

A study of Pituitary Suppressive Effects of Synthetic Glucocorticoids Using Plasma ACTH Bioassay

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/2297/7837

血漿 ACTH bioassay 法を用いた合成副腎皮質ステロイドの下垂体抑制効果に関する研究

金沢大学医学部第三内科学講座 (主任: 松田 保教授)

黒 田 ひとみ

(昭和60年11月22日受付)

ラット副腎細胞単層培養による ACTH bioassay 法の開発を行い、副腎摘除ラットの腹腔内に各種合成副腎皮質ステロイド剤を投与し、下垂体抑制の程度について血中 ACTH を指標として検討した。培養副腎細胞のコルチコステロイド産生を指標とした標準曲線の最小検出量は 2.5 pg であり、副腎摘出ラット血清抽出物の稀釈曲線は標準曲線と平行した。また、添加実験における回収率は 97.6% であり、inter-assay intra-assay variation とともに満足すべきものであった。Dex-P と Dex-S について、両エステルの下垂体抑制の相違について副腎摘除ラットを使って検討した。Dex-P は、投与後 1 時間より ACTH を抑制したが、Dex-S は 2 時間後にはじめて抑制を認め Dex-P の抑制程度は Dex-S に比し非常に強かった。血中遊離 Dex. 濃度は、Dex-P では腹腔内投与直後高値で以後漸減するのに対し、Dex-S は 3 時間後まで感度以下で 6 時間後に最も高い値を示した。これらの成績より、静注でのヒトでの成績と異なりラット腹腔内投与では Dex-S も徐々にある程度加水分解を受け、下垂体抑制効果を現わすことが明らかになった。Fk-P, Pred-suc はいづれも腹腔内投与で能率よく水解され、遊離ステロイドを生じた。投与量による ACTH 抑制の程度は Dex. に比し弱く、また持続も短かく、両者はほぼ同程度であった。合成グルココルチコイドの力価はステロイドの作用の強度と持続の両者を考慮して決定されるべきで、この点、現在臨床一般に用いられている相対力価、ハイドロコチゾン：プレドニゾン：デキサメサゾン，1：4：30 ではデキサメサゾンの力価が過小評価されている可能性がある。

Key words ACTH bioassay, glucocorticoids, pituitary suppressive effects, monolayer culture of adrenal cells

Hench ら¹⁾により重症慢性関節リウマチ患者にコチゾンが使用され、劇的な臨床効果が報告されて以来、副腎皮質ステロイド剤の使用は増加の一途をたどり、その間プレドニゾン、デキサメサゾン、トリアムシノロンなど多数の合成副腎皮質ステロイド剤が開発され、現在では臨床不可欠なものとして頻用されている。しかし、これらの合成副腎皮質ステロイドは電解質代謝作用を欠き、抗炎症・抗肉芽・抗アレルギー作用が増強されているが、糖質代謝作用、蛋白異化作用、下垂体-副腎皮質系抑制作用なども強化され、薬物として投与した場合必然的にさまざまな副作用が生じ

る。このため、合成副腎皮質ステロイド剤の種類や投与方法と効果・副作用の関係につきさまざまな検討がなされるようになった。

Abraham²⁾がステロイドの radioimmunoassay (RIA) を報告して以来、プレドニゾンやデキサメサゾンの測定にも RIA が使用され、血中・尿中濃度の測定が行なわれるようになり、その体内代謝動態の変化と投与方法や効果、副作用発現との関連につき詳細に検討されつつある³⁾⁻⁷⁾。

合成副腎皮質ステロイド剤の臨床的力価は、主に慢性関節リウマチ患者における臨床効果の比較検討よ

Abbreviations: Dex-P, dexamethasone disodium phosphate; Dex-S, dexamethasone sodium sulfate; DME, Dulbecco's modified Eagle medium; Fk-P, hydrocortisone disodium phosphate; Pred-suc, prednisolone sodium succinate; RIA, radioimmunoassay; S.A., specific activity.

り、ハイドロコチゾン 1 に対してプレドニゾン 4、デキサメサゾン 30 とされ⁹⁾、この相対力価は現在も臨床的に使用されている。しかし、この臨床的力価に基づき少量のデキサメサゾンを使用した場合は、ハイドロコチゾンやプレドニゾン使用時に比しかなり強い副作用が発現することより、デキサメサゾンの力価が過小評価されている可能性が指摘されている⁹⁾¹⁰⁾。また、副腎皮質ステロイド剤使用の臨床経験の蓄積とともに、ステロイドの作用発現機序に関する研究や検査方法の進歩により、より定量的な相対力価評価法としてレセプターとの結合活性¹¹⁾、ヒトのリンパ球幼若化 50% 阻害活性¹²⁾ や下垂体-副腎皮質抑制作用よりみた活性¹³⁾ が報告されている。特に、下垂体-副腎皮質系抑制作用の検討では力価の検討には、時間的要因が重要であることが指摘されている。

一方注射用合成副腎皮質ステロイド剤は、緊急例や重症例に対して抗炎症効果やショック効果を期待して広く使用され、また関節内や髄腔内注入用としても使用されている。注射用製剤としてのデキサメサゾンの燐酸塩および硫酸塩の合成副腎皮質ステロイド剤としての効果については、従来より動物実験で両剤共効果ありとする報告¹⁴⁾ と燐酸塩は効果があるが硫酸塩には効果を認めないとする報告¹⁵⁾ があり、一定の見解が得られていない。近年中村¹⁶⁾ は、ヒトにデキサメサゾンの燐酸塩と硫酸塩を静注し、下垂体抑制効果および遊離型デキサメサゾン測定した。静注法では硫酸塩は下垂体抑制を示さず、血中に遊離型デキサメサゾンがみられず、硫酸塩のまま尿中に速やかに排泄されることを明らかにし、静注による硫酸塩はグルココルチコイド作用はないと結論した。しかし、臨床的には関節内投与で明らかに抗炎症効果を認めており、炎症部位への局所注入など投与方法によって効果を発揮する可能性も考えられるが、詳細については今だ不明な点が多い。

本研究では、副腎細胞単層培養による ACTH bioassay を開発し、血中 ACTH を指標に各種合成副腎皮質ステロイド剤の下垂体抑制効果を検討し、新しい知見を得たので報告する。

材料および方法

I. ACTH bioassay

1. ラット副腎細胞単層培養法

午前 6 時から午後 6 時を明環境、他の時間帯を暗環境とした条件で飼育した、体重 180~200 g の雄ウィスター系ラットをベントバルピタル (Nembutal, Abbott Laboratory U.S.A.) 麻酔し、速やかに両側副腎を摘出した。取り出した副腎は、水冷した 20 mM

