Effect of Inhibitors of Steroidogenesis on Cytochrome P-450 Catalyzed Reactions

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7907

精製副腎皮質チトクローム P-450 触媒反応に及ぼす副腎ステロイド生成阻害剤の作用

金沢大学医学部内科学第二講座（主任：竹田亮祐教授）
永　井　国　雄

（昭和61年11月17日受付）

経口抗真菌剤である Ketoconazole 及び麻酔導入薬である Etomidate は，いずれもイミダゾール環を有し副腎皮質ステロイド合成阻害作用を示す事が論議されている．本研究は精製副腎皮質 P-450 再構成系を用い，Ketoconazole, Etomidate 及びステロイド合成阻害作用の知られた数種の薬剤につき，その作用を検討することを目的とした．P-450 再構成系は，チトクローム P-450 及びその電子伝達系から構成されウシ副腎皮質ミトコンドリア及びブタ精巣ミクロゾームから分離精製された．放射活性を有する基質を用い，種々の濃度に調整した各種薬剤を P-450 再構成系と共に反応させ，生成物の放射活性を計測することによりその阻害定数を求めた．Ketoconazole 及び Etomidate はコレステロール側鎖切断反応に対して拮抗的阻害作用を有し，その阻害定数はそれぞれ 0.98 μM, 0.21 μM であった．Metyrapone の阻害定数，160 μM と比較して，両者とも P-450scc に対する強い阻害作用を持つことが示された．Mitotane（o, p' DDD），Trilostane 及び Aminoglutethimide は，いずれも精製 P-450scc に対して阻害作用は認めなかった．Ketoconazole は精製 P-450$_{11\beta}$（11 位，18 位及び 19 位水酸化酵素）再構成系による，デオキシコルチコステロン（DOC）水酸化反応に対して拮抗的阻害作用を有し，その阻害定数は DOC からコルチコステロン，DOC から 18 位水酸化 DOC への変換の場合ともに 0.56 μM であった．Metyrapone の阻害定数 0.10 μM に匹敵する作用を認めた．Etomidate 及び Aminoglutethimide の阻害定数はそれぞれ 0.74 μM, 4.83 μM であった．17 α 位水酸化プロゲステロンの 17－20 側鎖切断反応に対して Ketoconazole 及び Etomidate の阻害定数は 2.60 μM, 16.0 μM であった．しかし同じ P-450scc II の担当する 17 α 位水酸化反応に対しては両者ともに作用はみとめなかった．ミクロゾーム内に存在する今ひとつの P-450 である．P-450c$_{21}$（21 位水酸化酵素）に対しては，Ketoconazole のみが阻害定数 1.26 μM を有した．電子伝達系に対してはいずれの薬剤も広い濃度範囲に渡って直接的影響は観察されなかった．本研究により副腎皮質ステロイド合成阻害作用の知られたいくつかの薬剤に関し，その阻害様式，阻害部位，相対的阻害強度があきらかになった．

Key words　ステロイド合成，チトクローム P-450，ケトコナゾール，エトミデート

従来，副腎皮質ステロイド合成阻害剤としては，Metyrapone (2-methyl-1, 2-di-3-pyridyl-1-propanone) を始め o, p'-DDD (1-(o-chlorophenyl)-1-(p-chlorophenyl)-2, 2-dichloroethane)，Aminoglutethimide (p-(α-aminophenyl)-α-ethylglutaramide) 及び Trilostane (4, 5-epoxy-17-hydroxy-3-oxoandrostane-2-carbonitrile) が知られ，治療的にも応用されている．これらに加えて最近は，Ketoconazole (cis-1-acetyl-4-[4-((2-(2, 4-dichlorophenyl)-2-(1H-imidazole-1-ylmetyl-1, 3-dioxalan4-ol)methoxy) phenyl]piperazine)，Etomidate (R-(+)-ethyl-[1-(phenylethy)-1H-imidazole-5-carboxylate) 等が新しく問題にされるようになった．

Ketoconazole (Nizoral, Janssen Pharmaceutica,

Abbreviations: DLPC, dilauroilphospatidylcholine; DOC, deoxycorticosterone; FpD, NADH-cytochrome b_5 reductase; FpT, NADPH-cytochrome P-450 reductase; Ki, inhibition constant; P-450, cytochrome P-450; TN, Turnover number.

Beerse, Belgium)は，広スペクトルを持つ経口抗真菌剤として開発されたイミダゾール環を有する薬剤である．本剤の抗真菌作用は，真菌内でラノステロールの14位脱メチル化を阻害してエルゴステロールの産生を減少させ，真菌の成長を抑制することに依ると考えられている[1]．当初，本剤はステロイドホルモンの生合成あるいは受容体との結合に対して影響を与えないとされたが，この点に関する十分な検討はなされていなかった．しかし近年健常者にKetoconazoleを投与すると迅速ACTH刺激試験に対する血漿コルチゾール反応が低下すること[2]，あるいはコルチゾール産生副腎皮質腫瘍患者に於て本剤が血漿コルチゾール低下作用を持つこと[3]，更には数種の腫瘍に対する臨床応用例[4][5]も相次いで報告されている．

Etomidate (Janssen pharmaceutica, Beerse, Belgium)は同じくイミダゾール環を有し，麻酔導入薬ないし鎮静薬として用いられている．本剤の副作用に関しては1981年から1982年にかけて，Ledinghamら[6]が各種の複雑損傷を受けたICU患者の死亡率が急増した事実とともに，これらの患者では血漿コルチゾール値が低い事，死亡率の上昇がEtomidateの登場と期を一にしている事に注目したのが契機となった．その後相次いで副腎ステロイド合成阻害作用のある事がin vivo[7][8]あるいはin vitro[9]~[12]の系で報告されている．

KetoconazoleはミトコンドリアP-450酵素に共通の阻害作用を示す事がLooseら[12]によって報告され，Etomidateもまた同様の可能性が指摘されている[10][11]．著者はすでに精製されたウシ副腎皮質ミトコンドリアP-450scc（コレステロール側鎖切断酵素），P-450$_{11\beta}$（11β位，18位及び19位水酸化酵素）を用い，Ketoconazoleのステロイド生合成に対する作用を検討し，阻害定数及び他のステロイド合成阻害剤と比較しその成績を報告[13][14]した．

本研究ではこれまでに得られた知見に加えて，Etomidateのミトコンドリア内P-450に対する作用，ミクロゾーム内に存在するP-450c$_{21}$（21位水酸化酵素），P-450scc II（17α位水酸化酵素及びC21ステロイド17−20側鎖切断酵素）に対するKetoconazole, Etomidateの阻害効果及びステロイド合成阻害作用の知られた数種の薬剤との比較検討を行った．

材料および方法

I．実験材料

P-450scc, P-450$_{11\beta}$, P-450c$_{21}$, P-450scc II及びアドレノドキシン，アドレノドキシン還元酵素，NADH-チトクロームb$_5$還元酵素（FpD），NADPH-チトクロームP-450還元酵素（FpT），チトクロームb$_5$などの電子供与系諸要素は，須原ら[15][16]の方法に準じて精製した．

Ketoconazole, o, p'DDDはそれぞれJanssen社及びRousse社より提供された．Metyrapone, Aminoglutethimideについては Ciba Geigy社より提供された．Trilostaneはウィントロップ研究所，ニュキャスル市J. Harper先生より，またEtomidateはミュンヘン大学，小児外科，H. G. Dorr教授より恵与された．

II．コレステロールからプレグネノロンへの反応阻害実験（P-450scc触媒コレステロール側鎖切断反応）

[1α, 2α (n)-^{3}H]コレステロール（Amersham社）を，放射活性1.0×10^4 cpm, 終濃度40 μM, 80 μM及び200 μMに調整し，Tween20（半井化学薬品社）を加え，5分間インキュベーションした．室温にて放冷後，更に15 nMアドレノドキシン，250 nMアドレノドキシン還元酵素，6 nMグルコース−6-リン酸（Boehringer Mannheim社），1.6単位グルコース−6-リン酸脱水素酵素（Boehringer Mannheim社），0.2 μM P-450scc及び0.3 mMリン酸カリウム緩衝液（pH 7.4）からなる混合液を加えた．ここに種々の濃度に調整した各種阻害剤を加え，37°Cで2分間プレインキュベーションを行った．0.4 mM NADPH (Boehringer Mannheim社）を加えることによって水酸化反応を開始し5分後に，1.6 mlの停止液（メタノール：クロロホルム＝1：1）を加え反応を終結した．内部標準として[4-^{14}C]プレグネノロン（Amersham社）を加え，0.5 mlの蒸留水にて水洗10秒間攪拌の後，1分間3000回転で遠心分離した．有機溶媒層を分離した後，蒸発乾固し少量のクロロホルムで再溶解し，シリカゲル薄層クロマトグラフィプレート（G25UV, Macherey-Nagel社）にスポットした．ベンゼン：酢酸エチル＝6：4混合液で展開後，検出した生成物をプレートからきり取り放射活性を計測した（Aloka, LSC-671液体シンチレーションスペクトロメーター）．

