

ニトラゼパムとニメタゼパムあるいはロラゼパムとオキサゼパムを比較する。デスメチルジアゼパムとニメタゼパム、オキサゼパムはフェニル基を、ノルフルジアゼパムとフルニトラゼパムはフルオロフェニル基を、ロラゼパムはクロロフェニル基を有する。本章での結果より、5位のフェニル基のハロゲンの有無により細胞障害性に影響を及ぼさないと示唆された。置換基は薬効にも関連するため、毒性だけでなく薬効への影響も考慮せねばならない。

ニトロベンゾジアゼピンについてさらに複数の CYP 分子種による代謝的活性化の有無について検討した (Fig. 3)。ヒトにおいてフルニトラゼパムの代謝物は血中で1-脱メチル体、尿中で3-水酸化体および7-アミノ体が検出されており (Fukazawa et al., 1978)、1-脱メチル化反応は主に CYP2C9 および CYP2C19、3-水酸化反応は CYP3A4 によって触媒される (Hesse et al., 2001; Kilicarslan et al., 2001)。また、HepG2 細胞においてフルニトラゼパムの7-アミノ化に NPR が関与しているとの報告がある

(Peng et al., 2004)。ニメタゼパムはマウス、ラット、イヌにおいて1-脱メチル化体、3-水酸化体、7-アミノ化体が、ヒトにおいて1-脱メチル化体、3-水酸化体で代謝される (エリミンインタビューフォーム)。ニトラゼパムのヒトにおける代謝物は7-アミノ体および7-アセトアミド体が主で、他に2-アミノ-5-ニトロベンゾフェノンおよび3-水酸化体が認められている (ネルボンインタビューフォーム; Kangas et al., 1977)。従ってフルニトラゼパム、ニメタゼパム、ニトラゼパムは類似した代謝を受けると考えられる。ニトロベンゾジアゼピンの代謝に関与する CYP2C9 および CYP2C19 は代謝的活性化に関与しないことから、ニトロベンゾジアゼピン系薬物の代謝的活性化は CYP3A4 特異的であることが示唆された。

生体内での細胞障害性を議論するときには、薬物濃度を考慮せねばならない。血中濃度については、フルニトラゼパム、ニメタゼパム、ニトラゼパムの血中濃度は本章で使用した濃度よりも低い。フルニトラゼパム 2 mg 単回投与後の最高血中濃度 (Cmax)

は 0.04 μM (Fukazawa et al., 1978)、ニメタゼパム 5 mg 単回投与後の C_{max} は 0.05 μM (エミリンインタビューフォーム)、ニトラゼパム 10 mg 単回投与後の C_{max} は 0.3 μM (Rieder, 1973) と報告されている。しかし代謝的活性化を受けると考えられるヒト肝における実際の薬物濃度を測定することは不可能であるため、*in vivo* への外挿にはさらに検討を加える必要がある。

特異体質性および非特異体質性の薬物性肝障害の両者について、反応性代謝物の生成が最初のステップであると示唆されている (Park et al., 2005)。一般に反応性代謝物は細胞内タンパク質と共有結合し細胞障害を引き起こすと考えられているが、生体内に存在する還元型グルタチオンによって反応性代謝物はグルタチオン抱合を受け解毒される経路が存在する (加藤と鎌滝, 2000)。*In vitro* においてグルタチオン抱合体の検出は、反応性代謝物の有無を明らかにするために広く使われている方法である (Samuel et al., 2003)。これまで代謝的に活性化されて不安定な反応中間体を形成する薬物について、グルタチオン抱合体の

存在が報告されている。たとえばトログリタゾン (Masubuchi, 2006)、前立腺癌治療薬であるフルタミド (Kang et al., 2007)、抗うつ薬であるトラゾドン (Kalgutkar et al., 2005) などが挙げられる。そこで本章でも、CYP3A4 により細胞障害が増強した薬物に関して、グルタチオン抱合体の検出を行なった。グルタチオン抱合体の量がわずかであったため、核磁気共鳴による解析ができず、LCMS-IT-TOF による構造推定のみを行なった。その結果、フルニトラゼパムでは Fig. 4 に示す構造のグルタチオン抱合体が推定できた。またニメタゼパムについては、 m/z 621 と m/z 603 からはフルニトラゼパムとニメタゼパムの分子量の差 (18) に起因する共通の MS フラグメントが検出されたため、ニメタゼパムもフルニトラゼパムと類似したグルタチオン抱合体を形成していると考えられる。ニトラゼパムについてはグルタチオン抱合体が本章での実験条件下では認められなかったが、これは検出感度に依存するのかもしれない。

本章では、CYP3A4 によりニトロベンゾジアゼピンが代謝的活性化を受

けることを明らかにした。フルニトラゼパムによる肝障害についてのメカニズムは未だ明らかにされていないが、CYP3A4による代謝的活性化が一因である可能性が示された。

A-2. チェノピリジン誘導体のCYP3A4による代謝的活性化の検討

チクロピジンおよびクロピドグレルはチェノピリジン誘導体 (Fig. 6) で、経口抗血小板薬である。副作用として

血栓性血小板減少性紫斑症、無顆粒球症、重篤な肝障害などが報告されている (パナルジンインタビューフォーム、プラビックスインタビューフォーム)。特にチクロピジンは2002年7月にこれらの副作用に関して緊急安全性情報が出されて注意が喚起されているが、肝障害の詳細なメカニズムは解明されていない。そこでチクロピジン、クロピドグレル、クロピドグレルの代謝物であるクロピドグレルカルボン酸 (Fig. 6) のCYP3A4による代謝的活性化について検討した。

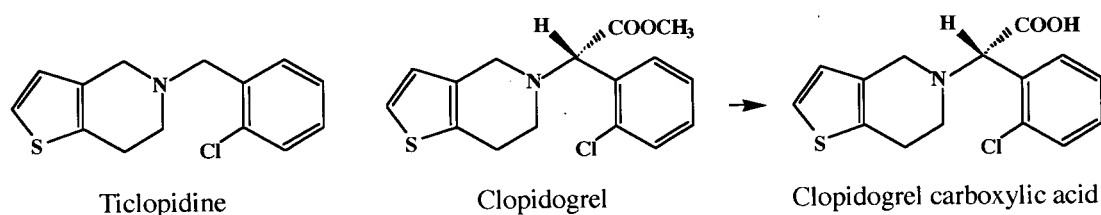


Fig. 6. Structures of tienopyridine analogues.

