

第二章 薬物の消化管吸収における MDR1 輸送能の評価について

試薬

[³H]Daunomycin (185 GBq/mmol), [³H]digoxin (703 GBq/mmol), [³H]diazepam (3052 GBq/mmol), [³H]dexamethasone (1500 GBq/mmol), [³H]17 β estradiol-17 β -D-glucuronide (E217 β G; 1628 GBq/mmol), [³H]progesterone (5291 GBq/mmol) 及び [³H]verapamil (3145 GBq/mmol)は New England Nuclear (NEN)より購入した。また, [³H]Cimetidine (574 GBq/mmol), [³H]cyclosporin A (259 GBq/mmol) and [³H]vinblastine (411 GBq/mmol)は Amersham から, [³H]Quinidine (740 GBq/mmol)は ARC より購入した。PSC833 はノバルティスファーマより提供を受けた。その他, 非標識化合物は Sigma-Aldrich から購入した。

In situ 小腸灌流実験

実験に使用した *mdr1* ノックアウトマウス及び正常マウスは, Taconic farms から購入した。すべてのマウスは個別ケージに紙製の床敷き飼育した (温度: 23°C, 湿度: 55%に管理)。すべてのマウスは少なくとも 1 週間予備飼育を行った。この間, 水 (水道水), 餌 (固形試料 MF) を自由に摂取させた。本実験は, 過去の報告を改良して行った (103-105)。27~32g のマウスを灌流実験の一晩前から絶食した。麻酔は, ネンブタール (pentobarbital sodium, 50mg/kg) を静脈内に投与し誘導した。マウスは体温を維持するため, 37°Cのホットプレート上に固定した。正中線に沿って下腹部より開腹し, 空腸部位 8~10 cm (灌流部位) を外に露出させた。灌流部位の前後にテフロン製のチューブをカニュレーションし, 空腸内部を PBS で洗浄した。また, 開腹部位の乾燥を防ぐため, 生理食塩水を滴下し, ティッシュペーパーでカバーした。あらかじめ, プラスチックシリンジで灌流液を 1mL 程度急速に小腸内に導入した後, シリンジポンプを用いて 0.1mL/min の流速で 1 回還流した。灌流液は, 20.1 mM Na₂HPO₄, 47.0 mM KH₂PO₄, 101 mM NaCl (pH6.4) の緩衝液にトリチウム標識体の

テスト化合物と ^{14}C ラベルしたイヌリン（非吸収マーカ、水分吸収の補正計算用）を添加して調製した。各テスト化合物の濃度は以下の通り。

$[^3\text{H}]$ daunomycin (9.25 KBq/mL, 50 nM), $[^3\text{H}]$ digoxin (9.25 KBq/mL, 13 nM), $[^3\text{H}]$ diazepam (9.25 KBq/mL, 3 nM), $[^3\text{H}]$ dexamethasone (9.25 KBq/mL, 6 nM), $[^3\text{H}]$ progesterone (9.25 KBq/mL, 1.5 nM), $[^3\text{H}]$ verapamil (9.25 KBq/mL, 3 nM), $[^3\text{H}]$ cimetidine (9.25 KBq/mL, 16 nM), $[^3\text{H}]$ cyclosporin A (9.25 KBq/mL, 9 nM), $[^3\text{H}]$ vinblastine (9.25 KBq/mL, 6 nM), $[^3\text{H}]$ quinidine (9.25 KBq/mL, 13 nM), $[^3\text{H}]$ ritonavir (9.25 KBq/mL, 250 nM) and $[^3\text{H}]$ loperamide (9.25 KBq/mL, 50 nM)

灌流液の outflow を 5 分おきに採取し、実験終了後、還流部位の長さを測定した。各サンプルから一部をガラスバイアルに採取し、シンチレーションカクテル（Hionic-Fluor）10mL を加え、液体シンチレーションカウンターで放射能濃度を測定した。

データ処理

非吸収マーカである $[^{14}\text{C}]$ イヌリンの濃度変化で灌流中の水吸収補正することにより、各化合物の吸収率を以下の式で計算した。

$$F_a = 1 - \frac{C_{in,I}}{C_{out,I}} \times \frac{C_{out}}{C_{in}}$$

ここで、 $C_{in,I}$ 及び $C_{out,I}$ は、inflow と outflow における $[^{14}\text{C}]$ イヌリンの濃度とした。また、 C_{in} 及び C_{out} は、inflow と outflow におけるテスト化合物の濃度とした。

小腸灌流部位単位長さあたりの透過係数、ここでは PS product と定義、は以下の式で算出した。

$$\text{PS product} = -\frac{Q}{L} \times \ln(1 - F_a)$$

ここで、 Q は灌流速度、 L は実験後の灌流部位の長さとした。

第三章 抱合代謝物の消化管排出に関与する ABC トランスポーターの解析

試薬

4MU, 4MU-G 及び 4MU-S は Sigma-Aldrich から購入した。E3040, E34-040-G 及び E3040-G はエーザイ株式会社より提供いただいた。

動物

EHBR 及び正常ラットは日本クレアより購入した。ラットは、温度：23℃、湿度：55%にコントロールした条件下、3～5匹/ケージで飼育した。

Bcrp1 ノックアウトマウスは Jonker らから供給いただいた。正常マウスである FVB マウスは日本クレアより購入した。すべてのマウスは個別ケージに紙製の床敷き飼育した（温度：23℃、湿度：55%にコントロール）。

すべてのラット、マウスともに、少なくとも 1 週間予備飼育を行った。この間、水（水道水）、餌（固形試料 MF）を自由に摂取させた。

In situ 小腸灌流実験

ラットの小腸灌流実験では、体重 240～280g のラットを用いた。一晩絶食した後（水は自由摂取）、エーテル麻酔下で正中線に沿って下腹部より開腹し、空腸部位 8～10 cm（灌流部位）を外に露出させた。灌流部位の前後にテフロン製のチューブをカニューレーションし、空腸内部を PBS で洗浄した。また、開腹部位の乾燥を防ぐため、生理食塩水を滴下し、ティッシュペーパーでカバーした。あらかじめ、プラスチックシリンジで灌流液を 1mL 程度急速に小腸内に導入した後、シリンジポンプを用いて 0.2mL/min の流速で 1 回還流した。灌流液は、20.1 mM Na₂HPO₄, 47.0 mM KH₂PO₄, 101 mM NaCl (pH6.4) の緩衝液に 10 μM の 4MU または E3040 と ¹⁴C ラベルしたイヌリン（非吸収マーカー、水分吸収の補正計算用）を添加

して調製した。

なお、マウスについては、実験の部「第二章 薬物の消化管吸収における MDR1 輸送能の評価について」に記載した方法と同様に行った。4MU 及び E3040 の灌流液中濃度は 10 μ M とした。

データ処理

吸収率並びに吸収クリアランスは、実験の部「第二章 薬物の消化管吸収における MDR1 輸送能の評価について」に記載した方法と同様に計算した。

なお、efflux rate は以下の式に基づき算出した。

$$\text{Efflux rate} = C_{\text{out},M} \times Q$$

ここで、 $C_{\text{out},M}$ は 4MU 及び E3040 のグルクロン酸抱合体、硫酸抱合体の灌流液出口側の濃度、 Q は灌流液の流速（ラットでは 0.2, マウスでは 0.1mL/min）とした。

