Glucocorticoid の抗ショック作用の研究

第 I 報: Dexamethasone のエステル型による抗エンドトキシン効果の相異

群馬大学医学部麻酔学教室

指導者: 藤田達士教授

今井孝祐, 桜谷憲彦

A Study of The Protective Mechanism of Glucocorticoid to Shock 1. Anti-Endotoxic Potency of Dexamethasone Based on Its Different Ester Types

Takasuke IMAI, Norihiko SAKURAYA

Department of Anesthesiology, Gunma Univ. School of Medicine

3-39-22 Showa-machi, Maebashi 371, Japan

Director. Prof. Tatsushi Fujita

There have been controversial discussions as to the effectiveness of glucocorticoid treatment for various shock states, although more than a decade has passed since pharmacological doses of glucocorticoid was begun to be used for the treatment of various shock states. We have tried to investigate the anti-shock mechanism of glucocorticoids, and firstly we compared the anti-endotoxic potency of dexamethasone based on different ester types in mice.

Dexamethasone disodium phosphate (MD-P) and dexamethasone sodium sulfate (DM-S) were compared. Each steroid was diluted to 0.2 mg/ml with saline calculated as dexamethasone and administered intraperitoneally to mice. After intervals of 0, 1, 2, 3, 6, 12 and 24 hours, 0.5 mg of endotoxin (E-coli; 0127-B8, Difco, USA) was injected intraperitoneally, and the survival rates were calculated 72 hours later.

In the control group the survival rate was 20.4%. In the group administered DM-P, the survival rates were 65.0% initially, 57.1% after 1 hour, 45.7% after 2 hours, 25.0% after 3 hours, 25.0% after 6 hours, 15.0% after 12 hours and 16.6% after 24 hours. On the other hand, in the group administered DM-S the survival rates were 25.0%, 4.7%, 0%, 3.7%, 15.0%, 15.0% and 16.0% respectively. The groups pre-treated with DM-P at intervals of 0, 1 and 2 hours and pre-treated with DM-S at interval of 2 hours, exhibited a statistically significant difference in survival rates.

We speculate that these differences in anti-endotoxic potency are due to its rate and speed on the liberation of free steroids from their ester types in blood. This means that glucocorticoid will manifest its anti-endotoxic potency depending on its concentration of free form in blood.

I. ま え が き

各種ショックに対して薬理学的量のグルコルチコイドの投与が広く行なわれるようになってすでに久しいが、その有効性に関しては今だに議論が多い (Schumar ら¹³, Reichgott ら¹³). 特に臨床的にショック患者に対して用いることに関しては今だに賛否両論ある (Morrison ら¹⁰, Roberts ら¹⁴). しかし実験的ショックモデルにおいてはその有効性が数多く立証されており、特に実験動物におけるエンドトキシンショックにおいては投与量に比例した抗ショック作用が証明されている (Mills¹⁰, Weil^{10, 17}). これらの抗ショック作用に関する従来の多くの研究はグルコルチコイドのさまざまなエステル型 (コハク酸塩, 磷酸塩, 硫酸塩など) を用いて行なわれてきている. 多くの場合これらエステル型は血中にて速やかに水解され遊離型になるものと考えられてきた. この仮定には殆ど疑問が抱かれず, これらエステル型の相異したグルコルチコイドは臨床的にも実験的にも等しく有効であろうと考えられていた. しかしこれは事実であろうか. 我々は一連の従来の研究 (今井ら^{5, 6}) 及び Kitagawa ら⁷ の報告よりこの点に疑問を抱き, エステル型の相異による抗エンドトキシン効果の比較を試み, グルコルチコイドの抗ショック作用の機序解明に役立たせうるのではないかと考えた. 本実験においてはグルコルチコイドとしてその一般性と効力よりみて dexamethasone を取り上げた.

Fig. 1. The structure of dexamethasone and its salt radical.