B-2. 研究方法

B-2-1. 試薬

チクロピジン塩酸塩は和光純薬工業より、硫酸水素クロピドグレル、クロピドグレルカルボン酸 (*S* 体) は Toronto Research Chemicals (Ontario,

Canada) より購入した。CYP1A2、CYP2B6を発現させたバキュロウイルス発現系マイクロソーム (CYP1A2、CYP2B6発現系マイクロソーム) は BD-Gentest より購入した。なお、CYP1A2発現系マイクロソームは NPR

を、CYP2B6 発現系マイクロソームは NPR と b₅ を同時発現させたものである。その他の試薬は I-2-1 に準じた。

B-2-2. チェノピリジン誘導体の CYP3A4 による代謝的活性化の検討

I-2-4 の方法に準じた。ただし被験薬の最終濃度は 25、50、100、200 μM とした。

B-2-3. チクロピジンおよびクロピドグレルの CYP3A4 以外の CYP 分子種による代謝的活性化の検討

CYP 発現系マイクロソームは CYP2C9、CYP2C19 に加え 80.0 μg/ml CYP1A2 発現系マイクロソーム (CYP1A2 として 8 nM) または 104 μg/ml CYP2B6 発現系マイクロソーム (CYP2B6 として 8 nM) を用いた。また被験薬の最終濃度は 25、50、100、200 μM とした。

C-2. 実験結果

C-2-1. チェノピリジン誘導体の CYP3A4 による代謝的活性化の検討

チクロピジン、クロピドグレル、クロピドグレルカルボン酸に関して、

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. 7 に示した。チクロピジンおよびクロピドグレルは 100 μM 以上で、CYP3A4 発現系マイクロソーム処置群でコントロールマイクロソーム処置群に比べて細胞生存率が 20% 以上低下した。一方、クロピドグレルカルボン酸ではコントロールマイクロソーム処置群と CYP3A4 発現系マイクロソーム処置群の間で有意な変動は認められなかった。

C-2-2. チクロピジンおよびクロピドグレルの CYP3A4 以外の CYP 分子種による代謝的活性化の検討

チクロピジンおよびクロピドグレルに関して CYP1A2、CYP2B6、CYP2C9、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. 8 に示した。ATP 測定法においてはチクロピジン、クロピドグレルともに CYP2C9 および CYP2C19 発現系マイクロソーム処置によってコントロールマイクロソーム処置群と比較して細胞生存率が有意に上昇したが、CYP2B6 発現系マイクロソ

ーム処置では細胞生存率の有意な変動は認められなかった。また CYP1A2 発現系マイクロソームを処置した場合はチクロピジンでは細胞生存率の有意な変動は認められなかったが、クロピドグレルは 200 μ M で有意に細胞生存率が低下した。MTT 測定法においてチクロピジンは CYP1A2、CYP2B6、CYP2C9、CYP2C19 発現系マイクロソーム処置で細胞生存率の有意な減少が認められた。クロピドグレルは CYP1A2、CYP2B6、CYP2C19 発現系マイクロソーム処置では細胞生存率の有意な減少が認められたが、CYP2C9 発現系マイクロソーム処置で細胞生存率が有意に上昇した。

D-2. 考察

チクロピジンは我が国だけでなく、欧米諸国でも臨床で汎用されている薬物であり、独立行政法人医薬品医療機器総合機構のホームページによると、我が国では推定使用患者数が年間約 100 万人 (平成 14 年) である。チクロピジンの一日投与量は 200-600 mg と高い。反応性代謝物の生成量が肝障害の程度を左右していると仮定した

場合、特異体質性肝障害であっても反応性代謝物がある一定量生成されることが必要であると考えられるため、高投与量の薬物は肝障害を惹起する可能性が高いと示唆できる。これに対し、チクロピジンの類似体であるクロピドグレルの一日投与量は基本的に 70 mg でありチクロピジンよりも低い。また、クロピドグレルの副作用はチクロピジンと類似しているが、発現頻度は低いことが示唆されている (Moussa et al., 1999; Bertrand et al., 2000)。

チクロピジンとクロピドグレルが薬効を示すためには、代謝される必要がある。チクロピジンは CYP やペルオキシダーゼによってさまざまな代謝物が生成されるが (Dalvie and O'Connell, 2004)、チオラクトン開環体が血小板凝集抑制作用を示すと報告されている (Yoneda et al., 2004)。チクロピジンのチオラクトンへの開環に関与する CYP 分子種としては CYP2C9、CYP2C19、CYP3A4 が挙げられる (Boissonnat et al., 1997; Donahue et al., 1997; Gidal et al., 1995)。

