

- Yalcin A, Weber K, and Tuschl T (2001a) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**:494-498.
- Elbashir SM, Lendeckel W, and Tuschl T (2001b) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* **15**:188-200.
- Elimadi A, Morin D, Albengres E, Chauvet-Monges AM, Allain V, Crevat A, and Tillement JP (1997) Differential effects of zidovudine and zidovudine triphosphate on mitochondrial permeability transition and oxidative phosphorylation. *Br J Pharmacol* **121**:1295-1300.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, and Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**:806-811.
- Fridovich I (1975) Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* **44**:147-159.
- Hammond SM, Bernstein E, Beach D, and Hannon GJ (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**:293-296.
- Haouzi D, Lekéhal M, Moreau A, Moulis C, Feldmann G, Robin MA, Lettéron P, Fau D, and Pessayre D (2000) Cytochrome P450-generated reactive metabolites cause mitochondrial permeability transition, caspase activation, and apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology* **32**:303-311.
- Hinson JA, Pohl LR, Monks TJ, and Gillette JR (1981) Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Life Sci* **29**:107-116.
- Howie D, Adriaenssens P, and Prescott LF (1977) Paracetamol metabolism following overdose: Application of high performance liquid chromatography. *J Pharm Pharmacol* **29**:235-237.
- Kohle C, Badary OA, Nill K, Bock-Hennig BS, and Bock KW (2005) Serotonin glucuronidation by Ah receptor- and oxidative stress-inducible human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A6 in Caco-2 cells. *Biochem Pharmacol* **69**:1397-1402.
- Kruyt FA and Curiel DT (2002) Toward a new generation of conditionally replicating adenoviruses pairing tumor selectivity with maximal oncolysis. *Hum Gene Ther* **13**:485-495.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, Cartwright J Jr, Dionne L, Lu N, Huang S, and Matzuk MM (1996) Neurodegeneration, myocardial

- injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. **93**: 9782-9787.
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, and Wang X (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* **86**:147-157.
- Miner DJ and Kissinger PT (1979) Evidence for the involvement of *N*-acetyl-*p*-quinoneimine in acetaminophen metabolism. *Biochem Pharmacol* **28**: 3285-3290.
- Modica-Napolitano JS (1993) AZT causes tissue-specific inhibition of mitochondrial bioenergetic function. *Biochem Biophys Res Commun* **194**:170-177.
- Ong MM, Wang AS, Leow KY, Khoo YM, and Boelsterli UA (2006) Nimesulide-induced hepatic mitochondrial injury in heterozygous Sod2(+/-) mice. *Free Radic Biol Med* **40**:420-429.
- Ong MM, Latchoumycandane C, and Boelsterli UA (2006) Troglitazone-induced hepatic necrosis in an animal model of silent genetic mitochondrial abnormalities. *Toxicol Sci* **97**:205-213.
- Pal-Bhadra M, Bhadra U, and Birchler JA (1997) Cosuppression in *Drosophila*: gene silencing of alcohol dehydrogenase by white-Adh transgenes is polycomb dependent. *Cell* **90**:479-490.
- Peng Z (2005) Current status of gendicine in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers. *Hum Gene Ther* **16**:1016-1027.
- Possel H, Noack H, Augustin W, Keilhoff G, and Wolf G (1997) 2,7-Dihydrodichloro fluorescein diacetate as a fluorescent marker for peroxynitrite formation. *FEBS Lett* **416**:175-178
- Runge D, Köhler C, Kostrubsky VE, Jäger D, Lehmann T, Runge DM, May U, Stolz DB, Strom SC, Fleig WE, and Michalopoulos GK (2000) Induction of cytochrome P450 (CYP)1A1, CYP1A2, and CYP3A4 but not of CYP2C9, CYP2C19, multidrug resistance (MDR-1) and multidrug resistance associated protein (MRP-1) by prototypical inducers in human hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **273**:333-341.
- Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman R, and Schreiber RD (1998) How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* **67**:227-264.
- Tarze A, Deniaud A, Le Bras M, Maillier E, Molle D, Larochette N, Zamzami N, Jan G, Kroemer G, and Brenner C (2007) GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization. *Oncogene* **26**:2606-2620.

Temple R (2001) Hepatotoxicity through the years : Impact on the FDA, presented 12 Feb 2001, www.fda.gov/cder/livertox/presentations/im1389/sld001.htm

Biophys **346**:161-169.

Tone Y, Kawamata K, Murakami T, Higashi Y, and Yata N (1990) Dose-dependent pharmacokinetics and first-pass metabolism of acetaminophen in rats. *J Pharmacobiodyn* **13**:327-335.

Towbin H, Staehelin T, and Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**:4350-4354.

Van Remmen H, Salvador C, Yang H, Huang TT, Epstein CJ, and Richardson A (1999) Characterization of the antioxidant status of the heterozygous manganese superoxide dismutase knockout mouse. *Arch Biochem Biophys* **363**:91-97.

Volkman X, Fischer U, Bahr MJ, Ott M, Lehner F, Macfarlane M, Cohen GM, Manns MP, Schulze-Osthoff K, and Bantel H (2007) Increased hepatotoxicity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in diseased human liver. *Hepatology* **46**:1498-1508.

Yamazaki H and Shimada T (1997) Progesterone and testosterone hydroxylation by cytochromes P450 2C19, 2C9, and 3A4 in human liver microsomes. *Arch Biochem*

【資料3】 厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

CYP3A4による代謝的活性化に関する薬物誘導性肝障害試験系構築の研究

分担研究者 中島 美紀 金沢大学大学院医学系研究科准教授

研究要旨

薬物の代謝的活性化は薬物性肝障害の原因の一つとして、近年注目されている。しかし *in vitro* において CYP の発現を維持するのは非常に困難であるため、*in vitro* における CYP による代謝的活性化の予測は難しいとされる。本研究では当研究室で構築した *in vitro* 実験系を用いて、CYP による代謝的活性化の予測を行なった。章 A-1 では、ベンゾジアゼピン系薬物の CYP3A4 による代謝的活性化の検討およびグルタチオン抱合体の検出を行なった。フルニトラゼパム、ニメタゼパム、ニトラゼパムでは CYP3A4 存在下で細胞障害の増強が認められ、CYP3A4 による代謝的活性化を明らかにした。またフルニトラゼパムおよびニメタゼパムは CYP3A4 とインキュベートすることによりグルタチオン抱合体が検出されたことから、ニトロベンゾジアゼピンのニトロ基が反応性代謝物の生成に重要な役割を果たしていることを明らかにした。章 A-2 では、チエノピリジン誘導体の CYP3A4 による代謝的活性化の検討を行なった。チクロピジンおよびクロピドグレルでは CYP3A4 による細胞障害の増強が認められ、CYP3A4 による代謝的活性化を明らかにした。章 A-3 では、HMG-CoA 還元酵素阻害薬の CYP3A4 による代謝的活性化の検討を行なった。フルバスタチンでは CYP3A4 による細胞障害の増強が認められ、CYP3A4 による代謝的活性化を明らかにした。