Hepes, 10% 重炭酸ナトリウム, ペニシリン (結晶ペニシリン G カリウム[®], 100 IU/ml, 明治製薬), アムホテリシン B (ファンギゾン[®], 0.25 μ g/ml, スクイブ社) を含む Dulbecco's modified Eagle Medium, pH 7.4 (DME, Gibco 社, U.S.A.) に集め、被膜を除去した後 tissue slicer (夏目製作所) で幅 0.3 mm のスライスとした。これをコラゲナーゼ (1 mg/ml, type 1, Worthington 社, U.S.A.) を含む DME 約 30 ml に浮遊させ、37°C 温浴中で 40 分間、100 回/分の速さで振盪し、その間 5 分間隔で手による振盪を加え副腎細胞を遊離させた後、ナイロンメッシュ 60 にて濾過した。これに DME 約 20 ml を加え直ちに 100 \times g, 10 分間冷却遠心後、上清を除去した細胞塊に 16% 牛胎児血清 (FCS, Gibco 社, U.S.A.) を含む DME (16% FCS-DME) を加え、100 \times g, 10 分間冷却遠心した。上清を除去した細胞塊を 16% FCS-DME に再浮遊させた。細胞浮遊液中の細胞数は、0.5% trypan blue で染色し生細胞を計数し、1 \times 10⁶/ml となるように細胞浮遊液を 16% FCS-DME で調整した。この細胞浮遊液 1 ml をあらかじめ 16% FCS-DME 1 ml を分注してある 35 \times 10 mm tissue culture dish (Falcon 社, U.S.A.) に加え、37°C, 5% CO₂-95% O₂ の条件でインキュベートした。培養液は、24 時間毎に新しい培養液と交換した。負荷実験は山本ら¹⁷⁾ の方法に従い、培養開始 36 時間後に行い、負荷実験後の培養細胞は 0.5 N 水酸化ナトリウムで溶解し、Lowry ら¹⁸⁾ の方法で細胞の蛋白量を測定した。

2. ACTH 抽出方法

ACTH 用採血および抽出にはすべてシリコン処理したガラス試験管を使用した。新実¹⁹⁾ の採血法に従い、ヘパリン処理した血漿 1~5 ml に 500 KIE/ml の割合にアプロチニン (トラジロール[®], バイエル-武田社) を加え、microsilica granules (QUSO G-32, Philadelphia Quartz CO, U.S.A.) 10~50 mg を加えて混和し、Sayers²⁰⁾ の方法に準じて抽出した。すなわち、QUSO G-32 を加えた血漿を 1 分間振盪・5 分間水中に静置し、3,000 rpm, 10 分間冷却遠心後上清を吸引除去し、2 ml 蒸留水で攪拌し遠心して上清を除く操作を 2 回くり返して洗浄し、1~3 ml の 0.1 N 塩酸を加え抽出した。抽出物は ACTH 測定まで -20°C で凍結保存し、測定時 2 N 水酸化ナトリウムを加え pH 7.0 に調整して使用した。

3. コルチコステロンの測定

培養液 0.5 ml にジクロールメタン 15 ml を加え混和後 1 時間静置し、水層を吸引除去後窒素気流下 45°C 温浴中でジクロールメタンを乾固し、0.2 ml エタノールに溶解した。次に 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を

加え10倍に希釈し、その0.1 mlをRIAで測定した。抽出による回収率は $98.5 \pm 2.5\%$ (Mean \pm S.D.)であるため回収率の補正は行なわなかった。

4. ACTH 標準曲線

下垂体摘出ラットより得た ACTH free の血漿 1 ml に、DME に溶解した 100 pg, 500 pg, 5 ng の ACTH (1~24) (Cortrosyn®, Organon, U.S.A.) の 0.1 ml を加え、前述の方法で ACTH を抽出後抽出物 0.01~0.1 ml を副腎細胞単層培養 dish に加え、37°C, 2 時間, 5% CO₂ インキュベーター内で培養した。培養液中のコルチコステロン産生量を測定し、標準曲線を作製した。

II. 合成副腎皮質ステロイド負荷実験

200 g 前後のウィスター系雄ラットをペントバルビタール麻酔下に両側副腎を摘除し、0.9%食塩水を与え、7日後に合成副腎皮質ステロイド製剤を腹腔内に投与した。投与後30分, 1, 2, 3, 6時間後に心臓採血を行った。採血にはすべてプラスチックシリンジ(テルモ社)にてヘパリン採血し、直ちにシリコン処理したガラス試験管に移し、アプロチニンを500 KIE/mlの割合で加えた後、冷却速心を行った。分離した血漿は ACTH 測定まで-20°C凍結保存した。使用した合成副腎皮質ステロイド製剤は、dexamethason disodium phosphate (Dex-P, デカドロン®, メルク 萬有), dexamethason sodium sulfate (Des-S, デキササエロソン®, シェーリング), hydrocortison disodium phosphate (Fk-P, 水溶性ハイドロコトロン®, メルク 萬有) および Prednisolone sodium succinate (Pred-suc, プレドニン®, 塩野義) であり、Dex-P および Des-S はそれぞれ 2.5, 25, 50, 100 μ g/100 g 体重, Fk-P は 50, 100, 500 μ g/100 g 体重, また Pred-suc は 100, 250, 500, 1,000 μ g/100 g 体重をラット腹腔内に投与した。また、対照群として生理食塩水を腹腔内に投与し、同時に採血した。

III. 血中遊離型デキサメサゾン (Dex.), ハイドロコチゾン (Fk), プレドニゾロン (Pred.) の測定

Dex., Fk および Pred. は中村¹⁶⁾の方法に従い RIA で測定した。血漿 0.1 ml に回収率測定用の 1,2,4,6,7-³H-Dex. (specific activity (S.A.), 85.0 Ci/mmol), 1,2-³H-Pred. (S.A. 40.0 Ci/mmol), 1,2-³H-Fk (S.A.) 47.69 Ci/mmol) を約 3,000 cpm 加え、ジクロールメタン 15 ml で抽出後乾固し残渣に 0.5 ml エタノールを加えその 0.1 ml を RIA 用に、0.1 ml を回収率測定用に供した。抽出による回収率は 90% 以上のため補正しなかった。

IV. 統計学的検定

測定値は一部を除き Mean \pm SEM であらわした。有意差の検定には全て Student の t-検定を用いた。

成 績

I. ACTH bioassay

1. ACTH 抽出

1) 血漿 ACTH 抽出の最適条件

¹²⁵I-ACTH (S.A. 54 μ Ci/ μ g, New England Nuclear, U.S.A.) 100,000 cpm を加えた血漿 1~5 ml について QUSO G-32 10~150 mg で吸着させ、0.1 N 塩酸 1~4 ml で溶出させ、吸着率, 溶出率, 回収率を検討した。図 1 に血漿 1 ml, 溶出液 1 ml とした場合の結果を示した。QUSO G-32 の使用量が増すに従い吸着率は上昇するが、溶出率は急速に低下した。従って回収率は、QUSO G-32 の最少量 10 mg 使用時が 73.7% と最も良好な結果を示した。溶出液量を増しても回収率は 70~72% と溶出液 1 ml, QUSO G-32 10 mg の条件と差はなく、血漿 1 ml では QUSO G-32 10 mg, 溶出液 1 ml とした。同様の方法で、血漿 2~4 ml では QUSO G-32 20 mg, 血漿 5 ml では QUSO G-32 50 mg, 溶出液 2 ml が最適であることを確認した。この条件での血漿 1~5 ml の回収率は $69.7 \pm 0.5\%$ と大きな差は認めなかった。

