

博士論文

副腎毒性評価における質量分析を用いた
血中ステロイド濃度一括測定の有用性

栃谷 智秋

目次

緒論.....	5
図 0-1) ヒト副腎におけるステロイドホルモン合成経路.....	7
第一章 ケトコナゾール投与ラットにおけるコルチコステロンおよびその前駆体の血中濃度変化.....	10
序.....	10
材料と方法.....	11
結果.....	14
考察.....	15
表 1-1. 実験スケジュール.....	18
表 1-2. ケトコナゾール投与後の体重および器官重量の変化.....	20
図 1-1. 対照群およびケトコナゾール投与ラットの副腎皮質.....	21
図 1-2. ケトコナゾール投与後の副腎皮質における Ki-67 陽性細胞数の変化.....	23
図 1-3. ケトコナゾール投与後の副腎におけるステロイド合成酵素の mRNA 発現レベルの変化.....	24
図 1-4. ケトコナゾール投与後のコルチコステロンおよびその前駆体の血漿中濃度の変化.....	25
第二章 副腎ステロイド合成に影響する各種薬物投与ラットにおけるコルチコステロンおよび前駆体の血中濃度変化.....	26
序.....	26
材料と方法.....	28
結果.....	31
考察.....	33
表 2-1. 本実験で用いた陽性対照薬物および用量.....	37
表 2-2. 実験スケジュール.....	38
表 2-3. 血液生化学.....	39
表 2-4. 体重および器官重量.....	40
表 2-5. 結果の要約.....	41
図 2-1. ラット副腎におけるステロイド合成経路.....	42
図 2-2. 媒体、TCP および AG 投与ラットの副腎皮質の病理組織像 (HE).....	43
図 2-3. 副腎束状帯/網状帯における空胞化の画像解析.....	44
図 2-4. コルチコステロンおよびその前駆体の血漿中濃度の変化.....	45
第三章 ケトコナゾール投与ラットの ACTH 投与下または非投与下におけるコルチコステロンおよびその前駆体の血中・副腎濃度の用量依存的・経時的变化.....	46

序.....	46
材料と方法.....	48
結果.....	52
考察.....	55
表 3-1. 実験 1 における群構成.....	58
表 3-2. 実験 1 における実験スケジュール.....	59
表 3-3. 実験 2 における群構成.....	60
表 3-4. 実験 2 における実験スケジュール.....	61
表 3-5. 器官重量.....	62
表 3-6. 副腎における病理組織学的変化.....	63
図 3-1. 副腎における病理組織像 (HE 染色)	64
図 3-2. 副腎束状帯/網状帯における空胞化.....	65
図 3-3. コルチコステロンおよびその前駆体の血中濃度.....	66
図 3-4. コルチコステロンおよびその前駆体の血中濃度.....	67
図 3-5. コルチコステロンおよびその前駆体の副腎中濃度	68
図 3-6. ステロイドの血中および副腎中濃度の相関.....	69
第四章 カニクイザルにおける副腎ステロイドおよびその前駆体の血中濃度の生理学的および薬物誘発性変動.....	70
序.....	70
材料と方法.....	72
結果.....	76
考察.....	79
表 4-1. 実験 2 における実験スケジュール.....	83
表 4-2. 実験 3 における実験スケジュール.....	84
表 4-3. 投与前およびケトコナゾール 7 日間反復投与後の血液生化学.....	85
表 4-4. カニクイザル、ラットおよびヒトにおける薬物誘発性の血中ステロイド濃度の変化.....	86
図 4-1. サルの副腎におけるステロイド合成経路.....	87
図 4-2. 雌雄のサルにおける血中ステロイド濃度の日内変化.....	88
図 4-3. 雌雄のサルにおける血中ステロイド濃度の日間変化.....	89
図 4-4. ケトコナゾール投与後および正常な雄サルにおける副腎の病理組織像.....	90
図 4-5. ケトコナゾールの単回または 7 日間反復投与後の雄サルにおける血中ステロイド濃度.....	91
図 4-6. メチラポンの単回投与後の雄サルにおける血中ステロイド濃度	92
総括.....	93
謝辞.....	98

参考文献99

緒論

薬物の研究開発は、規制の強化や競争の激化に伴い、期間は長期化し、費用は増加する一方で、新たに承認される薬物の数は停滞しており、生産性の低下が課題となっている。薬物候補の研究開発が中止される主な原因として、臨床試験における薬効の不足に加え、前臨床試験、臨床試験、市販後の各過程で同定される安全性上のリスクが挙げられる (Roberts *et al.*, 2014)。特に前臨床試験から初期臨床試験の段階では、安全性上のリスクが原因となって薬物の研究開発が中止される例が多く (Cook *et al.*, 2014)、対策が求められている。

薬物の非臨床安全性試験では、薬物がヒトに及ぼしうる安全性上のリスクを評価することを目的として、薬物の生体中の各器官・組織への機能的・形態学的な影響とその用量依存性を、ラット、マウスなどのげっ歯類や、サル、イヌなどの非げっ歯類を用いて評価する。評価指標としては、一般状態、体重、血液生化学的検査、臓器重量、病理組織学的検査などを用いる。薬物の影響が認められた場合、特にその毒性学的意義が否定できず、影響が発現する用量と薬効用量との乖離も小さい場合には、認められた影響の発現機序を究明し、ヒトへの外挿性を検討するとともに、鋭敏かつ特異性の高い安全性バイオマーカーの同定が必要となる。

安全性バイオマーカーは、臨床試験で薬物の影響を非侵襲的にモニターし、リスクを管理することを目的として、または非臨床試験で毒性を早期に検出し、より安全な薬物候補を効率的に探索することを目的として使用される。近年、分子生物学およびオミックス解析を含む解析技術の進歩により、新たな安全性バイオマーカーの同定が可能となっており、新しいより優れた安全性バイオマーカーは、薬物の研究開発の生産性を改善する上で重要な役割を果たすことが期待されている (Anadón *et al.*, 2019)。

非臨床安全性試験では、薬物の内分泌系への影響も評価される。内分泌系には、下垂体、甲状腺、上皮小体や膵内分泌腺のほか、副腎が含まれる。副腎は皮質と髄質に区別され、皮質はさらに組織学的に、外側から球状帯、束状帯、網状帯に区別される。皮質の各層では、レニン-アンジオテンシン系や血中カリウム濃度、下垂体から分泌される副腎皮質刺激ホルモン

(ACTH) の刺激を受けて、それぞれ鉱質コルチコイド、糖質コルチコイド、アンドロゲンを
含む副腎ステロイドホルモンが合成・分泌される。これらのステロイドホルモンは、電解質バ
ランス、糖代謝、脂質代謝の調整など、生命の維持に必要な役割を幅広く担っている。一方副
腎髄質は、主にクロム親和性細胞および神経節細胞からなり、皮質から分泌された糖質コルチ
コイド、および交感神経による刺激を受けて、エピネフリン、ノルエピネフリンなどのカテコ
ールアミンを合成・分泌する。カテコールアミンは、心拍数や血圧の増加、気管支の収縮、グ
リコーゲン分解等を引き起こす。

ヒトの副腎皮質におけるステロイドホルモンの合成経路を図 0-1 に示す。副腎皮質では、ス
テロイドホルモンの合成原料であるコレステロールが、エステル化された状態で脂肪滴とし
て、細胞質内に貯蔵されている。また、ミトコンドリアおよび滑面小胞体には、シトクロム
P450 (CYP) や脱水酸化酵素を含む複数のステロイド合成酵素が分布する。皮質の各層におい
て、コレステロールがこれらの酵素によって段階的に代謝されることで、最終産物として鉱質
コルチコイドであるアルドステロン、糖質コルチコイドであるコルチゾール、およびアンドロ
ゲンであるアンドロステンジオンが合成される。一方、ラットおよびマウスの副腎では、コル
チゾールおよびアンドロゲン (DHEA、アンドロステンジオン) の合成に必要な CYP17 が発現
しないため、主要な糖質コルチコイドとしてコルチコステロンが合成され、アンドロゲンは合
成されない (Inomata and Sasano, 2015)。合成されたステロイドホルモンの大部分は、細胞内に
貯蔵されることなく速やかに血中に分泌されることから、ステロイドホルモンの血中濃度は当
該のホルモンの合成速度を反映するとされる。

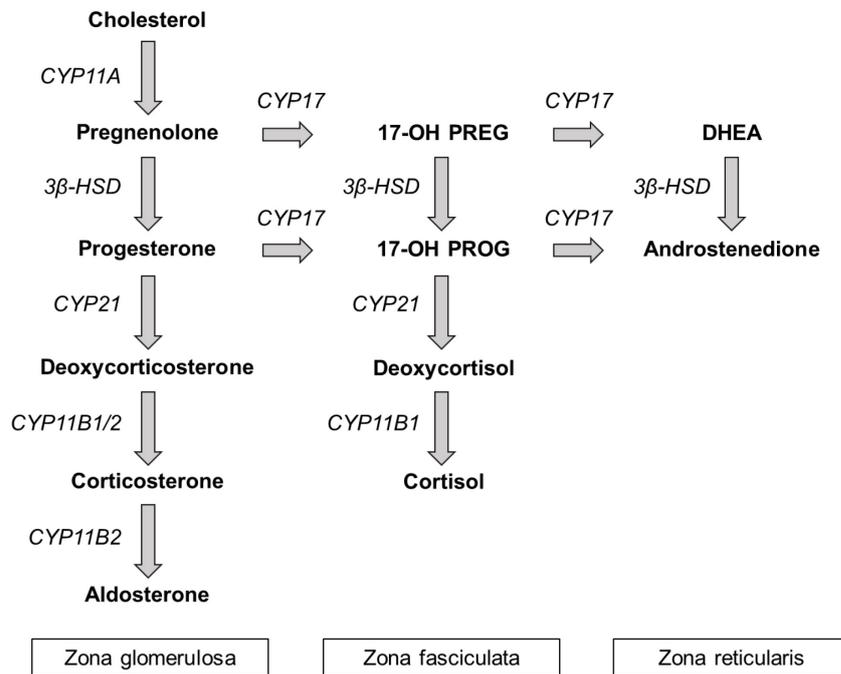


図 0-1) ヒト副腎におけるステロイドホルモン合成経路 (Rosol *et al.*, 2001)

CYP：シトクロム P450、HSD：ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ、17-OH PREG：17-ヒドロキシプレグネノロン、17-OH PROG：17-ヒドロキシプロゲステロン、DHEA：デヒドロエピアンドロステロン

副腎が腫瘍や感染症、自己免疫疾患などにより傷害された場合や、ステロイド合成酵素が先天的に欠損した場合、または下垂体からの ACTH 分泌が低下した場合などには、副腎皮質におけるステロイドホルモンの合成・分泌は低下し、副腎不全となる。副腎不全では、電解質バランスや糖代謝、脂質代謝の異常とともに、易疲労感、体重減少、消化器症状、血圧低下、低血糖などの症状が発現し、重度の場合には致死的となる (Charmandari *et al.*, 2014)。

また、副腎は内分泌系において、薬物による毒性の標的になりやすいとされており (Ribelin, 1984; Briggs *et al.*, 2015)、その原因として以下が考えられている (Harvey, 2016)。

- ・ 血流が豊富なため、薬物の曝露を受けやすい。
- ・ コレステロール、ステロイドが多量に存在するため、脂溶性薬物が分布しやすい。

- ・ 不飽和脂肪酸が多量に存在するため、脂質過酸化の影響を受けやすい。
- ・ CYP 酵素が多量に存在するため、薬物の代謝により毒性物質が生じる、または活性酸素が生じやすい。

副腎内では皮質、特に束状帯および網状帯が薬物の影響を受けやすく (Brändli-Baiocco *et al.*, 2018; Capen, 2007)、その主な機序はステロイド合成阻害によるものと考えられている (Harvey, 2016)。薬物による副腎皮質でのステロイド合成阻害は、ヒトでは致命的な影響を及ぼしうる。例として、抗痙攣薬として用いられていたアミノグルテチミド、および麻酔薬として用いられていたエトミデートは、副作用として副腎皮質におけるステロイド合成を阻害することで、副腎不全を誘発し、投与された患者が死亡したことが報告されている (Harvey, 2016)。

一方で、薬物の副腎ステロイド合成への影響は、性ステロイド合成への影響に比較して軽視されており、その評価法は限られ、特異性が高く鋭敏な手法が新たに求められている (Hinson and Raven, 2006)。*In vivo* における副腎ステロイド合成への影響の評価法の一つとして、実験動物では従来、コルチコステロンまたはコルチゾールの血中濃度の測定が実施されてきた (Inomata and Sasano, 2015)。しかし、コルチコステロンやコルチゾール単体の測定では、副腎におけるステロイド合成の変化を鋭敏に検出することは困難であり (Yarrington and Reindel, 1996)、また認められた変化の発現機序を推測することも困難であった。

ヒトでは、ステロイド合成酵素の欠損による先天性副腎疾患において、当該の欠損酵素によって代謝されるべきステロイド前駆体の血中濃度が増加することが知られており、これらの疾患の診断に、ステロイド前駆体の血中濃度の測定が実施されている (New, 2004)。ステロイド合成酵素が薬物によって阻害される場合でも、先天性副腎疾患と同様にステロイド前駆体の血中濃度が増加することが予想されるが、実験動物では、測定に用いる抗体の特異性や採取できる試料の量に限界があり、前駆体の測定はほとんど実施されていなかった。

ステロイドの測定には従来、放射免疫測定法 (RIA) や酵素免疫測定法 (ELISA) などの免疫

学的手法が用いられてきたが、これらの手法は、必要な試料量が多いこと、特異性が低いこと、放射性物質を使用することなどの欠点があった。近年では、ステロイドの測定に質量分析法が用いられる場合が増えてきている (Shackleton, 2010)。質量分析によるステロイド測定は、前駆体を含む複数のステロイドを、特異性高く、わずかな試料量で一括して測定することを可能とした (Kushnir *et al.*, 2010; Maeda *et al.*, 2013)。このことから、本測定法は、試料の量に限界がある実験動物においても、前駆体を含む複数のステロイドを特異性高く測定することで、薬物による副腎ステロイド合成への影響の評価に有用となる可能性が考えられた。

本研究では、この質量分析によるステロイド一括測定法の、薬物による副腎ステロイド合成への影響の評価、特に機序の究明および安全性バイオマーカー探索における有用性を検討することを目的として、種々の機序により副腎ステロイド合成に影響する薬物を、非臨床安全性試験で頻繁に用いられる動物種であるラットおよびサルに投与した後、前駆体を含むステロイドの血中濃度を一括測定し、血液生化学的検査や病理組織学的検査などの他の安全性評価指標と合わせて、薬物の影響を評価した。

第一章 ケトコナゾール投与ラットにおけるコルチコステロンおよびその前駆体の血中濃度変化

序

まず本章では、前駆体を含むステロイドの血中濃度の質量分析による一括測定が、非臨床安全性試験で用いる動物種でも可能であること、また薬物による副腎ステロイド合成への影響の評価における有用性を簡易的に検証することを目的として、副腎ステロイド合成に影響する陽性対照薬物一剤をラットに投与した後、ステロイドの血中濃度を一括測定した。

動物種としては、非臨床安全性試験でげっ歯類として最も頻繁に使用されるラットを選択した。性別は、性周期の影響が小さいと考えられる、雄を選択した。

ラットの副腎では、主要な糖質コルチコイドとしてコルチコステロンが、皮質の束状帯および網状帯で合成される。コルチコステロンは、まずコレステロールが CYP11A によってプレグネノロンに、次に HSD3B によってprogesteroneに、次いで CYP21 によってデオキシコルチコステロンに、最後に CYP11B1 によって代謝されることで合成される (Rosol *et al.*, 2001; Harvey and Sutcliffe, 2010)。また副腎内では、特に束状帯および網状帯が薬物の影響を受けやすく (Brändli-Baiocco *et al.*, 2018; Capen, 2007)、その主な機序はステロイド合成阻害によるものと考えられている (Harvey, 2016)。

これらのことから、陽性対照薬物としては、CYP 酵素を非特異的に阻害することで副腎ステロイド合成を阻害する (Johansson *et al.*, 2002)、ケトコナゾールを用いた。測定対象ステロイドは、ラットの束状帯および網状帯で合成される主要な糖質コルチコイドであるコルチコステロン、およびその前駆体であるプレグネノロン、progesteroneならびにデオキシコルチコステロンとした。さらに、ステロイドの血中濃度の変化との関連性を調べることを目的として、副腎における病理組織学的変化、およびステロイド合成酵素 (CYP11A1、CYP21、HSD3B1、HSD3B2、CYP11B1) の遺伝子発現変化を調べた。

材料と方法

薬物

ケトコナゾールは和光純薬工業（大阪、日本）から購入した。

動物

7週齢の雄のSprague-Dawley (CrI:CD)ラットを日本チャールス・リバー（神奈川、日本）から購入し、1週間の馴化期間を設けた。動物は、 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $55\pm 10\%$ 、各12時間の明期（8-20時）/暗期（20-8）周期に制御された飼育室で、ケージ当たり1匹または2匹ずつ飼育した。ラットには市販のペレット飼料（CRF-1、オリエンタル酵母工業、東京、日本）および水道水を自由に摂取させた。

動物実験

動物実験のスケジュールをTable 1-1に示す。

8週齢の雄ラットを、対照群とケトコナゾール群に1群あたり5匹ずつ、無作為に割り当てた。ケトコナゾールは0.5%メチルセルロース（MC）溶液に懸濁し、最終濃度を30 mg/mLとした。ケトコナゾール群の動物には、150 mg/kg（投与容量5 mL/kg）のケトコナゾールを、午前10時頃に1日1回、7日間反復強制経口投与した。用量は過去の報告に基づいて設定した（Shin *et al.*, 2006）。対照群の動物には、0.5%MC溶液（投与容量5 mL/kg）を同じ方法で投与した。

投与期間中、投与前に1日1回、一般状態を観察した。また、投与開始前および投与開始2日後、ならびに剖検日に体重を測定した。最終投与の6時間後に、非麻酔下で尾静脈から約1 mLの血液を採取した。最終投与の24時間後に、ラットを非麻酔下で断頭し、体幹血を採取した。抗凝固剤としてEDTAを用いて、血液の遠心により血漿を分離し、使用時まで -80°C で保存した。

上記の動物実験は大日本住友製薬の動物実験委員会による承認を受けた。

病理組織学的検査

断頭採血後（最終投与の24時間後）、両側の副腎および胸腺を摘出した後、肉眼的に検査し、重量を測定した。また、剖検当日の体重を用いて、体重に対する相対臓器重量を計算した。病理組織学的検査のため、右副腎を10%中性緩衝ホルマリンで固定し、パラフィンに包埋した後、組織切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン（HE）で染色し、光学顕微鏡で観察した。

副腎について、Histofine Simple Stain Rat MAX PO (MULTI)（ニチレイバイオサイエンス、東京、日本）を用いた酵素標識ポリマー法による免疫染色も実施した。一次抗体として、抗Adipophilinマウスモノクローナル抗体（クローンAP-125、Progen Biotechnik、ハイデルベルク、ドイツ）および抗ラットKi-67マウスモノクローナル抗体（クローンMIB-5、Dako、グロストラップ、デンマーク）を使用した。抗原賦活化のため、圧力鍋を用いて切片を0.01Mクエン酸緩衝液（pH 6.0）中で加熱した。核染色はヘマトキシリンで行った。被膜を含む副腎皮質のうち、無作為に選択した400倍の8視野について、Ki-67陽性細胞の数を計数し、1視野当たりの平均陽性細胞数を算出した。

定量的逆転写 PCR (qRT-PCR) による mRNA 発現解析

各群の5匹中4匹（動物番号の昇順で選択した）の左副腎をRNAlater（QIAGEN、東京、日本）に浸し、-80℃で保存した。その後、QIAGEN miRNeasy mini kit（QIAGEN）を用いてTotal RNAを抽出した。さらに、NanoDrop 2000分光光度計（Thermo Scientific、エプソム、英国）を用いて試料中RNA濃度を測定し、Agilent 2100 Bioanalyzer（Agilent Technologies、ヴァルトブロン、ドイツ）を用いて試料中RNAの品質を評価した。

qRT-PCRに使用したプライマーをTable 1-2に示す。各プライマーの塩基配列の特異性は、アガロースゲル電気泳動後の単一バンドの存在、および各qRT-PCR反応後に行われた融解曲線分析における単一ピークの存在によって確認した。cDNA合成およびその後のqRT-PCRは、QuantiFast SYBR Green RT-PCRキット（Qiagen、ヒルデン、ドイツ）およびApplied Biosystems 7500リアル

タイムPCRシステム（Applied Biosystems、フォスターシティ、カリフォルニア、米国）を用いて行った。サーマルサイクラー反応条件は、50°C、10分間（RT）、95°C、5分間（酵素不活性化）、95°C、10秒間および60°C、34秒間の40サイクルとした。各測定は2回行った。

遺伝子発現の差は、対照群と比較した変化倍数として表し、内因性対照としてGAPDHを用いた $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法により計算した。

コルチコステロンおよび前駆体の血漿中濃度の測定

血漿（200 μ L）中のコルチコステロン、デオキシコルチコステロン、プロゲステロン、およびプレグネノロンの濃度は、タンデム質量分析計（Triple Quad 6500、AB Sciex、フラミンガム、マサチューセッツ、米国）を組み合わせた液体クロマトグラフ（Nexera、島津製作所、京都、日本）（LC-MS/MS）を用いて、一括測定した。

統計解析

体重、胸腺および副腎の重量、Ki-67陽性細胞数、mRNA発現レベル、ならびに血中ステロイド濃度について、群ごとの平均値および標準偏差を計算し、群間の差をSAS v9.2（SAS Institute、ケーリー、ノースカロライナ、米国）を用いて以下のように検定した。まず、群間の分散の均一性を、*F*検定を用いて確認した（有意水準15%）。等分散の場合はスチューデントの*t*検定を適用し、等分散でない場合はウェルチの*t*検定を適用した。定量限界未満の値を含む血漿中ステロイド濃度については、ウィルコクソンの検定を適用した。特に記載しない場合は、両側検定を適用し、有意水準を5%とした。

結果

ケトコナゾールの投与期間を通じて、死亡個体は認められず、一般状態の異常または体重変化もみられなかった。ケトコナゾール群の副腎は腫大し、黄白色を呈していた。ケトコナゾール群の副腎の絶対および相対重量は、対照群よりも有意に高く、約 1.9 倍であった (Table 1-2)。またケトコナゾール群では、胸腺の絶対重量は有意に低く、対照群の約 83%であったが、相対重量に変化はなく、肉眼的な異常も認められなかった。

副腎の病理組織学的変化を Figure 1-1 に示す。ケトコナゾール群では、束状帯/網状帯の肥厚が認められた。これらの層の細胞は、顕著に腫大し、空胞化していた。束状帯/網状帯における空胞の縁は、Adipophilin に陽性であった。また、ケトコナゾール群では対照群に比べ、皮質における Ki-67 陽性細胞数の有意な増加が認められた (Figure 1-2)。

副腎におけるステロイド合成酵素の mRNA 発現の変化を Figure 1-3 に示す。ケトコナゾール群では、CYP11A1 の mRNA 発現は対照群よりも約 1.4 倍高かったが、HSD3B1/2、CYP21、および CYP11B1 の発現は 2 群間で同程度であった。

コルチコステロンおよびその前駆体の血漿中濃度の変化を Figure 1-4 に示す。対照群では、コルチコステロンに比較して前駆体の血漿中濃度は概して低値であった。最終投与の 6 時間後、ケトコナゾール群で、デオキシコルチコステロンの血漿中濃度が対照群よりも約 119 倍高かった。またケトコナゾール群では、progesterone の血漿中濃度も、対照群より約 2.9 倍高かった。一方、コルチコステロンまたはpregnenolone の血漿中濃度に対照群と有意な差はなかった。最終投与の 24 時間後では、いずれのステロイドの濃度にも、群間で有意な差は認められなかった。

