、BCRP の発現は keratin10 と同位置及びその下層に認めた (Fig. 7C)。次に、BCRP (Fig. 7D) と基底層のマーカー分子である keratin5 (Fig. 7E) との共染色を行い、BCRP と keratin5 の発現部位が一部重複することを確認した (Fig. 7F)。

BCRP の真皮における発現についても明らかにするため、BCRP (Fig. 7G) と血管内皮細胞のマーカーである CD31 (Fig. 7H) との共染色も実施し、CD31 と同位置に BCRP の発現を確認した (Fig. 7I)。



**Fig. 7. Localization of BCRP in human skin.**

Cryosections (40  $\mu\text{m}$ ) of human skin were incubated with anti-BCRP antibody, and anti-CD31, anti-keratin 5 or anti-keratin 10 antibody, followed by incubation with the corresponding secondary antibody. BCRP (A, C, D, F, G, I) was detected as green signals, while keratin 10 (B, C), keratin 5 (E, F) and CD31 (H, I) were detected as red signals. Double-staining images are shown in panels C, F and I. Sections were counter-stained for nuclei with DAPI (blue signal). The dotted circles indicate keratinocytes stained with anti-keratin 5 or 10 antibody and endothelial cells stained with anti-CD31 antibody (enlarged in the inset of each panel). Basal keratinocytes are indicated by arrows. EP and DER represented epidermis and dermis, respectively.

#### 第4節 考察

本章では、P-gp及びBCRPが典型基質の経皮吸収に及ぼす影響を明らかにするとともに、両トランスポーターの機能制御による基質の皮内動態制御を試みた。まず、Rho123を経皮投与後の皮膚及び血漿中濃度は、P-gp及びBCRPのノックアウトに伴って低下した (Fig. 2)。また、Rho123の経皮吸収に対する両トランスポーターの影響は、Ussing-type chamber法を用いた皮膚透過実験及びitraconazoleを用いた阻害実験においても同様に認められた (Figs. 3, 4)。したがって、P-gp及びBCRPが*in vivo*でRho123の経皮吸収に寄与することを初めて明らかにした。さらに、マウス及びヒト皮膚の真皮血管内皮細胞におけるP-gp及びBCRPの発現を確認し (Figs. 5, 7)、マウス皮膚においては両トランスポーターが皮膚から血液中へのRho123の輸送に関与することも明らかにした (Fig. 6)。これまで薬物の経皮吸収は主に単純拡散により説明されており、表皮最外層である角質層の物理的バリアが経皮吸収における最大の障壁と考えられてきた (Mitragotri *et al.*, 2011)。そこで、本検討では経皮吸収に対するトランスポーターの影響を評価するため、テープストリッピングにより角質層を除去して、検討を実施した。しかし、角質層剥離皮膚を用いた*in vivo*経皮投与実験及び*in vitro*皮膚透過実験のいずれにおいても、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウス又はitraconazoleの併用でRho123の経皮吸収性が低下した (Figs. 2-4)。したがって、これらの結果は経皮吸収に対して、角質層の物理的バリアのみならず、P-gp及びBCRPによる生物学的バリアも機能していることを示した。なお、皮膚にはP-gp及びBCRP以外にもMRPなどの他のABCトランスポーターも機能的に発現している (Li *et al.*, 2005; Heise *et al.*, 2010)。実際、LiらはMRP1がマウス皮膚において、fluo3及びgrepafloxacinの排泄方向の輸送に寄与することを示している (Li *et al.*, 2005)。また、Heiseらはヒト表皮ケラチノサイトにお

いて、MRPsがeugenolなどのアレルゲンやステロイドホルモンの細胞外排出に寄与することを報告している (Heise *et al.*, 2010)。そのため、P-gp及びBCRP以外にもこれらの薬物トランスポーターが外用薬や化粧品の経皮吸収に対して、生物学的バリアを構成している可能性がある。

トランスポーターを介した経皮吸収機構の存在を確認したことから、次に両トランスポーターの阻害が経皮投与後の基質の全身暴露を軽減し、同時に皮膚貯留性を高めることを期待した。そこで、Rho123をP-gp/BCRP阻害剤であるitraconazole (Wang *et al.*, 2002; Gupta *et al.*, 2007) とともに経皮投与後の表皮、真皮及び血漿中Rho123濃度を評価した結果、itraconazoleにより表皮中濃度は変化しなかったが、真皮及び血漿中濃度は低下した (Fig. 4)。したがって、P-gp/BCRP阻害剤の併用により、基質の表皮中濃度を維持したまま、真皮及び血液中への移行を抑制できる可能性が示された。皮膚疾患の中には基底細胞癌や乾癬、皮膚真菌症など病巣が表皮にある疾患も多く存在する (Raj *et al.*, 2006)。これらの疾患において、表皮への薬物の貯留は効力の最大化や持続、副作用の軽減に有用である。一方、これまでに開発された経皮吸収促進技術の多くは、角質層の物理的バリア機能を破壊し、皮膚組織全体への薬物移行を高める技術である (Prausnitz *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2012)。そのため、P-gp及びBCRPを標的とした薬物の皮内動態制御は、疾患部位選択的な薬物送達を可能にする新たな技術になることが期待される。

Rho123を経皮投与後の表皮中Rho123濃度はwild-typeマウスに比べて、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスで差はなかったが、真皮中濃度は低下が認められた (Fig. 2C)。また、itraconazoleも表皮中Rho123濃度には影響を及ぼさなかったが、真皮中濃度は低下させた (Fig. 4A)。これらの結果から、トランスポーターを介した経皮吸収におい

て、皮膚は少なくとも表皮と真皮の2つのコンパートメントに分けられることが示唆された。そこで、皮膚を表皮及び真皮に分けて、両組織にP-gp及びBCRPの発現を仮定した2-コンパートメントモデルを考えた結果、本モデルにより、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウス又はitraconazole併用時における真皮及び血漿中Rho123濃度の低下 (Figs. 2, 4) を説明できた (Fig. 8B)。なお、皮膚を1つのコンパートメントと仮定した場合についても考察したが (Fig. 8A)、本モデルではトランスポーターの機能低下時に血漿中濃度は低下するが、皮膚中濃度は増加すると考えられ、皮膚と血漿中濃度の両方が低下した今回の結果 (Figs. 2, 4) を説明できなかった。そこで、トランスポーターを介した基質の経皮吸収をより定量的に考察するため、以下の仮定 (i-iii) を置き、各コンパートメントモデルにおける数式モデルを作成した。

仮定 (i) パッチからのRho123の吸収 (R) は0次吸収である

(ii) 皮膚中濃度は定常状態に達している (Eq. 1=0)

(iii) 血液中濃度はsink条件を満たす

まず、皮膚を1つのコンパートメントと仮定した場合 (Fig. 8A)、以下の物質収支式が考えられる。

$$V_1 (dC_1/dt) = R - (P_2 + P_3) \cdot C_1 \quad (\text{Eq. 1})$$

$$J_{\text{abs}} = P_2 \cdot C_1 \quad (\text{Eq. 2})$$

上記の式において、Pは各コンパートメント間におけるRho123の透過クリアランスを、 $J_{\text{abs}}$ は血液中への透過速度を示し、P-gpとBCRPは $P_2$ に関与すると考えた。上記の式及び仮定に基づき、Rho123の経皮吸収を考察した時、定常状態における皮膚中濃度 ( $C_1$ ) 及び血液中への透過速度はそれぞれ以下の式で記載できる。

$$C_1 = R / (P_2 + P_3) \quad (\text{Eq. 3})$$

$$J_{\text{abs}} = R \cdot P_2 / (P_2 + P_3) \quad (\text{Eq. 4})$$

したがって、上記の式 (Eq. 3) より、 $P_2$ 又は $P_3$ が増加する場合にのみ皮膚中濃度 ( $C_1$ ) は低下すると考えられる。しかし、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウス又はitraconazole併用時では  $P_2$  (P-gp及びBCRPによる輸送) が低下していると考えられるため、1-コンパートメントモデルでは皮膚 ( $C_1$ ) 及び血漿中濃度 ( $J_{\text{abs}}$ ) の両方が減少する今回の結果 (Figs. 1, 3) を説明できなかった。一方、皮膚を表皮と真皮の2つのコンパートメントとして考えた場合、表皮、真皮、総皮膚中Rho123濃度 ( $C_1$ ,  $C_2$ ,  $C_{\text{skin}}$ ) はそれぞれ下記の式 (Eq. 5-8) にて記載できる。なお、P-gp及びBCRPは $P_2$ 及び $P_3$ に関与すると考えた。

$$J_{\text{abs}} = R \cdot P_2 \cdot P_3 / (P_2P_3 + P_3P_6 + P_5P_6) \quad (\text{Eq. 5})$$

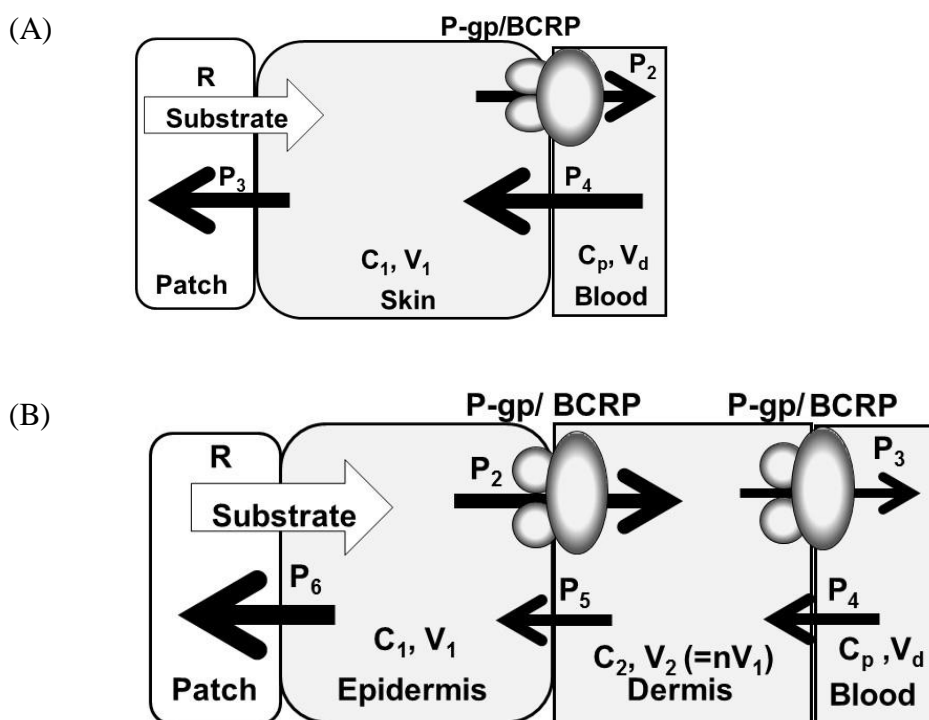
$$C_1 = R (P_3 + P_5) / (P_2P_3 + P_3P_6 + P_5P_6) \quad (\text{Eq. 6})$$

$$C_2 = R \cdot P_2 / (P_2P_3 + P_3P_6 + P_5P_6) \quad (\text{Eq. 7})$$

$$C_{\text{skin}} = R (nP_2 + P_3 + P_5) / (1+n) (P_2P_3 + P_3P_6 + P_5P_6) \quad (\text{Eq. 8})$$

上記の式において、少なくとも2つの条件 ( $P_6 \gg P_2$ 及び $P_5 > P_3$ もしくは $P_5 = P_3$ ) を満たす場合に、トランスポーターの機能低下時 ( $P_2$ 及び $P_3$ が低下した場合) には表皮中濃度 ( $C_1$ ) はほとんど変化しないが、真皮 ( $C_2$ )、皮膚 ( $C_{\text{skin}}$ ) 及び血漿中濃度 ( $J_{\text{abs}}$ ) は低下すると考えられた。したがって、皮膚を表皮と真皮の2-コンパートメントと考えることで、トランスポーターの機能低下時に皮膚、真皮及び血漿中Rho123濃度が低下した今回の結果 (Figs. 2, 4) を説明できる条件が存在することを確認した。しかしながら、現時点ではRho123の事例しか考察できていない。そのため、皮膚の2-コンパートメントモデルの妥当性も含め、今後さらなる検討が必要である。





**Fig. 8. Kinetic model representing transporter-mediated transdermal absorption after dermal application in viable skin.**

Viable skin is assumed to consist of one compartment in panel A, but two compartments in panel B.  $R$  is the zero-order absorption rate (mass/ time normalized by surface area).  $P_2$ ,  $P_3$ ,  $P_4$ ,  $P_5$  and  $P_6$  represent permeation clearances (volume/time normalized by surface area). P-gp and BCRP are assumed to be involved in  $P_2$  (A), and  $P_2$  and  $P_3$  (B).  $C_1$ ,  $C_2$  and  $C_p$  represent the concentration in each compartment (mass/volume).  $V_1$  and  $V_2$  are the volume of distribution in each compartment, and  $n$  is the ratio of  $V_2$  to  $V_1$ .  $V_d$  is the volume of distribution in systemic circulation.

2-コンパートメントモデルでは、表皮と真皮及び真皮と血液のコンパートメント間に P-gp及びBCRPの発現を仮定したことから、両トランスポーターの皮膚における発現部位についても検討した。これまでにP-gpはマウス皮膚の表皮における発現、ヒト皮膚の表皮及び真皮毛細血管における発現が確認されている (Sleeman *et al.*, 2000; Baron

*et al.*, 2001; Skazik *et al.*, 2011)。一方、BCRPもマウス及びヒト表皮ケラチノサイトにおける発現が報告されている (Triel *et al.*, 2004; Yano *et al.*, 2005)。また、本検討ではヒト皮膚組織において、BCRPが表皮に発現することを明らかにした (Fig. 7)。したがって、P-gp及びBCRPは、皮膚の2-コンパートメントモデルで仮定した表皮に発現することを確認したとともに、両トランスポーターがRho123の表皮から真皮への輸送に寄与したと推察した (Fig. 8B)。さらに、本検討では、マウス及びヒト皮膚真皮血管内皮細胞におけるP-gp及びBCRPの発現も示した (Figs. 5, 7)。また、Rho123を点滴静注時の皮膚移行性はwild-typeマウスに比べて、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスで増加した (Fig. 6)。したがって、P-gp及びBCRPは真皮血管内皮細胞にも発現し、真皮から血液中へのRho123の輸送にも寄与することが示された (Fig. 8B)。なお、脳の血管内皮細胞においては、両トランスポーターが異物の血液中から脳への移行を抑制し、血液脳関門を構築している (Tsuji *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005)。本研究では、P-gp及びBCRPは真皮血管内皮細胞において、血液脳関門と同じ方向性の輸送を示したことから、皮膚においてもバリア機能 (血液皮膚関門) を担っている可能性が考えられた。しかしながら、Rho123を静脈内投与時の $K_p$ について、wild-typeマウス及び*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウス間の差は脳に比べて、皮膚では僅かであった (Fig. 6)。そのため、血液脳関門に比べて、真皮血管内皮細胞ではタイトジャンクションが脆弱であることが示唆された。

ヒト皮膚の表皮において、BCRPは増殖性ケラチノサイトが構成する基底層とその上層で分化したケラチノサイトが構成する顆粒層や有棘層に認められた (Fig. 7)。一方、Bebesらは、ヒト表皮ケラチノサイトにおけるBCRPの発現は増殖期で高く、分化に伴って低下することを報告し、BCRPがケラチノサイトの増殖に関与する可能性を示してい

る (Bebes *et al.*, 2012)。したがって、BCRPはヒトの皮膚組織においてもケラチノサイトの増殖に関与している可能性が考えられた。

P-gp及びBCRPは典型基質の皮内動態に影響したことから、医薬品の皮内動態にも関与している可能性がある。例えば、皮膚真菌症治療薬であるketoconazole及びfluconazoleを服用後のヒトにおける角質層/血漿中濃度比はketoconazoleに比べて、fluconazoleで高いことが知られている (Harris *et al.*, 1983; Faergemann *et al.*, 1993)。一方、ketoconazoleを静脈内投与後の脳移行はwild-typeマウスに比べて、P-gpノックアウトマウスで低下するのに対し、fluconazoleを経口投与後の脳移行は両マウスで差がないことも報告されており (Yasuda *et al.*, 2002; von Moltke *et al.*, 2004)、ketoconazoleはP-gp基質であるが、fluconazoleはP-gp非基質であることが示されている。したがって、ヒトにおけるketoconazoleとfluconazoleの角質層/血漿中濃度比の差は、P-gpがketoconazoleを表皮から真皮へと排出したことに起因すると考えれば説明することが可能である。また、EGFR阻害剤であるsunitinibの服用者には、Hand-foot syndromeやざ瘡様湿疹などの皮膚障害が高頻度に起こる (Lee *et al.*, 2009)。さらに、sunitinibはP-gp及びBCRPの基質であり、これらのトランスポーターの発現量低下を伴う変異保有者では皮膚障害の発症頻度が増加又は増悪することが示唆されている (van Erp *et al.*, 2009; Mizuno *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2012)。したがって、これらのトランスポーターの変異保有者ではsunitinibの全身暴露の増加に加えて、皮内蓄積の増加により、皮膚障害が重症化した可能性も考えられる。

本章では、P-gp及びBCRPが皮膚に機能的に発現し、*in vivo*でRho123の表皮から真皮、真皮から血液中への輸送に寄与することを明らかにした。さらに、P-gp/BCRP阻害剤であるitraconazoleにより、Rho123の真皮及び血液中への移行を抑制できることを

示した。本知見は、P-gp及びBCRPを介した経皮吸収機構の存在を明らかにしたとともに、薬物の皮内動態制御において両トランスポーター新たなターゲットになる可能性を示した。

### 第3章 P-gp を介した外用ステロイドの経皮吸収機構

#### 第1節 緒言

第2章では P-gp 及び BCRP がマウスにおいて、*in vivo* で典型基質である Rho123 の表皮から真皮、真皮から血液中への経皮吸収に寄与することを示した。一方、P-gp と BCRP は幅広い基質認識性を有している (Kim, 2002; Marzolini *et al.*, 2004; Mao *et al.*, 2015)。そのため、両トランスポーターは様々な外用薬や化粧品の経皮吸収に対しても関与することが予想される。

外用薬の中にも P-gp の基質は数多く存在する。例えば、皮膚疾患治療薬においては免疫抑制剤である tacrolimus、ステロイドの dexamethasone や prednisolone、抗菌剤である erythromycin などが挙げられる (Saeki *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 1999; Yates *et al.*, 2003)。また、全身作用を期待する貼付薬においても、オピオイド系麻酔薬である fentanyl、ホルモン剤での estradiol、 $\beta$ 1 ブロッカーである bisoprolol などは P-gp の基質である (Dagenais *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2004; Tahara *et al.*, 2008)。また、P-gp は肝臓や腎臓では医薬品の排泄 (Koziolek *et al.*, 2001; Hoffmaster *et al.*, 2004)、小腸や脳では組織移行の制御 (Greiner *et al.*, 1999; Sasongko *et al.*, 2005) を担い、薬物の体内動態を制御している。さらに、BCRP も血液脳関門において、薬物の脳移行を抑制するため、薬物の体内動態への関与が示されている (Agarwal *et al.*, 2010)。一方、皮膚においては P-gp 及び BCRP が発現するものの (Baron *et al.*, 2001; Triel *et al.*, 2004; Skazik *et al.*, 2011)、医薬品の経皮吸収はこれまで単純拡散を基に考えられており、トランスポーターの関与は考えられていなかった (Mitragotri *et al.*, 2011)。そのため、外用薬や化粧品の経皮吸収に対する両トランスポーターの関与は明らかになっていない。なお、皮膚には P-gp や BCRP 以外のトランスポーターも発現する (Schiffer *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2005; Heise *et al.*, 2010)。これらのトランスポーターは P-gp や

BCRP と同様に幅広い基質認識性を有するため、様々な薬物の経皮吸収に対して協奏的に関与している可能性が考えられる。そのため、典型基質ではなく、医薬品の経皮吸収に対する個々のトランスポーターの寄与を *in vivo* で評価することは必ずしも容易ではない。

本章では、臨床使用されている外用薬の経皮吸収に対する P-gp と BCRP の関与を明らかにするため、検討を実施した。なお、両トランスポーターは様々な分子量の薬物を基質として認識するのに対し、単純拡散による薬物の経皮吸収性は分子量の増加に伴って低下する。そのため、分子量が大きい薬物ほど、経皮吸収に対するトランスポーターの寄与を評価しやすいと考えた。そこで、本検討では、外用薬の中で比較的高分子であるステロイドを選択し、dexamethasone を含む数種類のステロイドを wild-type 及び *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> マウスに経皮投与して、皮膚及び血漿中濃度を比較した。さらに、P-gp 及び BCRP によるステロイドの輸送を確認するため、両トランスポーターの発現細胞を用いて経細胞輸送実験を実施した。

## 第 2 節 実験方法

### 3-2-1. 試薬

Dexamethasone は Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan) より、itraconazole、Ko143 及び methylprednisolone は LKT Laboratories Inc. (St. Paul, MN) より、prednisolone、ethinyl estradiol 及び elacridar は Sigma-Aldrich Inc. (St. Louis, MO) より、prednisone は Nacalai Tesque Inc. (Kyoto, Japan) より購入した。その他の試薬はすべて特級試薬を用いた。

### 3-2-2. 実験動物

FVB/NJcl マウス (wild-type、雄性、7~9 週齢) 及び *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウス (雄性、7~9 週齢) を第 2 章の実験方法 (2-2-2) と同様に購入、飼育して実験に用いた。なお、すべての動物実験は金沢大学の動物実験指針に従って実施した。

### 3-2-3. マウスの除毛

第 2 章の実験方法 (2-2-3) に従って実施した。

### 3-2-4. *In vivo* 経皮投与実験

第 2 章の実験方法 (2-2-4) に準じて実施した。なお、経皮投与時には投与液 30  $\mu$ L (dexamethasone、prednisolone、methylprednisolone:いずれも 50 mg/mL、又は ethinyl estradiol: 10 mg/mL) を染み込ませたパッチ (直径 9 mm、Torii Pharmaceutical Co., Ltd.) をマウスの両脇腹にそれぞれ 1 枚ずつ貼付した。また、投与液は薬物を DMSO に溶かして調製した。採血は投与後 0.25、0.5、1、2、4 及び 6 時間にジエチル

エーテル吸入麻酔下で行い、投与後 6 時間の採血後には皮膚及び脳を採取した。

### **3-2-5. *In vivo* 静脈内定速注入実験**

Dexamethasone 溶液 (50 µg/mL) を 100 ng/min にてマウス頸静脈より静脈内投与した。投与液は dexamethasone を生理食塩水に溶解して調製した。投与開始後 1、2、4、5 及び 6 時間に尾静脈よりヘパリン処理済毛細管を用いて採血し、遠心 (1500×g, 10 min, 4°C) して血漿を採取した。また、投与開始後 6 時間においては皮膚 (腹部、脇腹、背部、眉間、頬)、耳、足 (前足、後足) 及び脳を採取し、採取した脇腹皮膚については一部を表皮と真皮に分離した。採取した試料はすべて分析時まで -30°C で保存した。Dexamethasone の  $K_p$  は、各組織中 dexamethasone 濃度を組織採取時点 (投与後 6 時間) の血漿中濃度で除して算出した。また、 $K_{ps}$  は表皮中 dexamethasone 濃度を真皮中濃度で除して算出した。

### **3-2-6. トランスポーター安定発現細胞の培養**

MDR1 を安定発現した LLC-PK1 細胞 (LLC-MDR1 cells) は、Prof. A. H. Schinkel (Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, the Netherlands) より提供頂いた (Schinkel *et al.*, 1995)。BCRP と PDZK1 を安定発現した MDCKII 細胞 (MDCKII/BCRP/PDZK1 cells) は shimidzu らが以前に作製した細胞を用いた (Shimizu *et al.*, 2011)。LLC-MDR1 細胞は Medium 199 (M199, Sigma-Aldrich Inc.) に 10% FBS、100 units/mL benzylpenicillin 及び 0.14 mg/mL streptomycin を添加した培地中で培養した。また、MDCKII/BCRP/PDZK1 細胞は DMEM (Sigma-Aldrich Inc.) に 10% FBS、1 mmol/L sodium pyruvate、100 unit/mL benzylpenicillin、0.14



mg/mL streptomycin、1 mg/mL G418、0.2mg/mL zeocin を添加した培地中で培養した。細胞は全て CO<sub>2</sub> インキュベーター (37°C、5%CO<sub>2</sub>) 内で培養した。

### 3-2-7. トランスポーター安定発現細胞を用いた経細胞輸送実験

経細胞輸送実験は Schinkel ら及び Shimizu らの方法を参考に実施した (Schinkel *et al.*, 1995; Shimizu *et al.*, 2011)。細胞は Transwell polycarbonate insert (3 µm pore size, 12 mm diameter; Corning Life Science, Edison, NJ) に  $3 \times 10^5$  cells/well の細胞密度で播種し、3 日間培養後、実験に用いた。経細胞輸送実験では投与液として、ステロイド含有 HBSS 溶液 (10 µmol/L) 又はステロイドと P-gp/BCRP 阻害剤 (25 µmol/L itraconazole、1 µmol/L elacridar 又は 1 µmol/L Ko143) を含む HBSS 溶液を用いた。投与液は Transwell の AP 又は BL 側に添加し、逆側 (receptor 側) には HBSS (pH 7.4) を添加した。投与液を添加後 30、60、90 及び 120 分に receptor 側から 100 µL を採取し、同量の HBSS (pH 7.4) を加えた。各薬物の ER は、BL から AP (BL-to-AP) 方向の  $P_{app}$  を AP から BL (AP-to-BL) 方向の  $P_{app}$  で除して算出した。 $P_{app}$  は累積透過曲線の傾きを投与液の初期濃度及び透過面積 (1.1 cm<sup>2</sup>) で除して算出した。

### 3-2-8. 試料中薬物濃度測定

試料中薬物濃度は、LC/MS/MS を用いて以下の条件にて定量した。

#### 3-2-8-1. 組織試料の前処理

Dexamethasone、prednisolone 及び methylprednisolone を経皮投与後の組織は重量を測定後、タングステンビーズ (直径 6 mm、2 個) とともに Shake Master Neo 用マスターチューブ (Bio Medical Science, Tokyo, Japan) に入れ、10 当量 (w/v) の 500

ng/mL prednisone 溶液 (内標準物質、アセトニトリル溶液) を添加した。Shake Master Neo (Bio Medical Science, Tokyo, Japan) にて組織を破碎後、遠心 (12000×g, 5 min, 4°C) して上清を採取した。上清は当量の 10 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液と混和後、遠心式フィルター (Ultrafree-MC-GV 0.22 µm, Millipore, Bedford, MA) を用いてろ過し、ろ液を LC/MS/MS 分析に供した。Ethinyl estradiol を経皮投与後の組織については、500 ng/mL dexamethasone 溶液 (内部標準物質、アセトニトリル溶液) を用いて同様に前処理後、LC/MS/MS に注入した。

### **3-2-8-2. 血漿及び receptor 液試料の前処理**

血漿及び receptor 液試料 10 µL にアセトニトリル 10 µL 及び 500 ng/mL 内標準溶液 30 µL を添加した。攪拌後、遠心 (12000×g, 5 min, 4°C) して上清を採取した。上清は当量の 10 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液と混和後、遠心式フィルター (Ultrafree-MC-GV 0.22 µm) を用いてろ過し、ろ液を LC/MS/MS に注入した。

### **3-2-8-3. LC/MS/MS 測定条件**

#### **Dexamethasone、prednisolone 及び methylprednisolone :**

Instrument: LC; LC-20A series (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan)

MS; API4000 triple quadrupole mass spectrometer

(AB Sciex, Foster City, CA, USA)

Column: Capcell pak MGII C<sub>18</sub> (5 µm, 2.1 mm × 50 mm; Shiseido, Tokyo, Japan)

Mobile Phase: 10 mmol/L ammonium formate : acetonitrile = 2:3 (v/v)

Flow Rate: 0.25 mL/min

Column Temperature: 40°C

Ionization: Electrospray

Polarity: Positive

Multiple Reaction Monitor: Dexamethasone; m/z 393.3 to 373.2

Prednisolone; m/z 361.2 to 147.2

Methylprednisolone; m/z 375.2 to m/z 357.3

Prednisone (internal standard); m/z 359.2 to 341.2

### **Ethinyl estradiol:**

Instrument: LC; LC-20A series (Shimadzu Coproration, Kyoto, Japan)

MS; API4000 triple quadrupole mass spectrometer

(AB Sciex, Foster City, CA, USA)

Column: Capcell pak MGII C<sub>18</sub> (5 μm, 2.1 mm × 50 mm; Shiseido, Tokyo, Japan)

Mobile Phase: Water : Acetonitrile = 3:2 (v/v)

Flow rate: 0.25 mL/min

Column Temperature: 40°C

Ionization: Electrospray

Polarity: Negative

Multiple Reaction Monitor: Ethinyl estradiol; m/z 295.1 to 144.8

Dexamethasone (internal standard); m/z 391.1 to 361.3

### **3-2-9. RT-PCR によるトランスporter 遺伝子発現量の評価**

Wild-type 及び *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> マウス (雄、7 週齢) の脇腹皮膚を採取し、氷冷した RNA later (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) 中でハサミを用いて裁断した。4°C

で一晩静置後、total RNA を QIA shredder Kit 及び Qiagen RNeasy Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) の標準プロトコルに従って抽出した。なお、皮膚はポリロンホモジナイザー (T-10 basic ULTRA-TURRAX) 及びソニケーター (HANDY SONIC UP-20P) を用いて、total RNA の抽出を行う直前に再度破碎した。Oligo (dT)<sub>12-18</sub> primer、deoxy nucleotide triphosphate (dNTP) mix 及び MultiScribe™ Reverse Transcriptase (Applied Biosystems, Foster City, California) を用いて、cDNA を作製した。cDNA を THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO, Osaka, Japan)、5'-及び3'-primer と混和し、Mx3005P (Agilent Technologies, Santa Clara, California) を用いて、RT-PCR を実施した。使用したプライマー配列を Table 1 に示す。

