イヌおよびラット血中testosterone, LHおよびラット精巣でのsteroid生成能に対するTZP-4238の効果

帝国臓器製薬株式会社代謝研究部¹⁾, 群馬大学医学部泌尿器科²⁾

本 間 誠次郎¹⁾, 竹 沢 豊²⁾, 山 中 英 寿²⁾

The Effects of Antiandrogen TZP-4238 on Plasma Testosterone and LH, and Steroidgenesis in Rat and Canine Testis

Seijiro Honma¹⁾, Yutaka Takezawa²⁾, and Hidetoshi Yamanaka²⁾

1) Pharmacokinetics Research Department, Teikoku Hormone Mfg. Co. LTD., 1604 Shimosakunobe, Takatsu-ku, Kawasaki 213, Japan

2) Department of Urology, Gunma University School of Medicine Showa-machi Maebashi, Gunma 372. Japan

TZP-4238 suppresses plasma testosterone in humans, but its action on the androgen biosynthesis pathway has not been established. Therefore, we researched the testicular testosterone level and the testosterone biosynthesis pathway in vitro in rats before and after receiving a single or continuous oral dose of TZP-4238.

The total testosterone fell to 60% of the basal level within 3-8 hr ($p < 0.05$) and then returned to the control concentration by 24 hr after a single administration of 32 mg/kg. The alteration of the plasma testosterone level correlated well with that of the intratesticular level, which was decreased to 50% at 3-8 hr and recovered to the control level by 24 hr. However, the decrement of the plasma LH level at 3-8 hr after a single oral administration was slight and it then returned to the original level at 12 hr. During the 8 weeks of daily administration of 0.5 mg/kg of TZP-4238 or chlormadinone acetate to dogs, the plasma testosterone levels were slightly lower than the basal extent.

In vitro experiments were conducted on the rat testis using the exogenous precursor steroids 20α -hydroxycholesterol, pregnenolone and progesterone, in various steps leading to the biosynthesis of testosterone. Trilostane acted at 3β -hydroxysteroid dehydrogenase (50% inhibition concentration, IC_{50} was $1\mu M$), ketoconazole inhibited the 17α -hydroxylase, and $C_{20, 22}$ - and $C_{17, 20}$ -lyase activities, with an IC_{50} of $1-50\mu M$. Cyproterone acetate inhibited both the 3β -hydroxysteroid dehydrogenase ($IC_{50}; 50\mu M$) and $C_{17, 20}$ -lyase. On the other hand, TZP-4238 exhibited a weaker inhibition of 3β -hydroxysteroid dehydrogenase ($IC_{50}; 100\mu M$) than cyproterone acetate, but not of hydroxylase and lyase. Though TZP-4238 did not inhibit the increased testosterone level induced by hCG, trilostane markedly inhibited the effect induced by hCG. These in vitro findings confirmed that TZP-4238 has no direct inhibitory effect on testicular steroidogenesis. These findings suggest that TZP-4238 causes a depression in plasma testosterone, and its action appears to be mainly the suppression of pituitary LH secretion.

Keywords: TZP-4238, Antiandrogen, Prostate, Testis, Testosterone biosynthesis

緒 言

17 α -Acetoxy-6-chloro-2-oxa-4, 6-pregnadiene-3, 20-dione (TZP-4238 Fig.1) は男性ホルモン作用に拮抗し, 実験的および自然発生前立腺肥大イヌの前立腺を萎縮させた¹⁾²⁾。その主な機序は血中から前立腺への testosterone の取り込み阻止による前立腺内の androgen 量の低下および前立腺核内の androgen receptor の減少等によると報告されている³⁾⁴⁾。しかし, TZP-4238 をヒトに大量投与すると血中 testosterone や黄体刺激ホルモン (LH) 等は低下するが, 血中 cortisol はほとんど変化しない⁵⁾。一方, マウスおよびイヌでは TZP-4238 投与で副腎の萎縮や血中 cortisol の低下が認められ, 血中 cortisol 低下の動物差の原因は TZP-4238 の代謝の差と報告されている⁶⁾。しかし, TZP-4238 による testosterone および LH 低下の機序について動物ではほとんど検討されていない。近年, Cisplatin, cyclosporin, alcohol 等の投与による血中および精巣中の testosterone の低下の機序についてもかなり詳細に検討され, 一部についてはその機構が明らかにされている^{7)~10)}。

TZP-4238 の代謝はヒト, ラット, イヌおよびマウス等で異なることから, 血中 testosterone の動態についても動物差があるのでないかと考えられたのでラットおよびイヌでの検討が必要となった。もし, ヒトと同様に血中 testosterone が低下したならば, それは視床下部-下垂体-精巣のどの段階で生じたかについても明らかにすることとした。まず, TZP-4238 が精巣に作用して testosterone の生成を抑制したとするならば, ミトコンドリアでの cholesterol 側鎖切断酵素 (20, 22-lyase), またはミクロゾーム中の 17 α -hydroxylase, および 17, 20-側鎖切断酵素等の酸化酵素 (P-450) なのか, あるいは, 3 β -hydroxysteroid dehydroxylase (3 β -HSD) 系の酵素に作用したかのいずれかと考えられる。そこで, 著者らは P-450 の阻害剤である ketoconazole および 3 β -HSD 阻害剤である trilostane 等の標準品を用いて TZP-4238 と比較し, testosterone の生成抑制について検討を加えた。一方, 視床下部-下垂体系を抑制したとするならばその作用は可逆的なのか, あるいは不可逆的なのかについても検討を加えた。

