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

浜松医科大学第二内科¹⁾

東邦大学第一内科²⁾

村 上 雅 子¹⁾, 宮 地 幸 隆²⁾, 南 野 正 隆¹⁾

吉 見 輝 也¹⁾

Radioimmunoassay for Dexamethasone and its Plasma Levels
After Oral Administration in Patients with Liver Disease

Masako MURAKAMI*, Yukitaka MIYACHI,
Masataka NANNO* and Teruya YOSHIMI***

*2nd Department of Internal Medicine,
Hamamatsu University School of Medicine

**1st Department of Internal Medicine,
Toho University School of Medicine

Dexamethasone (DXM), one of the strong synthetic glucocorticoids, has been used widely for therapeutic purposes and for evaluation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. However, information concerning the plasma concentrations of DXM and its metabolism in various liver diseases is limited.

In this study, plasma DXM levels were examined in patients with chronic inactive hepatitis (CH), patients with liver cirrhosis (LC) and normal subjects (NR) after oral administration of one milligram DXM. Plasma DXM levels were measured directly in plasma extract, using reliable and sensitive radioimmunoassay (RIA). The antiserum was obtained by immunizing rabbits with DXM-3-oxime-bovine serum albumin conjugate. Standard curves for DXM were obtained over the range 10-5000pg. The cross reactivity of endogenous steroids with DXM antiserum was less than 0.1%. In the group of NR, the peak of plasma DXM was $20.9 \pm 2.9 \text{ ng/ml}$ within 1.3 ± 0.4 hours after administration. Half time of its disappearance was 3.3 ± 1.1 hours, and plasma DXM disappeared in 24 hours, remaining less than 1 ng/ml . In patients with CH and those with LC, the peak levels of DXM were $10.8 \pm 1.0 \text{ ng/ml}$ and $10.5 \pm 0.5 \text{ ng/ml}$, respectively, and those values were significantly lower than those of NR. Half time of DXM disappearance in patients with CH and in those with LC were 6.2 ± 0.6 and 6.3 ± 0.6 hours, respectively, significantly prolonged compared with that of NR. Although DXM metabolism was impaired in CH as well as in LC, the

retention rate of indocyanine green (ICG) at 15 minutes in CH was found within the normal range, $10.0 \pm 1.1\%$, respectively.

These results might suggest that the impaired DXM metabolism in patients with chronic liver disease may be affected not only by the decreased hepatic blood flow but also by some other factors.

結 言

各種副腎皮質ステロイドホルモンの血中動態には肝を主とする各組織における代謝が関与し、肝障害により内因性および一部の合成副腎皮質ステロイドホルモンの代謝に変化が生ずることが知られている^{5)9)10)12)~14)16)}。肝障害時にみられる cortisol⁵⁾, prednisolone¹⁾²⁾⁵⁾⁶⁾⁸⁾¹⁴⁾¹⁶⁾¹⁷⁾の代謝障害についての報告はいくつかみられるが、ヒトでの経口投与後の血中 dexamethasone (DXM) の動態に関する知見は限られており⁵⁾⁷⁾¹⁵⁾、かつ一致した成績が得られていない。このため DXM 代謝に関わる肝機能の影響についての知見を得る上で、障害の程度の異なる肝障害群における血中 DXM 動態の検討が有用と考えられる。

私たちは血中 DXM の radioimmunoassay (RIA) による測定法を確立し、これを用いて健常人および障害の程度の異なる各種肝疾患患者に DXM を経口投与後、DXM の血中動態を検討し、興味ある知見を得たので報告する。

実験材料と方法

(1) 試薬

標識 dexamethasone として dexamethasone, 6, 7-³H (放射活性39.4 Ci/mmol) は New England Nuclear Co. (Boston, MA. USA.) より購入した。各種ステロイド標準品として, dexamethasone, dexamethasone, prednisolone, hydrocortisone, cortisone, corticosterone, progesterone, deoxycorticosterone, 11-D-17-OH-corticosterone および testosterone は Sigma 社 (St. Louis, MO. USA.) を使用した。bovine γ -globulin (Cohn fraction II) は Sigma 社から, dextran-T 70 は Pharmacia 社 (Uppsala, Sweden) から, charcoal は Amersham 社 (Arlington Heights. IL. USA.) の ACS II液を用いた。