Table 1. Primers for RT-PCR analysis

Gene	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (3' to 5')
Abcc1	GCCCCAGTGTTACTGGTCA	AATTCCCGAGGATTGGACTC
Abcc2	CAAATCCAATTCTCTACCTATGCAC	CCAGAACATGGACAGGAACC
Abcc3	GCTGAGGGTGGGGATAATCT	AGCAGTGGCCTCGTCTAAAA
Abcc4	GAGCACACGGACGAGGAG	TTGCAAGGCACACTAACTGTC
Abcc5	CTGTACCAGGGCAACACAGA	CGTCCAGAATTTGGAGATGAG
Abcc6	CATCTTGCCAGGAATCAACA	AGACAGGACAGCACCAGCTC
36B4	ACTGGTCTAGGACCCGAGAAG	TCCCACCTTGTCTCCAGTCT

PCR は以下の条件で実施した。

95°C, 15 min → (95°C, 10 sec → 60°C, 30 sec) × 40 cycle

また、mRNA 量は 36B4 を内部標準遺伝子として用いて、 $\Delta\Delta CT$  法により定量した。

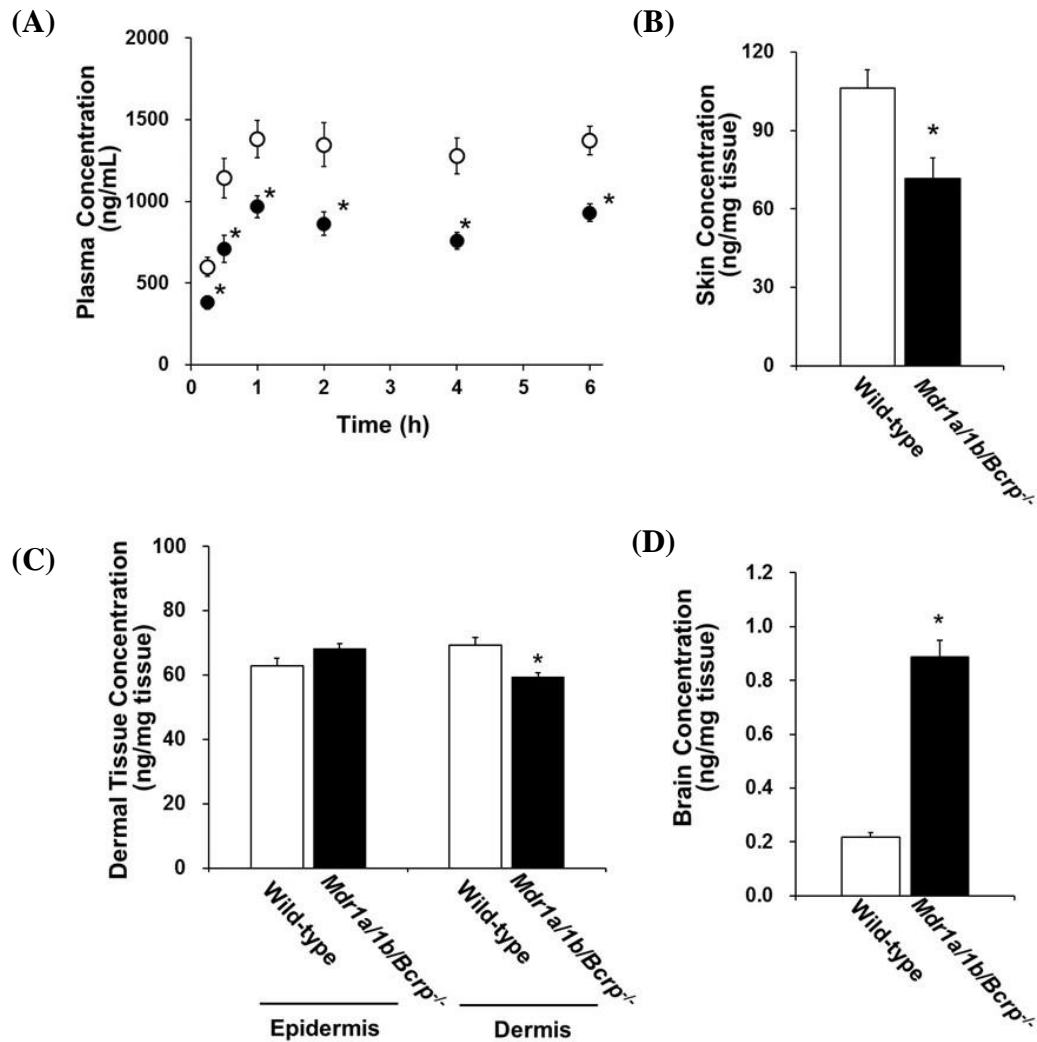
### 3-2-10. データ解析法

有意差の検定は Student の *t*-検定を用いて行い、 $p < 0.05$  を満たす時に有意差があると判断した。

## 第3節 結果

### 3-3-1. *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスにおけるdexamethasoneの*in vivo*経皮吸収性の評価

Wild-type 及び *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> マウスを用いて、外用ステロイドである dexamethasone の *in vivo* 経皮投与実験を実施した (Fig. 9)。血漿中 dexamethasone 濃度はすべての時点において、wild-type マウスに比べて、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスで低く推移した (Fig. 9A)。また、投与後 6 時間における皮膚中濃度も同様に wild-type マウスに比べて、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスで低値を示した (Fig. 9B)。次に皮膚を表皮及び真皮に分けて各組織中濃度を評価した。Dexamethasone を経皮投与後 6 時間における表皮中濃度は wild-type マウスと *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスで同程度であったが、真皮中濃度は wild-type マウスに比べて、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスで低下が認められた (Fig. 9C)。また、P-gp 及び BCRP は血液脳関門に発現し、基質の脳移行を抑制することが知られているため、dexamethasone を経皮投与後 6 時間における脳中濃度も評価した。脳中 dexamethasone 濃度は wild-type マウスに比べて、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスで大幅な増加を認めたことから、本実験条件においても、これらのトランスポーターが *in vivo* で dexamethasone の脳移行を抑制することが示された (Fig. 9D)。Dexamethasone の脳移行に対する BCRP の関与は明らかになっていないが、この結果は少なくとも P-gp が dexamethasone の脳移行を抑制することを示した既報と一致する結果であった (Schinkel *et al.*, 1995; Uchida *et al.*, 2011)。

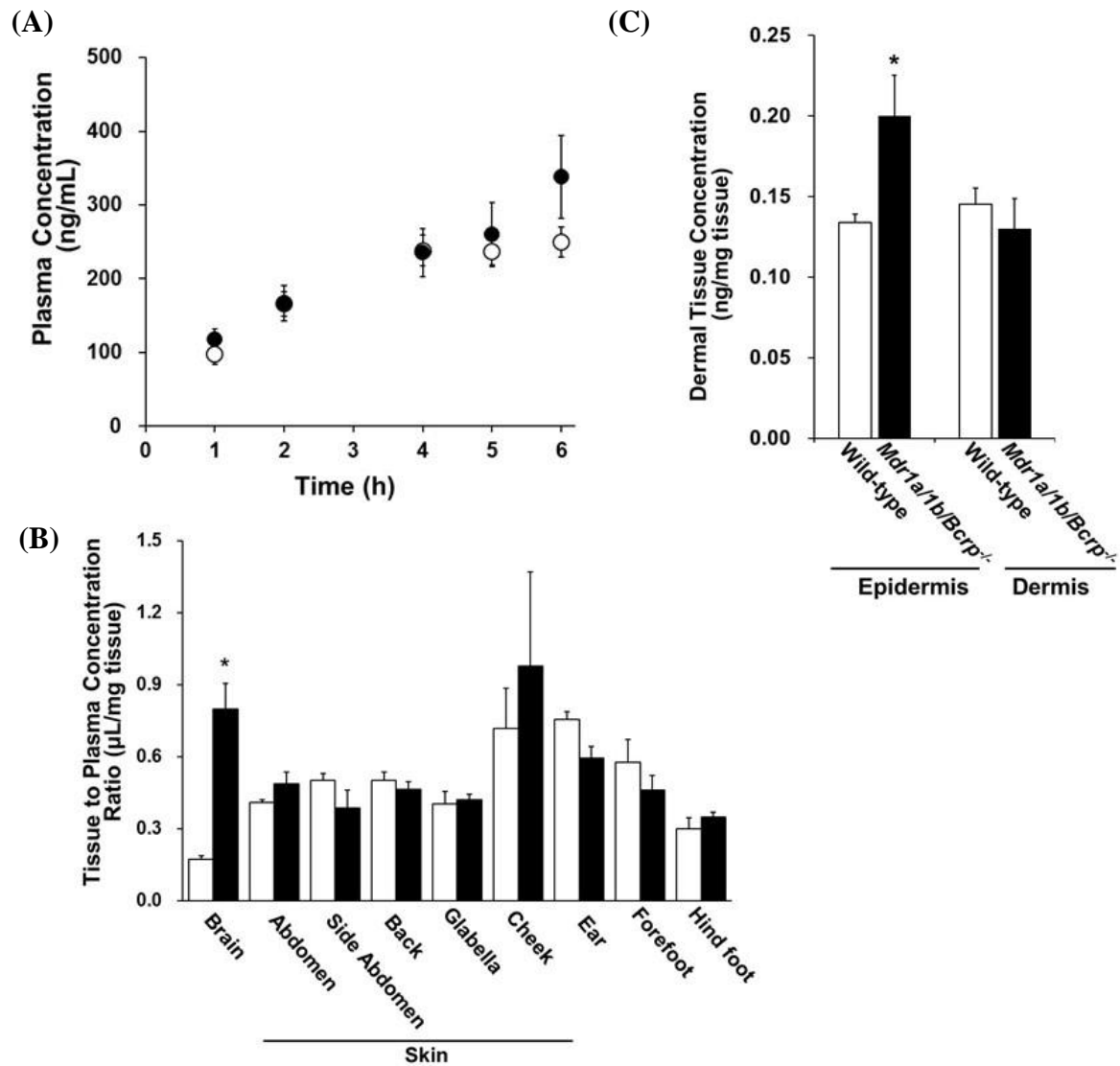


**Fig. 9. Transdermal absorption of dexamethasone in mice after topical application to tape-stripped skin.**

Dexamethasone dissolved in DMSO (30  $\mu$ L of 50 mg/mL) was applied to two patches for topical administration, and the patches were applied to tape-stripped abdominal skin. The concentration of dexamethasone in plasma (A) was measured in wild-type (open circles) and *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> (closed circles) mice. Concentrations in skin (B), epidermis (C), dermis (C) and brain (D) were also measured at 6 h after the start of topical application in wild-type (open columns) and *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> (closed columns) mice. Data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 9 and 4 in plasma and tissue samples, respectively). \*Significantly different from wild-type mice ( $p < 0.05$ ).

### 3-3-2. Dexamethasoneを点滴静注時における皮内動態の解析

Dexamethasone を経皮投与時の血漿中濃度が wild-type マウスに比べて、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスで低下した原因 (Fig. 9A) として、経皮吸収性の差以外に血中からの消失過程の差に起因した可能性も考えられる。そこで dexamethasone の点滴静注を行い、両マウスにおける血漿中濃度推移を確認した。血漿中 dexamethasone 濃度は投与後6時間まで、wild-type マウスと*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスで類似した推移を示した (Fig. 10A)。したがって、P-gp 及び BCRP は dexamethasone の血液中からの消失過程には関与しないことを確認した。次に、投与開始後 6 時間における各組織中 dexamethasone 濃度を評価し、 $K_p$  を算出した。脳における  $K_p$  は経皮投与時と同様に wild-type マウスに比べて、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスで高値を示した (Fig. 10B)。一方、皮膚 (腹部、脇腹、背部、眉間、頬)、耳及び足 (前足、後足) ではいずれの組織においても wild-type マウスと *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスで  $K_p$  に差は認められなかった (Fig. 10B)。しかしながら、脇腹皮膚を表皮と真皮に分離して両組織中濃度を評価した結果、表皮中濃度は wild-type マウスに比べて、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスで高値を示した (Fig. 10C)。また、 $K_{ps}$  は wild-type マウス ( $0.948 \pm 0.098$ , mean  $\pm$  S.E.M.) に比べて、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウス ( $1.52 \pm 0.07$ , mean  $\pm$  S.E.M.) で高値を示した。



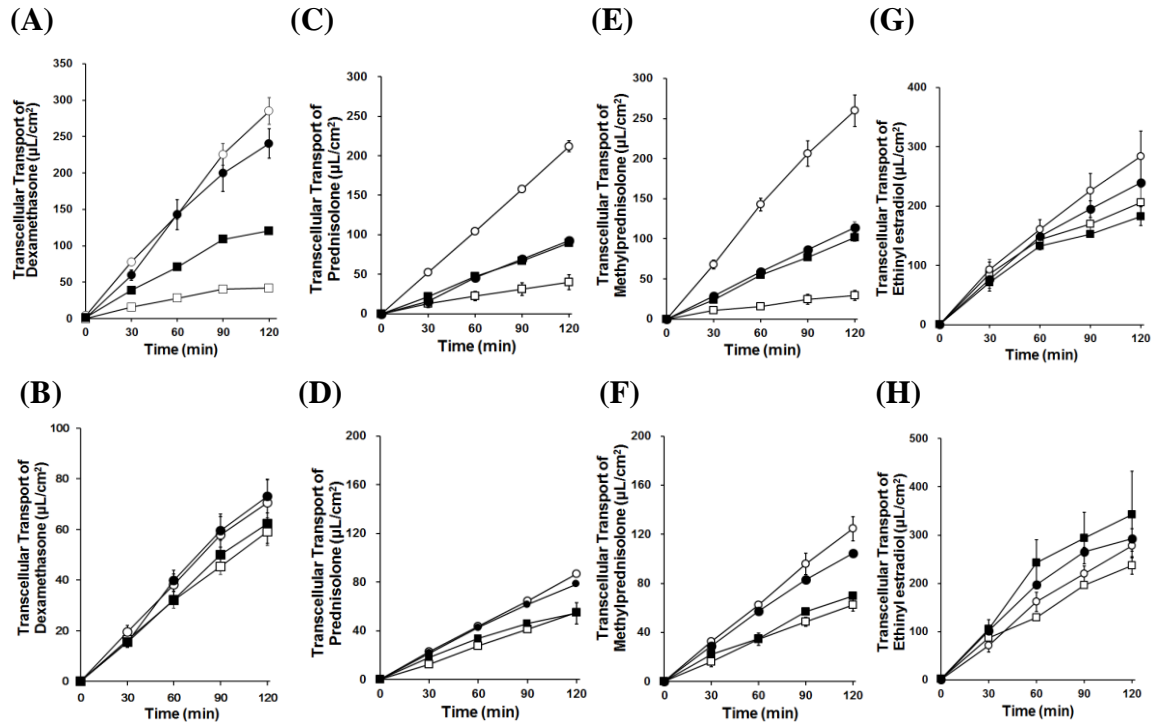
**Fig. 10. Plasma concentration and tissue distribution of dexamethasone in wild-type and *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> mice during intravenous infusion.**

Dexamethasone was intravenously infused at a rate of 100 ng/min. The concentration of dexamethasone in plasma (A) was measured in wild-type (open circles) and *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> (closed circles) mice. Tissue-to-plasma concentration ratios (B), and concentrations in epidermis and dermis of the side abdominal skin (C) were also measured at 6 h after the start of infusion in wild-type (open columns) and *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> (closed columns) mice. Data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M (n=4-5). \*Significantly different from the wild-type mice ( $p < 0.05$ ).



### 3-3-3. トランスポーター安定発現細胞を用いたdexamethasoneの経細胞輸送実験

P-gp 及び BCRP による dexamethasone の輸送を評価するため、LLC-MDR1 細胞及び MDCKII/PDZK1/BCRP 細胞を用いて dexamethasone の経細胞輸送実験を実施した。LLC-MDR1 細胞において、dexamethasone の透過は AP-to-BL 方向に比べて、BL-to-AP 方向が高く推移した (Fig. 11A)。また、AP-to-BL 方向の透過は P-gp 阻害剤である itraconazole により増加が認められた (Fig. 11A)。Dexamethasone 単独投与時及び itraconazole 併用時における dexamethasone の ER はそれぞれ 6.65 及び 2.01 であり、itraconazole 併用時に ER が減少したことから、dexamethasone は P-gp の基質であることを確認した。一方、MDCKII/PDZK1/BCRP 細胞においては、dexamethasone の透過に方向性は認められず、BCRP 阻害剤である Ko143 による影響も認められなかった (Fig. 11B)。



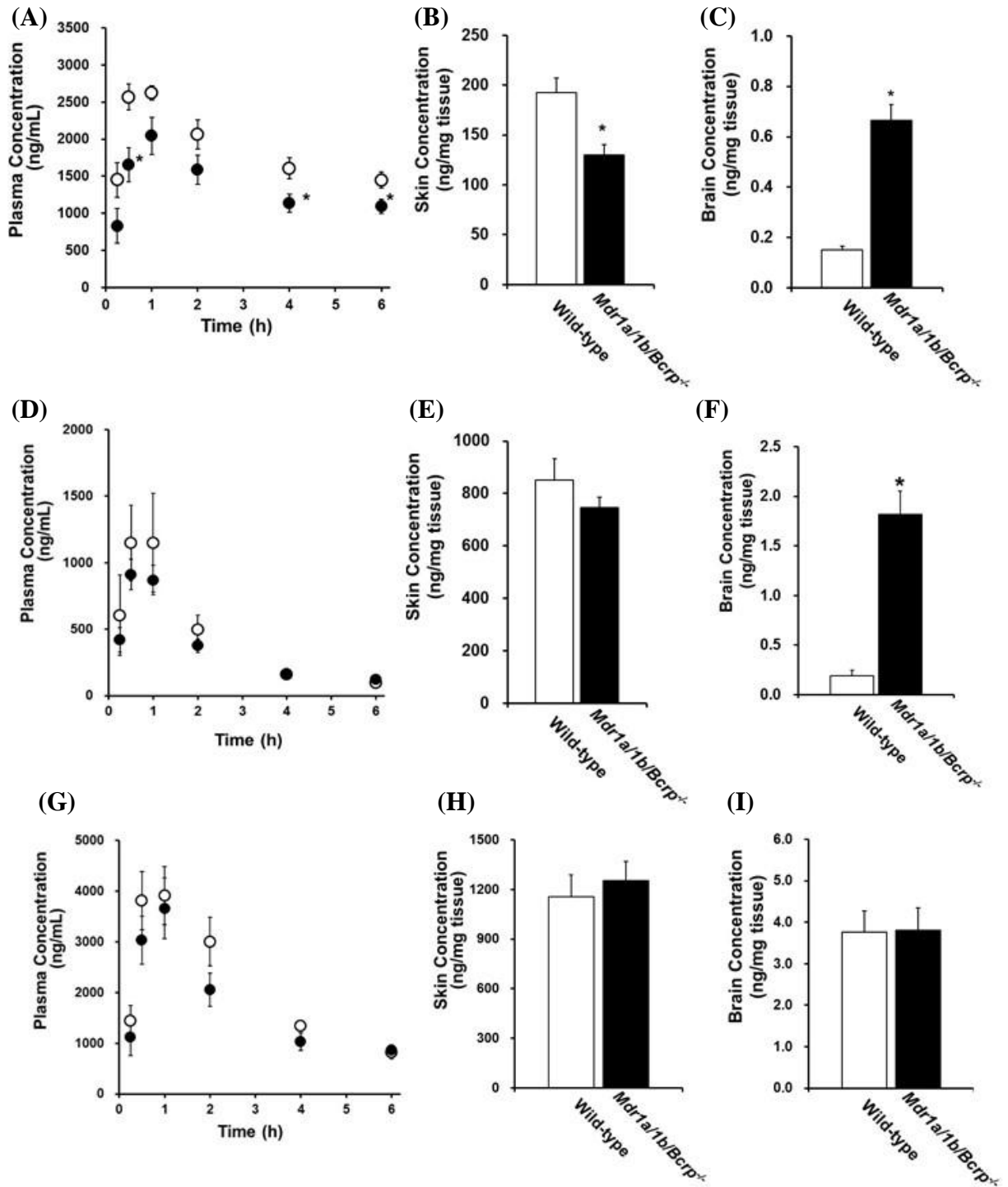
**Fig. 11. Transcellular transport of dexamethasone (A, B), prednisolone (C, D), methylprednisolone (E, F) and ethinyl estradiol (G, H) by P-gp and BCRP.**

Transport of dexamethasone (10  $\mu\text{mol/L}$ ) in the AP-to-BL (squares) and BL-to-AP (circles) directions was measured across LLC-MDR1 cells (A, C, E, G) and MDCKII/PDZK1/BCRP cells (B, D, F, H). Transport was examined in the presence (closed symbols) or absence (open symbols) of the P-gp inhibitor itraconazole (25  $\mu\text{mol/L}$ , panel A) or elacridar (5  $\mu\text{mol/L}$ , panels C, E, G) in LLC-MDR1 cells and the BCRP inhibitor Ko143 (1  $\mu\text{mol/L}$ ) in MDCKII/PDZK1/BCRP cells. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 3).

**3-3-4. 他の外用ステロイドにおけるP-gpを介した*in vivo*経皮吸収性の評価**

Dexamethasone 以外の外用ステロイドの経皮吸収についても P-gp の関与を明らかにするため、wild-type 及び *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> マウスを用いて、prednisolone、methylprednisolone 及び ethinyl estradiol の *in vivo* 経皮投与実験を実施した (Fig. 12)。まず、prednisolone を経皮投与後の血漿中濃度は wild-type マウスに比べて、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> マウスで低く推移し、経皮投与後 0.5、4 及び 6 時間では有意な低下を認めた (Fig. 12A)。投与後 6 時間における皮膚中濃度も血漿中濃度と同様に wild-type マウスに比べて、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> マウスで低値を示した (Fig. 12B)。したがって、prednisolone についても dexamethasone の経皮投与時 (Fig. 9) と同様の傾向を認めた。一方、脳中 prednisolone 濃度については wild-type マウスに比べて、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> マウスで顕著に増加した (Fig. 12C)。なお P-gp は prednisolone の脳移行を抑制することが報告されており (Karssen *et al.*, 2002)、今回の結果は既報と一致する結果であった。Methylprednisolone では、経皮投与後の脳中濃度が wild-type マウスに比べて、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> マウスで高値を示した (Fig. 12F)。一方、血漿及び皮膚中濃度は wild-type マウスと *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> マウスで差は認められなかった (Fig.

12D, 12E)。また、ethinyl estradiol 経皮投与後の血漿、皮膚及び脳中濃度はいずれも wild-type マウスと *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> マウスで差は認められなかった (Fig. 12G -I)。



**Fig. 12. Transdermal absorption of prednisolone, methylprednisolone and ethinyl estradiol in mice after topical application to tape-stripped skin.**

Prednisolone (50 mg/mL), methylprednisolone (50 mg/mL) and ethinyl estradiol (10 mg/mL) dissolved in DMSO were each applied to patches for topical administration, and two patches were applied to tape-stripped abdominal skin. Plasma concentrations of prednisolone (A), methylprednisolone (D) and ethinyl estradiol (G) were measured in wild-type (open circles) and *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> (closed circles) mice. Concentrations of prednisolone (B, C), methylprednisolone (E, F) and ethinyl estradiol (H, I) in skin (B, E, H) and brain (C, F, I) were also measured at 6 h after the topical application in wild-type (open columns) and *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> (closed columns) mice. Data are expressed as the mean ± S.E.M. (n = 3-4). \*Significantly different from wild-type mice ( $p < 0.05$ ).

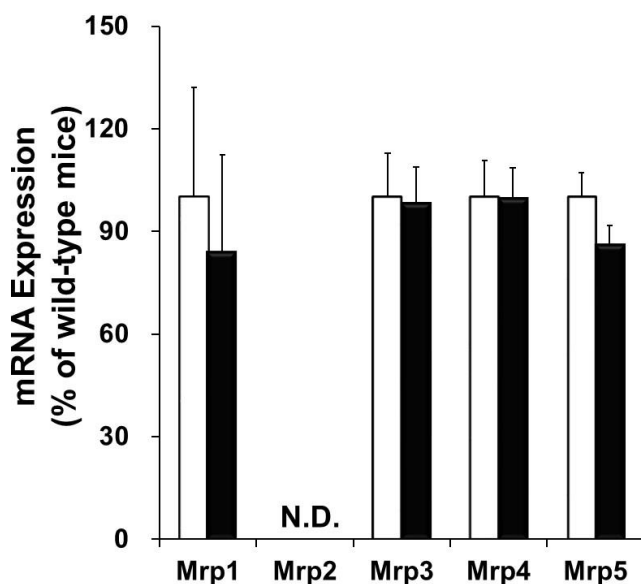
**3-3-5. トランスポーター安定発現細胞を用いた外用ステロイドの経細胞輸送実験**

Prednisolone、methylprednisolone 及び ethinyl estradiol について、P-gp 及び BCRP による輸送を確認するため、LLC-MDR1 細胞及び MDCKII/PDZK1/BCRP 細胞を用いた経細胞輸送実験を実施した。LLC-MDR1 細胞では、prednisolone 及び methylprednisolone の透過は AP-to-BL 方向に比べて、BL-to-AP 方向が高く推移した (Fig. 11C, 11E)。また、P-gp 阻害剤である elacridar により、両ステロイドの AP-to-BL 方向の透過は増加し、BL-to-AP 方向の透過は低下した (Fig. 11C, 11E)。なお、prednisolone 単独投与時及び elacridar 併用時の ER はそれぞれ 5.37 及び 1.05 で、methylprednisolone ではそれぞれ 9.10 及び 1.11 であった。一方、ethinyl estradiol は透過の方向性は認められず、elacridar の影響も認められなかった (Fig. 11G)。MDCKII/PDZK1/BCRP 細胞では、prednisolone 及び methylprednisolone の透過はともに AP-to-BL 方向に比べて、BL-to-AP 方向の透過がわずかに高く推移したが、BCRP 阻害剤である Ko143 による影響は認められなかった (Fig. 11D, 11F)。また、ethinyl estradiol の透過については方向性が認められず、Ko143 による影響も認めら

れなかった (Fig. 11H)。これらの結果から、prednisolone と methylprednisolone は P-gp の基質であることが示された。

### 3-3-6. *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスの皮膚におけるABCトランスポーターの発現量評価

皮膚には P-gp 及び BCRP 以外に、MRP の発現も報告されている (Li *et al.*, 2005; Heise *et al.*, 2010)。また、これらのトランスポーターは P-gp 及び BCRP とともに様々な薬物の体内動態に関与することが知られている。そこで、wild-type 及び *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスの皮膚で、P-gp 及び BCRP 以外の ABCトランスポーターの発現量に差がある可能性を考え、MRP1-5 の遺伝子発現量を評価した。両マウスの皮膚において、MRP2 を除くトランスポーターの発現が認められ、いずれのトランスポーターも wild-type と *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスで発現量に差は認められなかった (Fig. 13)。



**Fig. 13. Gene expression of various ABC transporters in skin of wild-type and *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> mice.**

The mRNA level for each transporter in wild-type (open columns) and *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> (closed columns) mice was quantified by RT-PCR and normalized by that of 36B4. Each point represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 3). N.D., not detected.