II. 材料と方法

DDN 系の若い雄マウス (体重20~25 g) を用いて行なった. マウスはdexamethasone 0.2mgにて前処置後0, 1, 2, 3, 6, 12, 24時間経過してより 0.5mgのエンドトキシンを腹腔内投与し72時間後の生存率を観察した. 使用したdexamethasoneはdexamethasone sodium sulfate (DM-S) (Dexa-scherrosone[®] 日本シエリング, Lot No.5002, 1 ml中に5.0mgのdexamethasone を含有) と, dexamethasone disodium phosphate (DM-P) (Decadron[®], 日本メルク万有, Lot No.A671, 1 ml中に3.3mgのdexamethasone を含有) である. 両エステル型の化学構造は図1. に示す. 両剤は生食水にてdexamethasone として 0.2 mg/mlとなるよう希釈, 各々 1 ml宛をマウス腹腔内に投与した. ステロイドは実験を通じて同一Lot Noを用いた. エンドトキシンはBovin 法により抽出されたlipopolysaccharide (E-coli 0127-B 8, Difco, USA) を用いた. 生食にてエンドトキシンを 1 mg/mlに溶解, この0.5mgをマウス腹腔内に投与した. なお実験を通じて同一Lot Noのエンドトキシンを使用した. 49匹のマウスはdexamethasoneを投与せずエンドトキシンのみ投与のコントロール実験に用いた. 別の20匹のマウスは両エステル型のdexamethasone 製剤の原液 1 mlのみの投与を各々について10匹づつ行なった. 又別のマウス39匹は両製剤の溶解液の影響を調べるのに用いた. DM-Sの溶解液 1 mlのみ投与したマウス10匹, DM-Sの溶解液 1 ml投与後直ちに 0.5mgのエンドトキシン投与したマウス10匹, 同様にDM-Pの溶解液 1 mlのみ投与したマウス 9 匹, 溶解液投与後

直ちにエンドトキシン0.5mg投与したマウス10匹である。DM-Pの抗エンドトキシン効果の検討に150匹のマウス、同様にDM-Sの検討に150匹のマウスを使用した。マウスはステロイドの投与を受けた後前述した時間間隔をおいてより0.5mgのエンドトキシン投与を受けた。実験結果はエンドトキシンのみ投与のコントロール群の生存率と、実験群の生存率との間でカイ2乗法（Yatesの補正）にて検定し、 $P < 0.05$ をもって統計学的に有意差ありと判定した。

III. 所 見

1) コントロール実験

エンドトキシンのみを投与されたマウス49匹のうち10匹のみが生存し、生存率は20.4%であった。又5mgのDM-Sのみの投与を受けた10匹のマウス、3.3mgのDM-Pのみの投与を受けた別の10匹のマウスはいずれも72時間の観察期間中死亡しなかった。又溶解液の影響をみた実験群にあっては、溶解液自体には毒性なく、又溶解液投与によりエンドトキシンショックの際の生存率が変化することもなかった（表1）。

Table 1. Survivors of mice from injection of various drugs (DM-P, DM-S and endotoxin).

Injected materials	Number of examined mice	Survivors	Survival rate
endotoxin 0.5mg only	49	10	20.4 %
DM-P 3.3mg only	10	10	100 %
DM-S 5.0mg only	10	10	100 %
DM-P solvent 1 ml	9	9	100 %
DM-P solvent 1 ml + endotoxin	10	1	10 %
DM-S solvent 1 ml	10	10	100 %
DM-S solvent 1 ml + endotoxin	10	4	40 %

DM-P: dexamethasone disodium phosphate

DM-S: dexamethasone sodium sulfate

Table 2. Survivors of mice from endotoxin shock which were pretreated with 0.2 mg dexamethasone disodium phosphate from 0 to 24 hours intervals.

Intervals between injection of DM-P and endotoxin	Total number of mice	Survivors at 72 hrs. later	Survival rates at 72 hrs.
control without DM-P	49	10	20.4 %
0 hour	20	13	65.0 %**
1 hour	21	12	57.1 %**
2 hours	35	16	45.7 %*
3 hours	16	4	25.0 %
6 hours	20	5	25.0 %
12 hours	20	3	15.0 %
24 hours	18	3	16.6 %

** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ compared to the control

2) DM-P 投与群

DM-P とエンドトキシンを同時に投与した群では生存率65.0%, 1時間後にエンドトキシンを投与した群で57.1%, 2時間後45.7%, 3時間後25.0%, 6時間後25.0%, 12時間後15.0%, 24時間後16.6%であった(表2)。

DM-P とエンドトキシン投与間隔が2時間までのものにあつてはコントロール群に比し有意差をもって生存率上昇した(0,1時間群で $P<0.01$, 2時間群で $P<0.05$)。

3) DM-S 投与群

DM-S とエンドトキシン同時投与群にあつては25.0%の生存率を示し, 両者の投与間隔が1時間群では4.7%, 2時間群では0%, 3時間群では3.7%, 6時間群では15.0%, 12時間群では15.0%, 24時間群では16.6%であった(表3)。

DM-S とエンドトキシンの投与間隔が2時間群では統計学的有意差をもって生存率低下した($P<0.05$)。

Table 3. Survivors of mice from endotoxin shock which were pretreated with 0.2 mg dexamethasone sodium sulfate from 0 to 24 hours intervals.

