
トピックス

メナジオンは第Ⅱ相薬物代謝酵素群により解毒代謝される**Phase II drug-metabolizing enzymes catalyze menadione detoxification****1. ビタミンKの変換反応**

キノン骨格は2つの酸素原子がカルボニル基としてベンゼン環に結合している、自然界に広く分布する構造である。キノン骨格は動物や植物、菌類に多く認められ、光合成や細胞呼吸などの生物学的に重要な機能を有している。脂溶性ビタミンであるビタミンKはナフトキノン骨格を基本構造とし、3位に結合する側鎖の違いにより同族体に分類される¹⁾。天然には、緑黄色野菜などの植物に含まれるビタミンK₁ (phyloquinone: PK) や腸内細菌や発酵食品由来のビタミンK₂ (menaquinone: MK-n) が存在し、ヒトが食事から摂取するビタミンKの90%以上はPKである¹⁾。ビタミンKのナフトキノン骨格のみを有する合成品であるビタミンK₃ (menadione: MD) は、生体内で抗炎症性、抗腫瘍性、抗マラリア性などを発揮することが認められている²⁾。その一方で、MDは両親媒性を有することや分子量が小さいことなどから生体内を自由に拡散し、副作用として細胞毒性をもたらすことが示されている³⁾。

哺乳類においてMDは、PKが活性型ビタミンKであるMK-4へと変換される際の間体として生成することが示唆されている⁴⁾。摂取されたPKは吸収部位である小腸において側鎖が切断され、約5-20%がMDとして遊離されると考えられる⁴⁾⁵⁾。ビタミンKは腸間膜静脈から門脈を経由して、またはリポタンパク質を介してリンパ管経由で吸収されて全身に供給され⁶⁾、各組織に発現するUbiA prenyltransferase domain-containing protein 1 (UBIAD1)によりMK-4へと変換される⁷⁾。PK摂取により生成するMD由来の毒性は、報告されていないため、MK-4に変換されないMDは抱合による解毒代謝されることが考えられる。

そこで、MDによる細胞毒性の発生原理および生体内における4種類のMD解毒反応に関してそれぞれ概説する。

2. メナジオン(MD)とQuinone oxidoreductase

MDによる細胞毒性は、MDに対する生体分子のアリール化によるものとレドックスサイクルによる活性酸素種(ROS)の生成に大別される⁸⁾。MDのアリール化では、MDは細胞内求核剤と結合し、抗酸化物質である還元型グルタチオンの枯渇やシステイン残基を含むタンパク質の失活を引き起こすことで細胞毒性を誘導する⁹⁾¹⁰⁾。

また、レドックスサイクルにおいて、MDは小胞体に局在するcytochrome P450 reductase (POR)によって1電子還元を受け、semiquinone (SQ)へと変換される¹⁰⁾。SQは、その反応性の高さから体内の酸素と反応し、自動酸化される過程でROSのスーパーオキシドを発生させ、細胞毒性を引き起こす¹¹⁾。これまでの報告から、MDの還元反応にはPORの他にNAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO1)、N-ribosyldihydronicotinamide: quinone reductase 2 (NQO2)の2つが関与する⁸⁾¹²⁾¹³⁾。

NQO1はNAD(P)H、NQO2はN-ribosyldihydronicotinamideをそれぞれ補酵素として、MDを2電子還元し、hydroquinone体のmenadiol (MDOH)を生成する⁸⁾(図1)。Thorらは、MD処理したラット肝細胞において、NQO1阻害剤のdicoumarolを処理するPORによるスーパーオキシド産生が増加し、細胞死が誘導されることを報告した¹¹⁾。また、Radjendiraneらによって、NQO1ノックアウトマウスにMDを経口投与すると、血液中のalanine aminotransferase (ALT)濃度が野生型マウスと比較して上昇することが報告され、MDによって肝細胞の細胞死が引き起こされることが明らかとなった¹³⁾。これらの結果より、NQO1はMDをMDOHへと変換することで細胞を保護する解毒酵素であることが示唆された¹⁴⁾¹⁵⁾。