III．DOCからコルチコステロンへの反応阻害実験（P-450$_{11\beta}$触媒11位，18位水酸化反応）

[1α, 2β (n)-^{3}H]DOC（Amersham社）を終濃度15 μM, 30 μM, 200 μMに調整し，種々の濃度の各種阻害剤を加えた．IIに準じて電子伝達系諸要素を加え，37°Cで2分間プレインキュベーションの後，0.5 μM P-450$_{11\beta}$によって水酸化反応を開始した．37°Cで2分間インキュベーションし，反応終結後内部標準として[4-^{14}C]コルチコステロン（Amersham社）を加え，有機溶媒層を分離した．シリカゲル薄層クロマトグラ

フィにスポットし，ベンゼン：アセトン＝65：35 混合液にて展開した．生成物をプレートからかきとり放射活性を計測した．

IV．17 α 位水酸化プロゲステロンからアンドロステンジオンへの反応阻害実験（P-450scc II 触媒 17−20 側鎖切断反応）

[7 (n) -^{3}H]17 α 水酸化プロゲステロン (Amersham 社) を終濃度 20 μM, 40 μM 及び 200 μM に調整し，電子伝達系として 0.4 mM NADP$^+$, 1.4 mM グルコース−6-リン酸，1.0 単位グルコース−6-リン酸脱水素酵素を加え，更に 2.4×10^{-2} μM チトクローム b_5, 0.4 mU FpT, 4 mU FpD を加えた．ここに 2.2×10^{-2} μM P-450scc II 及び阻害剤とともに，リン脂質である Dilauroilphosphatidylcholine (DLPC) (Sigma 社) を加え，37°C で 2 分間プレインキュベーションした．NADPH にて反応を開始し，30 分後に反応を停止し II に準じて生成物の放射活性を計測した．11 β 水酸化プロゲステロンから 11 β，17 α 位二水酸化プロゲステロンへの阻害反応 (P-450scc II 触媒 17 α 水酸化反応) も本法に準じた．基質としてプロゲステロンでなく 11 β 位水酸化プロゲステロンを用いたのは，17 α 位水酸化反応は受けるが次の 17−20 側鎖切断反応は 11 β 水酸基が障害になるために進行しないためである．

V．17 α 位水酸化プロゲステロンから 11-デオキシコルチゾールへの反応阻害実験（P-450c_{21} 触媒 21 位水酸化反応）

基質としては P-450c_{21} との親和性との違いからプロゲステロンではなく，17 α 位水酸化プロゲステロンを採用した．以下IVに準じた．

VI．副腎皮質ミトコンドリア及びミクロゾーム内電子伝達系に対する各種阻害剤の作用

ミトコンドリア及びミクロゾーム内電子伝達系（II 及びIVに準ずる）に，20 μM のチトクローム C (Sigra 社) を加えた．室温にて 0.4 mM NADPH を加えて反応を開始した．550 nm におけるチトクローム C の吸光度の変化率を計測した．

成　　績

I．コレステロールからプレグネノロンへの反応に及ぼす各種薬剤の効果

1．Ketoconazole

本反応は Ketoconazole によって濃度依存性をもって阻害された．50%阻害濃度は約 1.9 μg/ml であった (図 1a)．図 1b よりこの阻害は拮抗阻害の様式を取り，その阻害定数は 0.98 μM であった．基質濃度 200 μM に対する反応回転数 (Turnover Number, T. N.) は約 7.4 mol-product/min/mol-P450 であった．

2．Etomidate

Etomidate も本反応を濃度依存性をもって阻害し，50%阻害濃度は約 0.15 μg/ml であった（図2a)．図 2b よりこの阻害は拮抗阻害の様式をとり，その阻害定

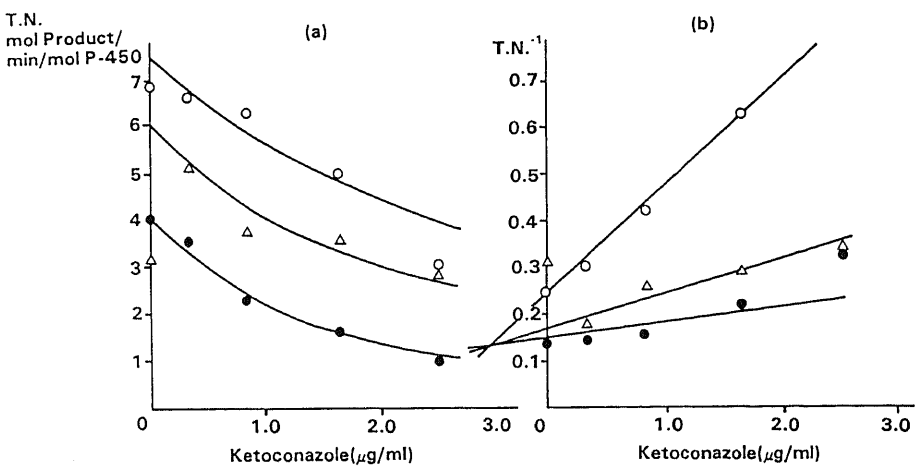

Fig. 1. Inhibitory effect of Ketoconazole on P-450scc catalyzed cholesterol to pregnenolone reaction.
Cholesterol concentration: ○, 200 μM; △, 80 μM; ●, 40 μM.

数は 0.21 μM と求められた.

3. Aminoglutethimide, o, p'DDD 及び Trilostane

図3,図4,図5に示すごとく 0～2.5 μg/ml の濃度範囲内では,本反応に対する作用は認められなかった.

II. DOC からコルチコステロンへの反応に及ぼす各種薬剤の効果

1. Ketoconazole

本反応は Ketoconazole によって濃度依存性を持って阻害された. 50%阻害濃度は約 0.7 μg/ml であった(図 6a). 図 6b から阻害定数を求めると0.56μM であった.

2. Etomidate

図 7a より 50%阻害濃度は約 0.15 μg/ml であり, 図,7b よりその阻害定数は 0.74 μM と求められた.

3. Aminoglutethimide

本反応は Aminoglutethimide によっても阻害を受けた. 図 8a より 50%阻害濃度は約 2.0 μg/ml であり, 図 8b からその阻害定数は 4.83 μM であった.

4. Trilostane 及び o, p'DDD

0～2.0 μg/ml の濃度範囲内では本反応に対する作用は認められなかった.

III. DOC から 18 位水酸化 DOC 及び, コルチコステロンから 18 位水酸化コルチコステロンへの反応に及ぼす Ketoconazole の効果

1. DOC から 18 位水酸化 DOC への反応

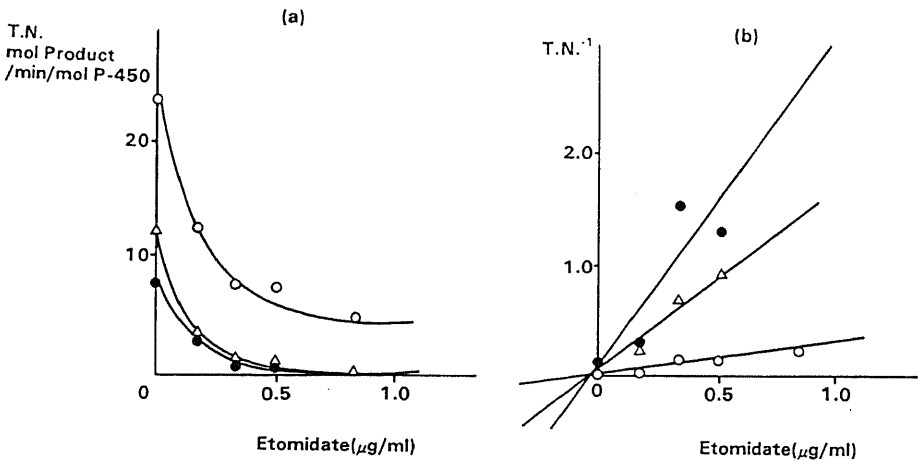

Fig. 2. Inhibitory effect of Etomidate on P-450scc catalyzed cholesterol to pregnenolone reaction.
Cholesterol concentration: ○, 200 μM; △, 80 μM; ●, 40 μM.