本論文では, TZP-4238 による精巣での testosterone 生成系について各酵素レベルで検討を加えたのち, 下垂体からの LH の分泌および hCG に対する精巣での反応等についてそれぞれラットおよびイヌで検討し, testosterone 低下の機序を明らかにしたのでまとめて報告する。

Fig. 1 Chemical structures

実験材料および方法

1. 化合物および試薬

TZP-4238, chlormadione acetate (CMA), cyproterone acetate (Cy. Ac.) およびhCGは帝国臓器製薬で作製した (Fig. 1)。KetoconazoleおよびtrilostaneはSigma社から, 20α -hydroxycholesterolはSteraloids社からそれぞれ購入した。Pregnenolone- $[4-^{14}\text{C}]$ (比放射能57.2mCi/mmol), progesterone- $[4-^{14}\text{C}]$ (比放射能60mCi/mmol), testosterone- $[7-^3\text{H}]$ (比放射能24.6Ci/mmol) はNEN社から購入した。Bond Elut C18 (3ml用) およびCN (3ml用) カラムはVarian社から購入した。Testosterone- $19\text{-C}^2\text{H}_5$ (testosterone- d_3 , 重水素化率 $\text{d}_3: 90\%$, $\text{d}_2: 10\%$, $\text{d}_0: 0\%$) は帝国臓器製薬, 山口隆博士から提供を受けた。

2. 動物

ウイスター系雄性ラットは静岡実験動物センター (SLC) 社から購入し, 恒温 ($24 \pm 1^\circ\text{C}$), 恒湿 ($60 \pm 10\%$) の飼育室で7日間以上予備飼育したのち, 実験に用いた。雄性ビーグル犬 (2~4才) は加商から購入し, 恒温 ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), 恒湿 ($55 \pm 10\%$) の条件下で予備飼育したイヌを用いた。

3. 薬物調製

TZP-4238は2% tween 80で4~64mg/4ml/kg, CMAは2% tween 80で8~32mg/4ml/kg, Cy. Ac. は2% tween 80で8~32mg/4ml/kg, trilostane 10mg/4ml/kg, ketoconazoleは2% tween 80で20mg/4ml/kgにそれぞれ調製した。

4. Gas chromatography-mass spectrometry/selective ion monitoring (GC-MS/SIM) による血漿中 testosterone の定量

Testosterone- d_3 を内部標準として深堀らの方法¹¹⁾に準じ, GC-MS/SIMで定量した。血漿 (1-2ml) に内部標準品としてtestosterone- d_3 (5ng) を加え均一に混合したのち, 予めメタノールおよび水で洗浄したBond Elut C18カラムに加えた。ついで, 水 (4ml), 30%アセトニトリル水 (2.5ml) で順次洗浄した後, 60%アセトニトリル水 (3ml) で溶出した。溶出した溶媒を減圧下で留去後, 残渣をベンゼンに溶解し, 予め50%ベンゼン-ヘキサンで洗浄したBond Elut CNカラム (3ml) にチャージした。ベンゼン (3ml), 1%酢酸エチル-ベンゼンで順次洗浄した後, 10%酢酸エチル-ベンゼン (4ml) で溶出した。溶媒を留去後, 20%無水トリフロロ酢酸-ベンゼン (60ul) を加えて室温に1時間放置した。ついで, GC-MS (日立M-80, GC column: 1% OV-1, T: 210°C) に注入し, 分子イオンで測定した。

5. Radioimmunoassay (RIA) による血漿中 testosterone の定量

血漿中 testosterone の定量はRIA キット (日本DPC社製) を用いた。

6. 血清中 LH の定量

① ラット血清中 LH: ラット血清 LH 定量用キット (Amersham 社製) を用いた。

② イヌ血清中 LH: イヌ下垂体から精製した LH を, 家兎に免疫して作製した抗体を用いて, メディカルシステムサービス神奈川社で LH を定量した。

7. 放射活性の測定

アロカ 3500 型液体シンチレーションカウンターで放射能を測定した。

8. ラットおよびイヌでの実験

実験 1. ラット精巣 in vitro での steroid 生成酵素に及ぼす TZP-4238 および他薬剤の影響

組織の調整: 精巣 (1個, 約1g) に0.1M phosphate buffer (pH7.5) 4mlを加えてホモジネートし, 遠心分離 ($900 \times g$, 10min) にてその上清を cell-free 画分とし, それを酵素源として用いた。

インキュベート: 基質として progesterone- $[4-^{14}\text{C}]$, pregnenolone- $[4-^{14}\text{C}]$ および 20α -hydroxycholesterol