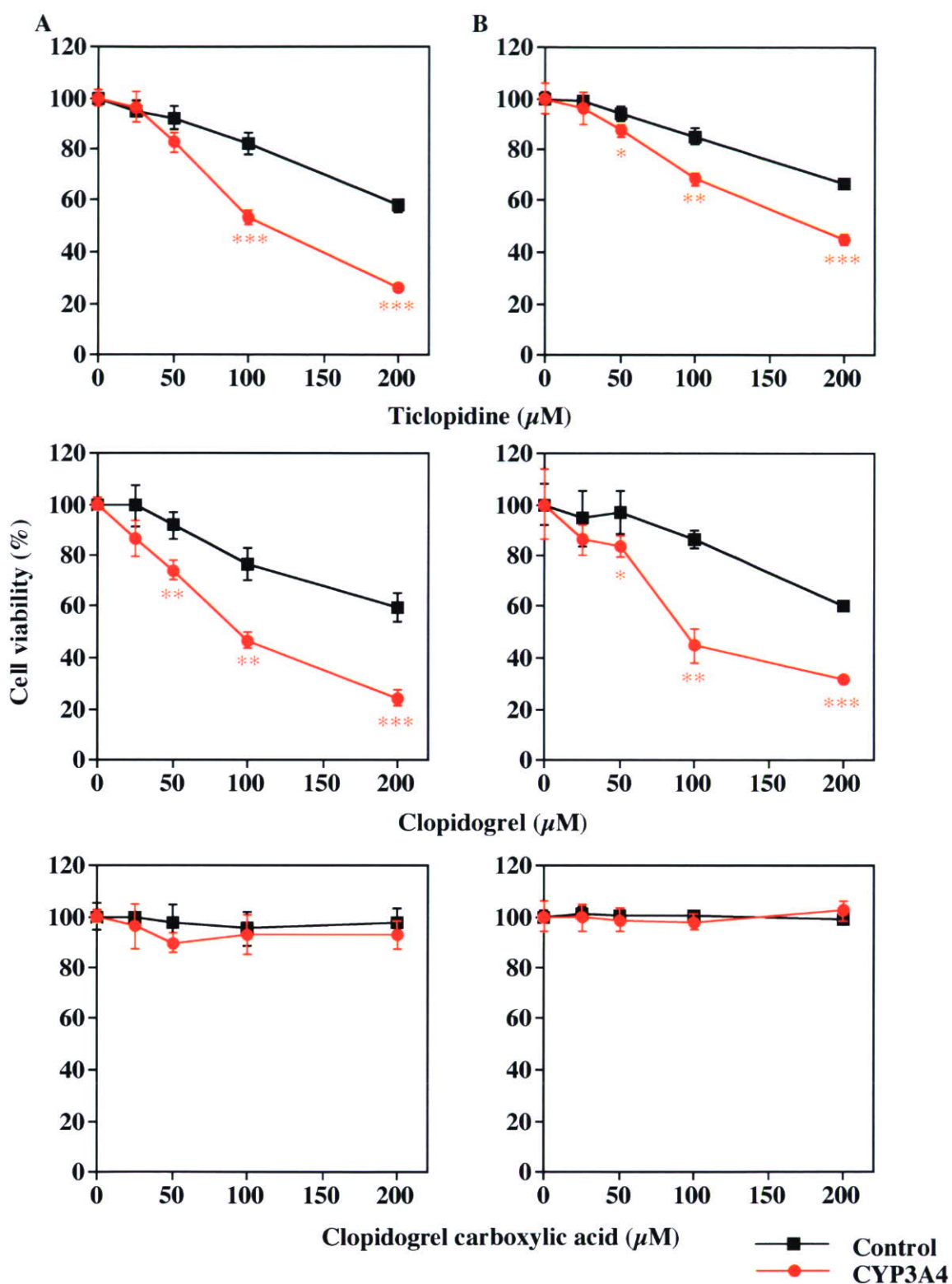


Fig. 7. Changes in the cytotoxicity of tienopyridine analogues by CYP3A4 in HepG2 cells. The concentrations of drugs were 25, 50, 100 and 200 μM . Data represent the mean \pm SD of three independent experiments. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ compared with control. A, ATP assay; B, MTT assay.

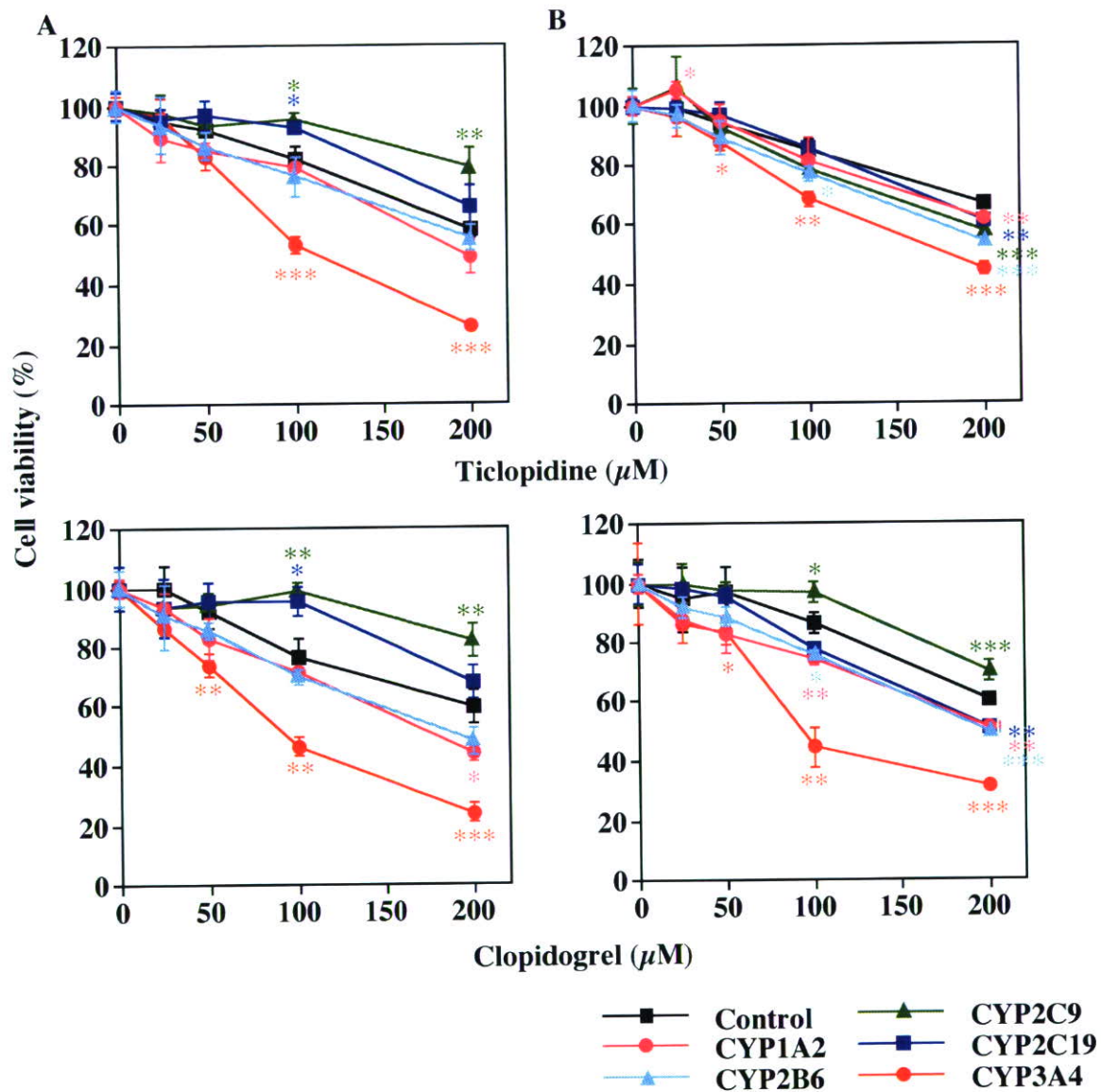


Fig. 8. Changes in the cytotoxicity of tienopyridine analogues by CYPs in HepG2 cells. The concentrations of drugs were 25, 50, 100 and 200 μM . Data represent the mean \pm SD of three independent experiments. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ compared with control. A, ATP assay; B, MTT assay.

一方、クロピドグレルの代謝経路は、カルボキシルエステラーゼにより薬理活性を示さないクロピドグレルカルボン酸へ代謝される経路と

(Caplain et al., 1999)、CYPにより薬理活性を示すチオラクトン開環体へ代謝される経路の2種類がある。*In vitro*においてクロピドグレルのチオラクトンへの開環に関与するCYP分子種はCYP3A4、CYP1A2、CYP2C19、CYP2B6であると報告されている(Savi et al., 1994)。寄与率は異なるが、チクロピジンとクロピドグレルともにCYP3A4によって代謝される。そこでまず、3種のチエノピリジン誘導体に関して、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。Fig. 7よりチクロピジンおよびクロピドグレルにおいてCYP3A4の存在下でHepG2細胞に対する細胞障害が増強したが、クロピドグレルカルボン酸では細胞障害は認められなかった。またCYP3A4より軽微であったが、CYP1A2およびCYP2B6による細胞障害の増強もチクロピジンおよびクロピドグレルで認められた(Fig. 8)。チクロピジンおよびクロピドグレルの代謝的活性化は主にCYP3A4によって行なわれているが、他のCYPによっても代謝的活性化が惹起される可能性がある。クロ

ピドグレルのチオラクトンへの開環を触媒するCYP3A4、CYP1A2、CYP2B6、CYP2C19により細胞障害が増強されたため、クロピドグレルに関してはチオラクトン開環体が反応性代謝物である可能性も考えられる。