分析方法

4MU, 4MU-G 及び 4MU-S の分析は、LC/MS/MS 法と HPLC 法で行った。ラットの実験は、LC/MS/MS（MDS SCIEX API4000）を用いて定量を行った。内標準物質として umbelliferone を添加した後、灌流液を直接 LC/MS/MS に注入し、分析を行った。分析カラムには Xterra C18（内径 4.6mm×長さ 50mm, Waters）、移動相には 0.1%酢酸水溶液とメタノールを用いた。流速を 0.5mL/min とし、グラジエント条件で溶出した {メタノール含量：20%(0min)→20%(2min)→75%(2.1min)→75%(5min)→20%(5.1min)→20%(10min)}。4MU, 4MU-G, 4MU-S 及び内標準物質の検出イオンは、それぞれ 175.2/132.9, 351.4/175.3, 254.7/175.1 及び 161.3/132.9 であった。また、マウスの実験は HPLC 法で行った。灌流液を直接 HPLC に注入し、分析を行った。分析カラムには Inertsil ODS-3（内径 4.6mm×長さ 150mm, GL サイエンス）、移動相には 50 mM KH_2PO_4 水溶液とメタノールを用いた。流速を 1mL/min とし、

グラジエント溶出した {メタノール含量 : 25%(0min)→50%(20min)→25%(21min)→25%(35min)}。UV 検出は 313nm で行った。

E3040, E3040-G 及び E3040-S の分析は, LC/MS/MS 法で行った。内標準物質として, phenacetin を添加した後, 灌流液を直接 LC/MS/MS に注入した。分析カラムには Xterra C18 (内径 4.6mm ×長さ 50mm, Waters), 移動相には 0.1%酢酸水溶液とアセトニトリルを用いた。流速を 0.5mL/min とし, グラジエント条件で溶出した {アセトニトリル含量: 10%(0min)→10%(4min)→60%(4.5min)→60%(6.5min)→10%(6.6min) →10%(10min)}。E3040, E3040-G, E3040-S 及び内標準物質の検出イオンは, それぞれ 299.9/221.1, 475.6/300.2, 380.5/300.1 及び 180.1/110.4 であった。

糸吉 論

本研究では、膜透過性の制御に関わっており薬物動態への関与が大きいと考えられる ABC トランスポーターに焦点を絞り、「それらが脳と小腸においてどのような機能を有し、その輸送能力は *in vitro* から予測できるのか？」という観点から研究を行った。

まず、第一章では、薬物の脳移行性における MDR1 の関与について検討した。薬物の脳移行性については、*mdr1* ノックアウトマウスを用いた脳対血漿中濃度比 (K_p , brain) を *in vivo* における *mdr1* の輸送能力として定義し、*in vitro* の実験から、その輸送能力を予測できるかどうか検討した。その結果、*in vivo* K_p , brain は、LLC-MDR1/LLC-PK1 細胞もしくは Caco-2 細胞を用いた経細胞輸送実験で求めた corrected flux ratio または単純に flux ratio から定量的に予測できることが示された。この方法は、脳への薬物移行性を予測するための、有効な評価系であると考えられた。このような予測性は、pharmacokinetic model をベースとした理論的な考察によって、説明できることを示した。ただし、ATP 加水分解を指標とした場合には、*in vivo* の MDR1 輸送能力とは有意な相関関係は見出されず、ATP 加水分解の促進作用と基質輸送の関係には例外的な化合物が存在することが示された。

また、第二章では、薬物の消化管吸収における MDR1 の関与について、第一章同様、*in vitro* 実験と *in vivo* 実験間の比較/外挿性について検討した。その結果、LLC-MDR1/LLC-PK1 細胞を用いた経細胞輸送実験で求めた PS_{a-to-b} ratio もまた、小腸において吸収性を制限している *mdr1* の輸送機能を定量的に評価できることを示した。このような評価方法は、ヒト小腸における MDR1 の発現量の個体間差に基づく吸収性の変動や多剤併用時に吸収性がどの程度変動しうるかを予測するためのツールとして、医薬品開発に適用できる可能性が示された。

第一章と第二章の検討から、*in vitro* における MDR1 の輸送能力は以下の式で定義でき、これらのパラメーターが *in vivo* における MDR1 の輸送能力と比較すべきであることを理論的に示した。

$$\text{in vitro index} = 1 + \frac{PS_{P-gp}}{PS_{\text{non P-gp}}}$$

この式から明らかなように、第二項目の分母は、複雑な透過過程の存在により大きくなることが予測される。したがって、小腸のように複数のトランスポーターが存在しているような臓器においては、*in vitro* と *in vivo* 間の相関性が低くなるものと考察できる。

最後に、第三章では抱合代謝物の消化管排出に関与する ABC トランスポーターの解析として、mrp2 ならびに bcrp1 の小腸における輸送への寄与を検討した。Bcrp1 ノックアウトマウスを用いた小腸 *in situ* 灌流実験により、小腸上皮細胞内で生成されたグルクロン酸抱合体や硫酸抱合体の管腔内への排出に bcrp1 が重要であることを示した。それに対し、小腸 mrp2 はグルクロン酸抱合体の排出に関与している事を示すことが出来た。これらの現象は、小腸での抱合代謝酵素と排出トランスポーターの協調的な異物排出作用と捉えることが可能であり、今後消化管での吸収性を評価する上で重要な ABC トランスポーターの機能を同定できたものと考えている。

以上、一連の研究の中で、pharmacokinetics によるモデル化を行い、ABC トランスポーターによる輸送現象を理論的に整理した。また、本研究で構築した MDR1 輸送能力の予測、消化管での MRP2 や BCRP の機能解析などの方法論を活用することにより、CNS 薬開発や経口医薬品のバイオアベイラビリティ改善が可能となるばかりでなく、薬物間相互作用や PK の個体間変動のメカニズムを解析することも可能である。今後、医薬品開発とその適正使用に対し、本方法論がその一助となることを期待したい。

今後の展望

本研究では、ABC トランスポーター遺伝子を導入した発現細胞やそのノックアウト動物を用いて、主に *in vitro* と *in vivo* 間のデータの解釈について、pharmacokinetics の概念に基づき考察してきた。今後、コンピューターサイエンス、分析機器、有機合成や遺伝子工学の更なる進展に伴い、ABC トランスポーターに関する研究も、大きく前進するものと考えられる。ここに、今後の研究に対する展望として、X 線構造解析の進展、分子イメージングの活用及びダブルトランスフェクタント細胞の構築の3点について述べたい。