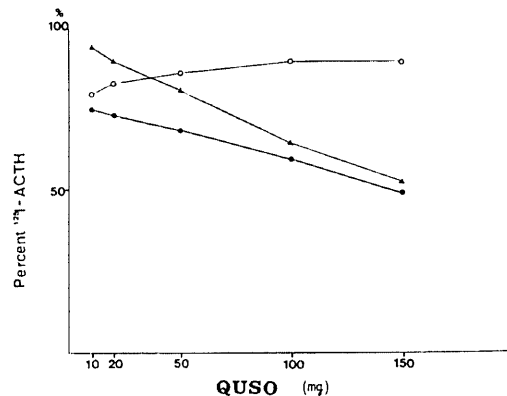


Fig. 1. Effect of doses of QUSO on adsorption, elution and recovery of ¹²⁵I-ACTH from plasma. 1 ml of rat plasma to which labeled ACTH had been added was mixed with various amounts of QUSO. This QUSO was centrifuged, washed twice with 2 ml distilled water, and mixed with 1 ml 0.1 N HCl. Percent adsorption, elution, and recovery (percent adsorption \times percent elution) were determined. ○—○, % adsorption; ▲—▲, % elution; ●—●, % recovery.

Table 1. Recoveries of ACTH added to pooled plasma.

added ACTH (pg/ml)	sample 1		sample 2		% recovery average
	Found	% recovery	Found	% recovery	
0	8.6		11.9		
50	52.9	88.8	63.1	102.4	95.6
100	107.8	99.3	116.5	104.6	101.9
250	247.3	95.5	250.0	95.2	95.3

overall average 97.6 ± 3.9*

Various amounts of standard ACTH were added to pooled rat plasma and assayed.

*Mean ± SEM

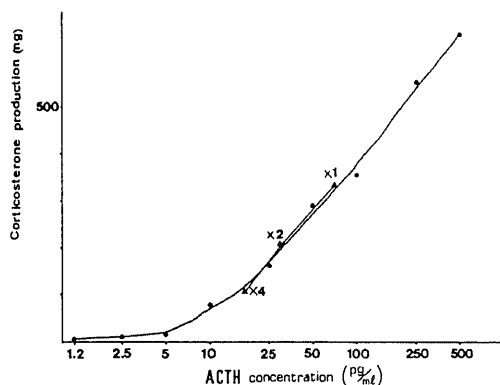


Fig. 2. A typical standard curve.

●—●, standard ACTH; ▲—▲, dilution curve of plasma extract from adrenalectomized rat. ×1, undilution; ×2, 2 fold dilution; ×4, 4 fold dilution.

2) ACTH 標準曲線, 回収率, 再現性の検討

図2に標準曲線および稀釈曲線を示した。ACTH 5~250 pgの範囲で直線関係となり, 最小検出量は2.5 pgであった。副腎摘除ラット血漿を下垂体摘出ラット血漿 (ACTH free 血漿) で稀釈後抽出し測定した ACTH 濃度は, 標準曲線とよく平行して変化した。

表1に回収率の結果を示した。2匹のラットより心臓採血で得た血漿に既知量 (50, 100, 250 pg) の ACTH (1-24) を加え全操作を行い, ACTH 濃度を測定し加えた ACTH (1-24) 量と比較した。回収率は 97.6 ± 3.9% と良好であった。

表2に Inter-assay および Intra-assay variation を示した。Inter-assay variation は血漿より抽出した ACTH 抽出物を4検体に分けて -20°C に保存し, 4回の測定の各々の時点で自然融解させ ACTH 濃度を測

定した。また, Intra-assay のために同一検体抽出物を 8 dish に同量添加して ACTH 濃度を同時に測定した。Inter-assay の変異係数は 10.7%, 12.4%, Intra-assay の変異係数は 20.2%, 5.4% と良好であった。

2. ラットおよびヒト血漿 ACTH 濃度

両側副腎摘除ラットの血漿 ACTH 濃度は, 578.7 ± 40.3 pg/ml (以下 1 ml 血漿を使用) であり, エーテル 1 分曝露によるストレスを加えた直後のラットは 1572.0 ± 37.0 pg/ml, ペントバルビタール麻酔下のラットでは 10~15 分後で 1545.5 ± 32.0 pg/ml, 30 分後で 224.8 ± 41.0 pg/ml であった。正常なヒトの午前 10 時から午後 12 時の ACTH 濃度は 25.0 pg/ml 以下であったが, 1 例の Nelson 症候群では 287.4 pg/ml であった。

II. 各種合成ステロイド投与後の血漿 ACTH 濃度 および血漿ステロイド濃度の経時的変化

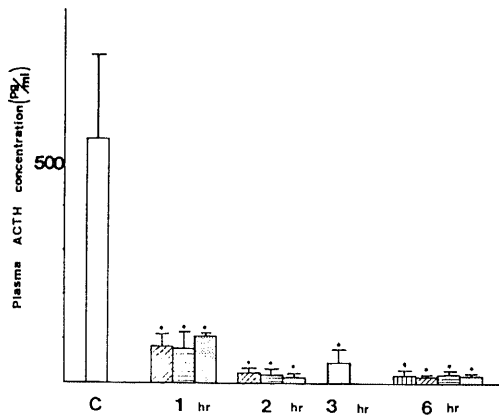
1. エステルの差による比較検討

図3に Dex-P を 100 μg/100 g 体重, 50 μg/100 g 体重, 25 μg/100 g 体重, 2.5 μg/100 g 体重腹腔内投与時の血漿 ACTH 濃度の経時的な変化を示した。100 μg/100 g 体重投与群では投与 1 時間では対照群に比し有意 ($p < 0.001$) に血漿 ACTH は抑制され, 以後 6 時間まで持続した。また 25 μg および 50 μg/100 g 体重投与群では投与 1 時間より 6 時間まで 100 μg/100 g 体重投与群と同程度の抑制を示し, 2.5 μg/100 g 体重投与群では 6 時間後の検討のみであるがより大量の使用時と同様, 有意 ($p < 0.001$) の抑制を示した。図4に Dex-S 100 μg, 50 μg, 25 μg および 2.5 μg/100 g 体重投与時の血漿 ACTH 濃度の推移を経時的に示した。100 μg/100 g 体重投与では, 1 時間では対照群との間に有意差を認めず, 2 時間後にはじめて有意 ($p < 0.001$) の低下を示し, 6 時間まで続いた。50 μg および 25 μg/100 g 体重投与では, 100 μg/100 g 体重投与群と同様に 2 時間より 6 時間まで有意 ($p < 0.001$ または $p < 0.005$) の低下を示したが, 2.5 μg/100 g 体重投与群で