チクロピジンの代謝的活性化について、ATP測定法とMTT測定法で細胞生存率の変化に差異が認められた。ATP測定法での結果はMTT測定法よりもCYP3A4による細胞生存率の減少が顕著であった。従って、チクロピジンの代謝的活性化により、細胞内のATPは枯渇するが、ミトコンドリアへの影響は小さい可能性がある。クロピドグレルではATP測定法とMTT測定法でチクロピジンほど大きな差は認められなかったため、ミトコンドリアに対する作用はわずかな構造の違いに影響されると考えられる。

本章ではCYP3A4によりチクロピジンおよびクロピドグレルが代謝的活性化を受けることを明らかにした。CYP3A4は臨床で使用されている薬物によって誘導される分子種でもあり、また酵素活性には個体差が認められている。従って、高用量で長期間服用

する可能性があるチクロピジンやクロピドグレルについては、CYP3A4の代謝的活性化が肝障害の原因として重要かもしれない。薬物の適正使用のためにも、チクロピジンとクロピドグレルについては、反応性代謝物や細胞障害メカニズムの解明をさらに検討する必要がある。

A-3. HMG-CoA 還元酵素阻害薬の CYP3A4 による代謝的活性化の検討

HMG-CoA 還元酵素阻害薬 (Fig. 9) は高脂血症の治療薬で HMG-CoA 還元酵素を阻害することでコレステロールの合成を抑制する。HMG-CoA 還元酵素阻害薬の重大な副作用として横紋筋融解症、肝機能障害などが報告されているが、詳細なメカニズムは解明されていない。そこでヒト肝癌由来 HepG2 細胞を用いて Fig. 9 に示した HMG-CoA 還元酵素阻害薬について CYP3A4 による代謝的活性化の有無を検討した。

B-3. 研究方法

B-3-1. 試薬

セリバスタチンナトリウム、フルバスタチンナトリウム、ロバスタチン、プラバスタチンナトリウム、シンバスタチンは和光純薬工業より、メバスタチンは Merck (Darmstadt, Germany) より、3'-ヒドロキシシンバスタチン、ピタバスタチン、ピタバスタチンラクトン、ロスバスタチンは Toronto Research Chemicals より購入した。

C-3. 実験結果

C-3-1. HMG-CoA 還元酵素阻害薬の CYP3A4 による代謝的活性化の検討

10種の HMG-CoA 還元酵素阻害薬に関して、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. 10 に示した。フルバスタチンでは CYP3A4 発現系マイクロソーム処置群でコントロールマイクロソーム処置群に比べて細胞生存率は 20%以上低下し、ロバスタチンおよびシンバスタチンでは CYP3A4 発現系マイクロソーム処置群で細胞生存率が有意に上昇した。

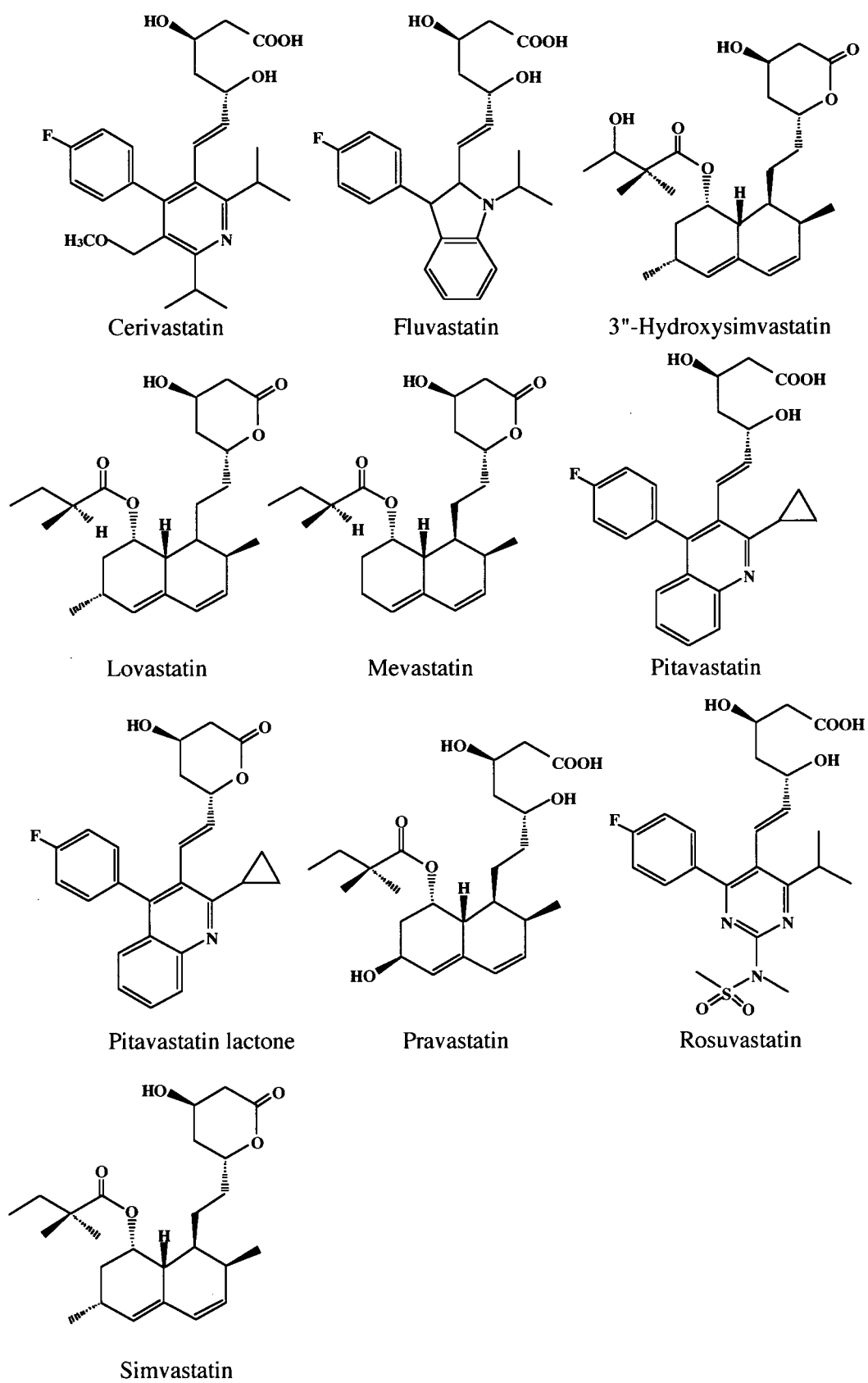


Fig. 9. Structures of statin analogues.

