

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10561

研究課題名(和文) インフラマソームを指標とするアセトアミノフェン中毒死の診断法確立

研究課題名(英文) Acetaminophen-induced acute liver injury and inflammasome

研究代表者

高安 達典 (Takayasu, Tatsunori)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：80154912

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)：本研究では、炎症反応の指揮者とも呼ばれるインフラマソームに着目し、マウスを用いた実験によりアセトアミノフェン肝障害におけるインフラマソームの態様を解析した。採取した肝臓組織から総タンパク質を抽出し、シグナル認識に関わる分子であるNLRP3, NLRP1, NLRC4, AIM2をウエスタンブロッティング法により検出し、経時的变化を検討したところ、APAP投与後6および24時間で著明に亢進していたのはNLRP1およびIL-18であった。これらの分子はAPAP肝障害の指標となり得る可能性が示唆された。

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中毒の病態におけるインフラマソームの態様を詳細に解析し、アセトアミノフェン肝障害発症メカニズムを解明することができれば、従来の化学分析に加えて、インフラマソームがアセトアミノフェン中毒死判断のための新たな分子指標となるものと考えられる。その結果、より客観的かつ正確な死因判定が可能となり、法医中毒学の新たな展開につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Acetaminophen (APAP), which is widely used as an antipyretic analgesic, is easily available, and its accidental poisoning as well as suicides have become a problem. In this study, we focused on the inflammasome and analyzed the inflammasome status in acetaminophen-induced liver injury using mice. Total proteins were extracted from liver tissues, and NLRP3, NLRP1, NLRC4, and AIM2, which are molecules involved in signal recognition, were detected by western blotting, and changes over time were examined. NLRP1 and IL-18 were markedly upregulated at 6 and 24 hours after APAP administration. These molecules may be indicators of APAP liver injury.

研究分野：実験病理学

キーワード：アセトアミノフェン 肝障害

1. 研究開始当初の背景

解熱鎮痛剤として汎用されているアセトアミノフェン (acetaminophen, APAP) は、容易に入手できることから、自殺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。また、アセトアミノフェン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。本研究では、炎症反応の指揮者とも呼ばれるインフラマソームに着目し、マウスを用いた実験によりアセトアミノフェン肝障害におけるインフラマソームの態様、炎症細胞の動態、アセトアミノフェン代謝動態、炎症性サイトカインの発現動態との関連を解析し、さらに実際のアセトアミノフェン中毒死事例において採取した血清及び各臓器におけるインフラマソームの態様を検索して、最終的にはインフラマソームがアセトアミノフェン中毒による死因判定の有用な指標となり得るか否かについて検討する。

2. 研究の目的

法医学は、法医病理学、法医中毒学、及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、その学術的特性から臨床医学と同様に最先端の知見が応用されなければならない。法医実務においては、正確な死因診断がもっとも重要な課題である。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しばしば遭遇する。これまでの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を機器を用いて化学的に検出する、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、法医実務に貢献してきた。

剖検時、アルコールを含めて何らかの薬毒物が検出された事例においては、検出された薬毒物と死因との関係を考察することが必要不可欠である。しかし、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、死亡に至った事例もしばしば経験する。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の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外を通じて非常に少ないのが現状である。

日本中毒情報センターの報告では、薬毒物服用による中毒死の割合は年々増加している。とりわけ、解熱鎮痛剤として知られているアセトアミノフェンは、市販の風邪薬や感冒薬の有効成分として広く使用されており、一般人も容易に入手可能であり、さらに近年インターネットの普及に伴い日本では販売されていなかった大用量のアセトアミノフェンも入手可能となったことから、自殺に加えて偶発的な中毒死例についても問題となっている。

申請者の所属する教室でも、今までにアセトアミノフェンによる中毒死と判断された剖検例に遭遇してきた。アセトアミノフェン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。そのメカニズムについては、アセトアミノフェン自身には肝毒性はなく、その代謝産物であるN-アセチル-p-ベンゾキノイミン (NAPQI) の肝毒性によって肝細胞壊死が惹起され、それに続く炎症反応によって肝障害がより増悪するものと考えられている。しかし、この肝障害は必ずしも服用したアセトアミノフェンの濃度依存的に増悪するのではなく、サイトカイン療法やステロイド治療中の患者において

は低用量で重篤な肝障害が生じた事例も報告されている (Lancet. 1989 May 20;1(8647):1143.)。このことから、アセトアミノフェン肝障害におけるサイトカインなどのケミカルメディエーターの関与が示唆されており、申請者らはこれまでアセトアミノフェン肝障害におけるサイトカインの動態及び役割を検討し、炎症性サイトカインがアセトアミノフェン中毒の分子指標となり得ることを証明してきた (Lab Invest. 2009 Jan;89(1):68-79.; Eur J Immunol. 2006 Apr;36(4):1028-38.; J Leukoc Biol. 2004 Jan;75(1):59-67.;

