

平成 30 年 10 月 22 日現在

機関番号：24701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07134

研究課題名(和文) アセトアミノフェン中毒におけるケモカインの病態生理学的解析と法医診断学への応用

研究課題名(英文) Pathophysiological analysis of chemokines in acetaminophen-induced liver injury

研究代表者

山本 寛記 (Yamamoto, Hiroki)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：30781265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：野生型にAPAPを投与し、肝臓で種々のケモカインのmRNAを定量したところ、CCL3で増加が見られた。そこでAPAP肝障害におけるCCL3の役割を明らかにするためCCL3とその受容体であるCCR1、CCR5それぞれの遺伝子欠損(KO)マウスを用いてAPAP肝障害モデルで検討を行ったところ、野生型と比較してCCL3 KOおよびCCR5 KOで肝障害の軽減と白血球浸潤の抑制が見られたが、CCR1 KOでは野生型と差は見られなかった。またマクロファージ、T細胞、NK細胞でCCR5の発現が確認された。APAP肝障害におけるCCL3-CCR5の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In wild type mice, administration of APAP increased intrahepatic expression of chemokines. Despite expression of almost chemokines decreased in 24 h after being increased in 10 h, only CCL3 expression increased up to 24 h. So, we focused on CCL3 and its receptor CCR1, CCR5 in APAP induced liver injury. In histopathological and biochemical analysis, liver injury was relieved in CCL3 deficient and CCR5 deficient mice compared with wild type, however in CCR1 deficient mice, there was no significance in wild type. Also, infiltrate of leucocyte was suppressed in CCL3 deficient and CCR5 deficient mice compared with wild type, but CCR1 deficient has no difference with wild type mice. Further, CCR5 was confirmed to express on the surface of inflammatory cells, such as macrophages, T cells, and NK cells. We suggested the relation of CCL3-CCR5 axis to APAP induced liver injury.

研究分野：法医学

キーワード：アセトアミノフェン ケモカイン 肝障害 法医学

## 1. 研究開始当初の背景

法医学は法医病理学、法医中毒学および法医血清遺伝学を3本柱とする応用医学の一つであり、その学問的特性から臨床医学と同様、最先端の知見が応用されなければならない。法医実務において、正確な死因診断が最も重要な課題であることは言うまでもない。実際、多量の薬毒物を服用したことによる薬毒物中毒死事例にもしばしば遭遇するが、これまで法医中毒学領域においては、採取された血液等の生物学的試料に含有される薬毒物は機器を用いて化学的に検出すること、すなわち分析学の確立に主体が置かれてきており、その結果、多くの薬毒物の検出が可能となり、法医実務に大きく貢献している。しかしながら、検出された薬毒物の血中濃度が、これまでの致死薬物濃度以下であるにも関わらず死亡に至る事例をしばしば経験する。そのような事例では、個人における薬毒物の感受性の違い、特に薬毒物による臓器障害について病態生理学的検討が必要であるものの、そのような研究は国内・国外を通じて非常に少ないのが現状である。

## 2. 研究の目的

解熱鎮痛剤として汎用されているアセトアミノフェン (APAP) は、容易に入手することから、自殺例に加えて偶発的な中毒事故についても問題となっている。現在法医実務で主体とされている化学分析では、致死薬物濃度以下であるにも関わらず、死亡の主たる原因となることもしばしば見受けられる。APAP が肝臓特異的に障害を起こすことは古くから知られている。また、肝臓間質には、マクロファージの一種であるクッパー細胞が存在していることも周知である。これまで当教室における検討結果から、APAP 肝障害においてマクロファージ (クッパー細胞) が密接に関係していることを明らかにしてきた。本研究ではケモカインの中でもマクロファージ関連ケモカインである CC chemokine ligand 3 (CCL3) とそのレセプターである CC chemokine receptor 1 (CCR1) 及び CCR5 に着目し、マウスを用いた実験により APAP 肝障害における CCL3, CCR1, CCR5 の発現態様、マクロファージ (クッパー細胞) の動態、APAP 代謝動態、炎症性サイトカインの発現動態との関連性を解析し、APAP 毒性に対するケモカインの影響を検討した。

