

Dexamethasone の抗脳浮腫作用に関する 実験的研究

—凍結損傷脳における ^3H -dexamethasone の経時的濃度変化と、
組織内の分布についての検討—

岡山大学医学部脳神経外科学教室（指導：西本 詮教授）

武 本 本 久

（昭和57年1月20日受稿）

Key Words : brain edema, cold injury,
glucocorticoid, dexamethasone.

I : 緒 言

脳神経外科的疾患に随伴する脳浮腫の予防および治療を目的として、glucocorticoid 剤が、臨床上広く用いられている。しかし、現在のところ、glucocorticoid 剤の脳浮腫抑制効果発現の作用機序については、いまだ明確な結論がえられず、ただ単に臨床経験的に使用されているにすぎないのが現状である。近年ようやく glucocorticoid 剤の大量投与時に、血液中、髄液中の濃度を測定し、その使用方法、投与量についての再検討がなされつつある^{1),2)}。しかし、その抗脳浮腫作用の面に注目して、実際に、脳組織中濃度変化に関して検討を加えた報告は、未だ数少ない^{3),4)}。

そこで、実験動物に、凍結損傷法による脳浮腫を作成し、臨床上よく用いられる glucocorticoid 剤である dexamethasone の ^3H 標識化合物をとりあげ、浮腫脳組織中におけるその経時的濃度変化と分布について検索を行ない、本剤の最適な投与方法、投与量を決定するとともに、その抗脳浮腫作用の作用機序の一端を明らかにせんと試みたので若干の文献的考察を加え報告する。

II : 実験方法

1. 実験動物ならびに麻酔方法

実験動物としては、成熟した体重190~210g の Wistar 系雄ラット122匹（藤井医用動物飼育所より購入）を用いた。飼育方法は、大型飼育箱に入れ、水および固型飼料（オリエンタル酵母社製）で飼育した。

麻酔方法は、Nembutal® (sodium pentobarbital) Abbott Laboratories 社製] を50mg/kg の割合で、腹腔内投与し、自発呼吸下に実験を行なった。

2. 実験機器および器具

脳組織中の ^3H -dexamethasone 濃度測定に関する実験では、超音波菌体破壊装置（海上電気株式会社製、T-A-4201、共振周波数19.5 KHz、実効音響出力100W）を用い、摘出した脳組織に超音波照射を3分間行ない破壊した後、液体シンチレーションカウンター用試料バイアルびん（Packard Instrument Company 製、低カリウムガラス製バイアルびん、容量20ml）に入れ、後述の懸濁計測法により液体シンチレーション計測器（日本無線株式会社製、Aloka LSC-653型）を用いて、試料中の ^3H -activity を測定した⁵⁾。

脳組織中における ^3H -dexamethasone の細胞分画分布に関する実験では、ホモゲナイザー（OMEGA 電気社製モーター、高島商店製10ml

テフロンガラスホモゲナイザー)にて、脳組織をホモゲナイズした後、遠心分離機(久保田鉄工株式会社製 KR-200B 型、日立製作所製日立 65-P 型)を用いて、試料を分離採取後、前述のバイアルビンに入れ、液体シンチレーション計測を行った。

シヨ糖濃度勾配超遠心分離法分析では、濃度勾配作成装置(日立製作所製、DGK 型密度勾配作成装置)を使用し、遠心用チューブ(poly-carbonate 製、容量 5 ml、日立製作所製)に 30%から 10%のシヨ糖直線濃度勾配溶液 4.6ml を作成し、試料重量後、遠心分離機(日立製作所製、65-P 型)を用いて遠心分離した。

3. 使用薬品

i) Glucocorticoid 剤

Dexamethasone [分子量 392.47, 純度 99.8%, 武田薬品工業株式会社製]を用いたが、そのトレーサーとしては、 ^3H -1,2(n)-dexamethasone [分子量 393, 比放射能 26 Ci/mmol, The Radio-chemical Center 社製]を使用した。これを、1% ethylalcohol 溶液 1 ml 中に dexamethasone 1 mg と ^3H -dexamethasone 100 μCi を含有するように調製して使用した。

ii) 液体シンチレーター

血液中および、脳組織中の ^3H -activity 計測には、シンチレーターとして Toluene 1000 ml (石津製薬、試薬特級)に、PPO (2,5-Diphenylloxazole) 5 g と、POPOP (1,4-bis-2,5-phenylloxazolyl-benzene) 0.3 g [いずれも、Packard Instrument Company 製]を溶解したシンチレーター 15 ml に、methyl alcohol 2.5 ml (石津製薬、試薬特級)と、重量比で、3~5%の CAB-O-SIL (Thixotropic Gel Powder, Packard Instrument Company 製)を加えた懸濁計測法にて行った⁵⁾。

シヨ糖溶液中の ^3H -activity は、Toluene 600 ml (前述)に、PPO 3 g と POPOP 0.3g (いずれも前述)を溶解し、さらに Triton X 100 (石津製薬、試薬特級) 300ml を加えたシンチレーター 15ml を用いる乳化計測法にて計測した。

4. 凍結損傷による脳浮腫作成

前記 Nembutal[®] の腹腔内投与による全身麻酔を行ったラットの右頭頂部に皮膚切開を加え、

歯科用ドリルにて頭蓋骨に直径約 3 mm の骨窓を穿った。つぎに、液体窒素中で冷却した、手製の真鍮性プローベ(先端の直径 1 mm)を、この骨窓部にて、saran plastic wrap および脳硬膜を隔てて、右頭頂部脳表に 3 分間接触させ、凍結損傷を作成した⁶⁾。頭皮を縫合後、のちに脳浮腫の拡がりを簡単に把握するために、2.5% Evans Blue 水溶液 0.4ml を尾静脈より注入した。

なお、この方法により、作成された病巣は、損傷作成 24 時間後において、脳表では、直径 5 mm 前後で脳表より深さ 3~5 mm に達する程度のほぼ一定した大きさのものであった⁶⁾。

5. 脳組織内 ^3H -dexamethasone の測定

凍結損傷を作成した 20 時間後のラット 80 匹を以下の 3 群に分けそれぞれ、glucocorticoid 剤を投与後経時的に断頭屠殺し検討した。すなわち、前述した dexamethasone の 1% ethylalcohol 溶液 0.1 ml を右大腿筋肉内へ注入したものを筋肉内投与 A 群(以下 I.M.A 群と略す)とし、dexamethasone 溶液 0.2 ml を筋肉内投与したものを B 群(以下 I.M.B 群)とした。また、Nembutal[®] 麻酔下に、I.M.A 群と同量の glucocorticoid 剤を右大腿静脈内へ注入したものを静脈内投与群(以下 I.V. 群)とした。断頭前、Nembutal[®] 麻酔下に両側頸動脈より 0.9% Krebs-Ringer 液 10ml を 50cm H₂O の圧力で注入し頭蓋内血液を灌流除去後、直ちに屠殺断頭した。ついで、頭蓋内より脳を摘出後、右頭頂部より浮腫脳組織を、対側頭頂部より健常脳組織を、それぞれ 110~130mg を摘出し、これを 1 ml のディスプレイ注射器にいれて、27ゲージの注射針を通して捻出しつつ、注射器の重量を計量することにより、捻出脳組織の重量を測定した。この捻出した脳組織 100mg を、2.5 ml の methyl alcohol 中で、前述の超音波液体破壊装置により破壊後、前述した懸濁計測法を用いて、液体シンチレーション計測器にて ^3H -activity を測定した。

血液サンプルは、屠殺直前心臓穿刺にて約 2 ml 採取後、3000 rpm、10 分間遠心分離(KR-200 B 型)して得られた血清 0.1 ml について、同様懸濁計測法を用いて測定した。なお、glucocorti-

表1. 凍結損傷脳作成ラットの脳組織中における dexamethasone の経時的濃度変化。

³H-dexamethasone 10 μ Ci と dexamethasone 0.1mg を含有した 1% ethylalcohol 溶液 0.1ml を筋肉内投与した群 (I.M.A 群), 静脈内投与群 (I.V. 群). 1% ethylalcohol 溶液 0.2ml を筋肉内投与群 (I.M.B 群) とした. 各群各時間における個体数 (ラット) は 5 匹づつである. 表は, 平均値 \pm S.D. dpm/100mg (脳組織) で示してある. (*印は, 同一群同一時間における, 病巣側と健常側の脳組織中 ³H-activity を, t-検定により比較し, P<0.05 以下の有意差を有することを表わしている.)

