グリチルリンによる偽アルドステロン症の発症機序に関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 蘇馬, 隆一郎 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8170

金沢大学十全医学会雑誌　第99巻　第1号　98－108（1990）

グリチルリンによる偽アルドステロン症の発症機序に関する研究

金沢大学医学部内科学第二講座（主任：竹田亮祐教授）
蘇　馬　隆一郎

（平成2年1月18日受付）

甘草の主成分であるグリチルリチンの長期摂取により高血圧，浮腫，低カリウム血症などいわゆる偽アルドステロン症をきたすことが知られている．本症の発症機序をグリチルリチンの抽出物であるグリチルレチン酸 (glycyrrhetinic acid, GR) をもちい，ラット腎細胞質分画のアルドステロン受容体とGR との親和性を検討する一方，健常被験者においてコルチゾールとコルチゾンの変換酵素である 11β-hydroxysteroid dehydrogenase (11β-OHSD) 阻害作用について検討を加えた．ラット腎細胞質分画アルドステロン受容体に対しては，[^{3}H]-aldosterone に合成純糖質コルチコイドである RU28362 を加えた場合や鉱質コルチコイド受容体の選択的拮抗剤である［7 α-methoxycarbonyl-^{3}H］ZK 91587 を用い検討した．その結果，GR はアルドステロン受容体のうち鉱質コルチコイド受容体（I 型受容体）に選択的に結合することが示されたが，その親和性はアルドステロンの約1/10000にとどまった．一方グリチルリチン製剤 (225mg/日) を5名の健常被健者に7日間連続経口投与した前後で尿中のコルチゾール，コルチゾン濃度の変化を検討するとともに，ハイドロコルチゾン (0.6mg/kg) を経静脈性に投与した後の血中コルチゾール，コルチゾン濃度の経時的変動を検討した．その結果，GR 投与後において尿中コルチゾン/コルチゾール比は有意に低下したが，血中コルチゾンおよびコルチゾールの推移には有意な変化を認めず，GR は腎において 11β-OHSD を阻害しコルチゾール→コルチゾンへの変換を阻害する結果，腎内コルチゾール濃度が上昇し鉱質コルチコイド様作用を呈する可能性が示唆された．以上の成績から GR による鉱質コルチコイド様作用の発現機序には GR 自体の有する鉱質コルチコイド様作用に加え，11β-OHSD 阻害作用など複数の因子が関与していることが推察された．

Key words mineralocorticoid, pseudoaldosteronism, glycyrrhetinic acid, 11β-hydroxysteroid dehydrogenase, mineralocotricoid receptor

甘草は東洋では和漢薬の代表的薬剤として今日も広く用いられており，ヨーロッパでは胃潰瘍の治療薬として，北アメリカでは liquorice candy の甘味剤としても使用されてきた．甘草の抽出物であるグリチルレチン酸 (glycyrrhetinic acid, G R) は現在肝疾患，アレルギー疾患の治療に使用されており，GR の誘導体である carbenoxolone も消化性潰瘍治療剤として使用されている[1)~4)]．1946年 Revers[5)] は甘草の抽出物を消化性潰瘍の患者に投与したところ，およそ20%の患者に浮腫および，心不全様の発作をきたしたと報告した．また，Molhuysen ら[6)] は同抽出物を消化性潰瘍の患者に投与し，ナトリウムの貯留，尿中カリウム排泄の増加，低カリウム血症などを観察したと報告したが，その原因として甘草の抽出物中の GR がデオキシコルチコステロン (deoxycorticosterone, DOC) 様の作用を有する可能性を示唆した．その後も同様の報告

Abbreviations: ACTH, adrenocorticotropic hormone; B. P., blood pressure; DOC, deoxycorticosterone; GR, glycyrrhetinic acid; PRA, plasma renin activity; 11β-OHSD, 11β-hydroxysteroid dehydrogenase

が諸家により報告された[7~15]. Conn ら[16]は GR およびその誘導体によって引き起こされる鉱質コルチコイド過剰様の病態に対して，レニン－アルドステロン系の抑制に伴うことから，偽アルドステロン症 (pseudoaldosteronism) と呼称した．このような GR の鉱質コルチコイド様作用の発現機序に関して，現在まで種々の仮説が提唱されてきた．熊谷[17,18]はラットをもちいた実験にて，肝より抽出された 5 β-reductase の活性が GR により著しい阻害をうけ，この結果アルドステロンの分解，不活化が阻害され鉱質コルチコイド様作用が発現される可能性を示した．また，Armanini ら[19]は，GR がラット腎細胞質分画の糖質コルチコイドおよび鉱質コルチコイド受容体に結合することから，本症の原因が GR 自体の鉱質コルチコイド様作用である可能性を示した．一方 Stewart ら[20]は，腎において GR がコルチゾール (cortisol, F) からコルチゾン (cortisone, E) への変換酵素である 11β-hydroxysteroid dehydrogenase (11β-OHSD) を阻害することを示し，これが GR の鉱質コルチコイド様作用の主因であるとした．著者は GR の鉱質コルチコイド様作用の発現機序を解明する目的で，GR の腎アルドステロン受容体との結合実験を発展させると共に，あわせて GR による 11β-OHSD 阻害作用の関与についても検討した．

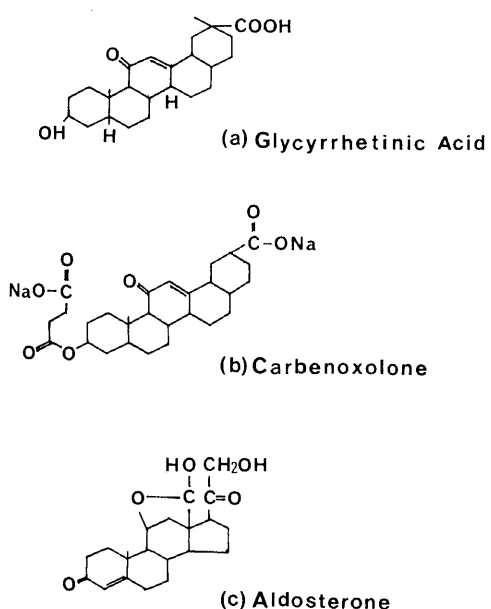

Fig. 1. Chemical structures of (a) glycyrrhetinic acid, (b) carbenoxolone, and (c) aldosterone.