(2) 血清 DXM の RIA

i) 抗 DXM 抗体作成: 抗原として用いるステロイド蛋白結合物は, Erlanger ら³⁾の方法に従い DXM-3-oxime-BSAを合成した。この複合物に, complete Freund's adjuvant と生理食塩水を加え emulsion とし, これを雄成熟家兎 (約2.5kg) に免疫, 抗 DXM 抗体を作成した。免疫注射は4ないし5週間隔で行ない, 4カ月後に得た血清が最も力価が高く, 以後の実験では, この抗DXM 抗血清を最終希釈倍数4000倍で使用した。

ii) 血清試料からの DXM の抽出: DXM 経口投与後に得た血清, 0.5ml に dichloromethane 4ml を加え, 1分間激しく混和後, 下層の dichloromethane 層の200 μ l ないし400 μ l をガラス試験管にとり, 37°C窒素ガスで乾燥後 RIA に供した。

iii) 測定方法: (Fig. 1) Fig. 1に示した手順により行なった。標準曲線用 DXM は DXM を

エタノールで溶解後, その稀釈系列を作成し, その一定量をガラス試験管にとり, 窒素ガス下で乾固, 作成した。この標準曲線用試験管およびii)の操作で得た試料用試験管に標識 DXM 500 μ l (0.1% bovine γ -globulin 含有 saline にて 5000cpm/500 μ l に調整), および稀釈倍数2000倍に調整した抗 DXM 血清500 μ l を加え, 混和後4℃で16時間 incubate した。次いで氷令5% dextran coated charcoal 溶液200 μ l を加え, 混和後正確に4℃, 20分間静置し, 3000rpm, 20分間冷却遠沈後, 上清を counting vial に移し, ACS II液5ml を加えて, liquid scintillation counter にて抗体と結合した標識 DXM の放射活性を測定した。

(I) sample preparation

(II) RIA

Fig. 1 Detailed assay procedure for plasma dexamethasone.

iv) RIA の基礎的検討: 本 RIA 系において, 標識 DXM は 5000cpm/tube, 抗血清は最終稀釈4000倍で使用し, 最小検出量は10pg/tubeであった。典型的な標準曲線を Fig. 2に示した。今回用いた抗 DXM 抗体の特異性を検討するために, 本抗体の各種ステロイドに対する交叉反応を検討した。標識 DXM と抗 DXM 抗体との結合に及ぼす各種ステロイドの抑制曲線を作成し, 50%の抑制に必要な DXM と個々のステロイドとの比率から, % cross reaction を求めた。DXM の抗血清に対する反応性を100%とすると, DXM の代謝産物である6 β -hydroxy-dexamethasone (6 β -OH-DXM) 10%, betamethasone 26.7%と合成ステロイドに若干の交叉反応を認めたが, 内因性ステロイドに対する交叉は, hydrocortisone 0.05%, corticosterone 0.11%, その他0.11%以下で DXM に対して極めて特異性の高い抗血清であると考えられた (Table 1.)。ヒト血清に一定量の非標識 DXM を加えて行なった添加回収率試験では, 全測定操作を通じて93.7 $\pm$ 2.3% (n=12, 3.5ng/ml, 7.0ng/mlの2点) と良好であった。精度については同一被検血清を同時に

測定した intraassay variance が4.4% (n=10, range 2-4ng/ml), interassay variance が4.5% (n=13, range 5-8ng/ml) と良好であった。

対象と方法

(1) 対象：健常人 (NR) 6名 (男性4名, 女性2名, 平均年齢 40.4 ± 5.1 才, 平均体重 64.8 ± 6.1 kg),

Fig. 2 Standard curve for dexamethasone.