考察

本章では、ケトコナゾールを投与したラットにおけるコルチコステロンおよびその前駆体の血中濃度の変化、副腎における病理組織学的変化およびステロイド合成酵素の mRNA 発現変化を調べた。

病理組織学的に、ケトコナゾール群では束状帯/網状帯が肥厚し、これらの領域の細胞は顕著に腫大、空胞化していた。空胞は、脂肪のマーカである Adipophilin (Obert *et al.*, 2007) に陽性であったことから、脂肪滴と判断した。ケトコナゾール投与ラットで副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) の血中濃度の増加が報告されており (Burrin *et al.*, 1986)、また ACTH が副腎に対する栄養作用を有し、副腎ステロイド合成酵素、特に CYP11A1 の発現を促進することも知られていること (Rosol *et al.*, 2001; Holt, 2008; Miller and Bose., 2011) から、今回認められた Ki-67 陽性細胞数の増加および CYP11A1 の mRNA 発現の増加は、ACTH の増加によって引き起こされた可能性が考えられた。

慢性的なストレスに起因して副腎の肥大/過形成が非特異的に生じること、また胸腺が萎縮することがよく知られている (Harvey and Sutcliffe, 2010; Elmore, 2012)。今回、ケトコナゾール群では胸腺の絶対重量がわずかに低かったが、相対重量に有意な変化はなかった。また、ケトコナゾール群では一般状態の異常または体重変化も認められなかった。したがって、今回認められた副腎肥大/過形成が慢性的なストレスによって生じた可能性は低いと考えられた。

ステロイドの濃度測定に用いた血漿は、200 μ L と微量ではあったが、対照群、ケトコナゾール群とも、前駆体を含むステロイドの濃度を感度よく測定することが可能であった。このことから、前駆体を含むステロイドの血中濃度の質量分析による一括測定は、ラットにおいても可能であることが確認された。

デオキシコルチコステロンの血中濃度は、ケトコナゾール最終投与の 6 時間後に、対照群と比較して顕著に高かった。同時点ではプロゲステロンの血中濃度もケトコナゾール群でわずかに高かったが、その変化は生理学的変動の範囲内であり、ごく軽微であると考えられた。プレグ

ネノロンおよびコルチコステロンの血中濃度に有意な変化はなかった。

ラット副腎において、主要な糖質コルチコイドであるコルチコステロンは、束状帯/網状帯でコレステロールから合成される (Hanukoglu, 1992; Hinson and Raven *et al.*, 2006)。これらの層では、コレステロールはまず CYP11A によってプレグネノロンに、次に HSD3B によってプロゲステロンに、次いで CYP21 によってデオキシコルチコステロンに、最後に CYP11B1 によってコルチコステロンに代謝される (Rosol *et al.*, 2001; Harvey and Sutcliffe, 2010)。CYP11B1 を欠くヒト (New, 2004) およびマウス (Mullins *et al.*, 2009) では、血中のデオキシコルチコステロン濃度が高値を示すことが報告されている。また、CYP11B1 の阻害薬であるメチラポンは、ラットの血中デオキシコルチコステロン濃度を増加させる (Colby *et al.*, 1970)。ケトコナゾールも CYP11B1 を阻害し (Loose *et al.*, 1983; Johansson *et al.*, 2002)、ヒトで血中のデオキシコルチコステロン濃度を増加させることが報告されている (Engelhard *et al.*, 1985)。したがって、今回認められたケトコナゾール投与による血中デオキシコルチコステロンの増加は、CYP11B1 の阻害を介したデオキシコルチコステロンのコルチコステロンへの代謝障害によるものと考えられた。

デオキシコルチコステロンの増加は、最終投与後 24 時間までに消失したが、この時点までにケトコナゾールの血中濃度が減少すること (Hamdy and Brocks, 2009)、またケトコナゾールによる CYP 酵素の阻害が可逆的であること (Yan *et al.*, 2002) に起因した可能性が考えられる。

CYP21 欠損マウス (Gotoh *et al.*, 1988) および HSD3B 阻害薬であるトリロスタンを投与されたラット (Potts *et al.*, 1978) で報告されているように、CYP21 または HSD3B の阻害により、それぞれプロゲステロンおよびプレグネノロンの血中濃度が増加する。一方、本章の実験ではプロゲステロンおよびプレグネノロンの血中濃度に明らかな変化がなかったことから、これらの酵素に対するケトコナゾールの影響は、CYP11B1 に対するよりも弱いと考えられた。

ケトコナゾール群の血中コルチコステロン濃度は対照群と比較して有意な変化はなかったが、これは個体間のばらつきが大きかったことが一因と考えられた。この結果は、ラットへのケトコナゾールの 7 日間投与がコルチコステロンの血中濃度に影響しなかったとする過去の報告と一

致する (Burrin *et al.*, 1986)。また、血中コルチコステロイド濃度は、副腎ステロイド合成阻害の鋭敏なマーカーではないことが知られている (Yarrington and Reindel, 1996)。以上の結果は、副腎ステロイド合成に対するケトコナゾールの影響を評価するために、血中デオキシコルチコステロン濃度がコルチコステロン濃度よりも鋭敏なマーカーであることを示している。

ケトコナゾール投与は、CYP11B1 を含むステロイド合成酵素の mRNA 発現レベルを減少させなかった。ケトコナゾールは、CYP 酵素と結合することで酵素活性を阻害することが報告されているが (Higashi *et al.*, 1987; Johansson *et al.*, 2002)、酵素の mRNA 発現レベルは必ずしも酵素活性の変化を反映しないことも知られている (Sanderson, 2006)。

このように、病理組織学的変化、mRNA 発現レベル、およびステロイドの血中濃度の変化は、副腎ステロイド合成の阻害およびそれに対する代償性変化を反映していると考えられた。

結論として、コルチコステロンとその前駆体の血中濃度の質量分析による一括測定は、ラットにおいても可能であることが確認された。また、前駆体を含む副腎ステロイドの血中濃度の一括測定は、ラット副腎ステロイド合成に対するケトコナゾールの影響を、コルチコステロン単独の測定よりも鋭敏に評価できることが示された。さらに、前駆体を含む各ステロイド濃度の変化を比較することによって、ステロイド合成のどの段階が投与薬物によって阻害されたかを推測することが可能であった。したがって、前駆体を含む副腎ステロイドの一括測定は、薬物による副腎ステロイド合成の影響を鋭敏に評価し、その作用機序を検討する上で、有用な手法となりうることが示された。

Table 1-1. Experimental schedule

	Day	1		2		3		4-6		7		8	
		Before or after the dosing (BD/AD)		BD	AD	BD	AD	BD	AD	BD	AD	BD	AD
Dosing	KET/MC		✓		✓		✓		✓		✓		
Examination	Clinical sign	✓		✓		✓		✓		✓			
	Body weight	✓				✓							✓
	Blood sampling											✓	✓
	Necropsy											(6h)	(24h)
													✓
													(24h)

✓: Conducted

Numbers in parenthesis mean hours after last dosing.

Table 1-2. Primers used for quantitative real time-PCR

Target	GenBank Accession No.	Primer sequence (5'-3')
CYP11A1	NM_017286	F: GGGCAACATGGAGTCAGTTT R: TTCCTCGGCATCTGAAC
CYP21	NM_057101 XM_001076389	F: CGACCCCAGATACTAGATGGAAAG R: AATTCCTGGGTCAGCTGCTC
HSD3B1	M38178	F: TGGTGCAGGAGAAAGAAGCTG R: AGACATCAATGACAGCAGCG
HSD3B2	NM_001042619.1	F: GAACCTATTGGAGGCCGGTAT R: TCTTCCTCACGGCCATTCAG
CYP11B1	NM_012537 XM_346808	F: ACCATGGAAGCCAGCCATTT R: CATGAGCTGTGTGGTGGACT
GAPDH	NM_017008 XM_216453	F: AGCCAAAAGGGTCATCATCT R: GGGGCCATCCACAGTCTTCT

F, Forward; R, Reverse

Table 1-2. Body weight and organ weight changes after ketoconazole administration

		Body weight (g)	Adrenal gland		Thymus	
			AB (mg)	RE (mg/100g)	AB (g)	RE (g/100g)
Control	n	5	5	5	5	5
	Mean	313	51	16.4	0.60	0.19
	S.D.	8	6	1.8	0.05	0.02
Ketoconazole	n	5	5	5	5	5
	Mean	310	97**	31.2**	0.50*	0.16
	S.D.	18	10	3.1	0.07	0.03

AB, Absolute weight; RE, Relative weight to body weight

* $p < 0.05$. ** $p < 0.01$.

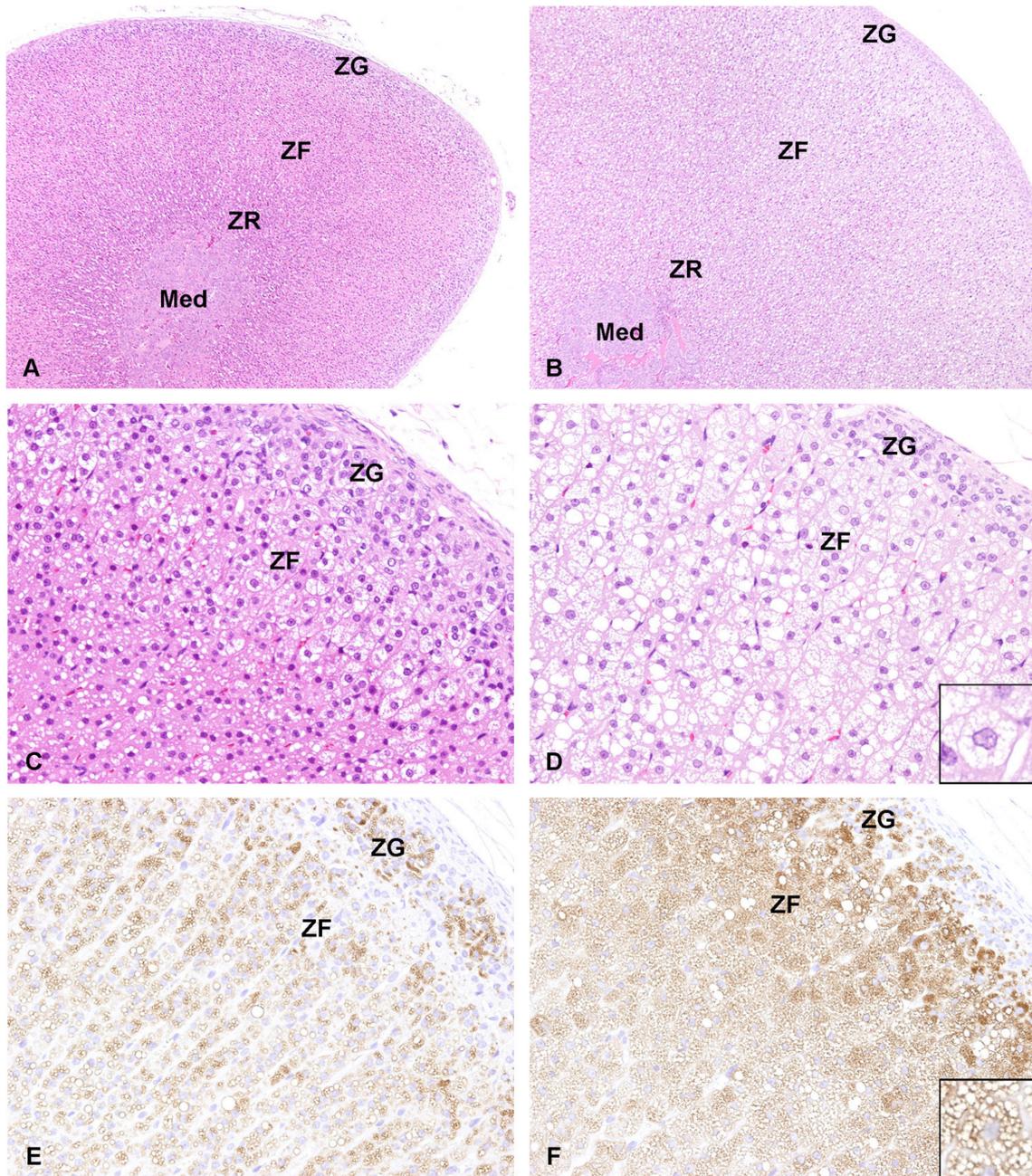


Figure 1-1. Adrenal cortex of a rat from the control group and from the ketoconazole group.

Compared with the control group (A), the zona fasciculata (ZF) and zona reticularis (ZR) are thicker and stained pale in the ketoconazole group (B) on HE sections. The distinction between ZF and ZR is obscure. Med, medulla. (C) and (D) are higher magnifications of (A) and (B), respectively. In the ketoconazole group (D), cells in ZF are severely vacuolated and swollen. Inset shows higher magnification

of affected cells. Immunohistochemically, the rim of the vacuoles in ZF and the zona glomerulosa (ZG) is positive for adipophilin both in the control (E) and ketoconazole groups (F). Inset shows higher magnification of affected cells.

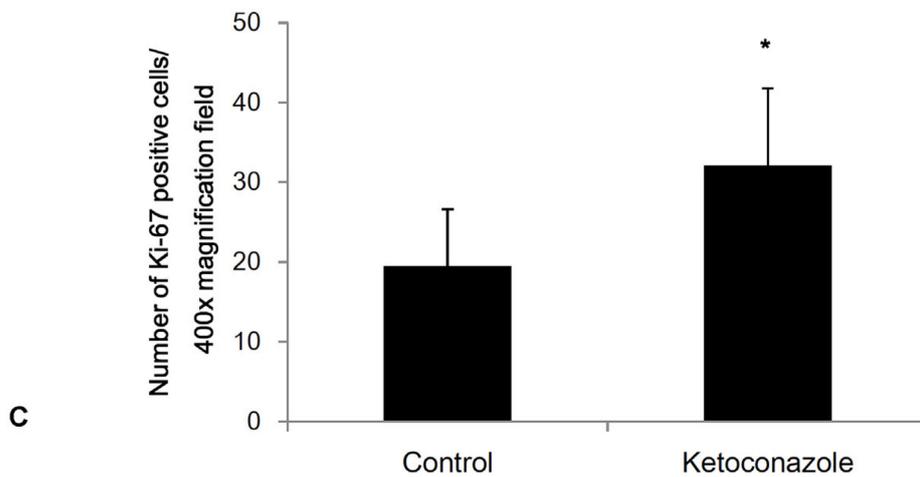
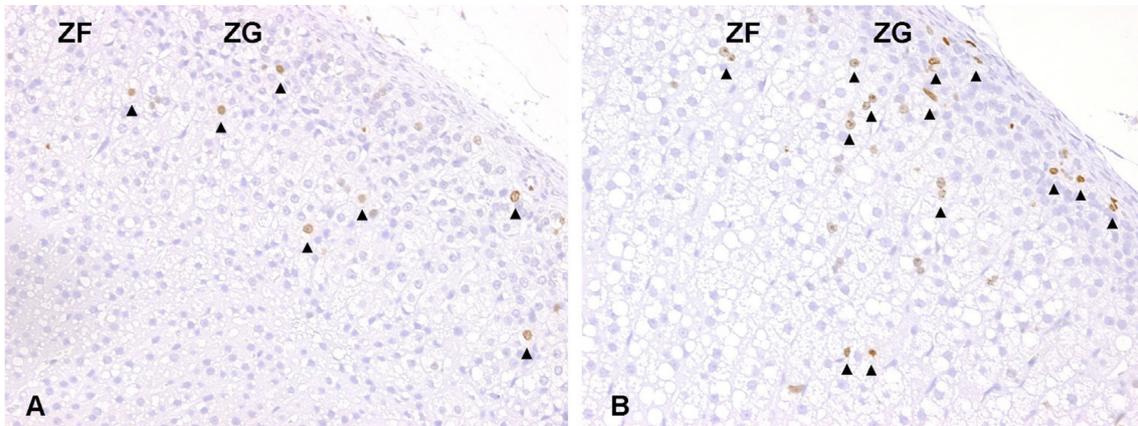


Figure 1-2. Changes in the number of Ki-67-positive cells in the adrenal cortex after ketoconazole administration.

Compared with the control group (A), higher number of Ki-67-positive cells (arrowheads) are seen mainly in the outer cortex in the ketoconazole group (B). ZF, zona fasciculata; ZG, zona glomerulosa. The results of Ki-67-positive cell count (C). Data are shown as the mean \pm standard deviation ($n = 5/\text{group}$), and (*) indicates a statistically significant difference from the control ($p < 0.05$).

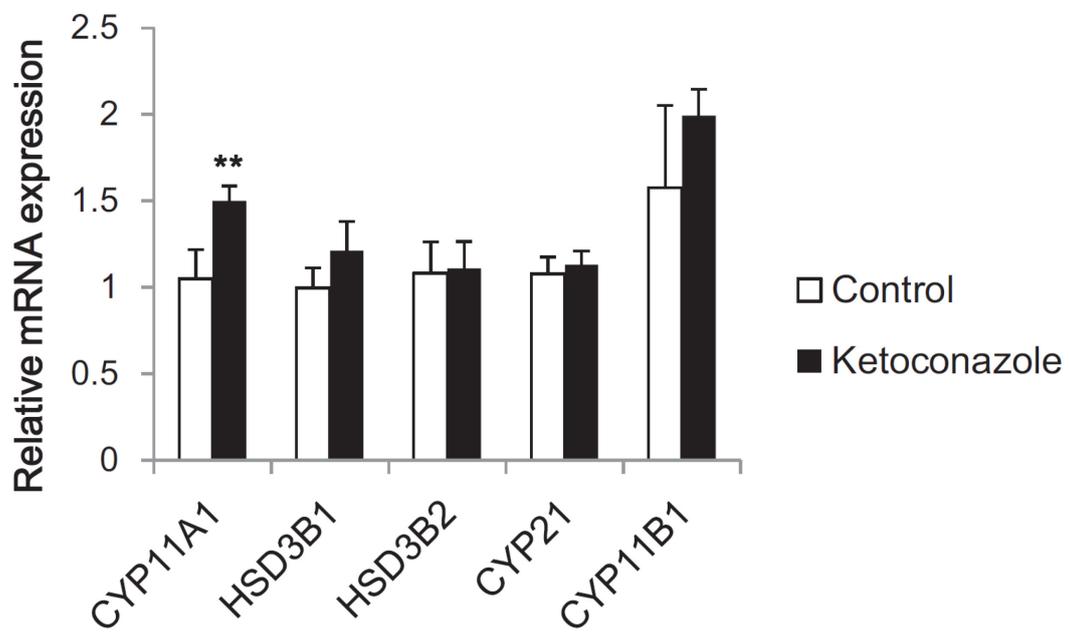


Figure 1-3. Changes in the mRNA expression levels of steroidogenic enzymes in the adrenal gland after ketoconazole administration.

Data are shown as the mean \pm standard deviation (n = 4/group). GAPDH was used as an endogenous control. (**) indicates statistically significant difference from the control ($p < 0.01$).

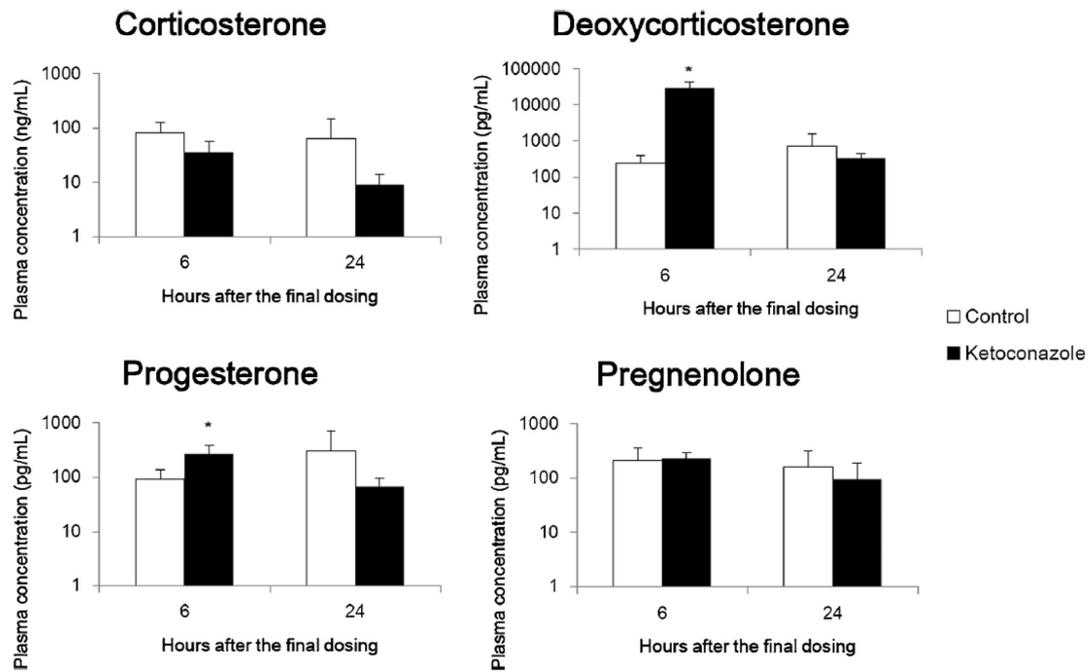


Figure 1-4. Changes in the plasma concentrations of corticosterone and its precursors after ketoconazole administration.

Data are shown as the mean \pm standard deviation ($n = 5/\text{group}$). (*) indicates a statistically significant difference from the control ($p < 0.05$).