X 線構造解析の進展

ABC トランスポーターは幅広い構造を基質として認識することができる。特に MDR1 は、中性からカチオン性であり、ベンゼン環を含む平面構造を有する化合物を基質として認識する傾向がある。しかしながら、これまで同定された基質の分子量は 200~1200 と非常に広範であり、種々の化合物を輸送することが知られている。また、ATP の加水分解が基質輸送に必須であることは突き止められているが、その輸送メカニズムは未だ不明のままである。今後、基質認識性の解明は、ABC トランスポーターに関する研究の中で重要なテーマになると考えられる。現在、蛋白の構造と機能との関係を直接的に観測する最も信頼性の高い手法は、X 線構造解析である (106-108)。ABC トランスポーターについても X 線構造解析の試みがなされているが、膜蛋白であるため、結晶化が非常に困難であり、その X 線構造 (3 次元構造) は一部のバクテリアの ABC トランスポーターについて報告されているのみである。MsbA もバクテリアの ABC トランスポーターであるが、MDR1 とは 30% 程度の相同性を有している (109, 110)。この結晶構造は同じくバクテリアの ABC トランスポーターである BtuCD と類似したものであり、2 つの TMD 集合体が脂質二重層を突き抜けて、細胞外的一端で会合することにより、はさみ型の構造をとっており、細胞内では TMD

の先端にICDを介してNBDが配置するオープン構造を有していることが明らかにされている(109)。最近,MDR1について,このMsbAのホモロジーモデリングの適用例が報告されている(110)。この報告では,NBDに結合したATPの加水分解エネルギーがいかに基質輸送に寄与しているのか,立体構造の変化の面から考察している。まず,6本の α ヘリックスから構成されているTMD内の高親和性サイトに基質が結合すると,NBDの3次元構造が変化する。次いでATPが結合することにより2つのNBDが介合し,ATPの加水分解が起こる。この加水分解により,NBDの構造変化が水素結合の連鎖を介して更なる蛋白全体の構造変化を惹起し,基質が低親和性サイトまで移動することにより,基質が細胞外に輸送(かつ1方向に)されるというメカニズムである(111)。先のMsbAとの比較によると,MDR1のTMD内部は比較的疎水性かつアニオニックなアミノ酸残基が表面を覆っていることが示されており,冒頭で述べたような基質認識性の傾向をサポートするものと考えられる(110)。残念ながら,現状では結合サイトの構造ははっきりしていないが,site directed mutagenesisの手法を取り入れることで,基質認識にかかわる重要な部位が明らかにされていくものと考えられる。

他方,同様に幅広い基質認識性を示すこと,さらに,基質のオーバーラップが指摘されているCYP3A4についても,X線構造解析の結果が報告されている。Williamsらは,活性中心近傍に幅広いcavity(1386\AA^3)の存在を指摘しているが(112),YanoらはPh cluster(アミノ酸残基のPhリングが密集し,活性中心上部の空間を規定している)によってcavityはかなりタイトなもの(520\AA^3)であると報告している(113)。この相違は,活性部位上部の空間を規定していると考えられているF-loopの長さの違いによるものと思われる(114)。

他方,Tanakaらは,CYP2C5のホモロジーモデリングからF-loopの長さによりPh clusterが生じる可能性を指摘しているが,彼等の報告した活性中心構造はWilliams,Yanoらのほぼ中間である 950\AA^3 のcavityの大きさと推定している(115)。CYP3A4は幅広い基質認識性を示すことに加えて,taxolやcyclosporin Aなどの分子量の大きいバルキーな構造を認識

することが可能であるという事実から、活性中心上部の cavity は広いものと予想されていたが (116, 117)、上述した様に X 線構造には相違点が見出されている。実際に酵素反応が起こる際には、Cytochrom B5 や NADPH reductase など、他の蛋白との相互作用を受けるものと考えられることから、F-loop への蛋白間相互作用が活性中心部位の構造変化を促し、基質認識性に影響をあたえる可能性も考えられる。いずれにしても、基質認識の多様性の面から考察すると、その気質類似性が指摘されている MDR1 とは、活性部位（結合サイト）の 3 次元構造は大きく異なるものと考えられた。

このような、蛋白の立体構造が明らかにされることにより、近い将来、代謝のみならず膜輸送の領域でも、基質と蛋白との相互作用を *in silico* で解析することが可能になるものと考えられる。これまでも、MDR1 の基質認識性に対して構造活性相関のアプローチが検討されているが (118)、今後、解像度の高い X 線構造解析が実現することにより、より精度の高いファーマコフォアモデルの構築とドッキングシュミレーションによる解析が可能になると予想される。

分子イメージングの活用

第一章で薬物の脳移行性に MDR1 が深く関与することを述べたが、最近、本研究手法同様に、MDR1 発現細胞や *mdr1* ノックアウトマウスを使い、既に上市されている多くの中枢 (CNS) 薬と MDR1 の関連性が報告された (119, 120)。結論として、多くの CNS 薬は非 MDR1 基質である事が明らかとなった。本研究から考察されたように、CNS 薬の開発には *mdr1* ノックアウトマウスや MDR1 発現細胞を用いた検討手法が有効であることを実証したものと解釈される。さらに本稿では、CNS 薬の開発における PET (Positron Emission Tomography) の活用を述べたい。現在、PET は癌の診断のために、保険適用されるまで、その使用が普及しつつある。安全で簡便に合成できるな放射性 PET リガンドが開発されることにより、個人レベルで脳における MDR1 に輸送能力を定量的に評価することが可能に

なるものと考えられる (121)。これまでに、colchicine, verapamil, carvedilol や paclitaxel の ^{11}C や ^{18}F のラベル体が放射性 PET リガンドがとして開発されている。実際, ^{11}C -verapamil をヒトに投与した場合, cyclosporin A のような MDR1 の阻害剤により, 脳への取り込みが増加することが PET で確かめられており, ヒト BBB における MDR1 の排出機能が測定されている (122)。

現在, *MDR1* 遺伝子の一塩基多型 (SNP) について, Hoffmayer らにより, digoxin の血漿中濃度が *MDR1* の SNP (C3435T) によって説明できるとの報告がなされて以降 (42), 多くの研究がなされている (123-125)。必ずしも C3435T だけの変異により, MDR1 輸送機能が変化すると結論には至っていないが, プロモーター領域でのエピジェネティックな変異への連鎖なども含め, ハプロタイプ解析がなされている (126)。これまでの解析は消化管吸収や尿排泄に限って検討されてきたが, これらの SNPs の影響が BBB の MDR1 機能に変化を与えるかどうかを研究するためには, 非侵襲的な分子イメージングが最良かつ唯一の方法と考えられる。SNPs による排出機能の低下は, 予測に反する中枢への副作用を惹起する可能性もあり, その程度を予測することは, 医薬品の適正使用の面から, 研究の意義は大きいものと推察される。他方, 多剤服用時の薬物間相互作用という観点からも, MDR1 阻害剤によりヒト *in vivo* における脳移行性増大が報告されており (127), 中枢への副作用評価にとって, 重要な手法に位置付けられていくものと考えられる。

また, MDR1 等は, 多剤耐性を獲得した腫瘍細胞に見出されており, 抗癌剤の治療効果を高めるために, modulator や chemosensitizer と呼ばれる, MDR1 阻害剤の開発が進められている。これまでに, cyclosporin A や PSC833 に加えて, 第三世代の modulator と呼ばれる, OC 144-093 (128), GF 120918 (129), XR9576 (130) や VX 710 (131) などが開発されてきている。これらは CYP3A4 への阻害作用が少なく, CYP 阻害に基づく抗癌剤血中濃度の上昇を抑えたより安全性の高いものと考えられている。これらの modulator が *in vivo* で機能するか, または, 最適な投与量はどれくらいであるか, PET などの分子イメージングによ

