

Dexamethasone (DXM)
のRadioimmunoassayの確立と肝疾患におけるDXM
の血中動態に関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 村上, 雅子 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1465

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 188号	学位授与年月日	平成 6年11月 4日
氏名	村上雅子		
論文題目	Dexamethasone(DXM)の Radioimmunoassay の確立と肝疾患における DXM の血中動態に関する研究		

博士(医学) 村上雅子

論文題目

Dexamethasone (DXM) の Radioimmunoassay の確立と肝疾患における DXM の血中動態に関する研究

論文の内容の要旨

Dexamethasone (DXM) は臨床的に広く用いられている合成糖質コルチコイドなので、その血中濃度の測定は、臨床的に極めて重要である。しかし DXM はその力価が内因性糖質コルチコイドであるコルチゾールの40倍、代表的な合成糖質コルチコイドであるプレドニソロンの10倍と極めて高いため、臨床的に頻用する投与量は極めて微量 (0.5-4 mg) であり、これを免疫学的方法により測定を試みる際は、抗血清の内因性ステロイドとの交叉反応が問題となり、広く実用化されるには至っていない。そこで DXM に特異性の高い Radioimmunoassay (RIA) による臨床的に応用し得る測定法の確立を目的として、この研究を行った。また臨床応用として、ステロイドホルモンの主要代謝臓器である肝の代表的疾患として肝硬変 (LC)、慢性非活動性肝炎 (CH) を選び、DXM 1 mg という常用量の投与後の血中濃度を測定し、他の肝機能検査との関係を検討した。

方法: i) 抗 DXM 抗体の作製; Erlager らの方法により DXM-3-oxime BSA を合成し、complete Freund's adjuvant・生理食塩水の emulsion として雄成熟家兎に4~5週間間隔で免疫し、定期的に採血し、DXM 抗体価を測定した。

4カ月後に得た抗血清が最も力価が高く、以後の全実験ではこれを最終希釈倍数4000倍として使用した。

ii) RIA; 標準曲線用 DXM または試料用試験管に³H-DXM (5000cpm / 500 μl)、抗 DXM 血清を加え、4℃で16時間静置した。その後5% dextran coated chrcoal 添加、遠沈後上清を得て、液体シンチレーションカウンターにて抗体と結合した標識 DXM の放射活性を測定した。

iii) 血清試料からの DXM の抽出; DXM 経口投与後に得た血清0.5ml をジクロロメタン4 ml で抽出し、抽出液200-400 μl を窒素ガスで乾燥後 RIA に供した。

iv) 臨床応用の対象; 肝硬変 (LC) 17例、慢性非活動性肝炎 (CH) 7例、健常成人男女6名を正常群 (NR) とした。疾患の診断は肝生検にて病理学的に行った。方法は早朝空腹時、DXM 1 mg 経口投与後6時間まで毎時間と、12、24時間後に採血し、血清を DXM の RIA に供した。結果は DXM 血中濃度の推移と、肝機能検査を比較することにより、各疾患における特異性の判定が可能かを検討した。

結果:A) DXM.RIA の確立について i) 本 RIA 系の DXM 最小検出量は10pg/tube で10-1000 pg/tube を測定し得る検量曲線が得られた。

ii) 他のステロイドとの交叉反応; 検量曲線の50% 結合抑制に必要な DXM と個々のステロイドの比率から、%cross reaction を求めた。DXM の C-16位・立体異性体である betamethasone と26.7%、DXM の代謝物である 6β-hydroxy-dexamethasone と10%の交叉を認めたが、prednisolone と0.14%、主要な内因性ステロイドである hydrocortisone (コルチゾール) と0.05%、cortisone と0.0025%、と有意の交叉はなく、他の内因性ステロイドとも0.11%以下で DXM に特異性の高い測定系が得られた。

iii) 測定精度、回収率; 同一測定内誤差、測定間誤差が各々、4.4%、4.5%、回収率93.7±2.3%と良

好であった。

B) 肝疾患に対する臨床応用;DXM 投与後、血中 DXM は NR、LC、CH 群で各々 1.3 ± 0.4 、 1.8 ± 0.3 、 1.3 ± 0.2 時間後に、頂値 20.9 ± 2.9 、 10.5 ± 0.5 、 10.8 ± 1.0 ng/ml を示し、LC、CH 群で有意に低濃度であった。その後血中 DXM は漸減し、NR、LC、CH 群で各々、 3.3 ± 1.1 、 6.3 ± 0.6 、 6.2 ± 0.6 時間後に頂値 1 / 2 に低下し、LC、CH 群で遷延した。24 時間後、血中 DXM は NR、LC、CH 群で各々、 0.9 ± 0.3 、 1.8 ± 0.3 、 1.2 ± 0.2 ng/ml で、LC 群で有意に高濃度の DXM が血中に残存することが示された。肝障害の程度と血中 DXM の消失率との相関を検討するため、LC 群で、DXM 頂値に対する 6 時間後の濃度の比率と ICG15 分値、及び血清総ビリルビン値との相関を求めたところ、いずれも有意な正の相関を示した。健常人では経口投与後 1 - 2 時間で血中濃度が頂値に至り、24 時間後にほぼ消失した。LC、CH 両群で DXM 頂値は正常群の 1 / 2 と有意に低かった。DXM の血中からの消失も CH、LC 群で正常の 2 倍の半減期を示した。血中頂値に対する 6、12 時間後の濃度は、正常群で 26.9、2.8% であるのに CH 群では 45.4、10.7%、LC 群で 54.4、19% と肝疾患群で有意に高い DXM の残存が示された。肝硬変群で血中 DXM 半減期と ICG15 分値との間の相関関係から、肝硬変での DXM の血中消失は肝障害度に相関することが示唆された。一方 CH 群では、ICG 値は正常で、有効肝血流量の低下は明らかではないのに、DXM 血中消失の遷延が示された。故に DXM は肝血流量の保たれている CH でも、代謝遅延がみられ、その代謝に、従来考えられた肝血流量以外の因子も関与するものと考えられた。DXM を用いた脳下垂体副腎機能検査、または治療的投与に際し、個々の症例の肝機能を考慮することが必要と考えられた。