NQO1によるMDの解毒の報告に対してNQO2による解毒の報告はされていない。そのため、NQO1またはNQO2、さらにはビタミンK還元酵素であるvitamin K reductase、ferroptosis suppressor protein-1以外の代謝

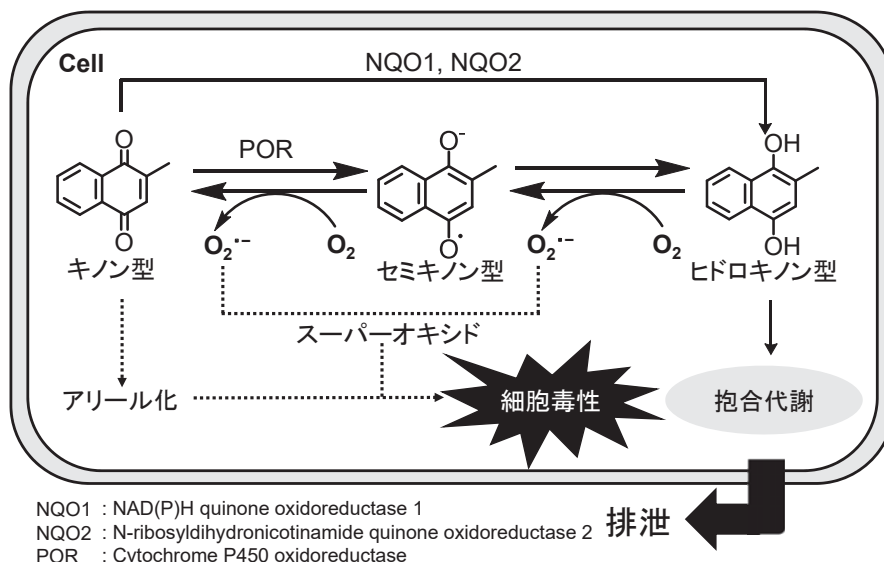


図1 細胞内におけるMDのレドックスサイクル

酵素が関与する可能性が考えられた。

ヒトやラットの胆汁や尿中ではMDの抱合体代謝物が検出されていることから、生体内で生成されたMDは第I相代謝に引き続き、第II相代謝において抱合されることにより解毒代謝される可能性が示唆されている^{4) 16)~18)}。そこで次に、抱合体酵素によるMDの解毒代謝について詳細に説明する。

3. グルクロン酸転移酵素 (UGT) によるMDの抱合反応

ヒトにおける代表的な第II相薬物代謝反応はグルクロン酸抱合である。MDのグルクロン酸抱合は、UDP-glucuronosyltransferase (UGT) が小腸、肝臓においてUDP-glucuronic acid (UDPGA) を補酵素として、基質であるMDOHにグルクロン酸を転移する反応である。

ヒトUGTには19のアイソフォームがあり、UGT 1A6, 1A7, 1A8, 1A9, および1A10がMDOHのグルクロン酸抱合活性をもつ。中でも、ヒト肝臓、小腸のミクロソーム画分を用いた検討において、UGT 1A6および1A10はそれぞれ高い活性を示すことが知られており、UGTの発現量は肝臓でもっとも高い¹⁹⁾。

NishiyamaらはUGTによるMDOHの抱合反応が解毒経路に關与するかヒト胎児腎細胞(HEK293)を用いて検討した²⁰⁾。その結果、野生株と比較しNQO1発現株では有意にROS発生量が増加し細胞生存率が低下したが、NQO1とUGTの共発現株ではMDに対する耐性が示された。また、NQO1活性をdoxycycline (DOX)により抑制した場合には野生株と同様に細胞