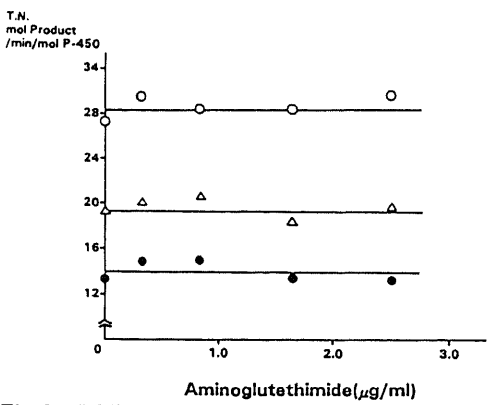

Fig. 3. Inhibitory effect of Aminoglutethimide on P-450scc catalyzed cholesterol to pregnenolone reaction.
Cholesterol concentration: ○, 200 μM; △, 80 μM; ●, 40 μM.

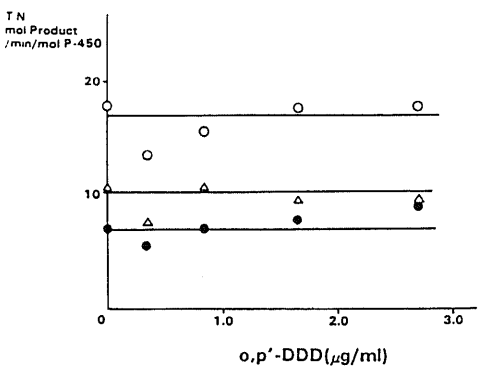

Fig. 4. Inhibitory effect of Mitotane (o, p'-DDD) on P-450scc catalyzed cholesterol to pregnenolone reaction.
Cholesterol concentration: ○, 200 μM; △, 80 μM; ●, 40 μM.

本反応は Ketoconazole に依って濃度依存性を持って阻害された．

50%阻害濃度は約 0.33 μg/ml であった（図 9a），図 9b よりその阻害定数は 0.56 μM であり図 6 で求めた値と一致した．また基質濃度 200 μM に対する反応回転数は約 10mol-product/min/mol-P450 であった．

2．コルチコステロンから 18 位水酸化コルチコステロンへの反応

Ketoconazole は強い阻害作用を示し，50%阻害濃度は 0.03 μg/ml 以下であった（図 10）．また基質濃度 250 μM に対する反応回転数は約 2.6 mol-product/min/mol-P450 であった．

Ⅳ．17α 位水酸化プロゲステロンからアンドロステンジオンへの反応に及ぼす各種阻害剤の効果

1．Ketoconazole

図 11 より阻害定数は 2.60 μM と求められた．

2．Etomidate

図 12 より阻害定数は 16.0 μM と求められた．

3．その他の薬剤

いずれの薬剤も P-450scc II が触媒する 17−20 側鎖切断反応には作用は認められなかった．

Ⅴ．11β 位水酸化プロゲステロンから 11β，17α 位水酸化プロゲステロンへの反応

Ketoconazole（図 13）及び Etomidate（図 14）を含めたいずれの薬剤も，P-450scc II が触媒する 17α 位水酸化反応には影響を与えなかった．

Ⅵ．17α 位水酸化プロゲステロンから 11-デオキシコルチゾールへの反応

図 15 より Ketoconazole は阻害作用を示しその阻害定数は 1.26 μM であった．Etomidate（図 16）を含めいずれの薬剤も本反応に対する作用は認められなかった．

Ⅶ．電子伝達系に及ぼす各種薬剤の作用

チトクローム C の 550 nm における吸光度の変化率はミトコンドリア内電子伝達系（表 1）及びミクロゾーム内電子伝達系（表 2）のいずれに対しても，各阻害剤とも差異を認めずかつ濃度による影響も観察されなかった．

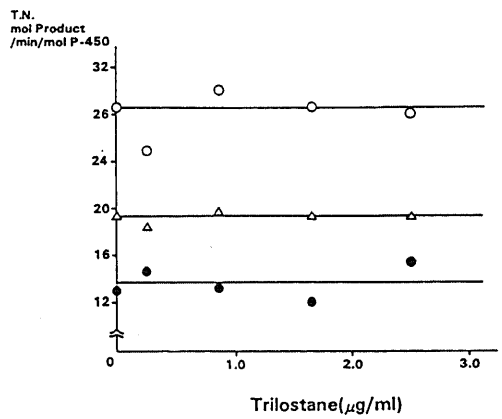

Fig. 5. Inhibitory effect of Trilostane on P-450scc catalyzed cholesterol to pregnenolone reaction. Cholesterol concentration: ○, 200 μM; △, 80 μM; ●, 40 μM.

考　　察

Ketoconazole は広スペクトルを持つ経口真菌剤と

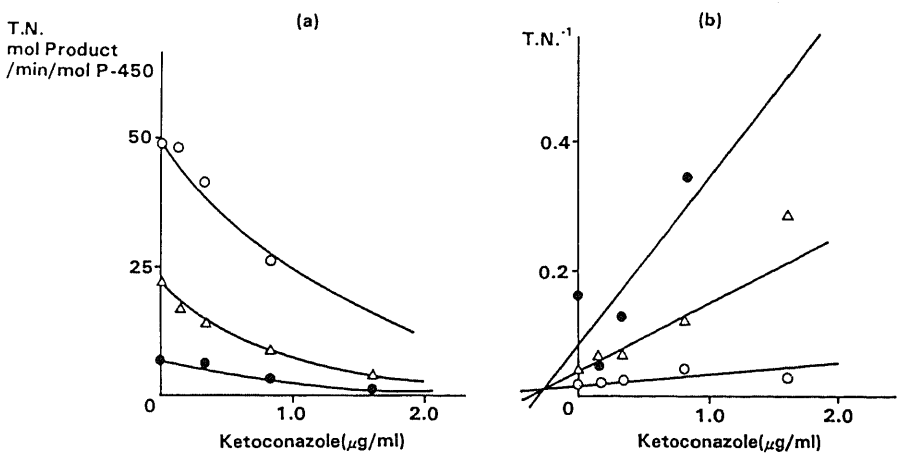

Fig. 6. Inhibitory effect of Ketoconazole on P-450$_{11\beta}$ catalyzed deoxycorticosterone (DOC) to corticosterone reaction.
DOC concentration: ○, 200 μM; △, 30 μM; ●, 15 μM.

して開発されたイミダゾール誘導体である．その抗真菌作用は真菌内でラノステロールから14位脱メチル化を阻害してエルゴステロール産生を減少させ真菌の成長を抑制させると考えられ，哺乳動物の細胞においても同様の機序でコレステロール合成を低下させる事が知られている．本剤のステロイド生合成に与える影響については当初重視されていなかった．しかし女性化乳房，インポテンツ等を説明する事実として血中テストステロンの低下，エストラジオール/テストステロン，黄体ホルモンの上昇が報告[17]され，Ketoconazole 400 mg 服用により，血中および唾液中のテストステロン濃度が低下すること[18][19]等性ホルモンへの影響が相次いで報告された．Santen ら[20]は，健常者を対常に Ketoconazole および偽薬剤服用前後でアンドロステンジオン，テストステロンは低下するが17α位水酸化プロゲステロンの上昇をみたことにより，Ketoconazole の作用が17−20側鎖切断酵素阻害にあることを示唆している．Coster ら[21]，もビーグル犬

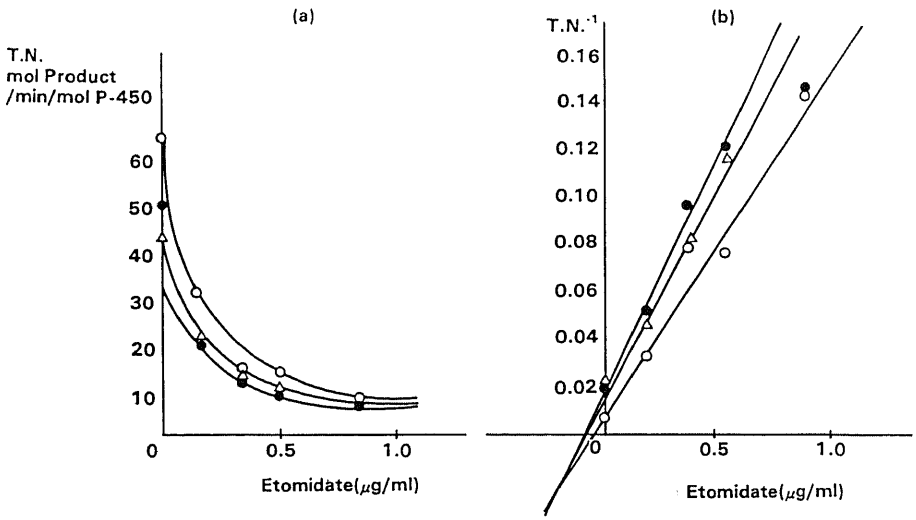

Fig. 7. Inhibitory effect of Etomidate on P-450$_{11\beta}$ deoxycorticosterone (DOC) to corticosterone reaction.
DOC concentration: ○, 200 μM; △, 80 μM; ●, 40 μM.