Table 2. The inter-and intra-assay variations of the method.

	sample	ACTH concentration pg/ml				mean \pm SD	%CV*
inter-assay	1	900	980	780	800	865 \pm 92	10.7
	2	390	325	350	290	338 \pm 42	12.4
intra-assay	A	475	336	457	320	387 \pm 80	20.2
	B	162	148	147	132	149.7 \pm 8.5	5.4

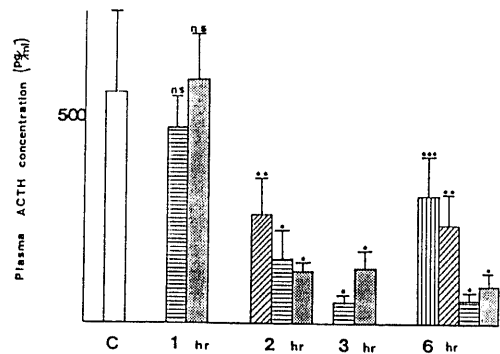
*%CV: coefficient of variation

Fig. 3. Plasma ACTH concentrations after intraperitoneal injection of dexamethasone phosphate (mean \pm SEM).

Plasma ACTH concentration after 3 hrs was assayed only in the rats injected intraperitoneally 100 μ g/100 g b.w. of dexamethasone phosphate. Plasma ACTH concentration of the rat, injected intraperitoneally 2.5 μ g/100 g b.w. of dexamethasone phosphate, was assayed only after 6 hrs. C, control (n=6); \square , Dex-P 2.5 μ g/100 g b.w. (n=6) injected; \square , Dex-P 2.5 μ g/100 g b.w. (n=6) injected; \square , Dex-P 25 μ g/100 g b.w. (n=6) injected; \square , Dex-P 50 μ g/100 g b.w. (n=6) injected; \square , Dex-P 100 μ g/100 g b.w. (n=6) injected; *, p<0.001 vs the control.

は6時間後の血漿 ACTH は軽度の抑制 (p<0.05) を示すのみであった。

図5に Dex-P および Dex-S 投与後の血漿 Dex. 濃度を経時的に示した。Dex-P は投与15分で137.2 \pm 30.5 μ g/dl をとり、以後急速に減衰し30分で平均25.5 μ g/dl の血漿濃度を示した後6時間まで徐々に減衰した。一方 Dex-S 100 μ g/100 g 体重投与群では投与30分、1, 2, 3時間は平均2.1~4.2 μ g/dl とほぼ変化なく、6時間後に平均29.5 μ g/dl と血漿濃度は増加した。25 μ g および 50 μ g/100 g 体重の Dex-P, Dex-

Fig. 4. Plasma ACTH concentration after intraperitoneal injection of dexamethasone sulfate (mean \pm SEM).

C, control (n=6); \square , Dex-S 2.5 μ g/100 g b.w. (n=6) injected; \square , Dex-S 25 μ g/100 g b.w. (n=6) injected; \square , Dex-S 50 μ g/100 g b.w. (n=6) injected; \square , Dex-S 100 μ g/100 g b.w. (n=6) injected; ns, not significant; *, p<0.001; **, p<0.005; ***, p<0.05 vs the control.

S 投与群はともに100 μ g/100 g 体重投与群に比し血漿濃度は低いが、同様の血漿濃度の推移を示した。6時間後の血漿 Dex. 濃度を Dex-P と Dex-S 投与群と比較するとすべての投与量において Dex-S 投与群が Dex-P 投与群より高い値を示した。

2. 合成副腎皮質ステロイド間での比較検討

図6, 7, 8に Dex-P, Pred-suc および Fk-P 投与後1, 2, 6時間後の血漿 ACTH 濃度を示した。投与後1時間(図6)では、Dex-P は25 μ g/100 g 体重で強い ACTH 抑制を示すのに対し、Pred-suc 100 μ g/100 g 体重では ACTH 抑制を示さず250 μ g/100 g 体重で有意の抑制を示した。また、グラフに示していないが500 μ g/100 g 体重で強い抑制を示した。Fk-P は50 μ g/100 g 体重投与群で明らかな ACTH 抑制を示し

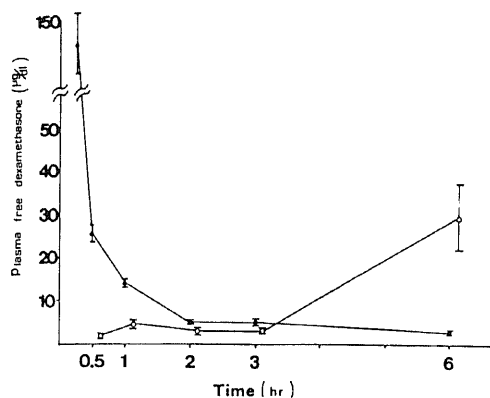


Fig. 5. Plasma levels of free dexamethasone after intraperitoneal injections of dexamethasone phosphate or dexamethasone sulfate (mean \pm SEM).

●—●, Dex-P; ○—○, Dex-S.

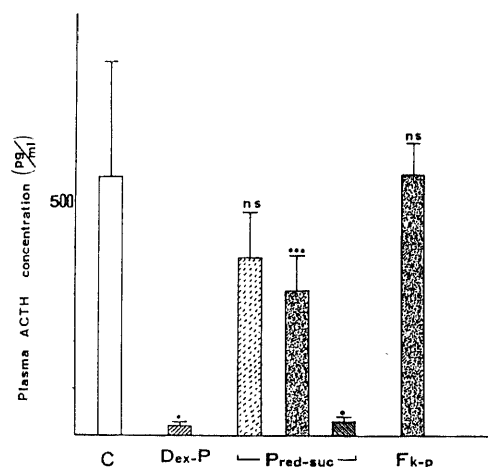







Fig. 7. Plasma ACTH concentrations 2 hours after intraperitoneal injections of various doses of glucocorticoids (mean \pm SEM).

C, control (n=6); , Dex-P 25 μ g/100 g b.w. (n=6) injected; , Pred-suc 250 μ g/100 g b.w. (n=6) injected; , Pred-suc 500 μ g/100 g b.w. (n=6) injected; , Pred-suc 1000 μ g/100 g b.w. (n=6) injected; , Fk-P 500 μ g/100 g b.w. (n=6) injected; ns, not significant; *, p < 0.001; ***, p < 0.05 vs the control.