生存率が低下した。さらに、細胞外培地の代謝物を測定すると、NQO1とUGTの共発現株でのみグルクロン酸抱合体が検出され、経時的に排出量が増加した。

Chhourらは、2電子還元酵素であるNQO2とUDP-グルクロン酸転移酵素(UGT1A6)の両方を発現する神経芽腫細胞株を作製し、両酵素の共発現がMD毒性に及ぼす影響を評価した²¹⁾。その結果、NQO2の過剰発現株は、野生株と比較し、ROSの有意な増加が確認された。一方、NQO2およびUGT1A6の共発現株では、UGT1A6およびNQO2それぞれの発現株と比較して、ROSの産生は有意に減少した。このことから、ROS発生量の増加は、NQO2酵素還元によるMDOHの再酸化に起因することが考えられる。UGT1A6によるMDの解毒代謝は、NQO2存在下によって促進されることが明らかとなった²¹⁾。ChhourらとNishiyamaらによる報告により、解毒経路はNQO1およびNQO2によるMDの2電子還元と、その後続くUGTによるMDOHのグルクロン酸抱合であることが示唆された。

Lositoらは、ラット胆汁において、Hydrochloric Acidと β -glucuronidaseによる加水分解を受けるグルクロン酸抱合体を検出した¹⁶⁾。また、グルクロン酸抱合体は肝臓から回収された血液中には検出されず、胆汁排泄後の尿中では検出された¹⁶⁾。これらのことから、胆汁排泄を介してグルクロン酸抱合されたMDの一部は腸肝循環に入り、最終的に小腸のリンパ管から吸収され、血液循環に入った後に尿中へ排泄されることで解毒代謝されることが考えられる。ヒトにおける詳細なグルクロン酸抱合体の代謝機構は明らかでないが、脱抱合

処理である硫酸・ニクロム酸塩化合物処理後のヒト尿中において遊離型 MD が検出されており、実際に MD のグルクロン酸抱合体が尿中排泄されることが示唆されている⁴⁾¹⁷⁾。

4. 硫酸転移酵素 (SULT) による MD の抱合反応

MD の第Ⅱ相代謝物としては、グルクロン酸抱合体の他に、硫酸抱合体が挙げられる¹⁸⁾。硫酸抱合は、生体外異物や内因性化合物に対して sulfotransferase (SULT) が、3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) から水酸基またはアミノ基を含む基質化合物に硫酸基を転移する抱合反応である。硫酸基は通常の細胞条件下では負電荷を帯びており、他の分子からの水素結合を受け入れる酸素原子に富んでいる。これにより硫酸抱合後の分子は水溶性が上がり、疎水性の毒性分子を容易に細胞外あるいは生体外へと排泄する。

ヒトには4種類の SULT 遺伝子ファミリーに分類される15種類の SULT 遺伝子が存在する²²⁾。薬物、神経伝達物質、甲状腺ホルモンの水酸基に対しては10種類の SULT1 ファミリーが、男性ホルモン、女性ホルモンなどのステロイド骨格の水酸基に対しては3種類の SULT2 ファミリーが硫酸基を抱合する。また、SULT1 および SULT2 ファミリーに含まれない SULT6B1 と SULT4A1 が存在し、それぞれ硫酸転移酵素活性を持つことが示唆されている。以上のことから、MD は MDOH に還元後、PAPS を補酵素として硫酸抱合されることが示唆されている。

Losito らは、ラット肝臓からの灌流液から arylsulfatase による分解を受ける MD 代謝物の検出を報告しており、硫酸抱合体の存在が示唆されている¹⁶⁾。また、ラット尿中において、硫酸抱合体は経口投与と比較し門脈に投与した場合により多く検出されたため、硫酸抱合の主要組織は肝臓であると思われる¹⁶⁾。しかし、尿中排泄された硫酸抱合体量はグルクロン酸抱合体量と比較して少なかったため、ラット肝臓では硫酸抱合よりもグルクロン酸抱合活性が優位であると考えられる。

SULT1 ファミリーは、ヒト体内において様々な組織に発現している。そのため、ヒトにおいても他の抱合体代謝物と同様に、MD の硫酸抱合体が尿中排泄されることが示唆されている⁴⁾¹⁷⁾。