本研究では、複数の薬物で CYP3A4 による代謝的活性化を明らかにし、さらに反応性代謝物の一部がグルタチオン抱合を受けることを示した。今後は代謝的活性化を受ける薬物の反応性代謝物を同定し、細胞障害メカニズムを解明することで、代謝的活性化の予測にさらに役立つ有益な情報を提供できると考えられる。

A. 研究目的

薬物の多くは体内に吸収されると薬物代謝酵素により代謝される。薬物代謝酵素による代謝は主に薬物の排泄を促す解毒的代謝であるが、一部では化学的に不安定な反応性代謝物が生じる代謝的活性化を引き起こす。チトクロム P450 (CYP) は主要な薬物代謝酵素で肝臓に高く発現しているが、腸管、腎臓、肺、皮膚などほとんどの臓器に分布している。中でも一分子種である CYP3A4 はヒト肝総 CYP の約 30% を占め (Shimada et al., 1994)、臨床で使用されている薬物の約 50% を代謝するといわれている重要な分子種である (Guengerich, 1995)。

肝障害の主な原因の一つに薬物が挙げられ、薬物誘導性肝障害は急性肝不全の約半数を占める (Kaplowitz, 2001)。また肝障害との関連が 1 件以上示唆されている薬物は約 1000 種類にのぼる (Zimmerman, 1999)。薬物性肝障害は中毒性と特異体質性の大きく 2 種類に分類される。中毒性肝障害は薬物の投与量依存的に、ほとんど個体差なく発症するため、非臨床試験による再現が可能であるとされている。

一方、特異体質性肝障害は発症の個体差が大きく、発症頻度は 100 から 10 万人に 1 人程度と非常に低いため、医薬品の研究・開発段階で発見されにくい (Utrecht, 1999)。そのため医薬品の承認販売後に肝障害が発覚し、しばしば発売中止となることがある。発売中止となる薬物には不安定な反応性代謝物の存在が報告されているものが多い (Guengerich and MacDonald, 2007)。反応性代謝物は主に CYP によって生成し、活性酸素の産生、チオールの酸化、内在性巨大分子への結合を行なうことで細胞の機能を障害する (Riley et al., 1988)。しかしヒト肝癌由来培養細胞において CYP の発現量は極めて低く、ヒト初代培養肝細胞では長期培養に伴って CYP の発現量が低下するため、*in vitro* において CYP による代謝的活性化のメカニズムを解明することは非常に困難である。

これまでに当研究室で Vagnati ら (2005) の方法を基に、ヒト肝癌由来 HepG2 細胞とヒト CYP3A4 を発現させたバキュロウイルス発現系ミクロソームを用いて薬物の代謝的活性化を検討する *in vitro* 評価系を構築した

(中川, 2007)。糖尿病治療薬であるトログリタゾンは特異体質性肝障害を引き起こし発売中止となった薬物で、CYP3A4による代謝的活性化が示唆されている (Yamamoto et al., 2002)。本実験系において、トログリタゾンの細胞障害性が CYP3A4 によって増強されることを再現できた。従って、本評価系によって CYP3A4 による代謝的活性化が予測可能であると考えられる。

そこで本研究では、これまでに肝障害が報告されている薬物を中心にベンゾジアゼピン系薬物、チエノピリジン誘導体、3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) 還元酵素阻害薬に対して、CYP3A4 による代謝的活性化の有無を明らかにすることを目的とした。

【以下3項目の研究内容について A-1, A-2, A-3 として分けて記載】

A-1. ベンゾジアゼピン系薬物の CYP3A4 による代謝的活性化の検討

フルニトラゼパムはベンゾジアゼピン系誘導体 (Fig. 1) で催眠剤、麻酔

前投薬、麻酔導入剤および局所麻酔時の鎮静剤として使用されている。フルニトラゼパムの重大な副作用として肝機能障害、黄疸などが報告されているが (サイレースインタビューフォーム)、詳細なメカニズムは解明されていない。そこで Fig. 1 に示した 13 種のベンゾジアゼピン系薬物について CYP3A4 による代謝的活性化の有無を検討した。

B. 研究方法

B-1. 実験材料および実験方法

B-1-1 試薬

ウシ胎児血清 (FBS)、非必須アミノ酸 (NEAA) はインビトロジェン (Carlsbad, CA) から、ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) は日水製薬 (Tokyo, Japan) から購入した。酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADP⁺)、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH) はオリエンタル酵母 (Tokyo, Japan) から購入した。CYP2C9、CYP2C19、CYP3A4 を発現させたバキュロウイルス発現系マイクロソーム (CYP2C9、CYP2C19、CYP3A4 発現系

マイクロソーム) およびコントロール
マイクロソームは BD-Gentest (Woburn,
MA) より購入した。なお、これらの
マイクロソームは NADPH-チトクロム
P450 還元酵素 (NPR) とチトクロム b_5
(b_5) を同時発現させたものである。ク
ロバザム、ジアゼパム、ロラゼパム、
ニメタゼパム、ニトラゼパム、オキサ
ゼパム、ロラゼパム、還元型グルタチ
オンは和光純薬工業 (Osaka, Japan)
より、プロマゼパム、クロルジアゼポ
キシド、デスメチルジアゼパム、フル
ニトラゼパム、フルラゼパム、ノルフ
ルジアゼパム、テマゼパムは
Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) より購
入した。CellTiter-Glo Luminescent Cell
Viability Assay および CellTiter-Blue
Cell Viability Assay はプロメガ
(Madison, WI) から購入した。

B-1-2 ヒト肝癌由来 HepG2 細胞の 培養

ヒト肝癌由来 HepG2 細胞は理研ジ
ーンバンク (Tsukuba, Japan) より購
入した。HepG2 細胞は 10% FBS、NEAA
を含む DMEM を培養液として用いて
10 cm ディッシュで培養した。継代時、
培地をアスピレート除去した後トリ
プシン-エチレンジアミン- N,N,N',N' -
四酢酸溶液 4 ml をディッシュに加え、
37°C、3~5 分間インキュベートした。
培養液を 6 ml 入れておいた 50 ml ファ
ルコンチューブにディッシュより剥
離した細胞を移し、250 g、4°C で 5 分
間遠心分離した。得られた沈殿を再度
培養液に懸濁し、40 μ m セルストレイ
ナーで濾過した濾液をディッシュに
まき、5% CO₂ 存在下 37°C で培養した。