#### 第4節 考察

外用ステロイドを含め、薬物の経皮吸収はこれまで単純拡散により説明されてきた (Mitragotri *et al.*, 2011)。一方、マウス及びヒト皮膚において、P-gp及びBCRPの発現が確認されている (Sleeman *et al.*, 2000; Baron *et al.*, 2001; Triel *et al.*, 2004; Yano *et al.*, 2005; Skazik *et al.*, 2011) が、これらのトランスポーターが外用薬の経皮吸収に対する寄与は明らかになっていない。そこで本章では、P-gがdexamethasoneを含む一部の外用ステロイドの経皮吸収に寄与することを明らかにした。まず、dexamethasoneを経皮投与後の皮膚及び血漿中濃度はwild-typeマウスに比べて、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスで低下した (Fig. 9A, 9B)。一方、dexamethasoneを点滴静注時の血漿中濃度推移は両マウスで差がなかったことから、P-gp及びBCRPはdexamethasoneの血液中からの消失に関与しなかった (Fig. 10A)。したがって、dexamethasoneを経皮投与後の*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスにおける血漿中濃度の低下は、経皮吸収性の差に起因したと考えた。また、LLC-MDR1細胞を用いた経細胞輸送実験において、dexamethasoneの排泄方向優位な輸送を認め、その方向性はitraconazoleにより消失したことから、dexamethasoneがP-gpの基質であることを確認した (Fig. 11A)。さらに、経皮投与後の皮膚を表皮及び真皮に分離して各組織中濃度を評価した結果、真皮中濃度のみがwild-typeマウスに比べて、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスで低下し (Fig. 9C)、第2章で確認したRho123を経皮投与時との結果 (Fig. 2C) と同様の結果を示した。また、prednisoloneを経皮投与時の皮膚及び血漿中濃度についてもwild-typeマウスに比べて、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスで低下した (Fig. 12A, 12B) ことから、dexamethasone以外のステロイドの経皮吸収に対してもP-gpが寄与することが示唆された。なお、wild-typeマウスに比べて、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスでdexamethasone及びprednisoloneの経皮吸

収性は低下したものの、完全な消失は認められなかった (Figs. 9, 12)。そのため、単純拡散も含め、P-gp以外を介した経皮吸収機構の存在も考えられるが、本研究は少なくともP-gが臨床使用されている外用ステロイドの経皮吸収に寄与することを初めて明らかにした。

外用の皮膚疾患治療薬の中でもステロイドは様々な皮膚疾患に汎用され、特にアトピー性皮膚炎の治療においては第1選択薬として使用されている (FERENCE *et al.*, 2009; Ring *et al.*, 2012)。しかし、ステロイドの長期使用は、皮膚委縮やステロイド性ざ瘡のような局所副作用に加えて、副腎抑制や高血糖、緑内障などの重篤な全身性副作用を引き起こすリスクを有している (Hengge *et al.*, 2006)。そのため、アトピー性皮膚炎のような慢性疾患においてはステロイドの長期使用が必要であるにもかかわらず、副作用のリスクがその使用を制限するとともに、患者のコンプライアンスを低下させており、有用な解決策が望まれている。そこで、外用ステロイドの皮内貯留の改善及び全身暴露の軽減を目指して、これまでに様々な方法が検討されてきた (Korting *et al.*, 2002; Sul *et al.*, 2013; Siddique *et al.*, 2015) が、副作用を回避する方法の確立には至っていない。本章ではP-gpの阻害により、経皮投与後のステロイドの皮内貯留を改善し、全身暴露を軽減できる可能性を考え、実際に*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスではwild-typeマウスに比べて、dexamethasoneを経皮投与の真皮及び血漿中濃度は低下するが、表皮中濃度は変化しないことを示した (Fig. 9C)。したがって、P-gp阻害剤の使用は、ステロイドを用いた表皮に病巣を有する炎症性疾患の治療において、薬効を維持しつつ、全身性副作用の軽減に有用である可能性が期待される。なお、P-gp阻害剤の中には経皮投与での臨床使用実績があるものも存在する。例えば、外用の皮膚疾患治療薬ではketoconazoleやerythromycin、tacrolimusが、外用の添加剤ではpolyethylene

glycol-300やpluronic P85がP-gp阻害能を有している (Batrakova *et al.*, 2001; Ekins *et al.*, 2002; Hugger *et al.*, 2002; Kishimoto *et al.*, 2014)。そのため、今後更なる検討が必要ではあるが、これらの臨床使用実績があるP-gp阻害剤の使用は、ステロイドの皮内動態制御において有用な手法になることが期待される。

Dexamethasoneの経皮投与時にはwild-typeマウスに比べて、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスで真皮中濃度が低下したのに対し、点滴静注時には表皮中濃度が増加した (Figs. 9C, 10C)。経皮投与時に*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスで真皮中濃度が低下した結果は第2章において、皮膚の2-コンパートメントモデルを用いて説明できることを示した (Fig. 8B)。そこで本章では、静注時に表皮中濃度が増加した結果を2-コンパートメントモデル (Fig. 8B) を用いて考察した。なお、考察に当たり、以下の仮定 (iii-v) を設けた。

仮定 (iii) 静脈内投与であるため、パッチからの吸収はない ( $R=0$ )

(iv) 角質層を剥離していない全総皮膚であるため、表皮から外界への排出は起こらない ( $P_6=0$ )

上記の仮定を満たすとき、定常状態におけるdexamethasoneの表皮 ( $C_1$ ) 及び真皮中濃度 ( $C_2$ ) は以下の物質収支式で記載できる。

$$C_1 = C_p \cdot (P_4 P_5) / (P_2 P_3) \quad (\text{Eq. 9})$$

$$C_2 = C_p \cdot P_4 / P_3 \quad (\text{Eq. 10})$$

P-gpは $P_2$ 及び $P_3$ の輸送過程に関与するため、上記の式 (Eq. 9, 10) より、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウス ( $P_2$ 及び $P_3$ が低下時) では表皮 ( $C_1$ ) 及び真皮中濃度 ( $C_2$ ) の両方が増加すると考えられる。しかし、上記の式において、表皮 ( $C_1$ ) 中濃度は $P_2$ 及び $P_3$ の影響を受けるのに対し、真皮中濃度 ( $C_2$ ) は $P_3$ の影響のみ受ける。そのため、 $P_2$ 及び $P_3$ 低下の影響は真皮 ( $C_2$ ) に比べて、表皮 ( $C_1$ ) の方が大きいことが推察され



る。また、血液脳関門に比べて、真皮血管内皮細胞のタイトジャンクションが脆弱であること (Olesen, 1989) から、真皮及び血液間の輸送に対するP-gpの寄与 (P<sub>3</sub>) は小さいと考えられる。実際、dexamethasoneの点滴静注実験において、脳のK<sub>p</sub>値はwild-typeマウスに比べて、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスで明らかな増加を認めたのに対し、皮膚のK<sub>p</sub>値は両マウスで差が認められなかった (Fig. 10B)。さらに、表皮においては、顆粒層及び基底層にはタイトジャンクションが存在し、異物の経皮吸収に対するバリアを担っていることが報告されている (Furuse *et al.*, 2002; Sayedyahosseini *et al.*, 2016)。そのため、表皮において、P-gpはタイトジャンクションとともに皮膚バリアを担っていることが推察される。したがって、P-gpノックアウト時には真皮 (P<sub>3</sub>) に比べて、表皮 (P<sub>2</sub>) でその影響がより顕著に認められたと推察した。しかしながら、現時点では経皮吸収に対するP-gpの輸送活性しか評価できておらず、P-gpの皮膚における発現の極性は評価できていない。そのため、今後、P-gpの皮膚での発現の極性についても詳細な検討が必要である。

LLC-MDR1発現細胞を用いた経細胞輸送実験により、methylprednisoloneがP-gpの基質であることを明らかにした (Fig. 11E)。しかし、wild-type及び*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスにmethylprednisoloneを経皮投与後の皮膚及び血漿中濃度は差が認められず (Fig. 12D, 12E)、methylprednisoloneの経皮吸収に対するP-gpの影響は認められなかった。したがって、*in vitro*経細胞輸送実験で見出したP-gpの基質は、皮膚では必ずしも基質に成りえないことが示唆された。実際、予備検討段階で、cyclosporin Aやitraconazole、ketoconazoleなどステロイド以外のP-gp基質を用いて*in vivo*経皮吸収実験を行ったが、いずれの薬物もwild-typeマウスと*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスで経皮吸収性に差は認められなかった (data not shown)。Methylprednisoloneの経皮吸収に対して

P-gpの影響が認められなかった原因として、dexamethasoneやprednisoloneに比べて、methylprednisoloneの皮膚透過性が高く、経皮吸収全体に対するP-gpの寄与が相対的に低い可能性がある。実際、methylprednisolone、dexamethasone及びprednisoloneは同一投与量でマウスに経皮投与したが、皮膚中濃度はdexamethasoneやprednisolone (100~200 ng/mg tissue) に比べて、methylprednisoloneでは明らかに高値 (800 ng/mg tissue) を示した (Figs. 9B, 12B, 12E)。したがって、P-gpは皮膚透過性の低い医薬品の経皮吸収に対して、大きな影響を及ぼす可能性が示唆された。一方、P-gp基質であるketoconazoleを服用後のヒトにおける角質層/血漿中濃度比はfluconazoleに比べて、低いことが報告されている (Harris *et al.*, 1983; Faergemann *et al.*, 1993)。また、ketoconazoleはP-gp基質であるが、fluconazoleはP-gp基質ではないこと (Yasuda *et al.*, 2002; von Moltke *et al.*, 2004) から、fluconazoleに比べて、ketoconazoleで角質層/血漿中濃度比が低い原因は、P-gpによるketoconazoleの表皮から血液中への輸送に起因した可能性がある。そのため、P-gpは静脈内投与や経口投与後の医薬品の皮内分布に対しても関与している可能性も考えられる。

本検討では、評価したステロイドの中にBCRPの基質が含まれていないため (Fig. 11)、BCRPがステロイドの経皮吸収に及ぼす影響は評価できていない。しかし、第2章のRho123を用いた*in vivo*経皮投与検討において、Rho123を経皮投与後の皮膚及び血漿中濃度は*Mdr1a/1b*<sup>-/-</sup>マウスに比べて、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスで低下する傾向を認めた (Fig. 2)。したがって、BCRPが基質の経皮吸収に関与している可能性もある。さらに表皮にはMRP、OCTN1やPEPT2など他の薬物トランスポーターも機能的に発現している (Li *et al.*, 2005; Markova *et al.*, 2009; Heise *et al.*, 2010; Kudo *et al.*, 2016)。MRP1はマウス皮膚組織において、fluo3及びgrefapfloxacinの排泄方向の輸送に寄与

すること (Li *et al.*, 2005)、MRPsがヒト表皮ケラチノサイトにおいて、アレルギーやステロイドホルモンの細胞外排出に寄与することが示されている (Heise *et al.*, 2010)。また、Markovaらはヒト表皮ケラチノサイトにOCTN1が発現し、抗酸化剤であるergothioneineの細胞内取り込みに寄与することを報告している (Markova *et al.*, 2009)。しかしながら、これらはいずれも*in vitro*での検討であり、トランスポーターが基質の*in vivo*経皮吸収に及ぼす影響は明らかになっていない。一方、Kudoらは最近、PEPT2がglycylsarcosineの*in vivo*経皮吸収に寄与することを報告した (Kudo *et al.*, 2016)。したがって、様々なトランスポーターが皮膚において、基質の吸収や排泄に関与している可能性が考えられる。また、これらのトランスポーターはいずれも表皮に発現することから (Markova *et al.*, 2009; Heise *et al.*, 2010; Kudo *et al.*, 2016)、それらは様々な薬物や化粧品成分の真皮への移行に協奏的に関与している可能性がある。そのため、これらのトランスポーターは、皮内動態制御法の開発において有用なターゲットになることが期待される。

本章では、P-gpが、外用ステロイド薬であるdexamethasone及びprednisoloneの経皮吸収に寄与することを明らかにした。また、P-gpは主にステロイドの表皮から真皮への輸送に寄与することを示した。したがって、本知見は表皮特異的な薬物送達技術の開発において、P-gpが有用なターゲットになる可能性を示した。

## 第4章 Oxazolone 誘発皮膚炎における P-gp と BCRP を介した histamine の皮内蓄積及び搔破行動の抑制

### 第1節 緒言

皮膚炎はアトピー性皮膚炎や乾癬など、様々な皮膚疾患で見られる代表的な病態である。また、皮膚炎は緩解と増悪を繰り返して慢性化するため、患者の QOL を大きく低下させる病態の一つである。炎症部位において、プロスタグランジンやヒスタミンなどの様々な炎症及び痒みのメディエーターが蓄積し (Johnson et al., 1960; Hammarström et al., 1975; Krogstad et al., 1997; Reilly et al., 2000; Potenzieri et al., 2012)、皮膚炎を増悪させる。そのため、これら内因性物質の皮内蓄積を抑えることが皮膚炎の症状改善につながる。実際に、内因性物質の皮内蓄積の抑制を目指して、生合成酵素の阻害剤が見出され、それらが皮膚炎や痒みを軽減することが報告されている (Giannaras et al., 2005; Cho et al., 2010; Inami et al., 2013)。しかし、内因性物質の皮内蓄積の抑制はこれまで生合成酵素を標的にした研究に留まっており、皮膚からの消失機構に注目した検討は少ない。

内因性物質の皮膚中濃度はそれらの生合成、代謝及び皮膚から血液中への排泄により制御されている (Sondergaard et al., 1972; Francis et al., 1977; Heavey et al., 1984; Aked et al., 1987; Potenzieri et al., 2012; Gutowska-Owsiak et al., 2014)。例えば、痒みのメディエーターであるヒスタミンは皮膚では、histidine decarboxylase (HDC) により合成された後、histamine *N*-methyltransferase (HNMT) により代謝される (Sondergaard et al., 1972; Francis et al., 1977)。さらに、ヒスタミンは速やかに皮膚から血液中に排出される (Heavey et al., 1984)。また、ロイコトリエンやプロスタグランジンの皮膚からの消失には、代謝よりも血液中への排泄の寄与が大きいことが示唆されている (Aked et al., 1987)。以上のように、内因性物質の皮内蓄積には生合成や代謝に加えて、血液中への排泄が関与すると考えられる。

脳や精巣では血管内皮細胞がタイトジャンクションを形成しているため、組織と血中間の物質の移行は制限される。一方、それら組織に比べて、皮膚の血管内皮細胞同士の結合は脆弱である (Olesen et al., 1989) ため、これまで内因性物質の皮膚からの血液中への排泄は細胞間隙輸送により考えられてきた。一方で近年、内因性物質の皮膚から血液中への移行に膜輸送体が寄与する可能性が示されている (Hashimoto et al., 2013)。脳血管内皮細胞に発現する代表的な膜輸送体である P-gp と BCRP が、皮膚の真皮血管内皮細胞にも発現する (Skazik et al., 2011; Hashimoto et al., 2013)。さらに我々は第 2 章及び第 3 章で、マウスにおいて P-gp 又は BCRP が皮膚から血液中への典型基質の rhodamine123 及び外用ステロイドの dexamethasone と prednisolone の移行に寄与することを報告した。一方、P-gp 及び BCRP は脳の血管内皮細胞にも発現し、様々な基質を脳から血液中に排出している (Agarwal et al., 2012; Qosa et al., 2012; Li et al., 2013)。そのため、脳と同様に皮膚においても P-gp 及び BCRP は内因性基質の皮膚から血液中への排泄を担い、その皮内動態を制御している可能性がある。BCRP 又は P-gp 発現細胞を用いた *in vitro* 実験では、皮膚炎及び痒みのメディエーターである尿酸やエンドルフィンは、それぞれ BCRP 及び P-gp の基質であることが確認されている (Hosomi et al., 2012; Oude Elferink et al., 2001) が、P-gp 及び BCRP の皮膚における内因性基質は解明されておらず、その皮内蓄積及び皮膚炎に及ぼす影響も明らかになっていない。

そこで本研究では、アトピー性皮膚炎に類似した病態を示す皮膚炎モデルであるオキサゾロン誘発皮膚炎マウス (Webb et al., 1998; Man et al., 2008) を用いて、P-gp 及び BCRP が内因性物質の皮膚から血液中への排泄に関与し、皮膚炎の増悪に影響を及ぼす可能性について検討した。まず、両トランスポーターの皮膚炎に対する関与を明らかにするため、野生型及び P-gp と BCRP ノックアウト (*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>) マウスにオキサゾロンを反復塗布し、皮膚炎の重症度について検討した。次に、両トランス

ポーターがいずれの内因性基質を皮膚から血液中に輸送することにより、皮膚炎の抑制に寄与するのかを検討するため、オキサゾロン塗布後の皮膚及び血漿のメタボローム解析を行った。さらに、P-gp 及びBCRPが当該メタボロームで見出したヒスタミンの皮内蓄積に関与する可能性が示されたため、両トランスポーターによるヒスタミン皮内蓄積制御機構についても検討を加えた。

## 第2節 実験方法

### 4-2-1. 試薬

Oxazolone、1-methylhistamine dihydrochloride 及び oxymetazoline hydrochloride は Sigma Chemical Co. Ltd. (St. Louis, MO) より、histamine は Nacalai Tesque Inc. (Kyoto, Japan) より、 $[^3\text{H}]$  Histamine dihydrochloride (22 Ci/mmol) は Perkin Elmer Inc. (Waltham, MA) より購入した。その他の全ての試薬は特級試薬を用いた。

### 4-2-2. 実験動物

FVB/NJcl マウス (wild-type、雄性、7~9 週齢) 及び *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> マウス (雄性、7~9 週齢) を第2章の実験方法 (2-2-2) と同様に購入、飼育して実験に用いた。なお、すべての動物実験は金沢大学の動物実験指針に従って実施した。

### 4-2-3. Oxazolone による感作及び皮膚炎の惹起

Man ら及び Webb らの方法を参考に oxazolone を用いて、マウスに感作及び惹起を行って皮膚炎を誘発した (Webb *et al.*, 1998; Man *et al.*, 2008)。感作及び惹起時は直前に動物用バリカンを用いてマウスの体毛を刈った。感作はジエチルエーテル吸入麻酔下で背部皮膚及び左耳に 3% oxazolone 溶液をそれぞれ 20 及び 10  $\mu\text{L}$  塗布して実施した。また、惹起は感作 8 日後より 2 又は 3 日に 1 回の頻度でマウスの両脇腹及び左耳に 0.5% oxazolone 溶液をそれぞれ 60 及び 10  $\mu\text{L}$  ずつ塗布して実施した。なお、溶媒対照群には同量のエタノールを塗布した。感作及び惹起日には oxazolone 溶液の塗布直前にデジタルシクネスゲージ (Model7301, Mitutoyo Corporation, Kawasaki, Japan) を用いて耳介厚を測定した。惹起日には oxazolone 溶液の塗布 2 時間前から投与までの間、搔破回数も計測した。Oxazolone 溶液の塗布 18 日目には塗布 24 時間後にジエチルエーテル吸入麻酔下で腹部大静脈より全血を採血後、遠心 (1500 $\times$ g, 10 min, 4 $^{\circ}$ C) して血漿を採

取した。次に oxazolone 塗布部の皮膚を採取し、メタボローム解析又は皮膚中 histamine/1-methylhistamine 濃度測定に供する際は液体窒素ですぐに凍結した。皮膚を RT-PCR に供する際は氷冷した RNA later (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) に漬けてハサミで裁断し、4°Cで一晩静置後、-80°Cで保管した。

#### **4-2-4. Oxazolone 反復塗布後の皮膚及び血漿試料のメタボローム解析**

Oxazolone 反復塗布群及び溶媒対照群の皮膚及び血漿をメタボローム解析は先の報告に従って、慶応大学先端生命科学研究所の曾我朋義教授に実施頂いた (Soga *et al.*, 2006、Soga *et al.*, 2009、Akiyama *et al.*, 2012)。

##### **4-2-4-1. 皮膚試料の前処理**

皮膚試料にジルコニアビーズ及び 20 µmol/L methionine sulfone/MES/CSA 溶液 (メタノール溶液) 500 µL を加え、Shake Master NEO (Bio Medical Science, Tokyo, Japan) で皮膚を破砕した。クロロホルム 500 µL 及び milliQ 水 200 µL を加えて攪拌後、遠心 (4600×g, 15 min, 4°C) して上層の水-メタノール層 300 µL を限外ろ過フィルター (分画分子量 5,000 Da) に採取した。遠心 (9100×g, 3h, 4°C) してろ液を 35°Cで遠心濃縮し、200 µmol/L 3-aminopyrrolidine 及び trimesate 水溶液 50 µL に溶解し、CE-TOFMS 測定に供した。

##### **4-2-4-2. 血漿試料の前処理**

血漿試料 40 µL に 20 µmol/L methionine sulfone/MES/CSA 溶液 400µL を添加して攪拌後、クロロホルム 400 µL 及び milliQ 水 120 µL を加えて再度攪拌した。遠心 (10,000×g, 3 min, 4°C) 後、上層の水-メタノール層 300 µL を限外ろ過フィルター (分画分子量 5,000 Da) に採取し、遠心 (9100×g, 7h, 4°C) 後、ろ液を 40°C



で遠心濃縮した。皮膚試料と同様に 200  $\mu\text{mol/L}$  3-Aminopyrrolidine 及び Trimesate 水溶液 50  $\mu\text{L}$  に溶解し、CE-TOFMS 測定に供した。

#### **4-2-4-3. CE-TOFMS による分析**

Instrument: CE; Agilent capillary electrophoresis system

MS; Agilent G3250AA LC/MSD TOF system

LC; Agilent1100 series

(Agilent Technologies, Waldbronn, Germany)

#### 陽イオン性代謝物質の測定:

Capillary: Fused-silica, i.d. 50  $\mu\text{m}$ ×100 cm

Capillary Buffer: 1 mol/L Formate

Applied Voltage: 30 kV

Polarity: Positive

Capillary voltage: 4000 V

Flow Rate: 10  $\mu\text{L}/\text{min}$

#### 陰イオン性代謝物質の測定

Capillary: COSMO (+), i.d. 50  $\mu\text{m}$ ×110 cm

Capillary Buffer: 50 mmol/L Ammonium acetate (pH8.5)

Applied Voltage: 30 kV

Polarity: Negative

Capillary Voltage: 3,500 V

Flow rate: 10  $\mu\text{L}/\text{min}$

#### **4-2-5. トランスポーター安定発現細胞の培養**

第3章の実験方法 (3-2-6) に従って培養した。

#### **4-2-6. トランスポーター安定発現細胞を用いた<sup>[3H]</sup> histamine の取り込み実験**

細胞はPDMS plate (24well) に $3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>の細胞密度で播種し、3日間培養した。なお、PDMS plateは東京大学大学院工学系研究科酒井研究室 酒井康行教授より提供頂いた。3日間培養後、細胞をHBSS (pH 7.4) で2回洗浄してHBSS (pH 7.4) 500  $\mu$ Lを添加した。37°Cで30分間インキュベート後、37°Cで加温した400 dpm/ $\mu$ L <sup>[3H]</sup>histamine/ 400  $\mu$ mol/L histamine 含有HBSS (pH 7.4) 500  $\mu$ Lを添加し、細胞内取り込み実験を開始した。37°Cで120分間インキュベート後、投与液を回収し、細胞をice-cold HBSS (pH 7.4) で2回洗浄した。0.2 N NaOH 300  $\mu$ Lを添加して細胞を可溶化後、5N HCl 12  $\mu$ Lで中和した。得られた試料200  $\mu$ Lを液体シンチレーションカクテル (Cleasol I, Nacalai tesque Inc.) 1 mLと混和し、液体シンチレーションカウンター (LSC-5100, Aloha, Tokyo, Japan) を用いて放射活性を測定した。細胞可溶化後の試料におけるタンパク量はProtein Assay Kit (Bio-Rad, Hercules, CA) を用いて測定した。<sup>[3H]</sup> histamineの細胞内取り込み量 ( $\mu$ L/mg protein) は、放射活性を投与液の濃度(dpm/ $\mu$ L) 及びタンパク量で除して算出した。

#### **4-2-7. トランスポーター発現細胞を用いた1-methylhistamine の取り込み実験**

<sup>[3H]</sup>Histamineの細胞内取り込み実験の実験方法 (4-2-6) に従って実施した。なお、投与液には500  $\mu$ mol/L 1-methylhistamine 含有HBSS (pH 7.4) を用いた。また、37°Cで120分間インキュベート後の細胞はice-cold HBSS (pH 7.4) で2回洗浄後、蒸留水 300  $\mu$ Lを添加し、セルスクレイパーで回収した。遠心 (10,000 $\times$ g, 5 min) して得られた上清をLC/MS/MSを用いて、上清中の1-methylhistamine濃度を測

定した。

#### **4-2-8. LC/MS/MS による試料中 histamine 及び 1-methylhistamine 濃度測定**

試料中薬物濃度は LC/MS/MS を用いて以下の条件にて定量した。

##### **4-2-8-1. 皮膚試料の前処理**

皮膚試料は重量を測定後、タングステンビーズ (直径 6 mm、2 個) とともに Shake Master Neo 用マスターチューブ (Bio Medical Science, Tokyo, Japan) に入れて、40 ng/mL oxymetazoline 溶液 (内標準物質、アセトニトリル溶液) 1 mL を添加した。Shake Master NEO にて破碎後、遠心 (12000×g, 5 min, 4°C) して上清を採取した。上清は当量の 50 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液と混和して、遠心式フィルター (Ultrafree-MC-GV 0.22 μm, Millipore, Bedford, MA) を用いてろ過し、ろ液を LC/MS/MS に注入した。

##### **4-2-8-2. 細胞可溶化液の前処理**

細胞可溶化液 10 μL に 40 ng/mL 内標準溶液 40 μL 及びアセトニトリル 950 μL を添加した。攪拌後、遠心 (12000×g, 5 min, 4°C) して上清を採取した。上清は当量の 50 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液と混和後、遠心式フィルター (Ultrafree-MC-GV 0.22 μm) を用いてろ過し、ろ液を LC/MS/MS に注入した。

##### **4-2-8-3. LC-MS/MS 測定条件**

Instrument: LC; LC-20A series (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan)

MS; API4000 triple quadrupole mass spectrometer

(AB Sciex, Foster City, CA, USA)

Column :COSMOSIL HILIC

(5  $\mu$ m, 2.0 mm  $\times$  100 mm; Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan)

Mobile Phase: A) 50 mmol/L ammonium acetate

B) Acetonitrile

Time (min)	% of A	% of B
0	20	80
0.5	20	80
3.0	80	20
4.0	80	20
5.0	20	80
10.0	20	80

Flow Rate: 0.3 mL/min

Column Temperature: 40°C

Ionization: Electrospray

Polarity: Positive

Multiple Reaction Monitor: Histamine; m/z 111.80 to 94.80

1-Methylhistamine; m/z 126.08 to 109.00

Oxymetazoline (internal standard); m/z 261.50 to 91.20

#### **4-2-9. RT-PCR によるトランスポーター遺伝子発現量の評価**

第 3 章の実験方法 (3-2-9) に従って oxazolone 反復塗布群及び溶媒対照群のマウス皮膚から total RNA を抽出後、cDNA を作製し、RT-PCR を実施した。使用したプライマー配列を Table 2 に示す。健常成人、アトピー性皮膚炎患者及び乾癬患者の皮膚の cDNA は東京大学医学部皮膚科学教室 佐藤伸一教授より提供頂いた。ヒト皮膚における P-gp 及び BCRP の遺伝子発現量は、市販の MDR1 リアル

タイム PCR プライマーセット (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) 及び ABCG2 リアルタイム PCR プライマーセット (Roche Applied Science) を用いて、標準プロトコルに従って評価した。

Table 2. Primers for RT-PCR analysis

Gene	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (3' to 5')
Abcb1a	CATTTGGCAAAGCTGGAGAG	TGCTCCGGTGGTGTTTTTAG
Abcb1b	TTGGGATCACGTTCTCCTTC	GCACCAAAGACAACAGCAGA
Abcg2	TGGTTTGGACTCAAGCACAG	GGAATACCGAGGCTGATGAA
Abcc1	GCCCCAGTGTTACTGGTCA	AATTCCCGAGGATTGGACTC
Abcc2	CAAATCCAATTCTCTACCTATGCAC	CCAGAACATGGACAGGAACC
Abcc3	GCTGAGGGTGGGGATAATCT	AGCAGTGGCCTCGTCTAAAA
Abcc4	GAGCACACGGACGAGGAG	TTGCAAGGCACACTAACTGTC
Abcc5	CTGTACCAGGGCAACACAGA	CGTCCAGAATTTGGAGATGAG
Abcc6	CATCTTGCCAGGAATCAACA	AGACAGGACAGCACCAGCTC
Hdc	CTTGCACAGAGCTGGAGATG	AGCAGGGCAATTAAGTGGA
Hnmt	CCACCGAAGTGGGACTTTATT	GCACTGGCAGCTAAGAGACC
Mao a	CGGATATTCTCAGTCACCAATG	AGCTTCACTTTATCCCCAAGG
Mao b	TCTCAACAACCAATGGAGGA	TCCCCCTGTCTGGTCAATGT
IFN- $\gamma$	GCGTCATTGAATCACACCTG	TGAGCTCATTGAATGCTTGG
36B4	ACTGGTCTAGGACCCGAGAAG	TCCCACCTTGTCTCCAGTCT

マウス cDNA の PCR は、以下の条件で実施した。

95°C, 15 min  $\rightarrow$  (95°C, 10 sec  $\rightarrow$  60°C, 30 sec)  $\times$  40 cycle

ヒト cDNA の PCR においては、以下の条件で実施した。

95°C, 10 min  $\rightarrow$  (95°C, 15 sec  $\rightarrow$  60°C, 60 sec)  $\times$  40 cycle

内部標準遺伝子として、マウス皮膚においては 36B4 を、ヒトにおいては gapdh を用いて、mRNA 量を  $\Delta\Delta$ CT 法により定量した。

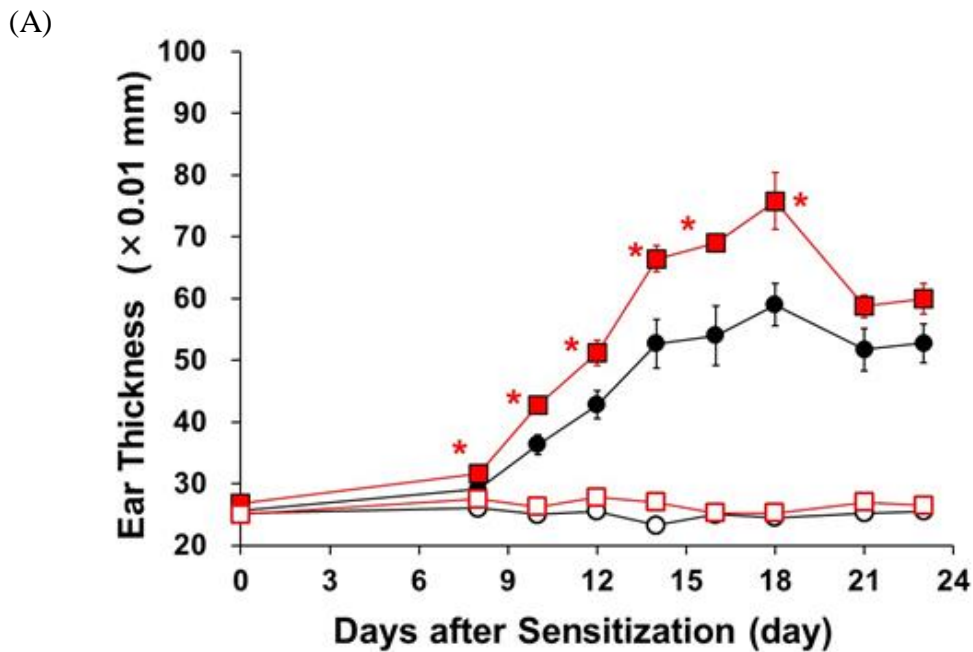
#### **4-2-10. データ解析**

有意差の検定は Student の  $t$ -検定を用いて行い、 $p < 0.05$  を満たす時に有意差があると判断した。

### 第3節 結果

#### 4-3-1. Oxazolone 誘発皮膚炎に対する P-gp 及び BCRP の影響

Wild-type 及び *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> マウスの耳及び両脇腹に oxazolone を反復塗布し、耳介厚の推移を評価した。耳介厚は wild-type 及び *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> マウスのいずれも溶媒対照群に比べて、oxazolone 塗布群で高く推移した (Fig. 14A)。また、oxazolone 塗布群における耳介厚は wild-type マウスに比べて、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> マウスで塗布開始後 8 日目 (惹起開始日) から 18 日目にかけて増加した。Oxazolone 塗布開始後 18 日目における耳介及び脇腹皮膚の所見を Fig. 14B に示す。Oxazolone 塗布群の耳介及び脇腹皮膚では紅斑、痂皮及び落屑が認められ、いずれも wild-type マウスに比べて、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> マウスで増悪した (Fig. 14B)。したがって、P-gp 又は BCRP が oxazolone 誘発皮膚炎の抑制に寄与する可能性が示された。





**Fig. 14 The difference of oxazolone-induced chronic dermatitis in wild-type and *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> mice.**

Ear thickness in oxazolone-treated *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> (closed red squares) mice was increased compared to that in oxazolone-treated wild-type (closed black circles), vehicle-treated wild-type (open circles) and *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> (open squares) mice for day 18 (A). Clinical symptoms of wild-type and *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> mice at day 18 (B). The repeated application of oxazolone to the ear and abdominal skin caused erythema, induration and abrasion. Each point represents mean  $\pm$  S.E.M (n=4-9). When error bars are not shown, they were smaller than the symbols. \*Significantly different from wild-type mice ( $p < 0.05$ ).