を用い，それぞれの基質からのtestosteroneへの変換量を求めた。酵素液500 μ lに基質（1 μ M 20%エタノール水溶液）100 μ l，NADPH（1mg/100 μ l）100 μ l，0.1M phosphate buffer（pH7.5）200 μ l，を加えた。なお，20 α -hydroxycholesterolおよびpregnenoloneを基質にしたときは，さらにNAD（1mg/100 μ l）100 μ lを加えた。インキュベート時間は基質により異なりprogesterone-[4- 14 C]では15分，pregnenolone-[4- 14 C]および20 α -hydroxycholesterolでは30分行い，反応後直ちに冷却し分析まで-20℃に保存した。

分析・定量： 14 Cを基質にしたときは，内部標準物質（I.S.）としてtestosterone-[3 H]（ 6.02×10^4 dpm），androstenedione-[3 H]（ 11.87×10^4 dpm）をそれぞれ加えたのち，予め洗浄したBond Elut C18に吸着し，水洗（4ml）を行った後，メタノール（3ml）でステロイド画分溶出した。溶媒留去後，抽出物をクロロホルムに溶解してプラスチック製TLCプレート（Merck. No 5735）に塗布したのち，ベンゼン-アセトン（85：15 v/v）で2回展開した。プレートを風乾したのち，コニカX線フィルムに7日間密着させ，TLCオートラジオグラムを作成後，testosteroneおよびandrostenedione画分をそれぞれ得た。Androstenedione画分は相当する部位のプレートをハサミで細かく裁断したのち，バイアルに入れ放射能を測定した。他方，testosterone画分はアセトンで抽出後，溶媒留去し，乾燥した。得られた抽出物にピリジン0.2ml，無水酢酸0.2ml加え一夜放置してアセチル誘導後，溶媒留去し，再びプラスチック製TLCプレートに塗布，ついでプレートをベンゼン-酢酸エチル（10：1 v/v）で展開後，testosterone acetate画分を取り， 14 Cおよび 3 Hを測定した。Testosteroneおよびandrostenedioneの生成量はそれぞれの画分の 14 Cを 3 Hで補正後，nmol/hr/mg 蛋白で示した。なお，蛋白の定量はLowry法で行った。

実験2. TZP-4238（32mg/kg）単回経口投与時の精巣中testosteroneおよび血漿中testosterone，LHの経時的变化

11週令の雄性ラット（n=5）にTZP-4238を32mg/kg単回経口投与後，Fig.7に示した時間間隔でエーテル麻酔下で採血したのち精巣を摘出した。血液を冷却遠心分離し，血漿を得た。血漿中のtestosteroneを経時的にGC-MS/SIMで定量した。精巣中のtestosteroneは下記に述べる方法で抽出後，GC-MS/SIMで測定した。血漿中のLHはRIAで測定した。

実験3. TZP-4238，CMA，Cy. Ac.およびketoconazoleを5週間連続投与したときの血漿中LH，testosteroneおよび精巣中のsteroid生成能

11週令のラット（n=7）にTZP-4238を4および16mg/kg，CMAを16mg/kg，Cy.Ac.を10mg/kg，ketoconazoleを20mg/kg各々5週間強制経口投与した。最終投与24時間後にエーテル麻酔下で採血すると同時に，精巣および前立腺を摘出し重量測定後，1側の精巣を冷却した生理食塩水に入れsteroid生成能の実験に使用した。他の精巣はtestosterone定量時まで-70℃に保存した。実験1と同様に得られた一側の精巣のcell-free画分を酵素源としてpregnenolone-[4- 14 C]からのtestosteroneの生成能を調べた。

他方，精巣中のtestosteroneの抽出，精製および定量は以下のように行った。精巣1個（約1g）に水5mlを加えてホモジネートした後，I.S.としてtestosterone- d_3 20ngを加え，100 $\times$ g 15分間冷却遠心分離した。上清を取りその内2.5mlを予め洗浄したBond Elut C18にチャージ後，水3mlついで30%アセトニトリル水3mlで順次洗浄した。その後，70%アセトニトリル水でtestosterone画分を溶出し，溶媒を減圧下で留去した。得られたサンプルをベンゼン1mlに溶解し，予めベンゼンで洗浄したBond Elut CNにチャージした。ベンゼン1ml，ついで2%酢酸エチル-ベンゼン4mlで順次洗浄後，10%酢酸エチル-ベンゼン4mlでtestosterone画分を溶出した。溶媒留去後，20%無水トリフルロロ酢酸-ベンゼン溶液60 μ lを加え，室温1時間放置後，GC-MS/SIMで定量した。血漿中testosteroneおよびLHの定量は4および5に述べた方法で行った。

実験4. TZP-4238 および trilostane 単回経口投与および hCG 併用投与下での血漿中および精巣中 testosterone の推移と精巣中の steroid 生成能

10週令のラット (n=8) に TZP-4238 (32mg/kg) または trilostane (20mg/kg) を経口投与3.5時間後に解剖し、採血すると同時に精巣を摘出し、直ちに冷生理食塩水に入れた。一方、TZP-4238 および trilostane 投与3時間後に hCG (25IU/100g) を皮下投与し、30分後にエーテル麻酔下で採血すると同時に精巣を摘出した。血漿中および精巣中の testosterone は上記に述べた方法で定量した。Pregnenolone-[4-¹⁴C] から testosterone の生成能については、実験1と同様に摘出した一側の精巣を用いて実験した。