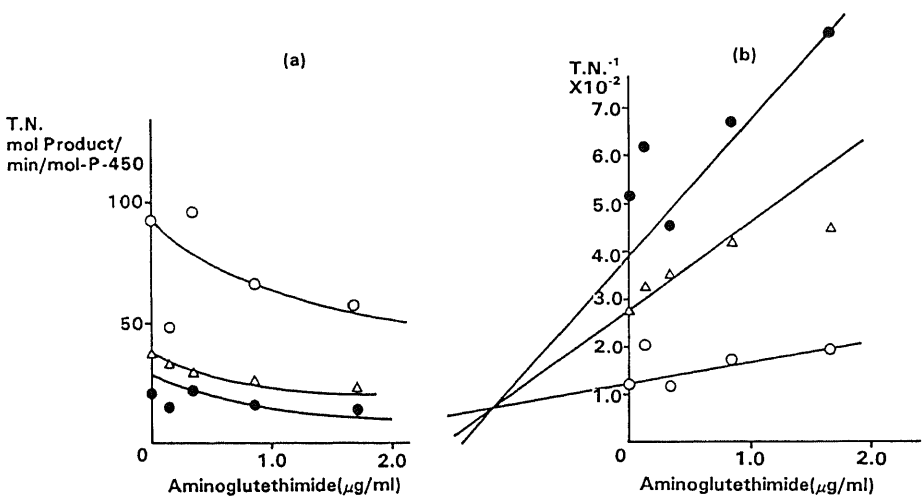

Fig. 8. Inhibitory effect of Aminoglutethimide on P-450$_{11\beta}$ catalyzed deoxycorticosterone (DOC) to corticosterone reaction.
DOC concentration: ○, 200 μM; △, 80 μM; ●, 40 μM.

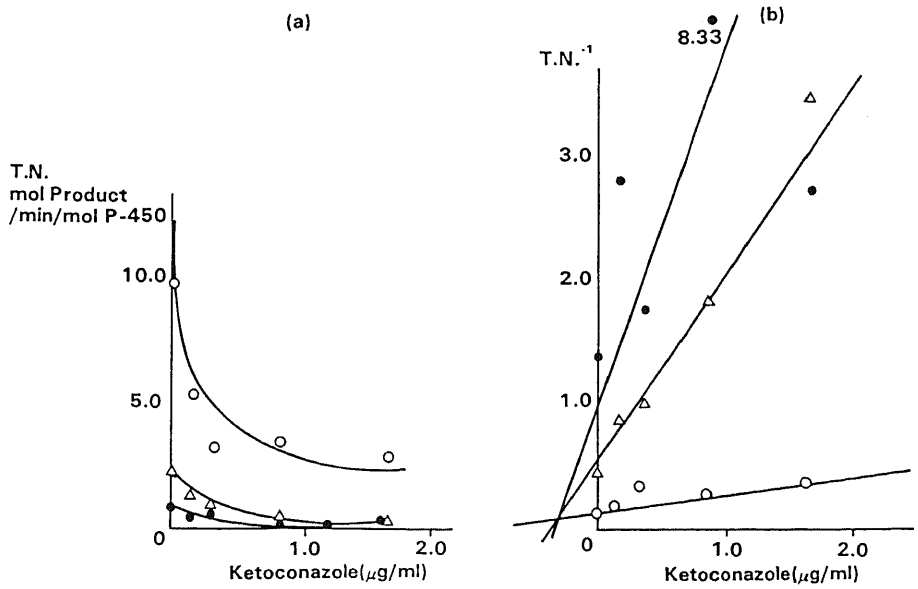

Fig. 9. Inhibitory effect of Ketoconazole on P-450$_{11\beta}$ catalyzed deoxycorticosterone (DOC) to 18-hydroxyDOC reaction.
DOC concentration : ○, 200 μM ; △, 80 μM ; ●, 40 μM.

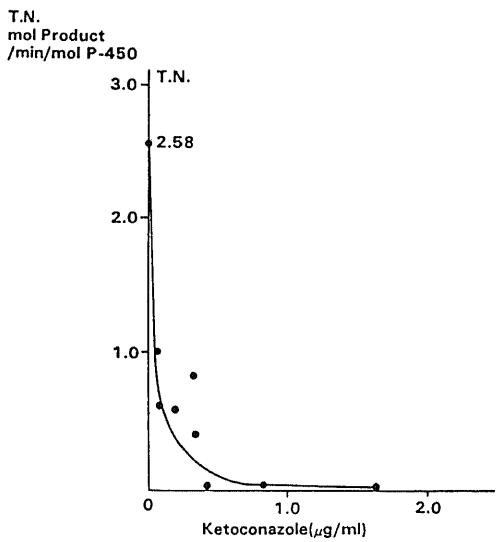

Fig. 10. Inhibitory effect of Ketoconazole on P-450$_{11\beta}$ catalyzed corticosterone to 18-hydroyx-corticosterone reaction.
corticosterone concentration : ●, 250 μM.

を用いた実験で同様の報告をしている.

コルチコステロイド生合成に対する阻害効果についても多数の報告がある. 副腎遊離細胞を用いた in vitro 実験系に放射性基質ステロイドを添加して行った検討[12]によって, Ketoconazole は DOC からコルチコステロン, コレステロールからプレグネノロンへの転換反応を阻害することが確認された. また腎におけるビタミン D 代謝にあずかる P-450 依存酵素, 24 位水酸化酵素を用量依存性に阻害することから, Ketoconazole は P-450 系酵素に共通の阻害剤であることも示唆された. Engelhardts ら[22]は, 正常対照および 5 例のクッシング症候群患者を対象に各種血中ステロイドの測定および, ACTH 刺激に対する反応性を検討するとともに, 副腎組織片, ホモジネートと放射性ステロイドとのインキュベーション実験によってその阻害部位が 11 β 水酸化酵素であることを示唆した. おなじイミダゾール環を有する麻酔導入薬である Etomidate に関しても, コレステロール側鎖切断反応あるいは 11 β 水酸化反応に対する阻害作用が相次いで報告[26)~29)]されている.

これらのいずれの報告も in vitro あるいは組織片, 遊離細胞を用いた実験系であるため, ステロイド代謝における各単位反応にたいする検討は不十分であり, 詳細な阻害部位および他の阻害剤との比較は不明であった.