材料および方法

Ⅰ．両側副腎摘除ラット腎細胞質分画アルドステロン受容体の性状に関する検討

1．ラット腎細胞質分画の調整

体重 200～250g の雄性ウィスター系ラット (三協ラボ，富山) を用い，内因性ステロイドの影響を除去するためペントバルビタール (40mg/kg 体重) 麻酔下，両側背部を切開し両側副腎を摘除した．標準固型飼料 (オリエンタル社，東京)，0.9%食塩水を随意に摂取させ 5 日間飼育後，ペントバルビタール (100mg/kg 体重) 麻酔下に開腹，4 ℃に氷冷した緩衝剤 A (10 mM tris-HCl, 20mM Na_2MoO_4 1 mM Dithiothreitol, 1 mM Ethylenediaminotetraacetate, 10% glycerol, pH 7.4) 50 ml で腹部大動脈より腎を灌流し血液成分を十分に除去した．摘出した腎の被膜を除去したのち細切，3 倍量の緩衝液 A を加え，テフロングラスホモジナイザーにてホモジナイズした後，4 ℃，1000×g，10分間遠心，上清をさらに 4 ℃，10500×g，60分間超遠心し上清を細胞質分画とした．

2．腎細胞質分画アルドステロン受容体の性状

細胞質分画 500μl (約 1 mg 蛋白/ml) と種々の濃度の [^{3}H]-aldosterone (比放射能 1.74×10^3 GBq/mmol, NEN Research Products) に緩衝液 A を含めた総量 1 ml の系内で 4 ℃，4 時間インキュベーションを行い，インキュベーション終了後，緩衝液 A に溶解して作成した 4 %活性化チャコール (Norit A, Sigma, USA) を 1 ml 加え 4 ℃，30分間静置し，非結合 [^{3}H]-aldosterone を吸着させた．その後 4 ℃，1500×g，15分間遠心した上清 200μl に，シンチレーター (AquasolII, New England Nuclear, USA) 10 ml を加え，液体シンチレーションカウンター LSC-671 (Aloka, 東京) にて放射能を測定した．同時に各 [^{3}H]-aldosterone の100倍の非標識 aldosterone を加えて同様にインキュベーションして得られた放射能を非特異的結合とし，各放射能より差し引き特異的結合を算出した．こうして得られた特異的結合をもとに，Scatchard plot[21]を行い，腎細胞質分画アルドステロン受容体と aldosterone との結合の解離定数 (Kd) と受容体数の指標となる最大結合能 (Bmax) を算出した．また，糖質コルチコイド受容体 (II 型受容体) の影響を除く目的で，合成純糖質コルチコイドである RU28362 (Russel, France) 200μl を加えて全く同様の実験を行った．更に鉱質コルチコイド受容体 (I 型受容体) を選択的に検討する目的で，[^{3}H]-aldosterone の代わりに，鉱質コルチコイド受容体の

選択的拮抗剤である［7 α-methoxycarbonyl-^{3}H］ZK 91587 (比放射能3.03×10^3 GBq/mmol, New England Nuclear) を用い同様の実験を行い比較し，腎細胞質分画アルドステロン受容体の性状に検討を加えた．

3．GR の腎細胞質分画アルドステロン受容体に対する競合

細胞質分画 500μl (約1 mg 蛋白/ml) と 1.0pM の［^{3}H］-aldosterone 緩衝液Aを含めた総量1 ml の系内にて，種々の濃度の非標識 GR とともに，4°C，4時間インキュベーションをおこない上記と同様に特異的放射能を算出した．これをもとに非放射性 GR による［^{3}H］-aldosterone の解離曲線を求めるとともに，RU28362 存在下で同様の実験を行い比較検討した．さらに GR の競合力を検討するため［7 α-methoxycarbonyl-^{3}H］ZK 91587 に対する非放射性 GR および非放射性 aldosterone の解離曲線をもとめ，［7 α-methoxycarbonyl-^{3}H］ZK 91587 の特異的結合を50%抑制するそれぞれのステロイド濃度を求め GR と aldosterone の競合力を比較した．

II．GR 投与における 11β-OHSD 阻害に与える影響

5名の健常男子を対象とした．被験者の年齢は23～26歳で，平均24.6歳であった．被験者は血圧，理学所見，心電図，血圧生化学検査において異常を認めなかった．実験の全期間を通じ，被験者のナトリウム摂取量は 200～250 mEq/日になるよう調整し，自由飲水とした．はじめの2日間はコントロール期間としその後グリチルリチン (グリチロン®，ミノファーゲン製薬，東京) を 225 mg/分3連続7日間経口で内服させ，内服終了後さらに2日間の観察期間をおいた．この間尿は連日全尿蓄尿し，電解質の測定に用い，コントロール期間の第2日目，及びグリチルリチン投与終了直前の第9日目の尿に関しては尿中のE，Fをも測定した．一方，グリチルリチン製剤内服直前，および内服終了直後において以下の要領で実験を行った．内因性コルチゾールの影響を排除するため夕食後30分以上の安静臥床の後，血圧，体重を測定．午後7時に肘静脈より前採血を施行し，電解質，血漿レニン活性 (plasma renin activity, PRA)，血漿アルドステロン，血漿EおよびF濃度を測定した．その後，安静臥床，絶食絶飲水下，水溶性ハイドロコルチゾン (サクシゾン®，日研化学，東京) 0.6mg/kg をすみやかに経静脈性に投与し，10，20，30，45，60，120，150，180，分に採血を施行，血漿EおよびF濃度を測定した．PRA，血漿アルドステロン濃度は既報のごとくラジオイムノアッセイにて測定し[22]，血漿F濃度は SPAC Cortisol Kit II (第一ラジオアイソトープ，東京) を用いたラジオイムノアッセイにて測定した．血漿E濃度の測定はエーテル抽出後，［^{3}H］-1, 2,-cortisone (比放射能 3.03×10^3 GBq/mmol, New England Nuclear,) を用いラジオイムノアッセイ硫安法にて測定し，

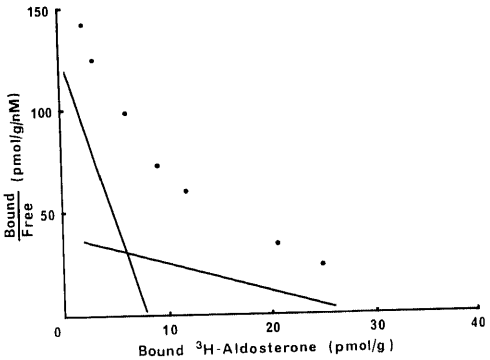

Fig. 2. Scatchard analysis of tritiated aldosterone binding to rat kidney cytosol prepared from adrenalectomized rats. Various concentrations of tritiated aldosterone were incubated with rat kidney cytosol (1 mg protein) in 1 ml assay mixture at 4°C for 4 hours. Unbound aldosterone was adsorbed by charcoal. The first slope indicated a high affinity and a low capacity site. (Kd=0.063 nM) The second slope indicated a low affinity and a high capacity site (Kd=0.72 nM).