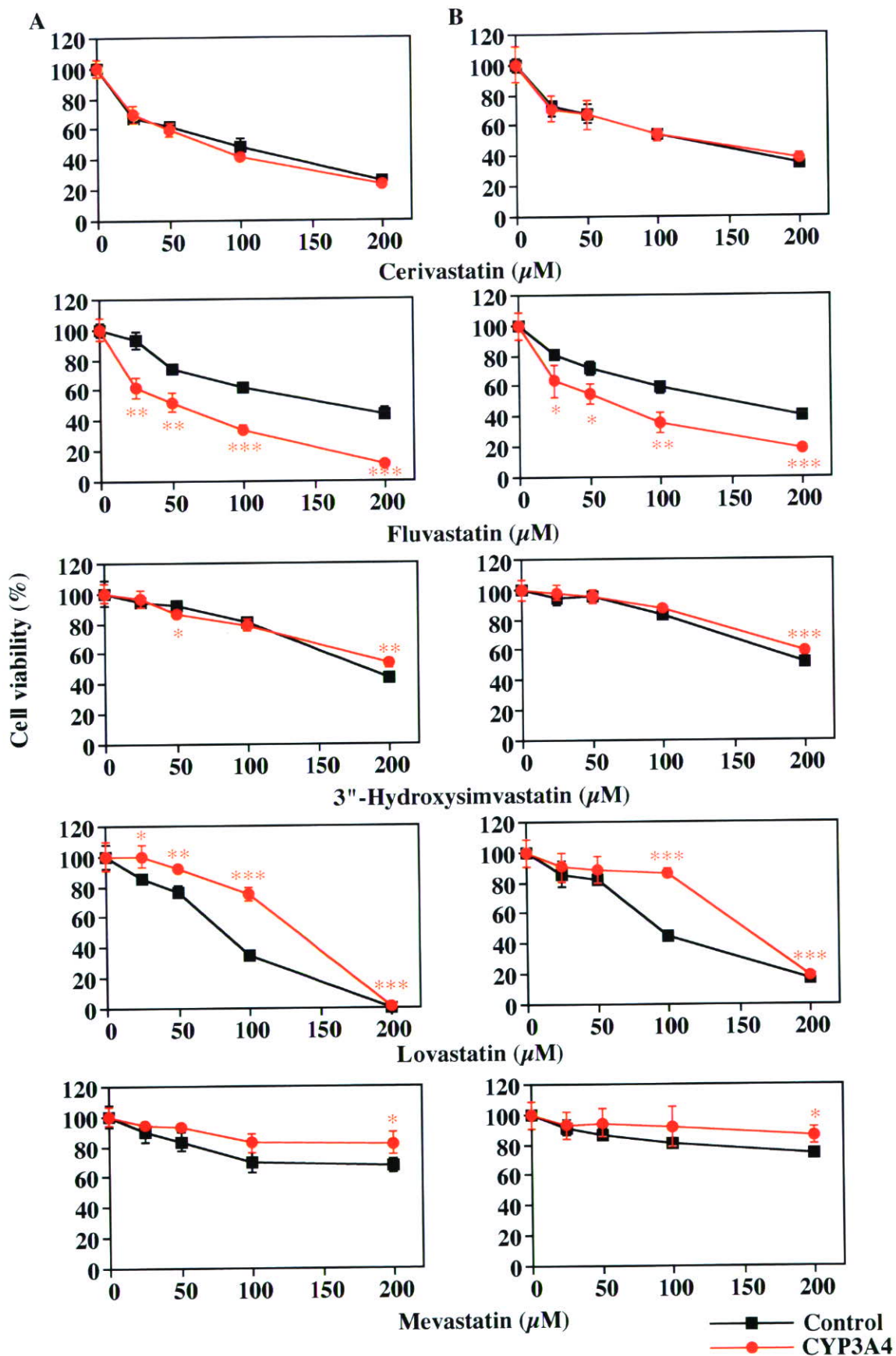


Fig. 10. Changes in the cytotoxicity of statin analogues by CYP3A4 in HepG2 cells. The concentrations of drugs were 25, 50, 100 and 200 μM . Data represent the mean \pm SD of three independent experiments. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ compared with control. A, ATP assay; B, MTT assay.

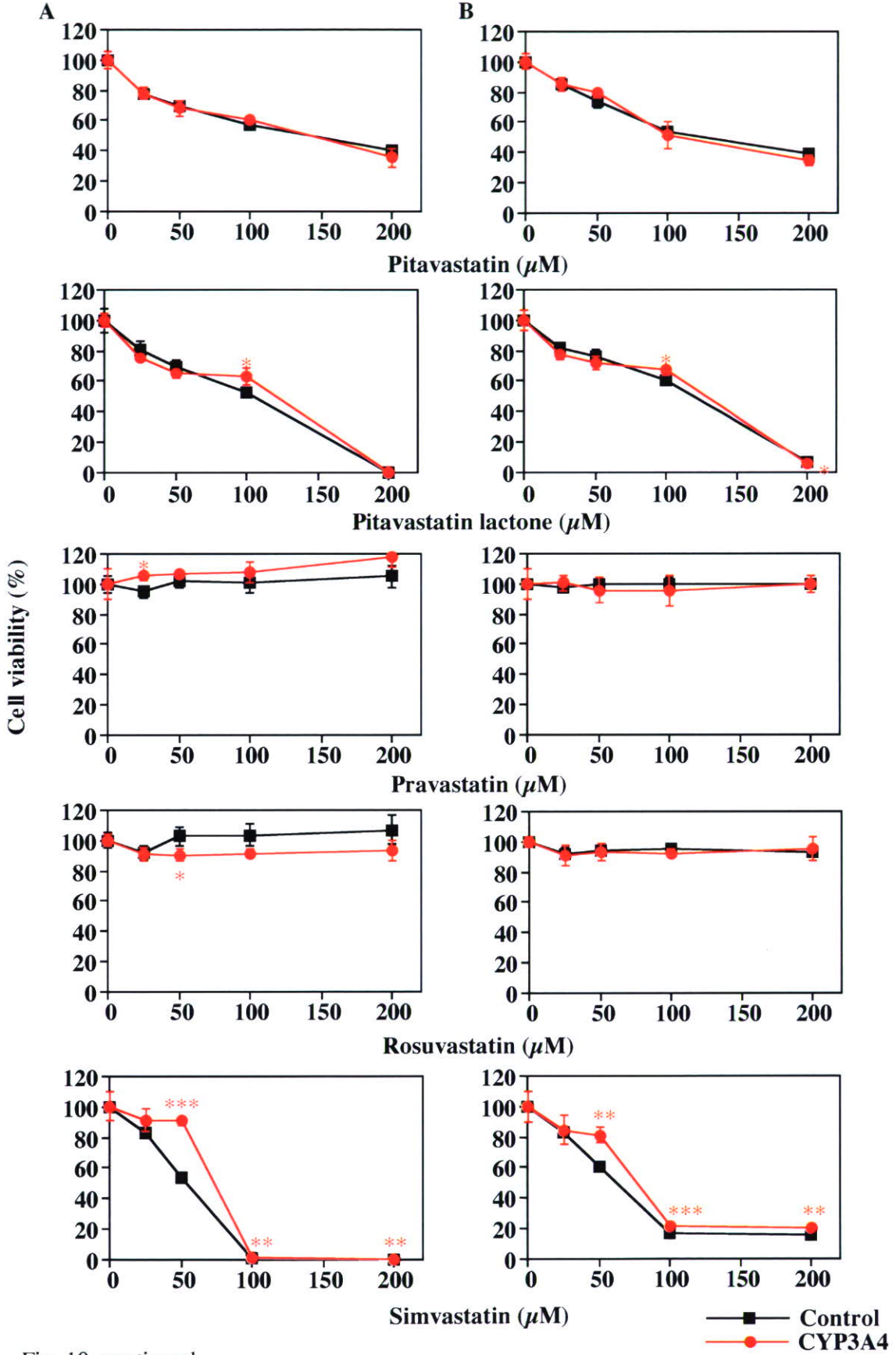


Fig. 10. continued.