Table 1 Cross reaction of various steroids with the antiserum against dexamethasone-3-oxime-BSA. (dilution 1:4000)

Steroid	Cross reactivity (%)
Synthetic	
Dexamethasone	100
6 β -OH- Dexamethasone	10
Betamethasone	26.7
Prednisolone	0.14
Endogenous	
Hydrocortisone	0.05
Cortisone	0.0025
Corticosterone	0.11
Progesterone	0.01
Deoxycorticosterone	0.015
11-D-17-OH-corticosterone	0.11
Testosterone	15×10^{-6}

Determined at 50% displacement

および肝硬変 (LC) 17例 (男性11名, 女性6名, 平均年齢 53.9 ± 2.3 才, 平均体重 60.5 ± 6.8 kg), 慢性非活動性肝炎 (CH) 7例 (男性5例, 女性2例, 平均年齢 49.4 ± 4.7 才, 平均体重 68.8 ± 5.5 kg) を対象とした。肝疾患の診断は全例, 肝生検にて病理組織学的に行なった。Table.2に血液生化学所見を示した。

(2) 方法: 全例, 早期絶食状態で DXM 1mg を1回経口投与し, 投与前, および後0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24時間で採血した。検体は血清に分離後 -20°C にて凍結保存し後日 DXM の RIA に供した。

(3) 推計学的検討: 測定結果は $\text{mean} \pm \text{SEM}$ で表し, 統計学的有意差の検定は Student's t 検定を用いた。

Table 2 Patients' profile.
Patients with liver cirrhosis (LC) and those with chronic inactive hepatitis (CH).

	normal range	LC (n:17)	CH (n:7)
GOT (KU)	5-23	64.4 ± 9.4	68.9 ± 20.2
GPT (KU)	2-16	44.6 ± 7.8	95.9 ± 37.7
γ GTP (IU/L)	0.5-24	108.9 ± 44.8	133.3 ± 47.4
ChE (Δ PH)	0.5-1.05	0.57 ± 0.07	0.84 ± 0.1
T.cho (mg/dl)	110-220	179.8 ± 18.9	160.4 ± 14.9
T.P (g/dl)	6.9-8.4	6.7 ± 0.16	6.9 ± 0.28
Alb. (g/dl)	4.0-4.4	3.3 ± 0.19	4.0 ± 0.17
PT (%)	70-140	80.9 ± 4.7	100 ± 6.6
ICG (%)	< 10	27.9 ± 3.0	10.0 ± 1.1

成 績

(1) 健常人および肝疾患患者における DXM 経口負荷後の DXM 血中動態

健常人および肝疾患患者に DXM 1mg を経口投与後の DXM の血中動態を Fig.3, Table 3に示した。DXM 1mg 経口投与後, その血中濃度が頂値に達する時間は, NR 群で 1.3 ± 0.4 時間, LC 群で 1.8 ± 0.3 時間, CH 群で 1.3 ± 0.2 時間と LC 群でやや遅れる傾向にあるが, その差は統計学的には有意ではなかった。血中 DXM 濃度の頂値は NR 群で 20.9 ± 2.9 ng/ml, LC 群で 10.5 ± 0.5 ng/ml, CH群で 10.8 ± 1.0 ng/mlと NR 群に比し LC 群および CH 群で有意に低値であった。その後 DXM 濃度は漸減し, 頂値の1/2の濃度に低下するのに要する時間 (T 1/2時間) は, NR 群 3.3 ± 1.1 時間に比し, LC群 6.3 ± 0.6 時間, CH 群 6.2 ± 0.6 時間と両群で有意に遅延していた。また24時間後には血中 DXM 濃度は, NR で 0.9 ± 0.3 ng/ml, LC で 1.8 ± 0.3 ng/ml, CH 群で 1.2 ± 0.2 ng/mlと, NR に比較して LC では有意に高濃度の DXM が血中に残存することが認められた。

Fig. 3 Plasma dexamethasone (DXM) levels over 48 hours following a single oral 1.0mg dose in normal subjects and patients with liver cirrhosis and those with chronic inactive hepatitis. Values are mean $\pm$ SEM. * $P < 0.05$, compared with those in normal subjects.