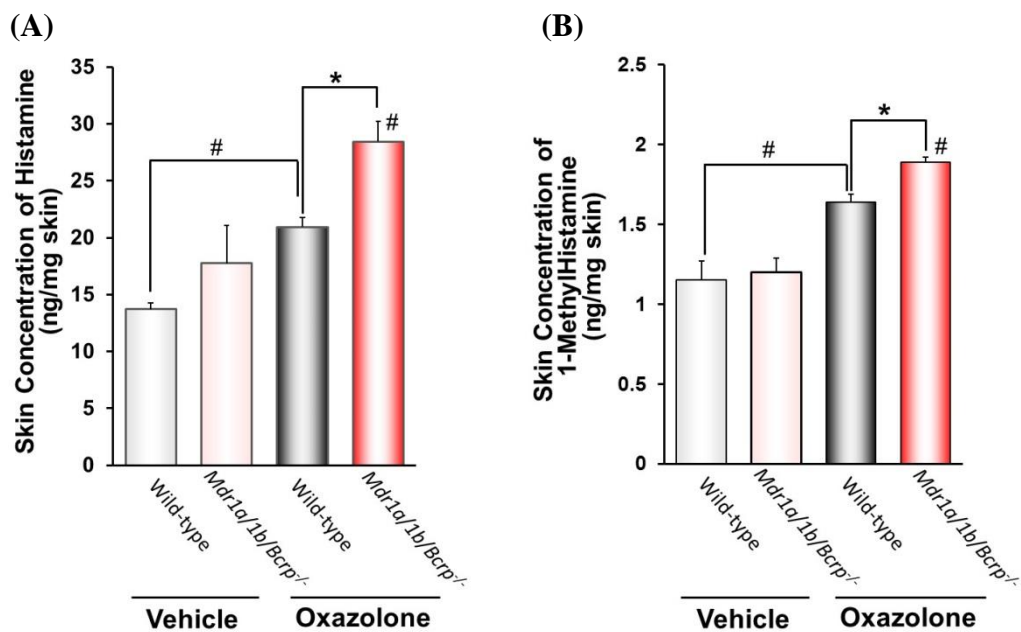
#### **4-3-2. Oxazolone 反復塗布後の皮膚のメタボローム解析**

P-gp 及び BCRP はマウスにおいて、基質の皮膚から血液中への排出に関与していることから、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスで皮膚炎が増悪した原因として、内因性炎症物質の皮内蓄積を考えた。そこで、それら内因性物質を特定するため、oxazolone 反復塗布群の皮膚及び血漿のメタボローム解析 (カチオン性物質:312 種類、アニオン性物質:270 種類) を実施した。Oxazolone 塗布群の皮膚では wild-type マウスに比べて、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスで合計 18 種類 (カチオン性物質:7 種類、アニオン性物質:11 種類) の代謝物濃度に有意な変動を認めた (Supplementary Tables S1-S4)。特に、痒



み又は皮膚での炎症メディエーターとして知られている (O'Mahony *et al.*, 2011; Kim 2012; Uratsuji *et al.*, 2012) histamine とその代謝物である 1-methylhistamine、urate 及び serotonin は oxazolone 塗布部の皮膚で増加した。これらの中で histamine は代表的な痒みのメディエーターであることに加え、炎症性細胞の遊走や皮膚バリアの回復遅延など様々な作用も有している (O'Mahony *et al.*, 2011; Gschwandtne *et al.*, 2013)。さらに、histamine 及び 1-methylhistamine は P-gp 及び BCRP との関連が明らかになっていない。そこで、histamine 及び 1-methylhistamine に着目して検討を進めた。

メタボローム解析において、oxazolone 塗布後の *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウス皮膚で histamine 及び 1-methylhistamine の増加を認めたことから、この結果を確認するため、LC/MS/MS を用いて、皮膚中 histamine 及び 1-methylhistamine 濃度を改めて評価した (Fig. 15)。Wild-type 及び *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスの皮膚中 histamine 濃度はともに溶媒対照群に比べて、oxazolone 反復塗布群で増加した (Fig. 15A)。また、oxazolone 反復塗布群の皮膚中 histamine 濃度は wild-type マウスに比べて、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスで増加しており、メタボロミクスと同様の傾向を示した (Fig. 15A)。一方、皮膚中 1-methylhistamine 濃度も histamine と同様の傾向を示し、両マウスでともに溶媒対照群に比べて、oxazolone 反復塗布群で増加したとともに、oxazolone 反復塗布群の皮膚中 1-methylhistamine 濃度は、wild-type マウスに比べて、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスで増加した (Fig. 15B)。

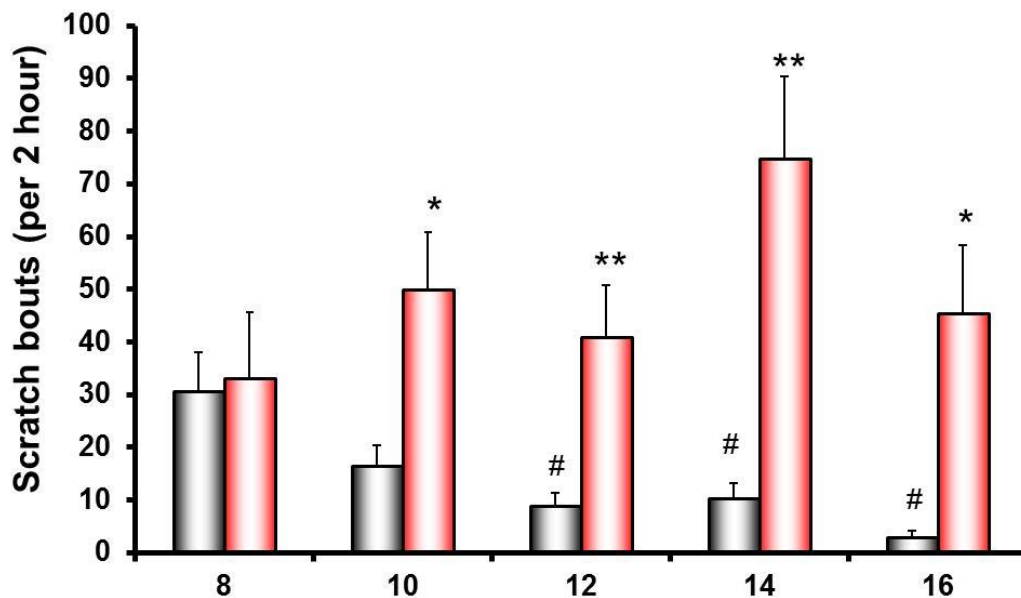


**Fig. 15 Skin concentration of histamine and 1-methylhistamine in wild-type and *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> mice repeatedly exposed to oxazolone.**

Mice were repeatedly challenged on the sensitized skin with oxazolone three times per week. Histamine (A) and 1-methylhistamine (B) concentration in skin of wild-type and *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> mice were analyzed at day 18. Each point represents mean  $\pm$  S.E.M (n=4-12). \* Significantly different from wild-type mice ( $p < 0.05$ ). # Significantly different from the vehicle treatment group ( $p < 0.05$ ).

#### **4-3-3. Oxazolone 反復塗布時の搔破回数の計測**

Oxazolone 反復塗布後の *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスにおける皮膚中 histamine 濃度の増加が皮膚炎の増悪に及ぼす影響を考察するため、oxazolone を反復塗布時の wild-type 及び *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスの搔破回数を計測した (Fig. 16)。Wild-type マウスにおける搔破回数は惹起開始直後 (投与開始後 8 日) が最も多く、その後、経時的に減少した。一方、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスでは wild-type マウスに比べて、惹起開始直後 (投与開始後 8 日) から投与開始後 16 日目までの間、全ての観察日で搔破回数が増加しており、さらに搔破回数の継時的な減少は認められなかった。



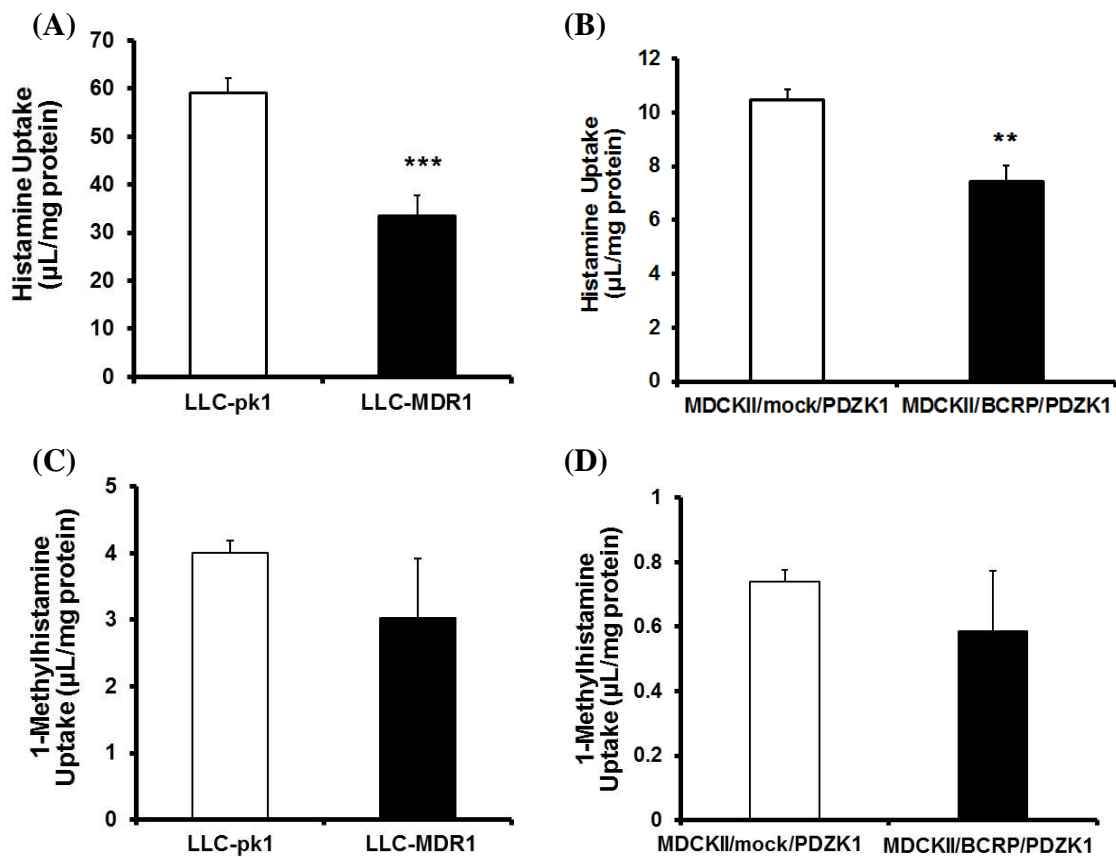
**Fig. 16 Scratching response in the wild-type and *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> mice repeatedly exposed to oxazolone.**

Mice were sensitized on the rostral back skin with oxazolone 8 days before the first challenge, and were repeatedly challenged on the abdominal skin with oxazolone three times per week. Scratching was measured for 2 hour before topical application of oxazolone in wild-type (black columns) and *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> (red columns) mice. Data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 17-18). \* \*\* Significantly different from wild-type mice ( $p < 0.05$  and  $0.01$ , respectively). # Significantly different from wild-type mice at day 8 ( $p < 0.05$ ).

#### **4-3-4. P-gp 又は BCRP 発現細胞を用いた histamine 及び 1-methylhistamine 輸送**

Oxazolone 塗布後の *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> マウスで、histamine 及び 1-methylhistamine の皮内蓄積が認められた原因として、P-gp 又は BCRP による histamine 又は 1-methylhistamine の皮膚から血液中への排泄の低下、皮内での histamine の生合成系の亢進又は代謝の低下を考えた。そこで、まず両トランスポーターによる histamine 及び 1-methylhistamine の輸送を評価するため、LLC-MDR1 細胞及び MDCKII/BCRP/PDZK1 細胞を用いて、<sup>3</sup>H histamine 及び 1-methylhistamine の細胞内取り込み実験を実施した。<sup>3</sup>H Histamine の細胞内取り込み量は LLC-pk1 細胞に比

べて、LLC-MDR1 細胞で低下した (Fig. 17A)。また、 $[^3\text{H}]$  histamine の細胞内取り込み量は MDCKII/mock/PDZK1 細胞に比べて、MDCKII/BCRP/PDZK1 細胞においても低下が認められた (Fig. 17B)。一方、1-methylhistamine の細胞内取り込み量については、LLC-MDR1 細胞及び MDCKII/BCRP/PDZK1 細胞のいずれもコントロール細胞と差が認められなかった (Fig. 17C, D)。

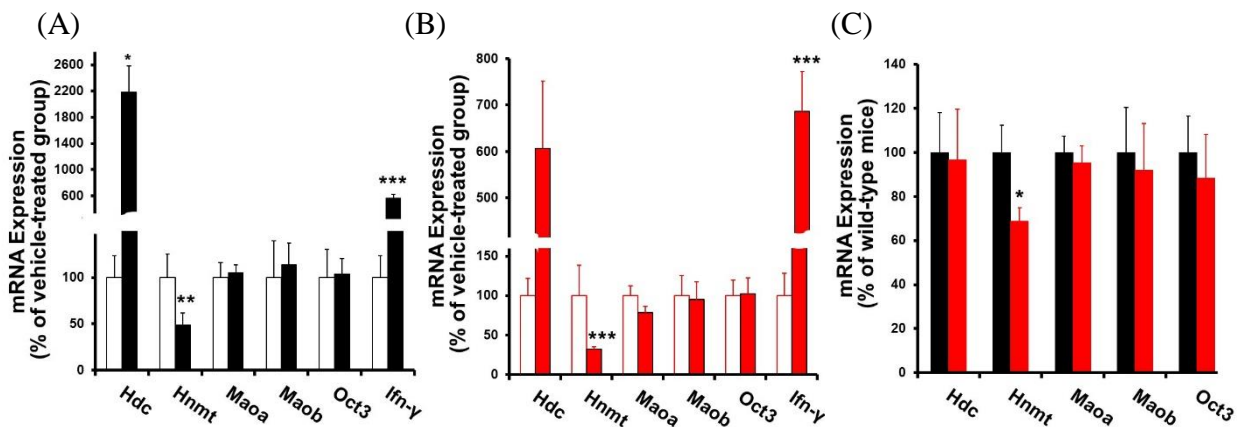


**Fig. 17 Uptake of  $[^3\text{H}]$  histamine and 1-methylhistamine in LLC-MDR1 and MDCKII/PDZK1/BCRP cells.**

Uptake of  $[^3\text{H}]$  histamine (A, B) and 1-methylhistamine (C, D) in LLC-pk1, LLC-MDR1, MDCKII/mock/PDZK1 and MDCKII/BCRP/PDZK1 cells. Panels A and C represent uptake in LLC-pk1 and LLC-MDR1 cells. Panel B and D represent uptake in MDCKII/mock/PDZK1 and MDCKII/BCRP/PDZK1 cells. Data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 3-6). \*\*, \*\*\* Significantly different from LLC-pk1 or MDCKII/mock/PDZK1 cells ( $p < 0.01$  and  $0.001$ , respectively).

#### 4-3-5. 皮膚炎部位における histamine 産生/代謝酵素の遺伝子発現量

次に oxazolone を反復塗布後の *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスにおいて、histamine 及び 1-methylhistamine の皮内蓄積が認められた原因として、皮膚での histamine の生合成の亢進又は代謝の低下を考えた。そこで、oxazolone 反復塗布後の wild-type 及び *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスの皮膚について、histamine 生合成及び代謝酵素の遺伝子発現量を評価した (Fig. 18)。溶媒対照群に比べて、oxazolone 反復塗布部の皮膚では、wild-type 及び *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスのいずれにおいても histamine 生合成酵素である Hdc の遺伝子発現量が顕著に増加した (Fig. 18A, B)。しかし、oxazolone 反復塗布部の皮膚では、その発現量に差は認められなかった。したがって、oxazolone 反復塗布時には、両マウスで histamine の産生能に差はないことが示唆された (Fig. 18C)。一方、histamine の代謝系については、wild-type 及び *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスのいずれも oxazolone 反復塗布後の皮膚で、histamine 代謝酵素である Hnmt の遺伝子発現量が低下した (Fig. 18A, B)。さらに Hnmt 遺伝子の発現量は、oxazolone 反復塗布部の皮膚では wild-type マウスに比べて、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスでは低下が認められた (Fig. 18C)。なお、histamine 代謝酵素である Mao a、Mao b 及び histamine の細胞内取込みを担う Oct3 の遺伝子発現量は oxazolone による影響を受けず (Fig. 18A, B)、皮膚炎部位での発現量も両マウスで差は認められなかった (Fig. 18C)。

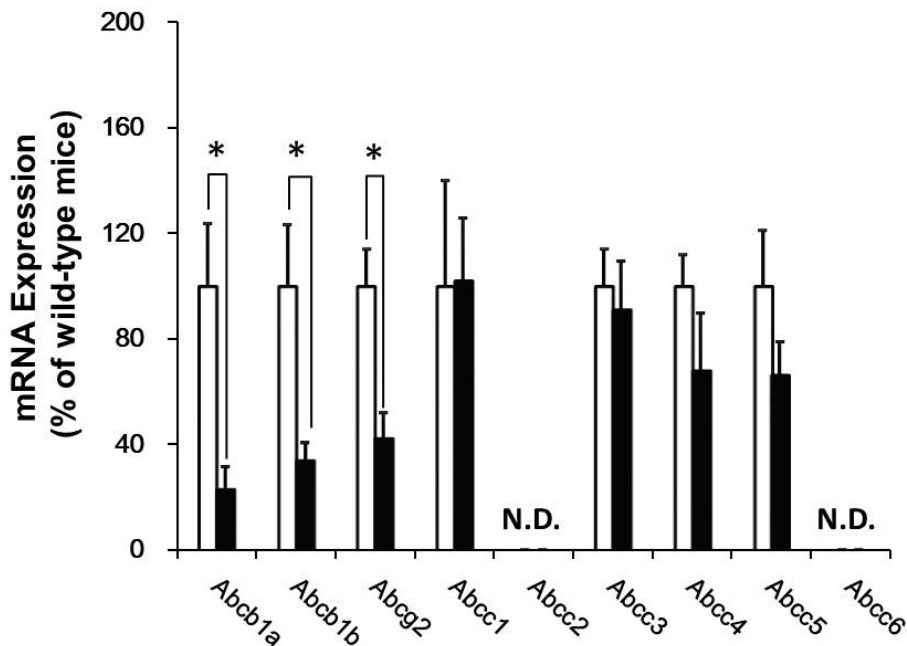


**Fig. 18 Gene expression of various enzymes produce and metabolize histamine in skin of wild-type and *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> mice.**

The mRNA level for each enzyme in skin of wild-type (A) and *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> (B) mice was quantified by RT-PCR and normalized by that of 36B4. Open and closed columns represent vehicle or oxazolone-treated skin. The mRNA level for each enzyme in oxazolone-treated skin of *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> was compared to that of wild-type (C). Each point represents the mean ± S.E.M. (n = 17-25). \*, \*\*, \*\*\* Significantly different from wild-type mice or vehicle-treated group ( $p < 0.05$ , 0.01 and 0.005, respectively).

**4-3-6. マウス皮膚炎部位におけるトランスポーター遺伝子発現量の評価**

皮膚炎部位でのトランスポーターの発現量変動を評価するため、oxazolone 反復塗布後の wild-type マウスの皮膚における ABC トランスポーターの遺伝子発現量を評価した (Fig. 19)。溶媒対照群に比べて、oxazolone 反復塗布群の皮膚では *Abcb1a*、*Abcb1b* 及び *Abcg2* の遺伝子発現量の顕著な低下が認められた。なお、今回 *Abcc2* 及び *Abcc6* については皮膚での遺伝子発現が認められなかったが、別系統のマウスの皮膚においても *Abcc2* 及び *Abcc6* の遺伝子発現が認められないことが報告されており、本結果は既報と一致する結果であった (Li *et al.*, 2006)。



### Fig. 19 Gene expression of transporters in skin of wild-type mice.

The mRNA level for each transporter in skin of vehicle-treated (open columns) and oxazolone-treated (closed columns) wild-type mice was quantified by RT-PCR and normalized by that of 36B4. Each point represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 4). \* Significantly different from vehicle-treated wild-type mice ( $p < 0.05$ ). N.D.; not detected.

#### 4-3-7. 皮膚疾患の患者皮膚における P-gp 及び BCRP 遺伝子発現量の評価

Oxazolone 反復塗布後のマウス皮膚において、P-gp 及び BCRP の遺伝子発現量の減少を認めたことから (Fig. 19)、代表的な炎症性皮膚疾患であるアトピー性皮膚炎及び乾癬の患者の皮膚における P-gp 及び BCRP 遺伝子の発現量についても評価した (Fig. 20)。P-gp 遺伝子の発現量は健常人の正常皮膚に比べて、アトピー性皮膚炎患者及び乾癬患者で低下した (Fig. 20A)。一方、BCRP 遺伝子については、健常人の正常皮膚に比べて、アトピー性皮膚炎患者及び乾癬患者で発現量の低下する傾向が認められた (Fig. 20B)。

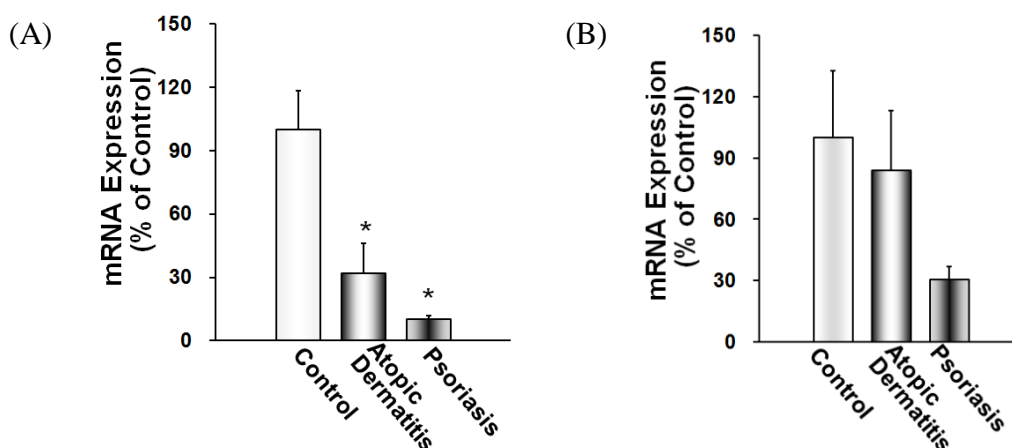


Fig. 20 Gene expression of P-gp and BCRP in skin of patients suffered from atopic dermatitis or psoriasis.

The mRNA level for P-gp (A) and BCRP (B) in skin of atopic dermatitis or psoriasis patients was quantified by RT-PCR and normalized by that of gapdh. Each point represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 10). \* Significantly different from healthy control ( $p < 0.05$ ).

#### 第4節 考察

Oxazolone 反復塗布時には wild-type マウスに比べて、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスで皮膚炎が増悪し (Fig. 14)、皮膚中ヒスタミン濃度及び搔破回数も増加した (Figs. 15, 16) ことから、oxazolone 反復塗布後のマウスで P-gp 又は BCRP がヒスタミンの皮内蓄積を軽減することで痒み、さらには皮膚炎の抑制に寄与する可能性が示された。したがって、皮膚炎発症時に皮膚に発現する P-gp 及び BCRP を阻害することにより、ヒスタミンの皮内蓄積が引き起こされ、痒みが増悪する可能性が考えられる。実際に、P-gp 又は BCRP 阻害能を有する医薬品の中には、副作用として痒みや皮膚炎を有する薬物が存在する。例えば、P-gp 及び BCRP 阻害能を有する doxorubicin は (Gao *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2003)、痒みを伴う皮膚炎を誘発すること、その皮膚炎が抗ヒスタミン薬である diphenhydramine により軽減することが報告されている (Solimando *et al.*, 1984)。また、BCRP 阻害能を有する EGFR 阻害剤の gefitinib や imatiib は (Houghton *et al.*, 2004; Ozvegy-Laczka *et al.*, 2004)、高頻度に痒みを伴う皮膚炎を発症する (Belum e *et al.*, 2015; Burotto *et al.*, 2015)。これらの薬物以外にも P-gp 及び BCRP 阻害能を有する薬物は多く存在する。したがって、P-gp 又は BCRP 阻害能を有する薬物の皮膚炎患者への使用時には、痒みや皮膚炎の増悪に留意する必要がある。

Oxazolone 塗布部の皮膚では wild-type マウスに比べて、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスで皮膚中ヒスタミン濃度が増加した (Fig. 15)。ヒスタミンは皮膚では主にマスト細胞が合成後、血管内皮細胞や繊維芽細胞で代謝される (Haddock *et al.*, 1987)。また、ヒスタミンは皮膚から血液中に速やかに移行する (Heavey *et al.*, 1984)。さらに、皮膚の血管内皮細胞におけるタイトジャンクションは脆弱であるため (Olesen *et al.*, 1989)、これまでヒスタミンの皮膚から血液中への移行は単純拡散により考えられてきた。一方、我々は第 2 章において、P-gp と BCRP が真皮血管内皮細胞に発現し、基質を皮膚から血液中に輸送することを示した。そのため、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスにおけるヒスタミン



の皮内蓄積の原因として、まず P-gp 又は BCRP によるヒスタミンの皮膚から血漿中への排泄の低下を考えた。本検討では P-gp 又は BCRP 安定発現細胞を用いた細胞内取り込み実験において、コントロール細胞に比べて、トランスポーター安定発現細胞で細胞内ヒスタミン濃度が低下した (Fig. 17)。したがって、両トランスポーターがヒスタミンの皮膚から血液中への排泄に関与する可能性がある。しかし、現時点ではヒスタミンの細胞内取り込みに対する P-gp 及び BCRP 阻害剤の影響は評価できていない。そのため、ヒスタミンが P-gp 又は BCRP の基質であるかは更なる検討を実施して判断する必要がある。*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスにおけるヒスタミンの皮内蓄積の原因として、皮膚内でのヒスタミンの生合成及び代謝能の差も考えられる。Oxazolone 塗布後の皮膚では wild-type マウスと *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスで *Hdc* 遺伝子の発現量に差は認められなかった (Fig. 18C)。一方、*Hnmt* 遺伝子は wild-type マウスに比べて、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスで発現量が低下した (Fig. 18C)。以上の結果から、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスで皮膚中ヒスタミン濃度が増加した原因は、P-gp 又は BCRP による皮膚からの排泄又は代謝の低下に起因した可能性が示唆された。ヒスタミンの皮膚からの消失は代謝と単純拡散による血液中への排泄により考えられてきたが、oxazolone 塗布時に wild-type に比べて、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスで皮膚中ヒスタミン濃度が増加したこと (Fig. 16) から、本研究は P-gp 又は BCRP による血液中への排泄もヒスタミンの皮内蓄積の抑制に一部寄与する可能性を示した。

Oxazolone 塗布部のマウス皮膚では P-gp をコードする *Abcb1a* 及び *Abcb1b*、BCRP をコードする *Abcg2* の遺伝子発現量が低下した (Fig. 19)。また、アトピー性皮膚炎及び乾癬患者の皮膚でも P-gp の遺伝子発現量が低下した (Fig. 20)。したがって、皮膚炎部位では、P-gp 及び BCRP の発現量の低下がヒスタミンの皮内蓄積を促進し、痒みの増悪に寄与している可能性が考えられる。アトピー性皮膚炎などの慢性的搔痒を伴う皮膚疾患においては、痒みに伴う搔破行動が皮膚炎の悪化、さらには痒みの増悪

につながる悪循環 (itch-scratch cycle) を引き起こす (Walgren et al., 1999)。そのため、両トランスポーターを誘導する薬物はヒスタミンの皮内蓄積を防ぎ、痒み並びに皮膚炎に対する治療薬になる可能性がある。現在、アトピー性皮膚炎の治療に外用ステロイドが第1選択薬として使用されている (FERENCE et al., 2009; Ring et al., 2012)。ステロイドは皮膚組織の P-gp 及び BCRP に対する影響は明らかになっていないが、*in vitro* で血管内皮細胞において P-gp の発現を誘導する (Iqbal et al., 2016)。そのため、ステロイドの治療効果には抗炎症作用に加えて、P-gp の誘導によるヒスタミンの皮内蓄積及び痒みの抑制が関与している可能性も考えられる。実際に、アトピー性皮膚炎患者では prednisone による治療後に皮膚中ヒスタミン濃度が低下し、痒みが軽減することが報告されている (Black et al., 1981)。また、ステロイド以外に rifampicin や carbamazepine などの P-gp 誘導能を有する医薬品も存在する (Greiner et al., 1999; Owen et al., 2006)。そのため、これらの薬物もヒスタミンの皮内蓄積を軽減し、痒みの抑制に寄与する可能性が期待される。

メタボローム解析において、oxazolone 塗布後の *MDR1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスの皮膚では wild-type マウスに比べて、urate 及び serotonin が増加した。これらはいずれも痒み又は炎症のメディエーターである (Kim 2012; Uratsuji et al., 2012)。したがって、P-gp 及び BCRP はヒスタミンに加えて、これらのメディエーターの皮内蓄積を抑制し、皮膚炎の軽減に寄与した可能性も考えられる。特に urate は *in vitro* で BCRP 基質であることが確認されており (Hosomi et al., 2012)、ヒト表皮ケラチノサイトに作用して IL-1 $\alpha$ 、IL-6 や IL-8 などの炎症性サイトカインの産生を亢進させる (Uratsuji et al., 2012)。さらに、炎症性皮膚疾患である乾癬患者では urate の皮内蓄積が認められていることから、urate の炎症性皮膚疾患への関与が示唆されている (Eisen et al., 1961; Goldman 1981)。Oxazolone 塗布部の皮膚における urate 量はメタボローム解析以外の測定系で確認できていないため、今後確認する必要がある。しかし、本研究は BCRP の発現量