		Control (dpm/100mg)	Lesion (dpm/100mg)	Serum (dpm/0.1ml)
5 min.	I.M.A	—	—	—
	I.M.B	—	—	—
	I.V.	265.1 \pm 12.9	301.4 \pm 22.1*	12600.7 \pm 2114.7
1 hr.	I.M.A	142.3 \pm 13.8	213.4 \pm 16.7*	1224.3 \pm 112.8
	I.M.B	264.4 \pm 12.6	340.3 \pm 20.7*	5228.8 \pm 197.7
	I.V.	404.7 \pm 25.8	506.8 \pm 26.6*	5115.1 \pm 318.3
2 hrs.	I.M.A	196.3 \pm 15.1	267.3 \pm 19.3*	2358.3 \pm 136.8
	I.M.B	359.8 \pm 11.6	436.2 \pm 15.4*	5308.1 \pm 192.9
	I.V.	405.8 \pm 21.0	483.2 \pm 24.3*	3769.0 \pm 222.8
3 hrs.	I.M.A	210.1 \pm 12.9	264.2 \pm 18.9*	2328.5 \pm 225.8
	I.M.B	380.6 \pm 13.6	427.9 \pm 20.9*	5113.0 \pm 180.1
	I.V.	378.8 \pm 19.5	464.5 \pm 24.1*	3360.9 \pm 229.1
4 hrs.	I.M.A	153.9 \pm 10.7	197.2 \pm 14.7*	1768.5 \pm 129.6
	I.M.B	261.9 \pm 14.3	322.1 \pm 17.0*	4274.5 \pm 192.6
	I.V.	316.2 \pm 20.2	367.8 \pm 20.7*	2695.5 \pm 208.3
6 hrs.	I.M.A	101.7 \pm 14.6	124.2 \pm 16.0*	1300.6 \pm 185.5
	I.M.B	187.2 \pm 15.2	209.6 \pm 16.6	3172.8 \pm 158.7
	I.V.	162.9 \pm 10.9	186.3 \pm 13.4*	1929.8 \pm 144.6

coid 剤投与後の経時的屠殺は, 各群とも, 投与後 1, 2, 3, 4, 6 時間目に行い, I.V. 群では, 特に 5 分後にも行った。

6. ³H-dexamethasone の血中濃度変化の測定

ラット 9 匹を使用し, 前述の Nembutal[®] 麻酔下で, 前頸部正中線上に皮膚切開を加え, 右総頸動脈を露出し, bifurcation 部の心臓側でカテーテル (Atom I.V.-11, 3Fr 外径 1mm) を心臓側へ向けて総頸動脈内へ 1.5cm 挿入し総頸動脈とともに結紮固定した。カテーテルの他の断端を加熱密封したのち左側頸部皮下を通して, 項背部より体外へ引き出し皮膚に固定^{7),8)}

した。

その後, 前述の 5 と同様に, I. M.A 群, I.M.B 群, I.V. 群の 3 群に分け, 投与量, 投与方法は前節と同様に行った。採血時間は, I. M.A および I.M.B 群では, 投与後 30 分, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 時間, I.V. 群は投与後, 5 分, 30 分, 1, 2, 3, 4, 5, 6 時間とした。採血方法は, 無麻酔下に, 密封したカテーテル先端を切断し 1 回 0.5ml の動脈血を, 容量 1ml の小試験管に取り, 3000 rpm, 10 分間遠心分離して得られた血清 0.1ml について, 前述した懸濁計測法にて, ³H-activity を測定した。なお, この際カテーテル内には, ヘパリン加生理食塩水を満たしたカテーテル内での血液凝固を防止した。

7. ³H-dexamethasone の浮腫脳組織内分布に関する検討

³H-dexamethasone の浮腫脳組織内分布を調べる目的で以下の 3 種の実験を行った。

i) 凍結損傷脳作成 20 時間後のラット (20 匹) の各々に dexamethasone の ethylalcohol 溶液 0.1ml を筋肉内注射し, その後 2 時間後に前述 5. と同様に断頭屠殺

し, 脳を摘出した。摘出脳から脳表クモ膜および血管を, 0 $^{\circ}$ C ~ 2 $^{\circ}$ C に冷却した Krebs-Ringer 液中で剝離除去し, さらに 2 $^{\circ}$ C の低温室内で浮腫脳組織と, 対側健常脳組織を, 前述 5. と同様に採取した。10 匹のラットの脳より合わせて, 浮腫脳組織 1g, 健常脳組織 1g を採取した。この脳組織 1g に 0.25 mol ショ糖溶液 10ml を加えて, ポーター型テフロンホモゲナイザーを用いて, ホモゲナイズしたのち, DeVenuto⁹⁾ らの遠心分離法に従って各 fraction に分離した。

すなわち, 図 1 に示した実験操作に従って, fraction I, II, III, IV, V を分離採取し, 各 fraction における ³H-activity を, 前述 5. で行っ

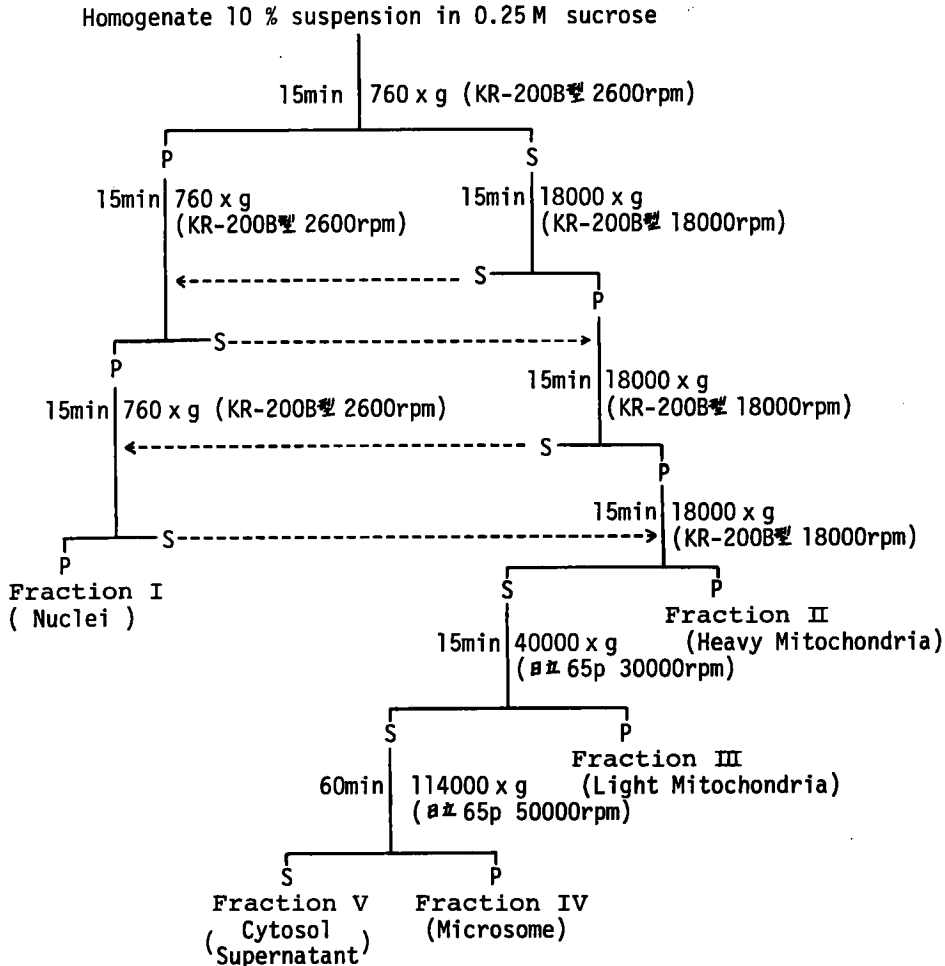


図1. ラット脳組織細胞成分の遠心分離による分画分取法。(DeVenuto, F. & Charder, G. 1966) 0.25M ショ糖溶液を用いて10%脳組織ホモジネート液を作成後、この図の方法に従って、各成分を分画分取した。