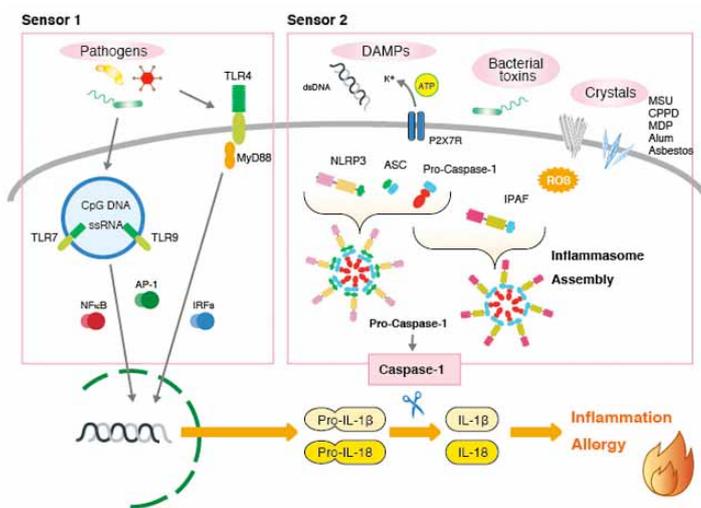


図1. インフラマソームと炎症反応

FASEB J. 2002 Aug;16(10):1227-36.). しかし、アセトアミノフェン肝障害のメカニズムは多様で、炎症性サイトカインのみではアセトアミノフェン肝障害を説明できないことも指摘されており、さらなる研究の必要性がうたわれている (Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2006 Aug;2(4):493-503.).

インフラマソームはカスパーゼ-1 活性化による IL-1 β , IL-18 分泌などを誘導する、炎症の要となる細胞質内タンパク質複合体である。インフラマソームは、病原成分、アスベストなどの外来因子、コレステロール結晶などの内在性因子により活性化され、感染症、糖尿病、動脈硬化、自己免疫疾患、虚血傷害など、多彩な疾患の発症と進行に中心的役割を果たしている (図1)。最近、研究の劇的展開によりこれら疾患に対してインフラマソーム情報伝達系を標的とした新しい治療方法が開発されつつある。これを法医学的に鑑みると、インフラマソームの態様は、生前生体がどのような侵襲をどの程度受けたかを評価する際の有用な分子指標となり得ると考えられる。しかし、インフラマソームが炎症性疾患においてどのような役割を果たしているかについては不明な点が多く残されている。本研究では、アセトアミノフェン中毒におけるインフラマソームの態様を、実験動物ならびに剖検試料を用いて検討する。さらには、インフラマソームがアセトアミノフェン中毒における生体反応の分子指標として法医学的意義を有するか否かを評価する。

3. 研究の方法

アセトアミノフェン中毒モデルの作製

8週齢の雄マウスにアセトアミノフェンを腹腔内投与する。アセトアミノフェンの投与用量については、150, 300, 450, 600, 750 mg/kg を腹腔内投与して肝障害を惹起させる。対照群マウスには生理食塩水を腹腔内投与する。各用量における肝障害の程度は、生存率及び生化学検査によって比較、検討し、至適用量を決定する。

(1) 生存率

各アセトアミノフェン投与用量において、投与後の経時的な生存率を算出し、カプランマイヤー法によって統計的解析を行う。

(2) 血清肝逸脱酵素の測定

アセトアミノフェン投与後、経時的 (2, 6, 10, 24, 48 時間) に各マウスから血液を採取し、血清肝逸脱酵素 (ALT 及び AST) の測定を行い (Fuji DRY-CHEM 3500V, 現有), 肝障害の程度を生化学的に検討する。

(3) 病理組織学的検討

経時的に採取した肝臓組織を、10%緩衝ホルマリン溶液で固定後、パラフィン包埋切片を作製する。各切片について HE 染色を行い、形態学的変化を観察する。形態学的肝障害の程度については、すでに報告されている方法に基づいてスコア化し (Eur J Immunol. 2006 Apr;36(4):1028-38.), 統計学的解析を行う。

(4) 免疫組織化学的検討

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、免疫組織化学的に肝臓への白血球浸潤の程度を検討する。

(5) 炎症性サイトカイン, ケモカインの発現動態の検討

採取した肝臓組織から総 RNA を抽出し、種々の炎症性サイトカイン (IL-1 β , IL-18, TNF- α , IL-6) 及び ケモカイン (CXCL1, CXCL2, CCL1, CCL2, CCL3, CX3CR1) の遺伝子発現を real-time RT-PCR 法にて、経時的に検討する。さらに、発現亢進が認められた炎症性サイトカイン及びケモカインの受容体について、その発現細胞を蛍光二重免疫染色により同定する。

