

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月14日現在

機関番号：24701  
 研究種目：挑戦的萌芽研究  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23659370  
 研究課題名（和文）死のメディエーターHMGB1を指標とするアセトアミノフェン中毒の新規法  
 医診断法  
 研究課題名（英文）Detection of HMGB1 in acetaminophen-induced liver injury model and  
 its application for forensic diagnosis  
 研究代表者  
 石田 裕子（ISHIDA YUKO）  
 和歌山県立医科大学・医学部・講師  
 研究者番号：10364077

研究成果の概要（和文）：マウスにアセトアミノフェン(APAP)400 mg/kgを腹腔内投与して肝  
 障害を惹起させたところ、投与後24時間で肝組織において著明な出血および小葉中心性の肝  
 細胞壊死などの変化を認めた。HMGB1遺伝子発現はコントロールと比べてAPAP投与後24  
 時間において有意に亢進しており、HMGB1のタンパク発現を正常肝では肝細胞核に、APAP  
 投与後肝では肝細胞質に認めた。APAP投与により肝臓において炎症を伴ったHMGB1放出が  
 増加することが示され、HMGB1動態が法医実務においてAPAP中毒の有用な指標となり得る  
 可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We examined HMGB1 expression in acetaminophen (APAP)-induced liver  
 injury. mRNA expression of HMGB1 was enhanced in the liver of mice injected with APAP. Although  
 HMGB1 protein was detected in hepatocyte nuclei of normal liver, it was observed in cytoplasm of  
 hepatocytes after APAP challenge. The detection of HMGB1 in the liver could be considered as  
 valuable diagnostic tools for the postmortem diagnosis of APAP-induced liver injury.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000円	870,000円	3,770,000円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：HMGB1, アセトアミノフェン, 法医診断学

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 法医学において薬毒物による自・他殺、  
 不慮の中毒死は重要であり、法医実務におい  
 てしばしば遭遇する。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  
 市販のかぜ薬や解熱鎮痛剤の有効成分とし  
 て広く使用されており、一般人が容易に入手  
 できることからしばしば故意に利用され問  
 題となっている。アセトアミノフェンを大量  
 に摂取した場合、活性代謝物 NAPQI が毒性  
 を発現し、肝に広範な小葉中心性の壊死が起  
 こることが知られており、ときに急性肝不全  
 に陥り死亡する。しかしながら、肝障害発症

の過程には不明な点も多く、毒性発現を説明  
 できるスキームは未だできあがっていない。  
 申請者はこれまで、アセトアミノフェンによ  
 る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。しかしながら、これら炎  
 症性サイトカインのみではアセトアミノフ  
 ェンによる肝障害を説明できないことも指  
 摘されている。

(2) 法医学において死因判定は最も重要な  
 実務の一つであり、より正確で客観的な死因

の判断には、常に最先端の医科学研究の知見及び技術が可能な限り応用されなければならない。本研究は、薬物中毒の死因判定における一つの指標として、新規核内因子 HMGB1 に着目した初の研究である。アセトアミノフェン中毒の発生機序を HMGB1 に注目して分子病理学的に解析し、法医診断学への応用を試みる極めて挑戦的な研究である。HMGB1 の動態が死因判定に有用となれば、これまでの中毒学的検査に分子病理学的検査を加えた、より客観的かつ包括的な法医診断法が確立され、法医中毒学の新たな展開の可能性がある。すなわち本研究により、アセトアミノフェン中毒の分子機構が解明されると同時に、死因判定の正確性の向上をもたらすことが期待できる。

## 2. 研究の目的

(1) アセトアミノフェン中毒の新規分子法医診断法の確立を最終目的とし、“死のメディエーター”と呼ばれる核由来因子 high mobility group box protein-1 (HMGB1)に着目してアセトアミノフェン中毒発生の分子機構を解明する。HMGB1 は死細胞から分泌タンパクとして細胞外に放出され、種々の炎症性疾患に関与していることが示唆されているが、その病態生理学的役割は不明である。アセトアミノフェン中毒における HMGB1 の役割を分子病理学的に検討し、その病態生理学的役割を的確に把握することにより、HMGB1 の動態が法医実務においてアセトアミノフェン中毒の有用な指標となり得るか否か検討する。

(2) 最近、死細胞から細胞外に放出されるユニークな核内因子 HMGB1 の存在が報告された。HMGB1 は細胞外に放出されると、諸臓器のバリアー破綻と炎症を引き起こすことから、臓器不全における“死のメディエーター”と呼ばれ注目されている。これを法医学的に鑑みると、HMGB1 の放出量やその動態は、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。本研究では、アセトアミノフェン中毒における HMGB1 の動態及び局在を、実験動物並びに剖検試料を用いて全身性及び局所性の両面から検討する。さらには、HMGB1 の病態生理学的役割を解明することにより、HMGB1 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

本研究は、死細胞由来の新規核内因子 high mobility group box protein-1 (HMGB1)の全身及び局所における動態を指標とするアセトアミノフェン中毒の分子法医診断法確立

の可能性を検討するものであり、動物実験による基礎的データの収集と剖検試料を用いた実務的検討から成る。具体的には、マウスを用いて実験的にアセトアミノフェン肝障害を惹起させ、全身及び局所で起こる現象を分子病理学的に解析して肝障害発生時の HMGB1 の生物学的意義を解明する。さらに、実際の法医剖検例から得られた試料について HMGB1 量及び局在を検討して、動物実験で得られた結果と比較・検討し、法医実務において有用な分子指標となり得るか否かについて評価する。

(1) アセトアミノフェン中毒モデルの作製  
8週齢の雄 C57BL/6 マウスに、アセトアミノフェン (400 mg/kg) を腹腔内投与して肝障害を惹起させる。アセトアミノフェン投与後、経時的にマウスを屠殺し、血液並びに肝臓を採取して試料とする。