## 3. 研究の方法

(1) APAP 投与後の肝臓における、ケモカインとそのレセプター (CCL3, CCL4, CCL5, CCR5) の発現量推移の検討

野生型マウスに APAP 投与後、経時的に採取した肝臓組織により total RNA を抽出し、逆転写反応を行い、cDNA を合成。それぞれのケモカインに特異的なプライマーを用い

て real time RT PCR を行い、各 mRNA を定量した。

## (2) 血清肝逸脱酵素の測定

実験動物として CCL3, CCR1, CCR5 遺伝子欠損マウス及びコントロールとして野生型 (C57BL/6) マウスを用いた。

APAP 中毒モデルの作成は、野生型、各遺伝子欠損マウスそれぞれで、8 週齢の雄に APAP を 600mg/kg 腹腔内投与し、肝障害を惹起させることで作成した。

APAP 投与後経時的 (2, 6, 10, 24 時間) に各マウスから採取した血液の一部を血清分離し、血清肝逸脱酵素 (ALT) の測定を行うことで肝障害の程度を生化学的に解析した。

## (3) 病理組織学的検討および免疫組織化学的検討

採取した肝臓組織を 10% PBS 緩衝ホルマリン溶液で固定後、パラフィン包埋切片を作成し、各切片について HE 染色を行い、形態学的変化を観察した。形態学的肝障害の程度については、既に報告されている方法に基づいてスコア化し、統計学的解析を行った。(Eur J Immunol 36:1028;2006)。さらに、好中球、マクロファージ (クッパー細胞)、T 細胞、NK 細胞に対する特異的抗体を用いて免疫組織学的に各白血球浸潤の程度を解析した。

## (4) APAP 投与後の肝臓における、炎症メディエーター、抗炎症物質の遺伝子発現の検討

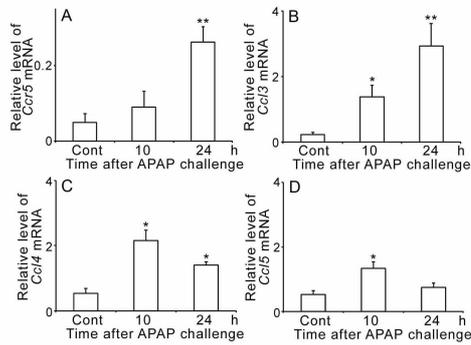
野生型および *Ccr5*<sup>-/-</sup> マウスに APAP を投与後、経時的に採取した肝臓組織により total RNA を抽出し、逆転写反応を行い、cDNA を合成。IFN- $\gamma$ , *Nos2*, *HO-1* に特異的なプライマーを用いて、real time RT PCR を行い、各 mRNA を定量し、経時的変化を検討した。

## (5) CCR5 発現細胞の同定

採取した肝臓組織を 10% PBS 緩衝ホルマリン溶液で固定後、パラフィン包埋切片を作成し、各切片について、マクロファージ、T 細胞、NK 細胞と CCR5 に特異的な抗体を使って蛍光二重染色を行った。

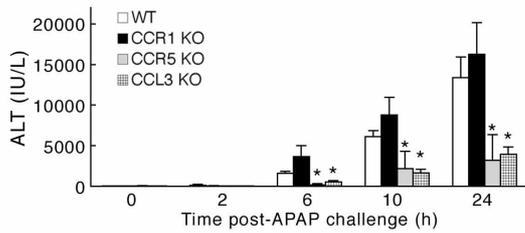
## 4. 研究成果

(1) 野生型マウスに APAP を投与後、経時的に採取した肝臓組織で、各時間における CCL3 の mRNA を定量した結果、CCL3 は 24 時間まで増加していた。さらに CCR5, CCL4, CCL5 についても各 mRNA を定量したところ、CCL4, CCL5 の発現量が 10 時間で増加したのち、24 時間で減少していたのに対し、CCR5 は 24 時間まで増加していた。