Intervals between injection of DM-S and endotoxin	Total number of mice	Survivors at 72 hrs. later	Survival rates at 72 hrs.
Control without DM-S	49	10	20.4 %
0 hour	20	5	25.0 %
1 hour	21	1	4.7 %
2 hours	25	0	0 %*
3 hours	27	1	3.7 %
6 hours	20	3	15.0 %
12 hours	20	3	15.0 %
24 hours	18	3	16.6 %

* $p<0.05$ compared to the control

IV. 考察および結語

グルコルチコイドは水に難溶の為, 現在水溶性のエステル型が臨床的に広く用いられている。現在市販されているこれら水溶性のエステル型はコハク酸ナトリウム, 燐酸ナトリウム, 硫酸ナトリウムなどである(Orr ら¹²⁾, Madsen ら⁸⁾, Melby ら⁹⁾)。従来これらのエステル型に関しては等しくグルコルチコイドとして有効であろうと考えられ, 多くの注意が払われてきたことはいいがたかった。事実 Erve ら⁴⁾のラットにおける実験によると, 2%エタノールに溶解したhydrocortisone, methylprednisolone phosphate, methylprednisolone succinate, hydrocortisone phosphate, hydrocortisone succinate, dexamethasone phosphate の間には抗エンドトキシン効果にそのステロイドの効力比以上の相異は認められておらず, これらの塩基はグルコルチコイドの効果に殆ど影響を及ぼさないであろうと考えられている。しかし一方犬の実験的心原性ショック実験においては, methylprednisolone succinate, sodium succinate, methylprednisolone phosphate, dexamethasone phosphate の各々の投与群間にあつて, methylprednisolone succinate のみが有効であり, 塩の電離がグルコルチコイドの効果に影響する可能性が指摘されている(Dietzman ら³⁾)。又Kitagawa ら⁷⁾は家兎及び犬において血中の遊離型17-OHCSを定量, dexamethasone phosphate とprednisolone phosphate投与後にあつては速やかにこれが上昇するが, dexamethasone sulfate とprednisolone sulfate群にあつてはこれが上昇しないことを報告している。これらの報告よりみるにどの型の塩を用いるかはグルコルチコイドの生物学的活性に重要な問題であることが推察される。

Mills ら¹⁰⁾はマウスにおいてLD 80のエンドトキシンを投与、グルコルチコイドの抗ショック作用を検討、12.8 μ g/g の dexamethasone は 66.7% にまで生存率を上昇させることを報告している。我々はこれに近似の値として0.2mgのdexamethasone を用いてマウスの抗ショック作用を検討した。0.2mgのDM-P は投与後2時間までは著明にマウスの生存率を上昇させたが、0.2mgのDM-Sは生存率を上昇させず、むしろ投与後数時間内は生存率を低下させる傾向にあった。この両エステル型間における生物学的作用の相異は、両エステル型間における遊離型17-OHCS の生成量の差によるものであらうと考えられる。

グルコルチコイドは脈管床の血管作働性物質に対する反応において、量に比例して相反した作用をもっていることが報告されている (Altura ら¹¹⁾)。少量のグルコルチコイドは血管収縮剤に対する脈管床の反応を亢進させ、薬理学的多量では血管収縮剤に対する脈管床の反応を抑制する。

DM-S は生体内で微量の遊離型dexamethasoneを生成することにより脈管床の血管作働性物質に対する反応を亢進させ、投与後数時間ではマウスの生存率を低下させる可能性も考えうる。又別の可能性としてはDM-S は生物学的に活性な遊離型dexamethasoneは殆ど遊離しないにも拘わらず、その構造よりみて強く内因性の corticosteroid の分泌を抑制し、これによって生存率が低下する可能性も考えられる。

グルコルチコイドの抗ショック作用に関しては確立した理論はいまだにない。血中に高濃度で存在していれば抗ショック作用が出現するのか、細胞内にとりこまれ酵素的変化を細胞にきたして抗ショック作用が出現するのかも確かでない。

グルコルチコイドの色々な生物学的作用は、細胞内にステロイドが取りこまれsteroid-receptor 結合体を作り、ついでこれは核内へ移行しchromatin と結合し特異なm-RNAの量或いは活性に影響を与え特異な酵素の生成或いは活性への影響をきたすという経過によると考えられいる (Baxter ら²⁾)。