第二章 副腎ステロイド合成に影響する各種薬物投与ラットにおけるコルチコ

ステロンおよび前駆体の血中濃度変化

序

第一章では、前駆体を含む副腎ステロイドの血中濃度の質量分析による一括測定が、ラットにおいても可能であることを確認した。また一括測定により、CYP 酵素を非特異的に阻害する薬物であるケトコナゾール投与の副腎ステロイド合成への影響を、鋭敏に評価でき、またその機序についての洞察も得られることを示した。

本章では、薬物による副腎ステロイド合成への影響の評価法として、前駆体を含むステロイドの血中濃度の一括測定の有用性をさらに検証することを目的として、各種の機序により副腎ステロイド合成に影響する複数の陽性対照薬物をそれぞれラットに投与し、ステロイドの血中濃度を一括測定した。

ラット副腎におけるステロイド合成経路を、使用した陽性対照薬物およびそれらの作用機序とともに Figure 2-1 に示す。ラット副腎の束状帯/網状帯では、主要な糖質コルチコイドとしてコルチコステロンをコレステロールから合成する (Hanukoglu, 1992; Hinson and Raven, 2006)。ラットでは、コレステロールは、主に血中の高密度リポタンパク質 (HDL) に由来するか、または脂肪滴に貯蔵されているコレステロールエステルの、中性コレステロールエステラーゼ (nCEH) による加水分解によって供給される (Latendresse *et al.*, 1993; Wickramaratne *et al.*, 1998; Nishizato *et al.*, 2014)。血中 HDL から副腎へのコレステロールの取り込みは、副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) によって促進される (Gwynne, 1976)。コレステロールは、まず CYP11A によってプレグネノロンに、次いで HSD3B によってプロゲステロンに、さらに CYP21 によってデオキシコルチコステロンに、最後に CYP11B1 によってコルチコステロンに代謝される (Rosol *et al.*, 2001; Harvey and Sutcliffe, 2010)。

陽性対照薬物としては、nCEH 阻害薬であるリン酸トリクレジル (TCP)、CYP11A 阻害

薬であるアミノグルテチミド (AG)、HSD3B 阻害薬であるトリロスタン (TRL)、CYP11B1 阻害薬であるメチラポン(MET)、CYP11B1 を含む CYP 阻害薬であるケトコナゾール(KET)、グルココルチコイド受容体阻害薬であるミフェプリストン (MIF) を用いた。

試験デザインは、ステロイド一括測定の毒性試験への組み込みの可能性を想定して、一般毒性試験に類似したものとした。測定対象ステロイドは、ラットの主要な糖質コルチコイドであるコルチコステロン、およびその前駆体であるプレグネノロン、progesterone ならびにデオキシコルチコステロンとした。また血液生化学的検査および副腎の病理組織学的検査を含む他の安全性評価指標の変化とステロイドの変化との関係も調べた。

材料と方法

薬物

陽性対照薬物として用いた TCP、AG、TRL、MET、KET、MIF の副腎への作用機序、供給源、媒体および用量は Table 2-1 に示した。

動物

6~7 週齢の雄の Sprague-Dawley (CrI:CD) ラットを日本チャールス・リバー (神奈川、日本) から購入し、1 週間以上の馴化期間を設けて使用した。動物は、 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $55\pm 10\%$ 、各 12 時間の明期 (8-20 時) / 暗期 (20~8 時) 周期に制御された飼育室で、ケージあたり 1 または 2 匹ずつで飼育した。ラットには市販のペレット飼料 (CRF-1、オリエンタル酵母、東京、日本) および水道水を自由に摂取させた。

動物実験

動物実験のスケジュールを Table 2-2 に示す。

8 週齢のラットを、媒体群および薬物群に 1 群あたり 5 匹ずつ無作為に割り当てた。動物に媒体または薬物を、午前 10 時頃に 1 日 1 回、7 日間反復強制経口投与した。投与容量は 5 mL/kg とした。投与期間中、投与前に 1 日 1 回、一般状態を観察した。また、投与開始前および投与開始 2 日後、ならびに剖検日に体重を測定した。最終投与の 6 時間後に、非麻酔下で約 0.5 mL の血液を尾静脈から採取した。最終投与の 24 時間後、イソフルラン吸入による深麻酔下で腹部大動脈から採血した後、放血によりラットを安楽死させ、剖検した。

剖検時に、両側の副腎および胸腺を摘出した後、肉眼的に検査し、重量を測定した。また、剖検当日の体重を用いて、体重に対する相対臓器重量を計算した。

抗凝固剤としてヘパリンまたは EDTA を用い、血液の遠心によって血漿を分離した。分離した血漿は、使用時まで -80°C で保存した。

上記の動物実験は大日本住友製薬の動物実験委員会による承認を受けた。

血液生化学的検査

最終投与の 24 時間後に採取した血漿について、自動分析装置 (JCA-BM1650、日本電子、東京、日本) を用いて、グルコース (Glu)、総コレステロール (T-Cho)、トリグリセリド (TG)、リン脂質 (PL)、ナトリウム (Na) およびカリウム (K) を測定した。

病理組織学的検査および画像解析

右副腎を 10% 中性緩衝ホルマリンで固定した。パラフィンに包埋後、薄切し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) で染色し、光学顕微鏡で観察した。

副腎の HE 染色標本について、バーチャルスライドスキャナ (Aperio ScanScope AT2、Leica Biosystems Imaging、ビスタ、カリフォルニア、米国) を用いて全体画像を取得し、ImageScope ソフトウェア (Leica Biosystems Imaging) を用いた画像解析により、空胞化部分の面積を定量した。画像解析では、空胞 (脂肪滴) を「核」として認識するよう設定した Nuclear Algorithm (version 9.1、Leica Biosystems Imaging) を使用した。束状帯/網状帯全体を解析領域として抽出し、空胞の総面積を定量した。次いで、全解析面積に対する空胞の総面積の比を計算し、副腎の空胞化指数 (Vacuolation index) とした。

ステロイドの血漿中濃度の測定

最終投与の 6 時間後に採取した 50 μ l の血漿を用いて、タンデム質量分析計 (Triple Quad 6500、AB Sciex、フラミンガム、マサチューセッツ、米国) と組み合わせた液体クロマトグラフ (Nexera、島津製作所、京都、日本) (LC-MS/MS) を用いて、コルチコステロン、デオキシコルチコステロン、プロゲステロン、およびプレグネノロンの血漿中濃度を一括測定した。

統計解析

体重、血液生化学的検査値、臓器重量、副腎空胞化指数および血漿中ステロイド濃度の平均値および標準偏差を計算し、各値を SAS v9.2 または v9.3 ソフトウェア (SAS Institute、ケーリー、ノースカロライナ、米国) を用いて以下のように統計的に解析した。

まず、薬物群とそれぞれの媒体群との間の分散の均一性を、 F 検定を用いて確認した (有意水準 25%)。等分散の場合はスチューデントの t 検定を適用し、等分散でない場合はウェルチの t 検定を適用した。定量下限 (LLOQ) を下回る血漿ステロイド濃度は LLOQ/2 に設定し、ウィルコクソンの検定を用いて解析した。特に記載しない場合は、両側検定を適用し、有意水準を 5% とした。

結果

一般状態と体重

投与期間を通じて、死亡個体は認められず、また KET 群が投与開始後 2 日からわずかな体重減少を示したことを除いて、一般状態の異常または体重変化は認められなかった。

血液生化学的検査

Table 2-3 に血液生化学的検査の結果を示す。総コレステロールは TCP 群および AG 群で高かったが、MIF 群では低かった。トリグリセリドは MET 群と KET 群で低く、リン脂質も KET 群と MIF 群で低かったが、リン脂質は TCP 群で高かった。また、KET 群ではナトリウムの高値、カリウムの低値が認められた。ナトリウムは MIF 群では低値であったが、その変化の小ささと、MIF 群で標準偏差が小さかったことを考慮すると、偶発的な差であると考えられた。

剖検および臓器重量

副腎は AG 群と KET 群で腫大し、退色していた。また、副腎の腫大は TRL 群と MIF 群でも認められた。TCP 群または MET 群に異常はみられなかった。Table 2-4 は臓器重量を示す。副腎重量は TCP 群を除いて高かった。どの群においても胸腺重量に有意な変化はみられなかった。

病理組織学的検査および画像解析

TCP 群および AG 群の副腎の病理組織像を Fig. 2-2 に示す。副腎の束状帯/網状帯の空胞化が、TCP 群、AG 群、および KET 群で認められた。形態学的特徴から、空胞は脂肪滴であると考えられた。空胞化は、AG 群および KET 群では細胞肥大を伴っていた。束状帯/網状帯の細胞は、TRL 群、MET 群、および MIF 群では空胞化を伴わずに肥大していた。画像

解析により、TCP 群、AG 群、および KET 群で束状帯/網状帯の空胞化面積の有意な増加が確認された (Fig. 2-3)。

ステロイド血漿中濃度

コルチコステロンおよび前駆体の血漿中濃度の変化を Figure 2-4 に示す。TRL 群のプレグネノロン、ならびに MET 群および KET 群のデオキシコルチコステロンの濃度は、媒体群よりも 30 倍以上高かった。TRL 群および MET 群ではプロゲステロン濃度も高値を示したが、その程度はプレグネノロンおよびデオキシコルチコステロンよりも小さかった。コルチコステロン濃度に有意な変化は認められなかった。

考察

本章では、各種の機序で副腎ステロイド合成に影響を及ぼす複数の薬物をそれぞれラットに投与し、コルチコステロンおよび前駆体の血中濃度の変化を調べた。

副腎の変化が、慢性的ストレス反応の結果として非特異的に認められることはよく知られている。しかし、本章の研究結果では、最終体重が KET 群でわずかに低かった以外、一般状態の異常は認められず、またストレス下で容易に萎縮する胸腺の重量にも有意な変化はなかった (Harvey and Sutcliffe, 2010; Elmore, 2012)。したがって、今回認められた副腎の変化がストレス反応によって引き起こされた可能性は低いと考えられた。

TCP 群では血中ステロイド濃度に変化はなかったが、副腎の脂肪化（空胞化）が認められた。TCP はラット副腎のコレステロールエステル濃度を増加させることが報告されている (Latendresse *et al.*, 1993)。このことから、脂肪滴の蓄積はコレステロールエステルの蓄積によって引き起こされたと考えられた。また、TCP 群では総コレステロールとリン脂質が高値を示した。副腎の主要な nCEH であるホルモン感受性リパーゼ (HSL) が欠損したマウスで血中総コレステロールの増加が報告されているが、これはコレステロール代謝の阻害によるものと考えられている (Li *et al.*, 2002)。TCP 群では、副腎重量に変化はなく、束状帯/網状帯の細胞肥大も認められなかった。TCP 投与はラットにおいてコルチコステロン濃度の変化は起こさないと報告されており (Latendresse *et al.*, 1995)、これは nCEH が阻害されても、新たに合成されたコレステロールがステロイド合成に利用されるためと推測されている (Rosol *et al.*, 2001)。また、HSL 欠損マウスでは、ACTH 投与後を除いて、血中のコルチコステロン濃度に野生型マウスと有意な差がなかったことが報告されている (Li *et al.*, 2003)。したがって、nCEH 阻害単独ではコルチコステロン合成に対する影響は弱く、束状帯/網状帯の細胞肥大などの代償性変化を起こしづらい可能性が考えられた。

AG 群では、血中ステロイド濃度の変化は明らかではなかったが、副腎の脂肪化が認められた。AG はラット副腎中のコレステロールおよびコレステロールエステルの濃度を増加さ

せることが報告されている (Szabó *et al.*, 1974)。したがって、今回認められた脂肪化は、コレステロールまたはコレステロールエステルの蓄積によって引き起こされたと考えられた。血中総コレステロールの高値は、コレステロール代謝の阻害によって引き起こされたと考えられた。TCP 群とは異なり、AG 群ではヒトの先天性リポイド副腎過形成症において観察されるように (Bose *et al.*, 1996)、脂肪化は束状帯/網状帯の細胞肥大を伴っていた。

TRL 群では、過去の報告 (Potts *et al.*, 1978) と同様、血中プレグネノロン濃度が著しく高かった。血中プレグネノロン濃度の増加は、ヒトにおける HSD3B 欠損症の顕著な特徴である (Cavanah and Dons, 1993)。したがって、プレグネノロン濃度の高値は、TRL による HSD3B 阻害によるものと考えられた。予想外に、TRL 群では血中プロゲステロン濃度も高かったが、その変化の程度はプレグネノロンよりも低かった。ヒトの HSD3B2 欠損症では、17-ヒドロキシプロゲステロン濃度の増加が観察されることが知られており、これは増加した 17-ヒドロキシプレグネノロンが肝臓の HSD3B1 によって代謝されることによると考えられている (Miller and Auchus, 2010)。したがって、今回認められたプロゲステロン濃度の高値は、TRL の半減期が短いこと、HSD3B に対する影響が可逆的であること (McGee and Shaw, 1992; Potts *et al.*, 1978)、および TRL の HSD3B2 に対する影響が HSD3B1 よりも弱いことに起因し (Thomas *et al.*, 2011)、蓄積されたプレグネノロンからの合成の亢進によって生じた可能性が考えられる。また、副腎の重量増加と肥大が観察され、ステロイド合成阻害への代償的变化であると考えられた。

MET 群および KET 群において、デオキシコルチコステロンの血中濃度は著しく高かった。これは過去の報告 (Colby *et al.*, 1970) および第一章の結果とも一致していた。血中デオキシコルチコステロン濃度の増加は、ヒトおよびマウスにおける CYP11B1 欠損の特徴の一つである (New, 2004; Mullins *et al.*, 2009)。したがって、今回認められた血中デオキシコルチコステロン濃度の高値は、CYP11B1 阻害によって引き起こされたと考えられた。MET 群における血中プロゲステロン濃度の高値の原因は不明であった。血液生化学的検査の結果、

KET 群で血中ナトリウムの高値とカリウムの低値が認められた。本研究の MET 群では認められなかったが、MET を 1 日 2 回投与したラットで同様の変化が報告されている (Colby *et al.*, 1970)。また、高血圧および低カリウム血症が CYP11B1 欠損症のヒトで観察されることが知られており、それらは鉱質コルチコイド活性を有するデオキシコルチコステロンの増加に起因する (Vinson, 2011)。したがって、電解質の変化はデオキシコルチコステロンの増加によるものと考えられた。トリグリセリドおよびリン脂質の低値の原因は不明であった。病理組織学的には、AG 群でみられたように、副腎の束状帯/網状帯の脂肪化および細胞肥大が KET 群で認められた。一方 MET 群では、副腎重量が増加し、細胞肥大が示唆されたが、脂肪化は認められなかった。CYP11B1 欠損マウス (Mullins *et al.*, 2009)、および他の CYP11B1 阻害薬であるオシドロスタットを投与したラット (Li *et al.*, 2015) では、副腎肥大が脂肪化を伴わずに認められたことが報告されている。したがって、CYP11B1 阻害単独では一般に脂肪化を引き起こさず、KET 群で認められた脂肪化は、CYP11A のような他の CYP 阻害 (Johansson *et al.*, 2002) によるものと推測された。

MIF 群では、血中ステロイド濃度の変化は明らかではなかった。しかしながら、過去の報告と一致して (Tamura *et al.*, 2009)、束状帯/網状帯の細胞肥大が認められた。肥大、ならびに総コレステロールの低値は、糖質コルチコイド受容体の拮抗作用に対する代償性変化と考えられた。リン脂質の低値の原因は不明であった。

全体として、前駆体ステロイドの血中濃度の変化は、コルチコステロン濃度の変化よりも明瞭であった。HSD3B 阻害薬である TRL、または CYP11B1 阻害薬である MET および KET を投与し、血中ステロイド濃度を一括測定することにより、前駆体ステロイドの濃度が顕著に増加することを明らかにした。対照的に、これら阻害薬の投与による血中コルチコステロン濃度の有意な変化はみられなかった。コルチコステロイドの血中濃度は、副腎ステロイド合成阻害の鋭敏なマーカーではないことが知られている (Yarrington and Reindel, 1996; Hinson and Raven, 2006)。したがって、少なくとも HSD3B 阻害薬および CYP11B1 阻害薬を

投与した場合には、副腎ステロイド合成への影響を評価するために、前駆体ステロイドの血中濃度はコルチコステロン濃度よりも鋭敏であることが示された。

また、血中ステロイド濃度の変化は、投与薬物の作用機序を反映していた。著しく増加した前駆体ステロイドは、投与薬物の阻害標的となる酵素によって代謝されるものであった。したがって、血中ステロイド濃度の変化パターンから、投与薬物の副腎への作用機序に関する洞察を得ることができると考えられる。

結論として、前駆体を含む副腎ステロイドの血中濃度一括測定は、薬物による副腎ステロイド合成への影響を鋭敏に評価し、またその作用機序を検討する上で、有用な手法となることを示すことができた。

Table 2-1. The positive control drugs and dose levels used in this study

Drug	Mode of action ^{a)}	Supplier ^{b)}	Vehicle ^{c)}	Dose level (mg/kg/day)	Reference
Tricresyl phosphate (TCP)	nCEH inhibitor	TCI	Corn oil	700	NTP ^{d)} (1994)
Aminoglutethimide (AG)	CYP11A inhibitor	TRC	0.5% MC	125	Ng <i>et al.</i> (2013)
Trilostane (TRL)	HSD3B inhibitor	Selleck	1% GT	40	Potts <i>et al.</i> (1978)
Metyrapone (MET)	CYP11B1 inhibitor	Sigma	0.5% MC	400	
Ketoconazole (KET)	CYPs inhibitor	Wako	0.5% MC	150	
Mifepristone (MIF)	GR antagonist	TCI	0.5% MC	150	Tamura <i>et al.</i> (2009)

a) nCEH: Neutral cholesterol ester hydrolase; HSD3B: Hydroxysteroid dehydrogenase 3B; GR:

Glucocorticoid receptor

b) TCI: Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan); TRC: Toronto Research Chemicals (North York, ONT,

Canada); Selleck: Selleck Chemicals (Houston, TX, US); Sigma: Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, US);

Wako: Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan)

c) Corn oil (Sigma-Aldrich); 0.5% MC: 0.5% water solution of methylcellulose (Nacalai Tesque, Kyoto,

Japan); 1% GT: 1% water solution of gum tragacanth (Nacalai Tesque)

d) NTP: National Toxicology Program

Table 2-2. Experimental schedule

		Day 1		Day 2		Day 3		Day 4-6		Day 7		Day 8
		Before or after the dosing (BD/AD)		BD	AD	BD	AD	BD	AD	BD	AD	
Dosing	Drug/Vehicle		✓		✓		✓		✓		✓	
Examination	Clinical sign	✓		✓		✓		✓		✓		
	Body weight	✓				✓						✓
	Blood sampling (steroid measurement)										✓ (6h)	
	Blood sampling (blood biochemistry)											✓ (24h)
	Necropsy											✓ (24h)

✓: Conducted

Numbers in parenthesis mean hours after last dosing.

Table 2-3. Blood biochemistry

Drug	Glu (%)	T-Cho (%)	TG (%)	PL (%)	Na (%)	K (%)
Vehicles	100 ± 7	100 ± 12	100 ± 32	100 ± 8	100 ± 1	100 ± 5
TCP	95 ± 11	149 ± 22**	60 ± 22	117 ± 11*	100 ± 1	100 ± 7
AG	90 ± 8	135 ± 10**	61 ± 27	113 ± 11	101 ± 1	100 ± 5
TRL	98 ± 9	89 ± 8	105 ± 29	93 ± 3	100 ± 1	105 ± 7
MET	98 ± 7	109 ± 10	39 ± 15**	99 ± 10	100 ± 1	104 ± 7
KET	93 ± 10	103 ± 13	23 ± 10**	84 ± 8*	102 ± 1*	84 ± 7**
MIF	111 ± 11	78 ± 13*	77 ± 22	83 ± 11*	99 ± 0**	98 ± 4

Glu: Glucose; T-Cho: Total cholesterol; TG: Triglyceride; PL: Phospholipid; Na: Sodium; K: Potassium

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; N = 5

The values are shown as the percentage of the mean ± standard deviation compared with the mean of the concurrent vehicle control group.

Table 2-4. Body weight and organ weights

Drug	Final body weight (%)	Adrenal glands		Thymus	
		AB (%)	RE (%)	AB (%)	RE (%)
Vehicles	100 ± 5	100 ± 13	100 ± 13	100 ± 20	100 ± 21
TCP	95 ± 10	107 ± 5	112 ± 9	81 ± 19	84 ± 16
AG	101 ± 8	156 ± 33*	157 ± 31**	103 ± 22	106 ± 24
TRL	102 ± 7	134 ± 23*	130 ± 21*	91 ± 19	90 ± 20
MET	101 ± 7	122 ± 13*	124 ± 10*	109 ± 14	107 ± 13
KET	88 ± 11	250 ± 42**	292 ± 85**	98 ± 28	112 ± 24
MIF	98 ± 9	143 ± 35*	148 ± 31*	102 ± 34	100 ± 33

AB: Absolute weight; RE: Relative weight to body weight

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; N = 5

The values are shown as the percentage of the mean ± standard deviation compared with the mean of the concurrent vehicle control group.

Table 2-5. Summary of the results

Drug	Blood biochemistry	Adrenal weight	Adrenal histology	Plasma Steroid
TCP	T-Cho, PL↑	—	Lipidosis of zona fasciculata/reticularis	—
AG	T-Cho↑	↑	Lipidosis and hypertrophy of zona fasciculata/reticularis	—
TRL	—	↑	Hypertrophy of zona fasciculata/reticularis	Pregnenolone↑↑ Progesterone↑
MET	TG↓	↑	—	Deoxycorticosterone↑↑ Progesterone↑
KET	Na↑ TG, PL, K↓	↑	Lipidosis and hypertrophy of zona fasciculata/reticularis	Deoxycorticosterone↑↑
MIF	T-Cho, PL↓	↑	Hypertrophy of zona fasciculata/reticularis	—

↑↑: Markedly high; ↑: High; ↓: Low; —: Within normal limit

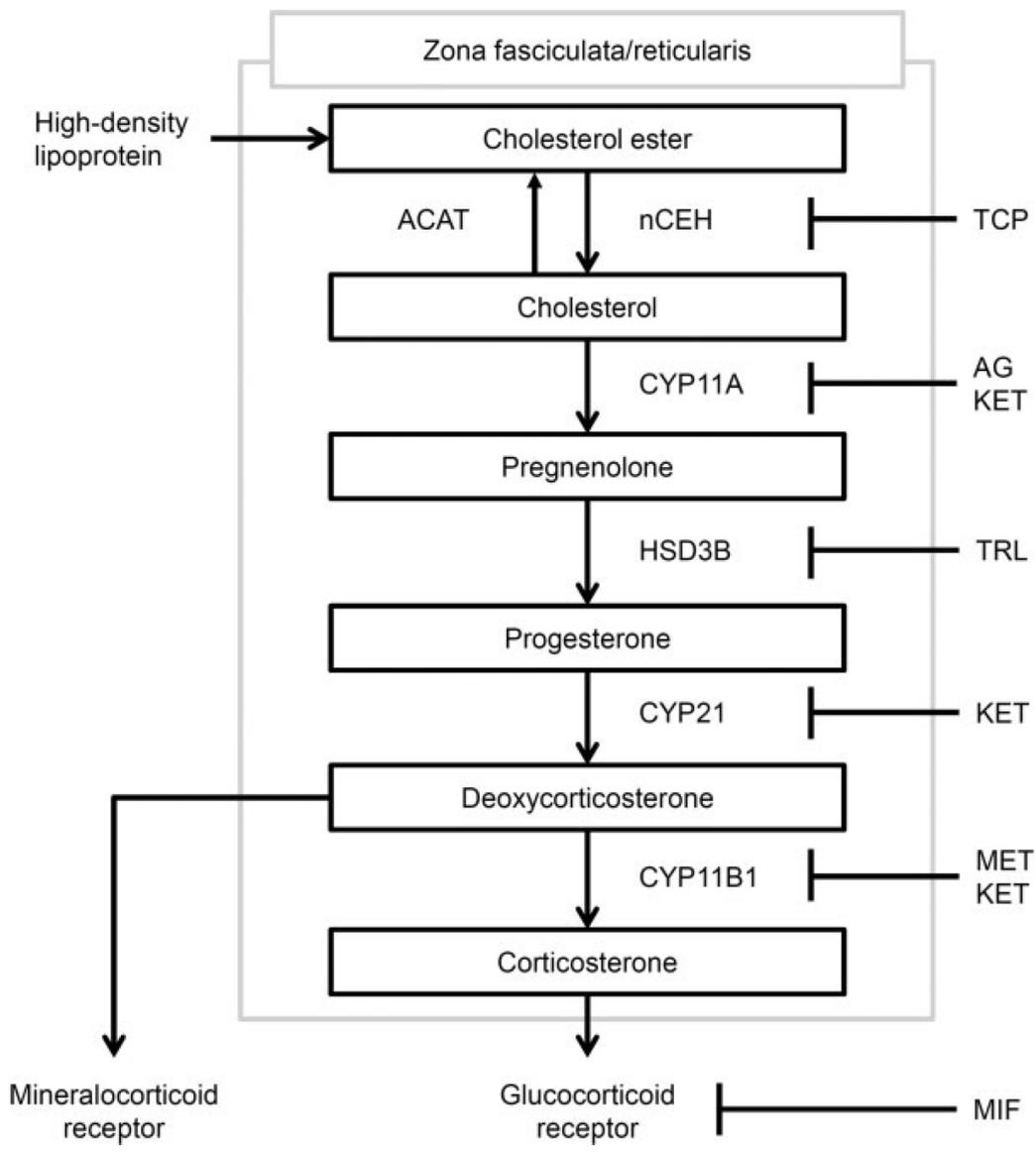


Figure 2-1. The steroidogenic pathway in the rat adrenal gland.