るリガンドの集積から直接求めることができれば、抗癌剤の毒性を軽減した最適な化学療法
法の確立につながるものと期待される。

ダブルトランスフェクタント細胞の構築

本研究は、排出機能を有する ABC トランスポーターである、MDR1, MRP2, BCRP に焦点
を絞って解析を進めてきた。発現細胞を用いて、これらの ABC トランスポーターの輸送能
力を測定する場合、細胞内に基質が透過して初めて排出トランスポーターにアクセスでき
る。しかしながら、基質によっては、膜透過の乏しいものもあり、*in vitro* 実験においてこ
れらの基質を取り扱う場合、膜ベシクル（細胞の内側から外側への輸送を解析するために、
細胞膜を反転させた小胞体）の調製が必須であった。最近、当研究室ならびに Keppler らの
グループにおいてほぼ同時期に確立されたダブルトランスフェクタント細胞は、この問題
を解決する有効な評価系であると考えられる（132, 133）。すなわち、取り込みトランスポ
ーターと排出トランスポーターの両方を MDCK II などの極性細胞の apical 側と basal 側に同
時に発現させることにより、方向性のある基質輸送を経細胞輸送実験により解析するとい
う手法である。実際、薬物輸送は、細胞を介して起こる現象であり、ダブルトランスフェ
クタント細胞による薬物輸送は、より *in vivo* を志向した実験系であると考えられる。Sasaki
らの報告によると、ラット肝臓血管側に発現する取り込みトランスポーター *oatp1b2* と同じ
く胆管側に発現する *mrp2* を共に発現させたダブルトランスフェクタント細胞は、ラットに
おける胆汁排泄能力を予測できる可能性が示されている（134）。また、Hirano や Matsusima
らは、低い膜透過性のためにこれまで評価できなかった pravastatin や pitavastatin について、
取り込みトランスポーターを共発現させたダブルトランスフェクタント細胞を構築するこ
とにより、胆汁排泄に関与する ABC トランスポーターの基質特異性について解析を行って
いる（135, 136）。今後、肝臓のみならず腎臓や小腸タイプのダブルトランスフェクタント
細胞を作成することにより、取り込みトランスポーターの影響を加味した、消化管吸収や

尿排泄に対する *in vitro* 予測モデルが構築できるものと期待される。

参考文献

1. Klein I, Sarkadi B, Varadi A. An inventory of the human ABC proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1461:237–262.
2. Dean M, Allikmets R. Complete characterization of the human ABC gene family. *J Bioenerg Biomembr*. 2001;33:475–479.
3. Stefkova J, Poledne R, Hubacek JA. ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases. *Physiol Res*. 2004;53(3):235–43.
4. Borst P, Elferink RO. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem*. 2002;71:537–92.
5. Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J*. 1982;1:945–951.
6. Hung LW, Wang IX, Nikaido K, Liu PQ, Ames GFL, Kim SH. Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter. *Nature* 1998;396:703–707.
7. Sharom FJ, Liu R, Romsicki Y, Lu P. Insights into the structure and substrate interactions of the P-glycoprotein multidrug transporter from spectroscopic studies. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1461:327–345.
8. Hopfner KP, Tainer JA. Rad50/SMC proteins and ABC transporters: unifying concepts from high-resolution structures. *Curr Opin Struct Biol*. 2003;13:249–255.
9. Locher KP, Lee AT, Rees DC. The *E. coli* BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science* 2002;296:1091–1098.
10. Dahl SG, Sylte I, and Ravna AW. Structures and Models of Transporter Proteins *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;309:853–860.

11. Tomblin G, Bartholomew L, Gimi K, Tyndall GA, Senior AE. Synergy between conserved ABC signature Ser residues in P-glycoprotein catalysis. *J Biol Chem.* 2004;279:5363–5373.
12. Chan LM, Lowes S, Hirst BH. The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur J Pharm Sci.* 2004 Jan;21(1):25-51.
13. Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999;39:361–398.
14. Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AM, Deeley RG. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science.* 1992;258:1650–1654.
15. Evers R, Kool M, van Deemter L, Janssen H, Calafat J, Oomen LCJM, Paulusma CC, Oude Elferink RPJ, Baas F, Schinkel AH, Borst P. Drug export activity of the human canalicular multispecific organic anion transporter in polarized kidney MDCK cells expressing cMOAT (MRP2) cDNA. *J Clin Invest.* 1998;101:1310–1319.
16. Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst.* 2000 Aug 16;92(16):1295-302.
17. Paulusma CC, Bosma PJ, Zaman GJ, Bakker CT, Otter M, Scheffer GL, Scheper RJ, Borst P, Oude Elferink RP. Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene. *Science.* 1996 Feb 23;271(5252):1126-8.
18. Kool M, de Haas M, Scheffer GL, Scheper RJ, van Eijk MJT, Juijn JA, Baas F, Borst P. Analysis of expression of Cmoat (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res.* 1997;57:3537–3547.

19. Bates SE, Robey R, Miyake K, Rao K, Ross DD, Litman T. The role of half-transporters in multidrug resistance. *J Bioenerg Biomembr.* 2001;33:503–511.
20. Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, Ross DD. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci.* 1998;95:15665–15670.
21. Boesch D, Gaveriaux C, Jachez B, Pourtier-Manzanedo A, Bollinger P, Loo F. *In vivo* circumvention of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance of tumor cells with SDZ PSC 833. *Cancer Res.* 1991;51(16):4226-33.
22. Leslie EM, Deeley RG, Cole SP. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005;204(3):216-37.
23. van Tellingen O. The importance of drug-transporting P-glycoproteins in toxicology. *Toxicol Lett.* 2001;120(1-3):31-41.
24. Cole SPC, Deeley RG. Multidrug resistance II: MRP and related proteins. In: Bertino, J.R. (Ed.), *Encyclopedia of Cancer.* Elsevier Science USA pp. 2002:255–267.
25. Flens MJ, Zaman GJ, van der Valk P, Izquierdo MA, Schroeijs AB, Scheffer GL, van der Groep P, de Haas M, Meijer CJ, Scheper RJ. Tissue distribution of the multidrug resistance protein. *Am J Pathol.* 1996;148:1237–1247.
26. Stride BD, Valdimarsson G, Gerlach JH, Wilson GM, Cole SPC, Deeley RG. Structure and expression of the mRNA encoding the murine multidrug resistance protein (MRP), an ATP-binding cassette transporter. *Mol Pharmacol.* 1996;49:962–971.
27. Fromm MF. Importance of P-glycoprotein at blood–tissue barriers. *Trends Pharmacol Sci.* 2004;25:423–429.