グルコルチコイドのエステル型は血液中では各々の解離度にしたがってイオン化している為細胞膜を通過しがたいと考えられ、その為遊離型の生成率と速度がステロイドの生物学的活性に大きく影響するものと考えられる。

DM-S と DM-P には抗エンドトキシン効果に大きな差があること、ステロイドのエステル型には生物学的活性よりみて差が存在すること、ステロイドの抗ショック作用の機序解明にあたってはこれらの点を考慮にいれなければならないこと、グルコルチコイドの抗ショック作用はその血中濃度と深い関係があり血中濃度が低下すると速やかにその抗ショック作用も低下するであらうことを結論する。

(本論文の要旨は第50回日本内分泌学会総会、第24回日本麻酔学会総会において発表した。)

(DM-S 及びDM-P のsolvent を提供して下さった日本シエーリング、日本メルク万有、両社に対して謝意を表します。)

文 献

- 1) Altura, B.M., and Altura, B.T.: Experimental vascular actions of glucocorticoids and their relationship to protection in circulatory shock. J. Pharmacol. Exp. Ther. 190: 300-315, 1974.
- 2) Baxter, J.D. and Forshman, P.H.: Tissue effects of glucocorticoids. Am. J. Med. 53: 573-589, 1972.
- 3) Dietzman, R.H., Shatney, C.H. and Lillehei, R.C.: Comparative effects of the salt radical associated with corticosteroids in cardiogenic shock. Circulation 48: IV-108, 1973.
- 4) Erve, P.R., Earnest, W. and Schumar, W.: Anti-endotoxic effect of water-soluble analogues of glucocorticoid. J. Surg. Res. 18: 567-569, 1975.
- 5) 今井孝祐, 桜谷憲彦, 藤田達士: Endotoxin shock に及ぼすestrogen の効

- 果, 第1報 麻酔 25: 179-184, 1976. 6) 今井孝祐, 玉尾 洋, 桜谷憲彦, 藤田達士: Endotoxin shock に及ぼす estrogen の効果, 第2報: Ester type による抗 endotoxin 効果の比較: Dexamethasone における比較 麻酔 25: 1364-1369, 1976. 7) Kitagawa, H., Mohri, T. and Kitagawa, M.: Comparative studies on anti-inflammatory effect and biological fates of 21-phosphates and -sulfates of dexamethasone and prednisolone. *Arzneim. Forsch.* 22: 402-410, 1972. 8) Madsen, J., Done, A.K.: Ely, R.S., and Kelley, V.C.: Evaluation of water-soluble hemisuccinate esters of hydrocortisone and prednisolone. *Am. J. Dis. Child.* 97: 66-71, 1959. 9) Melby, J.C. and Cry, M.S.: Comparative studies on absorption and metabolic disposal of water-soluble corticosteroids esters. *Metabolism* 10: 75-82, 1961. 10) Mills, L.C. Corticosteroid in endotoxin shock. *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.* 138: 507-511, 1971. 11) Morrison, J., Reduto, L., Pizzarello, R., Kenneth, G., Maley, T. and Gulotta, S.: Modification of myocardial injury in man by corticosteroid administration. *Circulation* 53: 200-204, 1976. 12) Orr, R.H., Raimondo, V.D., Flanagan, M.E. and Forshman, P.H.: A water-soluble preparation of hydrocortisone for clinical use. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 15: 763-765, 1955. 13) Reichgott, M.J., and Melmon, K.L.: Should corticosteroids be used in shock? *Med. Clin. North Am.* 57: 1211-1223, 1973. 14) Roberts, R., DeMello, V. and Sobel, B.E.: Brief communication: Deleterious effects of methylprednisolone in patients with myocardial infarction. *Circulation* 53: 204-206, 1976. 15) Schumar, W. and Nyhus, L.M.: The role of corticosteroids in the management of shock. *Surg. Clin. North Am.* 49: 147-162, 1969. 16) Weil, M.H.: Adrenocortical steroid for therapy of acute hypotension; Special reference to experiments on shock produced by endotoxin. *Am. Pract. Digest. Treat.* 12: 162-168, 1961. 17) Weil, M.H.: Experimental studies on the use of corticosteroids for treatment of shock produced by endotoxin and by hemorrhage. 331-347. Ed. by Zimmerman, W.E., Staib, I. and Jacobson, E.D.: Shock: metabolic disorders and therapy, F.K. Schattner Verlag, Stuttgart-New York, 1972.