の低下に伴う urate の皮内蓄積も皮膚炎の増悪に関与している可能性を示した。

本研究では皮膚に発現するP-gp及びBCRPがhistamineの皮内蓄積、さらには痒みを軽減し、皮膚炎の抑制に寄与する可能性を示した。したがって、ステロイドのようなP-gp又はBCRPを誘導する薬物はヒスタミンの皮内蓄積を抑制し、痒みの軽減に寄与することが示唆された。一方、皮膚疾患患者へのP-gp及びBCRPの阻害薬の使用はヒスタミンの皮内蓄積を引き起こし、痒みや炎症を増悪させる可能性がある。そのため、P-gp及びBCRP阻害薬の使用時には皮膚における痒みや皮膚炎に留意して使用する必要性を示した。

## 第5章 総括

皮膚は生体内と外界とを隔て、生体の恒常性維持を担うバリアとして機能している。また、このバリア機能は、角質層が構成する物理的バリアが担っていると考えられてきた。しかし、皮膚には薬物代謝酵素やトランスポーターも発現しており、それらが構成する生物的バリアの存在もする。しかし、生物的バリアが薬物の経皮吸収や皮膚の恒常性に及ぼす影響は解明されていないため、本研究では、薬物トランスポーターである P-gp 及び BCRP に着目し、両トランスポーターが基質の経皮吸収及び皮膚炎に及ぼす影響を検討した。

第2章では、P-gp 及び BCRP が典型基質である Rho123 の経皮吸収に及ぼす影響を検討した。角質層を剥離した皮膚に Rho123 を経皮投与後の表皮中濃度は wild-type 及び *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> マウスで差は認められなかったが、真皮及び血漿中濃度は wild-type に比べて、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> マウスで低下した。一方で静注時の皮膚における  $K_p$  値は wild-type に比べて、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> マウスで増加した。また、wild-type マウスに P-gp/BCRP 阻害剤である itraconazole を Rho123 と同時に経皮投与時においても真皮及び血漿中濃度が低下した。したがって、P-gp 及び BCRP は *in vivo* で基質の経皮吸収に寄与することを明らかにしたとともに、阻害剤の使用により、基質の皮内動態を制御できる可能性を示した。

第3章では、外用ステロイドの経皮吸収に対する P-gp 及び BCRP の関与を検討した。Dexamethasone 及び prednisolone を経皮投与後の皮膚及び血漿中濃度はいずれも wild-type マウスに比べて、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> マウスで低下した。また、P-gp 及び BCRP 安定発現細胞を用いた経細胞輸送実験から、両ステロイドが P-gp の基質であることを確認した。本検討には BCRP の基質となるステロイドが含まれていなかったが、本知見は少なくとも P-gp は一部の外用ステロイドの経皮吸収に寄与することを明らかにした。

第4章ではP-gp及びBCRPが皮膚炎に及ぼす影響を検討した。本章では、oxazoloneを反復塗布時の皮膚炎はwild-typeに比べて、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスで増悪したとともに、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスではhistamineの皮内蓄積及び搔破回数が増加した。併せて、P-gp又はBCRP安定発現細胞ではhistamineの細胞内取り込み量の低下を認め、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスにおけるoxazolone反復塗布後の皮膚では*Hmmt*の遺伝子発現量の低下も認めた。したがって、*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>マウスで炎症が増悪したメカニズムの解明には更なる見当が必要であるが、P-gp及びBCRPがhistamineの皮内蓄積の抑制を介して、痒みに伴う搔破回数を軽減し、皮膚炎の抑制に寄与する可能性が示された。

本研究はP-gp及びBCRPが基質の経皮吸収に寄与するとともに、皮膚の恒常性維持を担っている可能性を示した。したがって、本知見は、これらのトランスポーターを標的とする薬物の皮内動態制御法への応用が期待されるとともに、P-gp及びBCRP阻害能を有する薬物を用いた治療時に痒みや炎症などの副作用に留意する必要性を示した。

## 引用文献

- Agarwal S, Sane R, Gallardo JL, Ohlfest JR, Elmquist WF. Distribution of gefitinib to the brain is limited by P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2)-mediated active efflux. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 334: 147-155, 2010.
- Agarwal S, Elmquist WF. Insight into the cooperation of P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) at the blood-brain barrier: a case study examining sorafenib efflux clearance. *Mol. Pharm.*, 9: 678-684, 2012.
- Ahmad N, Mukhtar H. Cytochrome p450: a target for drug development for skin diseases. *J Invest Dermatol.*, 123: 417-425, 2004.
- Aked DM., Foster SJ. Leukotriene B4 and prostaglandin E2 mediate the inflammatory response of rabbit skin to intradermal arachidonic acid. *Br. J. Pharmacol.*, 92: 545-552, 1987.
- Akiyama M, Sugiyama-Nakagiri Y, Sakai K, McMillan JR, Goto M, Arita K, Tsuji-Abe Y, Tabata N, Matsuoka K, Sasaki R, Sawamura D, Shimizu H. Mutations in lipid transporter ABCA12 in harlequin ichthyosis and functional recovery by corrective gene transfer. *J. Clin. Invest.*, 115: 1777-1784, 2005.
- Akiyama Y, Takeuchi Y, Kikuchi K, Mishima E, Yamamoto Y, Suzuki C, Hozawa A, Ito S, Soga T, Abe T. A metabolomic approach to clarifying the effect of AST-120 on 5/6 nephrectomized rats by capillary electrophoresis with mass spectrometry (CE-MS). *Toxins (Basel)*, 4: 1309-1322, 2012.
- Baron JM, Höller D, Schiffer R, Frankenberg S, Neis M, Merk HF, Jugert FK. Expression of multiple cytochrome p450 enzymes and multidrug resistance-associated transport proteins in human skin keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, 116: 541-548, 2001.
- Batrakova EV, Miller DW, Li S, Alakhov VY, Kabanov AV, Elmquist WF. Pluronic P85 enhances the delivery of digoxin to the brain: in vitro and in vivo studies. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 296: 551-557, 2001.
- Bebes A, Kis K, Nagy T, Kurunczi A, Polyánka H, Bata-Csörgo Z, Kemény L, Dobozy A, Széll M. The expressions of ABCC4 and ABCG2 xenobiotic transporters in human keratinocytes are proliferation-related. *Arch. Dermatol. Res.*, 304: 57-63, 2012.
- Belum VR, Washington C, Pratilas CA, Sibaud V, Boralevi F, Lacouture ME. Dermatologic adverse events in pediatric patients receiving targeted anticancer therapies: a pooled analysis. *Pediatr. Blood Cancer.*, 62: 798-806, 2015.
- Black AK, Keahey TM, Eady RA, Greaves MW. Dissociation of histamine release and clinical improvement following treatment of acquired cold urticaria by prednisone. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 12: 327-331, 1981.

- Burotto M, Manasanch EE, Wilkerson J, Fojo T. Gefitinib and erlotinib in metastatic non-small cell lung cancer: a meta-analysis of toxicity and efficacy of randomized clinical trials. *Oncologist*. 20: 400-410, 2015.
- Callaghan R, Luk F, Bebawy M. Inhibition of the multidrug resistance P-glycoprotein: time for a change of strategy? *Drug Metab. Dispos.*, 42: 623-631, 2014.
- Chang HM, Huang WY, Lin SJ, Huang WC, Shen CR, Mao WY, Shen CN. ABCG2 deficiency in skin impairs re-epithelialization in cutaneous wound healing. *Exp. Dermatol.*, 25: 355-361, 2016.
- Cho YS, Kim CH, Surh JH, Kang NS, Yoo SE, Cheon HG. Identification of 4-[4-(4-fluoro-phenyl)-thiazol-2-ylamino]-2,6-dimethyl-phenol (KR-33749) as an inhibitor of 5-lipoxygenase with potent antiinflammatory activity. *Pharmacology*, 86: 65-72, 2010.
- Dagenais C, Graff CL, Pollack GM. Variable modulation of opioid brain uptake by P-glycoprotein in mice. *Biochem. Pharmacol.*, 67: 269-276, 2004.
- Danby SG, Brown K, Higgs-Bayliss T, Chittock J, Albenali L, Cork MJ. The Effect of an Emollient Containing Urea, Ceramide NP, and Lactate on Skin Barrier Structure and Function in Older People with Dry Skin. *Skin Pharmacol. Physiol.*, 29: 135-47, 2016.
- de Lange EC, de Bock G, Schinkel AH, de Boer AG, Breimer DD. BBB transport and P-glycoprotein functionality using MDR1A (-/-) and wild-type mice. Total brain versus microdialysis concentration profiles of rhodamine-123. *Pharm. Res.*, 15: 1657-1665, 1998.
- Eisen AZ, Seegmiller JE. Uric acid metabolism in psoriasis. *J. Clin. Invest.*, 40: 1486-1494, 1961.
- Ekins S, Kim RB, Leake BF, Dantzig AH, Schuetz EG, Lan LB, Yasuda K, Shepard RL, Winter MA, Schuetz JD, Wikel JH, Wrighton SA. Three-dimensional quantitative structure-activity relationships of inhibitors of P-glycoprotein. *Mol. Pharmacol.*, 61: 964-973, 2002.
- Elias PM. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J. Invest. Dermatol.*, 80 (Suppl): 44s-49s, 1983.
- Faergemann J, Laufen H. Levels of fluconazole in serum, stratum corneum, epidermis-dermis (without stratum corneum) and eccrine sweat. *Clin. Exp. Dermatol.*, 18: 102-106, 1993.
- Ference JD, Last AR. Choosing topical corticosteroids. *Am. Fam. Physician.*, 79: 135-140, 2009.
- Francis D, Greaves MW, Yamamoto S. Enzymatic histamine degradation by human skin.

- Br. J. Pharmacol.*, 60: 583-587, 1977.
- Frier HI, Rousseau JE Jr, Eaton HD, Dwyer TM. Dische's carbazole method for the determination of inulin in ventriculocisternal perfusion fluids. *J. Dairy Sci.*, 52: 1872-1874, 1969.
- Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol.*, 156: 1099-1111, 2002.
- Gao J, Murase O, Schowen RL, Aubé J, Borchardt RT. A functional assay for quantitation of the apparent affinities of ligands of P-glycoprotein in Caco-2 cells. *Pharm. Res.*, 18: 171-176, 2001.
- Ghadially R, Brown BE, Sequeira-Martin SM, Feingold KR, Elias PM. The aged epidermal permeability barrier. Structural, functional, and lipid biochemical abnormalities in humans and a senescent murine model. *J. Clin. Invest.*, 95: 2281-2290, 1995.
- Giannaras A, Selig W., Ellis J, Hullinger T. The effect of a novel, dual function histamine H1 receptor antagonist/5-lipoxygenase enzyme inhibitor on in vivo dermal inflammation and extravasation. *Eur. J. Pharmacol.*, 506: 265-271, 2005.
- Goldman M. Uric acid in the etiology of psoriasis. *Am. J. Dermatopathol.*, 3: 397-404, 1981.
- Greiner B, Eichelbaum M, Fritz P, Kreichgauer HP, von Richter O, Zundler J, Kroemer HK. The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin. *J. Clin. Invest.*, 104: 147-153, 1999.
- Gschwandtner M, Mildner M, Mlitz V, Gruber F, Eckhart L, Werfel T, Gutzmer R, Elias PM, Tschachler E. Histamine suppresses epidermal keratinocyte differentiation and impairs skin barrier function in a human skin model. *Allergy*, 68: 37-47, 2013.
- Gupta A, Unadkat JD, Mao Q. Interactions of azole antifungal agents with the human breast cancer resistance protein (BCRP). *J. Pharm. Sci.*, 96: 3226-3235, 2007.
- Gutowska-Owsiak D, Greenwald L, Watson C, Selvakumar TA., Wang X, Ogg GS. The histamine-synthesizing enzyme histidine decarboxylase is upregulated by keratinocytes in atopic skin. *Br. J. Dermatol.*, 171: 771-778, 2014.
- Haddock RC, Mack P, Fogerty FJ, Baenziger NL. Role of receptors in metabolic interaction of histamine with human vascular endothelial cells and skin fibroblasts. An ordered sequence of enzyme action. *J. Biol. Chem.*, 262: 10220-10228, 1987.
- Hammarström S, Hamberg M, Samuelsson B, Duell EA, Stawiski M, Voorhees JJ. Increased concentrations of nonesterified arachidonic acid,



- 12L-hydroxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acid, prostaglandin E2, and prostaglandin F2 alpha in epidermis of psoriasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 72: 5130-5134, 1975.
- Harris R, Jones HE, Artis WM. Orally administered ketoconazole: route of delivery to the human stratum corneum. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 24: 876-882, 1983.
- Hashimoto N, Nakamichi N, Uwafuji S, Yoshida K, Sugiura T, Tsuji A, Kato Y. ATP binding cassette transporters in two distinct compartments of the skin contribute to transdermal absorption of a typical substrate. *J. Control. Release.*, 165: 54-61, 2013.
- Hatano Y, Elias PM, Crumrine D, Feingold KR, Katagiri K, Fujiwara S. Efficacy of combined peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  ligand and glucocorticoid therapy in a murine model of atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.*, 131: 1845-1852, 2011.
- Heavey DJ, Ind PW, Miyatake A., Brown MJ, Macdermot J, Dollery CT. Histamine released locally after intradermal antigen challenge in man. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 18: 915-919, 1984.
- Heise R, Skazik C, Rodriguez F, Stanzel S, Marquardt Y, Jousen S, Wendel AF, Wosnitza M, Merk HF, Baron JM. Active transport of contact allergens and steroid hormones in epidermal keratinocytes is mediated by multidrug resistance related proteins. *J. Invest. Dermatol.*, 130: 305-308, 2010.
- Hengge UR, Ruzicka T, Schwartz RA, Cork MJ. Adverse effects of topical glucocorticosteroids. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 54: 1-15, 2006.
- Hoffmaster KA, Turncliff RZ, LeCluyse EL, Kim RB, Meier PJ, Brouwer KL. P-glycoprotein expression, localization, and function in sandwich-cultured primary rat and human hepatocytes: relevance to the hepatobiliary disposition of a model opioid peptide. *Pharm. Res.*, 21: 1294-1302, 2004.
- Hosomi A, Nakanishi T, Fujita T, Tamai I. Extra-renal elimination of uric acid via intestinal efflux transporter BCRP/ABCG2. *PLoS One.* 7: e30456, 2012.
- Houghton PJ, Germain GS, Harwood FC, Schuetz JD, Stewart CF, Buchdunger E, Traxler P. Imatinib mesylate is a potent inhibitor of the ABCG2 (BCRP) transporter and reverses resistance to topotecan and SN-38 in vitro. *Cancer Res.*, 64: 2333-2337, 2004.
- Hugger ED, Novak BL, Burton PS, Audus KL, Borchardt RT. A comparison of commonly used polyethoxylated pharmaceutical excipients on their ability to inhibit P-glycoprotein activity in vitro. *J. Pharm. Sci.*, 91: 1991-2002, 2002.
- Ichida K, Matsuo H, Takada T, Nakayama A, Murakami K, Shimizu T, Yamanashi Y, Kasuga H, Nakashima H, Nakamura T, Takada Y, Kawamura Y, Inoue H, Okada C, Utsumi Y, Ikebuchi Y, Ito K, Nakamura M, Shinohara Y, Hosoyamada M, Sakurai Y,

- Shinomiya N, Hosoya T, Suzuki H. Decreased extra-renal urate excretion is a common cause of hyperuricemia. *Nat. Commun.*, 3: 764-770, 2012.
- Inami Y, Andoh T, Kuraishi Y. Prevention of topical surfactant-induced itch-related responses by chlorogenic acid through the inhibition of increased histamine production in the epidermis. *J. Pharmacol. Sci.*, 121: 242-245, 2013.
- Iqbal T, Kinjo M, Dowling TC. Determination of Rhodamine 123 in cell lysate by HPLC with visible wavelength detection. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 814: 259-262, 2005.
- Ito K, Kato Y, Tsuji H, Nguyen HT, Kubo Y, Tsuji A. Involvement of organic anion transport system in transdermal absorption of flurubiprofen. *J. Control. Release*, 124: 60-68, 2007.
- Ito K, Nguyen HT, Kato Y, Wakayama T, Kubo Y, Iseki S, Tsuji A. P-glycoprotein (Abcb1) is involved in absorptive drug transport in skin. *J. Control. Release*, 131: 198-204, 2008.
- Jonker JW, Buitelaar M, Wagenaar E, Van Der Valk MA, Scheffer GL, Scheper RJ, Plosch T, Kuipers F, Elferink RP, Rosing H, Beijnen JH, Schinkel AH. The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 99: 15649-15654, 2002.
- Johnson HH Jr, Deoreo GA, Lascheid WP, Mitchell F. Skin histamine levels in chronic atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.*, 34: 237-238, 1960.
- Karssen AM, Meijer OC, van der Sandt IC, De Boer AG, De Lange EC, De Kloet ER. The role of the efflux transporter P-glycoprotein in brain penetration of prednisolone. *J. Endocrinol.*, 175: 251-260, 2002.
- Kim K. Neuroimmunological mechanism of pruritus in atopic dermatitis focused on the role of serotonin. *Biomol. Ther. (Seoul)*, 20: 506-512, 2012.
- Kim RB, Wandel C, Leake B, Cvetkovic M, Fromm MF, Dempsey PJ, Roden MM, Belas F, Chaudhary AK, Roden DM, Wood AJ, Wilkinson GR. Interrelationship between substrates and inhibitors of human CYP3A and P-glycoprotein. *Pharm. Res.*, 16: 408-414, 1999.
- Kim RB. Drugs as P-glycoprotein substrates, inhibitors, and inducers. *Drug Metab. Rev.*, 34: 47-54, 2002.
- Kim WY, Benet LZ. P-glycoprotein (P-gp/MDR1)-mediated efflux of sex-steroid hormones and modulation of P-gp expression in vitro. *Pharm. Res.*, 21: 1284-1293, 2004.

- Kishimoto W, Ishiguro N, Ludwig-Schwellinger E, Ebner T, Schaefer O. In vitro predictability of drug-drug interaction likelihood of P-glycoprotein-mediated efflux of dabigatran etexilate based on [I]<sub>2</sub>/IC<sub>50</sub> threshold. *Drug Metab. Dispos.* 42: 257-263, 2014.
- Korting HC, Unholzer A, Schäfer-Korting M, Tausch I, Gassmueller J, Nietsch KH. Different skin thinning potential of equipotent medium-strength glucocorticoids. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, 15: 85-91, 2002.
- Koziolek MJ, Riess R, Geiger H, Thévenod F, Hauser IA. Expression of multidrug resistance P-glycoprotein in kidney allografts from cyclosporine A-treated patients. *Kidney Int.*, 60: 156-166, 2001.
- Krogstad AL, Lönnroth P, Larson G, Wallin BG. Increased interstitial histamine concentration in the psoriatic plaque. *J. Invest. Dermatol.*, 109: 632-635, 1997.
- Kudo M, Katayoshi T, Kobayashi-Nakamura K, Akagawa M, Tsuji-Naito K. H(+)/peptide transporter (PEPT2) is expressed in human epidermal keratinocytes and is involved in skin oligopeptide transport. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 475: 335-341, 2016.
- Kumar S, Sahdev P, Perumal O, Tummala H. Identification of a novel skin penetration enhancement peptide by phage display peptide library screening. *Mol. Pharm.*, 9: 1320-1330, 2012.
- Lee WJ, Lee JL, Chang SE, Lee MW, Kang YK, Choi JH, Moon KC, Koh JK. Cutaneous adverse effects in patients treated with the multitargeted kinase inhibitors sorafenib and sunitinib. *Br. J. Dermatol.*, 161: 1045-1051, 2009.
- Lee YJ, Kusuhara H, Jonker JW, Schinkel AH, Sugiyama Y. Investigation of efflux transport of dehydroepiandrosterone sulfate and mitoxantrone at the mouse blood-brain barrier: a minor role of breast cancer resistance protein. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 312: 44-52, 2005.
- Li L, Agarwal S, Elmquist WF. Brain efflux index to investigate the influence of active efflux on brain distribution of pemetrexed and methotrexate. *Drug Metab. Dispos.*, 41: 659-667, 2013.
- Li Q, Kato Y, Sai Y, Imai T, Tsuji A. Multidrug resistance-associated protein 1 functions as an efflux pump of xenobiotics in the skin. *Pharm. Res.*, 22: 842-846, 2005.
- Li Q, Tsuji H, Kato Y, Sai Y, Kubo Y, Tsuji A. Characterization of the transdermal transport of flurbiprofen and indomethacin. *J. Control. Release*, 110: 542-556, 2006.
- Madison KC, Swartzendruber DC, Wertz PW, Downing DT. Presence of intact intercellular lipid lamellae in the upper layers of the stratum corneum. *J. Invest.*

- Dermatol.*, 88: 714-718, 1987.
- Maliepaard M, Scheffer GL, Faneyte IF, van Gastelen MA, Pijnenborg AC, Schinkel AH, van De Vijver MJ, Scheper RJ, Schellens JH. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res.*, 61: 3458-364, 2001.
- Man MQ, Hatano Y, Lee SH, Man M, Chang S, Feingold KR, Leung DY, Holleran W, Uchida Y, Elias PM. Characterization of a hapten-induced, murine model with multiple features of atopic dermatitis: structural, immunologic, and biochemical changes following single versus multiple oxazolone challenges. *J. Invest. Dermatol.*, 128: 79-86, 2008.
- Mao Q, Unadkat JD. Role of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in drug transport--an update. *AAPS. J.*, 17: 65-82, 2015.
- Markova NG, Karaman-Jurukovska N, Dong KK, Damaghi N, Smiles KA, Yarosh DB. Skin cells and tissue are capable of using L-ergothioneine as an integral component of their antioxidant defense system. *Free Radic. Biol. Med.*, 46: 1168-1176, 2009.
- Marzolini C, Paus E, Buclin T, Kim RB. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 75: 13-33, 2004.
- Mitragotri S, Anissimov YG, Bunge AL, Frasch HF, Guy RH, Hadgraft J, Kasting GB, Lane ME, Roberts MS. Mathematical models of skin permeability: an overview. *Int. J. Pharm.*, 418: 115-129, 2011.
- Mizuno T, Terada T, Kamba T, Fukudo M, Katsura T, Nakamura E, Ogawa O, Inui K. ABCG2 421C>A polymorphism and high exposure of sunitinib in a patient with renal cell carcinoma. *Ann. Oncol.*, 21: 1382-1383, 2010.
- Morita K, Sasaki H, Furuse K, Furuse M, Tsukita S, Miyachi Y. Expression of claudin-5 in dermal vascular endothelia. *Exp. Dermatol.*, 12: 289-295, 2003.
- Nezu J, Tamai I, Oku A, Ohashi R, Yabuuchi H, Hashimoto N, Nikaido H, Sai Y, Koizumi A, Shoji Y, Takada G, Matsuishi T, Yoshino M, Kato H, Ohura T, Tsujimoto G, Hayakawa J, Shimane M, Tsuji A. Primary systemic carnitine deficiency is caused by mutations in a gene encoding sodium ion-dependent carnitine transporter. *Nat. Genet.*, 21: 91-94, 1999.
- Nomura T, Akiyama M, Sandilands A, Nemoto-Hasebe I, Sakai K, Nagasaki A, Ota M, Hata H, Evans AT, Palmer CN, Shimizu H, McLean WH. Specific filaggrin mutations cause ichthyosis vulgaris and are significantly associated with atopic dermatitis in Japan. *J. Invest. Dermatol.*, 128: 1436-1441, 2008.
- Olesen SP. An electrophysiological study of microvascular permeability and its

- modulation by chemical mediators. *Acta. Physiol. Scand. Suppl.*, 579: 1-28, 1989.
- O'Mahony L, Akdis M, Akdis CA. Regulation of the immune response and inflammation by histamine and histamine receptors. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 128: 1153-1162, 2011.
- Oude Elferink RP, Zadina J. MDR1 P-glycoprotein transports endogenous opioid peptides. *Peptides*, 22: 2015-2020, 2001.
- Owen A, Goldring C, Morgan P, Park BK, Pirmohamed M. Induction of P-glycoprotein in lymphocytes by carbamazepine and rifampicin: the role of nuclear hormone response elements. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 62: 237-242, 2006.
- Ozvegy-Laczka C, Hegedus T, Várady G, Ujhelly O, Schuetz JD, Váradi A, Kéri G, Orfi L, Németh K, Sarkadi B. High-affinity interaction of tyrosine kinase inhibitors with the ABCG2 multidrug transporter. *Mol. Pharmacol.*, 65: 1485-1495, 2004.
- Palmer CN, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Lee SP, Goudie DR, Sandilands A, Campbell LE, Smith FJ, O'Regan GM, Watson RM, Cecil JE, Bale SJ, Compton JG, DiGiovanna JJ, Fleckman P, Lewis-Jones S, Arseculeratne G, Sergeant A, Munro CS, El Houate B, McElreavey K, Halkjaer LB, Bisgaard H, Mukhopadhyay S, McLean WH. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat. Genet.*, 38: 441-446, 2006.
- Potenzieri C, Udem BJ. Basic mechanisms of itch. *Clin. Exp. Allergy.*, 42: 8-19, 2012.
- Prausnitz MR, Langer R. Transdermal drug delivery. *Nat. Biotechnol.*, 26: 1261-1268, 2008.
- Proksch E, Brandner JM, Jensen JM. The skin: an indispensable barrier. *Exp. Dermatol.*, 17: 1063-1072, 2008.
- Qosa H, Abuznait AH, Hill RA, Kaddoumi A. Enhanced brain amyloid- $\beta$  clearance by rifampicin and caffeine as a possible protective mechanism against Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.*, 31: 151-165, 2012.
- Raj D, Brash DE, Grossman D. Keratinocyte apoptosis in epidermal development and disease. *J. Invest. Dermatol.*, 126: 243-257, 2006.
- Reilly DM, Parslew R., Sharpe GR, Powell S, Green MR. Inflammatory mediators in normal, sensitive and diseased skin types. *Acta. Derm. Venereol.*, 80: 171-174, 2000.
- Ring J, Alomar A, Bieber T, Deleuran M, Fink-Wagner A, Gelmetti C, Gieler U, Lipozencic J, Luger T, Oranje AP, Schäfer T, Schwennesen T, Seidenari S, Simon D, Ständer S, Stingl G, Szalai S, Szepietowski JC, Taïeb A, Werfel T, Wollenberg A, Darsow U. European Dermatology Forum (EDF), European Academy of Dermatology and Venereology (EADV), European Federation of Allergy (EFA),

- European Task Force on Atopic Dermatitis (ETFAD), European Society of Pediatric Dermatology, Global Allergy and Asthma European Network (GA2LEN). Guidelines for treatment of atopic eczema (atopic dermatitis) part I. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 26: 1045-1060, 2012.
- Saeki T, Ueda K, Tanigawara Y, Hori R, Komano T. Human P-glycoprotein transports cyclosporin A and FK506. *J. Biol. Chem.*, 268: 6077-6080, 1993.
- Saengko L, Link JM, Muzi M, Mankoff DA, Yang X, Collier AC, Shoner SC, Unadkat JD. Imaging P-glycoprotein transport activity at the human blood-brain barrier with positron emission tomography. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 77: 503-514, 2005.
- Sayed-yahosseini S, Rudkouskaya A, Leclerc V, Dagnino L. Integrin-Linked Kinase Is Indispensable for Keratinocyte Differentiation and Epidermal Barrier Function. *J. Invest. Dermatol.*, 136: 425-435, 2016.
- Schiffer R, Neis M, Höller D, Rodríguez F, Geier A, Gartung C, Lammert F, Dreuw A, Zwadlo-Klarwasser G, Merk H, Jugert F, Baron JM. Active influx transport is mediated by members of the organic anion transporting polypeptide family in human epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, 120: 285-291, 2003.
- Schinkel AH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, Borst P. Absence of the mdr1a P-glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A. *J. Clin. Invest.*, 96: 1698-1705, 1995.
- Schoellhammer CM, Blankschtein D, Langer R. Skin permeabilization for transdermal drug delivery: recent advances and future prospects. *Expert. Opin. Drug Deliv.*, 11: 393-407, 2014.
- Shimizu T, Sugiura T, Wakayama T, Kijima A, Nakamichi N, Iseki S, Silver DL, Kato Y. PDZK1 regulates breast cancer resistance protein in small intestine. *Drug Metab. Dispos.*, 39: 2148-2154, 2011.
- Siddique MI, Katas H, Iqbal Mohd Amin MC, Ng SF, Zulfakar MH, Buang F, Jamil A. Minimization of Local and Systemic Adverse Effects of Topical Glucocorticoids by Nanoencapsulation: In Vivo Safety of Hydrocortisone-Hydroxytyrosol Loaded Chitosan Nanoparticles. *J. Pharm. Sci.*, 104: 4276-4286, 2015.
- Skazik C, Wenzel J, Marquardt Y, Kim A, Merk HF, Bickers DR, Baron JM. P-glycoprotein (ABCB1) expression in human skin is mainly restricted to dermal components. *Exp. Dermatol.*, 20: 450-452, 2011.
- Sleeman MA, Watson JD, Murison JG. Neonatal murine epidermal cells express a functional multidrug-resistant pump. *J. Invest. Dermatol.*, 115: 19-23, 2000.
- Soga T, Baran R, Suematsu M, Ueno Y, Ikeda S, Sakurakawa T, Kakazu Y, Ishikawa T, Robert M, Nishioka T, Tomita M. Differential metabolomics reveals ophthalmic acid

- as an oxidative stress biomarker indicating hepatic glutathione consumption. *J. Biol. Chem.*, 281: 16768-16776, 2006.
- Soga T, Igarashi K, Ito C, Mizobuchi K, Zimmermann HP, Tomita M. Metabolomic profiling of anionic metabolites by capillary electrophoresis mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 81: 6165-6174, 2009.
- Solimando DA Jr, Wilson JP. Doxorubicin-induced hypersensitivity reactions. *Drug Intell. Clin. Pharm.*, 18: 808-811, 1984.
- Sondergaard J, Glick D. Histidine decarboxylase activity in human allergic contact dermatitis. *J. Invest. Dermatol.*, 59: 247-250, 1972.
- Sul GD, Park HJ, Bae J., Hong KD, Park BD, Chun J, Jeong SK, Lee SH, Ahn SK, Kim HJ. Preventive effects of multi-lamellar emulsion on low potency topical steroid induced local adverse effect. *Ann. Dermatol.*, 25: 5-11, 2013.
- Surber C, Wilhelm KP, Hori M, Maibach HI, Guy RH. Optimization of topical therapy: partitioning of drugs into stratum corneum. *Pharm. Res.*, 7: 1320-1324, 1990.
- Suzuki M, Suzuki H, Sugimoto Y, Sugiyama Y. ABCG2 transports sulfated conjugates of steroids and xenobiotics. *J. Biol. Chem.*, 278: 22644-22649, 2003.
- Svensson CK. Biotransformation of drugs in human skin. *Drug Metab. Dispos.*, 37: 247-253, 2009.
- Tahara K, Kagawa Y, Takaai M, Taguchi M, Hashimoto Y. Directional transcellular transport of bisoprolol in P-glycoprotein-expressed LLC-GA5-COL150 cells, but not in renal epithelial LLC-PK1 Cells. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 23: 340-346, 2008.
- Tang SC, Lagas JS, Lankheet NA, Poller B, Hillebrand MJ, Rosing H, Beijnen JH, Schinkel AH. Brain accumulation of sunitinib is restricted by P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) and can be enhanced by oral elacridar and sunitinib coadministration. *Int. J. Cancer.*, 130: 223-233, 2012.
- Triel C, Vestergaard ME, Bolund L, Jensen TG, Jensen UB. Side population cells in human and mouse epidermis lack stem cell characteristics. *Exp. Cell Res.*, 295: 79-90, 2004.
- Tsuji A, Terasaki T, Takabatake Y, Tenda Y, Tamai I, Yamashima T, Moritani S, Tsuruo T, Yamashita J. P-glycoprotein as the drug efflux pump in primary cultured bovine brain capillary endothelial cells. *Life Sci.*, 51: 1427-1437, 1992.
- Uchida Y, Ohtsuki S, Kamiie J, Terasaki T. Blood-brain barrier (BBB) pharmacoproteomics: reconstruction of in vivo brain distribution of 11 P-glycoprotein substrates based on the BBB transporter protein concentration, in vitro intrinsic transport activity, and unbound fraction in plasma and brain in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 339: 579-588, 2011.