今回, 著者が得た成績では, 精製された副腎皮質ミトコンドリア P-450scc, P-450$_{11\beta}$, ミクロゾーム P-450c$_{21}$, P-450scc II およびそれぞれの電子伝達系酵素からなる, 水酸化反応再構成系を用いることで各薬剤

の阻害様式，阻害部位およびそれぞれの相対阻害強度が明らかになった．

P-450scc が触媒するコレステロールからプレグネノロンの変換に関しては，Ketoconazole および Etomidate が阻害作用を示した．その阻害定数はそれぞれ 0.98 μM, 0.21 μM であり，すでに知られている Metyrapone の阻害定数 160 μM と比較すると両者とも強力な拮抗的阻害作用を有することが判明した．本反応に対する両阻害剤の作用は既に示唆されていたが，さらに定量的に評価することができた．o, p'-DDD, Aminoglutethimide に関しては，コレステロール側鎖切断反応に対する阻害作用が報告[30)~33)]されている．しかし今回の成績からは直接的影響は観察されていない．

Ketoconazole, Etomidate ともに，P-450$_{11\beta}$ が触媒する，DOC からコルチコステロンへの反応を濃度依存性をもって阻害し，反応回転数（T. N.）の逆数と阻害剤濃度とは比例関係がみられ，拮抗的阻害の式を満足した．阻害定数はそれぞれ 0.56 μM, 0.74 μM であった．Metyrapone の阻害定数は約 0.1 μM[34)]であり両者ともに Metyrapone と同様の強い阻害作用を持つことが示された．

P-450$_{11\beta}$ はステロイド 11β 位，18 位および 19 位に共通の水酸化酵素である．今回の Ketoconazole の成績で DOC 濃度 200 μM を用いた時の反応回転数は，11β 位，18 位それぞれにつき 48 mol-product/min/

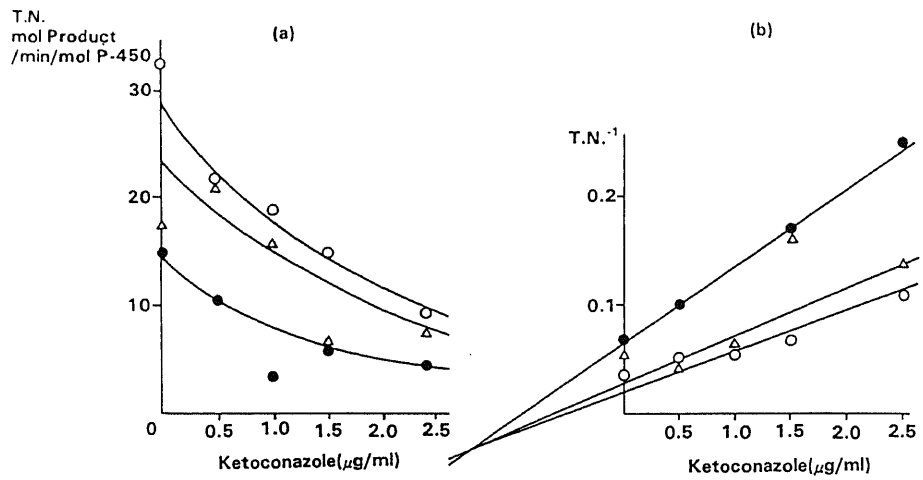

Fig. 11. Inhibitory effect of ketoconazole on P-450scc II catalyzed 17α-hydroxyprogesterone to androstenedione reaction.
17α-hydroxyprogesterone concentration : ○, 200 μM ; △, 40 μM ; ●, 20 μM.

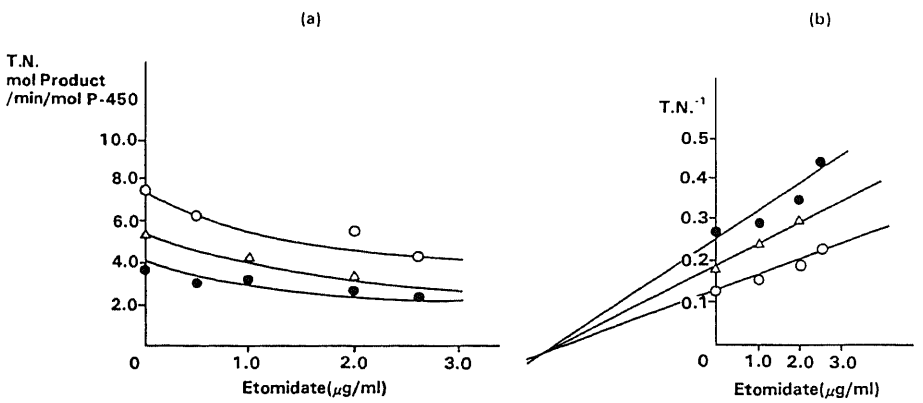

Fig. 12. Inhibitory effect of Etomidate on P-450scc II catalyzed 17α-hydroxyprogesterone to androstenedione reaction.
17α-hydroxyprogesterone : ○, 200 μM ; △, 40 μM ; ●, 20 μM.

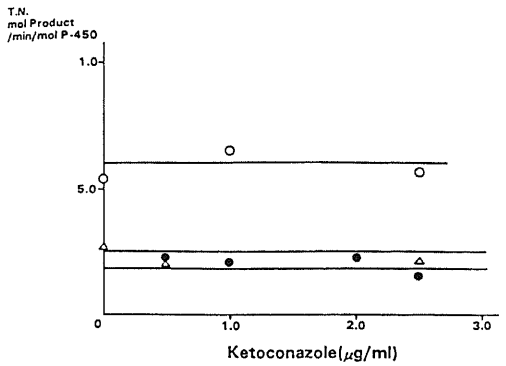

Fig. 13. Inhibitory effect of Ketoconazole on P-450scc II catalyzed 11β-hydroxyprogesterone to 11β, 17α-dihydroxyprogesterone reaction.
11β-hydroxyprogesterone concentration : ○, 200 μM ; △, 100 μM ; ●, 20 μM.

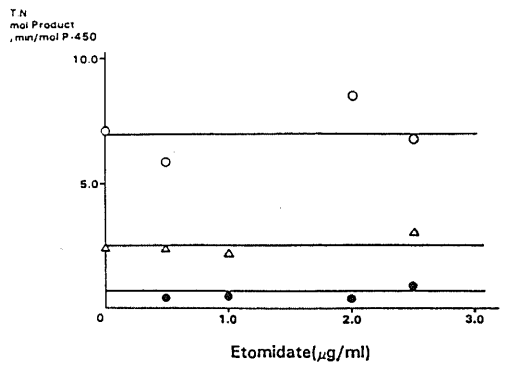

Fig. 14. Inhibitory effect of Etomidate on P-450scc II catalyzed 11β-hydroxyprogesterone to 11β, 17α-dihydroxyprogesterone.
11β-hydroxyprogesterone concentration : ○, 200 μM ; △, 100 μM ; ●, 20 μM.

mol-P450 および 10 mol-product/min/mol-P450 であった．両者の比は約 5 : 1 であり，ウシ副腎皮質ミトコンドリア P-450$_{11\beta}$ は DOC を基質とした場合，約 5 : 1 で 11β 位水酸化反応の方が 18 位水酸化反応よりも優位に進行することが確かめられた．ヒトにおいては 11β 位対 18 位水酸化反応の比はウシの場合とは異なるとしても，本質的には同様の傾向にあるものと推定される．コルチコステロンから 18 位水酸化コルチコステロンへの変化に対する Ketoconazole の阻害効果について，著者はラット副腎スライスを用いたインキュベーション実験により，抑制効果は 20 分後に強く認められ，120 分の間継続し，かつその効果が用量依存性であることを報告した[35]．P-450$_{11\beta}$ は，18 位水酸化反応にも共通の酵素であることから，Ketoconazole がコルチコステロンから 18 位水酸化コルチコステロンへの変換反応にも同様の阻害作用を持つことは，当然予測されることであり，事実，その 50%阻害濃度は 0.03 μg/ml 以下と強力なものであることが確かめられた．また 250 μM のコルチコステロンを用いた場合と反応回転数は 2.6 mol-product/min/mol-P450 であるのに対し DOC からコルチコステロンへの回転数は基質濃度 200 μM の時，48 mol-product/min/mol-P450 であることから，コルチコステロンから 18 位水酸化コルチコステロンへの反応は DOC からコルチコステロンへの反応に比較して進行しにくく，かつ Ketoconazole によって強く阻害されるものと思われる．

Aminoglutethimide の P-450$_{11\beta}$ に対する拮抗的阻害作用が確認され，阻害定数は 4.8 μM と求められた．本剤にはコレステロール側鎖切断反応およびアロマターゼに対する阻害作用が従来報告されている[30)~32)]．しかし，本研究により P-450scc に対する作用は認め

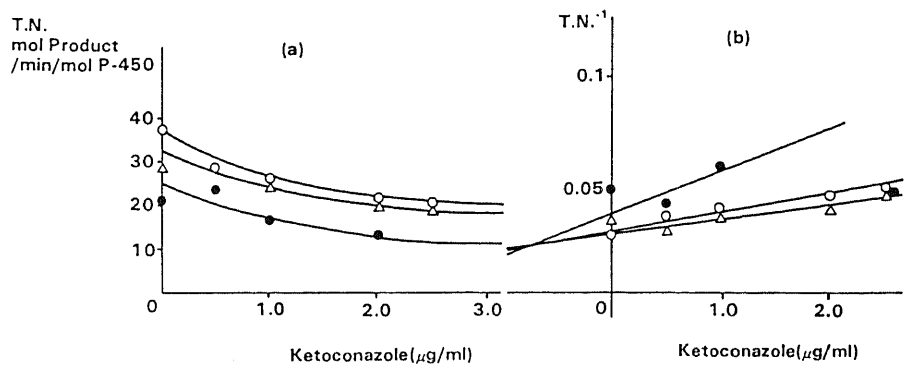

Fig. 15. Inhibitory effect of Ketoconazole on P-450c$_{21}$ catalyzed 17α-hydroxyprogesterone to 11-deoxycortisol.
17α-hydroxyprogesterone concentration : ○, 200 μM ; △, 40 μM ●, 8 μM.