(P; Precipitate (沈査))

(S; Supernatant (上清))

たと同様な懸濁計測法にて測定した。さらに、fraction V の0.4 ml について10~30% ショ糖濃度勾配超遠心分離法を用い分析を試みた。すなわち、10~30% ショ糖濃度勾配溶液に、fraction V の0.4 ml を重畳し、2℃、 $3.0 \times 10^5 g$ にて、16時間の超遠心分離(日立65-P型遠心機)を行ったのち、ツベルクリン針にて遠心チューブの底に、小孔をあけ、各fractionを滴下分離採取し、各々の0.2 ml について、その 3H -activity を3. ii) に述べた乳化計測にて測定した。

ii) 凍結損傷脳作成20時間後のラット6匹

の各々に 3H -dexamethasone 100 μ Ci と dexamethasone 0.1 mg を含有した1% ethylalcohol 溶液0.1 ml を筋肉内注射し、2時間後に前述7. i) と同じ方法で断頭屠殺後、脳を摘出した。6匹のラット脳より合わせて、浮腫脳組織700 mg、健常脳組織700 mg を7. i) と同じ方法で採取した。この脳組織700 mg に0.25 mol ショ糖溶液7 ml を加えて、7. i) と同様に、各fraction中の 3H -activity を測定した。さらに、浮腫脳組織と健常脳組織のfractionについて、10~30% ショ糖濃度勾配超遠心分離法にて、7.

i) と同様な方法で各 fraction の ^3H -activity を測定した。

iii) 凍結損傷作成20時間後のラット7匹を使用して、浮腫脳組織と健常脳組織をそれぞれ、各々の一匹のラットより、実験方法5.と同じ方法で100mgづつ採取し、0.01 M Tris-HCl-0.0015 M Na_2EDTA 緩衝液 (Sigma Chemical Company 製) (pH 7.4) 5 ml を加え、2℃の低温室内で、ホモジネートした。ついで、2℃で2時間、 ^3H -dexamethasone $10\mu\text{Ci}$ とともに incubate した後、2℃、 $1,12 \times 10^5\text{g}$ にて60分間遠心分離 (日立65-P型遠心分離機) し、上清分画を採取した。次に、その0.4ml を前述と同様、シヨ糖濃度勾配超遠心分離法分析を行って、各 fraction の ^3H -activity を測定した。なお、血液成分については、3000 rpm、10分間遠心分離して得られた血清2.5mlに、0.01 M Tris-HCl-0.0015 M Na_2EDTA 緩衝液 (pH 7.4) を加えて5mlとし、 ^3H -dexamethasone $10\mu\text{Ci}$ と incubate したのち、その0.4ml について同様のシヨ糖濃度勾配超遠心分離法分析を行ない、各 fraction の ^3H -activity を測定^{10),12)}した。

なお、10~30%シヨ糖濃度勾配超遠心分離法分析において分子量を推定するために、gamma-Globulin (human) (Fraction 11, 平均分子量160,000) (Becton Dickinson and Company 製, CAT No. 90-0457, Lot No. Y-4024) の0.01%溶液を用い、その0.4ml について同様のシヨ糖濃度勾配超遠心分離法分析を行った後、各 fraction 0.2ml 採取し、Lowry 法によって発色させ、分光光度計 (日立製作所製, 102型日立デジタル分光光度計) にて750m μ 波長光に対する吸収係数を測定し分子量推定の示標とした。

III. 実験結果

1. 脳組織中 ^3H -dexamethasone の濃度変化
凍結損傷脳を作成したラットに、 ^3H -dexamethasone を投与し、脳組織中の dexamethasone の経時的濃度変化を、脳組織100mg中の ^3H -dexamethasone の濃度 (dpm) として測定した。結果は、表1と、図2に、各群の各時間における平均値によるグラフを示した。すなわち、筋肉内投与された ^3H -dexamethasone は、健常脳

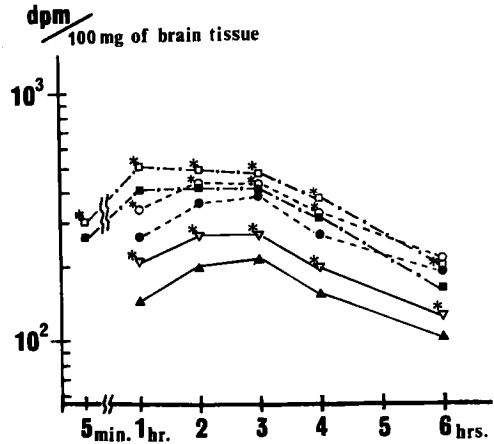


図2. 凍結損傷作成ラットの脳組織中における dexamethasone の経時的濃度変化。
縦軸 (対数表示) を脳組織 100 mg 中の ^3H -activity (dpm) とし、横軸を投与から屠殺までの時間として、表1,2,3,の平均値をもってグラフ表示した。

▽, ▲印は、I.M.A群, ○, ●印は、I.M.B群, □, ■印は、I.V.群を表わし、白印は、浮腫脳組織を、黒印は、健常側脳組織をそれぞれ表わしている。

(*印は、同一群同一時間における、病巣側と健常側の脳組織中 ^3H -activity を、t-検定により比較した結果、 $p < 0.05$ の有意差を有することを表わしている。)

組織中では、投与3時間後に、浮腫脳組織中では、投与2時間後に最高濃度となっていた。一方、静脈内投与された ^3H -dexamethasone の脳組織内濃度は、健常脳では、投与2時間後、浮腫脳では、投与1時間後に最高濃度となっていた。さらに、いずれの投与方法および投与後の時間においても、健常脳に比して、浮腫脳の ^3H -dexamethasone 濃度は高値となっていた。t-検定の結果で、浮腫脳が、健常脳に比して有意な増加 ($P < 0.05$) を示したのは、I.M.A群の1, 2, 3, 4, 6時間値, I.M.B群の1, 2, 3, 4時間値, およびI.V.群の5分, 1, 2, 3, 4, 6時間値であった。さらに、I.M.B群とI.V.群, I.M.A群の脳組織中における ^3H -dexamethasone の時間的な濃度変化はほぼ同じような推移を示したが、I.M.A群は他二群に比していずれの時間においても低値を示した。

2. 血液中 ^3H -dexamethasone の濃度変化

I.M.A 群, I.M.B 群, I.V. 群の 3 群について, 個々の実験動物の結果を図 3 にグラフ表示した.