実験5. イヌに TZP-4238 および CMA を単回および連続投与したときの血漿中 testosterone および LH の変動

一群5匹のイヌに TZP-4238 (1mg/kg) および CMA (2mg/kg) のカプセルを単回経口投与し、経時的に採血した後、血漿 testosterone を GC-MS/SIM で測定した。

また、一群5匹のイヌに TZP-4238 および CMA それぞれ0.5mg/kg のカプセルを8週間連続経口投与、ついで投与後2週間まで経時的に採血し、血漿中 testosterone および LH を RIA 法で測定した。なお、薬物投与期間中の採血は薬物投与24時間後に1週間毎に行った。連続投与終了後は午前9-9時30分に採血した。

9. データ処理法

データの検定は Student T test で行った。精巣および血漿中の testosterone 量の相関は回帰分析で行った。

Fig. 2 Time course of testosterone production from 20 α -hydroxycholesterol in rat testis homogenates
Each point is mean (n=2)

Fig. 3 Effects of TZP-4238 and other drugs on testosterone production from progesterone- ^{14}C in rat testis homogenates
Each point is mean (n=2)

結 果

実験1. ラット精巣 in vitro でのsteroid生成酵素に及ぼすTZP-4238 および他薬剤の影響

インキュベーション時間: 20α -hydroxycholesterolを基質としてラット精巣のcell free画分 ($900 \times \text{g}$ 上清) とインキュベートし, testosterone生成量と時間について検討した。基質無添加の精巣のcell free画分中のtestosterone量は約 $5\text{ng}/\text{tube}$ であり, 基質添加後生成したtestosterone値から差し引いた結果をFig.2に示した。30分まで直線的にtestosteroneを生成した。

Progesterone から testosterone の生成: TZP-4238, CMA, Cy. Ac. およびketoconazoleを $0.1\mu\text{M}$ から $1000\mu\text{M}$ まで精巣cell free画分に添加して, progesterone- $[4\text{-}^{14}\text{C}]$ から testosterone の生成能について検討した結果をFig.3に示した。Testosterone生成能を50%抑制するketoconazoleの濃度 (IC_{50}) は約 $50\mu\text{M}$ であったが, 他の薬剤はほとんど抑制しなかった。

Pregnenolone から testosterone の生成: 上記薬物にtrilostaneを加えてpregnenolone- $[4\text{-}^{14}\text{C}]$ から testosterone の生成能について検討した結果を, Fig.4に示した。Trilostaneの IC_{50} 値は $1\mu\text{M}$, Ketoconazoleの IC_{50} 値は $20\mu\text{M}$, Cy. Ac. の IC_{50} 値は $50\mu\text{M}$, TZP-4238およびCMAの IC_{50} 値は $100\mu\text{M}$ であった。

20α -Hydroxycholesterol から testosterone の生成: 20α -Hydroxycholesterol から testosterone の生成能の結果をFig.5に示した。Trilostaneおよびketoconazoleの IC_{50} 値はいずれも $1\mu\text{M}$ で, Cy. Ac. の IC_{50} 値は $60\mu\text{M}$, TZP-4238およびCMAの IC_{50} 値はおおよそ $300\mu\text{M}$ 以上で抑制は極めて弱かった。

Trilostaneは 3β -HSDを抑制し, ketoconazoleは酸化酵素すなわち, cholesterol側鎖切断酵素およびprogesteroneの 17α -hydroxylaseまたは, C-17, 20-側鎖切断酵素を抑制した。Cy. Ac. は弱いながら 3β -HSDを抑制した。しかし, CMA, TZP-4238等の 3β -HSDおよび酸化酵素の抑制作用は, Cy. Ac. の約1/5弱であった。

Fig. 4 Effects of TZP-4238 and other drugs on testosterone production from progesterone- ^{14}C in rat testis homogenates
Each point is mean (n=2)

Fig. 5 Effects of TZP-4238 and other drugs on testosterone production from 20α -hydroxycholesterol in rat testis homogenates
Each point is mean (n=2)

実験2. ラットにTZP-4238 (32mg/kg) 単回経口投与したときの精巣中testosteroneおよび血漿中testosterone, LHの経時的変化

TZP-4238をラットに単回経口投与したときの血漿および精巣中のtestosteroneの推移を, Fig.6に示した。精巣中のtestosteroneは, 投与後3~8時間で対照群の約50%まで減少したが, 24時間では正常レベルまで回復した。血漿中のtestosteroneの変動も精巣と同様であった。精巣と血漿中のtestosterone量の相関は良好であった ($r=0.92$)。しかし, Fig.7に示したように血漿中のLHはあまり大きく変動しなかった。

Fig. 6 Changes of plasma and testicular testosterone level after a single oral administration of TZP-4238 (32 mg/kg) to rats
Each bar is mean $\pm$ S.D. (n=5 rats).
*: $p \leq 0.05$ compared with control

Fig. 7 Plasma LH levels after a single oral administration of TZP-4238 (32 mg/kg) to rat
Each bar is mean $\pm$ S.D. (n=5 rats).