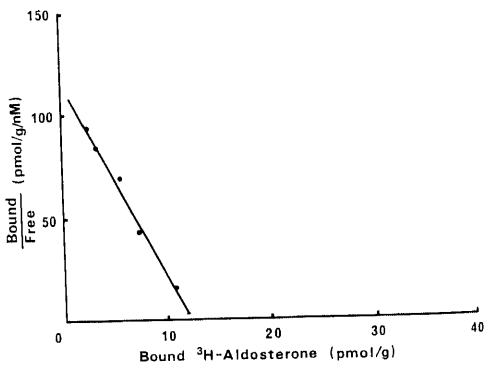

Fig. 3. Scatchard analysis of tritiated aldosterone binding to rat kidney cytosol prepared from adrenalectomized rat. Preincubation was performed with 200 μl RU28362 for 20 min at 4°C. Various concentrations of tritiated aldosterone were incubated with rat kidney cytosol (1 mg protein) in 1 ml assay mixture at 4°C hours. Unbound aldosterone was adsorbed by charcoal. The curve was linealized (Kd=0.105 nM).

また，尿中E，F濃度についても同様の方法にて測定した[23)~25)]．蛋白量はウシ血清アルブミンを標準としてLawry ら[26)]の方法によった．なお，5名の健常者には，あらかじめ実験主旨を説明し了解を得た上で実験を施行した．

Ⅲ．統計学的検定

測定値はすべて平均値±標準誤差で示した．統計学的検定には，図8に関しては分散分析後，Duncan の多重比較法を用い，$p<0.05$を有意とし，その他は対応のある標本の t 検定により行った．

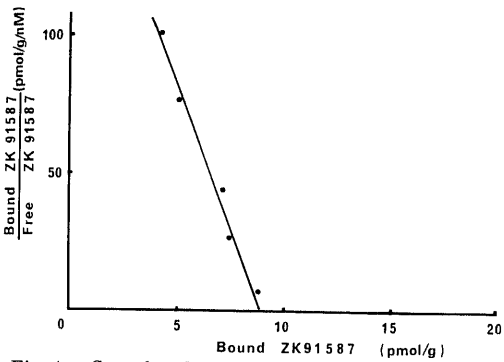

Fig. 4. Scatchard analysis of ZK91587 to rat kidney cytosol prepared from adrenalectomized rat. Various concentrations of ZK91587 were incubated with rat kidney cytosol (1 mg protein) in 1 ml assay mixture at 4°C for 4 hours. Unbound ZK91587 was adsorbed by charcoal. ZK91587 bound to one binding site (Kd=0.046 nM).

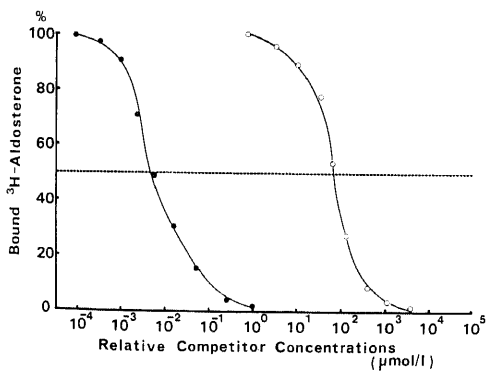

Fig. 5. Competition by aldosterone and glycyrrhetinic acid for tritiated aldosterone binding sites in rat kidney cytosol. Tritiated aldosterone (1.0 pM) and increasing concentrations of unlabeled aldosterone (—●—) or glycyrrhetinic acid (—○—) were incubated with rat kidney cytosol (1 mg protein) in 1 ml assay mixture at 4°C for 4 hours. Unbound aldosterone was adsorbed by charcoal.

成　　績

Ⅰ．ラット腎細胞質分画アルドステロン受容体の性状

ラット腎細胞質分画アルドステロン受容体に関しラジオアイソトープ (radioisotope, R I) 標識化合物として［^{3}H］-aldosterone を用いた場合の Scatchard plot による解析例を図2に示す．アルドステロン受容体は2つの構成成分から成ると考えられる結果を示した．すなわち鉱質コルチコイド受容体（Ⅰ型受容体）と考えられる高親和性，低結合性受容体の解離定数 (Kd) は 0.063nM，最大結合能 (Bmax) は 8.0pM/g 蛋白であり，糖質コルチコイド受容体（Ⅱ型受容体）と考えられる低親和性，高結合性受容体の部分の解離定数 (Kd) は 0.72nM，最大結合能 (Bmax) は 28.2pM/g 蛋白でありこれは従来からの報告に一致した[27)~30)]．

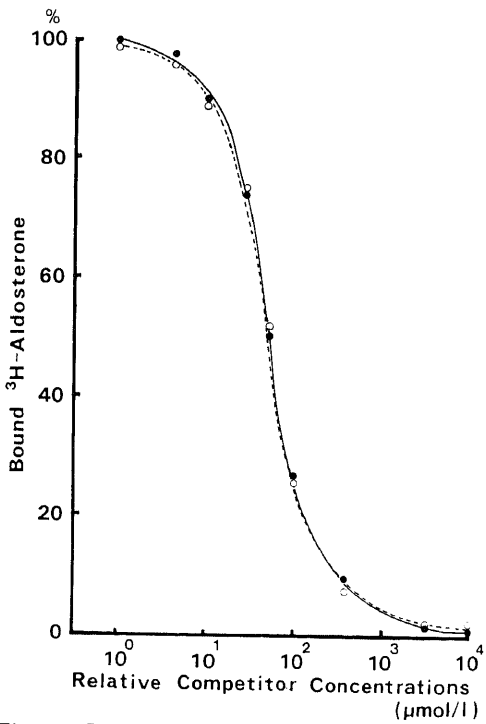

Fig. 6. Competition by glycyrrhetinic acid for tritiated aldosterone binding sites in rat kidney cytosol, preincubated with RU28362 (—●—), without RU28362 (···○···). Tritiated aldosterone (1.0 pM) and increasing concentrations of unlabeled glycyrrhetinic acid with or without RU28362 were incubated with rat kidney cytosol (1 mg protein) in 1 ml assay mixture at 4°C for 4 hours. Unbound aldosterone was adsorbed by charcoal.