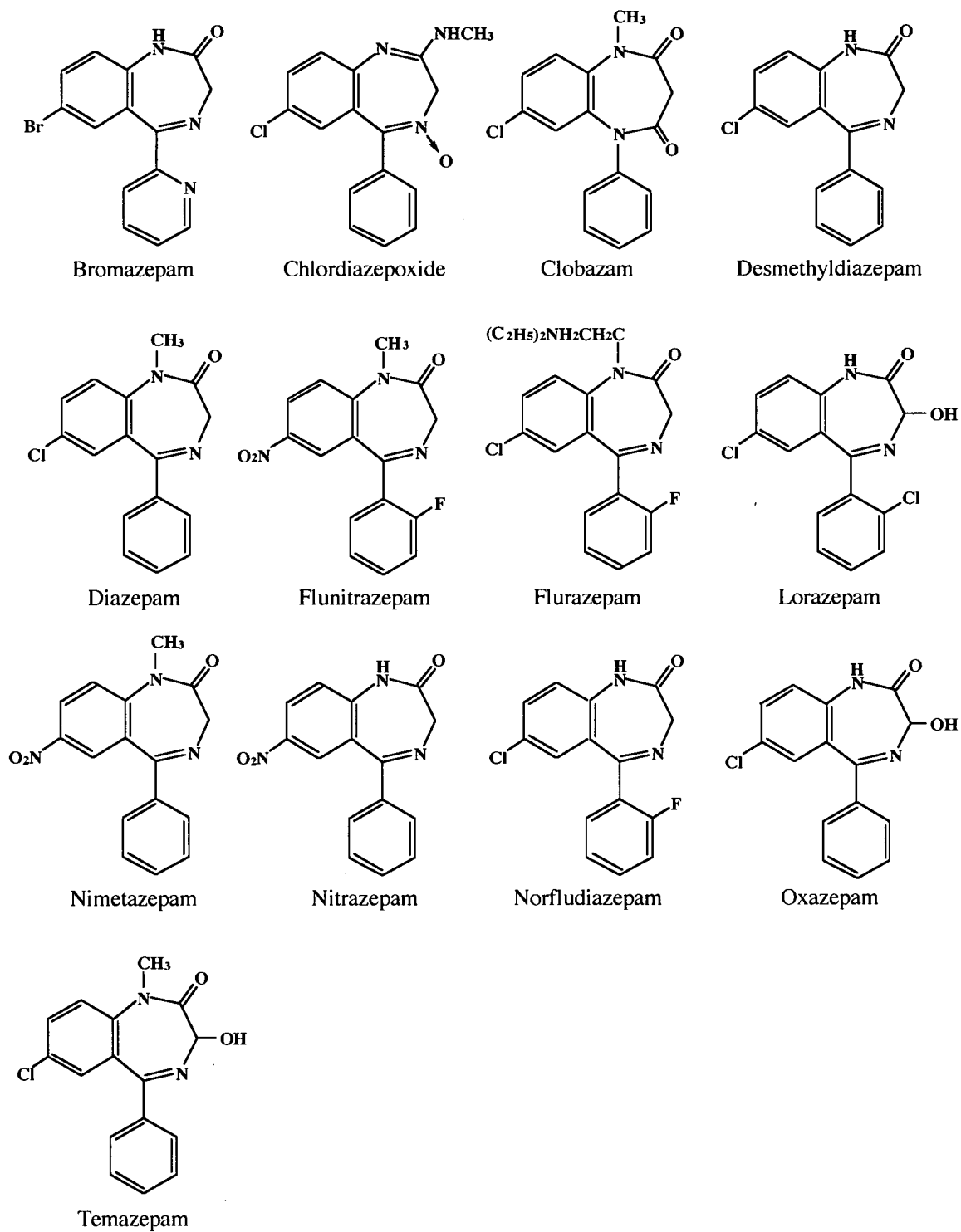


Fig. 1. Structures of benzodiazepine analogues.

B-1-3 細胞生存率の測定法

細胞生存率は CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (ATP 測定法) と CellTiter-Blue Cell Viability Assay (MTT 測定法) の 2 種類で検討した。ATP および MTT 測定法はマニュアルに従い、以下のように測定した。ATP 測定法は、96 well-plate に CellTiter-Glo Reagent 100 μ l を加え PerkinElmer Life Sciences (Wellesley, MA) のルミノメーター1420 ARVO MX にセットし、2 分間振とう後、10 分間静置して発光を測定した。MTT 測定法は、96 well-plate に CellTiter-Blue Reagent 20 μ l を加え、10 秒間振とう後、CO₂ インキュベーター内で 90 分間呈色反応を行なった。その後ルミノメーター1420 ARVO MX で 570 nm の蛍光を測定した。

B-1-4 ベンゾジアゼピン系薬物の CYP3A4 による代謝的活性化の検討

最終濃度が 10,000 cells/well の HepG2 細胞、62.4 μ g/ml CYP3A4 発現系マイクロソーム (CYP3A4 として 8 nM)、3% FBS を含む DMEM、1 mM NADPH となるように混合した溶液に

被験薬を加え、96 well-plate に 100 μ l/well ずつまき、5% CO₂ 存在下 37°C で 24 時間インキュベートし、その後 I-2-3 の ATP 測定法および MTT 測定法により細胞生存率を測定した。被験薬としてプロマゼパム、クロルジアゼポキシド、クロバザム、デスメチルジアゼパム、ジアゼパム、フルニトラゼパム、フルラゼパム、ロラゼパム、ニメタゼパム、ニトラゼパム、ノルフルジアゼパム、オキサゼパム、テマゼパムを用いた。被験薬の濃度は 50、100、200、400 μ M で検討した。なお、DMSO の最終濃度は 0.2% とした。また対照群にはコントロールマイクロソームを CYP3A4 発現系マイクロソームと同じタンパク質濃度で添加した。

B-1-5 ニトロベンゾジアゼピンの CYP2C9 および CYP2C19 による代謝的活性化の検討

最終濃度が 10,000 cells/well の HepG2 細胞、22.4 μ g/ml CYP2C9 (CYP2C9 として 8 nM) または 37.6 μ g/ml CYP2C19 発現系マイクロソーム (CYP2C19 として 8 nM)、3% FBS を含む DMEM、1 mM NADPH となるよう

に混合した溶液に被験薬を加え、96 well-plate に 100 μ l/well ずつまき、5% CO₂ 存在下 37°C で 24 時間インキュベートし、その後 I-2-3 の ATP 測定法および MTT 測定法により細胞生存率を測定した。被験薬としてフルニトラゼパム、ニメタゼパム、ニトラゼパムを用いた。被験薬の濃度は 50、100、200、400 μ M で検討した。なお、DMSO の最終濃度は 0.2%とした。また対照としてコントロールマイクロソームを CYP3A4 発現系マイクロソームと同じタンパク質濃度で添加した。