28. Haimeur A, Conseil G, Deeley RG, Cole SP. The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation. *Curr Drug Metab.* 2004a;5:21–53.
29. Sarkadi B, Ozvegy-Laczka C, Nemet K, Varadi A. ABCG2—A transporter for all seasons. *FEBS Lett.* 2004;567:116–120.
30. Kusunhara H, Sugiyama Y. Efflux transport systems for drugs at the blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier (Part 2). *Drug Discov Today.* 2001 Feb 1;6(4):206-212.
31. Kusunhara H, Sugiyama Y. Efflux transport systems for drugs at the blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier (Part 1). *Drug Discov Today.* 2001 Feb 1;6(3):150-156.
32. Langmann T, Mauereer R, Zahn A, Moehle C, Probst M, Stremmel W and Schmitz G. Real-Time Reverse Transcription-PCR Expression Profiling of the Complete Human ATP-Binding Cassette Transporter Superfamily in Various Tissues. *Clin Chem.* February 1, 2003;49(2):230-238.
33. Dietrich CG, Geier A, and Oude Elferink RPJ. ABC of oral bioavailability: transporters as gatekeepers in the gut. *Gut*, December 1, 2003; 52(12): 1788 - 1795.
34. Sai Y, Tsuji A. Transporter-mediated drug delivery: recent progress and experimental approaches. *Drug Discov Today.* 2004 Aug 15;9(16):712-20.
35. Chen CJ, Chin JE, Ueda K, Clark DP, Pastan I, Gottesman MM and Roninson IB. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell.* 1986;47:381-389.
36. Ueda K, Clark DP, Chen CJ, Roninson IB, Gottesman MM and Pastan I. The human multidrug resistance (*mdr1*) gene. cDNA cloning and transcription. *J Biol Chem.* 1987;262:505-508.

37. Wacher VJ, Silverman JA, Zhang Y and Benet LZ. Role of P-glycoprotein and cytochrome P450 3A in limiting oral absorption of peptides and peptidomimetics. *J Pharm Sci.* 1998;87:1322-1330.
38. Benet LZ, Izumi T, Zhang Y, Silverman JA and Wacher VJ. Intestinal MDR transport proteins and P450 enzymes as barriers to oral drug delivery. *J Control Release.* 1999;62:25-31.
39. Schinkel AH. Pharmacological insights from P-glycoprotein knockout mice. *Clin Pharmacol Ther.* 1998;36:9-13.
40. Schinkel AH, Smit JJM, van Tellingen O, Beijnen JH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CAAM, van der Valk MA, Robanus-Maandag EC, te Riele HPJ, Berns AJM, and Borst P. Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell.* 1994;77:491-502.
41. Kwei GY, Alvaro RF, Chen Q, Jenkins HJ, Hop CEAC, Keohane CA, Ly VT, Strauss JR, Wang RW, Wang Z, Pippert TR, and Umbenhauer DR. Disposition of ivermectin and cyclosporin A in CF-1 mice deficient in *mdr1a* P-glycoprotein. *Drug Metab Dispos.* 1999;27:581-587.
42. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmöller J, John A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, and Brinkmann U. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: Multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci. (USA)* 2000;97:3473-3478.
43. Mayer U, Wagenaar E, Dorobek B, Beijnen JH, Borst P and Schinkel AH. Full blockade of intestinal P-glycoprotein and extensive inhibition of blood-brain barrier P-glycoprotein by oral treatment of mice with PSC833. *J Clin Invest.* 1997;100:2430-2436.

44. Kusuvara H, Suzuki H, Terasaki T, Kakee A, Lemaire M and Sugiyama Y. P-glycoprotein mediates the efflux of quinidine across the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997;283:574-580.
45. Edwards DJ, Fitzsimmons ME, Schuetz EG, Yasuda K, Ducharme MP, Warbasse LH, Woster PM, Schuetz JD and Watkins P. 6',7'-Dihydroxybergamottin in grapefruit juice and Seville orange juice: Effects on cyclosporine disposition, enterocyte CYP3A4, and P-glycoprotein. *Clin Pharmacol Ther.* 1999;65:237-244.
46. Suzuki H and Sugiyama Y. Role of metabolic enzymes and efflux transporters in the absorption of drugs from the small intestine. *Eur J Pharm Sci.* 2000;12:3-12.
47. Yu DK. The contribution of P-glycoprotein to pharmacokinetic Drug-Drug interactions. *J Clin Pharmacol.* 1999;39:1203-1211.
48. Verschraagen M, Koks CHW, Schellens JHM and Beijnen JH. P-glycoprotein system as a determinant of drug interactions: The case of digoxin-verapamil. *Pharmacol Res.* 1999;40:301-306.
49. Yamazaki M, Neway WE, Ohe T, Chen I, Rowe JF, Hochman JH, Chiba M and Lin JH. *In vitro* substrate identification studies for P-glycoprotein-mediated transport: species difference and predictability of *in vivo* results. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001;296:723-735.
50. Litman T, Zeuthen T, Skovsgaard T and Stein WD. Structure-activity relationships of P-glycoprotein interacting drugs: kinetic characterization of their effects on ATPase activity. *Biochim Biophys Acta.* 1997;1361:159-168.
51. Buxbaum E. Co-operative binding sites for transported substrates in the multiple drug resistance transporter Mdr1. *Eur J Biochem.* 1999;265:64-70.

52. Drori S, Eytan GD and Assaraf YG. Potentiation of anticancer-drug cytotoxicity by multidrug-resistance chemosensitizers involves alterations in membrane fluidity leading to increased membrane permeability. *Eur J Biochem.* 1995;228:1020-1029.
53. Borgia MJ, Eytan GD and Assaraf YG. Competition of hydrophobic peptides, cytotoxic drugs, and chemosensitizers on a common P-glycoprotein pharmacophore as revealed by its ATPase activity. *J Biol Chem.* 1996;271:3163-3171.
54. Ueda K, Yoshida A and Amachi T. Recent progress in P-glycoprotein research. *Anti-Cancer Drug Design.* 1999;14:115-121.
55. Sauna ZE and Ambudkar SV. Evidence for a requirement for ATP hydrolysis at two distinct steps during a single turnover of the catalytic cycle of human P-glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci.(USA)* 2000;97:2515-2520.
56. Sparreboom A, van Asperen J, Mayer U, Schinkel AH, Smit JW, Meijer DKF, Borst P, Nooijen WJ, Beijnen JH, and van Tellingen O. Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine. *Proc Natl Acad Sci.(USA)* 1997;94:2031-2035.
57. Bardelmeijer HA, Beijnen JH, Brouwer KR, Rosing H, Nooijen WJ, Schellens JHM, and van Tellingen O. Increased oral bioavailability of paclitaxel by GF120918 in mice through selective modulation of P-glycoprotein. *Clin Cancer Res.* 2000;6:4416-4421.
58. Mayer U, Wagenaar E, Beijnen JH, Smit JW, Meijer DKF, van Asperen J, Borst P, and Schinkel AH. Substantial excretion of digoxin via the intestinal mucosa and prevention of long term of digoxin accumulation in the brain by the mdrla P-glycoprotein. *Br J Pharmacol.* 1996;129:1038-1044.