The modes of action of the drugs used in this study are also shown. ACAT: Acyl-CoA: cholesterol acyltransferase; HSL: Hormone-sensitive lipase.

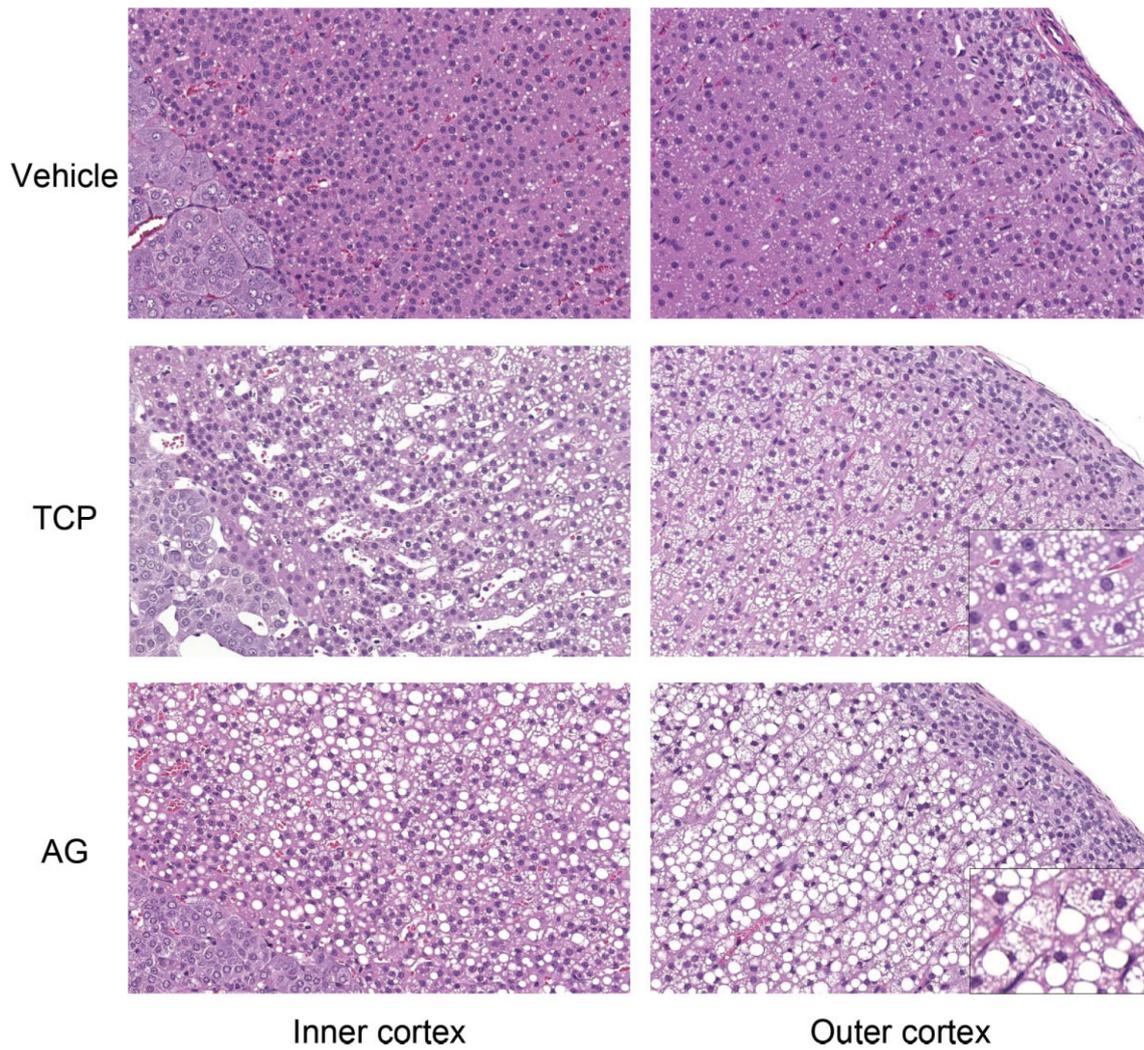


Figure 2-2. Histopathological images of the adrenal cortex of a rat from the vehicle, TCP, and AG groups (HE).

The zona fasciculata/reticularis of the adrenal glands were vacuolated in the TCP and AG groups. The vacuolation was accompanied with hypertrophy in the AG group. The insets show higher magnifications of the affected cells.

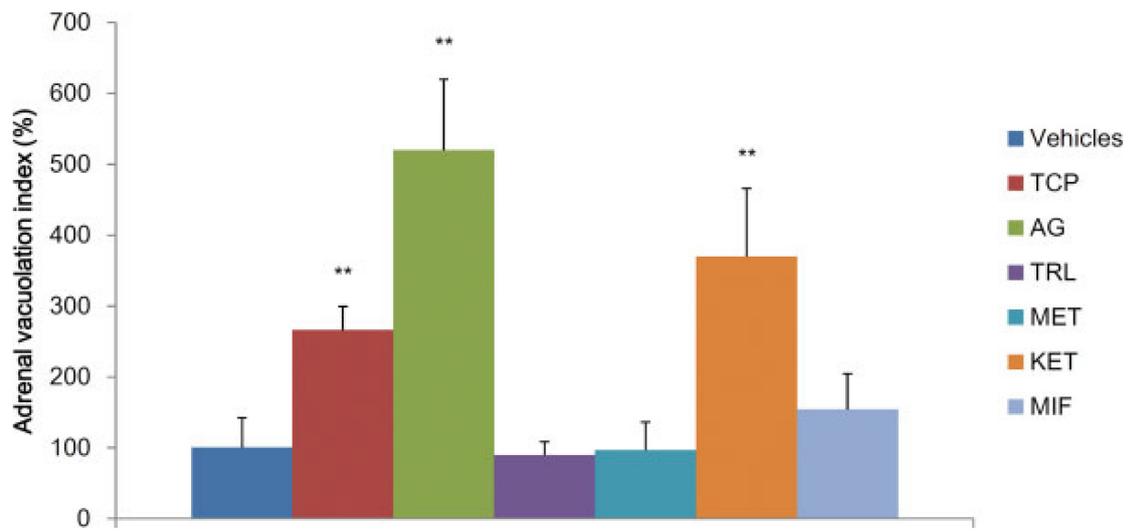


Figure 2-3. Image analysis of the vacuolation of the zona fasciculata/reticularis.

The data are shown as the percentage of the mean \pm standard deviation compared with the mean of the concurrent vehicle control group (n = 5/group). (**) indicates statistically significant difference from the vehicle control ($p < 0.01$).

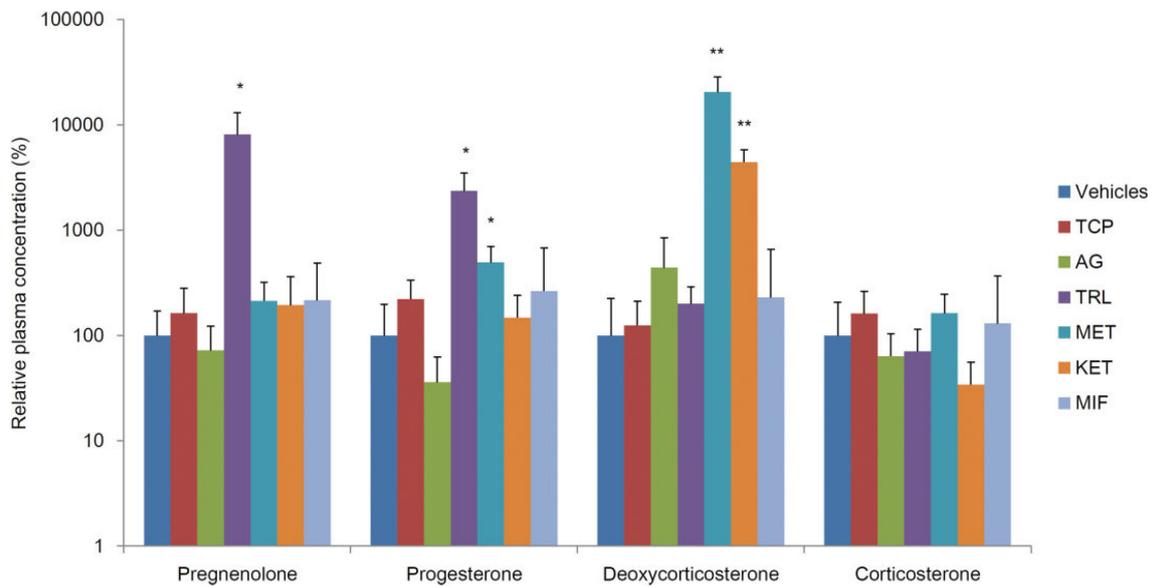


Figure 2-4. Changes in plasma concentrations of corticosterone and its precursors.

The data are shown as the percentage of the mean \pm standard deviation compared with the mean of the concurrent vehicle control group (n = 5/group). (*) and (**) indicate statistically significant difference from the vehicle control (* p < 0.05; ** p < 0.01).

第三章 ケトコナゾール投与ラットの ACTH 投与下または非投与下におけるコルチコステロンおよびその前駆体の血中・副腎濃度の用量依存的・経時的変化 序

第一章および第二章の研究では、前駆体を含む複数の副腎ステロイドの血中濃度の一括測定が、薬物による副腎ステロイド合成への影響を検出する鋭敏な方法であり、またその機序の研究にも有用であることを示した。しかし、薬物の影響は単一の用量および時点で評価したのみであり、血中ステロイド濃度の変化の用量依存性および推移は不明であった。また CYP11A 阻害薬であるアミノグルテチミドなど一部の薬物については、血中ステロイド濃度の変化は明らかではなかった。さらに、ステロイドの血中濃度が副腎濃度を反映したものかが不明であった。

本章では、薬物投与による血中ステロイド濃度の変化の用量依存性および推移を明らかにすることを目的として、複数用量のケトコナゾールをラットに単回または反復投与した後、経時的にステロイドの血中濃度を一括測定した。また、ステロイド合成への影響の検出感を向上させることを目的として、副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) をケトコナゾールとともにラットに投与し、ステロイドの血中濃度の変化をケトコナゾール単独投与時の変化と比較した。さらに、ステロイドの血中濃度と同時に副腎濃度を測定し、それらの相関を調べた。

ケトコナゾールは、CYP 酵素を非特異的に阻害することで副腎ステロイド合成を阻害する (Johansson *et al.*, 2002)。第一章および第二章の研究において、ラットへの単独投与では、CYP11B1 阻害を介すると考えられる血中デオキシコルチコステロン濃度の著しい増加が認められた一方で、他の CYP 酵素に対する影響は血中ステロイド濃度の変化からは明らかではなかったことから、陽性対照薬物として選択した。ACTH は、下垂体から分泌され、副腎における糖質コルチコイドの合成を促進するホルモンであり、副腎のステロイド

合成能を評価する目的で ACTH 刺激試験に用いられる (Harvey and Sutcliffe, 2010)。測定対象ステロイドは、ラットの主要な糖質コルチコイドであるコルチコステロン、およびその前駆体であるプレグネノロン、progesterone ならびに deoxycorticosterone とした。

材料と方法

薬物

ケトコナゾールは和光純薬工業（大阪、日本）および東京化成工業（東京、日本）から、ACTH（1-24）は Bachem（ブーベンドルフ、スイス）から購入した。

動物および飼育

日本チャールズリバー（神奈川、日本）から購入した雄の Sprague-Dawley (CrI:CD) ラットを使用した。ラットには市販のペレット飼料（CRF-1、オリエンタル酵母、東京、日本）および水道水を自由に摂取させた。

実験 1 では、各 12 時間の明期（8~20 時）/暗期（20~8 時）周期の部屋で、動物をケージ当たり 1 匹または 2 匹ずつ飼育した。

実験 2 では、午前 8 時点灯、午後 6 時消灯の部屋で、動物をケージ当たり 5 匹ずつ飼育した。

動物実験

実験 1

8 週齢のラットをケトコナゾール投与群と 0.5%メチルセルロース（MC）溶液投与（媒体対照）群に無作為に割り当てた。ケトコナゾールの用量は 15、50、および 150 mg/kg とした。高用量はこれまでの研究に基づいて選択し、中および低用量は約 3 の公比を用いて選択した。群構成および動物実験のスケジュールをそれぞれ Table 3-1 および Table 3-2 に示す。ケトコナゾール投与群の動物には、ケトコナゾールを午前 10 時頃に 1 日 1 回、1 日（単回投与群）または 7 日間（反復投与群）、強制経口投与した（ケトコナゾール群）。ケトコナゾールは 0.5%MC に懸濁し、投与容量は 5 mL/kg とした。媒体対照群の動物には、同容量の 0.5% MC を投与した（MC 群）。

投与期間中、投与前に1日1回、一般状態を観察した。投与開始前および投与開始2日後、ならびに剖検日に体重を測定した。

ケトコナゾールの単回または7日間の反復投与終了の1、3および6時間後に、非麻酔下で最大0.5 mLの血液を尾静脈から採取した。抗凝固剤としてEDTAを用いて、血液の遠心により血漿を分離し、使用時まで-80°Cで保存した。

最終投与の約24時間後、イソフルラン吸入による深麻酔下で放血によりラットを安楽死させ、剖検した。剖検時に、両側副腎および胸腺を摘出し、肉眼的に検査した後、重量を測定した。また、剖検日の体重を用いて体重に対する相対臓器重量を計算した。臓器重量測定後、副腎を10%中性緩衝ホルマリン(NBF)で固定した。

実験2

6週齢のラットをケトコナゾール群およびMC群に無作為に割り当てた。群構成および動物実験のスケジュールをそれぞれTable 3-3およびTable 3-4に示す。ケトコナゾール群の動物には、150 mg/kgのケトコナゾールを、午前9~10時に単回強制経口投与した。ケトコナゾールは0.5% MCに懸濁し、投与容量は5 mL/kgとした。ケトコナゾール投与の5時間後、ラットに生理食塩水または0.4 mg/kgのACTHを皮下投与した。ACTHは生理食塩水に溶解し、投与容量は1 mL/kgとした。MC群の動物には、0.5% MCの単回投与に続いて生理食塩水またはACTHを皮下投与した。

ケトコナゾール投与前に体重を測定し、ケトコナゾール投与6時間後の採血前に一般状態を観察した。

ケトコナゾール投与の6時間後(ACTH投与の1時間後)に、非麻酔下で尾静脈から約250 µLの血液を採取した。抗凝固剤としてEDTAを用いて、血液の遠心により血漿を分離し、使用時まで-80°Cで保存した。

採血後に、イソフルラン吸入による深麻酔下で放血によりラットを安楽死させ、剖検し

た。剖検時に、両側副腎を摘出し、肉眼で検査した後、重量を測定した。その後、副腎を液体窒素中で凍結し、使用時まで-80°Cで保存した。

上記の動物実験は大日本住友製薬の動物実験委員会による承認を受けた。

病理組織学的検査および画像解析

実験 1 では、10% NBF で固定された副腎をパラフィン包埋し、切片にした後、ヘマトキシリン・エオジン (HE) で染色し、光学顕微鏡で検査した。

副腎の HE 染色標本について、バーチャルスライドスキャナ (Aperio ScanScope AT2、Leica Biosystems Imaging、ビスタ、カリフォルニア、米国) を用いて全体画像を取得した。皮質空胞化の画像解析は、ImageScope ソフトウェア (Leica Biosystems Imaging) を用いて実施した。束状帯/網状帯において、空胞全体の面積 (V) は、Nuclear Algorithm (version 9.1、Leica Biosystems Imaging) を用いて定量した。空胞を除く組織面積 (T) は、Positive Pixel Count Algorithm (version 9.1、Leica Biosystems Imaging) を用いて定量した。空胞を含む全組織面積に対する空胞全体の面積の比 ($100 (\%) \times V/(V + T)$) を空胞化指数 (Vacuolation index) とした。

ステロイドの血中および副腎濃度の測定

実験 1 および 2 の両方において、タンデム質量分析計 (Triple Quad 6500 または 6500 +、AB Sciex、フラミンガム、マサチューセッツ、米国) と組み合わせた液体クロマトグラフ (Nexera、島津製作所、京都、日本) (LC-MS/MS) を用いて、コルチコステロンおよびその前駆体 (デオキシコルチコステロン、プロゲステロンおよびプレグネノロン) の血漿中濃度を一括測定した。

実験 2 では、副腎中のコルチコステロン、デオキシコルチコステロン、プロゲステロン

およびプレグネロン濃度を既報 (Maeda *et al.*, 2013) のように測定した。

統計解析

SAS v9.4 ソフトウェア (SAS Institute、ケーリー、ノースカロライナ、米国) を用いて統計解析を実施した。体重、臓器重量、副腎空胞化指数、ならびに血中および副腎ステロイド濃度の群間差は以下のように解析した。

実験 1 では、MC 単回投与群とケトコナゾール単回投与群の比較のため、まず 2 群間の分散の均一性を、 F 検定 (有意水準 25%) を用いて確認した。等分散の場合はスチューデントの t 検定を使用し、等分散でない場合はウェルチの t 検定を使用した。MC 反復投与群とケトコナゾール反復投与群間の比較には、Dunnett 検定を用いた。

実験 2 では、ACTH 投与または非投与の MC 群とケトコナゾール群とを比較するために、Tukey 検定を用いた。また、血中および副腎ステロイド濃度について、生理食塩水群と ACTH 群それぞれでピアソンの相関係数を求めた。

特に記載のない限り、検定は両側、有意水準 5% で実施した。統計解析の前に、血中および副腎ステロイド濃度の値は対数変換した。また、定量下限 (LLOQ) 未満の血中ステロイド濃度値は LLOQ/2 として扱った。

結果

実験 1：ケトコナゾール投与後の臓器重量、病理組織学変化、および血中ステロイド濃度の用量依存的・経時的変化

剖検および臓器重量

投与期間を通じて、動物は死亡せず、状態の異常や体重変化を示さなかった。反復投与後の剖検では、ケトコナゾール 150 mg/kg 群で副腎の退色および腫大が認められた。

Table 3-3 に臓器重量を示す。副腎重量はケトコナゾール 150 mg/kg 群で反復投与後、有意に増加した。また、ケトコナゾール 150 mg/kg 単回投与では、有意差はみられなかったが、副腎重量の増加傾向がみられた。胸腺重量はどの群においても有意な変化はみられなかった。

病理組織学的変化および画像解析

Table 3-6 に副腎の病理組織学的変化を示す。50 mg/kg 以上投与のケトコナゾール群では反復投与後、束状帯/網状帯の空胞の増加が認められた (Figure 3-1)。空胞は、その形態から脂肪滴と考えられた。さらに、束状帯/網状帯の細胞肥大がケトコナゾール 150 mg/kg 反復投与群で認められた。ケトコナゾール 150 mg/kg 単回投与群でも軽微な細胞肥大が認められた。

画像解析により、ケトコナゾール 150 mg/kg 反復投与群で束状帯/網状帯の空胞の増加が確認された (Figure 3-2)。また、ケトコナゾール 50 mg/kg 反復投与群でも、空胞化指数が高い傾向にあった。一方、ケトコナゾール 15 mg/kg 反復投与群またはケトコナゾール 150 mg/kg 単回投与群に変化はみられなかった。

血中ステロイド濃度

Figure 3-3 に、コルチコステロンおよびその前駆体の血中濃度を示す。デオキシコルチコ

ステロン濃度はすべての用量のケトコナゾール反復投与群で、MC 反復投与群に比較して概ね用量依存性に増加した。ケトコナゾール 150 mg/kg 投与群では、時間経過とともに増加の程度が大きくなる傾向がみられた。また、ケトコナゾール 150 mg/kg 単回投与後のデオキシコルチコステロン濃度は、各時点で MC 単回投与群に比較して有意に増加した。さらに、コルチコステロン濃度は MC 群とケトコナゾール群の間で有意差を示さなかったが、MC の単回投与後に時間経過とともに増加したのに対し、150mg/kg のケトコナゾールの単回投与後に同様の傾向はみられなかった。

上記以外に、ケトコナゾール 150 mg/kg の反復投与終了の 1 時間後にプレグネノロン濃度の高値が認められ、ケトコナゾール 150 mg/kg の単回投与の 1 時間後にはプロゲステロン濃度の高値が認められた。しかし、これらは一過性であり、また生理学的変動の範囲内であったことから、投与に関連する変化ではないと判断した。

実験 2：ACTH 投与または非投与下でのケトコナゾール投与後の血中および副腎ステロイド濃度
血中ステロイド濃度

Figure 3-4 に、ACTH 投与または非投与下でのケトコナゾール投与後のコルチコステロンおよびその前駆体の血中濃度を示す。実験 1 と一致して、ケトコナゾール投与は ACTH 非投与群において血中デオキシコルチコステロン濃度を有意に増加させた。対照的に、ACTH 投与は MC 群ですべてのステロイドの濃度を有意に増加させたが、ケトコナゾール投与はデオキシコルチコステロンを除いて、これらのステロイド濃度の増加を有意に抑制した。

副腎ステロイド濃度

Figure 3-5 に、ACTH 投与または非投与下でのケトコナゾール投与後の副腎ステロイド濃度を示す。ケトコナゾール投与は ACTH 非投与群で副腎のデオキシコルチコステロン濃度とプレグネノロン濃度を有意に増加させたが、プロゲステロン濃度とコルチコステロン濃

度を減少させた。これに対し、ACTH 投与は MC 群の副腎コルチコステロン濃度を有意に減少させたのみであった。

Figure 3-6 に、血中および副腎ステロイド濃度の相関を示す。ACTH 非投与では、デオキシコルチコステロン濃度を除いて、相関は弱いかまたは認められなかった。一方、ACTH 投与群では、プレグネノロン濃度を除いて、中程度から強い相関が認められた。

考察

実験 1 では、ケトコナゾール投与後のコルチコステロンとその前駆体の血中濃度について用量依存のおよび経時的变化を調べた。第一章および第二章の研究と一致して、150 mg/kg のケトコナゾールの反復投与は、副腎束状帯/網状帯の細胞肥大および空胞化（脂肪化）を引き起こし、血中デオキシコルチコステロン濃度を増加させた。これらの変化は、一般状態の異常、または胸腺重量の減少などの非特異的なストレス反応（Harvey and Sutcliffe, 2010; Elmore, 2012）を伴わなかった。したがって、今回認められた副腎の病理組織学的変化および血中ステロイド濃度の変化がストレス反応によるものである可能性は低いと考えられた。副腎の脂肪化は、CYP11A などの CYP 酵素の阻害による、コレステロールおよびコレステロールエステルの蓄積によって引き起こされたと考えられた。また、血中デオキシコルチコステロン濃度の増加は、ケトコナゾール投与による CYP11B1 阻害を介して引き起こされたと考えられた（Johansson *et al.*, 2002）。さらに、副腎の肥大は、これらの副腎ステロイド合成障害に対する代償性変化と考えられた。

上記のケトコナゾール投与による変化は概ね用量依存性であった。また反復投与後では、副腎の重量および病理組織学的変化は、15 および 50 mg/kg 投与群では認められなかったか、または軽度であった。一方、血中デオキシコルチコステロン濃度はケトコナゾール 15 mg/kg 投与でも有意に増加した。また、ケトコナゾール 150 mg/kg の単回投与後、副腎の重量および病理組織学的変化は明らかではなかったが、血中デオキシコルチコステロン濃度は有意に増加した。このように、血中デオキシコルチコステロン濃度は、ケトコナゾール投与の副腎への影響について、鋭敏なマーカーとなることが示された。