B-1-6 ベンゾジアゼピン系薬物のグルタチオン抱合反応

反応系は最終濃度が 100 mM Kpi (pH 7.4)、50 nM CYP3A4 発現系マイクロソーム、10 mM 還元型グルタチオン、100 μ M 被験薬となるように混合し全量を 200 μ l とした。最終濃度が 1 mM になるように 10 mM NADPH 生成系 (1.94 mM NADP⁺、4.13 mM グルコース 6-リン酸、4.13 mM Kpi (pH 7.4)、0.5 unit/ml グルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼ) を 50 μ l 添加することにより反応を開始した。なお、被験薬は

DMSO に溶解し、反応液中の有機溶媒濃度は 1%以下とした。また対照群にはコントロールマイクロソームを CYP3A4 発現系マイクロソームと同じタンパク質濃度で添加した。37°C で 60 分間インキュベートした後、氷冷したメタノール 750 μ l を加え、激しく攪拌することにより反応を停止した。15000 g で 5 分間遠心分離し、上清 10 μ l を 4000 Q TRAP liquid chromatography-tandem mass spectrometry (4000 Q TRAP LC-MS/MS; Applied Biosystems, Lincoln, CA) に注入した。

B-1-7 ベンゾジアゼピン系薬物のグルタチオン抱合体検索

ベンゾジアゼピン系薬物のグルタチオン抱合体の検索には Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) を用いた。装置は 4000 Q TRAP LC-MS/MS を用いた。カラムは Inertsil ODS-3 (100 mm x 2.1 mm ID, 3 μ m, GL Science, Tokyo, Japan) を用いた。移動相は 10 mM 酢酸アンモニウム/アセトニトリルを用い、アセトニトリルは試料注入後 0-6 分では 5%、6-11 分では 90%、11-15

分では5%とした。カラム温度は40°C、流速は0.2 ml/minとした。ターボガスは450°Cとし、ネブライジングガス、ターボガスには空気、カーテンガスには窒素を用い、それぞれ60、60、12 psiとした。コリジョンエネルギーは-30 Vとした。フルニトラゼパムおよびニメタゼパムの保持時間は約4分であった。positive-electrospray ionization (ESI) modeを用い、precursor ion scan (m/z 272, negative) で分析した。

B-1-8 フルニトラゼパムおよびニメタゼパムのグルタチオン抱合反応

I-2-6の方法に準じた。ただしCYP3A4発現系ミクロソームの最終濃度は100 nMとし、反応液の全量を225 μ lとした。最終濃度が1 mMになるように5 mM NADPH生成系(3.88 mM NADP⁺、8.25 mM グルコース 6-リン酸、8.25 mM Kpi (pH 7.4)、1 unit/ml グルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼ)を25 μ l 添加することにより反応を開始した。遠心分離後6サンプルの上清を混合し40°C、減圧下で濃縮し、300 μ lの50%メタノールに再溶解した後、遠心濾過し、濾液10 μ lをliquid

chromatography ion trap time-of flight mass spectrometer (LCMS-IT-TOF; 島津製作所, Kyoto, Japan) に注入した。

B-1-9 ベンゾジアゼピン系薬物のグルタチオン抱合体の構造解析

フルニトラゼパムおよびニメタゼパムのグルタチオン抱合体はLCMS-IT-TOFを用い構造解析を行った。測定条件はI-2-7の方法に準じた。ただしコリジョンエネルギーは30 Vとした。フルニトラゼパムおよびニメタゼパムの構造解析はESI modeを用い、それぞれm/z 621、m/z 601のイオンをproduct ion scan (positive) で分析した。

B-1-10 統計解析

各群における統計学的評価はStudent t-testにより解析し、 $P < 0.05$ の時、統計学的に有意であると判断した。

C-1. 実験結果

C-1-1. ベンゾジアゼピン系薬物のCYP3A4による代謝的活性化の検討

13種のベンゾジアゼピン系薬物

(Fig. 1) に関して、CYP3A4 による薬物の代謝的活性化が及ぼす細胞障害への影響を検討した。その結果を Fig. 2 に示した。フルニトラゼパム、ニメタゼパム、ニトラゼパムを 100 μ M 以上処置した HepG2 細胞において、CYP3A4 発現系ミクロソーム処置群でコントロールミクロソーム処置群に比べて細胞生存率は 25%以上低下した。また細胞生存率の低下は薬物の濃度依存的であった。一方、ブロマゼパム、クロルジアゼポキシド、クロバザム、デスメチルジアゼパム、ジアゼパム、フルラゼパム、ロラゼパム、ノルフルジアゼパム、オキサゼパム、テマゼパムではコントロールミクロソーム処置群と CYP3A4 発現系ミクロソーム処置群の間で細胞生存率に顕著な変動は認められなかった。デスメチルジアゼパム、ジアゼパム、フルラゼ

パム、ロラゼパム、ノルフルジアゼパム、オキサゼパムではコントロールミクロソーム処置群において薬物濃度依存的な細胞生存率の低下を示した。

C-1-2. ニトロベンゾジアゼピンの CYP2C9 および CYP2C19 による代謝的活性化の検討

フルニトラゼパム、ニメタゼパムおよびニトラゼパムに関して、CYP2C9 および CYP2C19 による代謝的活性化が及ぼす細胞障害への影響を検討した。その結果を Fig. 3 に示した。フルニトラゼパム、ニメタゼパム、ニトラゼパムではコントロールミクロソーム処置群と CYP2C9 および CYP2C19 発現系ミクロソーム処置群の間で細胞生存率に顕著な変動は認められなかった。