59. Yokogawa K, Takahashi M, Tamai I, Konishi H, Nomura M, Moritani S, Miyamoto K and Tsuji A. P-glycoprotein- dependent disposition kinetics of tacrolimus: studies in *mdr1a* knockout mice. *Pharm Res.* 1999;16:1213-1218.
60. Washington CB, Wiltshire HR, Man M, Moy T, Harris SR, Worth E, Weigl P, Liang Z, Hall D, Marriott L, and Blaschke TF. The disposition of saquinavir in normal and p-glycoprotein deficient mice, rats, and in cultured cells. *Drug Metab Dispos.* 2000;28:1058-1062.
61. Kim RB, Fromm MF, Wandel C, Leake B, Wood AJJ, Roden DM and Wilkinson GR. The drug transporter P-glycoprotein limits oral absorption and brain entry of HIV-1 protease inhibitors. *J Clin Invest.* 1998;101:289-294.
62. Greiner B, Eichelbaum M, Fritz P, Kreichgauer HP, von Richter O, Zundler J and Kroemer HK. The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction and rifampin. *J Clin Invest.* 1999;104:147-153.
63. Lown KS, Mayo RR, Leichtman AB, Hsiao HL, Turgeon K, Schmiedlin-Ren P, Brown MB, Guo W, Rossi SJ, Benet LZ and Watkins PB. Role of intestinal P-glycoprotein (*mdr1*) in interpatient variation in the oral bioavailability of cyclosporine. *Clin Pharmacol Ther.* 1997;62:248-260.
64. von Ahsen N, Richter M, Grupp C, Ringe B, Oellerich M and Armstrong VW. No influence of the MDR-1 C3435T polymorphism or a CYP3A4 promoter polymorphism (CYP3A4-V Allele) on dose-adjusted cyclosporin A trough concentration or rejection incidence in stable renal transplant recipients. *Clin Chem.* 2001;47:1048-1052.
65. Kim RB, Leake BF, Choo EF, Dresser GK, Kubba SV, Schwarz UI, Taylor A, Xie HG, McKinsey J, Zhou S, Lan LB, Schuetz JD, Schuetz EG and Wilkinson GR. Identification of functional variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;70:189-199.

66. Fellay J, Marzolini C, Meaden ER, Back DJ, Buclin T, Chave J, Decosterd LA, Furrer H, Opravil M, Pantaleo G, Retelska D, Ruiz L, Schinkel AH, Vernazza P, Eap CB, and Telenti A. Response to antiretroviral treatment in HIV-1-infected individuals with the allelic variants of the multidrug resistance transporter 1: a pharmacogenetics study. *Lancet*. 2002;359:30-36.
67. Adachi Y, Suzuki H, Sugiyama Y. Comparative studies on *in vitro* methods for evaluating *in vivo* function of MDR1 P-glycoprotein. *Pharm Res*. 2001;18:1660-1668.
68. Schinkel AH, Mol CAAM, Wagenaar E, van Deemter L, Smit JJM, and Borst P. Multidrug resistance and the role of P-glycoprotein knockout mice. *Eur J Cancer*. 1995;31A: 1295-1298.
69. Borst P, Schinkel AH, Smit JJM, Wagenaar E, van Deemter L, Smith AJ, Eijdens EWHM, Baas F, and Zaman GJR. Classical and novel forms of multidrug resistance and the physiological function of P-glycoproteins in mammals. *Pharmacol Ther*. 1994;60:289-299.
70. Zhang Y and Benet LZ. The gut as a barrier to drug absorption. *Clin Pharmacokinet*. 2001;40:159-168.
71. Schuetz EG, Unbenhauer DR, Yasuda K, Brimer C, Nguyen L, Relling MV, Schuetz JD and Schinkel AH. Altered expression of hepatic cytochromes P-450 in mice deficient in one or more *mdr1* genes. *Mol Pharmacol*. 2000;57:188-197.
72. Prueksaritanont T, Gorham LM, Hochman JH, Tran LO and Vyas KP. Comparative studies of drug metabolizing enzymes in dog, monkey, and human small intestine, and in Caco-2 cells. *Drug Metab Dispos*. 1996;24:634-642.
73. Zhang Q, Dunbar D, Ostrowska A, Zeislosft S, Yang J and Kaminsky LS. Characterization of human small intestinal cytochromes P-450. *Drug Metab Dispos*. 1999;27:804-809.
74. Kusuhara H and Sugiyama Y. Role of transporters in the tissue-selective distribution and elimination of drugs: transporters in the liver, small intestine, brain and kidney. *J Control Release*. 2002;78:43-54.

75. Doherty MM and Charman WN. The mucosa of the small intestine. How clinically relevant as an organ of drug metabolism? Clin Pharmacokinet. 2002;41:235-253.
76. Kaminsky LS and Zhang Q. The small intestine as a xenobiotic-metabolizing organ. Drug Metab Dispos. 2003;31:1520-1525.
77. Taipalensuu J, Tornblom H, Lindberg G, Einarsson C, Sjoqvist F, Melhus H, Garberg P, Sjostrom B, Lundgren B and Artursson P. Correlation of gene expression of ten drug efflux transporter family in normal human jejunum and in human intestinal epithelial caco-2 cell monolayers. J Pharmacol Exp Ther. 2001;299:164-170.
78. Mulder GJ, Brouwer S, Weitering JG, Scholtens E and Pang KS. Glucuronidation and sulfation in the rat *in vivo*. The role of the liver and the intestine in the *in vivo* clearance of 4-methylumbelliferone. Biochem Pharmacol. 1985;34:1325-1329.
79. Zimmerman CL, Ranta S, Leboeuf E and Pang KS. High-performance liquid chromatographic method for the direct determination of 4-methylumbelliferone and its glucuronide and sulfate conjugation. J Chromatogr B. 1991;563:83-94.
80. Takenaka O, Horie T, Suzuki H and Sugiyama Y. Different biliary excretion systems for glucuronide and sulfate of a model compound; study using Eisai hyperbilirubinemic rats. J Pharmacol Exp Ther. 1995a;274:1962-1969.
81. Takenaka O, Horie T, Kobayashi K, Suzuki H and Sugiyama Y. Kinetic analysis of hepatobiliary transport for conjugated metabolites in the rat perfused liver of mutant rats (EHBR) with hereditary conjugated hyperbilirubinemia. Pharm Res. 1995b;12:1746-1755.
82. Chen J and Pang KS. Effect of flow on first pass metabolism of drugs: single pass studies on 4-methylumbelliferone conjugation in the serially perfused rat intestine and liver preparations. J Pharmacol Exp Ther. 1997;280:24-31.

83. Nakatomi K, Yoshikawa M, Oka M, Ikegami Y, Hayasaka S, Sano K, Shiozawa K, Kawabata S, Soda H, Ishikawa T, Tanabe S and Kohno S. Transport of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) by breast cancer resistance protein ABCG2 in human lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;280:827-832.
84. Suzuki M, Suzuki H, Sugimoto Y and Sugiyama Y. ABCG2 transports sulfated conjugates of steroids and xenobiotics. *J Biol Chem.* 2003;278:22644-22649.
85. Adachi Y, Suzuki H and Sugiyama Y. Quantitative evaluation of the function of small intestinal P-glycoprotein: comparative studies between *in situ* and *in vitro*. *Pharm Res.* 2003;20:1163-1169.
86. Gotoh Y, Suzuki H, Kinoshita S, Hirohashi T, Kato Y and Sugiyama Y. Involvement of an organic anion transporter (canalicular multispecific organic anion transporter/multidrug resistance-associated protein 2) in gastrointestinal secretion of glutathione conjugates in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000;292:433-439.
87. Jonker JW, Smit JW, Brinkhuis RF, Maliepaard M, Beijnen JH, Schellens JHM and Schinkel AH. Role of breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92:1651-1656.
88. van Herwaarden AE, Jonker JW, Wagenaar E, Brinkhuis RF, Schellens JHM, Beijnen JH, and Schinkel AH. The breast cancer resistance protein (Bcrp1/ABCG2) restricts exposure to the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b] pyridine. *Cancer Res* 2003;63:6447-6452.
89. Jonker JW, Buitelaar M, Wagenaar E, van der Valk MA, Scheffer GL, Scheper RJ, Plosch T, Kuipers F, Oude Elferink RPJ, Rosing H, Beijnen JH and Schinkel AH. The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria. *Proc Natl Acad Sci. USA* 2002;99:15649-15654.