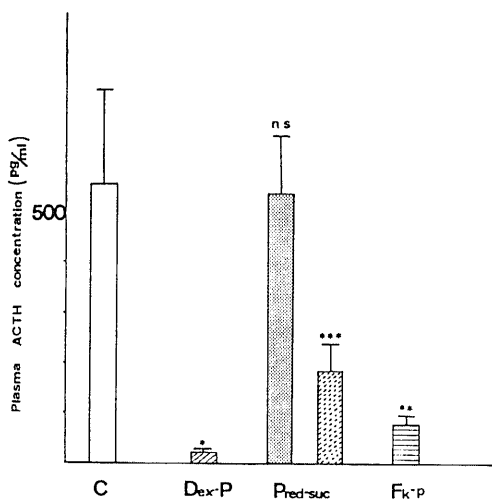






Fig. 6. Plasma ACTH concentrations 1 hour after intraperitoneal injections of various doses of glucocorticoids (mean \pm SEM).

C, control (n=6); , Dex-P 25 μ g/100 g b.w. (n=6) injected; , Pred-suc 100 μ g/100 g b.w. (n=6) injected; , Pred-suc 250 μ g/100 g b.w. (n=6) injected; , Fk-P 50 μ g/100 g b.w. (n=6) injected; ns, not significant; *, p < 0.001; **, P < 0.005; ***, p < 0.05 vs the control.

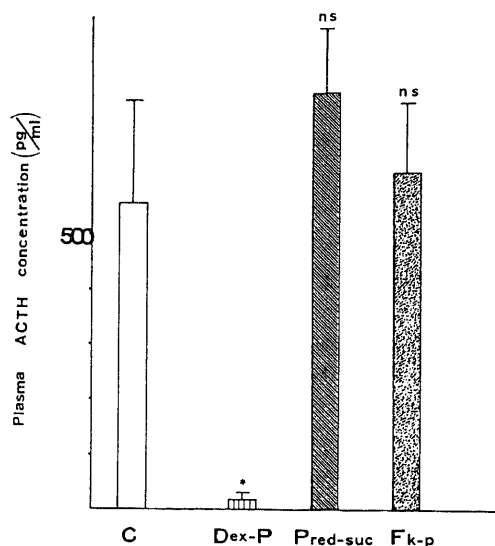





Fig. 8. Plasma ACTH concentrations 6 hours after intraperitoneal injections of various doses of glucocorticoids (mean \pm SEM).

C, control (n=6); , Dex-P 2.5 μ g/100 g b.w. (n=6) injected; , Pred-suc 1000 μ g/100 g b.w. (n=6) injected; , Fk-P 500 μ g/100 g b.w. (n=6) injected; ns, not significant; *, p < 0.001 vs the control.

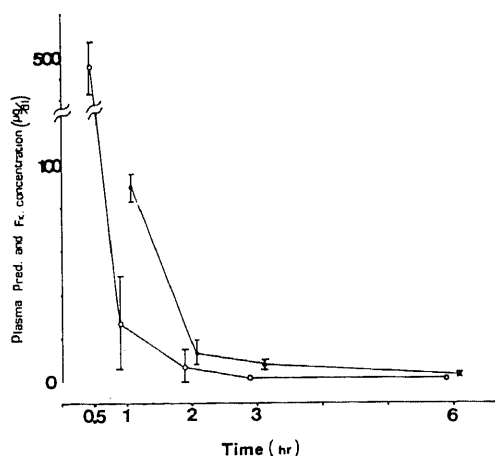


Fig. 9. Plasma levels of free steroids after intraperitoneal injections of prednisolone succinate and hydrocortisone phosphate of 500 μ g/100 g b.w. (mean \pm SEM).

●—●, Prednisolone succinate (Pred.) injected;
○—○, hydrocortisone phosphate (Fk) injected.

た。投与2時間後では(図7), Dex-Pは1時間後と同様25 μ g/100g体重で強いACTH抑制を示したが, Pred-sucは250 μ g/100g体重ではまったくACTH抑制は認めず, 500 μ g/100g体重で軽度のACTH抑制を認めるが, 1,000 μ g/100g体重ではじめて著明($P<0.001$)な抑制を示した。Fk-Pは500 μ g/100g体重投与ではACTH抑制を示さなかった。投与6時間後では(図8), Dex-Pは2.5 μ g/100g体重で依然強いACTH抑制を示したが, Pred-sucは1,000 μ g/100g体重, Fk-Pは500 μ g/100g体重でまったくACTH抑制を示さなかった。

図9にPred-sucおよびFk-P 500 μ g/100g体重投与時の血漿PredおよびFk濃度を経時的に示した。Fk-Pは30分で平均480.0 μ g/dlの値をとり, 1時間後には平均27.3 μ g/dlとなり3時間, 6時間では0.3 μ g/dlの測定感度以下となった。一方Pred-sucは投与1時間で平均90.0 μ g/dl, 2時間で14.4 μ g/dl, 3時間で7.8 μ g/dl, 6時間で3.1 μ g/dlとFkより高い値を示した。

考 察

I. 副腎細胞単層培養法によるACTH bioassayについて

ACTHの特異的作用である副腎細胞のステロイド産生能を利用したACTH bioassay法には, 従来より

下垂体摘出ラットを用いたIn vivo法として副腎重量²¹⁾, 副腎アスコルビン酸減少²²⁾, 副腎静脈血中または副腎組織中コルチコステロンを指標とする方法²³⁾²⁴⁾が行われていた。これらの方法は操作が煩雑であり, しかも感度が悪いことよりほとんど近年は使用されなくなった。これにかわってIn vitro法として副腎スライスや遊離細胞を用いる方法が開発されたが, 副腎スライスはACTHに対する感度が劣ることより, 近年はもっぱら副腎遊離細胞を用いるACTH bioassay法が行なわれている。副腎遊離細胞が副腎皮質細胞機能研究の手段として用いられるようになったのは, Feinsteinら²⁵⁾, Klopzenbergら²⁶⁾, Swallowら²⁷⁾の報告からである。その後間もなく副腎遊離細胞を用いるACTH bioassay法がSayers²⁰⁾により考案され, 従来のbioassay法に比べはるかに感度がよく精度も優れたものであることが報告された。また, 新実¹⁹⁾もSayers²⁰⁾と同様に副腎遊離細胞を用いたACTHのbioassay法の検討を行い, その感度は4pg/mlと良好であり精度および特異性に優れ末梢血中ACTH濃度を測定するのに十分なbioassay法であると報告している。