られず，P-450$_{11\beta}$に対する弱い阻害作用を有することが判明した．また o, p'-DDD には 11β-水酸化酵素に対する阻害作用[36]，Trilostane は 3β-水酸化ステロイド脱水素酵素に対する阻害作用[37]が報告されている．実験成績からは，両者ともに P-450$_{11\beta}$の関与する酸化反応には阻害作用は認められなかった．

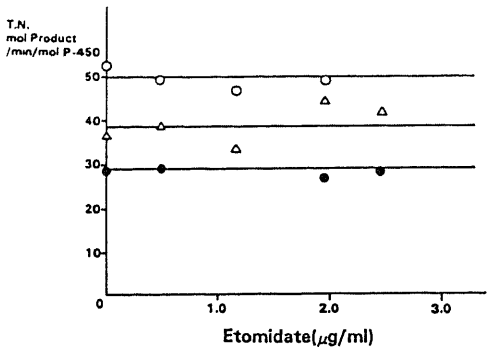

Fig. 16. Inhibitory effect of Etomidate on P-450c$_{21}$ catalyzed 17α-hydroxyprogesterone to 11-deoxycortisol.
17α-hydroxyprogesterone concentration: ○, 200 μM; △, 40 μM; ●, 8 μM.

Ketoconazole および Etomidate は，P-450scc II が触媒する 17−20 側鎖切断反応を阻害しそれぞれの阻害定数は，2.60 μM, 16.0 μM であった．しかし両者ともに同じ P-450scc II の触媒する 17 α 位水酸化反応には阻害作用を示さなかった．このことは過去の報告と一致する．しかし，Nakajin ら[38]が報告したごとく P-450scc II は 1 つの酵素である．にも拘わらず異なる阻害定数を示した理由として次の様な事を考えている．

基質が P-450 と結合する場所は 1 つと考えられる．プロゲステロン（あるいはプレグネノロン）は P-450scc II の特定部位に結合し，まず 17 位が水酸化される．ひきつづき 17−20 側鎖切断反応がおこる．P-450scc II との親和性はプロゲステロンと 17 α 位水酸化プロゲステロンとでは異なるため一部の 17 α 位水酸化プロゲステロンは結合部位から遊離してしまう．残存する 17 α 位水酸化プロゲステロンもすでに 17 位に水酸基を有し，かつ 17−20 の C-C 結合に対する酸化反応であるため，その環境はプロゲステロンの 17 位水酸化反応とは変化している．これらの条件の違い

Table 1. Effect of inhibitors on the electron-transport system in adrenal mitochondria#

	Keto	Eto	o,p'DDD	Tril	Amino	Metyr
0(μg/ml)	0.215	0.388	0.299	0.265	0.268	0.230
1.0	0.275	0.424	0.222	0.257	0.268	0.275
2.0	0.206	0.388	0.215	0.272	0.229	0.268
3.0	0.162	0.423	0.226	0.272	0.311	0.261
4.0	0.279	0.423	0.233	0.268	0.251	0.275

#All figures indicate ΔA/min
Various concentrations of inhibitors (up to 4.0 μg/ml) were added to assay mixture containing cytochrome c, adrenodoxin reductase, adrenodoxin and potassium phosphate at room tempereture. Chages in the UV absorbance at 550 nm (ΔA/min) were determined.
Keto, Ketoconazole; Eto, Etomidate; Tril, Trilostane; Amino, Aminoglutethimide; Metyr, Metyrapone.

Table 2. Effect of inhibitors on the electron-transport system in adrenal microsomes#

	Keto	Eto	o,p'DDD	Tril	Amino	Metyr
0(μg/ml)	0.183	0.221	0.198	0.183	0.198	0.178
1.0	0.233	0.230	0.219	0.198	0.183	0.161
2.0	0.169	0.240	0.183	0.198	0.183	0.172
3.0	0.183	0.221	0.205	0.212	0.219	0.173

#All figures indicate ΔA/min.
Various concentrations of inhibitors (up to 3.0 μg/ml) were added to assay mixture containing cytochrome c, FpT, cytochrome b_5 and potassium phosphate at room temperature. Chages in the UV absorbance at 550nm (ΔA/min) were determined.
Keto, Ketoconazole; Eto, Etomidate; Tril, Trilostane; Amino, Aminoglutethimide; Metyr, Metyrapone.

が同じ P-450scc II が担当する酸化反応でありながら阻害定数の違いとなって表われたと思われる．

同様な事実は P-450 が関与する他のステロイド代謝においても見うけられる．例えば DOC からアルドステロンへの代謝は $P\text{-}450_{11\beta}$ が担当しているが DOC は $P\text{-}450_{11\beta}$ に結合すると 11 位，18 位，19 位が酸化反応の標的になる．これらの酸化は一定の比率で 11＞18＞19 位の順に進行する．酸化反応が進むにつれ反応生成物と $P\text{-}450_{11\beta}$ との親和性は変化し，少しづつ遊離また一部は再結合する．このようにして $P\text{-}450_{11\beta}$ を介して次々に生理活性を有する DOC，コルチコステロン，18 位水酸化コルチコステロン，アルドステロンが産生される．またコレステロールからプレグネノロンへの反応は，P-450scc 上で行われるが途中いくつかの中間生成物が考えられる．しかしコレステロールの殆どはプレグネノロンまで酸化反応を受けてしまう．P-450scc 上ではコレステロールの側鎖は酵素とは一定の距離を有しており大きな障害なしに酸化反応は次々と進行する．中間生成物と P-450scc との親和性が強い変動を受けないこともこの反応を最後まで進行させることに関与していると思われる．

副腎皮質ではコレステロールから様々な生理活性を有する物質が産生されている．しかし，存在する酵素は，P-450scc，$P\text{-}450_{11\beta}$，$P\text{-}450c_{21}$，P-450scc II，P-450aromatase 及び 3β 水酸化ステロイド脱水素酵素の 6 種類である．上記の様な環境が作りだされる事により少ない酵素で多くの生理活性物質の産生を可能にしているものと思われる．

$P\text{-}450c_{21}$ との親和性との違いからプロゲステロンではなく 17α 位水酸化プロゲステロンを採用した．したがってその反応生成物は 11-デオキシコルチゾールである．Ketoconazole のみが阻害定数 1.26 μM で阻害作用を示した．その他の薬剤はいずれも 0～2.5 μg/ml の濃度範囲に渡って阻害作用を認めなかった．Etomidate に阻害が認められなかったのは，その阻害定数が大きいためとも考えられる．

チトクローム P-450 が触媒する水酸化反応は，その電子伝達系はミクロゾーム型とミトコンドリア型に分けられる．ミクロゾーム型では，NADPH または NADH を電子供与体として，P-450 還元酵素（FpT，チトクローム b5）と，P-450 の二成分から構成される．一方ミトコンドリア型では，NADPH を電子供与体としてアドレノドキシン還元酵素，アドレノドキシン，P-450 の三成分からなる．本研究では，P-450 の吸収スペクトルの変化を直接みるのではなく，チトクローム C を使用してその 550 nm の吸収度の変化率を測定することで，各薬剤の作用を検討した．このため P-450 還元酵素系に対する効果を見たことになり，チトクローム P-450 への最終的電子の授受への作用は不明である．成績は表 1，表 2 の如く各種薬剤ともに直接的影響は観察されなかった．

全体の成績を表 3 にまとめた．本研究により副腎皮質ステロイド合成阻害作用が話題になっている Ketoconazole，Etomidate 及び合成阻害作用が知られ，臨