さらに合成純糖質コルチコイドである RU28362 存在下において同様の検討を加えたところII型受容体は RU28362 により占拠され，図3に示したごとく [^{3}H]-aldosterone を用いた Scatchard plot による解析ではI型受容体のみが認められ，その解離定数 (Kd) は 0.105nM，最大結合能 (Bmax) は12.0pM/g 蛋白であった．以上より RU28362 はラット腎細胞質分画のアルドステロン受容体においてII型受容体を完全に阻害することが示された．次に，近年入手可能となったI型受容体の選択的拮抗剤である [7 α-methoxycarbonyl-^{3}H] ZK 91587 を RI 標識化合物としてもちいて同様の検討を加えた結果を図4に示す．Scatchard plot による解析では，RU28362 を用いた結果と同様に直線化しI型受容体のみが認められ，解離定数 (Kd) は 0.046nM，最大結合能 (Bmax) は 9.0pM/g であった．

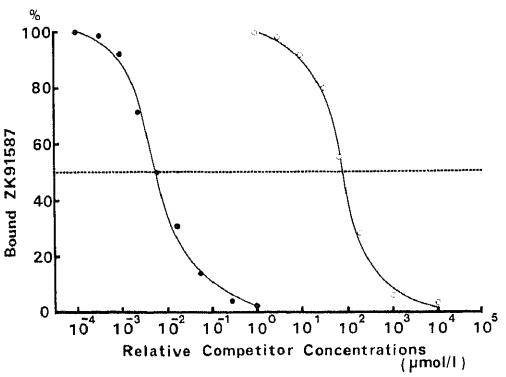

Fig. 7. Competition by aldosterone and glycyrrhetinic acid for ZK91587 binding sites in rat kidney cytosol. Tritiated ZK91587 (10 . pM) and increasing concentrations of unlabeled aldosterone (—●—) or glycyrrhetinic acid (—○—) were incubated with rat kidney cytosol (1 mg protein) in 1 ml assay mixture ar 4°C for 4 hours. Unbound aldosterone was adsorbed by charcoal.

Table 1. Changes of body weight, mean blood pressure, serum Na, serum K, plasma renin activity (PRA) and plasma aldosterone before and after the administrations of GR (225mg/day, for a week).

	before	after
Body weight (kg)	61.3±2.5	62.1±2.1
Mean B. P. (mmHg)	90.3±2.2	90.0±3.0
Serum Na (mEq/L)	140.6±0.4	139.2±0.8
Serum K (mEq/L)	3.8±0.1	3.4±0.1*
PRA (ng/ml/h)	1.3±0.1	1.0±0.1*
Plasma aldosterone (pg/ml)	33.1±2.2	24.5±1.5**

Mean B.P., mean blood pressure. Values are mean ±S.E.M.
*, significantly different from the before values ($p<0.05$)
**, significantly different from the before values ($p<0.01$)

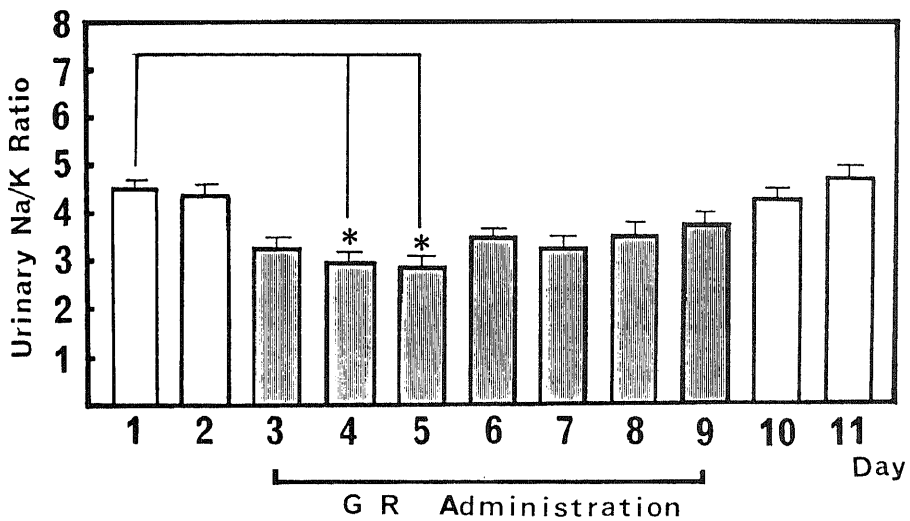

Fig. 8. Changes of urinary Na/K ratio during administrations of glycyrrhetinic acid (225 mg/day, for a week). GR, glycyrrhetinic acid. Values are mean±S. E. M. (n=5). *, $p<0.05$ vs Day 1 by Duncan's multiple comparison.

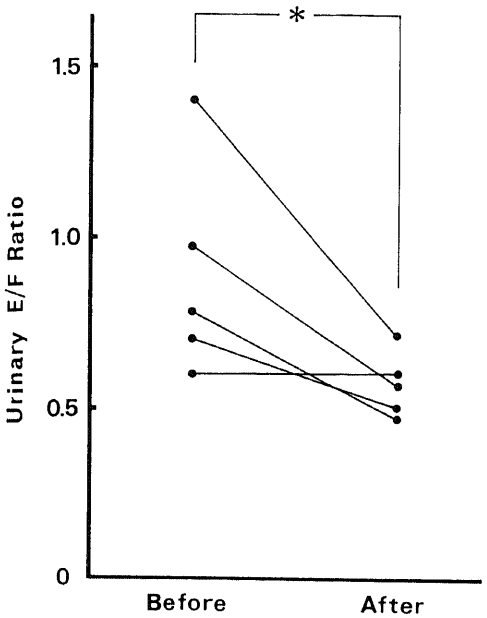

Fig. 9. Changes of urinary E/F ratio before and after administrations of glycyrrhetinic acid (225 mg/day, for a week) in 5 volunteers. Before, before administrations of glycyrrhetinic acid; After, after administrations of glycyrrhetinic acid; E, cortisone; F, cortisol. *, $p<0.05$.