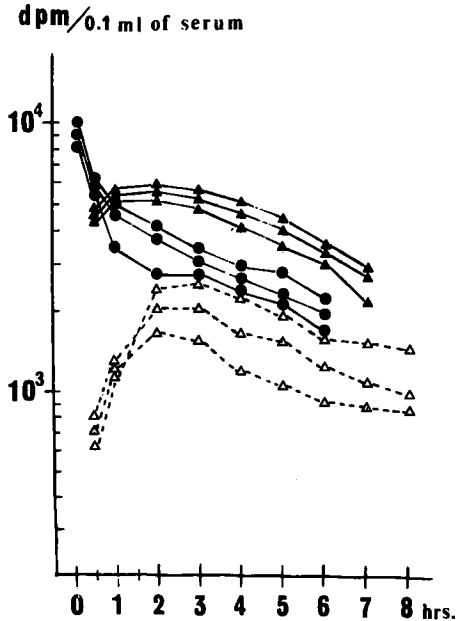


図 3. ラット血液中 dexamethasone の経時的濃度変化.
³H-dexamethasone と dexamethasone を混合投与し, 総頸動脈カテーテルより経時的に採血, 3000 rpm, 10 分間遠心分離して得た血清 0.1 ml 中の ³H-activity を計測した. 縦軸 (対数表示) は, 血清 0.1 ml 中の ³H-activity (dpm) を, 横軸は時間経過を表わしている.
 △印は, I.M.A 群, ▲印は, I.M.B 群, ●印は, I.V. 群の値を示している.

I.M.A 群, I.M.B 群の 2 群において, 最大値をとるのは, 投与 2~3 時間後であり, 投与 6 時間後においても, 両群とも最大値の 55% 前後を示した. これに比べ, I.V. 群では, 投与 5 分後に, 最大値をとり以降はほぼ双曲線状に減少し, 投与 1 時間後には, 5 分値の 47.5% に減少した. しかし, 投与後 2~6 時間では, I.V. 群の値は, I.M.A 群と I.M.B 群の中間の値を保っていた. すなわち, I.V. 群と I.M.B 群と比べた場合には, 投与 1 時間後から, 6 時間後までは, I.M.B 群の血中濃度の方が, I.V. 群のそれよりも高値を示した.

3. 脳組織内の ³H-dexamethasone 分布

³H-dexamethasone 10 μ Ci と dexamethasone 0.1mg を投与した場合には, 健常脳組織の frac-

表 2. 凍結損傷作成ラットの脳組織各細胞成分の dexamethasone 濃度

凍結損傷脳作成ラット (20 匹) の各々の一匹に, ³H-dexamethasone 10 μ Ci と dexamethasone 0.1mg を筋肉内注射した. 投与後 2 時間目に屠殺断頭し, 10 匹のラット脳から, 浮腫脳組織と健常側脳組織をそれぞれ 1 g 採取し, 図 1 の方法に従って, 各細胞分画 (fraction) を分離採取し, その ³H-activity (dpm) を測定した. 表中の \bar{M} は, 2 回の実験の平均値を表わしている. (%) は, 平均値 (各細胞分画) の全体に対する百分率を表わす.

	Lt. parietal (control)	Rt. parietal (lesion)
Fraction I	284.3 dpm 290.6 ----- \bar{M} - 287.5 (8.9%)	307.5 dpm 358.5 ----- \bar{M} - 333.0 (8.0%)
Fraction II	742.6 dpm 782.7 ----- \bar{M} - 762.7 (23.7%)	1296.0 dpm 954.5 ----- \bar{M} - 1125.0 (27.1%)
Fraction III	20.6 dpm 21.7 ----- \bar{M} - 21.2 (0.7%)	13.4 dpm 15.1 ----- \bar{M} - 14.3 (0.3%)
Fraction IV	39.3 dpm 43.2 ----- \bar{M} - 41.3 (1.3%)	176.3 dpm 146.3 ----- \bar{M} - 161.3 (3.9%)
Fraction V	2095.8 dpm 2121.8 ----- \bar{M} - 2108.8 (65.5%)	2330.9 dpm 2695.9 ----- \bar{M} - 2513.4 (60.6%)
Total	3182.6 dpm 3260.1 ----- \bar{M} - 3221.5	4124.1 dpm 4169.8 ----- \bar{M} - 4147.0

tion I 284.3, 290.6 (dpm) (\bar{M} = 287.5 (dpm)) (8.9%) (全体に対する百分率), fraction II 742.6, 782.7 (\bar{M} = 762.7) (23.7%), fraction III 20.6, 21.7 (\bar{M} = 21.2) (0.7%), fraction IV 39.3, 43.2 (\bar{M} = 41.3) (1.3%), fraction V 2095.8, 2121.8 (\bar{M} = 2108.8) (65.5%) となっているのに対して, 浮腫脳組織の fraction I 307.5, 358.5 (\bar{M} = 333.0) (8.0%), fraction

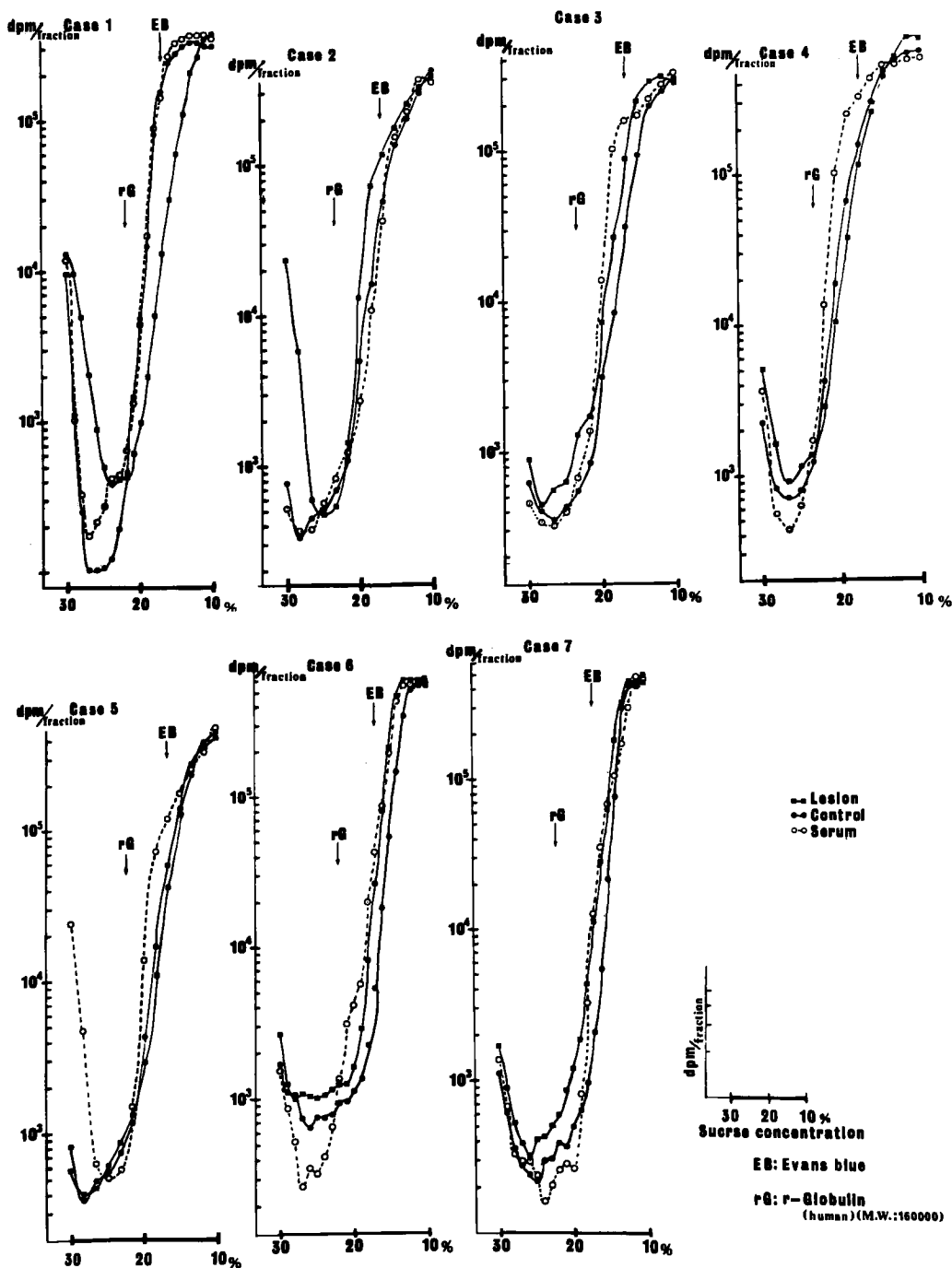


図4. 10-30%シヨ糖濃度勾配超遠心分離法分析による、凍結損傷脳組織上清分画 (fraction V, 可溶性分画) における³H-dexamethasoneの分布状態。