(6) インフラマソーム情報伝達系の態様検討

採取した肝臓組織から総タンパク質を抽出し、シグナル認識に関わる分子である NLRP3, NLRP1, NLRC4, AIM2 をウエスタンブロッティング法により検出し、経時的変化を検討する。さらに、採取した肝臓組織から single cell suspension を作製してフローサイトメーターにより、NLRP3, NLRP1, NLRC4, AIM2 またはカスパーゼ-1 の活性化が認められる細胞を同定する。

(7) 上記の実験成果に基づき、アセトアミノフェン肝障害特異的に活性化されるインフラマソームを見出す。

(8) 上記の研究計画を鋭意継続するとともに、実際の法医実務において薬物中毒と診断された事例について、各臓器を採取し、インフラマソームの態様を遺伝子及びタンパク質レベルで検討する。それらの結果を実験動物を用いた解析と比較、検討し、法医実務に応用可能か否かについて評価する。

4. 研究成果

採取した肝臓組織から総タンパク質を抽出し、シグナル認識に関わる分子である NLRP3, NLRP1, NLRC4, AIM2 をウエスタンブロッティング法により検出し、経時的変化を検討したところ、APAP 投与後 6 および 24 時間で著明に亢進していたのは NLRP1 および IL-18 であった (図2)。NLRC4 に関しては、APAP 投与前および投与後において検出されなかった。

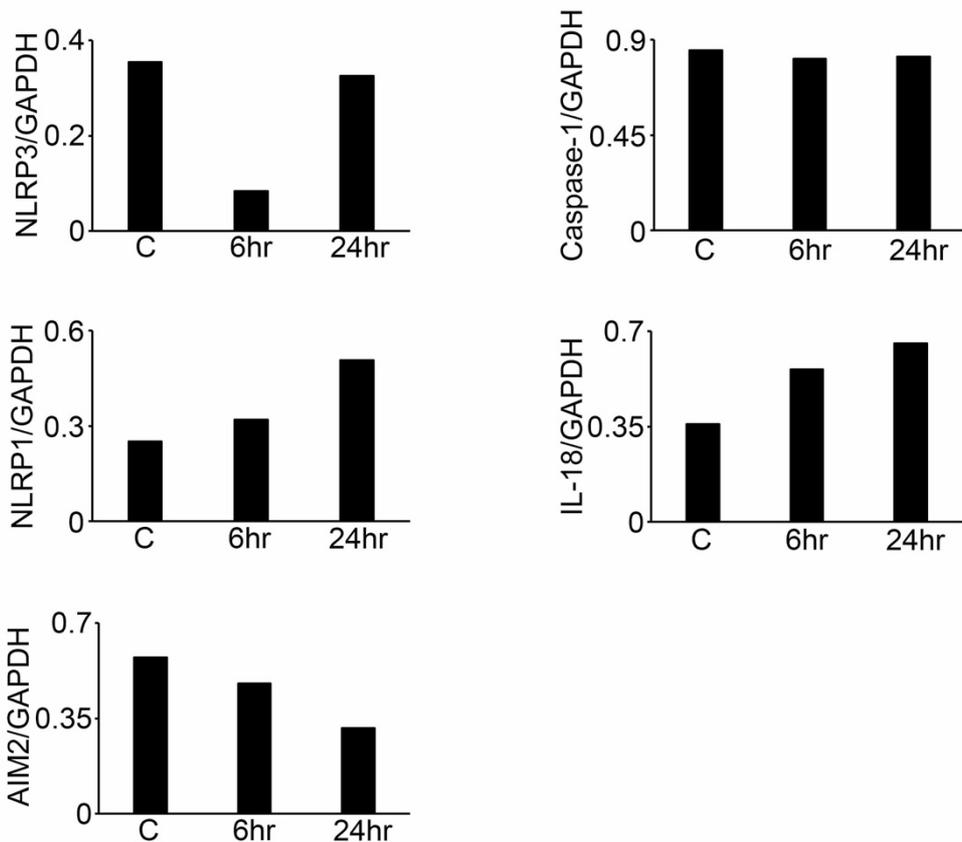
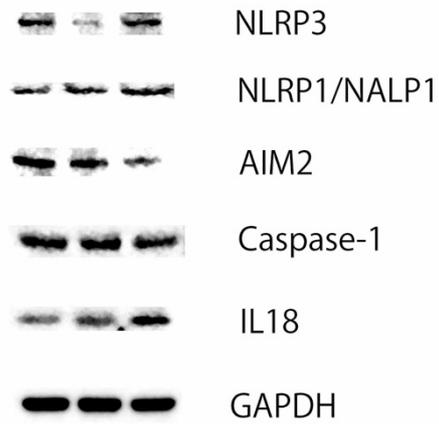


図2. 肝臓におけるインフラマソームシグナル認識に関わる各種分子の検出

これらの結果から、マウス APAP 肝障害において NLRP1 および IL-18 が APAP 投与後に亢進することが判明した。これらの分子は APAP 肝障害の指標となり得る可能性が示唆された。今後、ヒト試料を用いた解析が必要であると考えられる。

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
---------	---------