- Uratsuji H, Tada Y, Kawashima T, Kamata M, Hau CS, Asano Y, Sugaya M, Kadono T, Asahina A, Sato S, Tamaki K. P2Y6 receptor signaling pathway mediates inflammatory responses induced by monosodium urate crystals. *J. Immunol.*, 188: 436-444, 2012.
- van Erp NP, Eechoute K, van der Veldt AA, Haanen JB, Reyners AK, Mathijssen RH, Boven E, van der Straaten T, Baak-Pablo RF, Wessels JA, Guchelaar HJ, Gelderblom H. Pharmacogenetic pathway analysis for determination of sunitinib-induced toxicity. *J. Clin. Oncol.*, 27: 4406-4412, 2009.
- von Moltke LL, Granda BW, Grassi JM, Perloff MD, Vishnuvardhan D, Greenblatt DJ. Interaction of triazolam and ketoconazole in P-glycoprotein-deficient mice. *Drug Metab. Dispos.*, 32: 800-804, 2004.
- Wahlgren CF. Itch and atopic dermatitis: an overview. *J. Dermatol.*, 26: 770-779, 1999.
- Wang EJ, Lew K, Casciano CN, Clement RP, Johnson WW. Interaction of common azole antifungals with P glycoprotein. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46: 160-165, 2002.
- Webb EF, Tzimas MN, Newsholme SJ, Griswold DE. Intralesional cytokines in chronic oxazolone-induced contact sensitivity suggest roles for tumor necrosis factor alpha and Interleukin-4. *J. Invest. Dermatol.*, 111: 86-92, 1998.
- Yamagata T, Kusuhara H, Morishita M, Takayama K, Benameur H, Sugiyama Y. Improvement of the oral drug absorption of topotecan through the inhibition of intestinal xenobiotic efflux transporter, breast cancer resistance protein, by excipients. *Drug Metab. Dispos.*, 35: 1142-1148, 2007.
- Yanagi T, Akiyama M, Nishihara H, Sakai K, Nishie W, Tanaka S, Shimizu H. Harlequin ichthyosis model mouse reveals alveolar collapse and severe fetal skin barrier defects. *Hum. Mol. Genet.*, 17: 3075-3083, 2008.
- Yano S, Ito Y, Fujimoto M, Hamazaki TS, Tamaki K, Okochi H. Characterization and localization of side population cells in mouse skin. *Stem Cells*, 23: 834-841, 2005.
- Yates CR, Chang C, Kearbey JD, Yasuda K, Schuetz EG, Miller DD, Dalton JT, Swaan PW. Structural determinants of P-glycoprotein-mediated transport of glucocorticoids. *Pharm. Res.*, 20: 1794-1803, 2003.
- Yasuda K, Lan LB, Sanglard D, Furuya K, Schuetz JD, Schuetz EG. Interaction of cytochrome P450 3A inhibitors with P-glycoprotein. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 303: 323-332, 2002.
- Zhang W, Mojsilovic-Petrovic J, Andrade MF, Zhang H, Ball M, Stanimirovic DB. The expression and functional characterization of ABCG2 in brain endothelial cells and vessels. *FASEB J.*, 17: 2085-2087, 2003.



**Supplementary Table S1. Data for cationic metabolites in skin of wild-type and *Mdr1a/1b/BCRP*<sup>-/-</sup> mice after oxazolone application.**

Metabolite	Vehicle-treated mice (nmol/g skin)					Oxazolone-treated mice (nmol/g skin)				
	Wild-type		<i>Mdr1a/1b/Bcrp</i> <sup>-/-</sup>		<i>P</i> value	Wild-type		<i>Mdr1a/1b/Bcrp</i> <sup>-/-</sup>		<i>P</i> value
	Mean	S.D.	Mean	S.D.		Mean	S.D.	Mean	S.D.	
Serotonin*	2.6	0.88	2.3	0.49	0.654	5.8	0.91	11	1.0	0.000
Histamine*	169	15	183	19	0.287	111	19	178	18	0.002
Riboflavin*	0.36	0.81	N.D.	N.D.	0.374	N.D.	-	2.9	0.8	0.006
1-Methylhistamine*	2.3	0.53	2.3	0.98	0.950	2.3	0.21	3.7	0.91	0.023
Nicotinamide*	24	4.9	30	9.4	0.311	29	4.4	46	6.1	0.036
N-Acetylhistidine*	0.16	0.16	0.29	0.16	0.406	0.36	0.030	0.42	0.037	0.043
o-Acetylcarnitine*	102	11	93	9.0	0.326	113	10.5	126	4.8	0.044
Thiamine monophosphate	1.8	0.22	0.90	1.4	0.157	2.2	0.43	3.4	0.92	0.052
5-Hydroxylysine	1.1	0.12	0.94	0.16	0.226	1.4	0.13	1.8	0.24	0.053
Carnitine	72	6.0	79	7.3	0.264	104	9.7	116	12	0.055
Metformin	0.026	0.058	0.028	0.045	0.962	0.028	0.019	0	0	0.061
Isopropanolamine	0.70	0.25	0.23	0.23	0.069	0.27	0.19	0.55	0.17	0.079
5-Aminovalerate	1.5	0.40	1.5	0.33	0.878	1.7	0.23	2.2	0.20	0.081
Xanthine	48	15	53	42	0.700	57	10	118	43	0.092
Guanidinosuccinate	0.18	0.30	0.058	0.080	0.437	0.12	0.16	0.63	0.55	0.092
Ala	1200	136	1216	137	0.868	1805	215	2063	293	0.093
GABA	1.8	0.31	1.8	0.62	0.980	2.1	0.30	2.9	0.48	0.098
Hypoxanthine	53	17	66	56	0.545	62	11	118	42	0.100
N-Methylglutamate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	0.62	0.46	0.35	0.41	0.108
1-Methylnicotinamide	2.9	0.23	2.6	0.36	0.304	5.1	2.1	7.0	0.7	0.111
Choline	108	15	115	28	0.535	122	18	167	29	0.113
N-Acetylputrescine	0.34	0.34	0.17	0.24	0.325	0.61	0.44	0.86	0.23	0.114
Glu <sup>#</sup>	1331	84	1131	81	0.011	2351	290	2795	124	0.120
Gly-Gly	8.6	2.3	7.4	1.4	0.464	7.4	2.7	9.1	3.2	0.125
Inosine	142	37	176	112	0.476	135	18	191	39	0.133
Hydroxyproline	89	26	83	19	0.738	155	34	207	22	0.138
Pyridoxamine 5'-phosphate	0.95	0.22	0.67	0.12	0.095	1.2	0.085	1.4	0.14	0.141
alpha-Aminoadipate	7.2	1.6	5.8	0.89	0.247	15	4.0	22	3.1	0.143
Met	63	15	65	8.9	0.843	146	21	184	30	0.150
Arg	253	56	200	36	0.187	799	285	977	320	0.164
His	144	15	147	18	0.885	337	82	449	142	0.165
N6,N6,N6-Trimethyllysine	3.1	0.57	3.0	0.18	0.729	5.1	0.36	5.8	0.59	0.167
a-Lipoamide+5-Methoxyindoleacetate	0.65	0.56	0.56	0.39	0.627	0.78	0.54	0.27	0.14	0.168
Uracil	13	1.4	8.4	9.1	0.282	24	6.0	44	16	0.169
Gly-Leu	3.3	0.49	3.4	0.64	0.923	4.3	1.2	6.1	2.1	0.172
Putrescine(1,4-Butanediamine)	6.7	1.9	4.1	1.0	0.082	13	2.6	17	3.9	0.177
Tyr	172	37	166	14	0.755	264	45	357	82	0.178
Muramate	0.076	0.10	0.15	0.13	0.461	N.D.	-	0.14	0.17	0.184
Gly	1929	211	2011	209	0.574	2225	554	2789	571	0.190
Asp <sup>#</sup>	347	42	269	17	0.015	873	193	1185	203	0.191
SAM <sup>#</sup>	11	2.1	7.5	0.39	0.022	12	2.6	14	2.5	0.198
N,N-Dimethylglycine	8.0	0.74	7.8	0.40	0.657	8.3	0.96	9.7	1.3	0.198
Agmatine	0.086	0.056	0.032	0.047	0.096	0.069	0.013	0.032	0.037	0.199
Glucosamine	2.2	0.50	1.7	1.0	0.443	1.1	0.23	0.88	0.101	0.204
Betaine	188	28	145	17	0.082	287	73	411	82	0.207
Thr	266	29	266	32	0.998	474	84	598	107	0.207
Phe	121	17	127	18	0.673	242	45	330	86	0.208
Ectoine	0.56	0.17	0.27	0.37	0.128	0.73	0.13	0.84	0.10	0.208
Thymine	147	24	140	7.3	0.580	129	8	117	8.1	0.216
Taurine	3651	318	3633	239	0.900	4166	439	4492	236	0.217
Asn	134	15	132	19	0.900	325	70	426	116	0.219
Cytidine	63	9.2	61	16	0.843	55	15	73	9.7	0.227
Methylguanidine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	1.7	2.3	N.D.	-	0.233
Methionine sulfoxide	8.2	1.6	7.8	0.91	0.724	11	3.3	14	3.2	0.237
Pro	768	97	811	138	0.607	676	178	783	180	0.250
Guanosine	34	5.1	31	7.9	0.700	20	2.7	23	2.6	0.252
Leu	263	27	273	41	0.734	479	92	626	144	0.254
Ornithine	526	61	574	126	0.529	404	160	553	178	0.255
Val	533	66	553	83	0.691	655	125	795	201	0.261
4-(beta-Acetylaminoethyl)imidazole	0.087	0.14	0.038	0.084	0.519	0.027	0.053	0.11	0.13	0.263
Ala-Ala	0.91	0.16	1.2	0.35	0.199	1.5	0.30	1.8	0.54	0.276
N-Acetylmethionine	7.7	1.5	7.5	1.7	0.821	8.0	3.0	9.9	3.5	0.287
Trp	39	3.9	37	3.4	0.473	59	13	76	17	0.288
N8-Acetylspermidine	0.36	0.11	0.32	0.12	0.706	2.1	1.4	3.5	0.92	0.293
Gln	1425	119	1256	172	0.095	2093	208	2313	294	0.296

\*Significantly different from oxazolone-treated wild-type mice ( $p < 0.05$ ). #Significantly different from vehicle-treated wild-type mice ( $p < 0.05$ ).

**Supplementary Table S1. Data for cationic metabolites in skin of wild-type and *Mdr1a/1b/BCRP*<sup>-/-</sup> mice after oxazolone application.**

Metabolite	Vehicle-treated mice (nmol/g skin)					Oxazolone-treated mice (nmol/g skin)				
	Wild-type		<i>Mdr1a/1b/Bcrp</i> <sup>-/-</sup>		P value	Wild-type		<i>Mdr1a/1b/Bcrp</i> <sup>-/-</sup>		P value
	Mean	S.D.	Mean	S.D.		Mean	S.D.	Mean	S.D.	
7-Methylguanine	0.37	0.075	0.33	0.088	0.557	0.32	0.067	0.38	0.030	0.301
Ser	1906	280	1951	301	0.821	2417	771	2903	780	0.303
Urocanate	917	117	911	176	0.954	836	344	1028	338	0.304
Lys	340	40	306	41	0.404	530	104	664	156	0.312
Ile	101	17	98	14	0.753	192	54	266	77	0.313
S-Lactoylglutathione	1.5	0.33	1.3	0.43	0.321	2.3	0.49	2.7	0.56	0.314
Adenosine	35	17	40	30	0.730	10.7	3.6	9.6	5.0	0.316
Uridine	71	11	67	25	0.614	64	11	83	22	0.322
Xanthosine	0.71	0.40	0.83	0.25	0.671	0.52	0.35	1.0	0.71	0.335
Kynurenine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	0.65	0.15	0.36	0.43	0.336
Diethanolamine	0.60	0.57	0.71	0.56	0.733	0.74	0.51	0.43	0.50	0.351
5-Methylcytosine	0.068	0.15	N.D.	N.D.	0.374	0.041	0.083	N.D.	-	0.391
Azetidine-2-carboxylate	N.D.	-	0.035	0.079	0.374	N.D.	-	0.057	0.11	0.391
Atropine	0.032	0.071	0.014	0.031	0.374	N.D.	-	0.016	0.031	0.391
5-Hydroxytryptophan	0.29	0.40	0.34	0.47	0.445	0.00	0.00	0.29	0.58	0.391
Tropine	0.081	0.18	0.062	0.11	0.605	N.D.	-	0.032	0.064	0.391
N-Methylalanine	0.13	0.29	0.071	0.16	0.732	0.000	0.000	0.10	0.19	0.391
1-Aminocyclopropane-1-carboxylate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	0.061	0.12	N.D.	-	0.391
2-Guanidinobenzimidazole	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	0.018	0.036	0.391
3-Chloroalanine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	0.054	0.108	0.391
Z-Gly-Pro	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	0.18	0.37	0	0	0.391
gamma-Glu-2AB	0.13	0.29	N.D.	N.D.	0.374	0.100	0.20	0.13	0.26	0.391
Phosphorylcholine	77	7.8	77	11	0.983	155	49	189	25	0.392
SAH	1.2	0.27	0.99	0.57	0.447	1.5	0.55	2.1	0.56	0.398
Allantoin	192	91	163	84	0.699	138	15	202	129	0.406
beta-Ala-Lys	4.0	0.79	3.7	1.0	0.664	5.8	2.1	7.4	2.3	0.412
5-Methylthioadenosine	0.91	0.19	0.93	0.23	0.892	1.4	0.22	1.5	0.21	0.413
Cyclohexylamine	0.58	0.26	0.47	0.29	0.684	0.25	0.18	0.32	0.12	0.419
Glu-Glu	2.4	0.27	2.1	0.67	0.379	1.9	0.46	2.3	0.48	0.420
Thiamine	13	0.78	16	3.1	0.107	24	5.3	27	6.2	0.457
6-Aminohexanoate	0.092	0.21	0.19	0.26	0.383	0.37	0.43	0.119	0.24	0.460
5-Methyl-2'-deoxycytidine	1.5	0.25	1.5	0.34	0.824	1.0	0.14	1.2	0.26	0.461
Adenine	0.95	0.15	1.1	0.34	0.262	2.2	0.30	2.4	0.37	0.463
Indole-3-acetaldehyde	23	10	19	7.4	0.415	18	3.5	21	10.7	0.481
Betonicine	0.063	0.14	0.093	0.21	0.821	0.093	0.13	0.26	0.31	0.491
Cystathionine	17	5.1	12	1.8	0.113	53	73	23	17	0.512
Triethanolamine	1.6	0.31	1.3	0.17	0.198	1.5	0.27	1.5	0.13	0.515
Benzamide	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	1.7	2.1	3.2	2.2	0.520
7,8-Dihydrobiopterin <sup>#</sup>	379	78	204	37	0.007	455	113	528	112	0.527
Pseudopelletierine	0.087	0.19	0.047	0.10	0.374	0.041	0.027	0.066	0.082	0.535
Carnosine	35	21	44	7.7	0.214	48	12	42	6.5	0.550
Piperidine	1.1	0.32	1.5	0.74	0.498	1.2	0.89	1.5	0.41	0.566
beta-Ala	123	51	65	7.1	0.081	105	33	117	23	0.575
N-Acetylglucosamine	16	1.8	17	2.8	0.575	23	8.4	27	6.7	0.588
Glycerophosphorylcholine	506	48	528	25	0.425	814	102	873	100	0.589
Hydroxyatrazine	0.047	0.10	0.047	0.060	0.983	0.016	0.031	0.029	0.039	0.593
Creatine	2755	555	3067	408	0.325	2770	308	2881	319	0.602
2AB	4.9	0.39	5.0	0.85	0.681	7.0	0.94	6.7	0.50	0.606
Guanine	16	4.4	12	4.6	0.462	6.0	0.67	5.5	2.1	0.609
gamma-Guanidinobutyrate	1.2	0.30	1.0	0.27	0.424	1.5	0.31	1.6	0.41	0.609
Creatinine	30	18	25	9.2	0.660	19	5.2	18	3.7	0.609
Spermine	0.30	0.66	0.15	0.34	0.714	0.106	0.21	0.037	0.075	0.619
Melatonin	2.9	1.8	2.9	1.1	0.983	2.9	1.3	3.4	0.8	0.640
Tyrosine methyl ester	4.9	11	N.D.	N.D.	0.374	22	12	24	5	0.648
Anserine	138	66	170	31	0.268	147	58	132	6.0	0.654
Indole-3-acetate	2.9	0.58	1.8	1.1	0.094	3.2	1.07	2.8	0.48	0.656
5-Methyltetrahydrofolate	0.87	1.2	0.48	1.1	0.676	1.8	2.1	0.95	1.9	0.667
Citrulline	112	14	100	6.2	0.128	149	10	143	22	0.675
Acetylcholine	3.5	0.48	3.9	0.42	0.346	2.6	0.62	2.5	0.63	0.685
Urea	6408	1969	4757	1797	0.367	4469	749	4433	841	0.693
3-Methylhistidine <sup>#</sup>	5.5	0.82	4.0	0.34	0.013	5.2	1.3	4.9	1.1	0.719
Pipecolate	4.1	0.70	3.9	0.45	0.648	5.0	1.5	5.4	1.4	0.731
N-Acetylvaline	1.2	0.48	1.1	0.69	0.732	1.5	0.22	1.4	0.56	0.741
Hypotaurine	259	33	238	46	0.355	446	273	394	120	0.746
Guanidinoacetate	6.4	0.80	6.1	0.55	0.274	15	3.1	14	1.5	0.757
gamma-Butyrobetaine	4.1	0.74	4.3	0.29	0.721	7.5	2.0	7.8	0.90	0.760
2'-Deoxycytidine	33	5.3	31	7.4	0.702	21	3.5	22	3.2	0.766

#Significantly different from vehicle-treated wild-type mice ( $p < 0.05$ ).

**Supplementary Table S1. Data for cationic metabolites in skin of wild-type and *Mdr1a/1b/BCRP*<sup>-/-</sup> mice after oxazolone application.**

Metabolite	Vehicle-treated mice (nmol/g skin)					Oxazolone-treated mice (nmol/g skin)				
	Wild-type		<i>Mdr1a/1b/Bcrp</i> <sup>-/-</sup>		<i>P</i> value	Wild-type		<i>Mdr1a/1b/Bcrp</i> <sup>-/-</sup>		<i>P</i> value
	Mean	S.D.	Mean	S.D.		Mean	S.D.	Mean	S.D.	
Tyramine	1.1	0.51	0.62	0.19	0.077	0.66	0.33	0.73	0.22	0.775
Trimethylamine N-oxide	2.0	0.70	2.2	0.81	0.602	1.8	0.22	1.7	0.34	0.808
1-Methyladenosine	1.7	0.27	1.8	0.32	0.632	1.9	0.67	1.9	0.15	0.820
Cysteine-gluthathione disulphide -Divalent	1.4	1.5	1.6	2.3	0.892	0.73	0.19	0.70	0.36	0.823
Cytosine	0.75	0.26	0.62	0.18	0.480	1.0	0.36	1.0	0.11	0.828
Imidazole-4-acetate	1.9	0.41	1.9	0.41	0.741	2.2	0.64	2.1	0.71	0.830
Glutathione(red)	181	91	156	60	0.682	209	131	224	69	0.846
2'-Deoxyguanosine	172	34	142	38	0.364	79	13	82	20	0.855
gamma-Glu-cys	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	0.87	1.7	1.15	2.3	0.879
Ophthalmate <sup>#</sup>	0.98	0.16	0.82	0.17	0.003	1.3	0.28	1.3	0.15	0.891
Thymidine	35	6.3	32	5.4	0.435	21	1.2	21	2.2	0.892
Trigonelline	3.7	0.82	3.1	0.75	0.071	5.5	0.93	5.5	1.3	0.904
Sarcosine <sup>#</sup>	4.7	0.47	4.0	0.38	0.049	8.3	4.6	8.0	3.8	0.940
Glutathione(ox) <sup>#</sup>	137	11	105	21	0.005	200	63	203	45	0.953
Acetohydroxamate	164	25	158	9.9	0.672	165	13	165	13	0.979
Spermidine	11	6.7	7.1	2.4	0.317	19	4.4	19	4.9	0.992
N-epsilon-Acetyllysine	0.64	0.15	0.65	0.11	0.964	0.87	0.047	0.87	0.12	0.997
Leu-Leu-Tyr	0.058	0.095	0.011	0.025	0.217	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
5,6-Dimethylbenzimidazole	0.082	0.11	0.017	0.039	0.326	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2-Aminobenzimidazole	0.024	0.054	0.013	0.028	0.374	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
4-Hydroxymethylimidazole	0.16	0.35	N.D.	-	0.374	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
5-Methoxytryptamine	0.054	0.12	N.D.	N.D.	0.374	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Benzamidine	0.079	0.18	N.D.	N.D.	0.374	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Desethyltriazine	0.036	0.081	N.D.	N.D.	0.374	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Homoserine	0.75	1.7	N.D.	-	0.374	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Leupeptin	0.063	0.14	N.D.	N.D.	0.374	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Scopolamine	0.049	0.11	0.027	0.060	0.374	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Tryptamine	0.069	0.15	N.D.	-	0.374	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Arginine ethyl ester	0.033	0.073	0.020	0.044	0.374	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Tropinone	0.11	0.25	0.070	0.16	0.374	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
1-Amino-1-cyclopentanecarboxylate	0.053	0.12	0.032	0.072	0.374	N.A.	0	0	0	N.A.
Noradrenaline	0.12	0.18	0.17	0.23	0.737	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Isoamylamine	0.27	0.38	0.21	0.46	0.845	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
1,3-Diaminopropane	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
1,3-Phenylenediamine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
1-Methyl-2-pyrrolidinone	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2,3-Diaminopropionate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2,4-Diaminobutyrate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2,4-Dimethylaniline	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2,6-Diethylaniline	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2-Amino-2-methyl-1,3-propanediol	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2-Aminophenol	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2-Cyanopyridine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2-Deoxystreptamine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2-Hydroxypyridine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
3,3',5'-Triiodothyronine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
3,5-Diiodo-tyrosine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
3-Amino-1,2,4-triazole	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
3-Aminopropane-1,2-diol	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
3-Aminopropionitrile	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
3-Hydroxyanthranilate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
3-Hydroxykynurenine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
3-Iodotyrosine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
3-Methyladenine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
3-Methylguanine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
4,4'-Methylene bis(o-chloroaniline)	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
4-Amino-3-hydroxybutyrate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
4-Aminoindole	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
4-Aminophenylsulfone	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
4-Aminosalicylate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
4-Methyl-5-thiazolethanol	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
4-Methylpyrazole	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribotide	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
5-Aminoindole	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
5-Aminolevulinatate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.

#Significantly different from vehicle-treated wild-type mice (*p* <0.05).

**Supplementary Table S1. Data for cationic metabolites in skin of wild-type and *Mdr1a/1b/BCRP*<sup>-/-</sup> mice after oxazolone application.**

Metabolite	Vehicle-treated mice (nmol/g skin)					Oxazolone-treated mice (nmol/g skin)				
	Wild-type		<i>Mdr1a/1b/Bcrp</i> <sup>-/-</sup>		P value	Wild-type		<i>Mdr1a/1b/Bcrp</i> <sup>-/-</sup>		P value
	Mean	S.D.	Mean	S.D.		Mean	S.D.	Mean	S.D.	
5'-Deoxyadenosine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
5-Hydroxyindoleacetate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
5-Methoxy-N,N-dimethyltryptamine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
6-Aminopenicillanate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
6-Hydroxynicotinate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
6-Mercaptopurine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
6-Methylaminopurine	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
7,8-Dihydroneopterin	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Acetanilide	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Acetoacetamide	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Albendazole	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Alliin	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Alloxyptopine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
alpha-Methylbenzylamine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Alpha-Methylserine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Amantadine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Aniline	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Anthranilate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Benzimidazole	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
beta-Cyanoalanine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
beta-Imidazolelactate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Bis(3-aminopropyl)amine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
b-Leucine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Cadaverine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Canavanine	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Carbachol	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Castanospermine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Chloramphenicol	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Cys	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Cys-Gly	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Cysteamine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Cystine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Daunorubicin	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Deisopropylatrazine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Desthiobiotin	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Diclofenac	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Dihydrouracil	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Diphenylamine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Disulfiram	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
DOPA	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Dopamine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Eflornithine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Epinephrine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Glucosaminatate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Gramine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Harman	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Hexamine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Hexylamine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Histidinol	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Homocarnosine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Homocysteine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Homocystine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Hydroxyurea	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Ibotenate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Indole-3-acetamide	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Indole-3-ethanol	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Isatin	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Isobutylamine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Isoniazid	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Isonicotinamide	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Isoquinoline	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Lysinamide	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Mannosamine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Melamine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Methionine sulfoximine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Muscimol	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
N1-Acetylspermine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
N6-Methyl-2'-deoxyadenosine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
N-Acetylglucosylamine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.

**Supplementary Table S1. Data for cationic metabolites in skin of wild-type and *MDR1a/1b/BCRP*<sup>-/-</sup> mice after oxazolone application.**

Metabolite	Vehicle-treated mice (nmol/g skin)					Oxazolone-treated mice (nmol/g skin)				
	Wild-type		<i>MDR1a/1b/Bcrp</i> <sup>-/-</sup>		P value	Wild-type		<i>MDR1a/1b/Bcrp</i> <sup>-/-</sup>		P value
	Mean	S.D.	Mean	S.D.		Mean	S.D.	Mean	S.D.	
N-alpha,N-alpha-Dimethylhistidine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
N-alpha-Benzenolarginine ethylester	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
n-Butyl a-Picolinate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
N-gamma-Ethylglutamine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Nicotine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
N-Methylaniline	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
N-omega-Methyltryptamine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Normicotine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
O-Acetylserine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Octopine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Octylamine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
o-Phenanthroline	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
o-Succinylhomoserine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
p-Aminobenzoate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Pargyline	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Phenethylamine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Phenylethanolamine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Phenylhydrazine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Picolinamide	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Piperazine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Piroxicam	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Pterin	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Purine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Purine riboside	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Pyrazinamide	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Pyrazole	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Pyridine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Pyridoxal	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Pyridoxamine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Pyridoxine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Quinoline	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Quisqualate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Semicarbazide	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Sepiapterin	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
S-Methylmethionine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Synephrine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Tacrine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Tetrahydropalmatine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Tolazoline	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
trans-Zeatin	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
TRH	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Trientine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Trimethylsulfonium	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Xanthopterin	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.