5. グルタチオン転移酵素 (GST) による MD の抱合反応

肝臓での抱合反応はグルクロン酸抱合、硫酸抱合の他にグルタチオン抱合がある^{23)~25)}。MD のグルタチオ

ン抱合は glutathione S-transferase (GST) により、還元型グルタチオン (Glutathione, GSH) が転移される反応である。GSH はグリシン・システイン・グルタミン酸からなるトリペプチドであり、システイン残基におけるチオール部位が求核性を有する。そのため、チオール部位に MD などの親電子性物質を結合する抱合反応の他、過酸化物質や ROS などを消去することで酸化ストレスから細胞を保護する役割を担う。GSH は ROS を還元すると、自らは酸化され酸化型グルタチオン (Glutathione-S-S-Glutathione, GSSG) となる⁹⁾²⁴⁾。

Loughlin らはラット肝細胞において、MD 添加濃度依存的にグルタチオン抱合体量が増加することを示した²⁴⁾。また、細胞内の MD が増加すると GSSG よりもグルタチオン抱合体が優先的に生成され、GST が MD の解毒代謝を担う可能性が示唆された。MD のグルタチオン抱合体はラット血中で報告されている一方で、尿中での報告はされていない。また、Haenen らはグルタチオン抱合体が尿細管上皮細胞の刷子縁膜を通過せず、細胞内に取り込まれないことを報告している²⁶⁾。これらのことから、グルタチオン抱合体は血中から尿細管へ取り込まれる際に代謝反応を受ける可能性が考えられた。

Redegeld らは、腎臓におけるグルタチオン抱合体代謝経路を調べるため、ラット腎臓の灌流実験を行った²⁷⁾。その結果、グルタチオン抱合体を灌流液に添加すると腎臓から急速に消失した。一方、細胞膜の外側に存在し GSH をグリシン・システインとグルタミン酸に加水分解する γ -glutamyl cysteine transpeptidase (γ -GT) の阻害剤である acivicin を灌流液に添加したところ、グルタチオン抱合体のクリアランス (除去速度) が低下した。また、近位尿細管細胞の側底部吸収経路を阻害し、腎臓からの排出を抑制する probenecid を acivicin とともに加えることで、抱合体のクリアランスはさらに低下した。

これらの結果より、腎臓におけるグルタチオン抱合体の代謝は、側底膜における probenecid 感受性の organic anion transporter (OAT) を介した取り込みと、刷子縁膜に発現する γ -GT による代謝が重要であることが明らかとなった。

6. N-アセチル転移酵素 (NAT) による MD の抱合反応

主に肝臓で合成されたグルタチオン抱合体は血中では検出される一方で尿中では検出されず、ラット尿中には N-アセチルシステイン抱合体 (メルカプトール酸) が検出される²⁸⁾²⁹⁾。N-アセチルシステイン抱合体は、

グルタチオン抱合体が γ -GT, dipeptidase, *N*-acetyl transferase (NAT) により順番に変換反応を受け生成した代謝物であり, 一般的に尿中に排泄される. Losito らは, ラット尿中において β -glucuronidase, arylsulfatase のいずれの処理においても分解されない代謝物を報告しており, これらは加水分解処理により分解されない MD の *N*-アセチルシステイン抱合体である可能性が示唆された¹⁷⁾.

Micheletti らは, *N*-アセチルシステイン抱合体が, 初代皮膚繊維芽細胞の HDFa と比較して, HeLa, SH-SY5Y, SaOS2, U2OS, などの悪性細胞株に対して細胞毒性を示すことを報告している³⁰⁾. また, Katikireddy らは, *N*-アセチルシステイン抱合体を添加した正常な不死化角膜内皮細胞 (HCEnc-21T) では, MD のみを添加した細胞と比較して, 細胞死や細胞内 ROS 産生の有意な減少を報告している³¹⁾. これらの報告は, 不明瞭であった生体内における *N*-アセチルシステイン抱合体の生理作用を示唆する結果と言える.