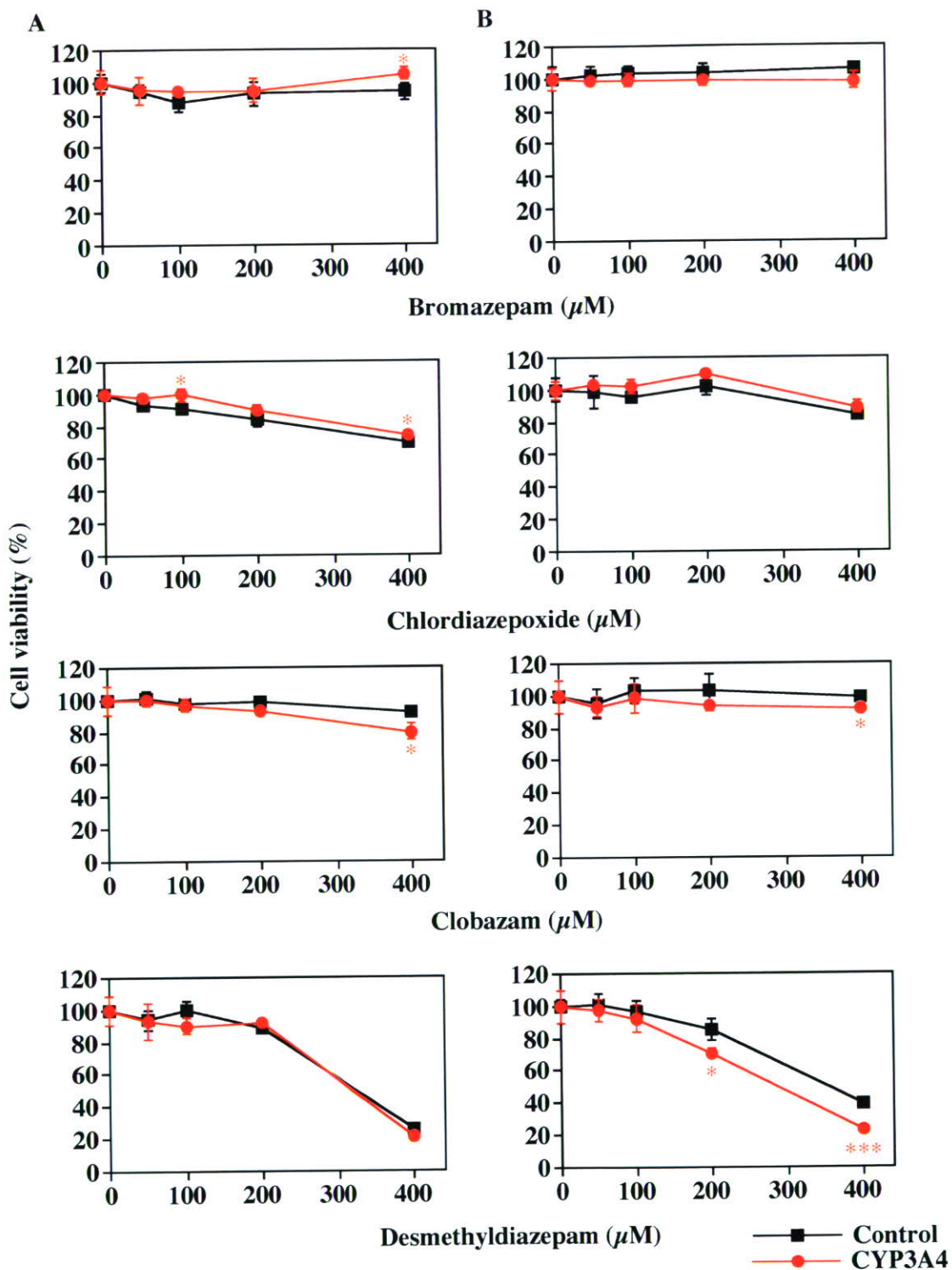


Fig. 2. Changes in the cytotoxicity of benzodiazepine analogues by CYP3A4 on HepG2 cells.. The concentrations of drugs were 50, 100, 200 and 400 μM . Data represent the mean \pm SD of three independent experiments. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ compared with control. A, ATP assay; B, MTT assay.

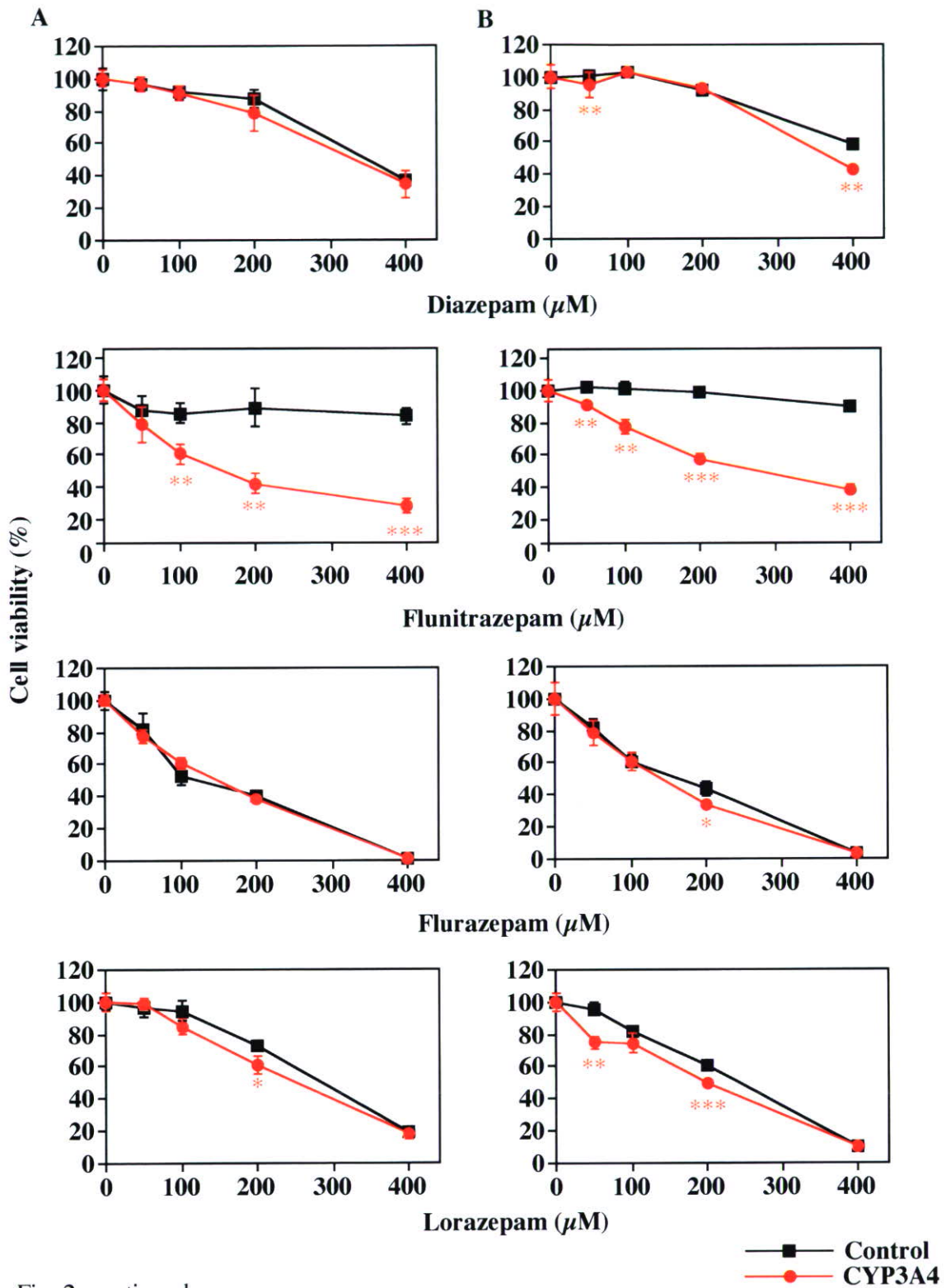


Fig. 2. continued.