血中デオキシコルチコステロン濃度の変化は、ケトコナゾール 150 mg/kg 反復投与群では時間経過とともに大きくなる傾向がみられたが、ケトコナゾール 15 または 50 mg/kg 投与群で同様の傾向は認められなかった。これは、ケトコナゾールの高用量域における半減期および Tmax（最大濃度までの時間）の延長に関連している可能性が考えられる（Hamdy and

Brocks, 2009)。

実験1のMC群では、特に単回投与後で、血中コルチコステロン濃度は時間経過とともに増加する傾向があった。これは、夕方にピークに達するラットの血中コルチコステロン濃度の日内変動によるものと考えられた (Atkinson and Waddel, 1997)。一方、ケトコナゾール 150 mg/kg 投与群に同様の傾向はみられず、ケトコナゾール投与によるコルチコステロン分泌の障害が示唆された。しかしながら、MC群とケトコナゾール群との間に有意差はなく、血中コルチコステロン濃度の副腎ステロイド合成阻害のマーカーとしての感度の低さ (Yarrington and Reindel, 1996) がさらに確認された。

ケトコナゾールの単独投与では、副腎ステロイド合成への影響を、デオキシコルチコステロンを除き、血中ステロイド濃度の変化としては検出できなかった。そこで実験2では、ACTH を併用投与することでこの血中濃度の変化をより明らかにできるかを検討した。ケトコナゾールが CYP11B1 に加え、CYP11A を含む他の副腎ステロイド合成酵素を阻害することを考慮すると (Johansson *et al.*, 2002)、デオキシコルチコステロン以外のステロイドの血中濃度にも変化が現れることが期待された。

ACTH 単独投与では4つすべてのステロイドの血中濃度が増加した。ケトコナゾール投与後に ACTH を投与したところ、デオキシコルチコステロン以外のステロイドでケトコナゾール投与による血中濃度の変化が明瞭となった。このうち、プレグネノロンおよびプロゲステロンの血中濃度の減少は、CYP11A の阻害を介して引き起こされたと考えられた。したがって、ACTH の併用投与はケトコナゾール投与による血中ステロイド濃度の変化の検出感度を高めると考えられた。

さらに、ステロイドの血中濃度の変化が副腎濃度の変化を反映しているかを調べるため、ステロイドの血中濃度と副腎濃度との相関を調べた。その結果、ケトコナゾールの単独投与では、血中濃度と同様に、副腎のデオキシコルチコステロン濃度が増加した。一方、ケトコナゾールの単独投与は副腎のプレグネノロン濃度を増加させたが、プロゲステロンとコル

チコステロン濃度を減少させた。これらのステロイドでは、血中濃度と副腎濃度の間の相関は弱いかあるいは認められなかった。ところが、ACTH を投与すると、プレグネノロンを除いて血中と副腎の濃度に中程度から強い相関が認められた。このように、ACTH を投与すると、ステロイドの血中濃度の変化は副腎濃度の変化を反映することが示された。ケトコナゾール投与による副腎のプレグネノロン濃度増加の機序については、プレグネノロン合成が副腎ステロイド合成における律速段階であり ACTH によって急速に促進されること (Rosol *et al.*, 2001; Miller and Bose, 2011)、ラットにケトコナゾールを経口投与した際の T_{max} が約 1~2 時間であること (Hamdy and Brocks, 2009)、およびケトコナゾールによる CYP 酵素の阻害が可逆的であること (Yan *et al.*, 2002) を考慮すると、ステロイド合成阻害に対する代償性変化である可能性が考えられた。また、ACTH の単独投与は、副腎中のコルチコステロン濃度を予想外に減少させたが、これは副腎中の既存のコルチコステロンが ACTH 投与により急速に放出されたことに起因すると考えられた (Mohn *et al.*, 2005)。

結論として、前駆体を含む副腎ステロイドの血中濃度の変化を調べることで、薬物投与による副腎ステロイド合成への影響を、鋭敏かつ早期に検出できることが示された。加えて、上述したステロイドの一括測定の有用性は、ACTH の併用投与によりさらに高められることが示された。

Table 3-1. Groups assigned in Experiment 1

Group	KET dose level (mg/kg)	Number of animals	
		Single dose	Repeated dose
0.5% MC	0	5	5
	15	0	5
KET	50	0	5
	150	5	5

Table 3-2. Experimental schedule in Experiment 1

			Day											
			1		2		3		4-6		7		8	
Group		Before or after the dosing (BD/AD)	BD	AD	BD	AD	BD	AD	BD	AD	BD	AD	BD	AD
Single dose	Dosing	KET/MC	✓											
	Examination	Clinical sign	✓											
		Body weight	✓		✓									
		Blood sampling		✓✓✓										
		Necropsy				✓								
				(1, 3, 6h)										
					(24h)									
Repeated dose	Dosing	KET/MC	✓		✓		✓		✓		✓		✓	
	Examination	Clinical sign	✓		✓		✓		✓		✓		✓	
		Body weight	✓				✓							✓
		Blood sampling											✓✓✓	
		Necropsy											(1, 3, 6h)	
													✓	
													(24h)	

✓: Conducted; Numbers in parenthesis mean hours after last dosing.

Table 3-3. Groups assigned in Experiment 2

Group	KET dose level (mg/kg)	Number of animals	
		Saline	ACTH
0.5% MC	0	5	5
KET	150	5	5

Table 3-4. Experimental schedule in Experiment 2

		Day	1	
		Before or after the dosing of KET/MC (BD/AD)	BD	AD
Dosing	KET/MC		✓	
	ACTH/Saline			✓ (5h)
Examination	Clinical sign			✓ (6h)
	Body weight		✓	
	Blood sampling			✓ (6h)
	Necropsy			✓ (6h)

✓: Conducted; Numbers in parenthesis mean hours after KET/MC dosing.

Table 3-5. Organ weights

Group	Final body weight (g)	Adrenal glands		Thymus		
		AB (mg)	RE (%)	AB (g)	RE (%)	
Single dose						
KET 0 mg/kg/day (0.5% MC)	344 ± 16	55 ± 12	16.1 ± 3.3	0.59 ± 0.10	0.17 ± 0.02	
KET 150 mg/kg/day	339 ± 13	69 ± 7	20.3 ± 2.4	0.57 ± 0.11	0.17 ± 0.03	
Repeated dose						
KET 0 mg/kg/day (0.5% MC)	383 ± 26	54 ± 10	13.9 ± 1.7	0.56 ± 0.09	0.15 ± 0.03	
KET 15 mg/kg/day	375 ± 21	60 ± 5	16.1 ± 1.5	0.53 ± 0.10	0.14 ± 0.03	
KET 50 mg/kg/day	380 ± 25	63 ± 11	16.5 ± 2.7	0.51 ± 0.06	0.14 ± 0.01	
KET 150 mg/kg/day	363 ± 21	126 ± 25*	34.8 ± 2.7*	0.63 ± 0.07	0.17 ± 0.02	

Values are shown as the group mean ± standard deviation (N = 5).

AB = Absolute weight; RE = Relative weight to body weight.

* $p < 0.05$.

Table 3-6. Histopathological changes in the adrenal gland

Findings	Grade	KET (mg/kg/day)			
		0 (0.5%MC)	15	50	150
Single dose		5*	ND	ND	5
Hypertrophy, ZF/ZR	-	5			4
	±	0			1
Repeated dose		5	5	5	5
Hypertrophy, ZF/ZR	-	5	5	5	
	±	0	0	0	1
	+	0	0	0	3
	2+	0	0	0	1
Vacuolation, increased, ZF/ZR	-	5	5	2	0
	±	0	0	0	0
	+	0	0	3	0
	2+	0	0	0	3
	3+	0	0	0	2

ZF = Zona fasciculata; ZR = Zona reticularis.

Grade: - = Not remarkable; ± = Minimal; + = Mild; 2+ = Moderate; 3+ = Severe.

*: Number of animals; ND = Not done.

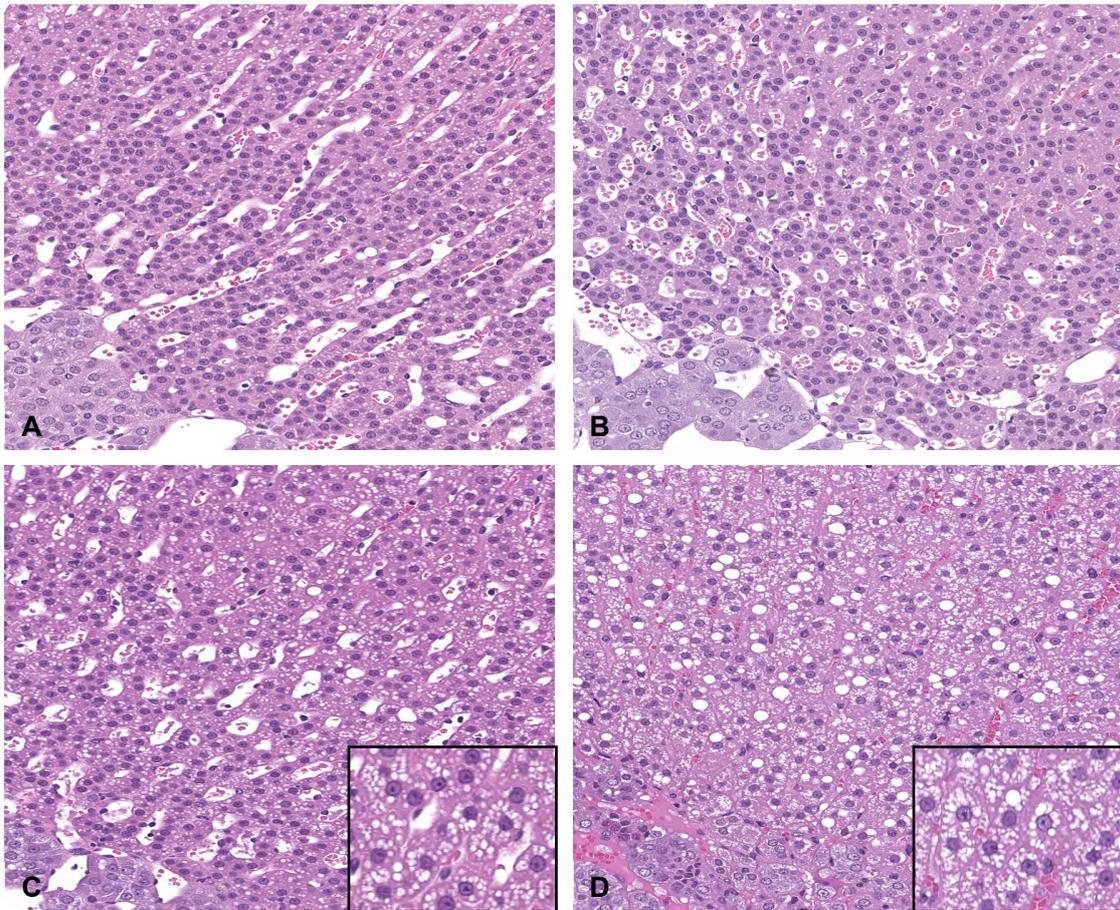


Figure 3-1. Histopathological images of the adrenal cortex of a rat from 0.5% MC (a), KET 15 mg/kg (b), 50 mg/kg (c) and 150 mg/kg (d) repeated-dose groups (HE stain). Insets show higher magnification of affected cells.

While there are no remarkable changes in the 0.5% MC and KET 15 mg/kg groups, vacuolation in the zona fasciculata/reticularis can be seen in KET 50 mg/kg and 150 mg/kg repeated-dose groups, as well as hypertrophy in the same area in KET 150 mg/kg repeated-dose group.

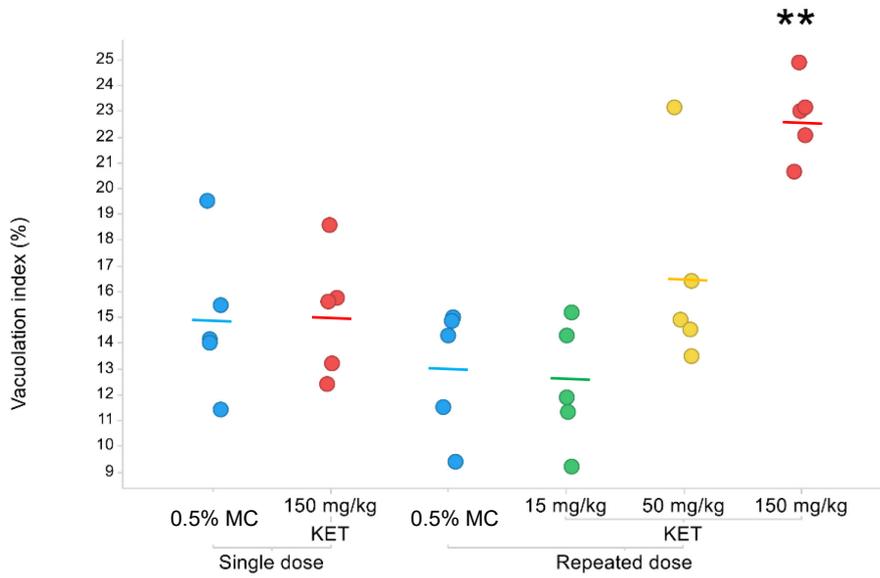


Figure 3-2. Vacuolation in the zona fasciculata/reticularis.

Each dot shows an individual value and each bar shows the mean (N = 5/group). (**) indicates statistically significant difference of the mean from that of the corresponding 0.5% MC group (** $p < 0.01$).

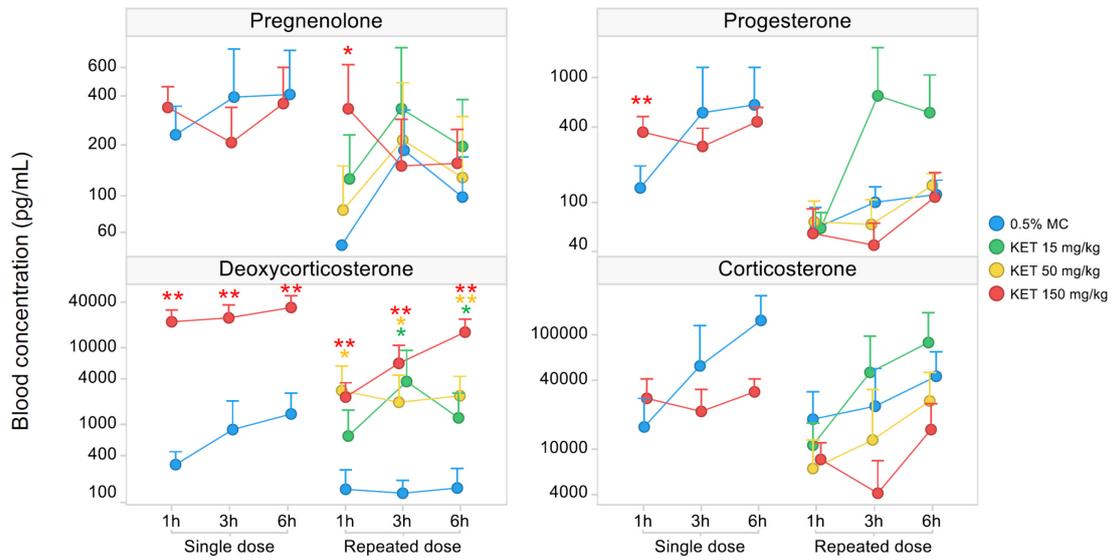


Figure 3-3. Blood levels of corticosterone and its precursors.

Each dot shows the mean at each time point and error bars show the standard deviation (N = 5/group).

(*) and (**) indicate statistically significant difference from the mean of the corresponding 0.5% MC group

(* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

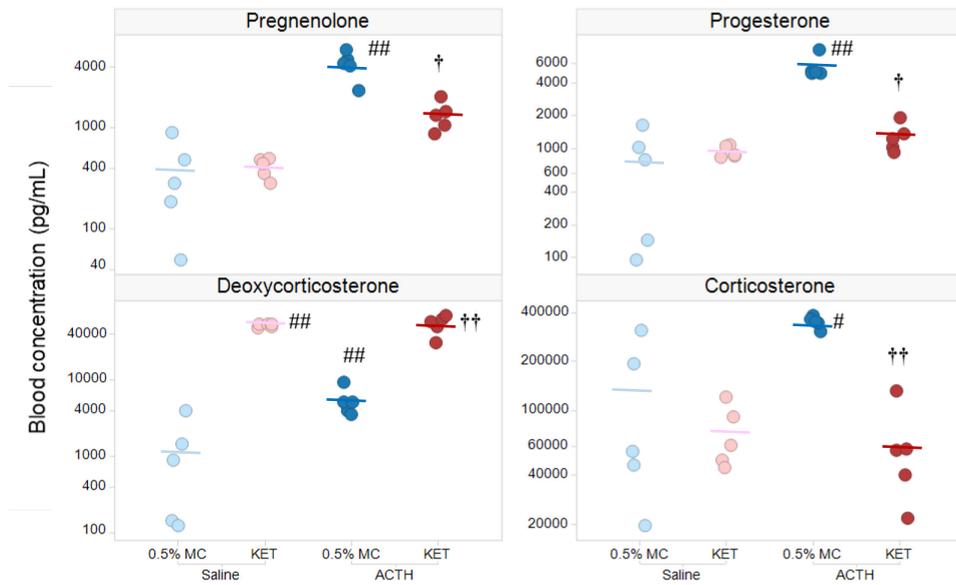


Figure 3-4. Blood levels of corticosterone and its precursors.

Each dot shows an individual value and each bar shows the mean (N = 5/group). (#) and (##) indicate statistically significant difference from the mean of the 0.5% MC with saline group ($\#p < 0.05$; $\##p < 0.01$). (†) and (††) indicate statistically significant difference from the mean of the 0.5% MC with ACTH group ($\dagger p < 0.05$; $\dagger\dagger p < 0.01$).

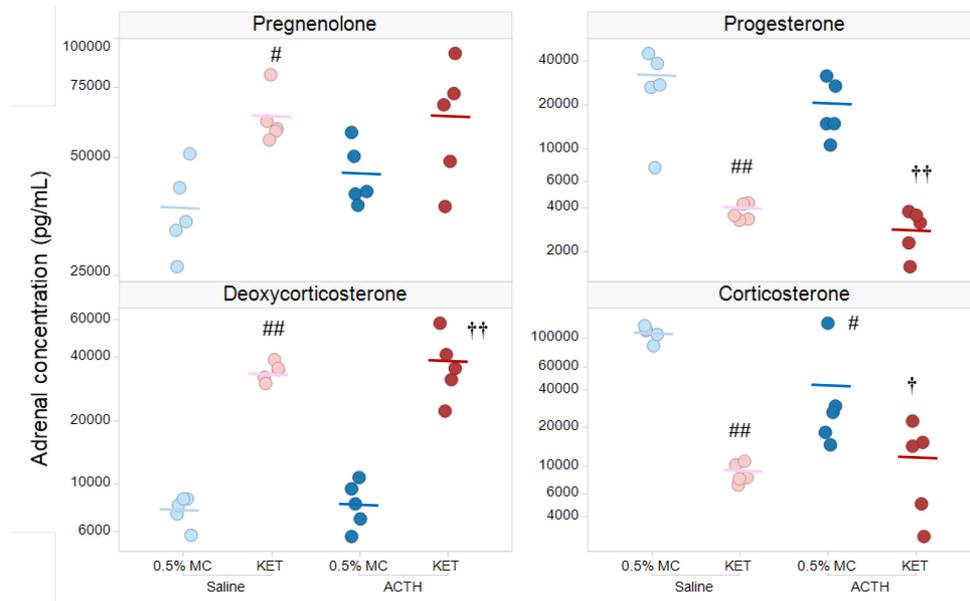


Figure 3-5. Adrenal levels of corticosterone and its precursors.

Each dot shows an individual value and each bar shows the mean (N = 5/group). (#) and (##) indicate statistically significant difference from the mean of the 0.5% MC with saline group ($\#p < 0.05$; $\#\#p < 0.01$). (†) and (††) indicate statistically significant difference from the mean of the 0.5% MC with ACTH group ($\dagger p < 0.05$; $\dagger\dagger p < 0.01$).

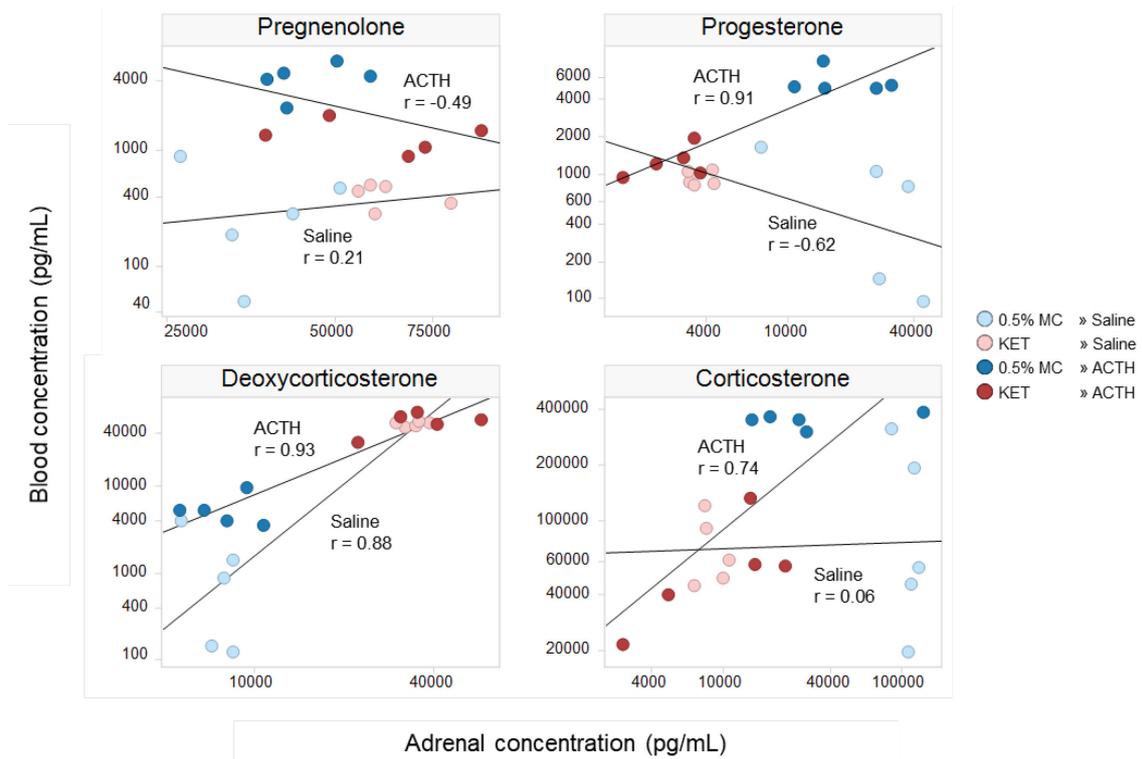


Figure 3-6. Correlation between the blood and adrenal levels of steroids.

Each dot shows an individual value (N = 5/group).