II. GR 腎細胞質分画アルドステロン受容体に対する競合に関する検討

アルドステロン受容体に対する GR の競合に関しては，[^{3}H]-aldosterone を用いた結果を図 5 に示す．GR は非標識アルドステロン同様に濃度が増すにつれ [^{3}H]-aldosterone と競合することが示された．その競合力は，[^{3}H]-aldosterone の特異的結合を50%抑制する濃度で比較した場合アルドステロンが$1.2\times10^{-3}\mu$mol/l, GR が$8.6\times10\mu$mol/l となり GR はアルドステロンの約10000倍の濃度で競合することが示された．また，RU28362 存在下においても GR の鉱質コルチコイド受容体に対する競合は影響を受けないことが示された (図 6)．さらに RI 標識化合物を [7α-methoxycarbonyl-^{3}H] ZK 91587 として同様の検討を加えた結果においても，図 5 と同様の傾向を認め，[7α-methoxycarbonyl-^{3}H] ZK 91587 の特異的結合を50%抑制するそれぞれの濃度はアルドステロンは$2.1\times10^{-3}\mu$mol/l, GR が$7.3\times10\mu$mol/l であり，やはり GR アルドステロンの約10000倍の濃度で競合することが示された (図 7)．

III. GR 投与下における 11β-OHSD 阻害に与える影響

GR 投与前および投与直後における臨床所見の推移

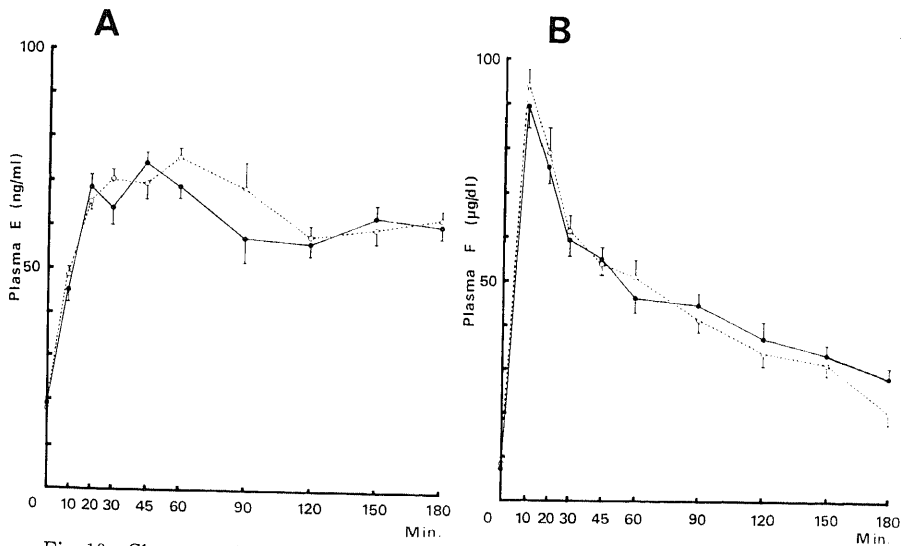

Fig. 10. Changes of plasma E (A) and F. (B) before (—●—) and after (…○…) administrations of glycyrrhetinic acid (225 mg/day, for a week) in 5 volunteers. Hydrocortisone (0.6 mg/kg) was injected from the cubital vein and the blood collection was performed thereaffer. Values are mean± S. E. M. (n=5). No significant differences were found in these values between before and after administrations of glycyrrhetinic acid. E, cortisone; F, cortisol.

に関しては表1に示す結果を得た．すなわち，体重，平均血圧，血漿ナトリウム値は有意な変化を認めなかったが，血漿カリウム値は 3.8±0.1mEq/l から 3.4±0.1mEq/l へと，また PRA は 1.3±0.1ng/ml/hr から 1.0±0.1ng/ml/hr へ，血漿アルドステロン値は 33.1±2.2pg/ml から 24.5±1.5pg/ml へとそれぞれ有意に低下した．また GR 投与前後を通じた全期間の尿中ナトリウム/カリウム比は図8に示すように，GR 投与翌日より GR 投与後第7日まで低下する傾向を認め，尿中カリウム排泄量の増加が認められた．この様な状況下において GR の投与前後における尿中 E/F 比は，図9に示すように5例ともに有意な低下を認めた．一方，GR 投与前後における水溶性ハイドロコルチゾン静注後の血中EおよびFの推移に関しては図10に示すように両者ともに有意な変化を認めなかった．

考　　察

甘草の抽出物である GR の鉱質コルチコイド様作用の発現機序に関して，現在まで種々の説が提唱されているが一定の見解は得られていない．現在までの報告を検討すると以下の説に分類される．1）GR の副腎皮質刺激ホルモン (adrenocorticotropic hormone, ACTH) 様作用－副腎皮質の鉱質コルチコイド産生増加－　2）腎尿細管に対するアルドステロン作用の増強．3）肝における鉱質コルチコイド代謝の阻害．4）GR 自体の腎尿細管における鉱質コルチコイド受容体との結合．5）腎尿細管に局在する 11β-OHSD の阻害を介する鉱質コルチコイド様作用の発現．1）に関しては，1970年 Mattingly ら[31]は GR の誘導体である carbenoxolone を消化性潰瘍の患者に投与したところ，carbenoxolone が 11-ハイドロキシコルチコイドを上昇させ，この作用がデキサメサゾン投与下，内因性 ACTH を抑制した状態でも持続したことを観察した．この効果は副腎不全患者においては認められないことより，carbenoxolone が ACTH 様物質として副腎に作用する可能性を示唆した．2）の可能性として，石川ら[32]はカエル皮膚の短絡電流を用いた実験で GR がアルドステロンの作用を増強したという結果を示している．3）に関する報告として，熊谷ら[18]はラットをもちいた実験にて，肝より抽出された5β-reductase の活性が GR により著しい阻害をうけ，この結果アルドステロンの分解，不活化が阻害され鉱質コルチコイド作用が発現される可能性を示した．しかしながら上記1）から3）までの機序を想定した場合，臨床的に GR による偽アルドステロン症においては，血中アルドステロン濃度および尿中アルドステロン排泄量が低下しているという事実を十分に説明できないという問題点が指摘される．これらの説に対して，4）および5）は腎尿細管における GR の作用に着目した説であり，今回の成績はこれらの説を支持する結果である．