Table 3. Effect of inhibitors of steroidogenesis on cytochrome P-450 catalyzed reactions#

	Keto	Eto	o,p'DDD	Tril	Amino	Metyr
P−450scc	0.98	0.21	(−) ※	(−)	(−)	160
$P\text{-}450_{11B}$	0.56	0.74	(−)	(−)	4.83	0.10
$P\text{-}450c_{21}$	1.26	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)
P−450scc II						
(17α−hyd)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)
(17, 20ly)	2.60	16.0	(−)	(−)	(−)	(−)
E. T. S. of mito.	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)
E. T. S. of micro.	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)

#All figures indicate Ki value(μM). ※(−) no inhibition.
Keto, Ketoconazole; Eto, Etomidate; Tril, Trilostane; Amino, Aminoglutethimide; Metyr, Metyrapone; E. T. S. of mito,electron-transport system in adrenal mitochondria; E. T. S. of micro, electron-transport system in adrenal microsomes; 17α-hyd, P-450scc II catalyzed 17α-hydroxylation of C_{21} steroids; 17, 20ly, P-450scc II catalyzed 17, 20 cleavage reaction of 17α-hydroxy C_{21} steroids。

床応用されている数種の薬剤について，その阻害様式，阻害部位及び相対的阻害強度が始めて明らかになった．

結 論

精製副腎皮質チトクローム P-450 及び電子伝達系酵素からなる副腎ステロイド酸化反応再構成系を用いて，Ketoconazole, Etomidate などのイミダゾール化合物及びステロイド合成阻害作用の知られた数種の薬剤につき，作用効果の検討を行い次の結論を得た．

1．Ketoconazole は精製ミトコンドリア P-450scc, P-$450_{11\beta}$ 及びミクロゾーム P-$450c_{21}$, P-450scc II 再構成系による副腎皮質ステロイド水酸化反応に対して，拮抗的阻害作用を有し，その阻害定数はそれぞれ 0.98 μM, 0.56 μM, 1.26 μM, 2.60 μM であった．副腎皮質ステロイド代謝の広範な部位に阻害作用を及ぼしかつその効果は強力であることが判明した．

2．Etomidate は精製ミトコンドリア P-450scc, P-$450_{11\beta}$ 及びミクロゾーム P-450scc II 再構成系による副腎皮質ステロイド水酸化反応に対して拮抗的阻害作用を有し，その阻害定数はそれぞれ 0.21 μM, 0.74 μM, 16.0 μM であった．Ketoconazole と比較して，ミクロゾーム系ではその作用は弱いが，ミトコンドリア系には遜色のない阻害効果を認めた．

3．Aminoglutethimide は，P-$450_{11\beta}$ 再構成系 DOC 水酸化反応に対して，阻害定数 4.83 μM と弱い阻害効果を認めた．その他の反応系には作用は認めなかった．Metyrapone はミクロゾーム系 P-450 水酸化反応に対しては，影響を及ぼさなかった．Trilostane, o, p'-DDD については，副腎皮質 P-450 の担当するいずれのステロイド代謝にも阻害作用は認められなかった．

4．副腎皮質ミトコンドリア及びミクロゾーム内電子伝達系に対しては，上記のすべての薬剤について直接的影響は観察されなかった．

謝 辞

稿を終えるにあたり，御指導と御稿閲賜りました恩師竹田亮祐教授に深謝致します．また，始終御指導，御助言頂きました宮森勇講師および高血圧グループの諸先生方に感謝致します．本研究を当初より御指導，御教示頂きました金沢大学理学部化学科片桐正之教授，板垣英治助教授，須原克子博士，ならびに教室員の皆様にこころから感謝致します．

なお，本論文の要旨は，第 4 回日本臨床薬理学会（1983 年 京都）日本内分泌学会 第 57 回総会（1984 年 東京） 第 57 回秋期大会（1984 年 神戸）第 58 回総会（1985 年 名古屋）第 59 回総会（1986 年 仙台）第 17 回 Intern. Symposium of the J. steroid Biochemistry.（1985 年 チロル）および第 68 回 Ann. Meeting, The Endocrine Society.（1986 年 アンハイム）で発表した．

文 献

1） **Bossche, V. D., Willemsens, H. G., Cools, W., Cornelissen, F., Lauwers, W. F. & Van. Cutsem, J. M.**: In vitro and in vivo effcts of the antimycotic drug ketoconazole on steroid synthesis. Antimicrob. Agents Chemother., **17**, 922-928 (1980).

2） **Pont, A., Williams, P. L., Loose, D. S., Feldman, D., Reitz, R. E., Bochra, C. & Stevens. D. A.**: Ketoconazole blocks adrenal steroidogenesis. Ann. Med., **97**, 370-372 (1982).

3） **Engelhardt, D., Mann, K., Horman, R., Brann, S. & Karl, H. J.**: Ketoconazole inhibits cortisol secretion of adrenal adenoma in vivo and in vitro. Klin. Wschr., **61**, 373-375 (1983).

4） **Contreras, P., Altier, E., Liverman, C., Gac, A., Rojas, A., Ibarra, A., Rovanal, M. & Seron-Ferre, M.**: Adrenal rest tumor of the liver causing cushing'syndron; treatment with Ketoconazole preceding an apparent surgical cure. J. Clin. Endocrinol. Metab., **60**, 21-28 (1985).

5） **Trachtenberg, J.**: Ketoconazole therapy in advanced prostatic cancer. J. Urol., **132**, 61-63 (1984).

6） **Ledingham, I. McA. & Watt, I.**: Influence of sedation on mortality in critically ill multiple trauma patients. Lancet I, 1270 (1983).

7） **Fellows, W., Byrne, A. J. & Allison, S. P.**: Adrenocortical suppression with etomidate. Lancet II, 54-55 (1983).

8） **Allolio, B., Stuttmann, R., Fischer, H., Leonhard, U. & Winkelman, W.**: Long-term etomidate and adrenocortical suppression. Lancet II, 626 (1983).

9） **Bossche, H.V., Willemsens, G., Colls, W. & Bellens, D.**: Effects of etomidate on steroid biosynthesis in subcellular fractions of bovine adrenals. Biochm. Pharmac., **33**, 3861-3868 (1984).

10） **Lambert, A., Frost, J., Mitchell, R., Wilson, A. U. & Robertson, W. R.**: On the site of action of the antiadrenal steroidogenic effect of etomidate and megestral acetate. Clin. Endocrinol., **21**, 721-727 (1984).

11） **Kenyon, C. J., Young, J., Gray, C. E. & Fraser, R.**: Inhibition by etomidate of steroidogenesis in isolated bovine adrenal cells. J. Clin.

Endocrinol. Metab., **58**, 947-949 (1984).

12) **Loose, D. S., Kan, P. B., Hirst, M. A., Marcus, R. A. & Feldman, D.**: Ketoconazole inhibits adrenal steroidogenesis by inhibiting cytochrome P-450-dependent enzymes. J. Clin. Invest., **71**, 1485-1499 (1983).

13) **永井国雄, 宮森 勇, 竹田亮祐, 板垣英治, 片桐正之**: 精製チトクローム P-450$_{11\beta}$ 触媒反応に及ぼす副腎ステロイド生成阻害剤の作用－ketoconazole を中心に－. 日内分泌会誌, **61**, 90-96 (1985).

14) **Nagai, K., Miyamori, K., Ikeda, M., Koshida, H., Takeda, R., Suhara, K. & Katagiri, M.**: Effect of Ketoconazole (an imidazole antimycoticagent) and other inhibitors of steroidogenesis on cytochrome P-450-catalyzed reactions. J. steroid Biochem., **24**, 321-323 (1986).

15) **Suhara, K., Gomi, T., Sato. H., Itagaki, E., Takemori, S. & Katagiri, M.**: Purification and immunological characterization of the two adrenal cortex mitochondrial cytochrome P-450 proteins. Arch. Biochem. Biophys. **190**, 290-299 (1978).

16) **Suhara, K., Fujimura, Y., Schiroo, M. & Katagiri, M.**: Multiple catalytic properties of the pnrified and reconstituted cytochrome P-450 (P-450scc II) system of pig testis microsomes. J. Biol. Chem., **259**, 8729-8739 (1994)

17) **Pont, A., Goldman, E. S., Sugar, A. M., Siiteri, P. K. & Stevens, D. A.**: Ketoconazole-induced incease in estoradiole-testosterone ratio. Probable explanation for gynecomatia. Arch. Intern. Med., **145**, 1429-1431 (1985).

