

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 10 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18359

研究課題名（和文）水素ガス吸入療法による薬剤性肝障害に対する新規治療法の開発とそのメカニズムの解明

研究課題名（英文）Development of a Novel Treatment for Drug-Induced Liver Injury by Hydrogen Gas Inhalation Therapy and Elucidation of Its Mechanism

研究代表者

政所 祐太郎（Madokoro, Yutaro）

鹿児島大学・鹿児島大学病院・医員

研究者番号：40794061

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：アセトアミノフェン（APAP）肝障害に対する水素ガス吸入の効果について検証した。16時間絶食の後、APAP300mg/kgを投与するモデルを使用した。水素ガス（N₂をベースとした、H₂ 1.29%、O₂ 21%の混合ガス）吸入群とコントロールガス（N₂ 79%、O₂ 21%の混合ガス）をAPAP投与後2時間吸入させ、24時間後に臓器保護効果について評価を行った。その結果、ALTは水素ガス吸入群が観光その上昇が抑えられる傾向にはあったが、統計学的な有意差は認めなかった。GSHに関しては群間で差はみられなかった。今後、モデルの重症度の検証や既存医療薬との併用など、さらなる検証を検討している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アセトアミノフェン（APAP）中毒による肝障害に対してはNアセチルシステインによる治療法が確立されているが、頻回投与や味の問題、内服後から治療介入までの時間的制約などいくつかの問題点が残っている。近年、さまざまな臓器障害に対して保護効果が報告されている水素ガス吸入療法をAPAP中毒にも応用する有効性について評価したが、有意な差はみられなかった。モデルの条件変更や既存治療法との併用療法などさらなる検証を続け、今後の新規治療の開発、水素ガス吸入療法が効果を示すメカニズムの解明をすることで今後の薬剤性肝障害の治療戦略に影響を与える可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The effect of hydrogen gas inhalation on acetaminophen (APAP) hepatotoxicity was tested using a model in which APAP 300 mg/kg was administered after a 16-hour fast. Hydrogen gas (a mixture of 1.29% H₂ and 21% O₂ based on N₂) and control gas (a mixture of 79% N₂ and 21% O₂) were inhaled for 2 hours after APAP administration, and the organ protective effects were evaluated 24 hours later. There was no difference in GSH between the two groups. Further validation of the model, such as the severity of the disease and the combination of the model with existing drugs, is under consideration.

研究分野：救急医学

キーワード：水素ガス アセトアミノフェン 薬剤性肝障害 中毒

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アセトアミノフェンは解熱鎮痛目的に使用されるが、自殺目的の過量内服や、疼痛改善目的に大量内服されることがあり、その結果重篤な肝障害を引き起こす場合がある。欧米では年間70000人の病院受診があり、300人の死者も出ている。

アセトアミノフェン中毒肝障害に対してはNアセチルシステイン(N-acetyl cysteine: NAC)内服による解毒が行われるが、重篤な肝障害においては半数程度の患者しか救命できなかったとの報告もある。また、NACの投与タイミングには24時間以内内服、可能であれば8時間以内内服という時間的制約があり、頻回投与の煩雑さ、嘔気等副作用の問題もある。

近年、水素ガスによる臓器保護効果が注目されている。詳細な作用機序は現在のところ不明であるが、蘇生後脳症、心筋梗塞、脳梗塞、造影剤腎症など様々な臓器障害において効果があると報告されている。今回我々は、アセトアミノフェン肝障害に対する水素分子の作用に着目した。水素ガスの研究は、虚血再灌流障害の治療として初めに成果をあげ、心筋虚血モデルにおいてもその効果が示された。我々が臓器保護効果を期待する肝障害に対しても虚血再灌流肝障害に対する水素ガス吸入による効果の報告があり、水素ガス吸入により肝組織の損傷を軽減し、ALTの上昇を抑制した。

アセトアミノフェン肝障害に対するNAC内服以外のより簡便で効果的な治療法として水素ガス吸入の効果についてはこれまで検証されたことはない。また、水素ガスが効果を示すこれまでの研究においてもその臓器保護メカニズムに関しては解明されていない。

2. 研究の目的

アセトアミノフェン中毒に対する水素ガス吸入療法の有用性を検討し、さらに、まだ解明されていない水素ガスの臓器保護メカニズムを解明する。これにより、既存の治療法で改善が見込めなかった症例においても治療の選択肢が広がり、また、そのメカニズム解明により他のさまざまな臓器障害への水素ガス吸入療法の応用へ繋がる可能性がある。