**Supplementary Table S2. Data for anionic metabolites in skin of wild-type and *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> mice after oxazolone application.**

Metabolite	Vehicle-treated mice (nmol/g skin)					Oxazolone-treated mice (nmol/g skin)				
	Wild-type		<i>Mdr1a/1b/Bcrp</i> <sup>-/-</sup>		P value	Wild-type		<i>Mdr1a/1b/Bcrp</i> <sup>-/-</sup>		P value
	Mean	S.D.	Mean	S.D.		Mean	S.D.	Mean	S.D.	
Urate*	216	9	179	31	0.093	217	26	287	5	0.010
CMP*	4.9	1.9	3.2	0.8	0.164	10	4.9	14.5	4.8	0.013
2-Oxoisopentanoate*	10	2	8.1	2.4	0.148	8.7	0.8	6.6	0.7	0.014
dCMP*	0.20	0.29	0.06	0.14	0.460	0.17	0.34	1.2	0.32	0.017
Saccharate*	0.36	0.50	0.25	0.56	0.556	1.0	0.2	1.5	0.2	0.022
Pantothenate*	6.0	0.7	6.3	0.5	0.583	4.6	0.8	5.9	0.8	0.022
CMP-N-acetylneuraminic*	5.1	0.9	2.7	1.7	0.058	8.5	2.0	13	1	0.025
N-Acetylmethionine*	1.2	0.16	1.1	0.32	0.762	1.1	0.1	1.5	0.2	0.027
trans-Aconitate*	3.1	0.5	2.1	2.0	0.385	3.9	0.5	4.8	0.4	0.029
ADP-ribose*	2.7	3.1	2.1	2.6	0.800	2.7	0.4	0.6	1.2	0.041
Quinate*	4.3	0.9	3.2	0.6	0.060	4.0	1.2	5.3	0.8	0.047
GMP <sup>#</sup>	13	2	8.1	2.1	0.025	19	8	30	12	0.053
threo-β-methylaspartate+Glu <sup>#</sup>	1329	85	1119	91	0.032	2459	331	3111	176	0.059
IMP	92	65	88	41	0.928	64	14	92	30	0.062
cAMP	2.2	1.3	0.90	1.33	0.307	N.D.	-	3.3	2.3	0.065
UDP-glucose <sup>#</sup>	51	6	29	7	0.010	77	16	96	12.5	0.072
Malate	178	32	124	25	0.069	243	46	300	27	0.072
dAMP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	0.26	0.52	1	0	0.074
N-Acetylaspartate	140	18	106	16	0.090	169	54	322	70	0.076
Trehalose 6-phosphate	4.9	4.1	7.0	5.3	0.502	19	4	23	1	0.081
Fumarate	35	8	24	4	0.109	51	14	67	9	0.083
Ru5P	73	15	65	37	0.657	82	12	114	19	0.087
N-Acetylglutamate <sup>#</sup>	1.2	0.2	0.8	0.1	0.012	2.6	0.6	4.3	0.8	0.088
N-Acetylglucosamine 1-phosphate	9.5	1.4	5.9	3.1	0.051	10	2	16	5	0.089
3-Hydroxybutyrate	116	76	55	11	0.188	49	9	79	33	0.095
Ethanolamine phosphate <sup>#</sup>	350	31	250	26	0.009	725	174	955	36	0.097
Glycerophosphate	396	133	359	107	0.719	410	51	580	156	0.100
Succinate	143	24	111	29	0.179	162	23	200	31	0.103
O-Phosphoserine	0.72	0.66	0.606	0.40	0.798	0.61	0.43	1.08	0.13	0.103
S7P	8.6	3.4	7.4	3.3	0.481	16	2	24	5	0.105
UMP <sup>#</sup>	28	5	15	4	0.004	41	13	57	18	0.106
Gluconate	25	3	17	10	0.127	42	8	53	9	0.115
DHAP	31	19	25	24	0.757	23	2	37	12	0.118
Adenylosuccinate	0.21	0.48	N.D.	-	0.374	0.80	0.63	1.3	1.0	0.121
Octanoate	4.3	4.2	4.5	1.6	0.957	11	3	8.2	1.1	0.124
4-Acetylbutyrate	3.8	0.6	3.0	0.3	0.115	4.2	0.3	3.8	0.2	0.132
4-Hydroxy-3-methoxybenzoate	3.9	2.5	0.6	1.3	0.119	2.9	2.4	2.2	2.3	0.132
ATP	341	95	367	194	0.753	521	136	469	180	0.139
CDP-choline	13	2	8.4	5.1	0.175	21	3	28	6	0.139
2-Hydroxyisobutyrate	6.3	0.8	6.2	0.8	0.829	5.8	0.9	4.0	0.9	0.139
Phthalate	0.25	0.08	0.27	0.05	0.822	0.20	0.13	0.31	0.04	0.143
Isocitrate	9.3	4.9	6.7	4.6	0.493	7.8	0.6	8.3	0.7	0.147
Pelargonate	8.3	6.7	8.9	2.5	0.880	19	5	15	1	0.148
Methyl sulfate	2.9	0.4	2.3	0.9	0.281	2.5	0.4	3.2	0.6	0.150
3'-AMP	0.15	0.34	N.D.	-	0.374	0.24	0.48	2.1	1.6	0.158
N-Acetylglucosamine 6-phosphate	9.2	2.8	6.5	4.4	0.210	9.0	1.5	15	5	0.160
2-Furoate	7.3	1.16	7.7	1.8	0.773	4.7	1.0	5.5	1.8	0.172
GDP-mannose	2.9	1.9	2.1	1.3	0.281	2.7	3.2	5.1	1.2	0.173
ADP-glucose	1.4	1.86	0.0	0.00	0.179	2.4	2.8	4.1	2.8	0.176
Ribulose 1,5-diphosphate	0.5	0.6	0.1	0.2	0.234	1.2	0.3	1.8	0.7	0.178
N-Acetylmuramate	0.47	0.64	0.28	0.62	0.711	N.D.	-	0.72	0.84	0.183
Acetyl CoA	1.5	0.9	0.56	0.38	0.102	0.61	0.51	0.97	0.37	0.197
Argininosuccinate	1.5	0.9	1.3	1.5	0.699	3.1	3.6	7.7	2.8	0.199
2-Deoxyglucose 6-phosphate	1.4	0.9	1.3	1.1	0.920	2.1	0.1	1.8	0.2	0.200
UDP-glucuronate	10	5	4	2	0.072	18	6	24	8	0.206
Homovanillate	1.0	1.4	0.71	0.97	0.180	4.4	1.8	6.9	1.5	0.210
Adenosine 3',5'-diphosphate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	0.38	0.48	N.D.	-	0.216
N-Acetyl-beta-alanine	4.9	0.3	4.8	0.8	0.845	7.2	1.5	9.8	2.0	0.219
Isethionate	9.5	1.2	8.0	4.5	0.565	4.7	5.5	9.9	2.0	0.225
Biotin	5.3	0.4	5.0	1.1	0.627	10	2	13	2	0.249
Phenylpyruvate	4.1	3.80	4.2	2.41	0.960	1.4	2.8	4.9	5.7	0.251
UDP-N-acetylglucosamine <sup>#</sup>	75	10.9	42	6	0.005	120	26	142	23.3	0.252
R5P	12	6	10	11	0.825	6.1	0.9	8.3	2.6	0.258
Benzoate	30	7	24	6	0.268	28	12	32	12	0.262
F1,6P	21	17	13	3	0.335	29	8	39	12	0.300

\*Significantly different from oxazolone-treated wild-type mice ( $p < 0.05$ ). #Significantly different from vehicle-treated wild-type mice ( $p < 0.05$ ).

**Supplementary Table S2. Data for anionic metabolites in skin of wild-type and *Mdr1a/1b/BCRP*<sup>-/-</sup> mice after oxazolone application.**

Metabolite	Vehicle-treated mice (nmol/g skin)					Oxazolone-treated mice (nmol/g skin)				
	Wild-type		<i>Mdr1a/1b/Bcrp</i> <sup>-/-</sup>		P value	Wild-type		<i>Mdr1a/1b/Bcrp</i> <sup>-/-</sup>		P value
	Mean	S.D.	Mean	S.D.		Mean	S.D.	Mean	S.D.	
Pyruvate	111	74	90	28	0.488	85	27	69	14	0.307
3-Indoxyl sulfate	1.4	2.0	2.0	3.0	0.731	4.9	1.2	6.2	2.7	0.314
6-Phosphogluconate	5.1	1.9	3.6	1.8	0.378	8.0	3.3	11	2.9	0.319
CDP <sup>#</sup>	4.2	1.2	1.9	0.7	0.007	8.2	1.0	7.3	1.4	0.337
4-Methylbenzoate	10	3	8	1	0.322	15	2	14	1	0.338
ADP	158	33	108	33	0.060	206	7	185	46	0.350
G6P	123	95	187	95	0.356	250	70	201	83	0.353
Itaconate <sup>#</sup>	0.80	0.47	0.12	0.11	0.014	6.1	3.3	3.7	1.4	0.380
Carbamoylphosphate	N.D.	-	49	48	0.084	26	52.9	30	60.5	0.391
Pyrrrole-2-carboxylate	1.1	1.0	N.D.	-	0.074	0.18	0.36	0.26	0.52	0.391
Taurocholate	63	139	N.D.	-	0.364	N.D.	-	0.45	0.90	0.391
Adenosine 5'-phosphosulfate	6.7	15.0	N.D.	-	0.374	N.D.	-	0.14	0.28	0.391
Glucosamine 6-phosphate	0	0	0	0	0.841	0	0	0	1	0.391
3-Phenylpropionate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	3.5	7.0	0.0	0.0	0.391
Cumate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	0.34	0.69	0.391
dTDP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	0.11	0.22	N.D.	-	0.391
dCTP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	0.14	0.28	N.D.	-	0.391
dATP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	0.10	0.21	N.D.	-	0.391
2-Hydroxybutyrate	3.7	0.6	3.0	0.2	0.135	3.8	0.5	4.0	1.0	0.397
CoA	0.68	0.73	0.31	0.42	0.432	0.93	1.24	2.0	1.3	0.398
NADH	11	10	13	9	0.713	23	18	33	24	0.412
Lactate	4009	914	3926	1168	0.914	5616	470	6246	1339	0.418
PEP	8.9	4.2	7.2	4.3	0.614	6.7	1.9	8.7	3.3	0.426
4-Oxopentanoate	4.2	0.7	3.4	0.4	0.111	4.0	0.6	3.7	0.2	0.434
GTP	15	6	14	7	0.790	44	19.9	41	17.0	0.446
dTMP	0.36	0.56	0.28	0.62	0.856	1.2	0.4	1.0	0.2	0.450
Syringate	1.5	2.0	0.8	1.7	0.351	0.9	1.8	2.9	3.3	0.451
NAD <sup>+</sup> <sup>#</sup>	83	14	64	6	0.029	104	13	97	16	0.452
CTP <sup>#</sup>	6	3	4	2	0.009	17	8	16	6	0.455
Heptanoate	2.2	3.2	2.4	1.5	0.922	6.3	1.9	5.8	1.1	0.455
Undecanoate	N.D.	-	0.18	0.26	0.190	0.78	0.58	0.30	0.60	0.468
Isobutyryl CoA	0.20	0.28	N.D.	-	0.180	0.094	0.187	0.31	0.41	0.471
Citrate	836.2	107.42	574.1	234.23	0.087	479	67.5	538.4	91.86	0.479
UTP <sup>#</sup>	24	9	16	7	0.006	54	25	59	22	0.492
N-Acetylneuraminat	1.8	1.6	2.3	2.5	0.780	3.4	3.9	6.2	4.2	0.495
PRPP	N.D.	-	0.21	0.47	0.374	0.74	0.88	1.4	1.1	0.499
3-Ureidopropionate	6.6	4.0	3.8	3.1	0.406	7.7	0.6	9.5	4.5	0.507
Mucate	6.1	5.2	5.4	3.7	0.853	19	5	17	4	0.528
AMP <sup>#</sup>	147	31	87	23	0.022	196	63	231	68	0.537
Phenaceturate	4.8	3.1	1.7	1.8	0.193	3.2	0.5	3.0	1.1	0.565
3PG	45	15	34	13	0.390	39	9	46	16	0.572
Glycolate	37	22	24	13	0.067	44	5	48	12	0.581
Azelate	5.457	1.34	7.255	1.96	0.250	6.9	2.5	8.1	1.6	0.585
2-Hydroxyglutarate <sup>#</sup>	4.6	1.0	2.3	0.3	0.009	7.4	2.0	8.3	0.9	0.594
dTTP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	0.36	0.42	0.24	0.47	0.610
Decanoate	2.6	2.1	2.6	1.8	0.989	5.8	1.8	6.6	1.1	0.616
2',3'-cCMP	0.86	0.81	0.74	0.80	0.828	2.0	0.5	2.6	1.9	0.621
F6P	24	20	39	21	0.347	50	17	44	21	0.623
Pimelate	0.96	0.25	0.73	0.24	0.297	1.0	0.1	0.85	0.60	0.645
2-Oxoglutarate	27	6	26	9	0.724	24	5.7	22	5.5	0.653
5-Oxoproline	1775	274	1861	337	0.682	1465	704.03	1585.1	550.73	0.654
2-Hydroxypentanoate	10	2	8	0	0.147	10	1	10	1	0.657
Orotidine 5'-monophosphate	N.D.	-	0.19	0.43	0.374	0.44	0.52	0.23	0.46	0.660
NADPH	2.3	0.3	1.5	0.6	0.080	5.0	2.8	5.7	2.5	0.666
Prostaglandin E2	N.D.	-	6.7	15.1	0.374	9.2	10.7	4.9	9.8	0.670
dCDP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	0.27	0.55	0.12	0.25	0.684
Propionate	23	26	29	20	0.759	45	6	48	8	0.690
Terephthalate	0.93	0.33	0.87	0.09	0.747	0.90	0.12	0.87	0.05	0.704
cis-Aconitate	14	3	11	5	0.196	11	2	11	2	0.713
NADP+	0.87	1.94	N.D.	-	0.374	2.7	3.1	1.6	3.2	0.720
UDP <sup>#</sup>	16.3	4.6	7.4	2.5	0.006	26	2	25	5	0.727
Hippurate	14	8	7.4	5.4	0.281	55	39	64	27	0.776
Malonate	4.1	0.6	2.9	0.5	0.058	4.1	0.7	4.2	0.5	0.788
3-Hydroxy-3-methylglutarate <sup>#</sup>	1.8	0.2	1.3	0.2	0.003	2.6	0.4	2.6	0.3	0.803
dGTP	N.D.	-	15	20.7	0.178	12	14	13	16	0.804
Butanoate	48	47	63	42	0.697	100	20	102	17	0.817

#Significantly different from vehicle-treated wild-type mice ( $p < 0.05$ ).

**Supplementary Table S2. Data for anionic metabolites in skin of wild-type and *Mdr1a/1b/BCRP*<sup>-/-</sup> mice after oxazolone application.**

Metabolite	Vehicle-treated mice (nmol/g skin)					Oxazolone-treated mice (nmol/g skin)				
	Wild-type		<i>Mdr1a/1b/Bcrp</i> <sup>-/-</sup>		P value	Wild-type		<i>Mdr1a/1b/Bcrp</i> <sup>-/-</sup>		P value
	Mean	S.D.	Mean	S.D.		Mean	S.D.	Mean	S.D.	
o-Hydroxybenzoate	0.19	0.42	0.00	0.00	0.374	1	0.91	1.0	1.42	0.818
GDP	7.1	1.8	3.8	2.4	0.075	13	3	12	1	0.826
2,3-DPG	3.8	4.6	1.4	1.3	0.304	10	7	9	6	0.836
N-Acetyllecine	3.6	0.9	2.8	0.4	0.197	3.8	0.4	3.7	0.8	0.851
Pentanoate+3-Methylbutanoate	6	9	10	7	0.630	18	6	19	4	0.862
G1P	11	5	13	4	0.660	19	3	19	5	0.889
4-Hydroxymandelate	2.7	2.5	3.4	3.3	0.711	3.6	2.7	3.3	4.0	0.901
Dodecanoate	3.0	2.8	4.3	2.8	0.499	6.1	1.0	6.2	0.9	0.908
p-hydroxybenzoate	3	1	1	1	0.118	1	1	1	1	0.910
Sorbitol 6-phosphate	1.1	0.8	1.3	0.8	0.790	2.7	0.6	2.7	0.4	0.922
Hexanoate	6.2	4.8	5.4	3.6	0.809	10	2	10	2	0.937
Glutarate	3.2	0.9	2.0	0.3	0.067	3.8	1.1	3.8	1.5	0.970
Sebacate	0.49	0.14	0.51	0.07	0.809	0.57	0.23	0.57	0.10	0.985
S-Carboxymethylcysteine	N.D.	-	0.23	0.51	0.374	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Glyoxylate	3.4	7.7	2.8	6.3	0.908	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Crotonate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
3-Hydroxypropionate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Methanesulfonate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Tiglate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2-Oxobutyrate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
(Methylthio)acetate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Glycerate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
3-Acetylacrylate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Nicotinate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
1-Aminoethylphosphonate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2-Aminoethylphosphonate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Barbiturate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Cyclohexanecarboxylate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Citraconate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
4-Oxohexanoate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
4-Methyl-2-oxopentanoate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
6-Hydroxyhexanoate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2-Hydroxy-4-methylpentanoate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
m-Hydroxybenzoate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Phosphonoacetate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2-Fluorobenzoate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2-Thiopheneacetate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
cis,cis-Muconate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Adipate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
4-Methylthio-2-oxobutyrate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Citramalate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
trans-Cinnamate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Tartrate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Benzoylformate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2-Carboxybenzaldehyde	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
N-Methylanthranilate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Mandelate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Phenoxyacetate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
p-Hydroxyphenylacetate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Cysteine sulfinat	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2,5-Dihydroxybenzoate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2,4-Dihydropyrimidine-5-carboxylate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Orotate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Dihydroorotate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2-Oxoctanoate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2-Oxoadipate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2-Hydroxyoctanoate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
N-Formylaspartate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
o-Coumarate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
p-Coumarate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
3-(2-Hydroxyphenyl)propionate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
3-Phenyllactate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
3-(4-Hydroxyphenyl)propionate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2,3-Pyridinedicarboxylate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Cysteate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2-Amino-3-phosphonopropionate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Sulfanilate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2-Quinolinecarboxylate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Phenyl phosphate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.



**Supplementary Table S2. Data for anionic metabolites in skin of wild-type and *Mdr1a/1b/BCRP*<sup>-/-</sup> mice after oxazolone application.**

Metabolite	Vehicle-treated mice (nmol/g skin)					Oxazolone-treated mice (nmol/g skin)				
	Wild-type		<i>Mdr1a/1b/Bcrp</i> <sup>-/-</sup>		P value	Wild-type		<i>Mdr1a/1b/Bcrp</i> <sup>-/-</sup>		P value
	Mean	S.D.	Mean	S.D.		Mean	S.D.	Mean	S.D.	
Shikimate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Carbamoylaspartate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Allantoate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2-Isopropylmalate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
N-Formylmethionine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
p-Hydroxyphenylpyruvate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
4-Pyridoxate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Chelidonate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Serine O-sulfate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
10-Hydroxydecanoate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
N-Carbamylglutamate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Glucuronate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
trans-4-Hydroxy-3-methoxycinnamate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
o-Hydroxyhippurate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
4-Hydroxy-3-methoxymandelate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
E4P	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Cysteine S-sulfate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
4-Sulfobenzoate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
3-Indolebutyrate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Xanthurenate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Etidronate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
6,8-Thioctate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Ibuprofen	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
N-Acetylphenylalanine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Benzylsuccinate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
N-Benzyloxycarbonylglycine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2-Deoxyribose 1-phosphate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
4-Nitrophenyl phosphate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2,4-Dichlorophenoxyacetate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Sinapate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Porphobilinogen	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Dodecanedioate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
N-alpha-t-Boc-asparagine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Ketoprofen	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Galacturonate 1-phosphate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
8-Anilino-1-naphthalene sulfonate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
ppGpp	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
dUMP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
3',5'-Cyclic dAMP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Phytate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
cIMP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Bis(p-nitrophenyl)phosphate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
cGMP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Gibberellate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Prostaglandin F2alpha	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
XMP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Digalacturonate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
dUDP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Cholate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
dADP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
n-Propionyl CoA	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Methylmalonyl CoA	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
P1, P4-Di(adenosine-5') tetraphosphate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Malonyl CoA	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
IDP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Succinyl CoA	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Glutaryl CoA	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Folate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Glycocholate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
dUTP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Lauroyl CoA	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
dITP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
ITP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
XTP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Phosphoramidon	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
TDP-glucose	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Nicotinamide hypoxanthine dinucleotide+	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Deamido-NAD+	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
FAD	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.

**Supplementary Table S3. Data for cationic metabolites in plasma of wild-type and *Mdr1a/1b/BCRP*<sup>-/-</sup> mice after oxazolone application.**

Metabolite	Vehicle-treated mice (μmol/L)					Oxazolone-treated mice (μmol/L)				
	Wild-type		<i>Mdr1a/1b/Bcrp</i> <sup>-/-</sup>		<i>P</i> value	Wild-type		<i>Mdr1a/1b/Bcrp</i> <sup>-/-</sup>		<i>P</i> value
	Mean	S.D.	Mean	S.D.		Mean	S.D.	Mean	S.D.	
Uridine*	21	4	21	1	0.802	19	1	22	1	0.013
Cytosine*	0.17	0.23	0.15	0.21	0.906	0.4	0.12	0.2	0.18	0.024
Cysteine-glutathione disulphide -Divalent*	21	3	26	6	0.190	26.9	2.5	23.6	2.4	0.027
1-Methyl-2-pyrrolidinone*	0.5	1.0	0.3	0.6	0.776	0.4	0.8	1.6	0.5	0.031
Imidazole-4-acetate*	0.4	0.20	0.3	0.07	0.391	0.6	0.13	0.5	0.08	0.036
Melatonin*.*#	0.68	0.11	0.48	0.11	0.043	0.76	0.09	0.55	0.15	0.037
Cyclohexylamine	0.09	0.10	0.08	0.08	0.754	0.10	0.07	0.15	0.05	0.051
Putrescine(1,4-Butanediamine)#	0.70	0.17	0.46	0.06	0.033	0.85	0.18	0.57	0.04	0.063
Piperazine	89	14	94	14	0.641	89	17	67	21	0.068
Guanidinosuccinate#	0.34	0.14	0.528	0.118	0.034	0.18	0.19	0.45	0.08	0.071
beta-Ala	2.1	0.3	1.7	0.2	0.095	2.6	0.2	2.3	0.4	0.085
Carnosine	0.70	0.15	0.67	0.18	0.854	0.73	0.12	0.53	0.13	0.092
Carnitine	37	2.8	38	1.9	0.290	39	4.2	36	4	0.097
Trigonelline	3.3	0.95	2.9	0.54	0.215	3.9	0.43	3.1	0.8	0.109
Ophthalmate	0.48	0.10	0.42	0.04	0.141	0.54	0.12	0.47	0.09	0.123
Allantoin	189	98	221	83	0.653	167	51	246	28	0.125
alpha-Amino adipate	1.3	0.3	1.3	0.16	0.518	1.6	0.5	1.3	0.4	0.126
Riboflavin	0.52	0.33	0.28	0.40	0.209	0.39	0.45	0.76	0.19	0.134
Ornithine	33	13	27	2	0.373	44	6	35	7	0.134
Gln	645	107	590	53	0.237	697	58	606	83	0.158
Thr	118	33	119	22	0.947	151	13	131	22	0.161
Creatine	117	52	146	7	0.225	152	24	130	32	0.168
Cytidine	4.4	1.1	4.3	0.7	0.853	4.3	0.6	4.9	0.8	0.178
N-Acetylputrescine	0.06	0.13	0.10	0.13	0.437	0.15	0.18	0.10	0.13	0.186
N-Methylalanine	0.03	0.07	0.000	0.00	0.374	0.129	0.153	0.00	0.00	0.191
Inosine	1.7	1.1	0.75	0.36	0.213	0.77	0.02	1.1	0.4	0.193
Scopolamine	0.021	0.05	0.037	0.054	0.300	0.015	0.019	0.000	0.000	0.205
5-Methyl-2'-deoxycytidine	0.11	0.08	0.14	0.04	0.320	0.1	0.03	0.1	0.02	0.210
Indole-3-acetaldehyde	17	6	19	4.4	0.654	16	2.9	19	1.7	0.217
2AB	2.6	0.31	2.6	0.28	0.742	3.1	0.22	2.9	0.27	0.231
Arg	78	22	103	6	0.090	119	13	102	17	0.241
o-Acetylcarnitine	11	5	11	2.1	0.883	16	4.0	12	3.7	0.249
Cystine	28	4	30	4	0.613	25	3	21	4	0.252
Hypotaurine	5.7	1.0	6.0	1.3	0.752	9.7	1.6	8.0	1.3	0.252
Anserine	0.57	0.39	0.80	0.16	0.218	0.64	0.45	0.85	0.18	0.253
Lysinamide	0.029	0.040	0.022	0.024	0.703	0.025	0.034	0.015	0.031	0.257
Choline	17	2	17	3	0.907	18	1	21	4	0.258
5-Aminolevulinate#	0.33	0.06	0.29	0.06	0.005	0.31	0.08	0.34	0.10	0.261
Lys	173	46	176	23	0.782	209	17	180	27	0.272
Isopropanolamine	0.04	0.09	0.03	0.06	0.848	0.12	0.15	0.07	0.08	0.277
3-Methylhistidine	5.9	1.25	4.6	0.60	0.098	4.8	0.7	4.2	1.0	0.282
7,8-Dihydrobiopterin	41	38	73	21	0.250	83	15	73	23	0.283
Spermidine	0.056	0.053	0.065	0.050	0.728	0.032	0.039	0.060	0.013	0.286
Adenosine	0.58	0.33	0.29	0.16	0.205	0.40	0.10	0.65	0.42	0.293
Asp	8.9	1.5	7.5	1.0	0.214	11	1	12	2	0.315
Ser	131	25	138	13	0.487	147	13	135	20	0.316
Glutathione(ox)	5.6	1.9	8.2	3.2	0.209	11	3	13	5	0.323
Azetidine-2-carboxylate	0.045	0.101	0.048	0.107	0.374	0.04	0.08	0.11	0.09	0.33
Citrulline	71	25	71	14.7	0.995	69	9	60	17	0.335
Trimethylsulfonium	0.055	0.080	0.035	0.078	0.371	0.028	0.056	0.054	0.064	0.336
Trimethylamine N-oxide	1.2	0.32	1.1	0.41	0.896	1.2	0.19	1.0	0.10	0.357
Hydroxyproline	22	4	23	4	0.762	28	5	23	4	0.359
Acetylcholine	0.081	0.075	0.081	0.050	0.994	0.085	0.060	0.075	0.070	0.369
Phosphorylcholine	2.6	0.2	3.0	0.4	0.078	3.4	0.6	4.0	1.0	0.388
Histidinol	0.041	0.057	0.021	0.047	0.465	0.026	0.052	0.028	0.055	0.391
Tryptamine	0.030	0.07	0	0	0.374	0.019	0.038	0.018	0.035	0.391
Homoserine	N.D.	-	0.554	0.758	0.178	0.38	0.76	0.42	0.83	0.391
4-(beta-Acetylaminoethyl)imidazole	0.054	0.08	0.059	0.084	0.179	0.047	0.093	0.04	0.08	0.391
2-Aminobenzimidazole	0.023	0.034	0.014	0.032	0.317	0.016	0.032	0.019	0.039	0.391
Leu-Leu-Tyr	0.050	0.050	0.032	0.035	0.126	0.019	0.037	0.012	0.025	0.391
SAH	0.040	0.055	N.D.	-	0.178	N.D.	-	0.020	0.040	0.391
Phenethylamine	0.024	0.054	0.000	0.000	0.374	0.000	0.000	0.026	0.052	0.391
6-Hydroxynicotinate	0.33	0.73	N.D.	-	0.374	N.D.	-	0.34	0.67	0.391
Nicotine	0.000	0.000	0.008	0.018	0.374	0.011	0.021	0.017	0.033	0.391
Glutathione(red)	N.D.	-	0.074	0.165	0.374	N.D.	-	0.045	0.090	0.391
Acetanilide	0.27	0.38	0.14	0.31	0.63	0.17	0.35	N.D.	-	0.391

\*Significantly different from oxazolone-treated wild-type mice ( $p < 0.05$ ). #Significantly different from vehicle-treated wild-type mice ( $p < 0.05$ ).