実験3. ラットにTZP-4238, CMA, Cy. Ac. およびketoconazoleを5週間連続投与したときの血漿中LH, testosterone および精巣中のsteroid生成能

TZP-4238を4および16mg/kg, CMAを16mg/kg, Cy. Ac. を10mg/kgおよびketoconazoleを20mg/kgラットに5週間連続投与したときの精巣, 前立腺の臓器重量をTable 1に示した。TZP-4238高投与(16mg/kg)群およびCy. Ac. 投与群に精巣の萎縮を認めたが, TZP-4238を4mg/kg投与した群では変化なかった。最終投与24時間後の血漿中testosteroneおよびLH濃度をTable 1に示した。いずれの群においても血漿中LHおよびtestosterone濃度に変化はなかった。Fig.8に最終投与24時間後の精巣中のtestosterone値を示した。TZP-4238の16および4mg/kg投与群は正常群のtestosterone値と差はなく, ketoconazole, CMAおよびCy. Ac. 投与群は正常群よりも低かったが, その差は明確でなかった。

Pregnenolone-[4-¹⁴C]を基質としたときのtestosteroneの生成能を, Table 2に示した。TZP-4238高投与群, CMA, Cy. Ac. 投与群ではいずれもtestosteroneの生成は抑制されたが, TZP-4238 4mg/kg投与群では変化はなかった。

Table 1 Effects of drugs on prostate and testis weight, and plasma hormone levels after the daily oral administration of drugs for 5 weeks to rats

Groups	Dose (mg/kg)	N	Organ weight		Hormone levels	
			Testis (g)	Prostate (mg)	Testosterone (ng/ml)	LH (ng/ml)
TZP-4238	4	7	3.02 ± 0.29	442 ± 104 *	3.25 ± 2.17	1.42 ± 0.55
TZP-4238	16	7	2.76 ± 0.25 *	338 ± 33 *	2.68 ± 1.2	0.81 ± 0.25
CMA	16	7	2.98 ± 0.36	526 ± 99 *	2.64 ± 1.02	0.76 ± 0.35
Cy.Ac.	10	7	2.92 ± 0.17	317 ± 65 *	-	1.02 ± 0.33
Ketoconazole	20	7	3.10 ± 0.17	896 ± 203	2.03 ± 0.94	0.77 ± 0.10
Normal	-	7	3.12 ± 0.24	897 ± 93	1.84 ± 1.14	0.86 ± 0.28

* $P \leq 0.05$ compared with normal group
Data are presented as mean ± S.D.

Table 2 The formation of testosterone from pregnenolone-14C in rat testis treated with drugs for 5 weeks

Groups	Dose (mg/kg)	N	Produced testosterone (ng/mg/hr)
Normal	-	5	8.1 ± 3.4
TZP-4238	4	7	5.1 ± 1.1
TZP-4238	16	7	4.1 ± 0.8 *
CMA	16	7	4.6 ± 0.6 *
Cy.Ac.	10	7	4.1 ± 0.7 *

* $P \leq 0.05$ compared with normal group
Data are presented as mean ± S.D.

Fig. 8 Testicular testosterone levels after the daily oral administration and other drugs for 5 weeks to rats
Each bar is mean $\pm$ S.D. (n=7 rats).
*: $p \leq 0.05$ compared with control

Fig. 9 Effects of a single drug or treatment of both hCG and drug on plasma testosterone level in rats
Rats were treated once with TZP-4238 (32 mg/kg) or Trilostane (20 mg/kg). The hCG was injected 3 hr administration drugs and then rat were killed at 0.5 hr after hCG treatment. Each group is mean $\pm$ S.D. (n=8 rats)
*: $p \leq 0.05$ compared with control or no hCG treated group.

実験4. ラットにTZP-4238およびtrilostaneを単回経口投与およびhCG併用投与したときの血漿中および精巣中testosteroneの推移

TZP-4238およびtrilostaneを単回投与した3.5時間後の血漿中testosteroneのレベルをFig.9に示した。TZP-4238投与群の血漿中のtestosteroneレベルは、正常群のそれと比較すると低下傾向を示したが、hCG併用投与では正常群と同様にtestosteroneは約15倍上昇した。しかし、trilostane投与群ではhCGの反応は極めて悪く、血漿testosteroneは約3倍の上昇であった。

薬剤単独およびhCG併用投与時の精巣中のtestosteroneレベルを、Fig.10に示した。TZP-4238投与群ではhCGによる精巣中のtestosteroneの反応は約14倍であり、正常群のhCGに対する反応比と同じであった。しかし、trilostane投与群ではhCGに対する反応は極めて悪く約3倍であった。

実験5. イヌにTZP-4238, CMAを単回および連続投与したときの血漿中testosteroneおよびLHの変動

TZP-4238をイヌに1mg/kg単回投与したときの血漿中testosteroneの推移を、Fig.11に示した。投与後5時間でtestosteroneは有意に減少し、24時間で投与前の状態に戻った。

CMAの2mg/kg水溶液を単回投与したときの血漿中testosteroneの推移を、Fig.12に示した。投与後3時間でtestosteroneの低下が見られ、24時間後では投与前の状態に戻った。

TZP-4238およびCMAをそれぞれ0.5mg/kgイヌに8週間連続投与したときの血漿中testosteroneの変化をFig.13に、LHの変化をFig.14にそれぞれ示した。いずれの薬物投与でも血漿中のtestosteroneの低下が認められなかった。またLHについてはバラツキが大きく、大きな変化はなかった。

Fig. 10 The effects of a single drug treatment of both hCG and drug on testicular testosterone level in rats

Rats were treated once with TZP-4238 (32 mg/kg) or Trilostane (20 mg/kg). The hCG was injected 3 hr administration drugs and then were killed 0.5 hr after hCG treatment. Each group is mean $\pm$ S.D. (n=8 rats)

*: $p \leq 0.05$ compared with control or no hCG treated group.