副腎細胞の単層培養は, O'Hareら²⁸⁾がラットを用いて基礎的なステロイドの分泌状態を報告したことに始まる。その後Goodyerら²⁹⁾は牛胎児の副腎細胞単層培養を用いてACTH(1-24)に対してコーチゾルの分泌量が用量反応的に増加することを示し, この方法がACTHのbioassay法として使用できる可能性を示唆した。最近山本ら¹⁷⁾はラットおよびヒト副腎細胞単層培養法によるACTHに対する反応性の検討を行い, 副腎遊離細胞法に比べ長時間の実験が可能であり, かつ技術的にも簡便で単層培養法が十分にACTHのbioassayに使用可能であることを報告している。著者は, 山本らと同様の方法にて副腎細胞単層培養を行い, これを用いてACTHのbioassayを行った。副腎遊離細胞の作製には, 消化酵素としてコラゲナーゼの使用と手による振盪を加えて得た単離細胞を使用し, 単層培養を行った。遊離細胞の作製には消化酵素としてトリプシン, コラゲナーゼおよび両者の併用が報告されているが, コラゲナーゼを用いた方法はトリプシン使用に比べ, より簡単に短時間内の操作で遊離細胞を作製できる利点がある。Sayers²⁰⁾の方法に代表される遊離細胞法では, 遊離細胞作製時に生ずる死細胞や傷害された細胞が混入しやすく, また特にコラゲナーゼを用いた場合は酵素の影響が残る可能性があるが, 単層培養法では山本ら¹⁷⁾も指摘している様に2回の培養液の交換で遊離細胞を作る時に生じる細胞片や酵素が除かれ, 2日間のrecovery timeで細胞膜面の修復が行

なわれることにより検体がより均一なものとなり、ACTH に対するコルチコステロンの産生量のばらつきが小さく、basal level の低下に伴い感度が良くなる利点がある。また成績には示さなかったが、培養3日目に標準 ACTH や検体を添加した後培養液で洗浄することにより4・5日目でも ACTH に対して用量反応的にコルチコステロンの産生がみられ、再利用も可能であった。前述の如く副腎遊離細胞法に比べ多くの利点を有する単層培養法は、ACTH の作用機序の研究やステロイド代謝の研究等に使用されるのみならず、ACTH bioassay の反応系として優れた方法と思われる。

ACTH の抽出法としては、silicic acid³⁰⁾、QUSO を用いる方法が報告されている。QUSO については、遊離副腎細胞のコルチコステロン産生を阻害する物質を充分に除くことができないことや、低濃度の ACTH 測定の場合に阻害物質を除くことができないとの報告がされている。しかし著者の検討では、¹²⁵I-ACTH の ACTH 回収率は $69.7 \pm 0.5\%$ と安定した良好な結果を示し、また添加回収率は 97.6% と良好であること、稀釈曲線が標準曲線とよく平行し $2.5 \mu\text{g/ml}$ の ACTH 濃度の検出が可能であることから考えて、ACTH 抽出は QUSO 法で問題ないと思われる。

ACTH の bioassay の信頼性については、Inter-assay および Inter-assay、添加回収率とも良好であり、感度は 2.5 pg/ml ときわめて高感度であること、しかも先に述べた如く遊離細胞法に比べ多くの利点を有する単層培養法を用いた本実験の測定系は、ACTH の bioassay 法として優れた方法と思われる。

II. 各種合成副腎皮質ステロイド製剤間における ACTH 抑制効果の相違について

ステロイドは水に難溶であるため、注射用製剤としてはリン酸、コハク酸あるいは硫酸塩など C-21 位をエステル抱合して製剤化しており、デキサメサゾン製剤としては Dex-P と Dex-S が臨床的に広く使用されている。Dex-P と Dex-S の生物学的活性については多方面より検討されており、Dex-P についてはすべての報告で強いグルココルチコイド活性を有することが明らかにされているが、Dex-S については今だ一致した見解が得られていない。Kitagawa ら³¹⁾はラットを用いて Dex-P と Dex-S の抗炎症効果を比較検討し、Dex-P は強い抗炎症効果を有するが、Dex-S はきわめて弱いかほとんど効果を認めなかったと報告している。また、抗ショック効果については、末盛³²⁾および江端³³⁾は Dex-P と Dex-S は同程度の効果を有すると報告しているが、今井³⁴⁾は Dex-S にはほとんど効果がなかったと報告した。近年中村¹⁶⁾は、ヒトにおいて定量的

に Dex-P と Dex-S のグルココルチコイド作用を比較検討するため下垂体-副腎皮質系の抑制を血中 ACTH を指標に検討し、Dex-P では静注 30 分以降 6 時間まで対照に比べ有意の ACTH 抑制を認めたと、Dex-S では静注後 6 時間まで対照との間に有意差は認めなかったと報告した。また同時に血中 Dex. 濃度の測定を行い、Dex-S では血中 Dex. 濃度は静注後 5 分に頂値を示し半減期 4.74 時間の 2 相性の減衰を示したが、Dex-S では血中 Dex. 濃度は静注後 24 時間まですべて感度以下であり、ほとんど未水解の Dex-S のまま尿に排泄されることを示し、Dex-P は強いグルココルチコイド活性を有するが、Dex-S には下垂体-副腎皮質系抑制効果は認めず、静脈内投与ではグルココルチコイド活性はないと結論している。

Dex-S は静脈内投与での効果には疑問があるが、臨床的には関節内あるいは髄腔内注入に用いられてきており、投与方法によって Dex-S は水解され遊離型デキサメサゾンとしてグルココルチコイド作用を発揮することが考えられる。著者はラットを用い Dex-P および Dex-S を腹腔内に投与し、下垂体-副腎皮質系の抑制効果を比較検討した。Dex-P は $25 \mu\text{g}$ より $100 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ 体重で投与 1 時間より 6 時間まで強い ACTH 抑制を示し、 $2.5 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ 体重の少量投与でも 6 時間後の ACTH は強く抑制された。また、血中デキサメサゾン濃度は投与 15 分までに頂値をとり、以後急速に減衰した。これらの結果は、中村¹⁶⁾のヒトにおける Dex-P の静脈内投与の成績と同様であった。

一方、Dex-S は投与 1 時間後では $100 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ 体重でも全く ACTH 抑制はみられなかったが、2 時間以後は Dex-P に比較して弱いながらも対照に比較し有意の ACTH 抑制を示した。また $100 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ 体重投与ラットの血中 Dex. 濃度は 2、3 時間では $4 \mu\text{g/dl}$ と低濃度であるが漸次上昇し、6 時間後には $29.5 \mu\text{g/dl}$ に達し、同時間の Dex-P より高い値を示した。これらの結果は、ヒトにおける中村の成績と異なっているが、これは Dex-S がラット腹腔内投与で一部水解され遊離 Dex. ができることによるものであろう。従来より Dex-S のグルココルチコイド活性の有無について賛否両論があるが³³⁾³⁵⁾、投与ルート、局所での水解による遊離 Dex. の産生が異なっていることによると考えられる¹⁶⁾³⁶⁾。

ラットにおける抗炎症力価はハイドロコチゾン 1 に対してプレドニゾン 3~4、デキサメサゾン 100~200 とされている^{37)~41)}。今回の著者の成績では、Fk-P の ACTH 抑制は 1 時間後でかなり強かったが、2 時間以後 $500 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ 体重でも有意の抑制を認めず、Pred-suc の 1 時間後の ACTH 抑制は Fk-P より