**Supplementary Table S3. Data for cationic metabolites in plasma of wild-type and *Mdr1a/1b/BCRP*<sup>-/-</sup> mice after oxazolone application.**

Metabolite	Vehicle-treated mice (μmol/L)					Oxazolone-treated mice (μmol/L)				
	Wild-type		<i>Mdr1a/1b/BCRP</i> <sup>-/-</sup>		<i>P</i> value	Wild-type		<i>Mdr1a/1b/BCRP</i> <sup>-/-</sup>		<i>P</i> value
	Mean	S.D.	Mean	S.D.		Mean	S.D.	Mean	S.D.	
Hypoxanthine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	0.14	0.28	0.391
Urocanate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	0.57	1.13	0.391
Noradrenaline	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	0.051	0.102	N.D.	-	0.391
3-Iodotyrosine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	0.021	0.041	N.D.	-	0.391
Atropine	0.018	0.028	0.010	0.022	0.200	0.0084	0.0169	0.011	0.022	0.391
2'-Deoxycytidine	1.0	0.1	1.2	0.1	0.057	1.3	0.3	1.2	0.1	0.395
Xanthosine	0.21	0.19	0.07	0.09	0.222	0.033	0.065	0.045	0.061	0.402
1-Methylhistamine	0.059	0.026	0.046	0.024	0.347	0.072	0.014	0.13	0.12	0.411
Betonidine	0.068	0.09	0.074	0.11	0.901	0.098	0.12	0.14	0.10	0.412
Asn	36	9	36	4	0.997	38	5	33	7	0.429
N8-Acetylspermidine	0.094	0.015	0.086	0.015	0.308	0.10	0.01	0.13	0.05	0.448
3-Chloroalanine	0.098	0.094	0.082	0.112	0.688	0.080	0.103	0.024	0.047	0.459
Piperidine	0.052	0.115	0.042	0.094	0.903	0.13	0.16	0.08	0.16	0.460
Ala	299	51	332	35	0.249	351	31	324	52	0.486
S-Methylmethionine	0.029	0.028	0.018	0.041	0.496	0.011	0.021	0.036	0.057	0.512
Pro	72	28	70	7	0.905	80	11	70	22	0.518
Urea	2280	135	2612	252	0.093	2627	244	2787	327	0.534
Methylguanidine	0.50	0.68	0.26	0.37	0.191	0.6	0.7	0	1	0.551
Phe	55	11	51	7	0.571	58	4	60	8	0.553
o-Succinylhomoserine	0.56	0.33	0.34	0.47	0.492	0.23	0.29	0.35	0.25	0.556
Glycerophosphorylcholine	14	3	15	4	0.332	14	3	15	4	0.565
Arginine ethyl ester	0.030	0.046	0.025	0.037	0.332	0.024	0.030	0.018	0.035	0.572
Taurine	354	23	339	33	0.473	340	28	354	44	0.580
Agmatine	0.016	0.023	0.018	0.026	0.783	0.014	0.028	0.004	0.009	0.582
N,N-Dimethylglycine	7.7	0.95	8.4	0.58	0.162	8.0	1.32	8.8	2.0	0.583
Diethanolamine	0.41	0.11	0.52	0.18	0.281	0.27	0.01	0.35	0.24	0.595
Thymidine	4.1	0.5	3.7	0.3	0.120	4.4	0.3	4.6	0.7	0.597
1-Methylnicotinamide	0.5	0.11	0.6	0.14	0.055	0.5	0.1	0.6	0.2	0.599
5-Aminovalerate	0.3	0.21	0.3	0.09	0.847	0.6	0.26	0.8	0.42	0.600
Creatinine	6.35	0.69	6.86	0.72	0.274	7.03	0.56	7.31	0.93	0.618
Val	152	30	146	19	0.717	166	18	158	22	0.623
6-Aminohexanoate	0.078	0.18	0.00	0.00	0.374	0.09	0.19	0.035	0.07	0.635
Histamine	0.21	0.12	0.17	0.10	0.178	0.24	0.10	0.23	0.09	0.640
N6,N6,N6-Trimethyllysine	1.0	0.1	1.2	0.1	0.068	1.1	0.2	1.2	0.4	0.647
Gly-Leu	0.18	0.08	0.19	0.07	0.48	0.20	0.06	0.21	0.06	0.65
Tyramine	0.4	0.17	0.35	0.13	0.507	0.40	0.19	0.49	0.26	0.658
α-Lipoamide+5-Methoxyindoleacetate	0.51	0.05	0.41	0.19	0.288	0.57	0.02	0.52	0.22	0.661
Glucosamine	0.63	0.23	0.51	0.14	0.134	0.55	0.21	0.59	0.17	0.675
N-Acetylhistidine <sup>#</sup>	0.33	0.05	0.49	0.09	0.005	0.55	0.088	0.51	0.14	0.676
N-Acetylvaline	0.6	0.13	0.7	0.18	0.431	0.9	0.24	0.8	0.24	0.679
Kynurenine	0.27	0.07	0.29	0.06	0.826	0.43	0.08	0.40	0.12	0.687
Methionine sulfoxide	2.3	1.4	1.8	0.15	0.544	3	0.5	4	1.6	0.706
Ile	43	11	43	10	0.952	50	7	47	10	0.719
1-Aminocyclopropane-1-carboxylate	0.096	0.094	0.053	0.073	0.344	0.12	0.10	0.10	0.08	0.72
Guanosine	0.077	0.057	0.025	0.034	0.192	0.021	0.026	0.030	0.037	0.724
5-Hydroxylysine <sup>#</sup>	0.6	0.14	0.52	0.08	0.030	0.7	0.09	0.7	0.12	0.729
γ-Butyrobetaine	1.2	0.16	1.3	0.19	0.600	1.8	0.3	1.7	0.13	0.744
Serotonin	0.12	0.14	0.40	0.76	0.484	0.20	0.23	0.25	0.25	0.75
5-Methylthioadenosine	0.013	0.029	0.016	0.037	0.884	0.034	0.040	0.022	0.043	0.759
7-Methylguanidine	N.D.	-	0.050	0.069	0.182	0.026	0.051	0.045	0.091	0.760
Sarcosine	1.6	0.55	1.4	0.28	0.495	2.0	0.4	2.3	1.3	0.764
Indole-3-acetate	1.2	0.39	1.0	0.5	0.552	1.2	0.51	1.3	0.61	0.774
Thymine	185	19	210	12.8	0.061	180	7	183	14.7	0.782
Tropinone	0.08	0.12	0.098	0.10	0.455	0.087	0.115	0.097	0.076	0.783
Betaine	71	6	64	3	0.098	82	4	82	5	0.784
Pseudopelletierine	0.068	0.07	0.061	0.10	0.699	0.093	0.070	0.082	0.099	0.792
Gly <sup>#</sup>	190	28	225	20	0.010	204	15	199	30	0.792
γ-Guanidinobutyrate	0.38	0.09	0.36	0.12	0.669	0.72	0.21	0.76	0.24	0.794
N-Methylglutamate	0.22	0.13	0.27	0.17	0.150	0.27	0.04	0.29	0.23	0.808
Ectoine	0.35	0.12	0.33	0.12	0.707	0.60	0.10	0.59	0.11	0.811
Cystathionine <sup>#</sup>	2.1	0.4	3.5	0.6	0.008	2.4	0.8	2.3	0.5	0.812
Tropine	0.075	0.07	0.064	0.06	0.510	0.087	0.071	0.090	0.056	0.812
Adenine	0.14	0.08	0.10	0.09	0.569	0.13	0.09	0.14	0.10	0.817
1-Amino-1-cyclopentanecarboxylate	0.12	0.09	0.058	0.086	0.291	0.10	0.075	0.093	0.073	0.836
5-Methoxytryptamine	0.082	0.14	0.10	0.14	0.248	0.082	0.116	0.091	0.115	0.850
Ala-Ala	0.15	0.15	0.3	0.04	0.235	0.2	0.20	0.1	0.16	0.862
Thiamine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	0.42	0.85	0.32	0.63	0.871

<sup>#</sup>Significantly different from vehicle-treated wild-type mice (*p* < 0.05).

**Supplementary Table S3. Data for cationic metabolites in plasma of wild-type and *Mdr1a/1b/BCRP*<sup>-/-</sup> mice after oxazolone application.**

Metabolite	Vehicle-treated mice (μmol/L)					Oxazolone-treated mice (μmol/L)				
	Wild-type		<i>Mdr1a/1b/Bcrp</i> <sup>-/-</sup>		P value	Wild-type		<i>Mdr1a/1b/Bcrp</i> <sup>-/-</sup>		P value
	Mean	S.D.	Mean	S.D.		Mean	S.D.	Mean	S.D.	
Met	44	15	43	2.4	0.871	63	8	66	31	0.875
SAM+	0.17	0.02	0.19	0.04	0.522	0.17	0.03	0.16	0.05	0.875
GABA	0.36	0.10	0.24	0.23	0.195	0.45	0.22	0.43	0.15	0.877
Hydroxyatrazine	0.033	0.049	0.034	0.031	0.981	0.019	0.039	0.020	0.029	0.885
5-Hydroxytryptophan	N.D.	-	0.077	0.119	0.222	0.064	0.129	0.083	0.167	0.886
1-Methyladenosine	0.22	0.08	0.19	0.07	0.318	0.18	0.07	0.17	0.03	0.902
N-Acetylglucosamine	2.0	0.3	2.0	0.5	0.827	1.8	0.2	1.8	0.4	0.908
Trp	31	9.5	30	2.6	0.948	30	4	31	4	0.924
Tyr	77	30	63	14	0.268	68	9	67	17	0.927
Nicotinamide	2.5	1.0	3.1	0.5	0.266	1.9	0.7	1.8	0.4	0.927
Pipecolate	2.8	0.31	3.6	0.42	0.062	3.1	0.5	3.0	0.8	0.928
His	58	4	65	3	0.089	67	8	66	5	0.929
N-Acetylmethionine	0.20	0.33	0.077	0.173	0.189	0.12	0.24	0.14	0.29	0.930
Acetohydroxamate	86	6	87	8.4	0.534	90	5	89	5	0.941
gamma-Glu-2AB <sup>#</sup>	0.074	0.166	0.199	0.179	0.028	0.315	0.15	0.30	0.17	0.942
Leu	112	18	98	12	0.180	118	12	119	16	0.946
Guanidinoacetate	2.6	0.35	2.5	0.10	0.678	3	0.3	3	0.4	0.946
Metformin	0.033	0.039	0.030	0.029	0.703	0.030	0.027	0.029	0.028	0.953
Triethanolamine	1.0	0.11	1.0	0.25	0.998	1.0	0.16	1.0	0.11	0.958
5-Methyltetrahydrofolate	0.29	0.4	0.12	0.3	0.267	0.13	0.27	0.12	0.25	0.965
Glu	36	8	30	4	0.248	43	6	43	8	0.986
N-epsilon-Acetyllysine	0.56	0.08	0.57	0.09	0.708	0.56	0.079	0.56	0.09	0.986
Benzamidine	0.060	0.085	0.016	0.037	0.180	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Leupeptin	0.030	0.066	0.020	0.044	0.374	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
4-Amino-3-hydroxybutyrate	0.025	0.056	N.D.	-	0.374	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
5-Methylcytosine	N.D.	-	0.036	0.081	0.374	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Pyridoxamine	0.011	0.025	N.D.	-	0.374	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Desethylatrazine	0.016	0.036	N.D.	-	0.374	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Muramate	0.049	0.109	N.D.	-	0.374	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
TRH	0.029	0.064	0.022	0.049	0.871	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Pyrazole	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
3-Aminopropionitrile	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Isobutylamine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
1,3-Diaminopropane	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Semicarbazide	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Hydroxyurea	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Cysteamine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Pyridine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
4-Methylpyrazole	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
3-Amino-1,2,4-triazole	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Isoamylamine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
3-Aminopropane-1,2-diol	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Aniline	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2-Hydroxypyridine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
4-Hydroxymethylimidazole	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Acetoacetamide	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Spermine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Hexylamine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Cadaverine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2-Cyanopyridine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2,3-Diaminopropionate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
N-Methylaniline	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
1,3-Phenylenediamine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Phenylhydrazine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2-Aminophenol	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Uracil	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Muscimol	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Dihydrouracil	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
beta-Cyanoalanine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Benzimidazole	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2,4-Diaminobutyrate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Alpha-Methylserine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Purine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Cys	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Benzamide	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
alpha-Methylbenzylamine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2,4-Dimethylaniline	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.

**Supplementary Table S3. Data for cationic metabolites in plasma of wild-type and *Mdr1a/1b/BCRP*<sup>-/-</sup> mice after oxazolone application.**

Metabolite	Vehicle-treated mice (μmol/L)					Oxazolone-treated mice (μmol/L)				
	Wild-type		<i>Mdr1a/1b/Bcrp</i> <sup>-/-</sup>		P value	Wild-type		<i>Mdr1a/1b/Bcrp</i> <sup>-/-</sup>		P value
	Mean	S.D.	Mean	S.D.		Mean	S.D.	Mean	S.D.	
Picolinamide	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Isonicotinamide	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Pyrazinamide	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Melamine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Quinoline	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Isoquinoline	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Octylamine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
b-Leucine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Bis(3-aminopropyl)amine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Gly-Gly	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
5-Aminoindole	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
4-Aminoindole	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Homocysteine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
p-Aminobenzoate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Anthranilate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Isoniazid	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Phenylethanolamine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Hexamine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
4-Methyl-5-thiazoleethanol	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
5,6-Dimethylbenzimidazole	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Carbachol	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Trientine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Isatin	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
O-Acetylserine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Normicotine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
3-Methyladenine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
6-Methylaminopurine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2,6-Diethylaniline	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Guanine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Amantadine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
6-Mercaptopurine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Xanthine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
4-Aminosalicylate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
3-Hydroxyanthranilate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Dopamine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
beta-Imidazolelactate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Ibotenate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Pargyline	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Tolazoline	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Indole-3-ethanol	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2-Deoxystreptamine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Pterin	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
3-Methylguanine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Pyridoxal	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Syneprhine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Pyridoxine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Diphenylamine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Deisopropylatrazine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Indole-3-acetamide	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
N-gamma-Ethylglutamine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
N-omega-Methyltryptamine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Gramine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2-Guanidinobenzimidazole	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Canavanine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Alliin	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Cys-Gly	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Xanthopterin	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Mannosamine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
n-Butyl a-Picolinate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Methionine sulfoximine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
o-Phenanthroline	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Harman	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Eflornithine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Epinephrine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
N-alpha,N-alpha-Dimethylhistidine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Quisqualate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Castanospermine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
5-Hydroxyindoleacetate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.

**Supplementary Table S3. Data for cationic metabolites in plasma of wild-type and *Mdr1a/1b/BCRP*<sup>-/-</sup> mice after oxazolone application.**

Metabolite	Vehicle-treated mice (μmol/L)					Oxazolone-treated mice (μmol/L)				
	Wild-type		<i>Mdr1a/1b/Bcrp</i> <sup>-/-</sup>		<i>P</i> value	Wild-type		<i>Mdr1a/1b/Bcrp</i> <sup>-/-</sup>		<i>P</i> value
	Mean	S.D.	Mean	S.D.		Mean	S.D.	Mean	S.D.	
Glucosaminat	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Tyrosine methyl ester	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
DOPA	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Tacrine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Desthiobiotin	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
6-Aminopenicillanate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
beta-Ala-Lys	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
5-Methoxy-N,N-dimethyltryptamine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
trans-Zeatin	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
N-Acetylglucosylamine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
3-Hydroxykynurenine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Sepiapterin	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Homocarnosine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
N1-Acetylspermine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Octopine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Pyridoxamine 5'-phosphate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
4-Aminophenylsulfone	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
gamma-Glu-cys	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
5'-Deoxyadenosine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Purine riboside	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
7,8-Dihydroneopterin	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Albendazole	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
N6-Methyl-2'-deoxyadenosine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
4,4'-Methylene bis(o-chloroaniline)	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2'-Deoxyguanosine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Homocystine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Glu-Glu	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Diclofenac	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Disulfiram	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Z-Gly-Pro	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
N-alpha-Benzenoarginine ethylester	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Chloramphenicol	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Piroxicam	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribotide	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Thiamine monophosphate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Tetrahydropalmitine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Allocriptopine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
S-Lactoylglutathione	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
3,5-Diiodo-tyrosine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Daunorubicin	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
3,3',5-Triiodothyronine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2-Amino-2-methyl-1,3-propanediol	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.

**Supplementary Table S4. Data for anionic metabolites in plasma of wild-type and *Mdr1a/1b/BCRP*<sup>-/-</sup> mice after oxazolone application.**

Metabolite	Vehicle-treated mice (μmol/L)					Oxazolone-treated mice (μmol/L)				
	Wild-type		<i>Mdr1a/1b/Bcrp</i> <sup>-/-</sup>		P value	Wild-type		<i>Mdr1a/1b/Bcrp</i> <sup>-/-</sup>		P value
	Mean	S.D.	Mean	S.D.		Mean	S.D.	Mean	S.D.	
4-Oxopentanoate*	1.2	1.7	2.1	1.3	0.531	N.D.	-	3.3	0.7	0.000
4-Methyl-2-oxopentanoate*	37	12	28	9	0.201	39	3	33	3	0.020
Itaconate	0.080	0.079	0.019	0.043	0.193	0.25	0.05	0.10	0.14	0.055
xanthurenate	28	3	27	2	0.535	27	2	30	2	0.069
Phenaceturate	1.9	0.6	1.5	1.0	0.587	3.1	1.1	1.7	0.4	0.071
Saccharate	0.69	0.18	0.53	0.09	0.187	0.83	0.16	1.1	0.3	0.078
N-Acetylglucosamine 1-phosphate	1.2	0.2	0.65	0.60	0.213	1.1	0.7	1.7	0.4	0.078
2-Hydroxy-4-methylpentanoate	0.62	0.85	1.5	0.9	0.259	2.1	0.4	1.8	0.1	0.085
Hexanoate	5.2	0.6	2	2.6	0.053	2.2	2.9	5.0	0.3	0.100
3-Hydroxybutyrate	230	144	128	26	0.244	134	29	195	66	0.115
2-Hydroxyisobutyrate+2-Hydroxybutyrate	15	2	15	1.2	0.918	14	1	11	2	0.119
Dodecanoate	4.6	1.1	3.9	0.8	0.271	4.6	0.6	3.8	0.5	0.121
Hippurate	3.7	1.8	4.9	1.6	0.101	12	4	8.3	2.8	0.124
Pentanoate+3-Methylbutanoate	6.9	1.5	5.8	3.3	0.425	4.2	3.9	7.3	1.0	0.131
Ru5P	2.2	0.9	2	1.1	0.752	1.9	1.1	4.1	2.5	0.196
Sebacate	0.18	0.02	0.20	0.04	0.161	0.21	0.03	0.25	0.04	0.217
4-Acetylbutyrate+ 4-Oxohexanoate	1.4	0.8	1.4	0.8	0.976	1.5	0.9	2.1	0.4	0.226
3-Indoxyl sulfate	3.5	1.1	5.8	3.6	0.289	7.8	3.0	10	2	0.231
trans-Cinnamate	0.69	0.97	0.28	0.63	0.221	1.9	1.2	0.8	1.1	0.238
Lactate	2792	341	2841	731	0.902	6823	2092	4765	1963	0.247
Terephthalate	0.14	0.20	0.053	0.119	0.505	0.056	0.126	0.16	0.21	0.247
N-Benzoyloxycarbonylglycine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	0.15	0.25	0.264
Glyoxylate	1.9	4.2	3.2	4.7	0.596	5.9	3.5	2.5	5.5	0.264
3-Ureidopropionate	5.9	5.8	4.4	4.9	0.340	13	3	16	6	0.265
Propionate	10	1	12	1	0.129	8.6	3.1	10	1	0.275
Azelaate	2.2	0.3	2.0	0.2	0.175	2.2	0.3	2.5	0.5	0.331
G6P+F6P	3.5	1.0	3.9	1.3	0.523	7.7	5.4	4.8	2.0	0.354
N-Acetylphenylalanine	0.74	0.19	0.98	0.34	0.245	1.0	0.6	1.3	0.3	0.360
2-Furoate	N.D.	-	1.4	1.9	0.179	0.38	0.84	N.D.	-	0.374
N-Formylmethionine	N.D.	-	0.048	0.071	0.201	0.013	0.030	N.D.	-	0.374
2,3-Pyridinedicarboxylate	0.090	0.201	N.D.	-	0.374	0.12	0.28	N.D.	-	0.374
UMP	N.D.	-	0.38	0.86	0.374	N.D.	-	0.60	1.34	0.374
Heptanoate	0.44	0.61	0.26	0.59	0.556	0.18	0.39	N.D.	-	0.374
4-Hydroxy-3-methoxymandelate	0.067	0.150	0.056	0.126	0.917	N.D.	-	0.054	0.120	0.374
3-(4-Hydroxyphenyl)propionate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	0.17	0.38	0.374
Undecanoate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	0.041	0.091	N.D.	-	0.374
cAMP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	0.038	0.086	N.D.	-	0.374
F1,6P	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	0.36	0.80	0.374
IMP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	0.37	0.82	N.D.	-	0.37
Pimelate	0.57	0.14	0.44	0.09	0.250	0.71	0.10	0.66	0.06	0.378
Isethionate	6.1	1.2	6.7	1.2	0.567	3.8	0.6	4.3	0.8	0.39
N-Acetylglutamate	0.44	0.12	0.51	0.10	0.310	0.67	0.29	0.58	0.26	0.401
2-Oxoglutarate	58	17	71	17	0.293	54	13	47	12	0.406
Pelargonate	2.7	0.4	2.3	1.3	0.589	2.8	0.4	3.0	0.2	0.424
Ethanolamine phosphate	7.7	1.1	7.3	0.8	0.646	9.8	1.1	11	3	0.425
N-Acetyl-beta-alanine	2.4	0.4	2.7	0.3	0.300	3.4	0.2	3.5	0.3	0.426
Glycerophosphate	26	2	23	1	0.058	30	9	26	4	0.443
N-Acetylmethionine	0.058	0.130	N.D.	-	0.374	0.079	0.116	0.048	0.073	0.460
5-Oxoproline	29	6	27	4	0.360	31	3	29	5	0.515
Glutarate	4.9	0.8	4.4	0.7	0.401	4.9	1.1	5.3	0.9	0.517
cis-Aconitate	6.5	0.9	6.9	0.6	0.582	6.5	0.9	6.0	1.1	0.530
Pyruvate	190	31	228	49	0.168	321	109	261	115	0.542
Fumarate	13	5	14	4	0.813	17	7	14	5	0.545
Urate	53	30	38	16	0.462	51	20	58	15	0.550
threo-β-methylaspartate+Glu	39	14	32	5	0.276	52	15	49	10	0.552
ADP	0.021	0.048	0.12	0.27	0.481	0.13	0.25	0.35	0.71	0.593
PEP	0.25	0.23	0.38	0.1	0.382	0.66	0.55	0.43	0.49	0.600
2-Oxoisopentanoate	20	4	19	4	0.523	19	2	18	2	0.603
Quinate <sup>#</sup>	6.8	1.1	5.6	0.8	0.036	5.7	0.3	6.0	0.7	0.610
Glycolate	29	1	30	2	0.172	32	3	33	3	0.614
Malate	62	21	62	18	0.985	71	22	64	21	0.634
Mucate	8.0	1.7	7.8	0.8	0.672	8.2	1.1	7.8	1.4	0.637
Adipate	0.86	0.13	0.68	0.15	0.131	0.94	0.39	0.85	0.09	0.645
Decanoate	6.0	1.0	6	0.2	0.773	5.2	0.8	5.5	0.5	0.657
Cysteine S-sulfate	9.3	2.3	10	2.4	0.538	12	2	11	3	0.659
2-Hydroxyglutarate	2.8	0.6	2	0.3	0.304	2.2	0.3	2.3	0.6	0.663

\*Significantly different from oxazolone-treated wild-type mice ( $p < 0.05$ ). #Significantly different from vehicle-treated wild-type mice ( $p < 0.05$ ).

**Supplementary Table S4. Data for anionic metabolites in plasma of wild-type and *Mdr1a/1b/BCRP*<sup>-/-</sup> mice after oxazolone application.**

Metabolite	Vehicle-treated mice (μmol/L)					Oxazolone-treated mice (μmol/L)				
	Wild-type		<i>Mdr1a/1b/Bcrp</i> <sup>-/-</sup>		P value	Wild-type		<i>Mdr1a/1b/Bcrp</i> <sup>-/-</sup>		P value
	Mean	S.D.	Mean	S.D.		Mean	S.D.	Mean	S.D.	
trans-Aconitate	3.4	2.3	1.4	0.5	0.130	12	6	11	7	0.670
2-Hydroxypentanoate	35	2	44	6	0.050	42	5	44	3	0.680
Homovanillate	2.3	1.4	2	1.5	0.415	1.9	1.8	1.3	1.8	0.681
3PG	0.90	0.17	1.1	0.3	0.429	1.0	0.5	1.2	0.9	0.724
Allantoate	4.9	2.9	6.3	1.5	0.420	4.0	2.3	4.6	2.6	0.744
Octanoate	0.69	1.53	0.61	1.37	0.947	0.95	1.30	1.3	1.8	0.749
Malonate <sup>#</sup>	3.9	1.0	2.3	0.1	0.027	2.4	0.2	2.4	0.2	0.795
Citrate	173	24	176	29	0.877	156	37	151	32	0.833
Succinate	58	30	54	19	0.842	84	31	81	26	0.876
6-Hydroxyhexanoate	0.35	0.78	0.25	0.56	0.844	0.66	1.47	0.55	1.22	0.911
Isocitrate	7.3	0.8	7.0	1.2	0.703	5.6	1.8	5.7	1.2	0.923
GMP	0.10	0.22	0.31	0.68	0.578	0.46	1.03	0.53	1.19	0.932
N-Acetylaspartate	3.0	0.6	3.2	0.6	0.638	3.2	0.6	3.2	0.9	0.950
Dodecanedioate	0.081	0.080	0.080	0.062	0.990	0.054	0.120	0.056	0.078	0.972
AMP	0.66	1.11	1.8	4.0	0.605	3.3	5.9	3.4	6.4	0.984
Gluconate <sup>#</sup>	31.9	2.7	36	3.8	0.037	24.6	3.5	24.5	7.5	0.987
Cysteine sulfinate	0.26	0.58	N.D.	-	0.374	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
3-Phenyllactate	0.072	0.160	N.D.	-	0.374	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
4-Pyridoxate	N.D.	-	0.015	0.034	0.374	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Serine O-sulfate	N.D.	-	0.059	0.131	0.374	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2-Oxobutyrate	10	4	13	9.0	0.377	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Glucuronate	8.2	7.5	8.8	8.0	0.926	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Crotonate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
3-Hydroxypropionate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Methanesulfonate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Tiglate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
(Methylthio)acetate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Glycerate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Pyrrole-2-carboxylate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Methyl sulfate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
3-Acetylacrylate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Benzoate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Nicotinate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
1-Aminoethylphosphonate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2-Aminoethylphosphonate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Barbiturate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Cyclohexanecarboxylate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Citraconate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
4-Methylbenzoate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
m-Hydroxybenzoate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
o-Hydroxybenzoate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
p-hydroxybenzoate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Phosphonoacetate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2-Fluorobenzoate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Carbamoylphosphate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2-Thiopheneacetate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
cis,cis-Muconate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
4-Methylthio-2-oxobutyrate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Citramalate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Tartrate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Benzoylformate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2-Carboxybenzaldehyde	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
3-Phenylpropionate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
N-Methylanthranilate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Mandelate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Phenoxyacetate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
p-Hydroxyphenylacetate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2,5-Dihydroxybenzoate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2,4-Dihydroxypyrimidine-5-carboxylate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Orotate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Dihydroorotate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2-Oxoactanoate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2-Oxoadipate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2-Hydroxyoctanoate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
N-Formylaspartate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
3-Hydroxy-3-methylglutarate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Phenylpyruvate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.

#Significantly different from vehicle-treated wild-type mice ( $p < 0.05$ ).



**Supplementary Table S4. Data for anionic metabolites in plasma of wild-type and *Mdr1a/1b/BCRP*<sup>-/-</sup> mice after oxazolone application.**

Metabolite	Vehicle-treated mice (μmol/L)					Oxazolone-treated mice (μmol/L)				
	Wild-type		<i>Mdr1a/1b/Bcrp</i> <sup>-/-</sup>		P value	Wild-type		<i>Mdr1a/1b/Bcrp</i> <sup>-/-</sup>		P value
	Mean	S.D.	Mean	S.D.		Mean	S.D.	Mean	S.D.	
o-Coumarate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
p-Coumarate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Cumate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Phthalate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
3-(2-Hydroxyphenyl)propionate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
4-Hydroxy-3-methoxybenzoate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
4-Hydroxymandelate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Cysteate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2-Amino-3-phosphonopropionate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
DHAP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Sulfanilate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2-Quinolinecarboxylate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
N-Acetylleucine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Phenyl phosphate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Shikimate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Carbamoylaspartate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2-Isopropylmalate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
S-Carboxymethylcysteine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
p-Hydroxyphenylpyruvate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Chelidonate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
O-Phosphoserine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
10-Hydroxydecanoate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
N-Carbamylglutamate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
trans-4-Hydroxy-3-methoxycinnamate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
o-Hydroxyhippurate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Syringate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
E4P	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
4-Sulfobenzoate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
3-Indolebutyrate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Xanthurenate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Etidronate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
6,8-Thioctate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Ibuprofen	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Benzylsuccinate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2-Deoxyribose 1-phosphate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
4-Nitrophenyl phosphate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Pantothenate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2,4-Dichlorophenoxyacetate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Sinapate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Porphobilinogen	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
R5P	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
N-alpha-t-Boc-asparagine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2-Deoxyglucose 6-phosphate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Biotin	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Ketoprofen	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Glucosamine 6-phosphate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
G1P	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Sorbitol 6-phosphate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2,3-DPG	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Galacturonate 1-phosphate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
6-Phosphogluconate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
S7P	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Argininosuccinate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
N-Acetylmuramate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
8-Anilino-1-naphthalene sulfonate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
N-Acetylglucosamine 6-phosphate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
ppGpp	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
2',3'-cCMP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
dCMP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
dUMP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
N-Acetylneuraminat	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Ribulose 1,5-diphosphate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
3',5'-Cyclic dAMP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
dTMP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
CMP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Phytate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
cIMP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
dAMP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Bis(p-nitrophenyl)phosphate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.

**Supplementary Table S4. Data for anionic metabolites in plasma of wild-type and *Mdr1a/1b/BCRP*<sup>-/-</sup> mice after oxazolone application.**

Metabolite	Vehicle-treated mice (μmol/L)					Oxazolone-treated mice (μmol/L)				
	Wild-type		<i>Mdr1a/1b/Bcrp</i> <sup>-/-</sup>		P value	Wild-type		<i>Mdr1a/1b/Bcrp</i> <sup>-/-</sup>		P value
	Mean	S.D.	Mean	S.D.		Mean	S.D.	Mean	S.D.	
cGMP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Gibberellate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
3'-AMP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Prostaglandin E2	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Prostaglandin F2alpha	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
XMP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Orotidine 5'-monophosphate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Digalacturonate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
NADPH	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
CoA	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
dCDP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
dUDP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
PRPP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
dTDP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
CDP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
UDP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Acetyl CoA	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Cholate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
dADP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
n-Propionyl CoA	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Methylmalonyl CoA	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
P1, P4-Di(adenosine-5') tetraphosphate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Isobutyryl CoA	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Trehalose 6-phosphate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Malonyl CoA	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Adenosine 5'-phosphosulfate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Adenosine 3',5'-diphosphate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
IDP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Succinyl CoA	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Glutaryl CoA	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Folate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
GDP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Adenylosuccinate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Glycocholate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
dCTP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
dUTP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Lauroyl CoA	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
dTTP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
CTP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
UTP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
dATP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
dITP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
dGTP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
ATP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
ITP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Taurocholate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
GTP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
XTP	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Phosphoramidon	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
CDP-choline	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
ADP-ribose	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
TDP-glucose	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
UDP-glucose	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
UDP-glucuronate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
ADP-glucose	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
GDP-mannose	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
UDP-N-acetylglucosamine	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
CMP-N-acetylneuraminate	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
NAD+	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Nicotinamide hypoxanthine dinucleotide+	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
Deamido-NAD+	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
NADH	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
NADP+	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.
FAD	N.D.	-	N.D.	-	N.A.	N.D.	-	N.D.	-	N.A.

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました金沢大学医薬保健研究域 (薬学系) 加藤 将夫 教授に謹んで謝意を表します。

また、本研究に関して、御指導と御助言ならびに御協力を賜りました金沢大学医薬保健研究域 (薬学系) 中道 範隆准教授に厚く感謝の意を表します。

さらに、本研究に関して、種々の有益な御指導と御助言を賜りました金沢大学医薬保健研究域 (薬学系) 増尾 友佑 助教に深く感謝の意を表します。

本研究の遂行に御協力を頂きました南茂 光 氏、山崎 絵里名 氏に御礼申し上げますとともに、本研究に関して、有益な御助言や御協力を頂きました金沢大学分子薬物治療学研究室の諸氏に厚くお礼申し上げます。

また、本研究に関する実験の遂行のために用いた数多くの動物達に深く感謝すると共に、追悼の意を表します。

## 参考文献

### 主論文

1. **Hashimoto N**, Nakamichi N, Yamazaki E, Oikawa M, Masuo Y, Schinkel AH, Kato Y. P-Glycoprotein in skin contributes to transdermal absorption of topical corticosteroids. *Int. J. Pharm.*, 521: 365-373, 2017.

### 副論文

1. **Hashimoto N**, Nakamichi N, Uwafuji S, Yoshida K, Sugiura T, Tsuji A, Kato Y. ATP binding cassette transporters in two distinct compartments of the skin contribute to transdermal absorption of a typical substrate. *J. Control. Release*, 165: 54-61, 2013.