第四章 カニクイザルにおける副腎ステロイドおよびその前駆体の血中濃度の 生理学的小よび薬物誘発性変動

序

第一章から第三章までの研究では、ラットを用いて、前駆体を含むステロイドの血中濃度の一括測定が、副腎ステロイド合成に対する薬物の影響を鋭敏かつ早期に評価し、その機序を検討する上で有用な手法であること、また副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) の併用投与によりその有用性がさらに高められることを示した。しかしながら、ラットおよびマウスは非臨床安全性試験でげっ歯類として最も頻用される動物種であるが、これらの動物種の副腎は、束状帯/網状帯において CYP17 を発現せず、主要な糖質コルチコイドとしてコルチゾールではなくコルチコステロンを合成すること、またアンドロゲンの前駆体であるデヒドロエピアンドロステロン (DHEA) やアンドロステンジオンを合成しないことから特殊であると考えられている (Hanukoglu 1992; Hinson and Raven 2006; Inomata and Sasano 2015)。そのため、上述した一括測定法がラットやマウス以外の動物種に適用できるかどうかは不明であった。

本章では、薬物による副腎ステロイド合成への影響の評価法として、前駆体を含むステロイドの血中濃度一括測定の有用性を、ラット、マウス以外の動物種でも検証することを目的とし、薬物の非臨床安全性試験で非げっ歯類として頻用される、カニクイザルを用いた実験を実施した。カニクイザルではステロイドの血中濃度についての情報に乏しいため、まずは雌雄のカニクイザルを用いて、前駆体を含むステロイドの血中濃度の生理学的変化を調べた。次に、雄のカニクイザルを用いて、副腎ステロイド合成に影響する陽性対照薬物を投与した後、ステロイドの血中濃度を一括測定し、他の安全性評価指標とともに薬物投与による変化を調べた。

サルの副腎におけるステロイド合成経路を Figure 4-1 に示す。ヒトおよびサルの副腎は、ラットの副腎とは異なり、束状帯/網状帯において CYP17 を発現しており、主要な糖質コルチコイド

としてコルチゾールを合成し、またアンドロゲン前駆体である DHEA およびアンドロステンジオンを合成する (Hanukoglu, 1992; Hinson and Raven, 2006; Inomata and Sasano, 2015)。糖質コルチコイド合成は副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) によって促進される。ACTH は CYP 酵素、特に CYP11A の発現を促進し、コレステロールのプレグネノロンへの代謝を高める (Rosol *et al.*, 2001; Miller and Bose, 2011; Inomata and Sasano, 2015)。一方アルドステロン合成は、主にレニン-アンジオテンシン系によって制御されている (Cooke *et al.*, 1979; Rosol *et al.*, 2001)。

陽性対照薬物としては、CYP 酵素の非特異的阻害薬であるケトコナゾール、および CYP11B1 阻害薬であるメチラポンを用いた。いずれも副腎ステロイド合成を阻害する薬物であり、ラットを用いた第一章から第三章までの研究において、副腎ステロイドの血中濃度に顕著な変化を起こしたものである。測定対象ステロイドは、カニクイザルの主要な糖質コルチコイドであるコルチゾール、鉱質コルチコイドであるアルドステロン、アンドロゲンであるテストステロンおよびアンドロステンジオン、ならびにそれらの前駆体とした。

材料と方法

薬物

ケトコナゾールおよびメチラポンは、それぞれ東京化成工業(東京、日本)および Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ、米国) から購入した。

動物および飼育

実験 1 および 2 では、Simian Conservation Breeding and Research Center (マニラ、フィリピン) から購入した 4~5 歳齢のカニクイザルのうち、実験 1 では雌雄各 5 匹を、実験 2 では雄 4 匹を用いた。動物は、温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $60\pm 20\%$ および各 12 時間の明期 (8~20 時) / 暗期 (20~8 時) 周期に制御されたコンベンショナル飼育室において、ステンレス製のケージで個別に飼育した。

実験 3 では、Hainan Jingang Laboratory Animal (海南、中国) から購入した、8~9 歳齢の雄のカニクイザル 3 匹を使用した。動物は、温度 $18\sim 20^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 30~80% および各 12 時間の明期 (7~19 時) / 暗期 (19~7 時) 周期に制御されたコンベンショナル飼育室において、ステンレス製ケージで個別に飼育した。

動物には約 100 g の市販のペレット飼料 (PS-A、オリエンタル酵母、東京、日本)、およびリンゴ等のおやつを 1 日 1 回正午前に与え、水道水を自由に摂取させた。

動物実験

実験 1：血中ステロイド濃度の生理学的変化

採血初日 (採血 1 日目: Day 1) の 9、11、13 および 17 時に、各動物から約 1 mL の血液を、橈側皮静脈から採取した。採血 3、7 日目の 9 時にも、採血 1 日目と同様の方法で採血した。抗凝固剤としてヘパリンを用い、血液の遠心によって血漿を分離し、使用時まで -80°C で保存した。

実験2：血中ステロイド濃度および他の検査項目のケトコナゾール投与による変化

動物実験のスケジュールをTable 4-1に示す。

動物に 100 mg/kg のケトコナゾールを 1 日 1 回午前 10 時に、7 日間反復強制経口投与した。ケトコナゾールは 0.5%メチルセルロース溶液中に 20 mg/mL の濃度で懸濁し、投与容量は 5 mL/kg とした。用量はラットで使用した用量に基づいて設定した。

投与期間中毎日、投与前および投与直後、ならびに投与後 1~2 時間に一般状態を観察した。体重は、投与の初日（投与 1 日目：Day 1）、投与 4 日目の投与前、および剖検日（最終投与の翌日）に測定した。

ステロイド測定のため、投与開始前日（投与-1 日：Day -1）の 10、11、13 および 17 時、ならびに投与 1 日目と 7 日目の投与後 1、3、7 および 24 時間（それぞれ 11、13、17 時、および翌日の 10 時）に、各動物から 1.3 mL の血液を、橈側皮静脈から採取した。抗凝固剤としてヘパリンを用い、血液の遠心によって血漿を分離した。また血液生化学的検査のため、投与-1 日および剖検日の午前 10 時に各動物から 0.6 mL の血液を採取し、血清を分離した。血漿および血清試料は使用時まで-80°Cで保存した。

最終投与の翌日に採血した後、塩酸ケタミンの筋肉内投与およびペントバルビタールナトリウムの静脈内投与による深麻酔下で、放血により動物を安楽死させ、剖検を実施した。両側の副腎を摘出し、肉眼的に検査した後、10%中性緩衝ホルマリン（NBF）で固定した。

実験3：血中ステロイド濃度のメチラポン投与による変化

動物実験のスケジュールをTable 4-2に示す。

動物に、投与初日（投与 1 日目）の午前 9 時に 90 mg/kg のメチラポンを、また投与 2 日目の午前 9 時に 180 mg/kg のメチラポンを強制経口投与した。メチラポンは 0.5%メチルセルロース溶液中に 18 および 36 mg/mL の濃度で懸濁し、投与容量は 5 mL/kg とした。用量はメチラポンの臨床用量に基づいて設定した。

投与の前後、および採血の前に一般状態を観察した。また、投与 1 日目の投与前に体重を測定した。

ステロイド測定のために、投与開始前日（投与-1日）の 9、10、12 および 16 時、ならびに投与 1 日目、2 日目の投与後 1、3、7 および 24 時間（それぞれ 10、12、16 時および翌日の 9 時）に、各動物から 1.1 mL の血液を採取した。抗凝固剤としてヘパリンを用い、血液の遠心によって血漿を分離した。血漿試料は使用時まで -80°C で保存した。

上記の動物実験は大日本住友製薬の動物実験委員会による承認を受けた。

血液生化学的検査

実験 2 で採取した血清試料について、自動分析装置（JCA-BM1650、日本電子、東京、日本）を用いてグルコース、総コレステロール、トリグリセリド、リン脂質、ナトリウムおよびカリウム値を測定した。

病理組織学的検査

実験 2 では、10%NBF で固定した副腎をパラフィンに包埋し、薄切後、ヘマトキシリン・エオジン（HE）で染色し、光学顕微鏡で検査した。

ステロイドホルモンとその前駆体の血漿中濃度の測定

実験 1 および 2 では、血漿中のプレグネノロン、プロゲステロン、デオキシコルチコステロン、コルチコステロン、アルドステロン、17-ヒドロキシプレグネノロン（17-OH プレグネノロン）、17-ヒドロキシプロゲステロン（17-OH プロゲステロン）、デオキシコルチゾール、コルチゾール、DHEA、およびテストステロンの濃度を、タンデム質量分析計（Triple Quad 6500、AB Sciex、フラミンガム、マサチューセッツ、米国）と組み合わせた液体クロマトグラフ（Nexera、

島津製作所、京都、日本) (LC-MS/MS) を用いて、一括測定した。

実験3では、タンデム質量分析計 (QTRAP 5500、AB Sciex) と組み合わせた液体クロマトグラフ (Nexera) を用いて、プレグネノロン、17-OH プレグネノロンおよび DHEA を除く上記ステロイドの血漿濃度を一括測定した。

統計解析

実験2および3では、SAS v9.4 ソフトウェア (SAS Institute、ケリー、ノースカロライナ、米国) を用いて統計解析を行った。血液生化学的検査および血中ステロイド濃度について投与前後の値を、対応のある t 検定 (両側、有意水準 5%) を用いて比較した。血中ステロイド濃度については、Bonferroni 補正を用いた多重比較を行った。統計解析の前に、血中ステロイド濃度の値は対数変換した。また、定量下限 (LLOQ) 未満の血中ステロイド濃度の値は LLOQ/2 に設定した。実験2では、投与1日目の投与直後に1個体 (動物番号1) が投与液様の物質を嘔吐したため、同個体の投与1日目の血中ステロイド濃度は統計解析から除外した。

結果

実験1：血中ステロイド濃度の生理学的変化

日内変化

雌雄の血中ステロイド濃度の日内変化を Figure 4-2 に示す。テストステロンを除いて、性差は明らかではなかった。コルチコステロン、コルチゾール、およびそれらの前駆体の濃度は概して、11時にピークに達した後、13時まで減少し、17時までさらに減少するか、または再び増加した。コルチゾール濃度とは対照的に、アルドステロン濃度は9時に最も高く、11時または13時まで減少し、17時までにはさらに減少するか増加した。DHEA およびアンドロステンジオンの濃度はコルチゾール濃度と同様の变化傾向を示したが、テストステロン濃度には同様の傾向は認められなかった。

日間変化

雌雄の血中ステロイド濃度の日間変化を Figure 4-3 に示す。雄では、日間変化は日内変化ほど顕著ではなかった。雌では日間変化は雄に比較して大きかった。各ステロイド濃度の変化に個体間で一貫性は認められなかったが、各個体内では、アンドロステンジオン、テストステロンおよびアルドステロンを除いて、各ステロイドの濃度は相関する傾向が認められた。

実験2：ケトコナゾール投与による血中ステロイド濃度および他の検査項目の変化

状態、体重、および血液生化学的検査

ケトコナゾールの投与期間中、1個体（動物番号2）を除いて、散発的な嘔吐が認められた。特に1個体（動物番号1）は、投与1日目の投与直後に、投与液様物質を嘔吐した。いずれの動物にも体重への影響はなかった。血液生化学的検査において、いずれの動物にも明らかな変化は認められなかった（Table 4-3）。

剖検および病理組織学的検査

剖検ではいずれの動物にも明らかな変化は認められなかった。病理組織学的には、副腎網状帯細胞の空胞化が軽度増加した (Fig. 4-4)。空胞は、形態から脂肪滴と考えられた。束状帯または球状帯に明らかな変化は認められなかった。

血中ステロイド濃度

ケトコナゾール投与後の血中ステロイド濃度の変化を Figure 4-5 に示す。コルチコステロン濃度は投与 7 日目の投与後 3 時間で投与前と比べて有意に増加した。一方コルチゾール濃度は投与 7 日目の投与後 1 および 3 時間でわずかに減少した。アルドステロン濃度は投与 7 日目の投与後 24 時間で投与前より有意に減少した。

デオキシコルチコステロン濃度は、ケトコナゾール投与 1 日目の投与後 3 時間で投与前より増加する傾向が認められ、投与 7 日目の投与後 3 時間で投与前より有意に増加した。デオキシコルチゾール濃度は、投与 1 日目の投与後 3 時間で有意に増加したが、投与 7 日目に明らかな変化は認められなかった。また、デオキシコルチゾール濃度は投与 1 日目の投与後 24 時間で有意に減少したが、その変化は軽微であった。

プロゲステロンと 17-OH プロゲステロンの血中濃度は、投与 1 日目の投与後 1 時間で投与前と比べて有意に低かった。しかし、投与 1 日目の投与後 3、7 時間後と投与 7 日目の同じ時点で同様の傾向はみられなかったことから、その変化は偶発的なものと考えられた。

プレグネロン濃度は、投与 7 日目の投与後 3、7 および 24 時間で投与前より有意に増加した。

DHEA 濃度は投与 7 日目の投与後 1 時間でわずかに低かったが、偶発的なものと考えられた。

実験3：メチラポン投与による血中ステロイド濃度の変化

一般状態

180 mg/kg のメチラポン投与では、投与後約 30 分で 1 個体（動物番号 2）に嘔吐が認められた。

血中ステロイド濃度

メチラポン投与後の血中ステロイド濃度の変化を Figure 4-6 に示す。コルチコステロン、コルチゾール、およびアルドステロンの濃度は、90 または 180 mg/kg のメチラポン投与後 1 または 3 時間以降有意に減少した。コルチコステロンおよびコルチゾール濃度は投与後 24 時間で投与前の濃度に回復したが、アルドステロン濃度は減少したままであった。

デオキシコルチコステロンおよびデオキシコルチゾール濃度は、90 または 180 mg/kg のメチラポン投与後 1 時間以降有意に増加した。増加の程度は投与後 3 または 7 時間で最も大きく、それぞれ投与前に比較して 1000 倍および 100 倍を超えていた。その後、増加は投与後 24 時間までに収束する傾向を示したが、濃度は投与前と比較して依然として高かった。

プロゲステロンおよび 17-OH プロゲステロンの濃度は、90 または 180 mg/kg のメチラポン投与後 3 時間以降投与前より有意に増加した。また、アンドロステンジオン濃度は 90 mg/kg のメチラポン投与後 3 時間で有意に増加した。

考察

本章ではカニクイザルを用いて、副腎ステロイドとその前駆体の血中濃度について、生理学的変化および薬物誘発性の変化を調べた。

まず、雌雄のカニクイザルにおける血中ステロイド濃度の日内変動を調べたところ、概して、コルチコステロン、コルチゾール、およびそれらの前駆体の濃度は、午前遅くにピークに達し、午後には減少し、夕方まで低い濃度に留まるか、または再び増加した。ヒトやサルなどの昼行性の動物種では、血中の糖質コルチコイド濃度は活動期間の始め、すなわち朝にピークに達することが知られている (Umberkoman-Wiita *et al.*, 1981; Chung *et al.*, 2011)。これに対し、アルドステロン濃度は概して早朝に最も高く、正午まで減少し、夕方まで減少しつづけるかまたは再び増加した。ヒトでは、血中のアルドステロン濃度はコルチゾール濃度と同様の日内変動を示すが、前者は後者と異なり、主にレニン-アンジオテンシン系によって制御されることから、それらの間には時間的なずれがあることが知られている (Cooke *et al.*, 1979)。このように、カニクイザルは、ヒトと同様の血中ステロイド濃度の日内変化を示した。

副腎でも合成されるアンドロゲンである DHEA およびアンドロステンジオンの血中濃度は、副腎ステロイドの血中濃度と同様の日内変動傾向を示したが、テストステロンの血中濃度には同様の傾向は認められなかった。主に性腺で合成されるテストステロンと異なり、DHEA およびアンドロステンジオンの濃度には明らかな性差がなく、またテストステロン濃度がコルチゾール濃度よりも明らかに低かったことを考慮すると、カニクイザルでは DHEA およびアンドロステンジオンの血中濃度は、性腺ではなく、主に副腎での合成を反映していると考えられた。

次いで、血中ステロイド濃度の日間変化を雌雄で調べたところ、雄では日内変化ほど動的ではなかったが、雌では雄に比較して変化が大きかった。雌におけるこれらの日間変化は、発情周期の影響である可能性が考えられたが、エストロンまたはエストラジオール濃度との相関は明らかではなかった (データは示していない)。したがって、薬物投与による血中ステロイド濃度の変化を雌のカニクイザルを用いて評価する場合には、これらの日間変化を考慮する必要がある

ると考えられた。

さらに、雄を使用して、ケトコナゾールによって誘発される血中ステロイド濃度および他の検査項目の変化を調べた。ケトコナゾールは、CYP11A、CYP17、CYP21 および CYP11B1/2 を含む複数の CYP 酵素を非特異的に阻害する薬物である (Engelhard *et al.*, 1991; Johansson *et al.*, 2002; Hille *et al.*, 2011)。

病理組織学的には、ケトコナゾールの反復投与により、網状帯細胞の空胞化 (脂肪化) が認められた。束状帯/網状帯細胞の空胞化は、ケトコナゾールを投与したラットにおいても認められた変化であり、CYP11A の阻害に起因すると考えられた。

デオキシコルチコステロンおよびデオキシコルチゾールの血中濃度の増加または増加傾向が、ケトコナゾール投与 1 日目から認められた。一方、コルチゾール血中濃度の減少は投与 7 日目まで明らかではなく、変動幅もデオキシコルチコステロンより小さかった。第一章から第三章のラットを用いた研究では、ケトコナゾールは CYP11B1 阻害を介してデオキシコルチコステロン濃度を増加させたが、コルチコステロン濃度に対する影響は有意ではなかった。またヒトでは、ケトコナゾールの投与がデオキシコルチコステロンとデオキシコルチゾールの血中濃度を増加させる一方で、コルチゾールの血中濃度に対する影響は一貫しないことが報告されている (Engelhardt *et al.*, 1985)。このように、ケトコナゾール投与ラットにおける副腎の病理組織学的変化および血中ステロイド濃度の変化はカニクイザルにおいても再現され、とくに血中ステロイド濃度の変化はケトコナゾールを投与したヒトにおける変化と類似していた。これらの結果は、デオキシコルチコステロンおよびデオキシコルチゾールの血中濃度が、動物種にかかわらず、ケトコナゾール投与による副腎ステロイド合成阻害の鋭敏なマーカーであることを示唆している。

アルドステロンの血中濃度は、ケトコナゾール投与 7 日目の投与後 24 時間に減少した。今回血中濃度の増加が認められたデオキシコルチコステロンは、鉍質コルチコイド活性を有しており、負のフィードバックを介してレニン合成を抑制し、二次的にアルドステロン合成を抑制する

ことが知られている (Nimkarn and New, 2008)。今回認められたアルドステロンの血中濃度の減少は、ケトコナゾールの CYP11B1/2 阻害作用による直接的なアルドステロン合成阻害、ならびにデオキシコルチコステロンの増加による二次的なアルドステロン合成抑制に起因した可能性が考えられた。

プレグネノロンの血中濃度はケトコナゾール投与 7 日目に増加した。これは、ケトコナゾールの CYP に対する影響が可逆的であること (Yan *et al.*, 2002)、CYP11A に対する影響が CYP11B1 に対する影響よりも弱いこと、およびプレグネノロン合成が副腎ステロイド合成の律速段階であり、ACTH によって急速に促進されること (Rosol *et al.*, 2001; Miller and Bose, 2011) を考慮すると、コルチゾール濃度の減少に対する代償性変化と考えられた。なお、コルチコステロン濃度も投与 7 日目の投与後 3 時間で増加した。ケトコナゾール投与によるコルチコステロン血中濃度の増加はヒトでも報告されているが (Engelhardt *et al.*, 1985)、その機序は不明である。

メチラポンは、ケトコナゾールよりも特異的に CYP11B1 を阻害する薬物である (Johansson *et al.*, 2002; Hille *et al.*, 2011)。ケトコナゾールと同様、メチラポンの投与はデオキシコルチコステロンおよびデオキシコルチゾールの血中濃度を増加させたが、コルチコステロンとコルチゾールの濃度は減少させた。メチラポン投与によるデオキシコルチコステロンおよびデオキシコルチゾール濃度の増加は、ラットおよびヒトでも報告されている (Schöneshöfer *et al.*, 1980; Koal *et al.*, 2012)。したがって、デオキシコルチコステロンおよびデオキシコルチゾール濃度は、カニクイザル、ラットおよびヒトで、CYP11B1 阻害の鋭敏なマーカーとなることが示唆された。

アルドステロン濃度は、おそらくはケトコナゾールと同じ機序により、メチラポン投与 1 日目から減少した。これに対し、プロゲステロン、17-OH プロゲステロン、およびアンドロステンジオンの濃度は、メチラポン投与後に有意に増加した。メチラポン投与によるプロゲステロンおよび 17-OH プロゲステロン濃度の増加は、コルチゾール濃度の減少に対する代償性変化と考えられた。なお、CYP11B1 欠損症の患者では、コルチゾールによる負のフィードバックの減少により、下垂体からの ACTH 分泌が増加し、17-OH プロゲステロンを含むステロイド前駆体が増

加すること、増加した前駆体の一部がアンドロゲン合成経路に流入し、男性化を引き起こすことが知られている (White *et al.*, 1994; Nimkarn and New, 2008)。

カニクイザル、ラットおよびヒトにおける、ケトコナゾールおよびメチラポン投与による血中ステロイド濃度の変化を Table 4-4 に要約した。カニクイザルの変化パターンは、ヒトの変化パターンと概ね一致していたが、ラットの変化パターンとは異なっていた。一方、CYP11B1 阻害の結果と考えられるデオキシコルチコステロンの増加はカニクイザルとラットで共通していた。これらの結果は、本研究で用いた手法が、副腎ステロイド合成に対する薬物投与の影響を鋭敏に検出し、その機序を検討するために、動物種によらず使用できることを示唆する。

本章では、前駆体を含む副腎ステロイドの血中濃度の一括測定は、ラットと同様カニクイザルにおいても、副腎ステロイド合成に対する薬物の影響を鋭敏に評価し、薬物の作用機序を検討する上で、有用な方法となることが示された。

Table 4-1. Experimental schedule in Experiment 2

	Day	-1		1		2		3		4		5-6		7		8	
	Before or after the dosing (BD/AD)			BD	AD	BD	AD	BD	AD	BD	AD	BD	AD	BD	AD	BD	AD
Ketoconazole dosing				✓		✓		✓		✓		✓		✓		✓	
Clinical sign				✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
					(0, 1- 2h)		(0, 1- 2h)		(0, 1- 2h)		(0, 1- 2h)		(0, 1- 2h)		(0, 1- 2h)		(0, 1- 2h)
Body weight				✓						✓							✓
Blood sampling		✓✓✓		✓	✓✓✓	✓										✓✓✓	✓
					(1, 3, (24h) 6h)											(1, 3, (24h) 6h)	(24h)
Necropsy																	✓ (24h)

✓: Conducted; Numbers in parenthesis mean hours after last dosing.

Table 4-2. Experimental schedule in Experiment 3

	Day	1		2		3
	Before or after the dosing (BD/AD)	BD	AD	BD	AD	
Metyrapone dosing			✓		✓	
Clinical sign		✓	✓✓✓✓ (0, 1, 3, 7h)	✓	✓✓✓✓ (0, 1, 3, 7h)	✓ (24h)
Body weight		✓				
Blood sampling	✓✓✓✓		✓✓✓ (1, 3, 7h)	✓ (24h)	✓✓✓ (1, 3, 7h)	✓ (24h)

✓: Conducted; Numbers in parenthesis mean hours after last dosing.

Table 4-3. Blood biochemistry before and after 7-day repeated dosing of ketoconazole

Test item	Unit	Day -1	Day 8
Glucose	mg/dL	50 ± 8	60 ± 9
Total cholesterol	mg/dL	103 ± 20	96 ± 24
Triglyceride	mg/dL	30 ± 10	33 ± 13
Phospholipid	mg/dL	144 ± 29	145 ± 37
Sodium (Na)	mEq/L	149 ± 2	149 ± 1
Potassium (K)	mEq/L	4.4 ± 0.6	4.2 ± 0.2

Values are shown as the mean ± standard deviation (N = 4).