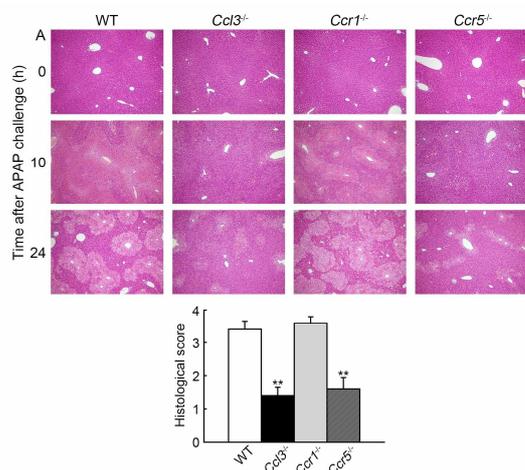
(2) *Ccr5*<sup>-/-</sup>および *Ccl3*<sup>-/-</sup>マウスで、血清中肝逸脱酵素の上昇が抑えられた。

APAP 投与の 2 時間後から、すべてのマウスにおいて ALT レベルは上昇したが、*Ccr5*<sup>-/-</sup> 及び *Ccl3*<sup>-/-</sup> で、ALT の上昇は抑えられた。*Ccr1*<sup>-/-</sup> に関しては野生型と同程度であった。



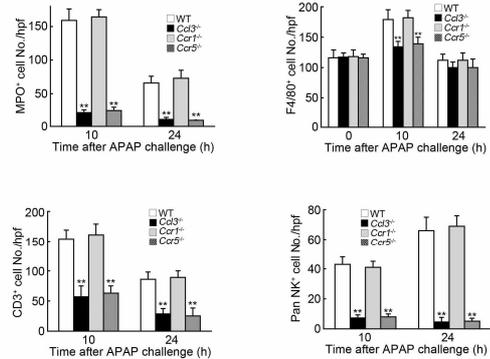
(3) *Ccl3*<sup>-/-</sup>, *Ccr5*<sup>-/-</sup>において、APAP 投与後、10 時間、24 時間の肝組織で、明らかな肝障害の軽減が見られた。

投与前、すべてのマウスにおいて、肝臓組織に違いはみられなかった。APAP 投与後、野生型、遺伝子欠損型とも肝細胞の壊死は経時的に拡大していったが、*Ccl3*<sup>-/-</sup>, *Ccr5*<sup>-/-</sup> で明らかに肝障害は軽減した。*Ccr1*<sup>-/-</sup> については、野生型と差がなかった。

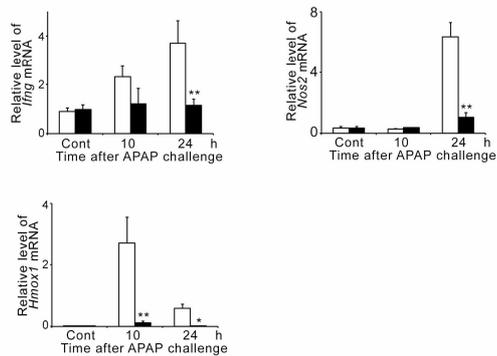


さらに、好中球、マクロファージ、NK 細胞、T 細胞など各白血球の浸潤についても、APAP 投与前の肝臓で差はみられなかったが、

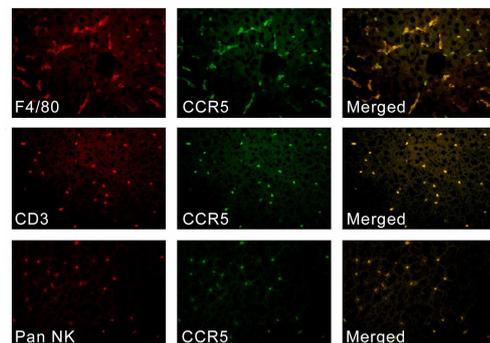
APAP 投与後、野生型と比較して、*Ccl3*<sup>-/-</sup>と *Ccr5*<sup>-/-</sup>で好中球、T 細胞、NK 細胞の浸潤は抑えられていた。*Ccr1*<sup>-/-</sup>については、野生型と差が見られなかった。



(4) 野生型と比較して、*Ccr5*<sup>-/-</sup>マウスでは APAP 投与後の IFN- $\gamma$ 、*Nos2*、*Hmox1* の発現の増加が抑えられた。