凍結損傷脳作成ラット7匹を用い、損傷作成20時間後に、脳組織(100mg)を採取し、In vitroで、2℃、2時間、³H-dexamethasone 10 μ Ciとincubateした後、シヨ糖濃度勾配超遠心分離法分析を行った。縦軸は、各fractionの³H-activity (dpm)を、横軸はシヨ糖濃度を表わしている。グラフ中の“rG”は、分子量推定のために用いたgamma-Globulin (分子量、160,000)の存在部位を示している。

表3. 凍結損傷脳作成ラットの脳組織細胞成分の dexamethasone 濃度

凍結損傷脳作成ラット(6匹)の各々の一匹に ^3H -dexamethasone $100\mu\text{Ci}$ と dexamethasone 0.1mg を筋肉内注射した。投与後2時間後に屠殺断頭し、6匹のラット脳から、浮腫脳組織と健常脳組織をそれぞれ700mg採取した。次に、図1の方法に従って、各細胞分画(fraction)を分離採取し、その ^3H -activity (dpm) を計測した。(%)は、全体に対する百分率を示す。

	Lt. parietal (control)	Rt. parietal (lesion)
Fraction I	552.2 dpm (4.5%)	1429.5 dpm (8.0%)
Fraction II	1704.5 dpm (13.8%)	2113.8 dpm (11.8%)
Fraction III	71.1 dpm (0.6%)	294.8 dpm (1.6%)
Fraction IV	44.2 dpm (0.4%)	59.9 dpm (0.3%)
Fraction V	9986.9 dpm (80.8%)	14089.3 dpm (78.3%)
Total	12358.9 dpm	17987.3 dpm

II 1296.0, 954.0 ($\bar{M}=1125.0$) (27.1%), fraction III 13.4, 15.1 ($\bar{M}=14.3$) (0.3%), fraction IV 176.3, 146.3 ($\bar{M}=161.3$) (3.9%), fraction V 2330.9, 2695.9 ($M=2513.4$) (60.6%)となっていた(表2)。また、 ^3H -dexamethasone $100\mu\text{Ci}$ と dexamethasone 0.1mg を投与した場合には、健常脳組織の fraction I 552.2 (4.5%), fraction II 1704.5 (13.8%), fraction III 71.1 (0.6%), fraction IV 44.2 (0.4%), fraction V 9986.9 (80.8%)となっていたが、浮腫脳組織の fraction I 1429.5 (8.0%), fraction II 2113.8 (11.8%), fraction III 294.8 (1.6%), fraction IV 59.9 (0.3%), fraction V 14089.3 (78.3%)となっていた(表3)。さらに、fraction V のショ糖濃度勾配超遠心分離法分析の結果では、 ^3H -dexamethasone $10\mu\text{Ci}$ と dexamethasone 0.1mg 投与および ^3H -dexamethasone $100\mu\text{Ci}$ と dexamethasone 0.1mg 投与のいずれにおいても、各 fraction の ^3H -activity は 10 dpm 位となり、信頼し得る data とはなり得なかった。そこで、

脳組織100mg のホモジネート液に ^3H -dexamethasone $10\mu\text{Ci}$ を 2°C 、2時間インキュベートした後、その上清分画について10~30%ショ糖濃度勾配超遠心分離法分析を行った結果は、図4に示す如くであった。この図の pattern より、ショ糖濃度の高い部位において、7例中6例に浮腫脳組織の上清が、健常脳組織上清分画よりも高い radioactivity を示した。

IV: 考 按

脳神経外科領域の疾患に必ずといってよいほどよく随伴する脳浮腫の予防と治療には、以前より glucocorticoid 剤がよく用いられていることは衆知のことである。この頭蓋内疾患に対する glucocorticoid 剤療法は、Adson が、トルコ鞍部、鞍上部の病巣手術後にみられた pituitary asthenia の状態に副腎皮質抽出物を投与し有効であったと1904年に米国の脳神経外科学会で発表したのに端を発する¹³⁾。続いて、1945年、Prados¹⁴⁾らは実験的脳浮腫に対する副腎皮質抽出物の作用について報告した。その後、多数の臨床報告がみられるが、Russek¹⁵⁾、Roberts¹⁶⁾らは脳卒中患者に cortisone を投与し、患者の大半に不全麻痺の改善をみたといひ、Kofman¹⁷⁾は乳癌の脳内転移患者に、prednisolone を用い、一時的な症状軽快を15例中14例に認めたといふ。さらに、Galicich¹⁸⁾は、glioma の再発例に dexamethasone を、Säker¹⁹⁾は、脳腫瘍患者に prednisolone を、Gardjian²⁰⁾らは、重症頭部外傷患者に cortisone, prednisolone を投与し、いずれも有効であったと報告したが、1962年 Rasmussen¹³⁾らが、側頭葉切除術の術前後に、glucocorticoid 剤を大量に使用して好成績を得たことから、脳浮腫に対する本剤の有効性が広く認められるようになった。現在では、脳浮腫の治療に際し、わが国では主として prednisolone が、欧米では主として dexamethasone が用いられているが、これら glucocorticoid 剤の脳浮腫に対する作用機序はいまだ明らかにされていないし、glucocorticoid 剤の種類別による効果発現の差についても詳細に検討を加えた報告は少ない^{6), 21)}。したがって科学的根拠に基づいた最も有効な使用量、投与

方法もいまだ不明である。

ただこれまで、臨床上での経験と glucocorticoid 剤の血液中における half-life が、140～370 分であるということから有効血中濃度を維持するためには 6 時間毎に投与することが好ましいと考えられてきた^{22),23)}。このような現状で最近、glucocorticoid 剤を大量投与したのちに本剤の血液や髄液中における濃度変化を経時的に調べ、その投与量と投与方法について再検討しようとする試みがはじまった^{1),2)}。

しかし、直接脳組織中の glucocorticoid 剤の経時的濃度変化について検討を加えた報告は数少ない^{3),4)}。

そこで、今回実験的に脳浮腫を作成し、この浮腫脳組織中の glucocorticoid 剤の経時的濃度変化を、血液中の濃度変化と合せ検索し、glucocorticoid 剤の投与量、投与方法に関する一指標を得んと試みた。

まず、実験的に脳浮腫を作成する方法としては、種々の報告があるが、ここでは、常に一定した脳浮腫を再現性よく容易に作成することが可能である凍結損傷による脳浮腫、いわゆる cold induced edema^{24),25)} を実験モデルとして採用した。この cold induced edema は、外傷性脳浮腫の prototype であるとも考えられており、その性状に関しても多数の報告がある。

脳浮腫の実験動物として今回用いたラットなどの齧歯類の脳は不適當であるという意見がある^{26),27)}。しかし一方では、これら脳の微細血管の構築および機能が、ヒトのそれに似ているという意見や²⁷⁾、又実際にラットの脳に作成した凍結損傷脳で、水分量の増加がみられ、さらには、glucocorticoid 剤を投与するとその水分量の減少がみられるという^{5),6),21)}報告がみられることから今回の実験ではラットを用いた。さらにラットは小動物であるために、容易に多数のものを処理出来るという利点がある。

つぎに、凍結損傷作成 20 時間後に、glucocorticoid 剤を投与したのは、臨床例では、すでに脳浮腫が進行しはじめた段階か、あるいは脳浮腫が完成した時点で、本剤を投与することが多いということに加えて、凍結損傷作成初期の外傷性出血ともなって流出した glucocorticoid