Table 4-4. Drug-induced changes in blood steroid levels observed in cynomolgus monkeys, rats and humans

Drug	Cynomolgus monkey	Rat	Human*
Ketoconazole	Deoxycorticosterone↑	Deoxycorticosterone↑	Deoxycorticosterone↑
	Deoxycortisol↑		Deoxycortisol↑
	Pregnenolone↑		
	Corticosterone↑		Corticosterone↑
	Cortisol↓		Cortisol↓
	Aldosterone↓		
Metyrapone	Deoxycorticosterone↑	Deoxycorticosterone↑	Deoxycorticosterone↑
	Deoxycortisol↑		Deoxycortisol↑
	Progesterone↑	Progesterone↑	Progesterone↑
	17-OH progesterone↑		17-OH progesterone↑
	Androstenedione↑		
	Corticosterone↓		Corticosterone↓
	Cortisol↓		Cortisol↓
Aldosterone↓		Aldosterone↓	

↑ = Increase; ↓ = Decrease; Note that steroids measured are not consistent among species.

*: Engelhardt *et al.*, 1985; Schöneshöfer *et al.*, 1980; Koal *et al.*, 2012

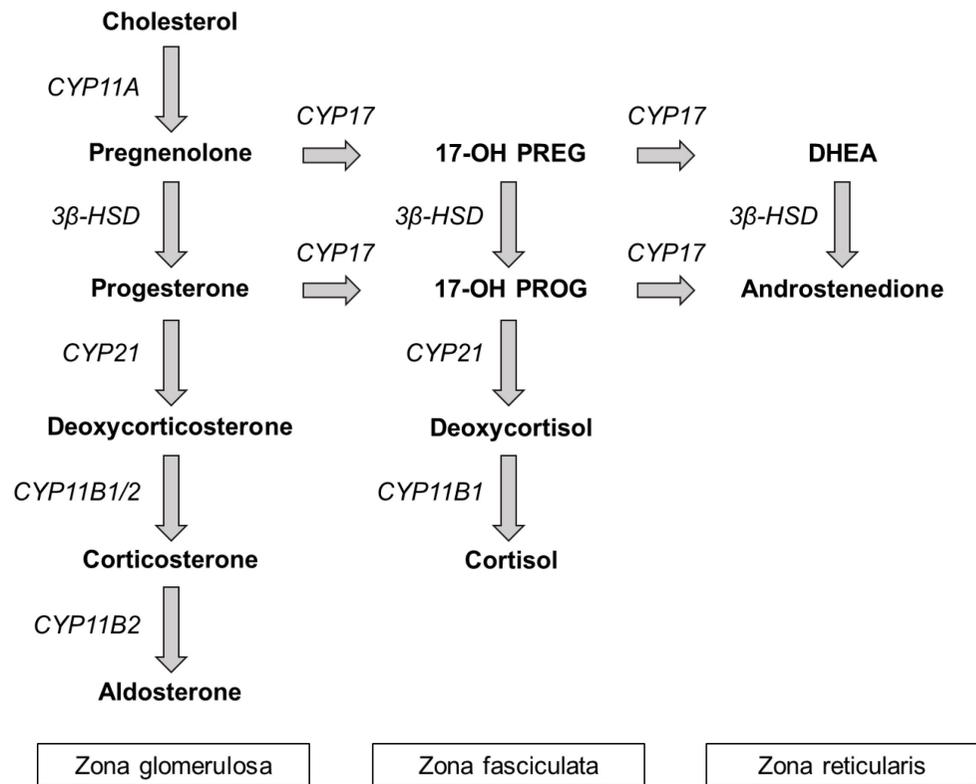


Figure 4-1. Steroidogenic pathway in the monkey adrenal gland.

Enzymes are in italics, hormones are in bold, and arrows indicate the direction of metabolism. HSD = hydroxysteroid dehydrogenase.

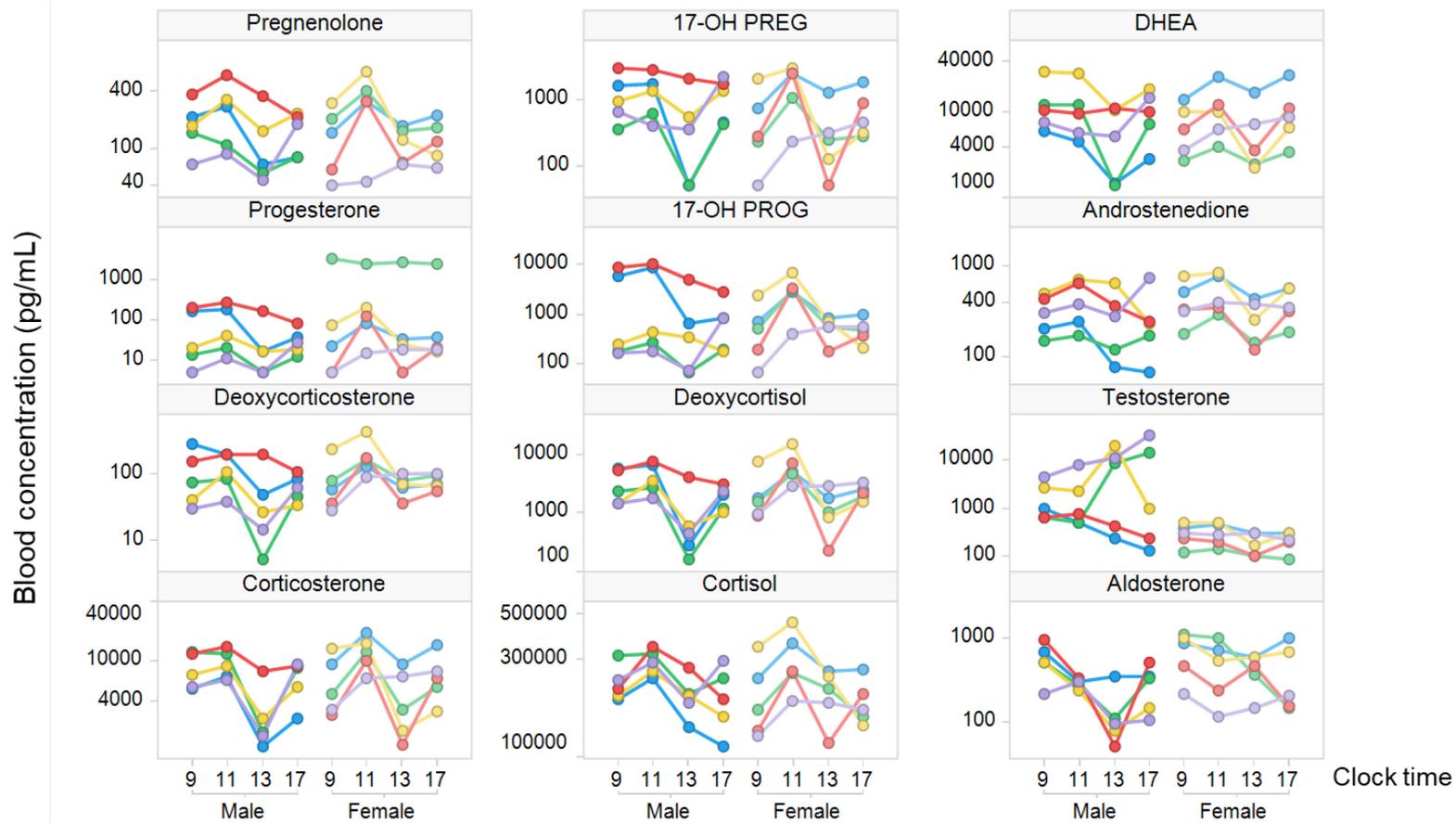


Figure 4-2. Blood steroid levels in male and female monkeys at different time points within a day.

Each dot shows an individual value at a time point (N = 5/sex). The Y-axis is logarithmic. 17-OH PREG = 17-OH pregnenolone; 17-OH PROG = 17-OH progesterone.

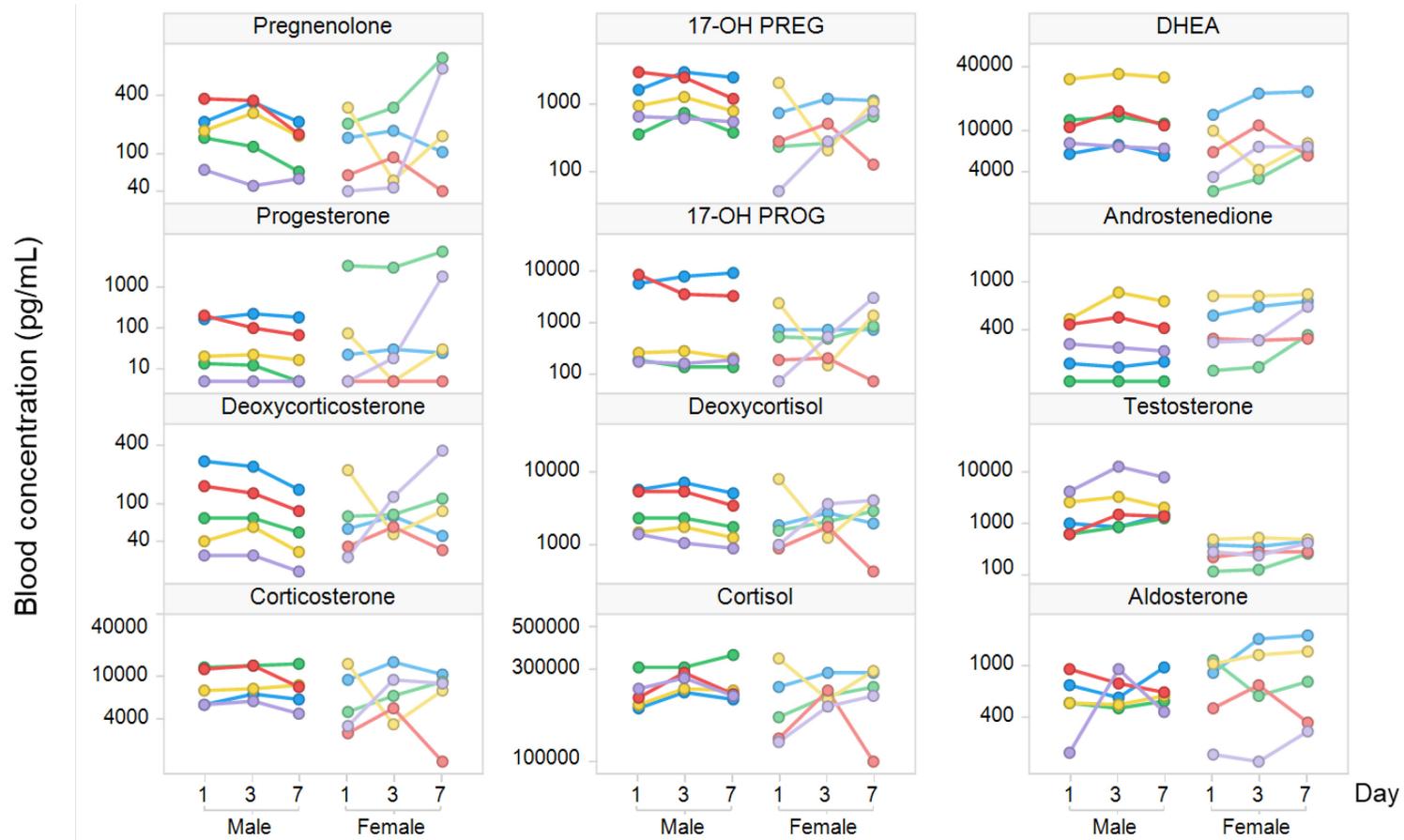


Figure 4-3. Blood steroid levels in male and female monkeys at the same time point (9 a.m.) on different days within a week.

Each dot shows an individual value on a given day (N = 5/sex). The Y-axis is logarithmic.

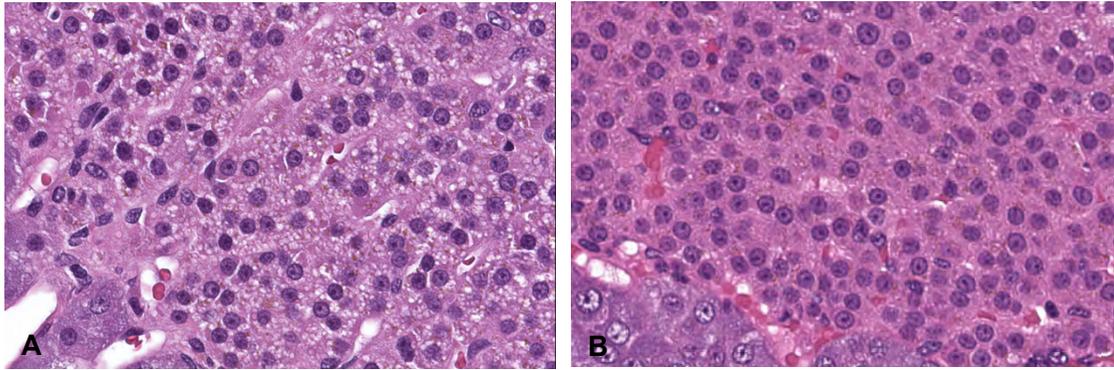


Figure 4-4. Histopathology of the adrenal gland in a ketoconazole-treated male (A) and an age-matched normal male (B) monkeys.

The medulla and zona reticularis are shown in the lower left and upper right, respectively. Cells in the zona reticularis are minimally vacuolated in the ketoconazole-treated animal, compared to those in the normal animal.

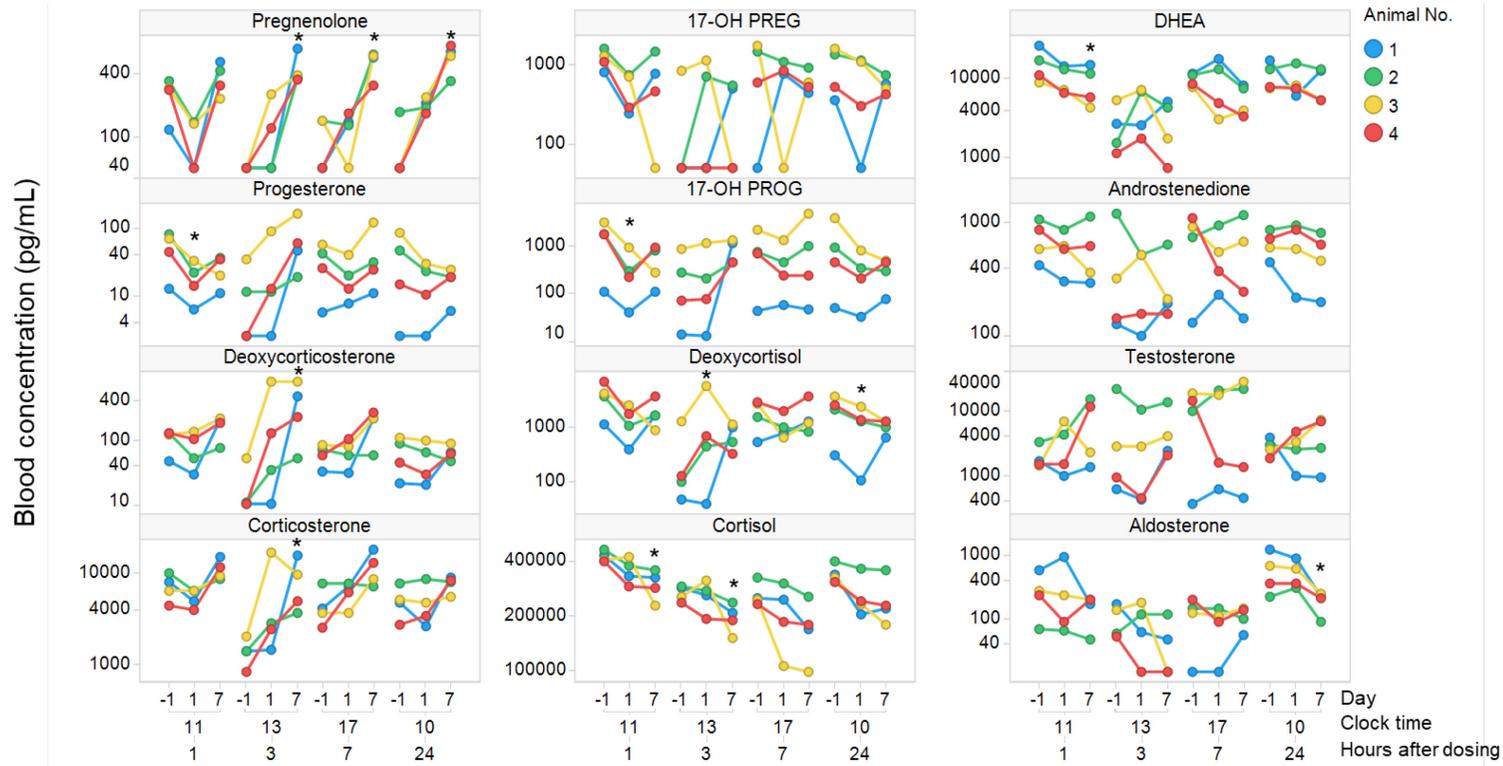


Figure 4-5. Blood steroid levels in male monkeys after a single or 7-day repeated dosing of ketoconazole.

Each dot shows an individual value at a time point on a given day (N = 4). The Y-axis is logarithmic. (*) indicates statistically significant difference from the values on Day -1 of dosing ($p < 0.05$). Note that animal No. 1 vomited test compound-like substance just after the dosing on Day 1, and the values for this animal on Day 1 were excluded from the statistical analysis.

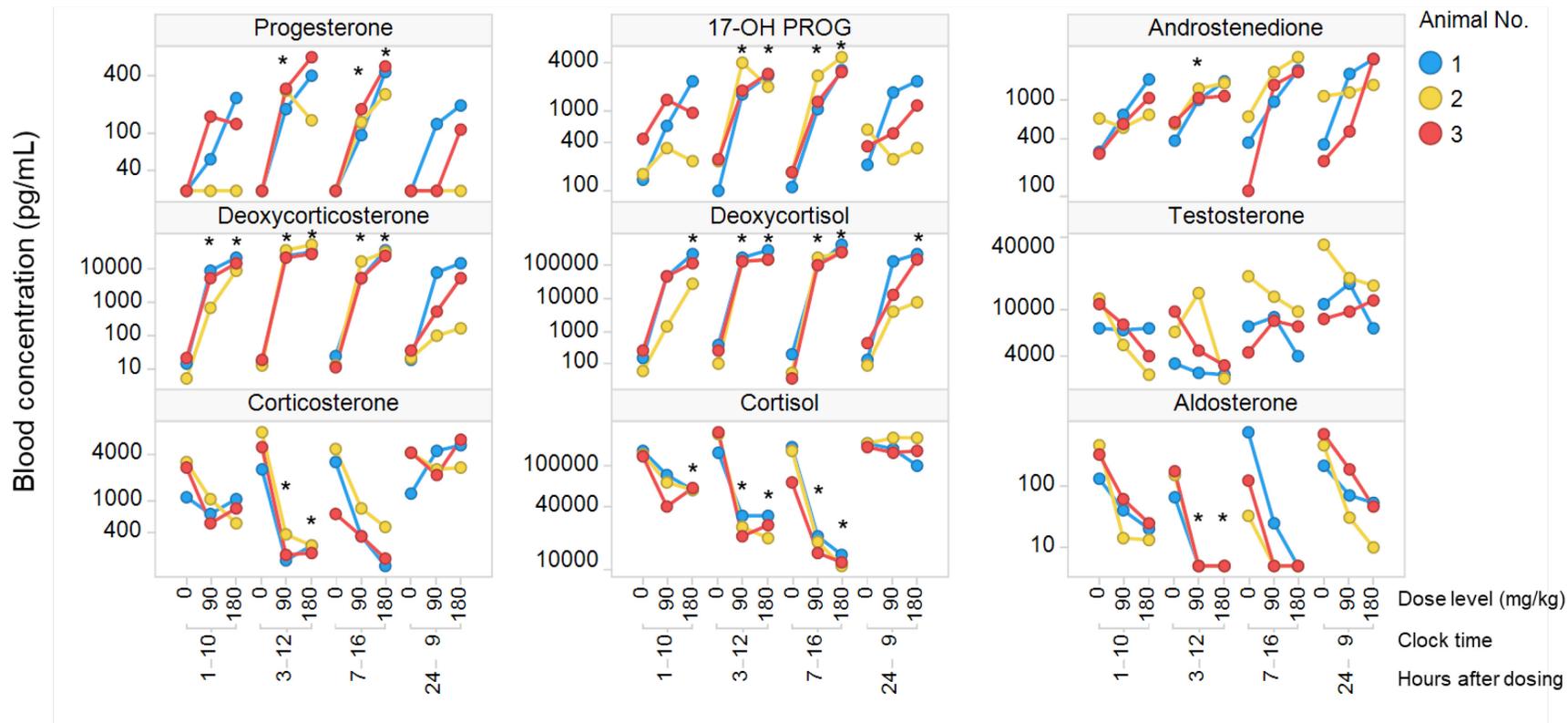


Figure 4-6. Blood steroid levels in male monkeys after a single dosing of metyrapone at 90 and 180 mg/kg.

Each dot shows an individual value at a time point on a given day (N = 3). The Y-axis is logarithmic. (*) indicates statistically significant difference from the pre-dosing values ($p < 0.05$).