7. おわりに

ビタミン K 中間体である MD の解毒代謝は主に抱合

反応によることが明らかとなった. 小腸において遊離した MD はその大部分がグルクロン酸抱合を受け, 毛細リンパ管から胸管へと入り全身へ移行すると考えられる¹⁶⁾. また, 小腸で抱合されなかった MD や硫酸抱合体の一部は門脈へ入り, 肝臓で硫酸抱合またはグルタチオン抱合を受ける²⁴⁾. その後下大静脈から心臓へと入り全身へ移行し, 一部は胆汁中へ排泄される. 肝臓, 腎臓で毒性を示すグルタチオン抱合体は生成後に変換反応を受け *N*-アセチルシステイン抱合体となり硫酸抱合体, グルクロン酸抱合体と共に尿中へ排出される (図 2). Thijssen らは, ヒトにおいて, PK, MK-4 の経口摂取後, 硫酸・ニクロム酸塩化合物処理により遊離する尿中の MD 排泄量が大幅に増加することを報告している⁴⁾. この効果は摂取後 1~2 時間以内に増加し, 約 3 時間でピークに達した. 尿中硫酸抱合体とグルクロン酸抱合体の排泄量がビタミン K 摂取量を反映する可能性が示唆された¹⁶⁾. また, Shearer らは, ヒトにおいて尿中の MD 排泄量と血中の PK 量が同様の挙動を示すことから, MD 抱合体排泄量は体内ビタミン K 量を反映する指標となる可能性が示唆された⁴⁾³²⁾.