ラット腎細胞質分画のアルドステロン受容体は Rousseau ら[33]の研究により2つの構成成分，すなわち鉱質コルチコイド受容体（I型受容体），糖質コルチコイド受容体（II型受容体）からなることが示され，前者はアルドステロンに対して高親和性かつ低結合性，後者は低親和性，高結合性であることが知られている．両側副腎摘除ラットの，腎細胞質分画とアルドステロンとの結合を Scatchard plot で解析した今回の成績においても2つの構成成分が確認され，各々の解離定数 (Kd) は，I型受容体が 0.063 nM，II型受容体が 0.72 nM と従来の報告に近似した値が得られた（図2）．なお今回著者は腎細胞質分画を調整する際，4°C の低温下で行い，緩衝溶液中に 20 mM のモリブテン酸ナトリウムを加えた．モリブテン酸ナトリウムは Grekin ら[34]の報告によれば，腎細胞質分画の受容体の安定化に有用とされており，著者もこれを用いた．また，更に新たな検討として今回著者は，I型受容体の性状を明らかにする目的で合成純糖質コルチコイドである RU28362 を用い実験を行った．その結果，RU 28362 はラット腎細胞質分画のアルドステロン受容体のうちII型受容体のみを阻害することを示した（図3）．さらに，著者は近年入手可能となった RI 標識化合物［7α-methoxycarbonyl-^{3}H］ZK 91587 を用いアルドステロン受容体の性状を解析した．ZK91587 は Schering らにより合成され，Grill ら[35]の腎細胞質アルドステロン受容体を用いた検討によれば，アルドステロン受容体のうちI型受容体にのみ結合することが示されている．今回の検討においても ZK91587 はI型受容体のみを検出し（図4），その解離定数 (Kd) 0.046nm となることが示された．GR 自体が腎尿細管においてアルドステロン受容体と結合することにより鉱質コルチコイド様作用を発現するという説について，Ulmann ら[36]はラット腎細胞質分画を用いた実験により，GR がアルドステロン受容体と直接結合する可能性を示した．その後 Armanini ら[19]は，やはりラット腎細胞脂質分画を用いた競合実験で，GR のみならず，glycyrrhizic acid もアルドステロン受容体と結合することにより鉱質コルチコイド様作用を発現することを示した．しかしながらこれらの報告では，GR がアルドステロン受容体のうちI型，II型のいず

れの受容体に対して親和性を有するのかという点についての検討が十分でない．今回著者は，前述のRU28362がラット腎細胞質分画アルドステロン受容体のうち，II型受容体のみを阻害するとの基礎的検討に基づき，RU28362投与前後においてGRのアルドステロン受容体における競合に変化が認められないとを示した(図6)．この成績からGRはアルドステロン受容体のうちでも，特にI型受容体に選択的に結合することが明らかになった．さらに，ZK91587を用いた検討においても図7に示すようにGRはアルドステロン同様に，I型受容体において競合することが示された．

GRのアルドステロン受容体に対する競合に関しては，GRアルドステロンと比較した場合，およそ10000倍の濃度で競合するという結果が得られた，これはArmanini らの報告に一致した結果である[19]．この事実はGRによる偽アルドステロン症がGRを長期投与した際に発症すると言う臨床的事実を説明すると思われる．しかし一方において，折笠らの報告にあるように偽アルドステロン症がGR投与後比較的早期に出現する臨床例が認められるなど[37)~39)]，GR自体の直接的な鉱質コルチコイド作用のみで本症の発現を説明することは困難であると思われる．

11β-OHSDはFとE間の相互変換酵素であり，11β-dehydrogenaseと11-oxo-reductaseという2つの作用を有し，主として肝，腎に局在することが知られている[40]．11β-OHSDはグルココルチコイド代謝に重要な役割をもち，その先天的欠損は高血圧，低カリウム血症などをきたし，Edwards らによりミネラロコルチコイド過剰症候群として第1例が報告されて以後，今日まで十数例の報告がある[41)~43)]．11β-OHSDの偽アルドステロン症発現に関与する可能性について，Stewart ら[20]は7名の健常被験者に甘草を200 g/日10日間経口投与し，尿中Fおよびその代謝産物が有意に高値となることを示した．更にGRが腎において11β-OHSDを阻害し腎内F濃度が上昇する結果，腎尿細管I型受容体にFが結合し鉱質コルチコイド様作用を発現する可能性を示した．今回の検討ではグリチルリチン225 mg/日，7日間連続経口投与により，血漿カリウム値，PRA，アルドステロンは有意に低下し(表1)，また尿中ナトリウム/カリウム比に関しても低下する傾向を認め(図8)鉱質コルチコイド様作用の発現を認めた．その際，尿中のE/F比はGR製剤投与後有意に低下し，本症発現に関与する一因と考えられた(図9)．さらに，GR製剤投与前後においてハイドロコルチゾン静注後の血中FおよびE濃度の推移に変化を認めなかったことより(図10)，GRは11β-OHSDの主な局在である肝，腎のうち主として腎においてF→Eへの変換を阻害し，肝における11β-OHSDに対する関与は少ないものと考えられた．なお，腎における11β-OHSDの局在についてはStewart らのオートラジオグラフィをもちいた最近の報告で確認されているが[44]，今後肝，腎におけるGRによる11β-OHSD阻害作用の特異性や，肝，腎相互の関連などにつき更に検討を加える必要があろう．以上よりGRによる鉱質コルチコイド様作用の発現には腎におけるアルドステロン受容体への結合が重要であるが，臨床効果の発現は単一の因子によるものではなく複数の因子が関与するものと考えられた．

結　　論

甘草の主成分であるグリチルリチンによる偽アルドステロン症の発症機序を明らかにするため，グリチルレチン酸(glycyrrhetinic acid, GR)を用い，GRと腎アルドステロン受容体との結合に関して詳細な検討を加えると共に，GRによる11β-hydroxysteroid dehydrogenase (11β-OHSD)阻害の可能性についても検討し，以下の結果を得た．

1．GRはラット腎細胞質分画アルドステロン受容体のうち，特に鉱質コルチコイド(I型)受容体に選択的に結合することが示された．

2．GRは鉱質コルチコイド(I型)受容体に対してアルドステロンと競合することが示されたが，その競合力はアルドステロンの約1/10000と低値にとどまった．

3．健常被験者5名にグリチルリチン(225 mg/日)7日間連続経口投与した後，血漿カリウム値，血漿レニン活性(plasma renin activity, PRA)，アルドステロン濃度は有意に低下し，尿中ナトリウム/カリウム比も減少する傾向を認め，鉱質コルチコイド様作用の発現を認めた．