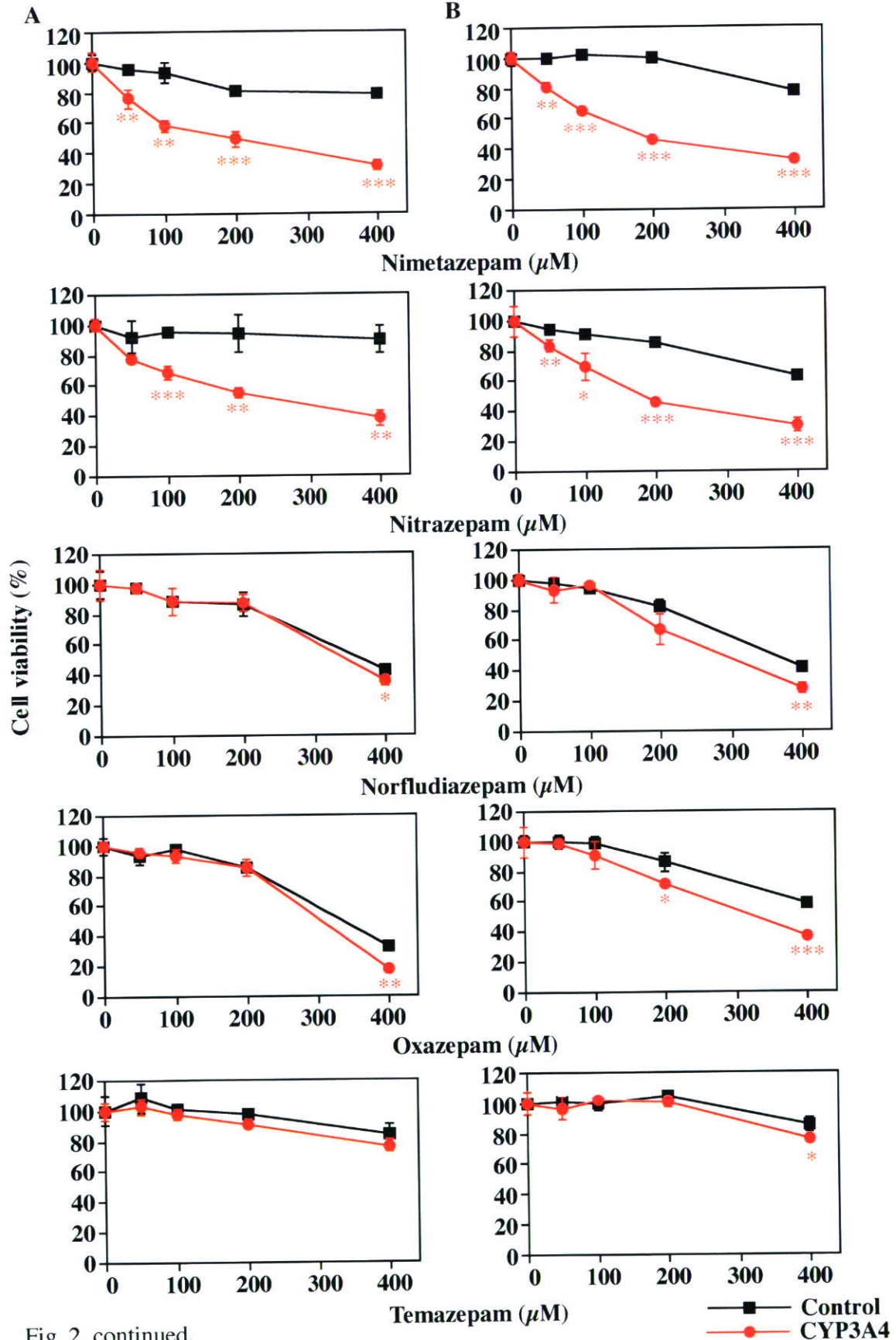


Fig. 2. continued.