Fig. 11 Plasma testosterone levels in dogs after a single oral administration of TZP-4238 (1 mg/kg)
Each point is mean $\pm$ S.D. (n=5 dogs).

Fig. 12 Plasma testosterone levels in dogs after a single oral administration of CMA (2 mg/kg)
Each point is mean $\pm$ S.D. (n=5 dogs).

Fig. 13 Plasma testosterone levels during and after 8 weeks continuous administration of 0.5 mg/kg of TZP-4238 or CMA to dogs. Each point is mean $\pm$ S.D. (n=5 dogs). Plasma samples were collected every week at 24 hr after oral administration of drugs. *p<0.05 compared with nontreated group.

Fig. 14 Plasma LH levels during and after 8 weeks continuous administration of 0.5 mg/kg TZP-4238 or CMA to dogs. Each point is mean $\pm$ S.D. (n=5 dogs). Plasma samples were collected every week at 24 hr after oral administration of drugs. *p<0.05 compared with nontreated group.

考 察

TZP-4238, CMA および Cy.Ac. をラットに 8～32mg/kg を 5 週間連続投与したとき、最終投与 24 時間後では血中および精巣中の testosterone の低下がほとんど認められず、ヒトに TZP-4238 を 1.25mg 投与したときのホルモン動態と異なっていた⁹⁾。しかしながら、Fig.6 に示したように TZP-4238 を単回投与したときに testosterone は、投与後 3～8 時間で約 50 % 減少し、24 時間後では回復していた。このように TZP-4238 投与 24 時間後の血中 testosterone 推移におけるヒトとラットの違いは、TZP-4238 の体内動態の差によると考えられた。即ち、雄性ラットでは TZP-4238 が肝臓での初回通過効果を大きく受け、 15β -水酸化体へ代謝され、血中 TZP-4238 の濃度が投与 24 時間後では 1ng/ml 以下と小さいのに対して、ヒトでは 5-10ng/ml であった⁵⁾¹²⁾。血中 testosterone を 50 % 低下させるときのラット血漿中 TZP-4238 の濃度 (IC_{50} 値) は、およそ 20-50ng/ml と報告されているが¹³⁾ ヒトではこの IC_{50} 値はさらに小さいと推察される。それ故ヒトとラットでの testosterone 低下の種差の要因は、血中の薬物量に比例すると推察される。イヌにおいても TZP-4238 および CMA を単回投与したときには投与後 4-12 時間で血中 testosterone の低下が観察されたが、連続投与時の 24 時間後の血中 testosterone の変動はラットと同様に変化なかった。

TZP-4238 による血中 testosterone 低下のメカニズムは、視床下部-下垂体に作用して LH の分泌を抑制する系と、精巣に直接作用しステロイド生合成の酵素を抑制する系、および精巣膜に存在する LH レセプター数を減少させる 3 つの系¹⁴⁾が考えられる。TZP-4238 投与ラットの精巣中の testosterone 濃度は、血中と同様な経時推移で変動し、かつ精巣中および血漿中 testosterone 濃度との間に良好な相関 ($\gamma = 0.92$) が認められることから、TZP-4238 投与による血中 testosterone の低下は、精巣から血液への分泌を抑制したのでなく、精巣内での testosterone の生成能を抑制したと結論される。

精巣での testosterone の生成経路および酵素系については、すでに確立されている。検討したすべての antiandrogen 剤は、progesterone から testosterone への生成系を抑制しなかったことから、 C_{17-20} 側鎖切断および 17α -hydroxylase 等の酸化酵素 (P-450) 系にはほとんど影響を与えないと結論される。しかし、pregnenolone から testosterone への生成酵素は Cy. Ac. で強く抑制され、ついで CMA, TZP-4238 の順にその抑制は弱くなった。代表的な 3β -HSD のインヒビターである trilostane はこの酵素系を著しく抑制し、その IC_{50} 値は $1\mu M$ であった。Cy. Ac. が精巣中の本酵素を抑制するという Lambert 等の報告と一致している¹⁵⁾。また、Cy. Ac. は副腎の cortisol の生成も抑制し、その機序は副腎の 3β -HSD の抑制であると報告されている¹⁶⁾。