4．GR経口投与後において尿中のコルチゾール/コルチゾン比は有意に低下したが，GR投与前後においてハイドロコルチゾン静注後の血中コルチゾールおよびコルチゾン濃度の推移に変化を認めず，GRは主として腎において11β-OHSDによるコルチゾール→コルチゾンへの変換を阻害し，腎内コルチゾール濃度が上昇する結果，鉱質コルチコイド様作用を発現する可能性が示された．

以上より，GRによる偽アルドステロン症発現にはGR自体の鉱質コルチコイド様作用のほか複数の因子が関与している可能性が考えらた．

謝 辞

稿を終えるに臨み，御指導と御校閲を賜りました恩師竹田亮祐教授に深甚なる謝意を表します．また終始御指導頂きました宮森勇講師，森瀬敏夫助手に深く感謝し，併せて本研究の遂行に際し多大なる御協力を頂ました池田正寿先生，越田英夫先生をはじめ金沢大学医学部第二内科第二研究室Aグループの各先生方に深く感謝します．さらに，薬物動態の解析に御協力して頂いた金沢大学付属病院薬剤部，市村藤雄教授，中島恵美助教授，統計学的処理につい御指導を賜りました金沢大学衛生学，橋本和夫教授に深く感謝いたします，尚，本論文の主旨は第7回ステロイドホルモン国際シンポジウム，第86回日本内科学会総会，第61回日本内分泌学会春季大会，第62回日本内分泌学会秋季大会にて報告した．

文 献

1) 鈴木 宏，大田康幸，平山千里，清水直容，麻生芳郎：強力ミノファーゲンCの慢性肝炎に対する治療効果について：二重盲験法による検討．医学のあゆみ，**102,** 562-578 (1977).

2) **Doll, R., Hill, I. D. & Hutton, C.:** Treatment of gastric ulcer with carbenoxolone sodium and oestrogens, Gut, **6,** 19-24 (1965).

3) **Hausmann, W. & Tarnoky, A. L.:** Biochemical effects of short term treatment with carbenoxolone disodium. Br. J. Pharmacol., **26,** 412-420 (1966).

4) **Langman, M. S., Knapp, D. R. & Wakley, E.:** Treatment of chronic gastric ulcer with carbenoxolone and gefarnate: a comparative trial. Br. Med. J., **3,** 84-86 (1973).

5) **Revers, F. E.:** Heeft Succus LIquiritae een gegenzede werking op de Maagweer ? Ned. Tijdschr. Geneeskd., **90,** 135-137 (1946).

6) **Molhuysen, J. A., Gerbbandy, de Vries, L. A., de Jong, J. C., Lenstra, J. B., Turner, K. P. & Brost, J. G. G.:** A liquorice extract with deoxycortone-like action. Lancet, **2,** 381-386 (1950).

7) **Strong, J. A.:** Serum pottasium deficiency during treatment with sodium P. A. S. and liquorice extract. Br. Med. J., **2,** 998-1002 (1951).

8) **Bannister, B., Ginsburg, R. & Shneerson, J.:** Cardiac arrest due to liquorice-induced hypokalemia. Br. Med. J., **2,** 738-739 (1977).

9) **Comming, A. M. M.:** Metabolic effect of liquorice. Br. Med. J., **1,** 906 (1977).

10) **Epstein, M. T., Espiner, E. A., Donald, R. A. & Hoghes, H.:** Liquorice toxicity and the renin angiotensin aldosterone axis in man. Br. Med. J., **1,** 209-210 (1977).

11) **Chamberlain, T. J.:** Liqorice poisoning, pseudoaldosteronism and heart failure. J. A. M. A., **213,** 1343 (1970).

12) **Davies, G. J., Rhodes, J. & Calcraft, B.:** Complications of carbenoxolone therapy. Br. Med. J. **3,** 400 (1969).

13) **Lefebvre, R. E. & Marc-Aurele, J. :** Liquorice and hypertention. Can. Med. Assoc. J., **99,** 230-231 (1969).

14) **Griss, E. D., Dexter, J. D. & Roth, R. G.:** Hypokalemic myopathy with myoglobinuria associated with liquorice ingestion. N. Engl. J. Med., **274,** 602-606 (1966).

15) **Turpie, A. G. G. & Thomson, T. J.:** Carbenoxolone sodium in the treatment of gastric ulcer with special reference of side effects. Gut, **6,** 591-594 (1965).

16) **Conn, J. W., Rovner, D. P. & Cohen, E. L.:** Licorice-induced pseudoaldosteronism. Hypertension, hypokalemia, aldosteronopenia, and suppressed plasma renin activity, J. A. M. A., **205,** 492-496 (1968).

17) 田村 泰：グリチルレチン酸及びその誘導体のラット肝△-3 ketosteroids-5 αおよび5 β-reductase に対する影響について．日内会誌，**51,** 589-560 (1975).

18) 熊谷 朗：グリチルリチンの作用とその機序．Mino. Med. Rev., **23,** 181-189 (1978).

19) **Armanini, D., Karbowiak, I. & Funder, J. W.:** Affinity of liquorice derivatives for mineralocorticoid and glucocorticoid receptors. Clin. Endocrinol., **19,** 609-612 (1983).

20) **Stewart, P. M., Wallace, A. M., Valentino, R., Burt, D., Shackleton C. L.& Edwards, C. R. W.:** Mineralocorticoid activity of liquorice; 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency comes of age. Lancet, **2,** 821-823 (1978).

21) **Scatchard, G.:** The attraction of proteins for small molecules and ions. Ann. NY Acad. Sci., **51,** 660-672 (1949).

22) **Takeda, R., Morimoto, S., Uchida, & Miya mori. I.:** Changes in plasma renin activity and pla sma aldosterone in the induced paralytic attack of thyrotoxic periodic paralysis. Acta Endocrinol., **82,** 715-727 (1978).

23) **Murphy, B. E. P.:** Some studies of the protein binding of steroids and their application to the routine micro and ultramicro measurement of various steroids in body fluids by competitive protein binding radioassay.: J. Clin. Endocrinol. Metab., **27,** 973-976 (1967).