90. Kondo C, Onuki R, Kusuhara H, Suzuki H, Suzuki M, Okudaira N, Kojima M, Ishiwata K, Jonker JW, Sugiyama Y. Lack of improvement of oral absorption of ME3277 by prodrug formation is ascribed to the intestinal efflux mediated by breast cancer resistant protein (BCRP/ABCG2). *Pharm Res.* 2005 Apr;22(4):613-8.
91. Mizuno N, Suzuki M, Kusuhara H, Suzuki H, Takeuchi K, Niwa T, Jonker JW, and Sugiyama Y. Impaired renal secretion of 6-hydroxy-5,7-dimethyl-2-methylamino-4-(3-pyridylmethyl) benzothiazole (E3040) sulfate in breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) knockout mice. *Drug Metab Dispos.* 2004;32:898-901.
92. Honjo Y, Hrycyna CA, Yan QW, Medina-Perez WY, Robey RW, van der Laar A, Litman T, Dean M and Bates SE. Acquired mutations in the MXR/BCRP/ABCP gene alter substrate specificity in MXR/BCRP/ABCP- overexpressing cells. *Cancer Res.* 2001;61:6635-6639.
93. Iida A, Saito S, Sekine A, Mishima C, Kitamura Y, Kondo K, Harigae S, Osawa S and Nakamura Y. Catalog of 605 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) among 13 genes encoding human ATP-binding cassette transporters: ABCA4, ABCA7, ABCA8, ABCD1, ABCD3, ABCD4, ABCE1, ABCF1, ABCG1, ABCG2, ABCG4, ABCG5 and ABCG8. *J Hum Genet.* 2002;47:285-310.
94. Zamber CP, Lamba JK, Yasuda K, Farnum J, Thummel K., Schuetz JD and Schuetz EG. Natural allelic variants of breast cancer resistance protein (BCRP) and their relationship to BCRP expression in human intestine. *Pharmacogenetics.* 2003;13:19-28.
95. Schinkel AH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CAAM and Borst P. Absence for the mdr1a P-glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A. *J Clin Invest.* 1995;96:1698-1705.

96. Schinkel AH, Wagenaar E, Mol CAAM and van Deemter L. P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J Clin Invest.* 1996;97:2517-2524.
97. Tsuji A, Takanaga H, Tamai I and Terasaki T. Transcellular transport of benzoic acid across Caco-2 cells by a pH-dependent and carrier-mediated transport mechanism. *Pharm Res.* 1994;11:30-37.
98. Sarkadi B, Price EM, Boucher RC, Germann UA and Scarborough GA. Expression of the human multidrug resistance cDNA in insect cells generates a high activity Drug-stimulated membrane ATPase. *J Biol Chem.* 1992;267:4854-4858.
99. Sharom FJ, Xiaohong Yu, Peihua Lu, Ronghua Liu, Chu JWK, Szabo K, Muller M, Hose CD, Monks A, Varadi A, Seprodi J and Sarkadi B. Interaction of the P-glycoprotein Multidrug transporter (MDR1) with high affinity peptide chemosensitizers in isolated membranes, reconstituted system and intact cells. *Biochem Pharmacol.* 1999;58:571-586.
100. Jonker JW, Wagenaar E, van Deemter L, Gottschlich R, Bender HM, Dasenbrock J and Schinkel AH. Role of blood-brain barrier P-glycoprotein in limiting brain accumulation and sedative side-effects of asimadoline, a peripherally acting analgaesic drug. *Br J Pharmacol.* 1999;127:43-50.
101. Neville CF, Ninomiya S, Shimada N, Kamataki T, Imaoka S and Funae Y. Characterization of specific cytochrome P450 enzyme responsible for the metabolism of diazepam hepatic microsomes of adult male rats. *Biochem Pharmacol.* 1993;45:59-65.
102. Hendrikse NH, Schinkel AH, De Vries EGE, Fluks E, Van der Graaf WTA, Willemsen ATM, Vaalburg W and Franssen EJF. Complete *in vivo* reversal of P-glycoprotein pump function in the blood-drain barrier visualized with positron emission tomography. *Br J Pharmacol.* 1998;124:1413-1418.

103. Loria RM, Kayne HL, Kibrick S, and Broitman SA. Measurement of intestinal absorption in mice by a double-label radioisotope perfusion technic. *Lab Animal Sci.* 1976;26:603-606.
104. Yuasa H, Matsuda K, and Watanabe J. Influence of anesthetic regimens on intestinal absorption in rats. *Pharm Res.* 1993;10:884-888.
105. Barthe L, Woodley J, and Houin G. Gastrointestinal absorption of drugs: methods and studies. *Fundam Clin Pharmacol.* 1999;13:154-168.
106. Dahl SG, Sylte I, Ravna AW. Structures and models of transporter proteins. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004 Jun;309(3):853-60. Epub 2004 Feb 26.
107. Jones PM, George AM. The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. *Cell Mol Life Sci.* 2004 Mar;61(6):682-99.
108. Chang G. Multidrug resistance ABC transporters. *FEBS Lett.* 2003 Nov 27;555(1):102-5.
109. Seigneuret M, Garnier-Suillerot A. A structural model for the open conformation of the mdr1 P-glycoprotein based on the MsbA crystal structure. *J Biol Chem.* 2003 Aug 8;278(32):30115-24. Epub 2003 May 30.
110. Chang G, Roth CB. Structure of MsbA from *E. coli*: a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters. *Science.* 2001 Sep 7;293(5536):1793-800.
111. Rosenberg MF, Kamis AB, Callaghan R, Higgins CF, Ford RC. Three-dimensional structures of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein demonstrate major conformational changes in the transmembrane domains upon nucleotide binding. *J Biol Chem.* 2003 Mar 7;278(10):8294-9. Epub 2002 Dec 25.
112. Williams PA, Cosme J, Vinkovic DM, Ward A, Angove HC, Day PJ, Vornrhein C, Tickle IJ, Jhoti H. Crystal structures of human cytochrome P450 3A4 bound to metyrapone and progesterone. *Science.* 2004 Jul 30;305(5684):683-6.