結語：高感度で、特異性も高い、血清 DXM-RIA の方法を確立した。この方法は血清からの抽出操作のみで RIA を行う簡便なものであり、肝疾患における検体では DXM の代謝の疾患による相違を明らかにする事ができ、今後多くの臨床面に応用可能と考える。

論文審査の結果の要旨

Dexamethasone (DXM) は合成糖質コルチコイドの一つで、その力価は現在用いられている経口用製剤のうち最も高い。本剤は諸々疾患の治療用の他、クッシング症候群の診断の際、DXM 抑制試験の薬剤としても広く臨床的に用いられている。DXM の血中濃度を測定する事は極めて重要であるが、本剤の投与量が内因性糖質コルチコイドの分泌量に対して極めて微量 (0.5 - 4 mg) であるため、免疫学的方法により測定しようとする際は、抗血清の内因性ステロイドとの交叉反応が問題となるため、従来の方法はクロマトグラフィーによる分離が必要であった。申請者はより簡便で DXM に特異性の高い radioimmunoassay (RIA) による測定法の確立を目的として本研究を行った。また確立された方法を用いて DXM の主要代謝臓器である肝疾患患者を対照として、疾患による代謝の相違を検討した。

I) DXM の RIA について

i) 抗 DXM 抗体の作製。DXM-3-oxime BSA を合成。これを Complete Freund's adjuvant 生理食塩水の emulsion として、雄成熟家兎に 4 ~ 5 週間間隔で免疫、DXM 抗血清を得た。4 カ月後に得た血清が抗体価が最も高かったので、この抗 DXM 抗血清を最終希釈倍数 4000 倍で用い、以下の RIA 法を確立した。この抗血清の他のステロイドとの交叉率 (% cross reaction) は DXM を 100 とすると、DXM の立体異性体 betamethasone 26.7%、DXM の主要代謝物 6 β -hydroxy-DXM (6 β -OH-DXM) 10% と有意の交叉を認めしたが、内因性糖質コルチコイドについては hydrocortisone 0.05%、cortisone 0.0025%、corticosterone 0.11% 等と有意の交叉を認めず DXM に特異性の高い

抗血清が得られた。ii) RIA による測定法の確立、血清0.5ml より、ジクロロメタン4 ml にて抽出。その400 μ l を窒素ガスにて乾固したものを試料とし、DXM-6,7- 3 H、抗DXM抗体を加え、4 $^{\circ}$ Cで静置後、dextran coated charcoalを用いてB/F分離を行う方法を確立した。この方法により10 pg/tube-1000pg/tubeのDXMを測定し得る方法であり、回収率93.7 \pm 2.3%、測定内誤差4.4%、測定間誤差4.5%と測定法として十分な結果が得られた。

II) 肝疾患における臨床応用

肝生検により病理組織学的診断の確定している、肝硬変(LC)17例、慢性非活動性肝炎(CH)7例と、正常群(健康成人男女6例、NR)につきDXMを常用量として用いられている1mgを投与し、投与前および投与後、0.5、1、2、3、4、5、6、12、24時間に採血、血清中DXM濃度を測定した。

LC、CH、NRでDXM濃度が頂値に達する時間には統計的有意差はなかった。頂値のDXM濃度はNRと比較するとLC、CHでは有意に低値であった。

頂値の1/2の濃度に低下するのに要する時間は、NR3.3 \pm 1.1時間、LC6.32 \pm 0.6時間、CH6.2 \pm 0.6時間で、LC、CHでは有意に代謝遅延が推定された。6時間値の頂値に対する比率と血清ビリルビン、ICG15分値の相関をみるとLCでは有意の正の相関があった。CH群ではICG15分値は正常範囲にあるので、同じようにDXMの代謝が遅延してもLCとCHでは差があり、ICG15分値で示される有効肝血流量以外の因子による事も推定された。

以上の研究に対し、以下の質疑応答が行われた。

1. 本測定法と従来報告されている測定法の相違、この方法の優れた点。
2. 薬物動態の研究としては、採血条件に不適切な点はないか。
また人体を対象とする研究なので、同意と承認はどのように得たか。
3. 統計学的処理について

これらの質問に対する申請者の回答はおおむね適切であった。

人体を対象とする研究のため、採血する時点、回数などにつき薬物動態学的な各種パラメーターを正確に算出するには不十分である点についても了解していたが、本測定法により肝疾患と正常人の間に違いが存在する事については、この研究においても明らかであった。

本論文は1989年5月18日に日本内分泌学会雑誌に受付されており、血清からの抽出操作を要しないDXMのdirect radioimmunoassayがLoら(J.Pharm.Sci.78:1040-1044,1989)によって報告される以前に研究が行われた事は明らかであり、本論文投稿の時点においては国際的にも優れた測定法と評価された。

本論文は、クロマトグラフィーの操作なしでDXMをRIAで測定する方法を確立したもので、この方法は高感度で特異性が高く、臨床応用も可能な優れた方法である。すでに国内文献においても多く引用されており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 五十嵐 良 雄

副査 教授 菅 野 剛 史 副査 教授 中 島 光 好

副査 助教授 中 村 達 副査 講師 田 港 朝 彦