20α -Hydroxycholesterol から testosterone の生成も trilostane が最も強く抑制し、ついで Cy. Ac. であり、CMA、および TZP-4238 による抑制はかなり弱かった。Ketoconazole は酸化酵素である C_{20-22} 、および C_{17-20} の側鎖切断酵素、 17α -hydroxylase 等の P-450 を抑制したが、 3β -HSD をほとんど抑制しなかった。このことは、progesterone および pregnenolone から testosterone 生成を抑制する IC_{50} 値が、いずれもほぼ同じであることを示している。Ketoconazole が testosterone の生成を抑制するという結果は過去の報告と一致した^{16)~18)}。Ketoconazole によるこれらの酸化酵素の抑制機序は、ketoconazole 分子のイミダゾール部位が P-450 のヘム鉄へ配位するために、基質が結合できなくなることによると報告されている¹⁹⁾。しかし、cisplatin のように直接精巣中の P-450 を減少させることにより testosterone の低下をもたらす機序も知られている⁷⁸⁾。

TZP-4238 単回投与 3～8 時間後ではラット血漿 testosterone の減少は認められたが、血漿 LH の変動は明確でなかった。しかし、ヒトに TZP-4238 を 1.25mg 投与したとき血漿中 LH の低下が報告されている⁹⁾。CMA についてもヒトとラットで血中 LH の動態について異なると報告されている²⁰⁾。このように CMA および TZP-4238 投与で血中 LH の反応にヒトと動物の間に差がみられた原因は、下垂体からの LH 分泌様式の違い²¹⁾ためと考えられる。ラットの場合、LH の分泌は拍動性型のため比較的下垂体に弱く作用する薬剤で

はパルスのような最大LH分泌時に影響するが、定常状態のような基礎値にまで影響しないためLHの抑制が現れにくい。それに対して成人男子では、拍動性分泌が小さいため基礎値にまで影響しやすいことから、TZP-4238投与により血中LHの値に低下がみられたと推察される。従って、ラットおよびイヌでもTZP-4238を投与したときには視床下部-下垂体系へ作用して血中testosteroneが低下したと考えられる。KuhlらはCMAおよびethinylestradiolをそれぞれ2mg, 50 μ gラットに2週間皮下投与したときに、血中LHはethinylestradiolで低下したがCMAでは変化しなかったと報告していることから上記の仮説が支持される²²⁾。一般に合成黄体ホルモン剤の中で、17 α -acetoxyprogesterone誘導体は19-nortestosterone誘導体に比較してLHへの作用は弱いことがラットの実験で報告されている²³⁾。そこで、TZP-4238が下垂体LHの分泌を抑制した結果、血中testosteroneを低下させたと仮定すると、無処置およびTZP-4238処置ラットを外因性hCGで刺激するならば、血中testosteroneの上昇効果は両者共同程度になると考えられる。事実、Fig.9に示したようにTZP-4238処置群ではhCGによるtestosterone上昇効果は無処置群と同様13~14倍であったが、trilostane処置群ではhCGに対する反応は約3倍と極めて悪かった。それ故、trilostane投与による血中testosteroneの低下は下垂体のLH分泌抑制よりも精巣内での生合成系(3 β -HSD)の阻害が主な要因であるのに対して、TZP-4238による血中testosterone低下の要因は視床下部-下垂体系に基づく抑制が約80~90%を占め、精巣内での酵素の抑制は少ないと結論される。

Trilostaneおよびcisplatinは精巣内のsteroid生成能に関与する酸化酵素(P-450)および3 β -HSDに対する抑制、精巣膜でのLHレセプター数の低下等をきたすことにより血中testosteroneを著しく低下させるが、下垂体LH分泌抑制によるtestosteroneの低下は薬物投与を中止するか、あるいはhCGで刺激すると直ちに回復する、いわゆる可逆性の阻害である。TZP-4238は後者の阻害様式と考えられる。

TZP-4238投与による血中testosteroneの低下をラットおよびイヌで確認した。その低下は、視床下部-下垂体系への作用によるLHの分泌抑制が主原因であり、精巣内のsteroid生成系、特に3 β -HSDの抑制は弱いものと考えられる。また、精巣内でのC₁₇₋₂₀側鎖切断および17 α -hydroxylase等のP-450酸化系への抑制はほとんどなかった。また、イヌにTZP-4238およびCMAをそれぞれ0.5mg/kg連続投与したときに両薬物投与群ともに血中LHおよびtestosteroneに大きな変動を与えなかった。このことよりイヌにおいてはTZP-4238とCMAの下垂体-精巣系への作用はほぼ同程度の強さだと結論される。