113. Yano JK, Wester MR, Schoch GA, Griffin KJ, Stout CD, Johnson EF. The structure of human microsomal cytochrome P450 3A4 determined by X-ray crystallography to 2.05-Å resolution. *J Biol Chem*. 2004 Sep 10;279(37):38091-4.
114. Poulos TL. Cytochrome P450 flexibility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Nov 11;100(23):13121-2.
115. Tanaka T, Okuda T, Yamamoto Y. Characterization of the CYP3A4 active site by homology modeling. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2004 Jul;52(7):830-5.
116. Melet A, Marques-Soares C, Schoch GA, Macherey AC, Jaouen M, Dansette PM, Sari MA, Johnson EF, Mansuy D. Analysis of human cytochrome P450 2C8 substrate specificity using a substrate pharmacophore and site-directed mutants. *Biochemistry*. 2004 Dec 14;43(49):15379-92.
117. Wester MR, Yano JK, Schoch GA, Yang C, Griffin KJ, Stout CD, Johnson EF. The structure of human cytochrome P450 2C9 complexed with flurbiprofen at 2.0-Å resolution. *J Biol Chem*. 2004 Aug 20;279(34):35630-7.
118. Ekins S, Kim RB, Leake BF, Dantzig AH, Schuetz EG, Lan LB, Yasuda K, Shepard RL, Winter MA, Schuetz JD, Wikel JH, Wrighton SA. Application of three-dimensional quantitative structure-activity relationships of P-glycoprotein inhibitors and substrates. *Mol Pharmacol*. 2002 May;61(5):974-81.

119. Doran A, Obach RS, Smith BJ, Hosea NA, Becker S, Callegari E, Chen C, Chen X, Choo E, Cianfroga J, Cox LM, Gibbs JP, Gibbs MA, Hatch H, Hop CE, Kasman IN, Laperle J, Liu J, Liu X, Logman M, Maclin D, Nedza FM, Nelson F, Olson E, Rahematpura S, Raunig D, Rogers S, Schmidt K, Spracklin DK, Szewc M, Troutman M, Tseng E, Tu M, Van Deusen JW, Venkatakrishnan K, Walens G, Wang EQ, Wong D, Yasgar AS, Zhang C. The impact of P-glycoprotein on the disposition of drugs targeted for indications of the central nervous system: evaluation using the MDR1A/1B knockout mouse model. *Drug Metab Dispos.* 2005 Jan;33(1):165-74.
120. Mahar Doan KM, Humphreys JE, Webster LO, Wring SA, Shampine LJ, Serabjit-Singh CJ, Adkison KK, Polli JW. Passive permeability and P-glycoprotein-mediated efflux differentiate central nervous system (CNS) and non-CNS marketed drugs. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002 Dec;303(3):1029-37.
121. Elsinga PH, Hendrikse NH, Bart J, Vaalburg W, van Waarde A. PET Studies on P-glycoprotein function in the blood-brain barrier: how it affects uptake and binding of drugs within the CNS. *Curr Pharm Des.* 2004;10(13):1493-503.
122. Sasongko 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.* 2005 Jun;77(6):503-14.
123. Sakaeda T, Nakamura T, Okumura K. Pharmacogenetics of drug transporters and its impact on the pharmacotherapy. *Curr Top Med Chem.* 2004;4(13):1385-98.
124. Ozawa S, Soyama A, Saeki M, Fukushima-Uesaka H, Itoda M, Koyano S, Sai K, Ohno Y, Saito Y, Sawada J. Ethnic differences in genetic polymorphisms of CYP2D6, CYP2C19, CYP3As and MDR1/ABCB1. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2004 Apr;19(2):83-95.

125. Marzolini C, Paus E, Buclin T, Kim RB. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther.* 2004 Jan;75(1):13-33.
126. Takane H, Kobayashi D, Hirota T, Kigawa J, Terakawa N, Otsubo K, Ieiri I. Haplotype-oriented genetic analysis and functional assessment of promoter variants in the MDR1 (ABCB1) gene. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004 Dec;311(3):1179-87.
127. Sadeque AJ, Wandel C, He H, Shah S, Wood AJ. Increased drug delivery to the brain by P-glycoprotein inhibition. *Clin Pharmacol Ther.* 2000 Sep;68(3):231-7.
128. Newman MJ, Dixon R, Toyonaga B. OC144-093, a novel P glycoprotein inhibitor for the enhancement of anti-epileptic therapy. *Novartis Found Symp.* 2002;243:213-26; discussion 226-30, 231-5.
129. Sparreboom A, Planting AS, Jewell RC, van der Burg ME, van der Gaast A, de Bruijn P, Loos WJ, Nooter K, Chandler LH, Paul EM, Wissel PS, Verweij J. Clinical pharmacokinetics of doxorubicin in combination with GF120918, a potent inhibitor of MDR1 P-glycoprotein. *Anticancer Drugs.* 1999 Sep;10(8):719-28.
130. Mistry P, Stewart AJ, Dangerfield W, Okiji S, Liddle C, Bootle D, Plumb JA, Templeton D, Charlton P. *In vitro* and *in vivo* reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by a novel potent modulator, XR9576. *Cancer Res.* 2001 Jan 15;61(2):749-58.
131. Toppmeyer D, Seidman AD, Pollak M, Russell C, Tkaczuk K, Verma S, Overmoyer B, Garg V, Ette E, Harding MW, Demetri GD. Safety and efficacy of the multidrug resistance inhibitor Incel (biricodar; VX-710) in combination with paclitaxel for advanced breast cancer refractory to paclitaxel. *Clin Cancer Res.* 2002 Mar;8(3):670-8.

132. Sasaki M, Suzuki H, Ito K, Abe T, Sugiyama Y. Transcellular transport of organic anions across a double-transfected Madin-Darby canine kidney II cell monolayer expressing both human organic anion-transporting polypeptide (OATP2/SLC21A6) and Multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2/ABCC2). *J Biol Chem.* 2002 Feb 22;277(8):6497-503.
133. Cui Y, Konig J, Keppler D. Vectorial transport by double-transfected cells expressing the human uptake transporter SLC21A8 and the apical export pump ABCC2. *Mol Pharmacol.* 2001 Nov;60(5):934-43.
134. Sasaki M, Suzuki H, Aoki J, Ito K, Meier PJ, Sugiyama Y. Prediction of *in vivo* biliary clearance from the *in vitro* transcellular transport of organic anions across a double-transfected Madin-Darby canine kidney II monolayer expressing both rat organic anion transporting polypeptide 4 and multidrug resistance associated protein 2. *Mol Pharmacol.* 2004 Sep;66(3):450-9.
135. Hirano M, Maeda K, Matsushima S, Nozaki Y, Kusuhashi H, and Sugiyama Y. Involvement of BCRP (ABCG2) in the biliary excretion of pitavastatin. *Mol Pharmacol.* 2005 *In press*
136. Matsushima S, Maeda K, Kondo C, Hirano M, Sasaki M, Suzuki H, Sugiyama Y. Identification of the hepatic efflux transporters of organic anions using double transfected MDCKII cells expressing human OATP1B1/MRP2, OATP1B1/MDR1 and OATP1B1/BCRP. *J Pharmacol Exp Ther.* *In press*

謝辞

本研究を遂行するに際し、終始ご懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました東京大学大学院薬学研究科分子薬物動態学教室 杉山 雄一 教授に謹んで感謝の意を表します。

また、本研究を遂行するに際し、ご指導を賜りました東京大学医学部附属病院薬剤部 鈴木 洋史 教授に深謝いたします。終始有益なご助言とご指導を賜りました東京大学大学院薬学研究科分子薬物動態学教室 楠原 洋之 助教授、前田 和哉 助手に深く感謝いたします。

最後に、多大なご支援をいただきました、第一化学薬品株式会社薬物動態研究所に深く感謝いたします。