剤により、見かけ上、浮腫脳組織内の glucocorticoid 剤が高濃度になる可能性があるため、この影響を排除せんと考えたからである。

Glucocorticoid 剤として、今回 dexamethasone をとりあげたのは、実験的ならびに臨床的に比較的よく使用されていることと、non-labelled の dexamethasone とともに ³H-labelled dexamethasone が簡単に安価で入手出来たからである。

Dexamethasone の投与量としては、Galicich¹⁸⁾、米増²⁸⁾らの報告の 1 日量 0.5mg/Kg を参考とし、ラットの体重を 200±10g として計算した結果、今回は、dexamethasone 0.1mg にトレーサーとしての ³H-dexamethasone 10 μ Ci を加えた量を用いることとした。この際、用いた ³H-dexamethasone の ³H が、生体内において分離しているのではないかということに関しては、投与 2 時間、6 時間後の血清中 dexamethasone、³H-dexamethasone を描出し、薄層クロマトグラフィで展開後、dexamethasone 分画の ³H-activity と他の分画の ³H-activity を測定したところ、80～90%の ³H-activity が、dexamethasone 分画に存在することを予備実験において確認した。さらに本実験において、I.M.B 群の投与量を I.V. 群、I.M.A 群の投与量の 2 倍にしたのは、同量投与した I.V. 群の脳組織内濃度が、I.M.A 群の約 2 倍となっていたため、筋肉内投与で、I.V. 群と同程度に組織内濃度を得ようとして行った。又、細胞分画中の ³H-dexamethasone 濃度測定の際に、³H-dexamethasone 10 μ Ci と 100 μ Ci とにしたのは、上清分画のショ糖濃度勾配分離法において、各 fraction の ³H-activity が 10 dpm 程度となったために、信頼しうる data とはならなかったため、この濃度を 1 桁上昇させる目的で、³H-dexamethasone を 100 μ Ci 投与してみた。

さて、本実験で得られた脳組織内の ³H-dexamethasone の経時的濃度変化と、血液中濃度変化とを合せ考えると、I.V. 群では、血液中濃度は、投与後 5 分で最高値をとり、1 時間後には、その約半分まで減少しているのに反し、脳組織内濃度は、投与 1 時間後に、最高となり、その後、3 時間までは、ほぼ同じ濃度を保ち、6

時間後には、1時間値の半量以下に減少していた。しかし、血液中濃度も最高値に比べれば50%にまで減少してはいるが、投与後2~6時間にわたり、次の筋注群の場合と大差ない値を示していた。

一方、I.M.A および I.M.B 群では、血液中濃度は、投与2~3時間後に最高値を示し、以降漸減し6時間後においても、最高値の50%以上の値を示したが、脳組織内濃度は、投与2および3時間後には、ほぼ同様な値で最高値を示したが、6時間後では、最高値の50%程度にまで減少していた。

このような、血清中濃度と、脳組織内濃度に関連して、Peterson²⁹⁾は、ラットに radioactive cortisol を投与した場合について、その radioactive cortisol の脳組織内量は、血清 cortisol の上昇値に比例して増加するものであると報告したが、Walker³⁰⁾らは、³H-cortisol をネコに静脈内投与した場合、投与直後では血中の³H-cortisol が非常に高濃度であるのに、脳組織中濃度は低く、血中³H-cortisol の減少と反比例して脳組織中の濃度が漸次増加したと述べている。さらに、Fishman³¹⁾らも、静脈内投与後、髄液中濃度を経時的にモニターしたところ、静注後60分で髄液中濃度は最高値に達したと報告している。

したがって、著者の実験にもみられるように、静脈内投与した場合、glucocorticoid の脳組織内濃度は、血液中の glucocorticoid 濃度が最高値に達した時点よりも、1時間ないし2時間程度遅れて最高値を示すものと考えてよからう。また、I.V. 群と、I.M.B 群の血液中および脳組織中の³H-activity を比較すると、dexamethasone 投与2~3時間後の時点では、I.M.B 群の方が、I.V. 群よりも、高い血液中濃度を示しているにもかかわらず、脳組織内濃度では、I.V. 群の方が、より高い値を示しており、Peterson²⁹⁾らが、指摘したように血液中の濃度に比例して脳組織内濃度が単に上昇するというのではなく、むしろ血液中濃度の最高値に従って、脳組織内濃度も影響をうけるものと思われた。

さらに、 $\frac{(\text{脳組織 } 100\text{mg 中の } ^3\text{H-activity})}{(\text{血液 } 0.1\text{ml 中の } ^3\text{H-activity})}$ を

求め、比較してみると、dexamethasone 投与2時間から4時間後の時点では、I.V. 群では、健常側0.107~0.117、浮腫側0.128~0.136、I.M.A および I.M.B 群では、健常側0.061~0.090、浮腫側0.075~0.113となり、これにても、血中濃度に対する脳組織内濃度の割合が、I.V. 群において高いという結果が得られた。

ここで、脳組織内濃度を少しでも高めようとする観点に立つならば、静脈内投与の方が有利であり、静脈内投与と同じ程度の脳組織内濃度を筋肉内投与においても維持しようとするならば、静脈内投与量の2倍量を必要とするのであろうことが推論されよう。

つぎに、脳組織内濃度について、健常側と浮腫側について、比較検討してみると、3群のいずれの投与方法においても、浮腫側が、健常側に比べて、高濃度であることが示された。病的脳組織中に、外因性 glucocorticoid 剤が、増加していることは、Schwartz³⁾、Yamaguchi⁴⁾らも、すでに報告しているが、両者の報告では、病巣脳組織では健常脳組織に比べて2倍近い濃度であったと報告しているのに対して、本実験結果では、I.M.A 群1.22~1.50倍、I.M.B 1.12~1.24倍、I.V. 群1.14~1.25倍であった。Schwartz³⁾らは、腫瘍細胞移植により脳浮腫を作成し、トレーサー量のみの³H-hydrocortisone を投与して、autoradiography 上での黒化度から比較を行っているが、Yamaguchi⁴⁾らは、硬膜外圧迫法による脳浮腫において、やはりトレーサー量のみの³H-methylprednisolone を投与し、液体シンチレーション計測法による、³H-activity を比較している。これに対し、本実験では、凍結損傷による脳浮腫を作成し、³H-dexamethasone をトレーサーとして、無標識 dexamethasone の常用量に混じて投与しており、さらに、glucocorticoid の投与後の測定の時にしては Schwartz³⁾、Yamaguchi⁴⁾らの報告では、いずれも投与後1時間以内の時点における1回~3回の測定によるものである。すなわち、脳浮腫の実験モデル、用いた glucocorticoid の種類・量・測定方法などの違いにより実験結果に差を生じたものと思われる。なかでも、McEwen³²⁾らは、無標識 glucocorticoid 剤の存在により、

標識 glucocorticoid 剤の取り込みが、制限されることを報告しており、本実験の浮腫脳組織³H-activity の、健常脳組織³H-activity に対する比が、Schwartz³⁾、Yamaguchi⁴⁾、らの比より低値を示した理由の一つとして、無標識 glucocorticoid 剤の混在が影響していると考えられる。

さて、投与された dexamethasone が、健常側脳組織に比して、浮腫脳組織で増加していることは、本実験でも明らかになった。しかし、次にこれら増加した dexamethasone が、脳組織内において、はたしてどのように分布しているのが問題となる。すなわち脳浮腫組織では、細胞外液腔が拡大し²⁴⁾、血液脳関門が損傷されているため、もし dexamethasone が、細胞外液腔にのみ存在しているのでは意味がなくなるからである。そこで、DeVenuto⁹⁾ らの行った遠心分離法に従って、脳組織をホモゲナイズしたものを 5 つの分画に分離し、³H-dexamethasone の分布状態を検索した。その結果は、表 2・3 に示すような結果となり、fraction V すなわち上清分画に、大半の³H-activity が存在していることが示された。