24) **Ruder, H. J., Guy, R. L. & Lipsett, M. B.:** A radioimmunoassay for cortisol in plasma and urine. J. Clin. Endocrinol. Metab., **35,** 219-224 (1972).

25) **柳瀬敏彦, 関屋健策, 名和田新, 加藤堅一, 井林博:** スパックコルチゾールキットIIの基礎的および臨床的検討. 医学と薬学, **11,** 837-839 (1984).

26) **Lawry, O. H., Rosbrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.:** Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., **193,** 265-275 (1951).

27) **Orjan, W. & Zhao-Ving, Yu.:** Mineralocorticoid receptor in rat kidney and hippocampus: characterization and quantitation by isoelectric focusing. Endocrinology, **113,** 243-250 (1983).

28) **Higgins, J. R., Wambach, G., Kem, D. C., Gomez-Sanchez, C., Holland , O. B. & Kaplan, N.:** Interation of 16β-hyroxydehydroepiandrosterone with renal mineralocorticoid receptors. J. Lab. Clin. Med., **2,** 250-256 (1977).

29) **笹野公伸, 笹野伸昭, Martin, K. O. & New, M. I.:** 鉱質コルチコイド受容体—そのステロイド特性—. 医学のあゆみ, **137,** 1043-1048 (1986).

30) **Scholer, D. W., Misina, T. & Edelman, I. S.:** Distribution of aldosterone receptors in rat kidney cortical tubules enriched in proximal and distal segments. Am. J. Physiol., **237,** 360-366 (1979).

31) **Mattingly, D,. Tyler, C. & Bilton, E.:** Plasma 11-hydroxycorticoid levels after carbenoxolone sodium. Br. Med. J., **2,** 793-795 (1969).

32) **石川三衛, 斉藤寿一:** グリチルリチンのアルドステロンによるカエル皮膚ナトリウム能動輸送促進効果の増強作用. 医学のあゆみ, **105,** 613-615 (1979).

33) **Rousseau, G. G., Baxter, L. D., Funder, J. W., Edelman, I. S. & Tomnins, G. M.:** Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors for aldosterone. J. Steroid Biochem., **3,** 219-227 (1972).

34) **Grekin, R. J. & Sider, R. S.:** Aldosterone receptor assay in rat kidney cytosol. J. Steroid Biochem., **13,** 835-837 (1981).

35) **Grill, H. J., Nickisch., Schulze, P. E., Laurent, H., Elger. W., Heubner, A. & Pollow, K.:** ^{3}H-ZK 91587: A new synthetic, highly specific ligand for mineralocorticoid receptor determination. J. Steroid Biochem., **23 (suppl.),**19 (1985).

36) **Ulmann, A., Menard, J. & P, Corvol.:** Binding of glycyrrhetinic acid to kidney mineralocorticoid and glucocorticoid receptors. Endocrinology, **97,** 46-51 (1975).

37) **折笠哲男, 斉藤寿一, 福井順一, 石川三衛, 藤岡隆庸, 葛谷 健, 吉田 尚:** 甘草による偽性アルドステロン症の1例. 内科, **48,** 1059-1062 (1981).

38) **Chamberlain, T. J.:** Liqorice poisonig, pseudoaldosteronism and heart failure. J. A. M. A., **213,** 1343 (1970).

39) **杉田 寛, 大鶴 昇, 宝来善次, 山本智英, 荻原敏男, 藤村敏宏, 打田日出夫:** 甘草による pseudoaldosteronism の1症例. 日内会誌, **63,** 1312-1317 (1974).

40) **Bush, I. E., Hunter, S. A. & Meigs. R. A.:** Metabolism of 11-oxygenated steroids. Biochem. J., **107,** 239-257 (1968).

41) **Monder, C., Shackleton, C. H. L. & Bradlow, H. L.:** The syndrome of apparent mineraloc orticoid excess: Its association with 11β-dehydrogenase and 5β-reductase deficiency and some consequences for corticosteroid metabolism. J. Clin. Endocrinol Metab., **63,** 550-557 (1986).

42) **Shackleton, C. H. L., Winter, J. S. D., Arteaga, E. Lopez, J. M. & Rodriguez, J.:** Congenital 11β-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency associated with juvenile hypertrnsion: corticosteroid metabolite profiles of four patients and families. Clin. Endocrinol., **22,** 701-712 (1985).

43) **Ulick, S., Levine, L. S. & Gunczler, P.:** A syndrome of apparent mineralocorticoid excess associated with defects in the peripheral metabolism of cortisol. J. Clin. Endocrinol. Metab., **49,** 757-764 (1979).

44) **Edwards, C. R. W., Stewart, P. M., D. Burt., L. Brett., Mclntyre, M. A., Sutanto, W. S., de Kloet, E. R. & Monder, C.:** Localization of 11β-hydroxysteroid dehydrogenase; tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor. Lancet., **2,** 986-990 (1988).

The Mechanism (s) of Pseudoaldosteronism Caused by Glycyrrhizin Ryuichiro Soma, Department of Internal Medicine (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., 99, 98—108, (1990)

Key words mineralocorticoid, pseudoaldosteronism, glycyrrhetinic acid, 11 β-hydroxysteroid dehydrogenase, mineralocorticoid receptor

Abstract

The abuse of glycyrrhizin, active principle of liquorice, leads to hypertension, edema, hypokalemia, termed pseudoaldosteronism. The present study was performed to clarify the mechanism (s) for the development of pseudoaldosteronism, usining mineralocorticoid receptors of rat kidney cytosol. Furthermore, the role of 11β-hydroxysteroid dehydrogenase inhibition by glycyrrhetinic acid (GR) for the development of pseudoaldosteronism was also studied in five normal subjects. In the in vitro receptor binding study, GR bound exclusively to mineralocorticoid (Type I) receptors of rat kidney cytosol, but its affinity to Type I receptors was approximately 1/10000 of that of aldosterone. The urinary cortisone (E)/cortisol (F) ratio was significantly decreased after glycryrrhizin (225mg/day t.i.d) administration for seven consecutive days in five healthy volunteers. The changes of plasma E and F during hydrocortisone (0.6mg/kg i.v.) infusion was not altered after glycyrrhizin administration. It is demonstrated that GR inhibits renal conversion of cortisol to cortisone by 11β-OHSD, which may also contribute to the mineralocorticoid activity of glycyrrhizin. In summary, it is suggested that multiple mechanisms may be involved in the development of pseudoaldosteronism induced by glycyrrhizin.