

## 審査の結果の要旨

申請者氏名 栃谷 智秋

副腎は内分泌系において、薬物毒性の標的になりやすい臓器とされる。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。副腎ステロイド合成の *in vivo* での評価法として、従来、血中のコルチコステロイド濃度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った。またヒトでは、先天性副腎疾患の診断に、血中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、採取可能な試料の量に限界があり、前駆体測定はほとんど実施されていない。また従来ステロイド測定には、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。質量分析では、わずかな試料量で、前駆体を含む複数のステロイドを高い特異性で一括測定することが可能である。そこで申請者は、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するため、一連の研究を実施した。

提出された博士論文は4章から構成される。第1章では、副腎ステロイド合成に寄与する CYP 酵素を非特異的に阻害するケトコナゾールを、雄のラットに7日間反復投与した後、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、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、また副腎の病理組織学的変化、およびステロイド合成酵素の発現変化が調べられている。検討の結果、副腎では束状帯/網状帯の細胞肥大および脂肪滴の蓄積、ならびに CYP11A1 の mRNA 量の増加が認められた。血中のコルチコステロン、プロゲステロン、およびプレグネノロン濃度には明らかな変化は認められなかったが、デオキシコルチコステロン (DOC) 濃度の顕著な増加が確認された。これらの変化は、CYP11B1 の阻害を介した、DOC 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察されている。

第2章では副腎ステロイド合成に影響する薬物として、ケトコナゾールの他、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)、およびミフェプリストン (糖質コルチコイド受容体阻害薬) を、雄のラットに7日間反復投与し、前駆体を含む副腎ステロイドの血中濃度が検討された。その結果、トリロスタン、メチラポン、ケトコナゾール投与により、血中のコルチコステロン濃度に有意な変化は認められないものの、前駆体ステロイド濃度の顕著な増加が確認された。このステロイド濃度の変動パターンは投与薬物の作用機序を反映するものであった。これらの結果から、前駆体を含むステロイドの血中濃度の一括測定は、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、有用な手法となると考察された。

第3章では複数用量のケトコナゾールを雄のラットに単回または7日間反復投与し、前駆体を含む副腎ステロイドの血中濃度について、ケトコナゾールの用量依存的および経時的な変化、ならびに副腎の病理組織学的変化が検討された。同時に副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) の併用投与の有用性、およびステロイドの血中濃度と副腎濃度との相関も調査された。その結果、ケトコナゾールは、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) が明瞭でない用量、時点でも DOC の血中濃度を増加させることが明らかになった。さらに、ACTH の併用投与により、ケトコナゾール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変化も明瞭となり、またステロイドの血中濃度は、副腎濃度とほぼ相関していた。このことから、前駆体を含む副腎ステロイドの血中濃度は、副腎ステロイド合成への影響を鋭敏かつ早期に反映し、かつステロイドの副腎濃度を反映すると考えられる。さらに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を示した。

第4章では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、生理学的変化および薬物誘発性変化が検討された。無処置の雌雄のカニクイザルでは、血中ステロイド濃度はヒトと同様の日内変動を示した。ケトコナゾールまたはメチラポンを雄のカニクイザルに単回または反復投与した結果、いずれの薬物も、副腎ステロイドの前駆体である DOC 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、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推測されている。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、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を示した。

以上のように、本論文では質量分析を用いた血中ステロイド濃度の一括測定が、ラットおよびカニクイザルのいずれにおいても、薬物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を明らかにしている。これらの研究成果は、特に医薬品開発や毒性・安全性試験分野における非常に有用な基礎情報となり、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士(獣医学)の学位論文として価値あるものと認めた。