Table 3 Changes in plasma dexamethasone (DXM) levels after a single oral 1.0mg dose and other variables in normal subjects and patients with liver cirrhosis and those with chronic inactive hepatitis. Half time of DXM disappearance is expressed as $T(1/2)$. Max concentration depicts peak value of DXM.

Values are mean $\pm$ SEM, compared with those in normal subjects.

** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

	Time of peak value (hr)	$T(1/2)$ (hr)	Peak value (ng/ml)	DXM. concentration (ng/ml) % Max. concentration (%)	
				6 hrs	24 hrs
Normal subjects	1.3 ± 0.4	3.3 ± 1.1	20.9 ± 2.9	5.0 ± 1.3	0.9 ± 0.3
				26.9 ± 8.8	2.8 ± 1.0
Liver cirrhosis	1.8 ± 0.3	$6.3 \pm 0.6^{**}$	$10.5 \pm 0.5^{**}$	5.8 ± 0.5	$1.8 \pm 0.3^{*}$
				$54.4 \pm 4.1^{**}$	$19 \pm 2.9^{**}$
Chronic inactive hepatitis	1.3 ± 0.2	$6.2 \pm 0.6^{*}$	$10.8 \pm 1.0^{**}$	5.1 ± 0.9	1.2 ± 0.2
				45.4 ± 6.5	$10.7 \pm 1.7^{**}$

肝障害の程度と血中 DXM 消失率との関係

肝障害の程度と血中からの DXM の消失率との相関を検討するため, LC 群において血中 DXM 濃度の頂値に対する6時間後の血中 DXM 濃度の比率 (DXM 6h/DXM peak(%)) と, ICG R 15分値との相関 (Fig.4-a), あるいは血清総ビリルビン値との相関 (Fig.4-b) を求めた。いずれの場合にも $p < 0.05$ の統計学的に有意な正の相関関係が認められた。

Fig. 4 (a) Correlation between the retention rate of indocyanine green (ICG R) at fifteen minutes and removal of dexamethasone (DXM).
(b) Correlation between serum total bilirubin (T.Bil) level and removal of dexamethasone.

考 察

今回私たちは, DXM-3-oxime-BSA を抗原として家兎を免疫して抗血清を作成し, これを用いて健常人および肝疾患例に DXM 経口投与後の, 血中 DXM 濃度を測定した。この抗 DXM 抗体は, hydrocortisone と0.05%の交叉を示し, corticosterone, 他の内因性ステロイドホルモンとも0.11%以下で, 本抗体の交叉性は DXM に対して極めて特異性が高いものと考えられた。感度は約10pg で, 10pg から5000pg の範囲で測定可能な標準曲線を得た。本 assay 系の回収率及び精度共に良好であった。Meikle ら⁷⁾により報告された DXM の RIA 法に比し, 我々の assay 系は簡便さと, 特異性の高い点において臨床に十分応用できるものと思われた。

健常人では DXM 経口投与後0.5時間で, 血中に DXM が検出され, 1ないし2時間で頂値に達

した後、血中半減期3ないし6時間で漸減し、24時間後にはほとんど認められなくなった。しかし同一投与量でも血中レベル、特に頂値に個人差が認められることから、ステロイド剤の腸管からの吸収に差がある可能性も考えられた。Meikle⁷⁾の報告では DXM 1mg 経口投与後、その最高血中濃度は 9ng/mlと示されており、本研究での DXM 最高血中レベル $20.9 \pm 2.9 \text{ ng/ml}$ は、その2倍の高値を示した。我々の測定系は、クロマトグラフィーなどによる DXM の分離を要さない、抽出操作だけの方法であり、そのため良好な回収率が得られたことが Meikle⁷⁾らの成績との差に関与しているものと思われた。