3. 研究の方法

実験(1)アセトアミノフェン肝障害モデル作成

今回の実験に適したモデルを作るためにアセトアミノフェン投与量や肝障害に大きく関連する絶食時間について検討を行う。使用マウスはC57BL6,雄,体重20-25g。前処置として絶食を行い、アセトアミノフェンは腹腔内投与を行った。肝障害の指標として血中肝逸脱酵素(AST, ALT)の測定を、肝組織障害の指標として血中HMGB1、生存率で評価を行った。採血はセボフルラン2%による浅い鎮静下に開腹し、下大静脈より血液を採取した。

実験(1)- 絶食時間の決定

10時間、16時間、24時間の3群を設定した。150mg/kgのアセトアミノフェンを生理食塩水に入れ、55°Cに温めた水が入った超音波洗浄機に生理食塩水に溶解したアセトアミノフェンを容器ごと入れて溶解させた。アセトアミノフェンが完全に溶解した後に37°Cに冷まし腹腔内注射した。注射後4,24時間後のALTで肝障害の評価を行った。

実験(1)- 絶食時間とアセトアミノフェン投与後の採血時間についての検討

4,8,10,16,24時間絶食の各群におけるアセトアミノフェン投与4時間後および24時間後採血でHMGB1を評価した。

実験(1)- 至適アセトアミノフェン投与量の評価

アセトアミノフェン150,300,400,600mg/kgの4群で生存時間を観察した。

実験(2)アセトアミノフェン肝障害モデルに対する水素ガス吸入群とコントロールガス吸入群の比較

実験(1)の結果をもとに作成したモデルマウスに対して、水素ガス(N₂をベースとした、H₂ 1.29%、O₂ 21%の混合ガス)吸入群とコントロールガス(N₂ 79%、O₂ 21%の混合ガス)をアセトアミノフェン投与後2時間吸入させ、臓器保護効果について評価を行った。

アセトアミノフェン+水素ガス吸入群、アセトアミノフェン+コントロールガス吸入群、アセトアミノフェン群(ガス吸入なし)、Sham群(生食投与のみ)の4群を設定した(n=9,Sham群はn=2)。評価項目としては、肝障害で上昇がみられる血清ALT値と肝障害では合成が低下するグルタチオン(GSH)値を測定した。

