

氏名(本籍)	とび た ただ みち 飛田忠道(茨城県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博乙第1898号
学位授与年月日	平成15年1月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	Determination of prednisolone in the cochlear tissue (蝸牛組織内プレドニゾンの測定)
主査	筑波大学教授 医学博士 吉田 薫
副査	筑波大学教授 医学博士 中山 凱夫
副査	筑波大学教授 医学博士 豊岡 秀訓

論文の内容の要旨

(目的)

以前より、ステロイド剤は、突発性難聴などの内耳性難聴に対する治療に用いられることが多いが、その作用機序については未だ十分には解明されていない。近年モルモットを使った動物実験において、音響障害に対して治療効果を持つことが報告され、またグルココルチコイドレセプターが蝸牛に存在する事から、投与されたステロイド剤が直接蝸牛に作用する可能性が高いと考えられる。しかし、ステロイド剤の蝸牛への移行、及びその蝸牛内動態に関する報告はない。今回我々は、グルココルチコイドとして臨床でも多く使用されるプレドニゾロンの蝸牛、肝、脳組織、血清への移行を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて測定し、その薬物動態を調べた。

(対象と方法)

試料としてプレドニゾロン (シオノギ製薬、水溶性プレドニン) を、蒸留水に溶解して使用した。実験動物としてPreyer耳介反射陽性、体重270-330gのハートレー系白色モルモットを31匹使用した。麻酔後に気管切開し、人工呼吸下に管理した。プレドニゾロン100mg/kg静注後、30分、1, 2, 4, 8時間後に検体を採取した。採血後に、蝸牛、肝、脳組織に関しては血液の混入を防ぐため生理食塩水で全身灌流後に採取した。蝸牛は骨壁を含む全体を使用し、蒸留水1mlを加えホモジナイズした後、遠沈にて不溶成分を除去後、上清をサンプルとした。肝、脳組織は10mgずつ、血清は25 μ lをサンプルとした。抽出にはSep-Pak Vac 1cc (50mg) C18 cartridges (Waters) を用いた。1mlのメタノール、蒸留水での前処理後、サンプルを注入し、アセトン:蒸留水(2:8)、蒸留水へキサンそれぞれ1mlでカラムを洗浄した。その後に0.2M水酸化ナトリウム0.3mlを入れた試験管に1mlのジエチルエーテルでステロイドを溶出させた。この混合液を良く攪拌し、3500rpm、3分間遠心分離し、上層のジエチルエーテル層をピペットで他の試験管に移し蒸発乾燥させた。HPLCシステムはMcWhinney, et al. の報告したシステムに若干の改良を加えて行った。カラムは250 x 4.6mm symmetry C185 μ m (Waters) を用い、UV検出器はmode 12,487 (Waters) を使用し、波長は254nmとした。移動相にはメタノール:テトラヒドロフラン:蒸留水(3:25:72)を用い、流速は1ml/minとした。検体入りの乾燥試験管に100 μ lの移動相を注ぎ、HPLCに50 μ lを注入し測定した。

(結果)

生理食塩水静注1時間後の対照動物の蝸牛ではピークは検出されず、プレドニゾロン100mg/kg静注1時間後の蝸牛では、検出時間12.0分で検出された。また、肝組織、血清でも同様に検出されたが、脳組織では検出されなかった。肝組織と血清ではプレドニゾロン静注後30分で最高値を示し(肝組織: $0.517 \pm 0.075 \text{ ng}/\mu \text{ g protein}$, 血清: $0.501 \pm 0.083 \text{ ng}/\mu \text{ g protein}$), その後は比較的速やかに時間経過とともに減少した。これに対して、蝸牛組織での濃度はプレドニゾロン静注後1時間で最高値を示し($0.307 \pm 0.055 \text{ ng}/\mu \text{ g protein}$; $35.30 \pm 6.32 \text{ ng/cochlea}$), 肝組織や血清中濃度に比べかなり緩やかに減少した。脳組織では今回の測定では検出されなかった。

(考察)

ステロイドホルモンの組織への移行はさまざまな因子により変化する。1) 組織内毛細血管通過時間, 2) 蛋白結合ホルモンの解離速度, 3) 遊離型ホルモンの膜透過性等が大きく関与している。毛細血管通過時間は組織により異なり、脳では短く、肝では長いことが知られている。今回の実験でも肝組織への移行は血清中の濃度とほぼ同程度であることより非常に良いと考えられ、毛細血管通過時間が長いことから裏付けられる。ステロイドホルモンの脳内への取り込みは血液脳関門の透過性が大きく関与しており、各ホルモンの構造上の極性により変化する。プロゲステロンやテストステロンのような極性の小さなステロイドは取り込みが良く、コルチゾールのような極性の大きなステロイドは透過性が悪い。プレドニゾロンは極性が大きいと透過性は悪いと考えられ、今回の測定で検出できなかったことと合致する。血液脳関門と血液蝸牛関門にはいくつかの類似した移送機構のある事が知られている一方、異なった移送機構もいくつか報告されている。我々の実験結果からはプレドニゾロンに関しては異なる移送機構が存在していると考えられる。濃度変化の時間経過をみると、蝸牛組織からの排泄は肝組織や血清と比較すると緩やかで、蝸牛組織で長時間高濃度が維持されることが予想され、高い治療効果を得るためには有利な要因と考えられる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

ステロイド剤は、突発性難聴など内耳性難聴の治療に多用されるが、蝸牛への移行及び蝸牛内動態に関する報告はない。本研究は、モルモットを用い、プレドニゾロン静注後の蝸牛・脳・肝および血清中の濃度を高速液体クロマトグラフィーにより測定し、その時間経過を調べたものである。脳組織とは異なり、蝸牛組織にはプレドニゾロンが移行することを直接的証拠により示すと同時に、肝組織や血清に比べ蝸牛における濃度変化が緩やかで、長時間高い濃度が保たれることを明らかにしている。内耳へのステロイドの移行とその時間経過を初めて明らかにした意義は高く、臨床的にも重要な研究である。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。