18) **Schürmeyer, T. & Nieschlag, E.**: Ketoconazole induced drop in serum and saliva testosterone. Lancet II, 1092 (1982).

19) **Schürmeyer, T. & Nieschlag, E.**: Effect of ketoconazole and other imidazole fungicides on testosterone biosynthesis. Acta. Endocrinol., **105**, 275-280 (1984).

20) **Santen, R. J., Bossche, H. V., Symoens, J., Brugmas, J. & De Coster, R.**: Site of action of low dose ketoconazole on androgen biosynthesis in men. J. Clin. Endocrinol. Metab., **57**, 732-736 (1983).

21) **De Coster, R., Beeres, D., Dom, J. & Willemsens, G.**: Endocrinological effect of single daily ketoconazole administration in male beagle dog. Acta. Endocrinol. **107**, 275-281 (1984).

22) **Engelhardt, D., Dörr, G., Jaspers, C. & Dörr, D.**: Ketoconazole blocks cortisol secretion in man by inhibition of adrenal 11β-hydroxylase. Klin. Wschr., **63**, 607-612 (1985).

23) **Dörr, H. G., Kuhnle, U., Holthausen, H., Bidlingmaier, F. & Knorr, D.**: Etomidate; A selective adrenocortical 11β-hydroxylase inhibitor. Klin. Wochensch., **62**, 1011-1031 (1984).

24) **Wagner, R. L., White, P. H., Kan, P. B., Rosenthal, M. H. & Feldman, D.**: Inhibition of adrenal steroidogenesis by the anesthetic etomidate. N. Engl. J. Med., **310**, 1415-1421 (1984).

25) **De Jong, F. H., Mallios, C., Jansen, C., Scheck, P. A. E. & Lamberts S. W. J.**: Etomidate suppresses adrenocortical function by inhibition of 11β-hydroxylation. J. Clin. Endcrinol. Metab., **59**, 1143-1147 (1984).

26) **Fry, D. E. & Griffiths, H.**: The inhibition by etomidate of the 11β-hydroxylation of cortisol. Clin. Endocrinol., **20**, 625-129 (1984).

27) **Fraser, R., Watt, I., Gray, C. E., Ledingham, I. M. & Lever, A. F.**: The effect of etomidate on adrenocortical function before and during hemorrhage shock. Endocrinoloby, **115**, 2266-2270 (1984).

28) **De Coster, R., Beerens, D., Haeterman, C. & Woutrs, L.**: Effet of etomidate on cortisol biosynthesis in isolated guinea-pig adrenal cells; comparison with metyrapone. J. Endocrinol. Invest. 8, 199-202 (1985).

29) **Allolio, B., Dörr, H., Stuttmann, R., Knorr, D., Engelhardt, D. & Winkelmann, W.**: Effect of a single bolus of etomidate upon major corticosteroid hormones and plasma ACTH. Clin. Endocrinol. **22**, 281-286 (1985).

30) **Touitou, Y., Legrant, J. C. & Desgez, P.**: Adrenocortical steroidogenesis and aminoglutethimide. Biomedicine, **18**, 185-191 (1973).

31) **Ralph. C., Brough, A. J., Cohen, M. N. P. & Satoh, P. S.**: Aminoglutethimide (Elipten-Ciba) as an inhibitor of adrenal steroidogenesis; mechanism of action and therapeutic trial. J. Chin Endo., **27**, 1239 (1967).

32) **Asbury R. F., Bakemeier, R. F., Felsch, E., Mccure, C. S., Savlov, E. & Bennett, J. M.**: Treatment of metastatic breast cancer with aminoglutethimide. Cancer, **47**, 1954-1958 (1981).

33) **Hart, M. M. & Straw, J. A.**: Studies on the

site of action o, p'DDD in the dog adrenal cortex.; Inhibition of ACTH-mediated pregnenolone synthesis. Steroid, 559-574 (1971).

34) Sato, H., Ashida, N., Suhara, K., Itagaki, E., Takemori, S. & Katagiri, M.: Properties of an adrenal cytochrome P-450 (P-450$_{11\beta}$) for the hydroxylations of corticosteroids. Arch. Biochem. Biopys., **190**, 307-314 (1978).

35) 永井国雄, 宮森 勇, 池田正寿, 武田仁勇, 安原修一郎, 越田英夫, 森瀬敏夫, 滝本弘明, 竹田亮祐, Vecsei, V.: 副腎ステロイド産生に及ぼすKetoconazoleの影響, 臨床薬理, **15**, 197-198 (1984).

36) Brown, R. D., Nicholson, W. E., Chick, W. T. & Strott, C. A.: Effet of o, p'DDD on human steroid 11β-hydroxylation activity. J. Clin. Endocrinol. Metab., **36**, 730-733 (1973).

37) 小島元子, 笹野伸昭: 新しいステロイド合成阻害剤 Trilostane の in vitro における酵素阻害剤について. 日内分泌会誌, **57**, 997-1008 (1981).

38) Nakajin, S. & Hall, P. F.: Microsomal cytochrome P-450 from neonatal pig testis. J. Biol. Chem. **256**, 3871-3876 (1981).

Effect of Inhibitors of Steroidogenesis on Cytochrome P-450 Catalyzed Reactions

Kunio Nagai, Department of Internal Medicine (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., **95**, 915—929 (1986)

Key words: Steroidogenesis, Cytochrome P-450, Ketoconazole, Etomidate.

Abstract

The present study was intended to examine the effect of Ketoconazole, Etomidate and some other known inhibitors of steroidogenesis on the purified reconstituted steroid monooxygenase system. The system consisted of cytochrome P-450 and its electron-transporting components such as adrenodoxin, its reductase, cytochrome b_5, NADPH-cytochrome b_5 reductase (FpD) and NADPH-cytochrome P-450 reductase (FpT) which had been purified from bovine adrenal mitochondria and pig testis microsomes. Ketoconazole and Etomidate competitively inhibited side chain cleavage reaction of cholesterol to form pregnenolone. The Ki values for Ketoconazole and Etomidate were 0.98 μM and 0.21 μM respectively. Compared with Metyrapone, (Ki=160 μM), Ketoconazole and Etomidate were potent inhibitors of cholesterol side chain cleavage enzyme (P-450scc) catalyzed reactions. Aminoglutethimide, Mitotane (o, p'-DDD) and Trilostane over the wide concentration range, failed to inhibit this reaction. Ketoconazole competitively inhibited hydroxylation of deoxycorticosterone (DOC) at the 11β-position to form corticosterone and at the 18-position to form 18-hydroxy DOC. The Ki value for Ketoconazole, calculated from either the 11β-hydroxylase reaction or the 18-hydroxylase reaction, was 0.56 μM. Ketoconazole also inhibited 18-hydroxylation of corticosterone to form 18-hydroxycorticosterone, with 50% inhibitory concentration of less than 0.03 μg/ml. The corresponding value in case of 18-hydroxylation of DOC was 0.3 μg/ml. The conversion of corticosterone to 18-hydroxycorticosterone was inhibited more potently than that of DOC to 18-hydroxy DOC by Ketoconazole. Etomidate, Aminoglutethimide and Metyrapone also had an inhibitory effect on P-450$_{11\beta}$ catalyzed reactions with Ki values of 0.74 μM, 4.83 μM and 0.10 μM respectively. Ketoconazole and Etomidate competitively inhibited cleavage of 17α-hydroxyprogesterone at the 17, 20 bond to give androstenedione with the Ki values of 2.60 μM and 16.0 μM, respectively. All other drugs of adrenal steroid inhibitory action failed to inhibit the same 17, 20 lyase (P-450scc II) system. All of the above listed inhibitors, over a wide variety of concentration ranges, had no significant effect on the 17α-hydroxylation of 11β-hydroxyprogesterone, the conversion also catalyzed by the same P-450sccII. Ketoconazole inhibited P-450c$_{21}$ catalyzed 17α-hydroxy-

pregesterone to 11-deoxycortisol with a Ki value of 1.26 μM. Other drugs including Etomidate failed to inhibit the same P-450c_{21} system. The electron-transporting system was not affected by either of these drugs. In conclusion, the present study demonstrates the precise site of action and relative potency of some known inhibitors of steroidogenesis, with particular reference to Ketoconazole and Etomidate, using a reconstituted steroid monoxydase system.