今後, MD 抱合体排泄量と体内ビタミン K 量との関

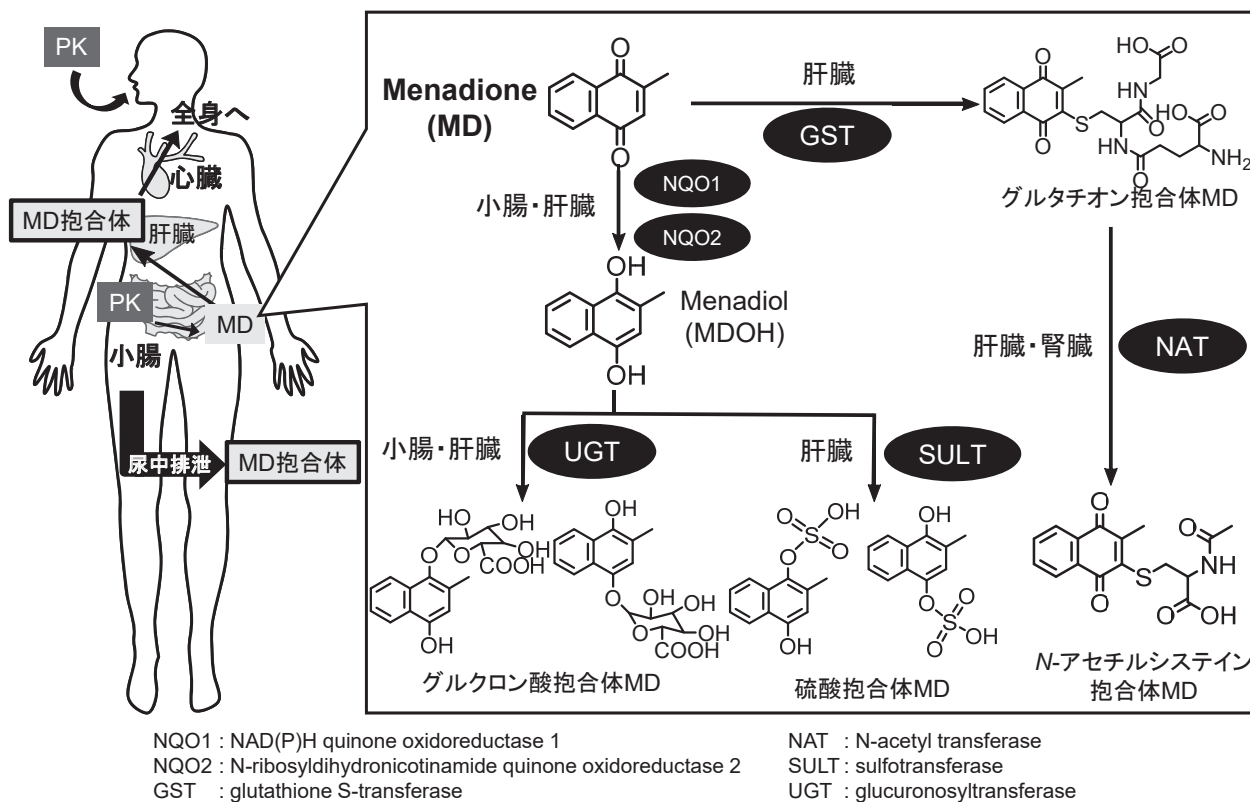


図 2 予想される MD の抱合代謝

連が明らかになることで、ビタミンK摂取から排泄までの代謝機構のさらなる解明につながる事が期待される。

Key words :Vitamin K, menadione, toxicity, conjugate, metabolism

¹Systems Engineering and Science, Graduate School of Engineering and Science, Shibaura Institute of Technology, Japan

²College of Systems Engineering and Science, Department of Bioscience and Engineering, Shibaura Institute of Technology, Japan

³Department of Urology, Jichi Medical University Saitama Medical Center, Japan

⁴Extension Center, Kobe Pharmaceutical University, Japan

⁵Faculty of Engineering, Department of Biotechnology, Toyama Prefectural University, Japan

Shintaro Tagami¹, Satoshi Asano¹, Kurumi Nakagawa², Ryo Tomioka², Kohei Murata¹, Masashi Oshima^{1,3}, Maya Kamao⁴, Miyu Nishikawa⁵, Shinichi Ikushiro⁵, Yoshihisa Hirota^{1,2}

¹ 芝浦工業大学大学院 理工学研究科 システム理工学専攻 創薬科学研究

² 芝浦工業大学 システム理工学部 生命科学科 創薬科学研究

³ 自治医科大学附属さいたま医療センター泌尿器科

⁴ 神戸薬科大学 薬学部 エクステンションセンター

⁵ 富山県立大学 工学部 生物工学科

田上 晋太郎¹, 浅野 公志¹, 中川 胡桃², 富岡 涼², 村田 昂平¹, 大島 将^{1,3}, 鎌尾 まや⁴, 西川 美宇⁵, 生城 真一⁵, 廣田 佳久^{1,2}

利益相反自己申告: 申告すべきものなし

(2023.7.28 受付)

文 献

1) Shearer MJ, (1995) Vitamin K. *Lancet* **345**, 229–34

2) Holger B, Karin F, Andres W, Sebastian K, Susan L, Vanessa Y, Herve V, Bruce P, R Heiner S, Elisabeth DC, (2006) A Fluoro Analogue of the Menadione Derivative 6-[2'-(3'-methyl)-1',4'-

naphthoquinoly] hexanoic Acid Is a Suicide Substrate of Glutathione Reductase. Crystal Structure of the Alkylated Human Enzyme. *J Am Chem Soc* **128**, 10784–10794

3) Chung JH, Seo DC, Chung SH, Lee JY, Seung SA, (1997) Metabolism and Cytotoxicity of Menadione and Its Metabolite in Rat Platelets. *Toxicol Appl Pharmacol* **142**, 378–385

4) Thijssen HH, Vervoort LM, Schurgers LJ, Shearer MJ, (2006) Menadione is a metabolite of oral vitamin K. *Br J Nutr* **95**, 260–266

5) Hirota Y, Tsugawa N, Nakagawa K, Suhara Y, Tanaka K, Uchino Y, Takeuchi A, Sawada N, Kamao M, Wada A, Okitsu T, Okano T, (2013) Menadione (vitamin K₃) is a catabolic product of oral phyloquinone (vitamin K₁) in the intestine and a circulating precursor of tissue menaquinone-4 (vitamin K₂) in rats. *J Biol Chem* **288**, 33071–33080