総括

本研究では、質量分析を用いた血中ステロイド濃度の一括測定について、薬物投与による副腎ステロイド合成への影響の評価法としての有用性を検討した。

第一章では、CYP 酵素の非特異的阻害により副腎ステロイド合成を阻害するケトコナゾールをラットに投与した後、ラットの主要な糖質コルチコイドであるコルチコステロン、およびその前駆体であるデオキシコルチコステロン、progesterone、pregnenoloneの血中濃度を質量分析法で一括測定し、それらの血中濃度変化と副腎の病理組織学的変化、ならびにステロイド合成酵素の遺伝子発現変化との関連性を調べた。ケトコナゾール投与ラットでは、対照群と比較して副腎重量は増加し、病理組織学的には副腎束状帯/網状帯の細胞肥大および脂肪滴の蓄積が認められた。また、副腎ステロイド合成の律速酵素である CYP11A1 の副腎 mRNA 量は、対照群と比較してわずかに増加した。血中のデオキシコルチコステロン濃度は顕著に増加したが、コルチコステロン、progesterone、およびpregnenolone濃度に明らかな変化は認められなかった。これらの変化は、ケトコナゾール投与による CYP11B1 阻害を介した、デオキシコルチコステロンからコルチコステロンへの代謝の抑制、ならびにその代償性変化を反映したものと考えられた。以上の結果から、前駆体を含む血中副腎ステロイドの一括測定は、薬物投与による副腎ステロイド合成への影響を鋭敏に反映し、その作用機序を検討する上で、有用な手法となることが示された。

第二章では、種々の機序により副腎ステロイド合成に影響する複数の薬物をそれぞれラットに投与し、前駆体を含む副腎ステロイド（コルチコステロン、デオキシコルチコステロン、progesteroneおよびpregnenolone）の血中濃度の変化と血液生化学的变化、副腎の病理組織学的変化を調べた。投与薬物として、リン酸トリクレジル(中性コレステロールエステラーゼ阻害薬)、アミノグルテチミド (CYP11A 阻害薬)、トリロスタン (HSD3B 阻害薬)、メチラポン (CYP11B1 阻害薬)、ケトコナゾール (CYP11B1 を含む CYP 阻害薬)、ミフェプリストン (グルココルチコイド受容体阻害薬) を用いた。トリロスタン、メチラポン、ケトコナゾール投与群では、血中の

前駆体ステロイドの濃度が対照群と比較して顕著に増加し、一方でコルチコステロンの濃度に有意な変化は認められなかった。したがって、前駆体ステロイドの血中濃度変化は副腎ステロイド合成に対する影響を評価する上で、最終産物であるコルチコステロンよりも鋭敏なマーカーとなることが示された。また各薬物の投与により血中濃度が増加した前駆体ステロイドは、投与薬物の標的となる酵素によって代謝されるものであり、血中ステロイド濃度の増加は投与薬物の作用機序を反映していた。さらに、血液生化学的変化および副腎の病理組織学的変化も、投与薬物の作用機序ごとに異なるパターンを示した。これらの結果から、前駆体を含む血中副腎ステロイドの一括測定は、薬物投与による副腎ステロイド合成への影響を鋭敏に反映し、またその作用機序を検討する上で、有用な手法となることを示すことができた。

第三章では、ケトコナゾール投与ラットにおいて、前駆体を含む副腎ステロイド（コルチコステロン、デオキシコルチコステロン、progesteroneおよびpregnenolone）の血中濃度について、ケトコナゾールの用量依存性および経時的な変化、並びに副腎の病理学的変化との関連を調べた。また、ケトコナゾールの単独投与では、デオキシコルチコステロン以外のステロイドの血中濃度の変化が検出できなかったことから、副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）投与と併用することで血中濃度変化を検出できるか否かを調べた。さらに、ステロイドの血中濃度と副腎濃度との相関も調べた。その結果、ケトコナゾールの投与は、副腎の病理組織学的変化（束状帯/網状帯の細胞肥大および脂肪滴蓄積）が明らかではない用量、時点においても、デオキシコルチコステロンの血中濃度を増加させた。さらに、ACTHの併用投与により、ケトコナゾール投与によるコルチコステロン、progesteroneおよびpregnenoloneの血中濃度の変化が明瞭となった。また、ステロイドの血中濃度は、副腎濃度とほぼ相関した。以上のことから、前駆体を含む副腎ステロイドの血中濃度変化の観察は、ケトコナゾール投与の際の副腎ステロイド合成への影響を、鋭敏かつ早期に検出し、かつステロイドの副腎濃度変化を反映することが示された。加えて、上述した血中ステロイド一括測定の有用性は、ACTHの併用投与によりさらに高められることも示された。

第四章では、非臨床安全性試験で非げっ歯類として頻用されるカニクイザルを用いて、コルチゾール、アルドステロン、アンドロゲンおよびそれらの前駆体を含む副腎ステロイドの血中濃度について、生理学的変化、およびケトコナゾール（CYP11B1を含むCYP阻害薬）ならびにメチラポン（CYP11B1阻害薬）投与による変化を調べた。カニクイザルの血中ステロイド濃度はヒトと同様の日内変動を示し、コルチゾールおよびその前駆体の血中濃度は、午前遅くにピークに達した後、午後には減少した。一方、日間変動は、とくに雄で日内変動に比較して小さかった。ケトコナゾールとメチラポン投与はいずれも、ラット、ヒトと同様カニクイザルでも、副腎ステロイドの前駆体であるデオキシコルチコステロンおよびデオキシコルチゾールの血中濃度を顕著に増加させた。その増加は、最終産物であるコルチゾール濃度の減少よりも早期に生じ、かつ変動幅はより大きかった。この変化はCYP11B1の阻害によるものと考えられた。また、アルドステロンやアンドロゲンなどのコルチゾール以外のステロイドの血中濃度にも、投与薬物の作用機序を反映した変化が認められた。これらの結果から、前駆体を含む副腎ステロイドの血中濃度一括測定は、カニクイザルにおいてもラットと同様に薬物投与の副腎ステロイド合成への影響を鋭敏に評価し、薬物の作用機序を検討する上で、有用な手法となることが示された。

一連の実験において、今回用いた測定法では、血漿として50 μ L程度と少量の試料であっても、前駆体を含む複数のステロイドの濃度を特異的に、かつ感度よく測定することが可能であった。非臨床安全性試験で最も頻用される動物種であるラットでは、24時間以内の採血許容量が1.2~2.4 mL程度（体重が250 gの場合）と、採取できる試料の量に限りがある。本測定法ではラットにおいても、第三章で示されたように、動物への負荷を抑えつつ、同一動物で短期間のうちに反復的、経時的な測定が可能であり、これによりステロイドの変動プロファイルのより詳細な把握とともに、使用する動物数ならびに動物実験に必要な被験物質量の削減にも寄与すると考えられる。

また今回、ステロイドの一括測定により、薬物投与により前駆体ステロイドの血中濃度が顕著に増加すること、またこの変化が投与薬物の作用機序を反映することが明らかとなった。この

ことから、未知の作用機序により副腎ステロイド合成に影響する薬物であっても、本手法を用いてステロイド濃度の変動プロファイルを把握することで、その機序についての推測が可能になると考えられる。機序解明により薬物の標的分子が明らかとなることで、*in silico*、*in vitro*などのより簡便な副腎毒性スクリーニング評価系の探索・構築や、認められた変化のヒトへの外挿性の考察にも寄与すると考えられる。さらに今回、血液生化学的検査や病理組織学的検査などの標準的な毒性評価項目においても、CYP11A 阻害に伴う血中コレステロール濃度の高値や副腎皮質の脂肪化、CYP11B1 阻害に伴う血中デオキシコルチコステロン濃度の高値とこれに起因すると考えられる血中カリウム濃度の低値など、投与薬物の作用機序を反映した変化パターンがみられたことは興味深い。コルチコステロン、コルチゾールなどの最終産物の低下だけでなく、それらの前駆体の過剰が及ぼす影響についても考察することが可能となり、非臨床安全性試験で認められた変化について、リスクをより正確に評価することにつながると思われる。

なお本研究では、ラットおよびサルのおよびいずれにおいても、薬物の影響は雄の動物を用いて評価したが、副腎ステロイド合成の経路は雌雄で共通であることから、雌動物でも評価は可能と考えられる。しかしながら、第四章で示されたように、雌動物では雄に比較して、発情周期の影響と考えられる血中ステロイド濃度の生理学的変化が大きい。このことから、薬物の影響を雌動物で評価する場合には、ステロイド濃度の測定時点の設定や結果の考察にあたって、生理学的変化の影響を考慮する必要がある。

また、今回研究に用いた動物種はラットおよびサルであるが、非臨床安全性試験で他に用いられる動物種であるイヌや、さらにはヒトにおいても、副腎ステロイドの合成経路はサルと共通しており、ラットとも一部共通している。このことから、本手法により非臨床安全性試験で見出した安全性バイオマーカー候補は、ヒトを含めて広く利用できる可能性が示唆される。実際、第四章で示されたように、薬物投与後の血中ステロイド濃度には、ラット、サル、およびヒトで共通する変化が認められた。従来、コルチコステロンやコルチゾール単体の測定では、副腎におけ

るステロイド合成の変化を検出することは困難であったが、今回示されたように、前駆体ステロイドは、副腎ステロイド合成への影響を鋭敏かつ早期に反映するバイオマーカーとなりうる。臨床試験で安全性バイオマーカーとして用いるにあたっては、当該バイオマーカーのヒトにおける正常範囲の把握やカットオフ値の設定、試料中安定性の確認を含む分析バリデーションなど、さらなるデータの蓄積が必要ではあるものの、副腎ステロイド合成に影響する可能性のある薬物について、薬物の影響を非侵襲的かつ感度よくモニターし、リスクを管理して臨床試験を安全に進める上で、有用な手段となることが示唆される。

以上のように、質量分析を用いた血中ステロイド濃度の一括測定は、薬物の非臨床安全性試験で頻繁に用いられる動物種である、ラットおよびマウスのいずれにおいても、薬物投与の副腎ステロイド合成への影響を鋭敏に評価し、またその作用機序を検討する上で、有用な手法となることが示された。本手法を、薬物による副腎への影響に関する機序検討や、非臨床および臨床試験における安全性バイオマーカー探索に応用することで、确实・効率的なスクリーニング法、またはリスク管理法の確立を実現し、薬物開発の加速、ひいては新たな疾患治療の一助となることが期待される。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究に終始暖かいご指導とご教示を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科 獣医病理学研究室 中山裕之教授、内田和幸准教授に深く敬意を表し感謝します。

また、本研究の機会を与えていただくとともに温かいご理解とご鞭撻を賜りました大日本住友製薬 船橋斉博士、坂東清子博士、宮脇出博士、山田徹博士に厚く御礼申し上げます。さらに、本研究の実施にあたり実験にご協力いただきました山下晃人氏、松本泉美氏、河内眞美氏、藤井雄太氏、立石湯美氏、国遠かおり氏、三瀬いずる氏、阿部健太郎氏、佐々木靖弘氏を始めとする大日本住友製薬 前臨床研究ユニット員の皆様、住化分析センター、化合物安全性研究所、ならびに LSI メディエンスの皆様感謝の意を表します。

参考文献

1. Anadón, A., Martínez-Larrañaga, MR., Ares, I. and Martínez MA., Biomarkers of Drug Toxicity and Safety Evaluation, In Gupta, RC., editor. Biomarkers in Toxicology. 2nd ed. San Diego: Academic Press; 2019. P. 655-691.
2. Atkinson, HC. and Waddell, BJ. (1997): Circadian variation in basal plasma corticosterone and adrenocorticotropin in the rat: sexual dimorphism and changes across the estrous cycle. *Endocrinology*, 138, 3842-3848.
3. Bose, HS., Sugawara, T., Strauss, JF 3rd. and Miller, WL. (1996): The pathophysiology and genetics of congenital lipoid adrenal hyperplasia. *N. Engl. J. Med.*, 335, 1870-1878.
4. Brändli-Baiocco, A., Balme, E., Bruder, M., Chandra, S., Hellmann, J., Hoenerhoff, MJ., Kambara, T., Landes, C., Lenz, B., Mense, M., Rittinghausen, S., Satoh, H., Schorsch, F., Seeliger, F., Tanaka, T., Tsuchitani, M., Wojcinski, Z. and Rosol, TJ. (2018): Nonproliferative and Proliferative Lesions of the Rat and Mouse Endocrine System. *J. Toxicol. Pathol.*, 31 (3 Suppl); 1S-95S.
5. Briggs, K., Barber, C., Cases, M., Marc, P., and Steger-Hartmann, T. (2015): Value of shared preclinical safety studies - The eTOX database. *Toxicol. Rep.*, 2, 210-221.
6. Burrin, JM., Yeo, TH., Ashby, MJ., and Bloom, SR. (1986): Effect of ketoconazole on adrenocorticotrophic hormone secretion in vitro and in vivo. *J. Endocrinol.*, 108: 37-41.
7. Capen CC. Toxic response of the endocrine system. In Klaassen, C., editor. Casarett & Doull's toxicology: The basic science of poisons. 7th ed. New York: McGraw-Hill Professional; 2007. p. 807-880.
8. Cavanah, SF. and Dons, RF. (1993): Partial 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency presenting as new-onset gynecomastia in a eugonadal adult male. *Metabolism*, 42, 65-68.
9. Charmandari, E., Nicolaides, NC. and Chrousos, GP. (2014): Adrenal insufficiency. *Lancet*, 383: 2152-2167.

10. Chung, S., Son, GH. and Kim, K. (2011): Circadian rhythm of adrenal glucocorticoid: its regulation and clinical implications. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1812, 581-591.
11. Colby, HD., Skelton, FR. and Brownie, AC. (1970): Metopirone-induced hypertension in the rat. *Endocrinology*, 86, 620-628.
12. Cook, D., Brown, D., Alexander, R., March, R., Morgan, P., Satterthwaite, G. and Pangalos, MN. (2014): Lessons learned from the fate of AstraZeneca's drug pipeline: a five-dimensional framework. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 13: 419-431.
13. Cooke, CR., Whelton, PK., Moore, MA., Caputo, RA., Bledsoe, T. and Walker, WG. (1979): Dissociation of the diurnal variation of aldosterone and cortisol in anephric subjects. *Kidney Int.*, 15, 669-675.
14. Elmore, SA. (2012): Enhanced histopathology of the immune system: a review and update. *Toxicol. Pathol.*, 40, 148-156.
15. Engelhardt, D., Dörr, G., Jaspers, C. and Knorr, D. (1985): Ketoconazole blocks cortisol secretion in man by inhibition of adrenal 11 beta-hydroxylase. *Klin. Wochenschr.*, 63, 607-661.
16. Engelhardt, D., Weber, MM., Miksch, T., Abedinpour, F. and Jaspers, C. (1991): The influence of ketoconazole on human adrenal steroidogenesis: incubation studies with tissue slices. *Clin. Endocrinol (Oxf)*, 35, 163-168.
17. Gotoh, H., Sagai, T., Hata, J., Shiroishi, T. and Moriwaki, K. (1988): Steroid 21-hydroxylase deficiency in mice. *Endocrinology*, 123, 1923-1927.
18. Gwynne, JT., Mahaffee, D., Brewer, HB Jr. and Ney, RL. (1976): Adrenal cholesterol uptake from plasma lipoproteins: regulation by corticotropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 73, 4329-4333.
19. Hamdy DA. and Brocks DR. (2009): Nonlinear stereoselective pharmacokinetics of ketoconazole in rat after administration of racemate. *Chirality*, 21, 704-712.

20. Hanukoglu, I. (1992): Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 43, 779-804.
21. Harvey, PW. (2016): Adrenocortical endocrine disruption. *J Steroid Biochem Mol Biol.*, 155, 199-206.
22. Harvey, PW. and Everett, DJ. (2003): The adrenal cortex and steroidogenesis as cellular and molecular targets for toxicity: critical omissions from regulatory endocrine disrupter screening strategies for human health? *J. Appl. Toxicol.*, 23, 81–87.
23. Harvey, PW. and Sutcliffe, C. (2010): Adrenocortical hypertrophy: establishing cause and toxicological significance. *J. Appl. Toxicol.*, 30, 617-626.
24. Higashi, Y., Omura, M., Suzuki, K., Inano, H., and Oshima, H. (1987): Ketoconazole as a possible universal inhibitor of cytochrome P-450 dependent enzymes: its mode of inhibition. *Endocrinol. Jpn.*, 34, 105-115.
25. Hille, UE., Zimmer, C., Vock, CA. and Hartmann, RW. (2010): First Selective CYP11B1 Inhibitors for the Treatment of Cortisol-Dependent Diseases. *ACS Med. ChemLett.*, 2, 2-6.
26. Hinson, JP. and Raven, PW. (2006): Effects of endocrine-disrupting chemicals on adrenal function. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, 20, 111–120.
27. Holt, RIG. An overview of human adrenal dysfunction. In Harvey, PW., Everett, DV., Springall, CJ., editors. *Adrenal toxicology*. New York: Informa healthcare; 2008. p. 39-76.
28. Inomata, A. and Sasano, H. (2015): Practical approaches for evaluating adrenal toxicity in nonclinical safety assessment. *J. Toxicol. Pathol.*, 28, 125-132.
29. Johansson, MK., Sanderson, JT. and Lund, BO. (2002): Effects of 3-MeSO₂-DDE and some CYP inhibitors on glucocorticoid steroidogenesis in the H295R human adrenocortical carcinoma cell line. *Toxicol. In Vitro*, 16, 113–121.

30. Koal, T., Schmiederer, D., Pham-Tuan, H., Röhring, C. and Rauh, M. (2012): Standardized LC-MS/MS based steroid hormone profile-analysis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 129, 129-138.
31. Kushnir, MM., Rockwood, AL. and Bergquist, J. (2010): Liquid chromatography–tandem mass spectrometry applications in endocrinology. *Mass Spectrom. Rev.*, 29, 480–502.
32. Latendresse, JR., Azhar, S., Brooks, CL. and Capen, CC. (1993): Pathogenesis of cholesteryl lipidosis of adrenocortical and ovarian interstitial cells in F344 rats caused by tricresyl phosphate and butylated triphenyl phosphate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 122, 281-289.
33. Latendresse, JR., Brooks, CL., Capen, CC. (1995): Toxic effects of butylated triphenyl phosphate-based hydraulic fluid and tricresyl phosphate in female F344 rats. *Vet. Pathol.*, 32, 394-402.
34. Li, H., Brochu, M., Wang, SP., Rochdi, L., Côté, M., Mitchell, G. and Gallo-Payet N. (2002): Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes lipid storage in the adrenal cortex and impaired corticosterone response to corticotropin stimulation. *Endocrinology*, 143, 3333-3340.
35. Li, L., Vashisht, K., Boisclair, J., Li, W., Lin, TH., Schmid, HA., Kluwe, W., Schoenfeld, H. and Hoffmann, P. (2015): Osilodrostat (LCI699), a potent 11 β -hydroxylase inhibitor, administered in combination with the multireceptor-targeted somatostatin analog pasireotide: A 13-week study in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 286, 224-233.
36. Loose, DS., Kan, PB., Hirst, MA., Marcus, RA. and Feldman, D. (1983): Ketoconazole blocks adrenal steroidogenesis by inhibiting cytochrome P450-dependent enzymes. *J. Clin. Invest.*, 71, 1495-1499.
37. Maeda, N., Tanaka, E., Suzuki, T., Okumura, K., Nomura, S., Miyasho, T., Haeno, S. and Yokota, H. (2013): Accurate determination of tissue steroid hormones, precursors and conjugates in adult male rat. *J. Biochem.*, 153, 63-71.
38. McGee, JP., and Shaw, PN. (1992): The pharmacokinetics of trilostane and ketotrilostane in an interconverting system in the rat. *Pharm. Res.*, 9, 464-468.

39. Miller, WL. and Bose, HS. (2011): Early steps in steroidogenesis: intracellular cholesterol trafficking. *J. Lipid Res.*, 52, 2111–2135.
40. Miller, WL., Auchus, RJ. (2011). The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr. Rev.*, 32, 81-151.
41. Mohn, CE., Fernandez-Solari, J., De Laurentiis, A., Prestifilippo, JP., de la Cal, C., Funk, R., Bornstein, SR., McCann, SM. and Rettori, V. (2005): The rapid release of corticosterone from the adrenal induced by ACTH is mediated by nitric oxide acting by prostaglandin E2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 6213-6218.
42. Mullins, LJ., Peter, A., Wrobel, N., McNeilly, JR., McNeilly, AS., Al-Dujaili, EA., Brownstein, DG., Mullins, JJ., Kenyon, CJ. (2009). CYP11b1 null mouse, a model of congenital adrenal hyperplasia. *J. Biol. Chem.*, 284, 3925-3934.
43. National Toxicology Program (1994). Toxicology and Carcinogenesis Studies of tricresyl phosphate (CAS No. 1330-78-5) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Gavage and Feed Studies). NTP TR 433, NIH Publication No. 94-3164., NIEHS, Research Triangle Park, NC.
44. New, MI. (2004): An update of congenital adrenal hyperplasia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1038, 14-43.
45. Ng, W., Metushi, IG., and Utrecht, J. (2013): Hepatic effects of aminoglutethimide: a model aromatic amine. *J. Immunotoxicol.*, 12, 24-32.
46. Nimkarn, S. and New, M. I. (2008): Steroid 11beta- hydroxylase deficiency congenital adrenal hyperplasia. *Trends Endocrinol. Metab.*, 19, 96-99.
47. Nishizato, Y., Imai, S., Okahashi, N., Yabunaka, A., Kunimatsu, T., Kikuchi, K., and Yabuki M. (2014): Translational research into species differences of endocrine toxicity via steroidogenesis inhibition by SMP-028--for human safety in clinical study. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 276, 213-219.

48. Obert, LA., Sobocinski, GP., Bobrowski, WF., Metz, AL., Rolsma, MD., Altrogge, DM. and Dunstan, RW. (2007): An immunohistochemical approach to differentiate hepatic lipidosiis from hepatic phospholipidosiis in rats. *Toxicol. Pathol.*, 35, 728-734.
49. Potts, GO., Creange, JE., Hardomg, HR., and Schane, HP. (1978): Trilostane, an orally active inhibitor of steroid biosynthesis. *Steroids*, 32, 257-267.
50. Ribelin, WE. (1984): The effects of drugs and chemicals upon the structure of the adrenal gland. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 4, 105–119.
51. Roberts, RA, Kavanagh, SL., Mellor, HR., Pollard, CE., Robinson, S. and Platz SJ. (2014): Reducing attrition in drug development: smart loading preclinical safety assessment. *Drug Discov. Today*, 19: 341-347.
52. Rosol, TJ., Yarrington, JT., Latendresse, J. and Capen, CC. (2001): Adrenal gland: structure, function, and mechanisms of toxicity. *Toxicol. Pathol.*, 29, 41–48.
53. Sanderson, JT. (2006): The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals. *Toxicol. Sci.*, 94, 3-21.
54. Schöneshöfer, M., Schefzig, B. and Arabin, S. (1980): Short-term kinetics of serum adrenal steroids and plasma ACTH after a single dose of metyrapone in man. *J. Endocrinol. Invest.*, 3, 229-236.
55. Shackleton, C. (2010): Clinical steroid mass spectrometry: a 45-year history culminating in HPLC–MS/MS becoming an essential tool for patient diagnosis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 121, 481–490.
56. Shin, JH., Moon, HJ., Kang, IH., Kim, TS., Kim, IY., Park, IS., Kim, HS., Jeung, EB. and Han, SY. (2006): Repeated 28-day oral toxicity study of ketoconazole in rats based on the draft protocol for the "Enhanced OECD Test Guideline No. 407" to detect endocrine effects. *Arch. Toxicol.*, 80: 797-803.

57. Szabó, D., Gláz, E., Kelemen, J. (1974): Subcellular localisation of adrenal cholesterol by autoradiography and digitonin reaction after aminoglutethimide-induced inhibition of corticosterone synthesis. *Histochemie.*, 38, 213-221.
58. Tamura, T., Yokoi, R., Okuhara, Y., Harada, C., Terashima, Y., Hayashi, M., Nagasawa, T., Onozato, T., Kobayashi, K., Kuroda, J., Kusama, H. (2009): Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity. 2) Two- or four-week repeated dose studies and fertility study of mifepristone in female rats. *J. Toxicol. Sci.*, 34 Suppl. 1, 31-42.
59. Thomas, JL., Bucholtz, KM., Kacsoh, B. (2011): Selective inhibition of human 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 as a potential treatment for breast cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 125, 57-65.
60. Umberkoman-Wiita, B., Hansen, S., Herbert, J. and Moore, GF. (1981): Circadian rhythms in serum and CSF cortisol of rhesus monkeys, and their modulation by timed injections of L-5-hydroxytryptophan. *Brain Res.*, 222, 235-252.
61. Vinson, GP. (2011): The mislabelling of deoxycorticosterone: making sense of corticosteroid structure and function. *J. Endocrinol.*, 211, 3-16.
62. White, PC., Curnow, KM. and Pascoe, L. (1994): Disorders of steroid 11 beta-hydroxylase isozymes. *Endocr. Rev.*, 15, 421-438.
63. Wickramaratne, GA., Foster, JR., Ellis, MK. and Tomenson, JA. (1998): Molinate: rodent reproductive toxicity and its relevance to humans--a review. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 27, 112-118.
64. Yan, Z., Rafferty, B., Caldwell, GW. and Masucci, JA. (2002): Rapidly distinguishing reversible and irreversible CYP450 inhibitors by using fluorometric kinetic analyses. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, 27, 281-287.

65. Yarrington, JT. and Reindel, JF. (1996): Chemically induced adrenocortical degenerative lesions. In: Jones, TC., Capen, CC. and Mohr, U., editors. Monographs on pathology of laboratory animals, endocrine system. 2nd ed. New York: Springer; 1996, p. 467-476.