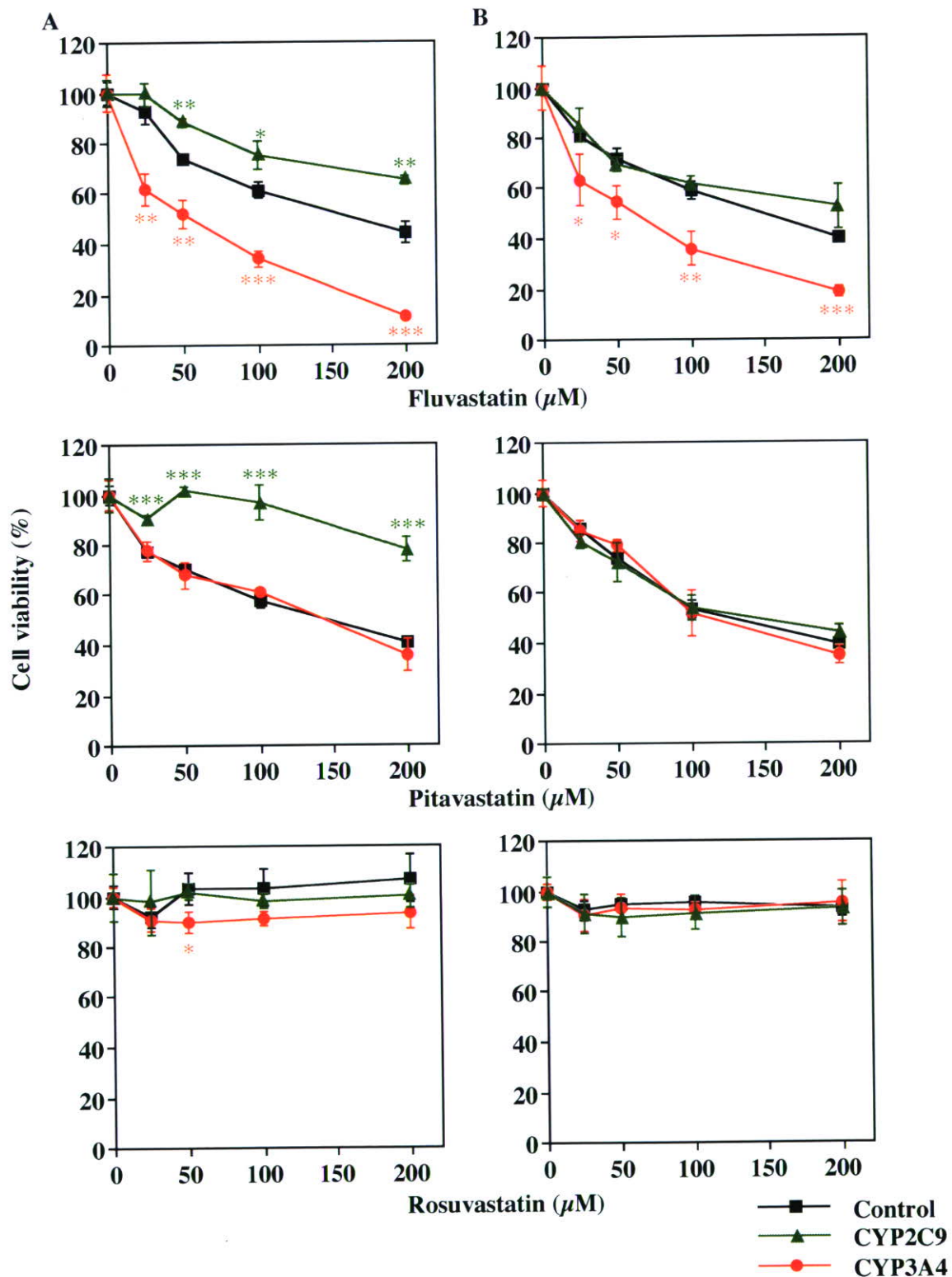


Fig. 11. Changes in the cytotoxicity of statin analogues by CYPs in HepG2 cells. The concentrations of drugs were 25, 50, 100, 200 μ M. Data represent the mean \pm SD of three independent experiments. * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001 compared with control. A, ATP assay; B, MTT assay.

セリバスタチン、3"-ヒドロキシシンバスタチン、メバスタチン、ピタバスタチン、ピタバスタチンラクトン、プラバスタチン、ロスバスタチンではコントロールマイクロソーム処置群と CYP3A4 発現系マイ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。またセリバスタチン、3"-ヒドロキシシンバスタチン、フルバスタチン、ロバスタチン、ピタバスタチン、ピタバスタチンラクトン、シンバスタチンではコントロールマイ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-3-2. HMG-CoA 還元酵素阻害薬の CYP2C9 による代謝的活性化の検討

CYP2C9 による代謝が報告されているフルバスタチン、ピタバスタチン、ロスバスタチンに関して、CYP2C9 が及ぼす細胞障害への影響を検討した。その結果を Fig. 11 に示した。ATP 測定法においては、フルバスタチンおよびピタバスタチンで CYP2C9 発現系マイクロソーム処置によってコントロールマイクロソーム処置群と比較して細胞生存率が有意に上昇したが、ロス

バスタチンでは細胞生存率の有意な変動は認められなかった。また MTT 測定法においてはフルバスタチン、ピタバスタチン、ロスバスタチンのいずれもコントロールマイクロソーム処置群と CYP3A4 発現系マイ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。

D. 考察

2005 年の厚生労働省調査によると、我が国における高脂血症の推定患者数は 3,000 万人を超えており、HMG-CoA 還元酵素阻害薬は高脂血症の第一選択薬として多数の患者に服用されている。HMG-CoA 還元酵素阻害薬はコレステロール生合成の律速酵素である HMG-CoA 還元酵素を阻害することでコレステロールの合成を抑制し、肝細胞中のコレステロール含量の低下、血中での低比重リポ蛋白の取り込み促進を引き起こす。HMG-CoA 還元酵素阻害薬は一般に安全性の高い薬として認識されているが、一方で肝トランスアミナーゼ値の増加や筋疾患などの副作用が報告されている (Bellosta et al., 2004)。*In vitro*

