

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 栃谷 智秋

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いる。特に皮質が影響を受けやすく、ヒトでは皮質におけるステロイド合成の阻害は致命的な影響を及ぼしうる。一方で、副腎ステロイド合成の評価法は限られており、特異性の高い鋭敏な手法が新たに求められている。*In vivo* における副腎ステロイド合成の評価法の一つとして、従来、血中のコルチコステロイド濃度の測定が実施されてきた。しかし、コルチコステロイド単体の測定では、副腎での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った。またヒトでは、先天性副腎疾患の診断に、血中のステロイド前駆体濃度の測定が実施されているが、実験動物では測定に用いる抗体の特異性や、採取できる試料量に限界があり、前駆体の測定はほとんど実施されてこなかった。ステロイドの測定には、従来 RIA や ELISA などの免疫学的手法が用いられてきたが、近年、質量分析が用いられる場合が増えてきている。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。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、薬物による副腎ステロイド合成阻害の評価法としての有用性を検討した。

まず、CYP 酵素を非特異的に阻害すること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、ラットにおけ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デオキシコルチコステロン、プロゲステロン、プレグネノロンの血中濃度を一括測定し、それらの変化と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遺伝子発現変化との関連性を調べた。8 週齢の雄の SD ラットにケトコナゾールを 150 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回、7 日間反復経口投与した。その結果、ケトコナゾールを投与したラットでは、対照群に比較して副腎重量は高値を示し、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、プロゲステロン、およびプレグネノロン濃度に明らかな変化は認められなかった。これらの副腎および血中ステロイド濃度の変化は、ケトコナゾールによる 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。これらの結果から、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への影響を鋭敏に評価し、その作用機序を検討する上で、有用な手法となることが示された。

次に、副腎毒性評価における本手法の有用性についてさらに検証するため、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、プロゲステロンおよびプレグネノロン）の血中濃度変化、ならびに血液生化学的变化、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、8 週齢の雄の SD ラットにそれぞれ 1 日 1 回、7 日間反復経口投与した。その結果、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変化は副腎ステロイド合成への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、当該の薬物の標的となる酵素によって代謝されるものであり、ステロイド濃度は投与薬物の作用機序を反映した変動パターンを示した。さらに、血液生化学的变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さらに示すことができた。

本手法の有用性についてさらに検証するため、ケトコナゾールを投与したラットにおいて、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、プロゲステロンおよびプレグネノロン）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、ならびに副腎の病理組織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、CYP11B1 以外の CYP 酵素への影響について、ステロイドの血中濃度の変化として検出できなかったことから、これらの影響を副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）投与と併用することで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。8 週齢の雄の SD ラットに、ケトコナゾールを 15、50、150 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回、単回または 7 日間の反復経口投与した。また、ラットにケトコナゾールを 150 mg/kg/日の用量で単回経口投与した後、ACTH を皮下投与した。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、ケトコナゾールの投与によるコルチコステロン、プロゲステロンおよびプレグネノロンの血中濃度の変化が明瞭となり、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の変化は、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し、かつステロイドの副腎濃度を反映することが示された。加えて、上述した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が示された。

ラットの副腎は CYP17 を発現しないため、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し、またアンドロゲンを合成しない点で特殊である。ラット以外の動物種で、副腎毒性評価における本手法の有用性について検証するため、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薬物誘発性の変化を調べた。生理学的変化に関しては、4～5歳齢の雌雄のカニクイザルを用いて、血中ステロイド濃度の日内および日間変動を調べた。その結果、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濃度は、午前遅くにピークに達し、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。次に雄のカニクイザルに、ケトコナゾール (CYP11B1 を含む CYP 阻害薬) またはメチラポン (CYP11B1 阻害薬) を投与し、血中ステロイド濃度の変動を調べた。ケトコナゾールは 4～5歳齢の雄に、メチラポンは 8～9歳齢の雄に投与した。用量はケトコナゾールは 100 mg/kg/日、メチラポンは 90 または 180 mg/kg/日とし、1日1回、単回又は7日間の反復にて、経口投与した。その結果、ケトコナゾールとメチラポン投与はいずれも、ラット、ヒトと同様に、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、投与前と比較して顕著に増加させた。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を含む他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による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。

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りに用いられる動物種である、ラットおよびカニクイザル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。