Miyachi⁴⁾¹¹⁾の報告した、DXM と同様 long acting steroid である betamethasone (BM) の血中動態と比較すると、BM の半減期は3-4時間で、今回の我々の DXM の半減期とはほぼ一致していた。

肝疾患患者における DXM の血中動態の検討では、健常人と同量の DXM 経口投与後の血中 DXM 頂値は、肝硬変例のみならず、慢性非活動性肝炎でも健常人の約50%に上昇するのみで、有意に低かった。頂値にいたる時間は、慢性非活動性肝炎では健常人と差がなかったが、肝硬変例では健常人の約2倍に遅延していた。一方、DXM の血中からの消失は、慢性非活動性肝炎で、すでに肝硬変群と同様に、健常人と比較して明かな差が認められ、半減期も著しく長く、健常人の約2倍を示した。投与6時間後、24時間後の血中 DXM 濃度は、健常人では各々頂値の $26.9 \pm 8.8\%$ 、 $2.8 \pm 1.0\%$ に過ぎないが、慢性非活動性肝炎では各々 $45.4 \pm 6.5\%$ 、 $10.7 \pm 1.7\%$ 、肝硬変では各々 $54.4 \pm 4.1\%$ 、 $19 \pm 2.9\%$ と、健常人より有意に高濃度の DXM が血中に残存することが示された。Kawai⁵⁾らの報告によれば、主に肝硬変症を対象として DXM を経静脈的に投与した際にも、血中 DXM の metabolic clearance は、健常人より有意に低下していたと報告している。このことから今回の肝硬変群における DXM 経口投与後の代謝遅延は、消化管での吸収段階における遅延よりも、むしろ血中に移行した後の代謝過程に由来することが大きいものと考えられた。肝硬変患者において、血中 DXM 半減期と ICG R 15分値、あるとは血清総ビリルビン値との間には、有意な正の相関が認められた。このことから、肝硬変での DXM の血中からの消失率は、肝障害の程度と相関することが示唆された。しかし慢性非活動性肝炎では、ICG R 15分値は、正常範囲にあり、有効肝血流量の減少は明かではないと考えられるのに、DXM の血中からの消失率低下が認められた。この成績から、本ステロイドの代謝には、従来考えられていた有効肝血流量以外に、他の因子も関与する可能性があることを示唆するものと考えられた。肝血流量以外の因子として、Peterson¹²⁾は cortisol代謝と肝疾患に関して、A環の還元酵素障害、 6β 位の水酸化、 11β 位の水酸基の酸化などに障害があることを示している。Rao¹³⁾は、ラットにおける肝硬変では、肝細胞への副腎皮質ホルモンの取り込みの低下がみられると報告している。これらの報告をあわせると、ステロイドホルモン代謝には、肝血流量以外の因子の関与が存在する可能性が示唆され、慢性非活動性肝炎における、今後の検討が必要とされる。以上、DXM では肝血流量の保たれている慢性非活動性肝炎でもすでに、その代謝遅延が認められたことから、その代謝には肝血流量以外の因子も関与する可能性が考えられた。このことから DXM を用いた間脳下垂体副腎皮質機能検査、あるいは、治療投与に際しては、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

1) 著者らの作成した、抗 dexamethasone (DXM) 抗体は、高感度で特異性が高く、本抗体を

用いた RIA 法は簡便で、臨床的応用も十分可能と考えられた。

2) DXM 1mg をヒトに経口投与後、血中 DXM の頂値は健常人に比較して肝硬変群、あるいは慢性非活動性肝炎群では有意に低値であった。

3) DXM の血中からの消失は、健常人に比較して肝硬変群で有意に遅延し、その遅延の程度と ICG 排泄率あるいは血清総ビリルビン値との間には有意の正の相関を認めた。しかし ICG 排泄率正常の慢性非活動性肝炎群でも DXM の血中からの消失は有意に遅延していた。