文 献

- 1) Y. Takezawa, Y. Fukabori, H. Yamanaka, M. Mieda, S. Honma, M. Kushitani, and N. Hamataki, Effects of the new steroidal antiandrogen TZP-4238 on hormone-induced canine prostatic hyperplasia. (1992);The Prostate, 21, 315-329
- 2) Y. Takezawa, K. Suzuki, Y. Fukabori, H. Yamanaka, S. Honma, M. Mieda, N. Hamataki, and M. Kushitani. Effect of a new steroidal antiandrogen, TZP-4238 (17 α -acetoxy-6-chloro-2-oxa-4, 6-pregnadiene-3, 20-dione), on spontaneously development canine benign prostatic hyperplasia (1995);The Prostate, in press.
- 3) K. Suzuki, K. Ito, T. Suzuki, H. Yamanaka, S. Honma., Synergistic effects of estrogen and androgen on prostate-effects of estrogen on androgen-and estrogen-receptor, BrdU uptake, immunohistochemical study of Ar and responses to antiandrogens (1994);The prostate, 25, 169-176.
- 4) M. Mieda, Y. Oota, T. Saito, H. Takahashi, E. Simazawa and K. Miyasaka, Antiandrogenic activity and endocrinological profile of TZP-4238 in rat, (1994);Endocrinologica Japonica, 41, 445-452.
- 5) 生駒文彦, 森 義則, 島 博基, 井原英有, 薮元秀典, 黒田治朗, 荻野敏弘, 鹿子不基二, 滝内秀和, 西崎伸也, 辻本幸夫, 善本哲郎, 吉田隆夫, 古倉浩次, 川口理作: 抗アンドロゲン剤TZP-4238の前立腺肥大症に対する第Ⅲ相臨床試験-下垂体, 副腎への影響. (1994); 西日本泌尿器科, 56, 1104-1115.
- 6) 太田昌宏, 湊 宏一, 星野敏也, 平林尚之, 本間誠次郎: イヌにTZP-4238を投与したときの副腎皮質ホルモンへの影響 (1994); 日本内分泌会誌, 70, 913-924.

- 7) M.D. Maines, P.M. Slus, and M. Iscan, cis-Platinum mediated decrease in serum testosterone is associated with depression of luteinizing hormone receptors and cytochrome P-450 in rat testis. (1990);Endocrinology, 126, 2398-2406.
- 8) D.W. Brann, C.D. Carla D. Putnam and V.B. Mahesh Similarities and differences in progesterone and androgens in modulation of LH FSH and PRL release:Unexpected properties of flutamide. (1990);J. Steroid Biochem., 36, 287-294.
- 9) M.D. Maines, and RD. Mayer, Inhibition of testicular cytochrome P-450-dependent steroid biosynthesis by cis-platinum, (1985);J. Biol. Chem., 260, 6063-6068.
- 10) M.L. Adams, P.J. Little, B. Bell and T.J. Cicero Alcohol effects rat testicular interstitial fluid volume and testicular secretion of testosterone and β -endorphin. (1991);J. Pharma. Exp. Ther., 258, 1008-1013
- 11) 深堀能立, 竹沢 豊, 山中英寿, 本間誠次郎: GC-MS/SIMによるヒト血中5 α -androstanediolの定量法, (1988);日本内分泌会誌, 63, 340-353
- 12) 本間誠次郎, 湊 宏一, 星野敏也, 三枝 衛, 川辺勝弘: 抗アンドロゲン剤TZP-4238の体内動態 (1報) (1994);応用薬理, 47, 317-335.
- 13) 本間誠次郎, 鈴木和宏, 竹沢 豊, 山中英寿: 抗アンドロゲン剤TZP-4238のラット前立腺での作用, (1994);日本内分泌会誌, 70, 925-940.
- 14) B.A. Krueger, G.M. Trakshel, P.M. Sluss, and M.D. Maines, Cyclosporin mediated depression of luteinizing hormone receptors and heme biosynthesis in rat testis:a possible mechanism for decrease in serum testosterone. (1991);Endocrinology, 129, 2647-2654.
- 15) A. Lambert, R. Mitchell and W.R. Robertson, Biopotency and site of action of drugs effecting testicular steroidogenesis. (1987);J. Endocr., 113, 457-461.
- 16) A. Lambert, R.M. Mitchell, and W.R. Robertson. On the site action of the anti-adrenal steroidogenic effect of cyproterone acetate. (1985);J. Steroid Biochem., 34, 2091-2095.
- 17) S.C. Sikka, R.S. Swerdloff and J. Rajfer, In vitro inhibition of testosterone biosynthesis by ketoconazole. (1985);Endocrinology, 116, 1920-1925.
- 18) P.B. Kan, MM. A. Hirst and D. Feldman, Inhibition of steroidogenic cytochrome P-450 enzymes in rat testis by ketoconazole and related imidazole anti-fungal drugs. (1985);J. Steroid Biochem., 23, 1023-1029.
- 19) K. Morita, T. Ono and H. Shimakawa, Inhibition of testosterone biosynthesis in testicular microsomes by various imidazole drugs. comparative study with ketoconazole. (1990);J. Pharmacobio-Dyn., 13, 336-343.
- 20) H. Kuhl, A. Baziad and H-D. Taubert, Augmentative and inhibitory effects of chronic steroid injections on LH release and their dependency on time. (1982);Endocrinol. Exp., 16, 93-101
- 21) 高橋清久: 生体機能の生体リズム, 新生理学大系, (医学書院, 鳥居鎮夫 編), (1987); 13, 87.
- 22) H. Kuhl, W. Weber, W. Mehls, J. Saandow and H-D. Taubert, Time and dose dependent alterations of basal and LH-RH stimulated LH release during treatment with various hormonal contraceptives (1984);Contraception, 40, 467-482.
- 23) F. Labrie, L. Ferland, L. Lagace, J. Drouin, J. Asselin, G. Zandian-Boulanger J-P Raynaud, High inhibitory activity of T 5020, a pure progestin, at the hypothalamic adenohypophyseal level on gonadotropin secretion. (1977);Fertility and Sterility, 28, 1104-1112.

(受付日: '94. 2.23)

(採択日: '95. 3. 6)