6) Takada T, Yamanashi Y, Konishi K, Yamamoto T, Toyoda Y, Masuo Y, Yamamoto H, Suzuki H, (2015) NPC1L1 is a key regulator of intestinal vitamin K absorption and a modulator of warfarin therapy. *Sci Transl Med* **7**, 275ra23

7) Nakagawa K, Hirota Y, Sawada N, Yuge N, Watanabe M, Uchino Y, Okuda N, Shimomura Y, Suhara Y, Okano T, (2010) Identification of UBIAD1 as a novel human menaquinone-4 biosynthetic enzyme. *Nature* **468**, 117–121

8) David R, Jadwiga KK, Shannon LW, Howard DB, Adli A, David S, (2000) NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms. *Chem Biol Interact* **129**, 77–97

9) Di Monte D, Ross D, Bellomo G, Eklow L, Orrenius S, (1984) Alterations in intracellular thiol homeostasis during the metabolism of menadione by isolated rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys* **235**, 334–342

10) Chung SH, Chung SM, Lee JY, Kim SR, Park KS, Chung JH, (1999) The biological significance of non-enzymatic reaction of menadione with plasma thiols: enhancement of menadione-induced cytotoxicity to platelets by the presence of blood plasma. *FEBS Lett* **449**, 235–40

11) Thor H, Smith MT, Hartzell P, Bellomo G, Jewell SA, Orrenius S, (1982) The Metabolism of Menadione(2-Methyl-1,4-naphthoquinone) by Isolated Hepatocyte. *J Biol Chem* **257**, 12419–12425

12) Ohnuma T, Komatsu T, Nakayama S, Nishiyama T, Ogura K, Hiratsuka A, (2009) Induction of antioxidant and phase 2 drug-metabolizing enzymes by falcariindiol isolated from *Notopterygium incisum* extract, which activates the Nrf2/ARE pathway, leads to cytoprotection against oxidative and electrophilic stress. *Arch Biochem Biophys* **488**, 34–41

13) Claudia MC, Namphuong T, Richard K, Anil KJ, (2006) NRH: quinone oxidoreductase 2 (NQO2) catalyzes metabolic activation of quinones and anti-tumor drugs. *Biochem Pharmacol* **72**, 366–76