(2) 血清肝逸脱酵素の検討  
採取した血液の一部を血清分離して血清肝逸脱酵素の測定を行い、肝障害が惹起されていることを確認し、各群の経時的な変化を観察する。

(3) 病理組織学的検討  
採取した肝組織を用いて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。

(4) HMGB1 の定量及び局在の検討  
経時的に採取した肝組織より total RNA を抽出して real time RT-PCR 法を用いて HMGB1 及び HMGB1 の受容体として働く Rage, TLR2, TLR4 の各遺伝子発現を定量する。さらに、肝組織切片を用いて HMGB1 に対する抗体を反応させて免疫染色を行い、経時的局在の変化を検討する。

(5) 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血液及び肝臓を採取し、HMGB1 の動態を検討する。血液試料を用いて ELISA 法により HMGB1 を定量するとともに、肝組織を用いて免疫染色により HMGB1 の局在を検討する。得られた結果を、実験動物を用いた実験結果と比較・検討し、HMGB1 の動態が法医診断学に応用可能か否かについて評価し、新規分子法医診断基準の確立を目指す。

## 4. 研究成果

(1) アセトアミノフェン中毒モデルの作製  
8週齢の雄 C57BL/6 マウスに、アセトアミノフェン 400 mg/kg を腹腔内投与して肝障害を惹起させた。アセトアミノフェン投与後経時的にマウスを屠殺し、血液並びに肝臓を採取

して試料とした。

### (2) 血清肝逸脱酵素の検討

採取した血液の一部を血清分離して血清肝逸脱酵素(ALT 及び AST)の測定を行ったところ、アセトアミノフェン投与後 10 及び 24 時間でコントロールと比べて有意に高値を示した。

### (3) 病理組織学的検討

採取した肝組織を用いてパラフィン包埋切片を作製し、各切片について HE 染色を行い形態学的変化を観察したところ、アセトアミノフェン投与後 24 時間の肝組織において著明な出血及び小葉中心性の肝細胞壊死などの変化を認めた。

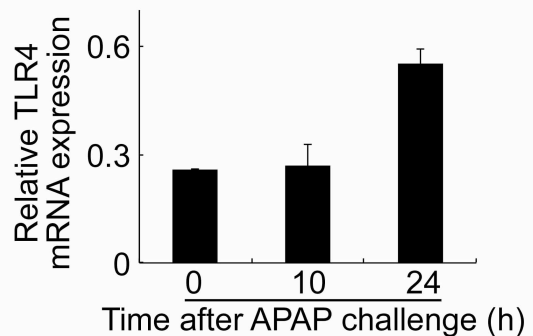
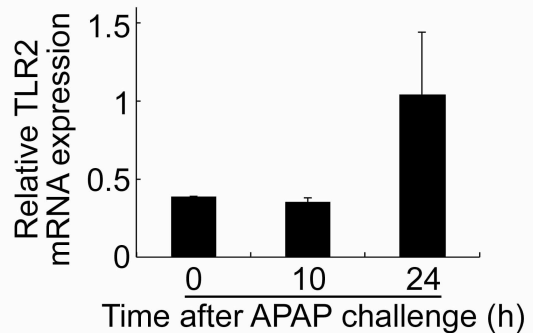
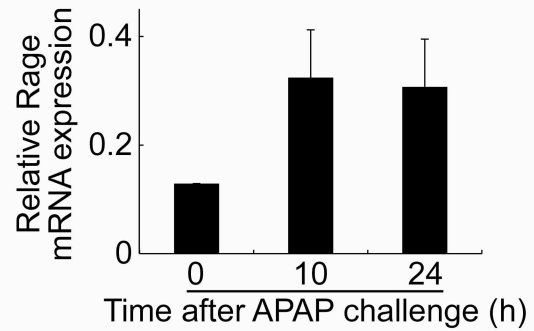
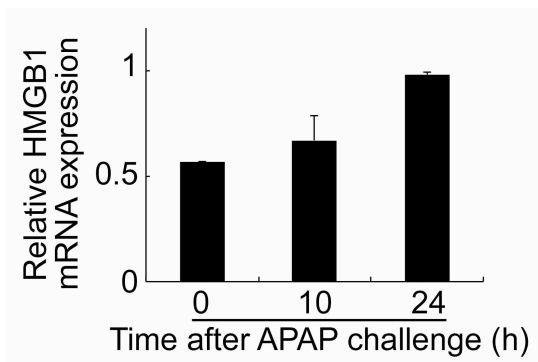
### (4) HMGB1 の局在の検討

肝組織切片を用いて HMGB1 に対する抗体を反応させて免疫染色を行い経時的局在の変化を検討したところ、正常肝では肝細胞核に、アセトアミノフェン投与後肝では肝細胞質に陽性所見を認めた。

### (5) HMGB1 の遺伝子発現の検討

経時的に採取した肝組織より total RNA を抽出して real time RT-PCR 法を用いて種々の分子の遺伝子発現を検討したところ、HMGB1 及び HMGB1 の受容体として働く RAGE, TLR2, TLR4 発現が、それぞれコントロールと比べてアセトアミノフェン投与後において亢進していた。

(6) 以上の結果より、アセトアミノフェン投与により肝臓において HMGB1 が細胞外に放出され、RAGE, TLR2, TLR4 発現亢進を伴った炎症を引き起こすことが示された。また、HMGB1 の動態が法医実務においてアセトアミノフェン中毒の有用な指標となり得る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)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[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

石田 裕子 (ISHIDA YUKO)  
和歌山県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号：10364077

### (2) 研究分担者

近藤 稔和 (KONDO TOSHIKAZU)  
和歌山県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：70251923

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：