4. 研究成果

実験(1)- 絶食時間の決定

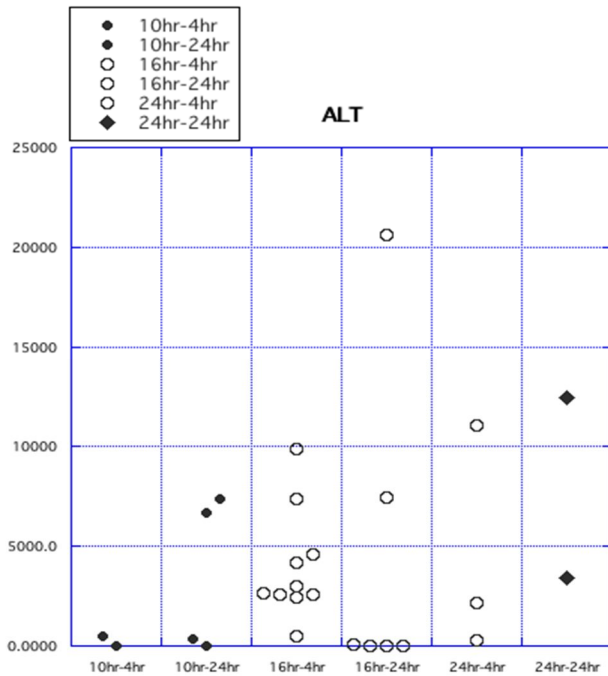


Fig.1 絶食時間ごとの ALT 値

実験(1)- 絶食時間とアセトアミノフェン投与後の採血時間について検討

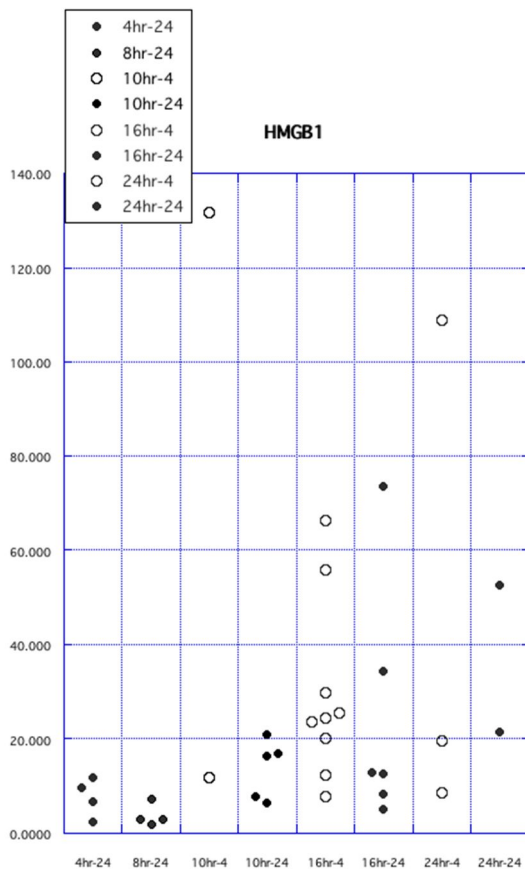


Fig.2 絶食時間とアセトアミノフェン投与後の採血時間で HMGB1 の変化

実験(1)- 至適アセトアミノフェン投与量の評価

絶食時間が長くなると肝障害の程度が強くなると推察された(Fig.1)。10 時間絶食では肝障害の程度が弱く、16 時間、24 時間絶食では肝障害モデルの作成はできているが、24 時間絶食では ALT10000 以上の肝障害が強すぎる個体があった。

16 時間絶食群ではデータのばらつきが抑えられ、肝障害の程度も適切であるため、16 時間絶食が適切であると考えた

4,8,10 時間絶食群は肝障害の程度が低く、16 時間絶食の肝障害の程度が要求を満たす強さであった(Fig.2)。16 時間絶食群は 24 時間後に採血しても HMGB1 の数値に大きな変動はみられなかった。これまでの報告においても14-16時間絶食が多く、16 時間絶食が適切と判断した。HMGB1 の値からは投与後 4 時間から 24 時間は障害は維持されているものと推測され、早期に死亡する個体を除外するため採血ポイントとしては 24 時間後採血を選択した。

アセトアミノフェン 150mg/kg を投与したマウスを 5 日間生存実験した結果、全てのマウスは 5 日後自力で回復した。

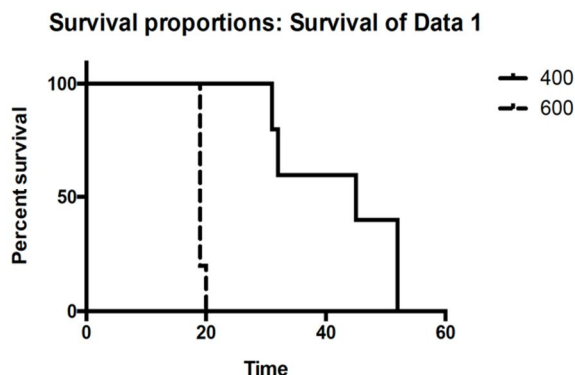


Fig.3 アセトアミノフェン 400mg/kg, 600mg/kg 投与での生存率

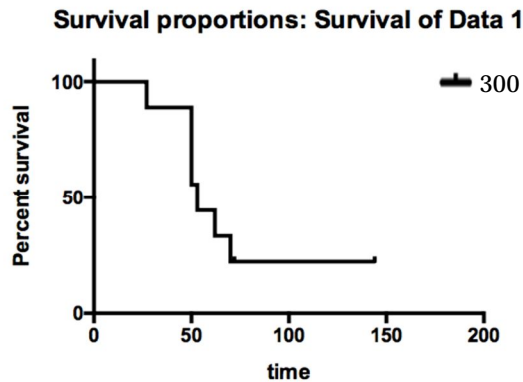


Fig.4 アセトアミノフェン 300mg/kg 投与での生存率

上記 Fig.3 のようにアセトアミノフェン 400mg/kg 及び 600mg/kg を投与したマウスは 1 日～2 日で全て死亡した。Fig.4 のようにアセトアミノフェン 300mg/kg 投与群では、2,3 日で 80%程度死亡した。N アセチルシステインは、アセトアミノフェン摂取後なるべく早期に投与を開始し、8 時間以内が望ましいが、24 時間以内であれば効果が認められることが報告されている。 今後は治療として NAC や H₂ ガスを用いるため、1 日～2 日で死亡するのは NAC 投与後の回復が追いつかず、2 日～3 日程度で死亡する時間的余裕が必要であり、2 日～3 日で生存する個体が存在する程度の緩やかな肝障害を今回の実験で要求する。300mg/kg 投与群では治療介入なしでは高い死亡率があることが確認でき、以上の条件に合致する。このモデルを使用することで水素ガス吸入と NAC 投与での生存率の比較、NAC 投与が遅れた時に水素ガス吸入をすれば効果があるか確認する実験など、今後様々な実験での応用が可能だと考える。

実験(2)