においてはヒト初代培養肝細胞で HMG-CoA 還元酵素阻害薬によるアポトーシスが認められており、コレステロール生合成の下流産物であるゲラニルゲラニルピロリン酸の減少が肝細胞障害の一因であると示唆されている (Kubota et al., 2004)。

本章では 10 種の HMG-CoA 還元酵素阻害薬に関して CYP3A4 による代謝的活性化の検討を行なった。フルバスタチンにおいて CYP3A4 の存在下で ATP 測定法、MTT 測定法ともに HepG2 細胞に対する細胞障害が増強したが (Fig. 10)、CYP2C9 の存在下では ATP 測定法で細胞障害が減少した (Fig. 11)。ヒトにおいてフルバスタチンは主に水酸化、脱イソプロピル化、 β -酸化され、水酸化および脱イソプロピル化は CYP2C9 が、5-水酸化は CYP3A4 が触媒すると報告されている (Dain et al., 1993; Fischer et al., 1999)。本章において、フルバスタチンの CYP2C9 を介する代謝は解毒的と考えられ、CYP2C9 存在下では細胞障害が減少したと示唆できる (Fig. 11)。しかし細胞障害の減少は ATP 測定法のみで認められたため、CYP2C9 によるフ

ルバスタチンの代謝によって ATP の枯渇は回避できるが、ミトコンドリアへの障害は回避できないと考えられる。一方 CYP3A4 によってフルバスタチンの細胞障害が増強されたため (Fig. 10)、CYP3A4 によるフルバスタチンの代謝的活性化が示唆された。

ロバスタチンおよびシンバスタチンの代謝は主に CYP3A4 が触媒する (Prueksaritanont et al., 1997; Wang et al., 1991)。ロバスタチンおよびシンバスタチンによる細胞障害が CYP3A4 の存在下で減少したため (Fig. 10)、CYP3A4 を介する代謝経路は解毒的と考えられる。シンバスタチンとその代謝物である 3'-ヒドロキシシンバスタチンでは、コントロールミクロソーム処置群における細胞生存率の低下は 3'-ヒドロキシシンバスタチンの方が軽微であったため、シンバスタチンの 3'-水酸化は解毒的であると考えられる。ピタバスタチンは CYP によりほとんど代謝されないが、CYP2C9 によってわずかに 8-水酸化体が生じると報告されている (Fujino et al., 1999)。ATP 測定法においてピタバスタチンによる細胞障害が CYP2C9 の存在下

で顕著に減少したのは (Fig. 11)、過剰な CYP2C9 によってピタバスタチンの解毒的代謝が進行したためと考えられる。しかし、MTT 測定法ではピタバスタチンによる細胞障害は顕著に変動しなかったため、フルバスタチンと同様にミトコンドリアへの障害は回避できないと考えられる。またピタバスタチンとそのラクトン体を比較すると、コントロールマイクロソーム処置群ではラクトン体の方が高濃度で細胞生存率が顕著に低下した。他のラクトン体であるシンバスタチン、ロバスタチンもピタバスタチンラクトンと同様に高濃度で強力な細胞障害を示したため、HMG-CoA 還元酵素阻害薬はラクトン構造が開環体よりも肝細胞毒性が強いことが示唆された。

本章では CYP3A4 によりフルバスタチンが代謝的活性化を受けることを明らかにした。HMG-CoA 還元酵素阻害薬の中で、CYP3A4 による代謝的活性化はフルバスタチン特異的であり、フルバスタチンと類似した化学構造も持つセリバスタチン、プラバスタチン、ロスバスタチンでは CYP3A4 による代謝的活性化が認められなかつ

たため、フルバスタチン特異的な代謝的活性化の経路が存在すると考えられる。CYP3A4 によるフルバスタチンの代謝的活性化が臨床で惹起される肝障害にどの程度寄与しているかは定かではないが、フルバスタチンの反応性代謝物やその細胞障害メカニズムをさらに解明することは副作用の発現防止に重要かもしれない。

G. 研究発表

1. 論文発表 論文作成中

2. 学会発表

水野 克彦、加藤美紀、中島美紀、横井 毅；ベンゾジアゼピン系薬物の CYP3A4 による代謝的活性化：第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会 2008 年 6 月 26～28 日 (発表予定、抄録提出済)

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

I. 引用文献

Bertrand ME, Rupprecht HJ, Urban P, and Gershlick AH for the CLASSICS Investigators (2000) Double-blind study of the safety of clopidogrel with and without a

loading dose in combination with aspirin compared with ticlopidine in combination with aspirin after coronary stenting : the clopidogrel aspirin stent international cooperative study (CLASSICS). *Circulation* **102**:624-629.

Bellosta S, Paoletti R, and Corsini A (2004) Safety of Statins: Focus on Clinical Pharmacokinetics and Drug Interactions. *Circulation* **109**:50-57.

Boissonnat P, de Lorgeril M, Perroux V, Salen P, Batt AM, Barthelemy JC, Brouard R, Serres E, and Delaye J (1997) A drug interaction study between ticlopidine and cyclosporin in heart transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol* **53**:39-45.

Caplain H, Donat F, Gaud C, and Necciari J (1999) Pharmacokinetics of clopidogrel. *Semin Thromb Hemost* **25**:25-8.

Dain JG, Fu E, Gorski J, Nicoletti J, and Scallen TJ (1993) Biotransformation of fluvastatin sodium in humans. *Drug Metab Dispos* **21**:567-572.

Dalvie DK and O'Connell TN (2004) Characterization of novel dihydrothienopyridinium and thienopyridinium metabolites of ticlopidine in vitro: role of peroxidases, cytochromes p450, and monoamine oxidases. *Drug Metab Dispos* **32**:49-57.

Donahue SR, Flockhart DA, Abernethy DR, and Ko JW (1997) Ticlopidine inhibition of phenytoin metabolism mediated by potent inhibition of CYP2C19. *Clin Pharmacol Ther* **62**:572-577.

エリミンインタビューフォーム (2007) 大日本住友製薬株式会社 1-16.

Fischer V, Johanson L, Heitz F, Tullman R, Graham E, Baldeck JP, and Robinson WT (1999) The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor fluvastatin: effect on human cytochrome P-450 and implications for metabolic drug interactions. *Drug Metab Dispos* **27**:410-416.

Fujino H, Yamada I, Kojima J, Hirano M, Matsumoto H, and Yoneda M (1999) Studies on the metabolic fate of NK-104, a new inhibitor of HMG-CoA reductase (5): In vitro metabolism and plasma protein binding in animals and human. *薬物動態* **14**:415-424.

Fukazawa H, Ichishita H, Honda M, and Shimazu H (1978) Pharmacokinetics studies of flunitrazepam in healthy male Japanese subjects. *臨床薬理* **9**:251-265

Gidal BE, Sorkness CA, McGill KA, Larson R, and Levine RR (1995) Evaluation of a potential enantioselective interaction between ticlopidine and warfarin in chronically anticoagulated patients. *Ther Drug Monit* **17**:33-38.