(5) 蛍光二重染色において、CCR5 の発現を確認したところ、マクロファージ、T 細胞、NK 細胞で、CCR5 の発現が確認された。



野生型に APAP を投与し、肝臓で種々のケモカインの mRNA を定量したところ、CCL3 で 24 時間後まで増加が見られた。そこで CCL3 に注目し、APAP 肝障害における CCL3

とその受容体の役割を明らかにするため CCL3 とその受容体である CCR1, CCR5 それぞれの遺伝子欠損マウスを用いて検討を行った。

病理組織学および生化学的解析の結果、野生型と比較して *Ccl3*<sup>-/-</sup>, *Ccr5*<sup>-/-</sup> で、肝障害の軽減は明らかであったが、*Ccr1*<sup>-/-</sup> については障害の程度は野生型と同程度であった。さらに免疫組織学的に解析においても、野生型に比べて、*Ccl3*<sup>-/-</sup>, *Ccr5*<sup>-/-</sup> では、肝臓への白血球の浸潤が抑えられたが、*Ccr1*<sup>-/-</sup> については野生型と差が見られなかった。また蛍光二重染色で CCR5 発現細胞を同定した結果、マクロファージ, T 細胞, NK 細胞で CCR5 の発現が確認された。APAP 投与後、肝臓で増加するケモカイン CCL3 が、CCR5 陽性炎症細胞を肝臓へ集めているということが考えられた。つまり APAP 肝障害において CCL3-CCR5 シグナルが深く関与しているという可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

1. Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Yamamoto H, Kato T, Kuninaka Y, Shimada E, Kondo T. Detection of intrathrombotic endothelial progenitor cells and its application to thrombus age estimation in a murine deep vein thrombosis model. Int J Legal Med. 2017. Doi: 10.1007/s00414-017-1668-5.
2. Yamamoto H, Takayasu T, Nosaka M, Kimura A, Ishida Y, Kawaguchi T, Fukami M, Okada M, Kondo T. Fatal acute intoxication of accidentally ingested nifedipine in an infant – A case report. Legal Medicine. 24 (2017) 12-18.
3. Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kawaguchi T, Yamamoto H, Kuninaka Y, Kondo T. Immunohistochemical detection of intrathrombotic fibrocytes and its application to thrombus age estimation in murine deep vein thrombosis model. Int J Legal Med (2017) 131:179-183.

[雑誌論文](計 3 件)

1. Yamamoto H, Ishida Y, Nosaka M, Kuninaka Y, Kondo T. Molecular toxicological study on the influence of circadian rhythms on acetaminophen hepatotoxicity. 96<sup>th</sup> International symposium advances in legal medicine. 11-15 September 2017.

2. Yamamoto H, Takayasu T, Ishida Y, Nosaka M, Kimura A, Shimada E, Kondo T. Fatal acute intoxication of accidentally ingested nifedipine in an infant. 26<sup>th</sup> Spring meeting of the German society of legal medicine (South region). 23-24 June 2017.

3. 山本寛記, 工藤恵子, 高安達典, 木村章彦, 野坂みずほ, 石田裕子, 川口敬士, 島田栄美, 近藤稔和. アジ化物による中毒死の 1 解剖例. 第 37 回日本中毒学会西日本地方会. 2017.2.4.

4. 橋爪佑示子, 木村章彦, 石田裕子, 野坂みずほ, 山本寛記, 川口敬士, 國中由美, 島田栄美, 川口真理子, 近藤稔和. 和歌山県の法医解剖例における孤独死の実態. 第 36 回日本法医学会学術近畿地方集会. 2016.11.12

5. 山本寛記, 高安達典, 木村章彦, 野坂みずほ, 石田裕子, 川口敬士, 近藤稔和. ニフェジピン誤飲による中毒死の 1 解剖例. 第 36 回日本中毒学会西日本地方会. 2016.2.6.

[学会発表](計 5 件)

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本寛記 (YAMAMOTO HIROKI)  
和歌山県立医科大学 医学部 助教  
研究者番号: 30781265

(2)研究分担者 ( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：

(4)研究協力者 ( )