14) Oldenburg J, Marinova M, Muller RC, Watzka M, (2008) The

- vitamin K cycle. *Vitam Horm* **78**, 35–62
- 15) Mishima E, Ito J, Wu Z, Nakamura T, Wahida A, Doll S, Tonnu W, Nepachalovich P, Eggenhofer E, Aldrovandi M, Henkelmann B, Yamada KI, Wanninger J, Zilka O, Sato E, Feederle R, Hass D, Maida A, Mourão ASO, Linkermann A, Geissler EK, Nakagawa K, Abe T, Fedorova M, Proneth B, Pratt DA, Conrad M, (2022) A non-canonical vitamin K cycle is a potent ferroptosis suppressor. *Nature* **608**, 778–783
 - 16) Losito R, Owen CA J, Flock EV, (1967) Metabolism of [¹⁴C] Menadione. *Biochemistry* **6**, 62–68
 - 17) Al Rajabi A, Peterson J, Choi SW, Suttie J, Barakat S, Booth SL, (2010) Measurement of menadione in urine by HPLC. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **878**, 2457–2460
 - 18) Hoskin FC, Spinks JW, Jaques LB, (1954) Urinary excretion products of menadione (Vitamin K₃). *Can J BioChem. Physiol* **32**, 240–50
 - 19) Nishiyama T, Ohnuma T, Inoue Y, Kishi T, Ogura K, Hiratsuka A, (2008) UDP-glucuronosyltransferases 1A6 and 1A10 catalyze reduced menadione glucuronidation. *Biochem Biophys Res Commun* **371**, 247–250
 - 20) Nishiyama T, Izawa T, Usami M, Ohnuma T, Ogura K, Hiratsuka A, (2010) Cooperation of NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 and UDP-glucuronosyltransferases reduces menadione cytotoxicity in HEK293 cells. *Arch Biochem Biophys Res Commun* **394**, 459–463
 - 21) Chhour M, Perio P, Gayon R, Ternet-Fontebasso H, Ferry G, Nepveu F, Boutin JA, Sudor J, Reybier K, (2021) Association of NQO2 With UDP-Glucuronosyltransferases Reduces Menadione Toxicity in Neuroblastoma Cells. *Front Pharmacol* **12**, e660641
 - 22) Suiko M, Kurogi K, Hashiguchi T, Sakakibara Y, Liu MC, (2017) Updated perspectives on the cytosolic sulfotransferases (SULTs) and SULT-mediated sulfation. *Biosci Biotechnol Biochem* **81**, 63–72
 - 23) Takahashi N, Schreiber J, Fischer V, Mason RP, (1987) Formation of Glutathione-Conjugated Semiquinones by the Reaction of Quinones with Glutathione: An ESR Study. *Arch Biochem Biophys* **252**, 41–48
 - 24) Loughlin AF, Skiles GL, Alberts DW, Schaefer WH, (2001) An ion exchange liquid chromatography/mass spectrometry method for the determination of reduced and oxidized glutathione and glutathione conjugates in hepatocytes. *J Pharm Biomed Anal* **26**, 131–142
 - 25) Fulop K, Jiang Q, Wetering KV, Pomozi V, Szabo PT, Aranyi T, Sarkadi B, Borst P, Uitto J, (2011) ABCC6 does not transport vitamin K₃-glutathione conjugate from the liver: Relevance to pathomechanisms of pseudoxanthoma elasticum. *Biochem Biophys Res Commun* **415**, 468–471
 - 26) Haenen HE, Spenkelink A, Teunissen C, Temmink JH, Koeman JH, van Bladeren PJ, (1996) Transport and metabolism of glutathione conjugates menadione and ethacrynic acid in confluent monolayers of rat renal proximal tubular cells. *Toxicology* **112**, 117–130
 - 27) Redegeld FA, Hofman GA, van de Loo PG, Koster AS, Noordhoek J, (1991) Nephrotoxicity of the glutathione conjugate of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) in the isolated perfused rat kidney. Role of metabolism by gamma-glutamyltranspeptidase and probenecid-sensitive transport. *J Pharmacol Exp Ther* **256**, 665–669
 - 28) Elgawish MS, Shimomai C, Kishikawa N, Ohyama K, Wada M, Kuroda N, (2011) Development and Validation of the First Assay Method Coupling Liquid Chromatography with Chemiluminescence for the Simultaneous Determination of Menadione and Its Thioether Conjugates in Rat Plasma. *Chem Res Toxicol* **16**, 1409–1417
 - 29) Jian W, Yao M, Zhang D, Zhu M, (2009) Rapid Detection and Characterization of in Vitro and Urinary N-Acetyl-L-cysteine Conjugates Using Quadrupole-Linear Ion Trap Mass Spectrometry and Polarity Switching. *Chem Res Toxicol* **22**, 1246–1255
 - 30) Micheletti G, Boga C, Zalambani C, Farruggia G, Esposito E, Fiori J, Rizzardi N, Taddei P, Foggia MD, Calonghi N, (2022) Synthesis of thia-Michael-Type Adducts between Naphthoquinones and N-Acetyl-L-Cysteine and Their Biological Activity. *Molecules* **27**, 5645–5660
 - 31) Katikireddy KR, White TL, Miyajima T, Vasanth S, Raof D, Chen Y, Price MO, Price FW, Jurkunas UV, (2018) NQO1 downregulation potentiates menadione-induced endothelial-mesenchymal transition during rosette formation in Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Free Radic Biol Med* **116**, 19–30
 - 32) Truong JT, Fu X, Saltzman E, Al Rajabi A, Dallal GE, Gundberg CM, Booth SL, (2012) Age group and sex do not influence responses of vitamin K biomarkers to changes in dietary vitamin K. *J Nutr* **142**, 936–941