Guengerich FP (1995) Human cytochrome P-450 enzymes, in *Cytochrome P-450* (PR Ortiz de Montellano ed) pp. 473-535, New York Plenum, New York.

Guengerich FP and MacDonald JS (2007) Applying mechanisms of chemical toxicity to predict drug safety. *Chem Res Toxicol* **20**:344-369.

Hesse LM, Venkatakrisnan K, von Moltke LL, Shader RI, and Greenblatt DJ (2001) CYP3A4 is the major CYP isoform mediating the in vitro hydroxylation and demethylation of flunitrazepam. *Drug Metab Dispos* **29**:133-140.

Kalgutkar AS, Henne KR, Lame ME, Vaz AD, Collin C, Soglia JR, Zhao SX, and Hop CE (2005) Metabolic activation of the nontricyclic antidepressant trazodone to electrophilic quinone-imine and epoxide intermediates in human liver microsomes and recombinant P4503A4. *Chem Biol Interact* **155**:10-20.

Kangas L, Kanto J, and Syvälahti E (1977) Plasma nitrazepam concentrations after an acute intake and their correlation to sedation and serum growth hormone levels. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* **41**:65-73.

Kang P, Dalvie D, Smith E, Zhou S, and Deese A (2007) Identification of a novel glutathione conjugate of flutamide in incubations with human liver microsomes.

Drug Metab Dispos **35**:1081-1088.

Kaplowits N (2001) Drug-induced liver disorders: implications for drug development and regulation. *Drug Saf* **24**:483-490.

加藤隆一、鎌滝哲也 (2000) 薬物代謝学 医療薬学・毒性学の基礎として 第2版. 東京化学同人, 東京 171-172.

Kilicarslan T, Haining RL, Rettie AE, Busto U, Tyndale RF, and Sellers EM (2001) Flunitrazepam metabolism by cytochrome P450s 2C19 and 3A4. *Drug Metab Dispos* **29**:460-465.

Kubota T, Fujisaki K, Itoh Y, Yano T, Sendo T, and Oishi R (2004) Apoptotic injury in cultured human hepatocytes induced by HMG-CoA reductase inhibitors. *Biochem Pharmacol* **67**:2175-2186.

Masubuchi Y (2006) Metabolic and non-metabolic factors determining troglitazone hepatotoxicity: a review. *Drug Metab Pharmacokinet* **21**:347-356.

Moussa I, Oetgen M, Roubin G, Colombo A, Wang X, Iyer S, Maida R, Collins M, Kreps E, and Moses JW (1999) Effectiveness of clopidogrel and aspirin versus ticlopidine and aspirin in preventing stent thrombosis after coronary stent implantation. *Circulation* **99**:2364-2366.

ネルボンインタビューフォーム (2007)

第一三共株式会社 1-51.

パナルジンインタビューフォーム (2007)
第一三共株式会社 1-62.

Park BK, Kitteringham NR, Maggs JL,
Pirmohamed M, and Williams DP (2005)
The role of metabolic activation in
drug-induced hepatotoxicity. *Annu Rev
Pharmacol Toxicol* **45**:177-202.

Peng FC, Chaing HH, Tang SH, Chen PC,
and Lu SC (2004) NADPH-cytochrome
P-450 reductase is involved in flunitrazepam
reductive metabolism in Hep G2 and Hep 3B
cells. *J Toxicol Environ Health A*
67:109-124.

プラビックスインタビューフォーム
(2006) サノフィ・アベンティス株式会社
1-61.

Prueksaritanont T, Gorham LM, Ma B, Liu L,
Yu X, Zhao JJ, Slaughter DE, Arison BH,
and Vyas KP (1997) *In vitro* metabolism of
simvastatin in humans [SBT] identification of
metabolizing enzymes and effect of the drug
on hepatic P450s. *Drug Metab Dispos*
25:1191-1199.

Rieder J (1973) Plasma levels and derived
pharmacokinetic characteristics of unchanged
nitrazepam in man. *Arzneimittelforschung*
23:212-218.

Riley RJ, Maggs JL, Lambert C,

Kitteringham NR, and Park BK (1988) An *in
vitro* study of the microsomal metabolism
and cellular toxicity of phenytoin, sorbinil
and mianserin. *Br J Clin Pharmacol*
26:577-588.

Samuel K, Yin W, Stearns RA, Tang YS,
Chaudhary AG, Jewell JP, Lanza T Jr, Lin
LS, Hagmann WK, Evans DC, and Kumar S
(2003) Addressing the metabolic activation
potential of new leads in drug discovery: a
case study using ion trap mass spectrometry
and tritium labeling techniques. *J Mass
Spectrom* **38**:211-221.

Savi P, Combalbert J, Gaich C, Rouchon MC,
Maffrand JP, Berger Y, and Herbert JM
(1994) The antiaggregating activity of
clopidogrel is due to a metabolic activation
by the hepatic cytochrome P450-1A. *Thromb
Haemost* **72**:313-317.

Schwartz MA, Koechlin BA, Postma E,
Palmer S, and Krol G (1965) Metabolism of
diazepam in rat, dog, and man. *J Pharmacol
Exp Ther.* **149**:423-435.

Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y,
and Guengerich FP (1994) Interindividual
variations in human liver cytochrome P-450
enzymes involved in the oxidation of drugs,
carcinogens and toxic chemicals: studies with
liver microsomes of 30 Japanese and 30
Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther*
270:414-423.

サイレースインタビューフォーム (2005)
エーザイ株式会社 1-31.

Vignati L, Turlizzi E, Monaci S, Grossi P, Kanter R, and Monshouwer M (2005) An *in vitro* approach to detect metabolite toxicity due to CYP3A4-dependent bioactivation of xenobiotics. *Toxicology* **216**:154-167.

Utrecht JP (1999) New concepts in immunology relevant to idiosyncratic drug reactions: the "danger hypothesis" and innate immune system. *Chem Res Toxicol* **12**:387-395.

Wang RW, Kari PH, Lu AY, Thomas PE, Guengerich FP, and Vyas KP (1991) Biotransformation of lovastatin. IV. Identification of cytochrome P450 3A proteins as the major enzymes responsible for the oxidative metabolism of lovastatin in rat and human liver microsomes. *Arch Biochem*

Biophys **290**:355-361.

Yamamoto Y, Yamazaki H, Ikeda T, Watanabe T, Iwabuchi H, Nakajima M, and Yokoi T (2002) Formation of a novel quinone epoxide metabolite of troglitazone with cytotoxicity to HepG2 cells. *Drug Metab Dispos* **30**:155-160.

Yoneda K, Iwamura R, Kishi H, Mizukami Y, Mogami K, and Kobayashi S (2004) Identification of the active metabolite of ticlopidine from rat *in vitro* metabolites. *Br J Pharmacol* **142**:551-557.

Zimmerman HJ (1999) Drug-induced liver disease. in *Hepatotoxicity: the adverse effects of drugs other chemicals on the liver*. 2nd ed. pp. 427-456, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.