ここで、上清分画に多くの³H-activity が存在する理由として、Bottoms³³⁾らは、細胞レベルにおいて、上清分画の占める容積率が、細胞核、ミトコンドリア、ミクロゾームなどのそれに比して、かなり大きいためであることを指摘している。しかし、ここで前述した、浮腫脳組織において、健常脳組織よりも、³H-activity の高い原因として、単に脳浮腫により拡大した細胞外液腔のみに存在するものであるとするならば、Bottoms³³⁾らの説に従えば、浮腫脳では、上清分画の容積率が拡大していることから、浮腫脳組織の fraction V における³H-activity の全体に対する割合が、健常脳組織のそれに比してより大きくならなければならないはずである。ところが、本実験の結果では、実験結果 3) に示したように、³H-dexamethasone 10 μ Ci 投与では、健常脳組織の fraction V の全体に対する割合は、65.5%、浮腫脳組織では、60.6%となっており、さらに³H-dexamethasone 100 μ Ci 投与でも、健常脳組織 fraction V は 80.8%、浮腫脳組織 78.3%となっていた。

このことは、浮腫脳組織中に増加した dexamethasone は、単に拡大した細胞外液腔にのみ、漏出増加しているのではないことを示唆しているものと考えてよからう。

さらに、fraction V (上清分画) 内の成分と、³H-dexamethasone が如何なる関係で存在しているのかを知る目的で、濃度勾配超遠心分離法分析^{10), 11), 12)}を行った。

すなわち、fraction V について 10~30% ショ糖濃度勾配における超遠心分離法を行ったところ、³H-dexamethasone を 10 μ Ci と 100 μ Ci のいずれを投与した場合にも ショ糖濃度勾配超遠心分離後の各 fraction の³H-activity は、background 程度となってしまう結論を導き出すことはできなかった。

そこで、方法を変えて In vitro の状態で、³H-dexamethasone と浮腫脳組織および健常脳組織の上清分画とを一定時間 incubate し、同様の実験を行ってみた。その結果は、図 4 に示すごとくであり、20~30% の比較的 ショ糖濃度の高い fraction において、浮腫脳の方が、健常脳よりも、やや高い³H-activity を示す結果をえた。このことは、浮腫脳組織中の上清分画の高分子物質と、³H-dexamethasone が、共存していることを示唆する所見と考えられたが、この分画に存在する高分子物質が、脳浮腫という病的状態下で、どこから生じたものかは、全く不明である。さらに、このような In vitro の結果をもって、そのまますぐに、In vivo の現象を説明しようとするのは、飛躍しすぎる恐れもあるが、浮腫脳組織において高分子物質と、dexamethasone が結合して存在している可能性を示唆するこの結果は大変興味深いものである。

いずれにしろ、dexamethasone が浮腫脳組織中により高濃度に存在しているという事実と、dexamethasone 投与により浮腫脳組織の水分量が減少したり⁶⁾、浮腫脳組織の酵素活性にも好影響を与え³⁴⁾、血管壁の透過性の亢進をも抑制³⁵⁾する。また、形態学的に、浮腫の拡がりを抑制³⁶⁾するという報告などから、考えると、この dexamethasone の浮腫脳組織における増加ということは、抗脳浮腫作用発現に関係した現象として意義あるものといえよう。

しかし、脳組織中にかほどの dexamethasone が、存在すれば、抗脳浮腫作用を発現し、どの程度の濃度に達すれば、最大の抗脳浮腫作用を発揮するのであろうかなどといった問題に関しては今後さらに検討されねばならない。

V : 結 論

実験的に脳浮腫を作成し、浮腫脳組織中の dexamethasone の濃度変化を経時的に検討した結果、浮腫脳組織では、対側健常脳組織よりも dexamethasone の濃度が、投与 6 時間後までは高いことが示された。

また、同一量の投与では、静脈内投与群の方が、筋肉内注入群よりもはるかに高い脳組織内濃度を示したことから脳組織内濃度を高めるためには、静脈内投与も一考すべきことが示唆された。

さらに、脳組織中における dexamethasone

の分布としては、その大部分が、上清分画に存在することが判明したが、浮腫脳組織では単なる細胞外液腔のみに増加したのではなく、高分子物質と共存している可能性が示唆された。このことは抗脳浮腫作用を有する dexamethasone の作用発現機序に関して何らかの意味をもつことであるかもしれない、今後さらに詳細な検討が必要とされるであろう。

稿を終るに臨み、御指導、御校閲を賜った恩師西本詮教授、本研究に終始御指導と御助言をいただいた当教室の松本皓先生、石光宏先生ならびに、御協力いただいた有光哲雄、植田清隆両先生に心から感謝いたします。

本論文の一部は、第18回日本神経学会総会において発表した。

参 考 文 献

1. 森信太郎, 吉本尚規, 松村茂太郎, 日比野弘道, 石川 進, 魚住 徹, 西 啓子, 宮井 潔, 熊原雄一, 松本圭史: Glucocorticoid 髄液内濃度に関する臨床的研究. 脳研究会会誌, 2, 114—115, 1976.
2. 柳橋萬之, 平川公義, 三井香児, 佐野圭司, 宮地幸隆, 四元秀隆, 大沢仲昭, 早川 勲: Radioimmunoassay による prednisolone 大量投与時の血液・髄液中濃度. 第17回日本神経学会総会(東京), 1976.
3. Schwartz, M.L., Tator, C.H. and Hoffman, H.J.: The uptake of hydrocortisone in mouse brain and ependimoblastoma. *J. Neurosurg.* 36, 178—183, 1972.
4. Yamaguchi, H., Shirakawa, S., Taomoto, K. and Matsumoto, S.: Steroid treatment of brain edema. *Surg. Neurol.* 4, 5—8, 1975.
5. 石光 宏: 実験的脳浮腫に関する研究. 第1編. Tritiated water ($^3\text{H}_2\text{O}$)による脳組織水分含有量の測定. 岡山医学会雑誌, 91, 805—817, 1979.
6. 石光 宏: 実験的脳浮腫に関する研究. 第2編. 各種 glucocorticoid 剤の脳浮腫抑制効果. 岡山医学会雑誌, 91, 819—829, 1979.
7. Popovic, V., Kent, K.M. and Popovic, P.: Technique of permanent cannulation of the right ventricle in rats and ground squirrels. *Proc. Exp. Biol. Med.* 113, 599—602, 1963.
8. Popovic, V.P. and Berger, R.: Semi-chronic implantation of large cannulas in the aorta and right ventricle of white rats. *Angiologica*, 5, 8—13, 1968.
9. DeVenuto, F. and Chader, G.: Interaction between cortisol or corticosterone and fractions of rat thymus, brain and heart cell. *Biochim. Biophys. Acta.* 121, 151—158, 1966.
10. 滝川漢男: ステロイドホルモンの結合蛋白について. 最新医学, 25, 2408—2418, 1970.
11. McEwen, B.S., Magnus, C. and Wallach, G.: Soluble corticosterone-binding macromolecules extracted from rat brain. *Endocrinology* 90, 217—226, 1972.

