

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 20 日現在

機関番号：32607
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2009 ～ 2011
 課題番号：21659417
 研究課題名（和文） 新規バイオマーカーを用いたアセトアミノフェン中毒の解毒薬治療評価法の提案
 研究課題名（英文） PROPOSAL FOR NOVEL BIO-MARKERS TO EVALUATE THE ANTIDOTE OF ACETAMINOPHEN POISONING
 研究代表者
 福本 真理子（FUKUMOTO MARIKO）
 北里大学・薬学部・准教授
 研究者番号： 40137914

研究成果の概要（和文）：

アセトアミノフェン中毒では、肝臓でCYP2E1による毒性代謝物NAPQIが蓄積し、肝細胞と共有結合することにより肝毒性を発現する。このNAPQIはグルタチオン（GSH）抱合を受け無毒化することから、GSH補給のためにその前駆体であるN-アセチルシステイン(NAC)が解毒薬となる。中毒の本体が酸化的代謝に起因し、解毒薬が抗酸化作用、ラジカル除去作用を有するGSHの補給であることに着目し、8-hydroxy deoxyguanosine(8-OH-dG)をはじめとする酸化ストレスマーカーがアセトアミノフェン中毒の毒性および解毒薬治療効果の新たな指標になりうるのではないかと推測し研究に至った。

アセトアミノフェン中毒量を投与したマウスを用いて、枯渇した肝臓中 GSH が NAC 投与により有意に上昇することを検証した。また、GSH 枯渇状態にある疾患に対して NAC を投与した場合の指標として、臨床的に検討されていた赤血球中 GSH、総チオール濃度、総抗酸化能については、肝臓中 GSH の増減を反映しているという確証は得られなかった。また、アセトアミノフェン中毒患者の尿および血清中の 8OHdG および Malonedialdehyde(MDA)の測定法を確立し、解毒薬の治療効果の指標としての有用性の可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Acetaminophen (APAP) is rapidly absorbed from gastrointestinal tract, and approximately 4% of any ingested amount is metabolized by hepatic cytochrome P450 mixed function oxidase system to an active intermediate metabolite that is thought to produce hepatotoxicity. This metabolite, *N*-acetyl *p*-benzoquinone mine (NAPQI), is normally detoxified by conjugation with glutathione and excreted by the urine. After an overdose, when glutathione is rapidly used and the store drop to less than 30% of normal, the unconjugated toxic metabolite may bind covalently to various hepatocellular macromolecules producing necrosis.

To propose the novel biomarker for efficacy of antidote in acetaminophen poisoning, we have evaluated some markers such as total antioxidant power (TAP), 8-hydroxy deoxyguanosine (8-OH-dG) and GSH in RBC and also developed a sensitive HPLC method for measuring malonedialdehyde (MDA) in urine and serum.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	0	1,100,000
2010年度	600,000	0	600,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,400,000	210,000	2,610,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：急性中毒学、酸化ストレスマーカー、アセトアミノフェン中毒、8-OHdG、MDA、

1. 研究開始当初の背景

アセトアミノフェン (APAP) は、家庭内常備薬として繁用されている安全性の高い解熱鎮痛薬であるが、小児の誤飲や成人の自殺企図による大量摂取の頻度もまた高い側面を持っている。APAP を大量摂取すると、肝臓で CYP2E1 による毒性代謝物 NAPQI が蓄積し、肝細胞と共有結合することにより肝毒性が発現する。この NAPQI はグルタチオン (GSH) 抱合を受け無毒化することから、GSH 補給のためにその前駆体である *N*-アセチルシステイン (NAC) が解毒薬となる。本邦では、2002 年、NAC 内用液剤が特異的解毒薬として認可され、欧米で推奨されている 72 時間経口プロトコールが行われる。解毒薬適応の判定には、一般に APAP 血中濃度 (摂取後 4 時間以降) が用いられ、Rumack-Matthew のノモグラムに従い治療ライン以上であれば、NAC 投与が開始される。

しかし、本邦での APAP 中毒症例の動向を見ると、欧米に比べ血中濃度が治療ライン未満の症例が多く、72 時間プロトコールを完遂しないことも多い。一方、治療ライン未満であっても劇症化する症例も散見する。解毒薬投与の判定基準の見直し、治療効果の科学的指標の必要性が議論されている。

2. 研究の目的

APAP 中毒の本体が酸化的代謝に起因し、解毒薬投与が抗酸化作用、ラジカル除去作用を有する GSH の補給であることに着目し、8-hydroxy deoxyguanosine