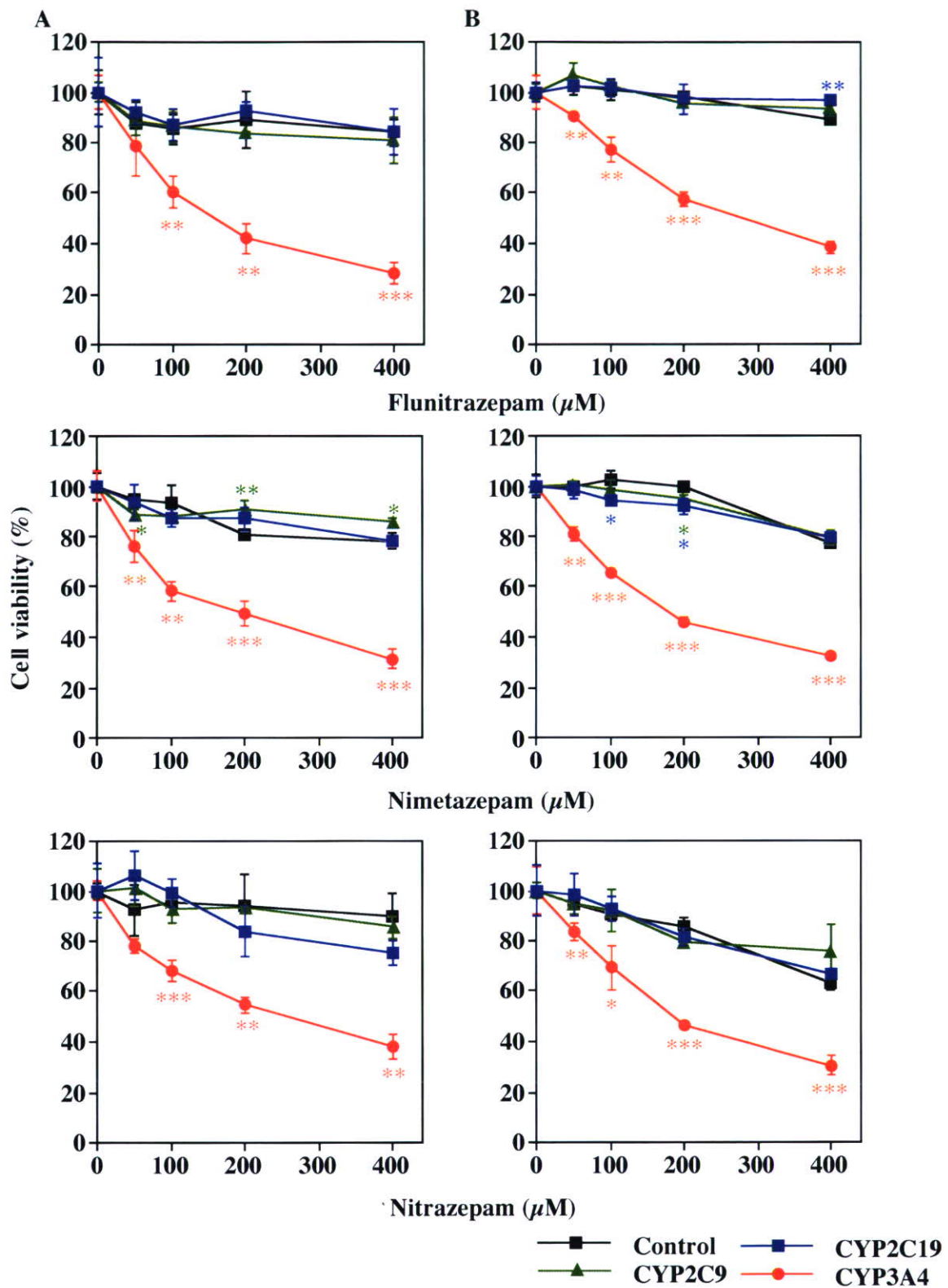


Fig. 3. Changes in the cytotoxicity of benzodiazepine analogues by CYPs in HepG2 cells. The concentrations of drugs were 50, 100, 200, 400 μM . Data represent the mean \pm SD of three independent experiments. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ compared with control. A, ATP assay; B, MTT assay.

C-1-3. ベンゾジアゼピン系薬物のグルタチオン抱合体検索

フルニトラゼパム、ニメタゼパム、ニトラゼパム、ブロマゼパム、テマゼパムに関して、CYP3A4の存在下および非存在下でグルタチオン抱合体の生成について LC-MS/MS を用いて検討した。その結果を Fig. 4 に示した。Precursor ion scan (m/z 272, negative) において、CYP3A4 発現系ミクロソーム処置群ではフルニトラゼパムおよ

びニメタゼパムのグルタチオン抱合体が検出され、それぞれ m/z 619、 m/z 601 であった。一方、コントロールミクロソーム処置群ではフルニトラゼパムおよびニメタゼパムのグルタチオン抱合体は検出できなかった (data not shown)。またニトラゼパム、ブロマゼパム、テマゼパムでは CYP3A4 発現系ミクロソーム処置群、コントロールミクロソーム処置群ともにグルタチオン抱合体は検出できなかった。

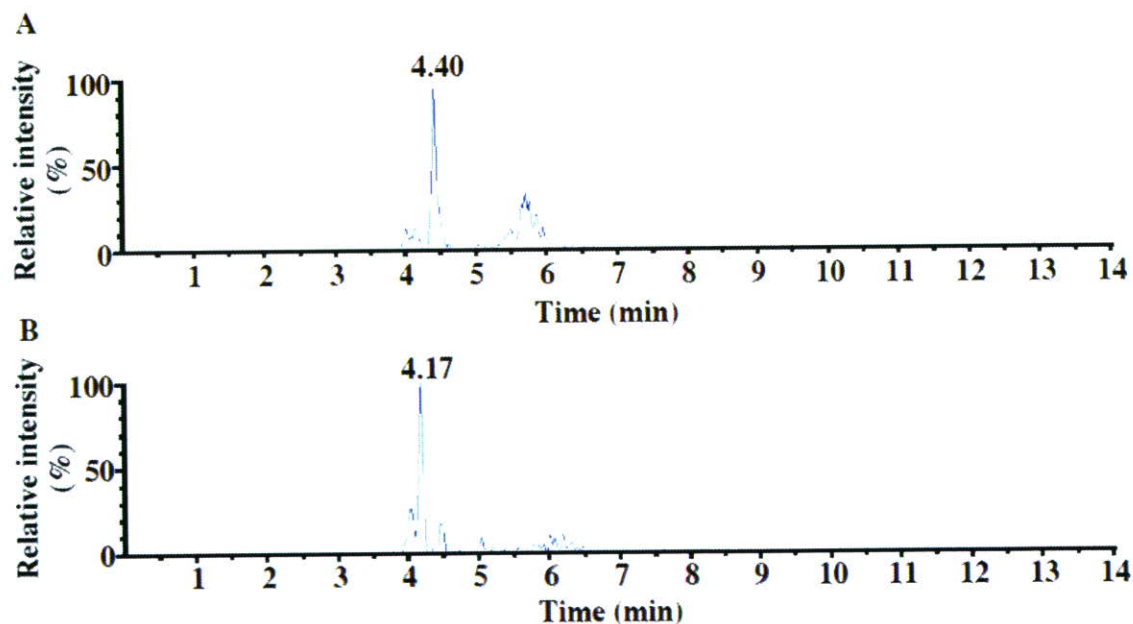


Fig. 4. Extracted ion chromatograms of glutathione conjugates of benzodiazepine analogues. A, flunitrazepam at m/z 619 ($[M - H]^-$); B, nimetazepam at m/z 601 ($[M - H]^-$).

C-1-4. フルニトラゼパムおよびニメタゼパムのグルタチオン抱合体の構造解析

フルニトラゼパムおよびニメタゼパムのグルタチオン抱合体の構造解析を行なった。その結果を Fig. 5 に示した。フルニトラゼパムのグルタチオン抱合体 (m/z 621) では MS フラグメントとして m/z 492.1、 m/z 348.1、 m/z 284.1 が検出され、 m/z 621 の構造は Fig. 5 と考えられた。一方、ニメタゼパム

のグルタチオン抱合体 (m/z 603) では m/z 474.2 および m/z 266.4 の MS フラグメントが検出された。これらはフルニトラゼパムのグルタチオン抱合体である m/z 621 から検出された m/z 492.1 および m/z 284.1 の MS フラグメントとの分子量の差が 18 であり、フルニトラゼパムとニメタゼパムの分子量の差と一致した。しかし m/z 348.1 に対応する MS フラグメントは検出できなかった。