4) 以上の成績より、肝疾患患者にみられる血中 DXM の代謝障害には、肝血流量の低下だけでは説明できない他の因子も関与している可能性が示唆された。

文 献

- 1) Colburn, W.A. and Buller, R.H.: Radioimmunoassay for prednisolone. *Steroids*, 21: 833-846, 1973.
- 2) Colburn, W.A. and Buller, R.H.: Radioimmunoassay for methylprednisolone. *Steroids*, 22: 687-697, 1973.
- 3) Erlanger, B.F., Borek, F., Beiser, S.M. and Lieberman, S.: Steroid-protein conjugates, I. Preparation and characterization of conjugates of bovine serum albumin with testosterone and with cortisone. *J. Biol. Chem.*, 228: 713-727, 1957.
- 4) 加納 隆, 水智 彰, 宮地 幸隆: 血中 Betamethasone の Radioimmunoassay 法による測定とその臨床的応用。日内泌会誌, 54: 654-665, 1978.
- 5) Kawai, S., Ichikawa, Y. and Homma, M.: Differences in metabolic properties among cortisol, prednisolone, and dexamethasone in liver and renal diseases: accelerated metabolism of dexamethasone in renal failure. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 60: 848-854, 1985.
- 6) Kozower, M., Veatch, L. and 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) Meikle, A.W., Langerquist, L.G. and Tyler, F.H.: A plasma dexamethasone radioimmunoassay. *Steroids*, 22: 193-202, 1973.
- 8) Miyachi, Y., Yotsumoto, H., Kano, T., Mizuchi, A., Muto, T. and Yanagibashi, K.: Blood levels of synthetic glucocorticoids after administration by various routs. *J. Endocrinol.*, 82: 149-157, 1979.
- 9) 宮地幸隆, 田中 孝, 河村 寛, 馬場さえ子: Betamethasone 投与後の肝細胞分画中の分布, 及び receptor の変動。厚生省特定疾患「ステロイドホルモン産生異常症」調査研究班昭和55年度研究報告書 (1980), 165-171, 1980.
- 10) 宮地幸隆: 肝障害における 副腎皮質ホルモン代謝。肝胆膵 8(3): 311-316, 1984.
- 11) Mizuchi, A., Okada, N., Henmi, Z. and Miyachi, Y.: Radioimmunoassay for plasma beta-methasone 17-benzoate. *Steroids*, 26: 635-645, 1975.
- 12) Peterson, R.E.: Adrenocortical steroid metabolism and adrenal cortical function in liver disease. *J. Clin. Invest.*, 39: 320-331, 1960.
- 13) Rao, M.L., Rao, G.S., Holler, M. and Breuer, H.: Reduced uptake of estrone and corticosterone by cells from cirrhotic rat liver. *Acta Endocrinol.*, 90: 648-657, 1979.
- 14) Renner, E., Horber, F.F., Jost, G., Frey, B.M. and Frey, F.J.: Effect of liver function on the metabolism of prednisone and prednisolone in humans. *Gastroenterology*, 90: 819-828, 1986.
- 15) Robert, J.W., William, K.V. and William, J.S.: Dexamethasone

- suppression testing in chronic renal failure: pharmacokinetics of dexamethasone and demonstration of a normal hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 63: 741-746, 1986.
- 16) Uribe, M., Schalm, S.W., Summerskill, W.H. and Go, V.L.W.: Oral prednisone for chronic active liver disease: dose responses and bioavailability studies. *Gut*, 19: 1131-1135, 1978.
- 17) Yanagibashi, K., Mizuchi, A., Yotsumoto, H. and Miyachi, Y.: Separation of serum prednisolone and prednisolone-21-Hemisuccinate by extraction and their concurrent determination by radioimmunoassay. *Clinical Chemistry*, 26: 1301-1303, 1980.
- (受付日: '89. 5.18)