(8-OH-dG) を始めとする酸化ストレスマーカーが APAP 中毒の毒性および解毒薬治療効果の新たな指標として有用ではないかと考えた。

8-OH-dG の測定は、尿検体を用いることから、患者への負担も少ない。APAP 中毒患者への応用においては、APAP、GSH、および NAC の同時測定が可能な電気化学検出器を用いた HPLC 法が最適と思われる。実験動物による予備実験を経て、APAP 中毒患者における NAC 治療による改善度を評価するうえでの新たなバイオマーカーとしての有用性を検討するために本研究計画を立案した。

3. 研究の方法

- ① 8-OH-dG 測定方法の検討：電気化学検出器を用いた HPLC 法およびイムノクロマトグラフィー法による尿中 8-OH-dG 濃度の測定方法を確立した。
- ② Malonedialdehyde (MDA) 測定方法の検討：紫外外部吸収検出および蛍光検出を用いた HPLC 法を確立し、尿中および血清中 MDA の測定方法を検討した。
- ③ アセトアミノフェン中毒患者の血中濃度と肝機能、予後データ、NAC 投与歴の収集した。
- ④ 実験動物 (マウス) でのアセトアミノフェン大量投与時の APAP 血中濃度、尿中 8OH-dG、Malonedialdehyde (MDA) 濃度の測定、肝機能検査、肝臓および血中チオール類 (総抗酸化能 (total antioxidant power; TAP)、GSH) の測定を行った。

4. 研究成果

APAP 中毒量を投与したマウスにおいて、血清および肝臓中 APAP 濃度は共に 1 時間後にピーク (147.33±73.95 μg/mL、2.24±3.55 μg/mg protein) を示した。肝内 GSH 濃度は 1 時間から急速に減少し、2 時間で最低となった後、ゆるやかに回復した。肝壊死がみられた 1~3 時間ではコントロール群の 30%以下に枯渇した。肝組織標本では 1 時間から脂肪滴が出現し、3 時間では中心静脈周辺に著しい壊死が観察された。また、グリソン鞘周辺は正常であり、これらは APAP 誘発性肝障害に特徴的な壊死形態であった。

APAP 投与後 1h で投与前の 6.3%まで減少した肝臓中 GSH 量は、NAC 投与 1h より有意な増加が見られ、3h では対照群の 96.3%まで回復した。血清中 GSH 量は検出限界以下であるため、慢性疾患や加齢に伴う GSH の低下を評価する指標として用いられている赤血球中 GSH 量を同時に測定した。また、赤血球中および肝臓中総抗酸化能 (TAP) も測定した。しかし、APAP や NAC 投与により有意な変化が見られなかったことから、NAC 投与による肝臓中 GSH 量の補給効果を反映する指標としてこれらは利用できないことがわかった。そこで、8-OH-dG 濃度および MDA 濃度の測定方法を確立し、APAP 中毒患者において NAC 投与により尿中 8-OH-dG 濃度および MDA 濃度が有意な変化が見られるか否かを検証するために臨床試験計画を立案する予定である。

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)

[雑誌論文] (計 6 件)

①吉村 久仁子, 福本真理子, 中原大貴, 山口麻美, 市村萌, 上条 吉人, 相馬 一亥

N-Acetylsysteine (NAC) による glutathione 補給効果の検証 中毒研究 24(4):336 2011.

②山口 麻美, 市村 萌, 福本 真理子, 吉村 久仁子, 上条 吉人, 相馬 一亥 Acetaminophen 蛋白付加物 (AP-adducts) は肝内 glutathione の枯渇を反映しているか 中毒研究 23(4):361 2010.

③福本 真理子 Rumack & Matthew のノモグラムの限界、Pros & Cons : アセトアミノフェン中毒の治療にノモグラムは有用か 中毒研究 23(2):111-115、2010.

[学会発表] (計 6 件)

①友田吉則、福本真理子、市村 萌、矢後 和夫、吉村久仁子、相馬一亥 Acetaminophen の肝毒性に対する新規バイオマーカーの検討 第 31 回日本中毒学会 (東京) 2009. 7. 25

②山口麻美、福本真理子、市村萌、吉村久仁子、上条吉人、相馬一亥 Acetaminophen 蛋白付加物 (AP-adducts) の最適な測定タイミングはいつか 第 33 回日本中毒学会総会・学術集会 2011. 7. 30(大垣)

③市村 萌、福本真理子、吉村 久仁子、上条 吉人、相馬 一亥、白川洋一、吉岡敏治 Acetaminophen 蛋白付加物 (AP-adducts) は日本人中毒症例においても重症度の指標となりうるか 第 32 回日本中毒学会総会 2010. 7. 24(岡山)

[図書] (計 1 件)

福本真理子 (分担執筆) アセトアミノフェン中毒の重症度指標 佐藤 博 編: 薬剤師のための救急救命時のスキル & 薬ハンドブック -その知識が命を救う-, pp263-266、医薬ジャーナル社、2010.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 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0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

福本 眞理子 (FUKUMOTO MARIKO)
北里大学・薬学部・准教授
研究者番号：40137914