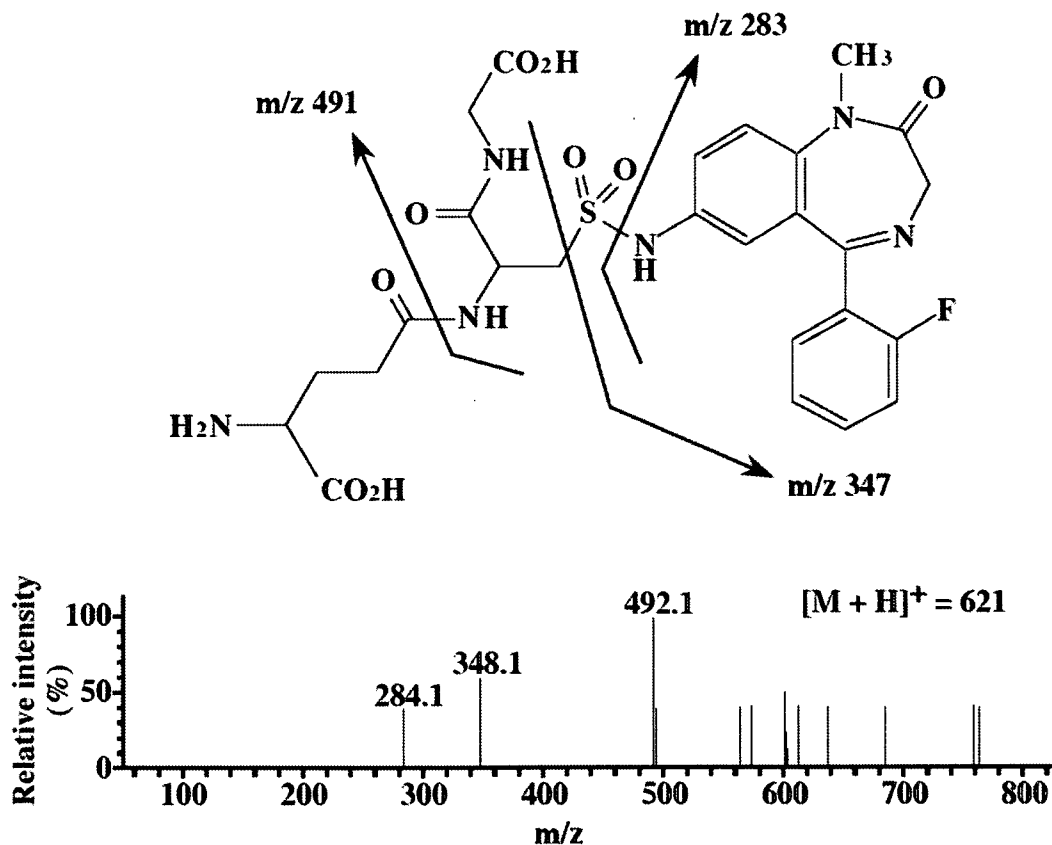


Fig. 5. MS/MS spectrum of glutathione conjugate of flunitrazepam at m/z 621 ($[M + H]^+$).

D-1. 考察

向精神薬に分類されるベンゾジアゼピン系化合物は中枢神経系のベンゾジアゼピン受容体に結合して γ -アミノ酪酸受容体の作用を亢進することにより、催眠・鎮静薬や抗不安薬、抗てんかん薬として用いられる。薬効や過量服用時の安全性、依存性を考慮すると、催眠・鎮痛薬や抗不安薬としてはベンゾジアゼピン系薬物が第一選択薬とされている。しかし、平成13年7月には厚生労働省医薬局から代表的なベンゾジアゼピン系薬物であるフルニトラゼパムの肝機能障害について注意を喚起する医薬品・医療用具等安全性情報(168号)が出された。我が国では数多くのベンゾジアゼピン系薬物が承認されており臨床で使用されている。そこで13種のベンゾジアゼピン系薬物に関して、CYP3A4による薬物の代謝的活性化が及ぼす細胞障害への影響を検討した。検討した被験薬には代謝物も含まれている。代表薬であるジアゼパムの主代謝経路は1位の脱メチル化と3位の水酸化である(Schwartz et al., 1965)。従って

デスメチルジアゼパム、テマゼパムおよびオキサゼパムはジアゼパムの代謝物である。同様にフルラゼパムの代謝物はノルフルジアゼパムであり、ニメタゼパムの代謝物はニトラゼパムであると考えられる。

Fig. 2よりフルニトラゼパム、ニメタゼパム、ニトラゼパムにおいてCYP3A4の存在下でHepG2細胞に対する細胞障害が増強した。他のベンゾジアゼピン系薬物は上述の3種ほど顕著な変動は認められなかった。フルニトラゼパム、ニメタゼパム、ニトラゼパムは7位にニトロ基を有するニトロベンゾジアゼピンである。同じくニトロベンゾジアゼピンであるクロナゼパムは臨床で抗てんかん薬として使用されている薬物である。溶解度の問題から400 μ Mまで検討できなかったが、100 μ MにおいてはCYP3A4により細胞生存率がコントロールと比較してATP測定法で57%、MTT測定法で35%減少した(data not shown)。本章で検討した他のベンゾジアゼピン系薬物はニトロ基を有していなかったため、7位のニトロ基の存在が、ベン

ゾジアゼピン系薬物の CYP3A4 による代謝的活性化に重要な役割を果たしていると考えられる。

置換基が及ぼす細胞障害への影響について以下に述べる。本章で使用した被験薬の7位はニトロ基以外にハロゲンが導入されている。7位以外は同じ構造であるジアゼパムとニメタゼパムあるいはデスメチルジアゼパムとニトラゼパムを比較すると、コントロールミクロソーム存在下では7位に塩素を有する構造が特に高濃度において細胞障害が増強した。しかし、CYP3A4 存在下では低濃度においてニトロ基を有する薬物の細胞生存率が減少した。7位の置換基は CYP3A4 による代謝的活性化だけでなく、親化合物の細胞障害性にも影響を与えていると考えられる。

また1位の置換基の差異について、ジアゼパムとデスメチルジアゼパム、フルラゼパムとノルフルジアゼパム、ニメタゼパムとニトラゼパム、テマゼパムとオキサゼパムを比較した。テマゼパムとオキサゼパム以外は1位がメチル基 (ジアゼパム、ニメタゼパム) でも水素 (デスメチルジアゼパム、ニ

トラゼパム) でもコントロール、CYP3A4 ともに細胞生存率に大きな差異は認められなかった。従って、ジアゼパムとニメタゼパムは親化合物と1-脱メチル化代謝物で細胞障害性に大きな差はないと示唆できる。一方、テマゼパムは1位が脱メチル化されるとオキサゼパムになるが、高濃度で代謝物が親化合物より高い毒性を示した理由は不明である。フルラゼパムとノルフルジアゼパムについては、フルラゼパムがノルフルジアゼパムより全薬物濃度において細胞生存率が低いため、1位がかさ高い構造である場合は細胞障害性が高いのかもしれない。

3位に水酸基が導入されたテマゼパムとオキサゼパムはそれぞれジアゼパムとデスメチルジアゼパムの代謝物と考えられる。ジアゼパムは3位の水酸化を受けることによって細胞障害性が減弱したが、デスメチルジアゼパムの場合は変化が認められなかった。従って、化合物により3位の水酸基の影響が異なると考えられる。

5位以外が同じであるデスメチルジアゼパムとノルフルジアゼパム、フル