12. Giannopoulos, G., Hassan, Z. and Solomon, S.: Glucocorticoid receptors in fetal and adult rabbit tissues. *J. Biol. Chem.* **249**, 2424—2427, 1974.
13. Rasmussen, T. and Gulati, D.R.: Cortisone in the treatment of post-operative cerebral edema. *J. Neurosurg.* **19**, 535—544, 1962.
14. Prados, M., Strowger, B.M.A. and Feindel, W.H.M.: Studies on cerebral edema. I. Reaction of the brain to air exposure; Pathologic changes. *Arch. Neurol. Psychiatr.* **54**, 163—174, 1945.
15. Russek, H.I., Russek, A.S. and Zohman, B.L.: Cortisone in immediate therapy of apoplectic stroke. *J. Am. Med. Assoc. (J.A.M.A.)*. **159**, 102—105, 1955.
16. Roberts, H.J.: Supportive adrenocortical steroid therapy in acute and subacute cerebrovascular accidents with particular reference to brain-stem involvement. *J. Am. Geriatr. Soc.* **6**, 686—702, 1958.
17. Kofman, S., Garvin, J.S., Nagamani, D. and Taylor, S.G.: Treatment of cerebral metastasis from breast carcinoma with prednisolone. *J. Am. Med. Assoc. (J.A.M.A.)*. **163**, 1473—1476, 1957.
18. Galicich, J.H., French, L.A. and Melby, J.C.: Use of dexamethasone in treatment of cerebral edema associated with brain tumors. *Lancet*. **81**, 46—53, 1961.
19. Säker, G. and Rust, W.: Über die Prednisolonanwendung bei Hirntumoren. *Nervenarzt*. **30**, 369—370, 1959.
20. Gardjian, E.S. and Webster, J.E.: *Head Injuries. Mechanisms, Diagnosis and management*. Little Brown and Co., Boston, p. 482, 1958.
21. 石光 宏, 秋岡達郎, 有光哲雄, 池田幸明, 岡尾昭二郎, 山田 修, 松本圭蔵, 西本 詮: Glucocorticoids の脳浮腫抑制効果に関する実験的検討. 第33回日本脳神経外科学会総会(仙台), 1974.
22. 石井昌三, 渡辺 博: 脳浮腫とステロイド. *神経内科*. **5**, 219—225, 1976.
23. Withrow, C.D. and Woodburg, D.M.: Some aspects of the pharmacology of adrenal steroids and central nervous system. In *Steroids and Brain Edema*, ed. Reulen, H.J. and Schürmann, K., Springer-Verlag, Berlin, pp. 41—55, 1972.
24. Bakay, L. and Haque, I.U.: Morphological and chemical studies in cerebral edema. I. Cold induced edema. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **23**, 393—418, 1964.
25. Klatzo, I., Piraux, A. and Laskowski, E.J.: The relationship between edema, blood-brain barrier and tissue elements in a local brain injury. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **17**, 548—564, 1958.
26. Long, D.M., Hartmann, J.F. and French, L.A.: The response of experimental cerebral edema to glucosteroid administration. *J. Neurosurg.* **24**, 843—854, 1965.
27. Nelson, S.R.: Effect of drugs on experimental brain edema in mice. *J. Neurosurg.* **41**, 193—199, 1974.
28. 米増祐吉: 薬物療法の適応と副作用. *災害医学*. **16**, 221—228, 1973.
29. Peterson, N.A. and Chaikoff, I.L.: Uptake of intravenously injected ($4\text{-}^{14}\text{C}$) cortisol by adult rat brain. *J. Neurochem.* **10**, 17—23, 1963.
30. Walker, M.D., Henkin, R.I., Harlan, A.B. and Casper, A.G.J.: Distribution of tritiated cortisol in blood, brain, CSF and other tissues of the cat. *Endocrinology*. **88**, 224—232, 1971.
31. Fishman, R.A. and Christy, N.P.: Fate of adrenal cortical steroids following intrathecal injection. *Neurology*, **15**, 1—6, 1965.
32. McEwen, B.S., Weiss, J.M. and Schwartz, L.S.: Retention of corticosterone by cell nuclei from brain regions of adrenalectomized rats. *Brain Res.* **17**, 471—482, 1970.
33. Bottoms, G. and Goetsch, D.D.: Subcellular distribution of the (^3H) corticosterone fraction in brain, thymus, heart and liver of the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol.* **124**, 662—665, 1967.

34. Bingham, W.G., Paul, S.E. and Sastry Suryanarayana, K.S.: Effect of steroid on enzyme response to cold injury in rat brain. *Neurology*. 21, 111—121, 1971.
35. Long, D.M., Maxwell, R.E. and French, L.A.: The effect of glucocorticoids upon experimental brain edema. In *Steroids and Brain Edema*, ed. Reulen, H.J. and Schürmann, K., Springer-Verlag, Berlin, pp. 65—76, 1972.
36. Long, D.M., Maxwell, R.E. and French, L.A.: The effects of glucosteroids upon cold induced brain edema. II. Ultrastructural evaluation. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 30, 680—697, 1971.

Effects of dexamethasone on brain edema—Uptake and distribution of tritiated (^3H) dexamethasone in cold induced edema—.

Motohisa TAKEMOTO

Department of Neurological Surgery, Okayama University,
Medical School, Okayama.

(Director: Prof. A. Nishimoto)

Dexamethasone has been used for prevention of cerebral edema, however its most suitable way of administration has not been fully clarified yet. Experimental cerebral edema was produced on the right parietal lobe of Wistar male rats with a cold metal probe cooled by liquid nitrogen. Twenty hour later, ^3H -dexamethasone was either intramuscularly or intravenously injected into rats in three different ways, classified as Group I.M.A, Group I.M.B and Group I.V.. Then, ^3H -dexamethasone was estimated in the brain tissue by the liquid scintillation counting method.

In Group I.M.A, dexamethasone 0.5 mg/kg B.W., containing ^3H -dexamethasone 100 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ of dexamethasone, was intramuscularly injected into 25 rats. Then, 5 rats were sacrificed 1,2,3,4 and 6 hours later. Subsequently a portion of edematous brain was obtained from the right parietal lobe. Simultaneously the left parietal lobe was sampled as a control. In Group I.M.B, a dose of dexamethasone injected was 1.0 mg/kg B.W.. Otherwise, the procedure was exactly the same as in Group I.M.A.. In Group I.V., dexamethasone 0.5 mg/kg B.W. was intravenously, not intramuscularly, injected into 30 rats. Then 5 rats were sacrificed 5 minutes, 1,2,3,4 and 6 hours later.

Edematous brain generally contained much higher ^3H -activity than the control. Furthermore, I.V. injection (Group I.V.) showed higher ^3H -activity than I.M. injection (both Group I.M.A and Group I.M.B) in both edematous and control brains at all times. Therefore, intravenous administration is apparently better than I.M. administration for maintaining high levels of dexamethasone in brain tissue.

For examination of the subcellular distribution of ^3H -dexamethasone in edematous brain, 20 rats were sacrificed 2 hours following intramuscular injection. Homogenates of the edematous portion and control portion were separately prepared. The subcellular fraction in each homogenate was separated by differential centrifugation and equilibrium fraction method. As a result, ^3H -dexamethasone was most strongly detected in the supernatant fraction (63%), followed by the heavy mitochondrial fraction (25.4%) and the nuclear fraction (8.4%). Although edematous brain tissue constantly demonstrated higher ^3H -activity than the control, its supernatant fraction conversely had less activity. Therefore high concentrations of ^3H -dexamethasone in the edematous brain is most likely due to its high accumulation in both the mitochondrial fraction and nuclear fraction rather than in the cytoplasm and intracellular space of the supernatant fraction. As a next step, distribution of ^3H -dexamethasone in the supernatant fraction was studied. Fourteen brain homogenates were similarly prepared from 7 rats and were incubated with 10 μCi of ^3H -dexamethasone for 2 hours at 2°C . Each homogenate was separately centrifuged for 60 minutes at $1.12 \times 10^5 \text{ g}$ at 2°C . Then, aliquots of each sample were gently layered on 4.6 ml linear gradients of 10 to 30 % sucrose solution and centrifuged for 16 hours at $3.0 \times 10^5 \text{ g}$ at 2°C . Following centrifugation, about 20 fractions were identified in each sample and the ^3H -activity was counted in each. The result was that the

high molecular weight fraction in the edematous brain showed higher radioactivity than the control in 6 out of 7 rats.

From these findings, unequivocal distribution of dexamethasone in the supernatant fraction of edematous brain tissue could be correlated with its biochemical action for preventing brain edema.