弱い様であるが、2時間後では500 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 体重で弱いながら有意な抑制がみられ、総合的にみて Fk-P と Pred-suc の ACTH 抑制効果はほぼ同程度と考えられた。Dex-P については、先に述べた如く1時間より強い ACTH 抑制を示し、投与後6時間の時点で比較すると Fk-P に対して200倍以上の強い ACTH 抑制効果を示した。これらの結果は、ラットにおける抗炎症力価がハイドロコチゾン1に対してデキサメサゾン100~200とする成績や副腎重量法での力価と同様であり、抗炎症力価と下垂体-副腎皮質系抑制がほぼ平行することを示している。

一方ヒトにおけるグルココルチコイドの相対力価として、ハイドロコチゾン1に対してプレドニゾン4、デキサメサゾン30が臨床一般に用いられている⁴²⁾⁴³⁾。しかし、この数字は抗リウマチ効果など用量-反応関係の定量化の難しい経験的なデータを基礎にしている。事実 Meikle ら¹³⁾は、血中コルチコステロンを指標に下垂体-副腎皮質抑制を経時的に検討し、ステロイド投与後8時間ではハイドロコチゾン1、プレドニゾン3、デキサメサゾン52であるが、14時間後ではそれぞれ1:5.2:154の力価を示し時間が経つほどデキサメサゾンの相対力価が高くなると報告し、Khalid ら⁴⁴⁾も副腎不全患者における ACTH 抑制の程度を検討し、デキサメサゾンは少なくともハイドロコチゾンの50倍以上の力価を有していると報告している。この様に従来のデータでは、デキサメサゾンの相対力価が過小評価されている可能性が考えられ、本剤の使用にあたってはこの点に留意する必要がある。

結 論

ラット副腎単層培養による ACTH bioassay 法を開発し、合成副腎皮質ステロイド剤を副腎摘除ラットの腹腔内に投与した場合の下垂体抑制効果について検討を行い、次の結果を得た。

1) ラット副腎単層培養法は、感度・精度・再現性ともに満足すべきものであり、臨床応用可能な ACTH bioassay 法と思われる。

2) Dex-P は腹腔内投与後すみやかに水解され遊離 Dex を生じ、投与後1時間より ACTH を強力かつ持続的に抑制した。

3) これに反し、Dex-S は一部が徐々に水解され、Dex を遊離し、投与後2時間より ACTH を抑制したが、その程度は Dex-P より軽度であった。

4) Fk-P, Pred-suc は腹腔内投与で能率よく水解され遊離ステロイドを生じ、持続は短いほぼ同程度の ACTH 抑制を示した。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御校閲を賜りました松田保教授、服部絢一名誉教授に心より感謝いたします。終始直接御指導いただきました現福井医科大学第三内科宮保進教授、岸田繁講師に深甚の謝意を表します。

なお本論文の要旨は第57回日本内分泌学会総会(昭和59年度、東京)において発表した。

文 献

- 1) Hench, P. S., Kendall, E. C., Slocumb, C. H. & Polley, H. G.: The effect of a hormone of the adrenal cortex and of pituitary adrenocorticotrophic hormone on rheumatoid arthritis. Proc. Staff Meet Mayo Clin., 24, 181-197 (1949).
- 2) Abraham, G. H.: Solid-phase radioimmunoassay estradiol-17 β . J. Clin. Endocrinol Metab., 29, 866-870 (1969).
- 3) 三浦 清・安田圭吾・五島英一・山北宜由・村瀬寛・村山正憲・皆森良明: 厚生省特定疾患「副腎ホルモン産生異常症」調査研究班. 58年度研究報告書, 200-212 (1984).
- 4) Peets, E. A., Staub, M. & Symchowicz, S.: Plasma binding of betamethasone-³H, and cortisol-¹⁴C. Biochem. Pharmacol., 18, 1655-1663 (1969).
- 5) 富岡幸生・五島英一・長井孝太郎・北田雅久・今井龍幸・石塚達夫・安田圭吾・奥山牧夫・三浦 清: 毎週続けて3~4日投与する副腎皮質糖質ステロイド間歇投与法に関する研究. 岐阜医紀, 30, 885-925 (1982).
- 6) Kozower, M., Veatch, L. & Kaplan, M. M.: Decreased clearance of prednisolone, a factor in the development of corticosteroid side effects. J. Clin. Endocrinol Metab., 38, 407-412 (1974).
- 7) Gambertoglio, J. G., Vincenti, F., Feduska, N. J., Birnbaum, J., Salvatierra, O. & Amend, W. J. C.: Prednisolone disposition in Cushingoid and noncushingoid kidney transplant patients. J. Clin. End. Metab., 51, 561-565 (1980).
- 8) Steelman, S. L. & Hirschmann, R.: Synthetic analogs of the adrenal cortical steroids, p345-383. In A. B. Eisenstein (ed.), The adrenal cortex, 1st ed. J & A. Churchill Ltd., London, 1967.
- 9) Ettinger, B., Goldfield, E. B., Burrill, K. C., Werder, K. V. & Forsham, P. H.: Plasma testosterone stimulation-suppression dynamics in hirsute women. Am. J. Med., 54, 195-200 (1973).
- 10) Meikle, A. W., Clarke, K. H. & Tyler, J. H.:

- Cushing syndrome from low doses of dexamethasone a result of slow plasma clearance. *JAMA.*, **235**, 1592-1593 (1976).
- 11) **Ballard, P. L., Carter, J. P., Graham, B. S. & Baxter, J. D.**: A radioreceptor assay for evaluation of the plasma glucocorticoid activity of natural and synthetic steroids in man. *J. Clin. Endocrinol Metab.*, **41**, 290-304 (1975).
- 12) **Cantrill, H. L., Waltman, S. R., Palmberg, P. F., Link, H. A. & Becker, B.**: In vitro determination of relative corticosteroid potency. *J. Clin. Endocrinol Metab.*, **40**, 1073-1077 (1975).
- 13) **Meikle, A. W. & Tyler, F. H.**: Potency and duration of action of glucocorticoids. *AM. J. Med.*, **63**, 200-207 (1977).
- 14) 江角吉造・林 正・中河 勇: Dexamethasone 及びその Na-sulfate, Na₂-phosphate の肝・舌の glycogen, 血糖値に及ぼす影響. *臨床薬理*, **4**, 184-186 (1973).
- 15) 安達 寛・長友佳紀子・竹原好文・外園不二夫・本松研一: エンドトキシンショックの生存率に及ぼす 燐酸デキサメサゾンと硫酸デキサメサゾンの効果の比較. *麻酔*, **28**, 27-32 (1979).
- 16) 中村 毅: 静注用 Dexamethasone 製剤の生体内代謝および下垂体-副腎皮質系への効果. *臨床薬理*, **12**, 1-16 (1981).
- 17) 山本昌弘・小川克仁・松井信夫: 副腎細胞単層培養法の検討. *名大環研年報*, **33**, 162-164 (1982).
- 18) **Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.**: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 19) 新実光朗: 遊離副腎細胞を用いる ACTH bioassay の検討と血中 ACTH の動態の観察. *日内分泌誌*, **56**, 208-230 (1980).
- 20) **Sayers, G.**: Bioassay of ACTH using isolated cortex cells. *ANN. N. Y. Acad. Sci.*, **297**, 220-241 (1977).
- 21) **Simpson, MSE., Evans, H. M. & Li, C. H.**: Bioassay of adrenocorticotrophic hormone. *Endocrinology.*, **33**, 261-268 (1943).
- 22) **Sayers, G. & Sayers, M. A.**: The pituitary-adrenal system. *Rec. Prog. Horm. Res.*, **2**, 81-115 (1948).
- 23) **Lipscomb, H. S. & Nelson, D. H.**: A sensitive biologic assay for ACTH. *Endocrinology.*, **71**, 13-23 (1962).
- 24) **Vernikos-Danellis, J., Anderson, E. & Trigg, L.**: Changes in adrenal corticosterone concentration in rats: Methods of bio-assay for ACTH. *Endocrinology.*, **79**, 624-630 (1966).
- 25) **Feinstein, M. & Halkerston, I. D. K.**: Preparation of ACTH responsive isolated cells from rat adrenals. *Fed. Proc.*, **27**, 626 (abstract) (1968).
- 26) **Kloppenber, P. W. C., Island, D. P.-Liddle, G. W., Michelakis, A. M. & Nieholson, W. E.**: A method of preparing adrenal cell suspensions and its applicability to the in vitro study of adrenal metabolism. *Endocrinology.*, **82**, 1053-1058 (1968).
- 27) **Swallow, R. L. & Sayers, G.**: A technic for the preparation of isolated rat adrenal cells. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **131**, 1-4 (1969).
- 28) **O'Hare, M. J. & Neville, A. M.**: The steroidogenic response of adult rat adrenocortical cells in monolayer culture. *J. Endocr.*, **56**, 537-549 (1973).
- 29) **Goodyer, C. G. Torday, J. S., Smith, B. T. & Giround, C. J. P.**: Preliminary observations of bovine adrenal fasciculata-reticularis cells in monolayer culture. *Acta Endocr.*, **83**, 373-385 (1976).
- 30) **Liotta, A. & Krieger, D. T.**: A sensitive bioassay for the determination of human plasma ACTH levels. *J. Clin. Endocrinol Metab.*, **40**, 268-277 (1975).
- 31) **Kitagawa, H., Mohri, T. & Kitagawa, N.**: Comparative studies on anti-inflammatory effect and biological fates of 21-phosphates and- sulfates of dexamethasone and prednisolone. *Arzneim. Forsch.*, **22**, 402-410 (1972).
- 32) 末盛郁男: 外傷性ショックラットに対する副腎皮質ステロイドの効果. *麻酔*, **26**, 1124-1131 (1977).
- 33) 江端俊彰・長内宏之・小林謙二・戸塚守夫・早坂 滉: エンドトキシンショックにおけるデキサメサゾンの効果. *麻酔*, **27**, 355-359 (1978).
- 34) 今井孝裕・桜谷憲彦: Glucocorticoid の抗ショック作用の研究. *日内分泌誌*, **54**, 87-92 (1978).
- 35) 桜谷憲彦・今井孝裕: Dexamethasone の燐酸塩, 硫酸塩間の抗エンドトキシン効果と血中濃度の比較研究. *麻酔*, **27**, 360-368 (1978).
- 36) 宮保 進・久田友一郎・岸田 繁・安里 公: ヒトにおける合成 corticosteroid 剤の代謝. *日内分泌誌*, **52**, 997-1007 (1976).
- 37) **Meier, R., Schuler, W. & Desaulles, P.**: Zur

Frage des Mechanismus der Hemmung des Bindegewebswachstums durch Cortisone. *Experimentia.*, **6**, 469-471 (1950).

38) **Stephenson, N. R.**: The relative potency of adrenal corticoids by the thymus involution method. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **34**, 253-258 (1956).

39) **Bibile, S. W.**: The assay of cortical steroids by the mouse eosinophil test. *J. Endocrinology.*, **9**, 357-369 (1953).

40) **Pabst, M. S., Sheppard, R. & Kuizenga, M. H.**: Comparison of liver-glycogen deposition and work performance tests for the bioassay of adrenal cortex hormones. *Endocrinology.*, **41**, 55-65 (1974).

41) **Hodges, J. R. & Vernikos, J.**: A comparison of the pituitary inhibitory effects of prednisone,

prednisolone and hydrocortisone. *Brit. J. Pharmacol.*, **13**, 98-102 (1985).

42) **Boland, E. W.**: The treatment of rheumatoid arthritis with adrenocorticosteroids and their synthetic analogues. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **82**, 887-901 (1959).

43) **Ringler, I.**: Activities of adrenocorticosteroids in experimental animals and man, p227-349. In R. I. Dorfman (ed), *Methods in hormone research*, Vol. IIIA., Academic Press, New York, 1964.

44) **Khalid, B. A. K., Burke, C. W., Hurley, D. M., Funder, J. W. & Stockigt J. R.**: Steroid replacement in Addison's disease and in subjects adrenalectomized for Cushing's disease: Comparison of various glucocorticoids. *J. Clin. Endocrinol Metab.*, **55**, 551-559 (1982).

A study of Pituitary Suppressive Effects of Synthetic Glucocorticoids Using Plasma ACTH Bioassay Hitomi Kuroda, Department of Internal medicine (III), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 — *J. Jusen Med. Soc.*, **94**, 1094-1104 (1985)

Key words: ACTH bioassay, glucocorticoids, pituitary suppressive effects, monolayer culture of adrenal cells

Abstract

An ACTH bioassay based on the steroidogenic response of rat adrenocortical cells in monolayer culture was developed. The minimum detectable ACTH was 2.5 pg. The dose response curve showed excellent parallelism between the standard ACTH and plasma extract from adrenalectomized rats. Both accuracy and reproducibility were satisfactory. Using this method, the relative ACTH suppressive potency of various synthetic glucocorticoids was evaluated. All steroids were injected intraperitoneally to adrenalectomized rats. Dexamethasone phosphate (Dex-P) caused a rapid and marked ACTH suppression, while the effect of dexamethasone sulfate (Dex-S) was slow and moderate. In contrast to prompt rise of plasma free dexamethasone after Dex-P, the free dexamethasone became measurable only later than 3 hours after Dex-S injection. The results suggest that, unlike the previous intravenous study in men, Dex-S injected to rats intraperitoneally can be hydrolyzed gradually and to a limited extent. Hydrocortisone phosphate and prednisolone succinate were hydrolyzed efficiently in the abdominal cavity. Compared to Dex-P, however, the pituitary suppression by both steroids was weak and transient. For evaluation of glucocorticoid potency, both intensity and duration of action should be taken into consideration. In this sense, the conventional data on the relative glucocorticoid activity (i. e. hydrocortisone 1: prednisolone 4: dexamethasone 30) seem to underestimate the potency of dexamethasone.