モデルは実験(1)で検証した結果、16 時間絶食、アセトアミノフェン 300mg/kg を腹腔内投与するモデルを使用した。

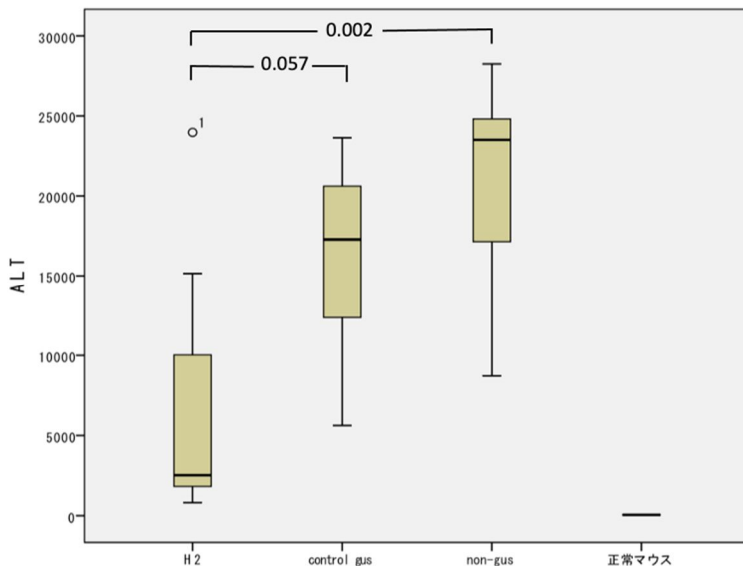


Fig.5 アセトアミノフェン肝障害モデルに対する水素ガス吸入の効果についての検討
水素ガス吸入群が ALT の値はコントロールガス群、ガス吸入なし群と比較して ALT の値は低値である傾向を示したが、統計学的な有意差は認めなかった(Fig.5)。

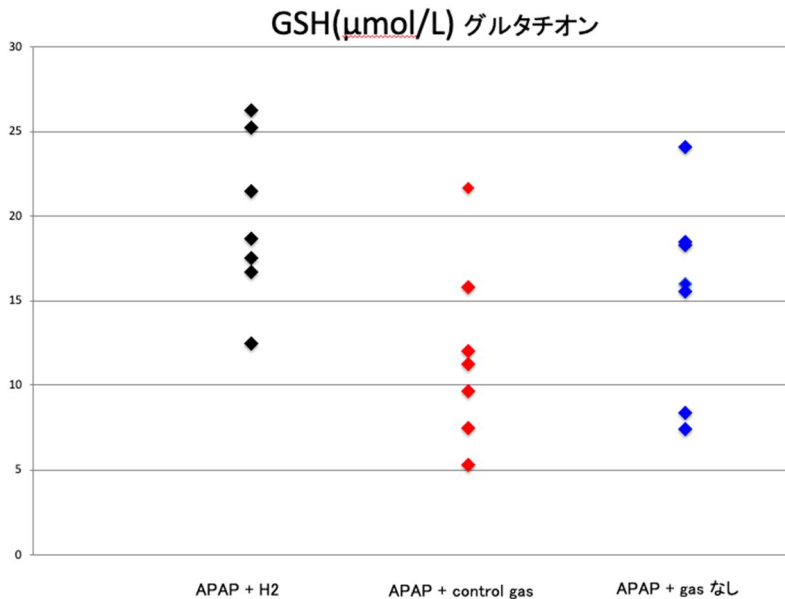


Fig.6 アセトアミノフェン肝障害モデルに対する水素ガス吸入の効果についての検討

GSH を比較した結果、水素ガス吸入群、コントロールガス吸入群、ガス吸入なし群の各群間で有意な差は認められなかった(Fig.6)

今回の実験条件においては、アセトアミノフェン肝障害モデルに対して水素ガス吸入を行ってもコントロールガス吸入群と比較して、ALT/GSH では有意差はでなかった。さらなる追加実験として、評価項目を HMGB1 や酸化ストレスマーカーなどに変えて測定する計画を立てていたが、その後肝障害モデルが安定して作成できなかった。実験(1)で計画したモデルにおいても、生存率や肝障害の程度の安定性を欠いた。個体差や絶食時間、アセトアミノフェン投与量、腹腔内注射の吸収の問題、等が原因として考えられた。

実験(2)(Fig.5)で示したように今回の条件において、統計学的有意差はなかったものの水素ガス吸入の効果がある傾向も示唆されたため、実験モデルの重症度の安定化を目指し改良を加えながら、アセトアミノフェン中毒の程度による水素ガス吸入の有効性の変化や、既存の治療法である N アセチルシステインと水素ガス吸入を併用することで N アセチルシステイン投与療法のデメリットである時間的制約などが解消できないかを検証するなど、さらなる研究を検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------