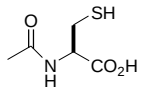
ホ. 薬 理 作 用

1．薬理試験
総　　括 …… **83**
1)**N-アセチルシステインによる解毒作用** …… **84**
(1)アセトアミノフェン中毒の発現メカニズム …… **84**
(2)**肝障害に対するN-アセチルシステインの効果** …… **86**
2)**グルタチオン産生に対するN-アセチルシステインの効果** …… **90**
(1)**グルタチオン生合成** …… **90**
(2)アセトアミノフェン投与ラットのグルタチオン合成に対する効果 …… **91**
2．一般薬理試験
総　　括 …… **92**
1)**結　果** …… **93**

略号一覧表

略号	化学名 (一般名)	構造式及び分子量	由来
NAC (N-アセチルシステイン)	L-α-acetamido-β- mercaptopropionic acid (N-acetyl-L-cysteine)	 M.W.=163.20	原薬 標識体

ホ．薬理作用に関する資料

１．薬理試験

総　　括

アセトアミノフェンの反応性代謝物は少量であればグルタチオン抱合反応によってグルタチオン抱合体となり胆汁中に排出され、さらにいくつかの反応を経てシステインを含んだメルカプツール酸として尿中に排泄される。しかしながら、アセトアミノフェンの多量摂取などによって反応性代謝物が過剰量産生すると、システインが減少し、グルタチオンが枯渇する。その結果、反応性代謝物は無毒化されずに蓄積し、肝細胞中の高分子との結合等によって肝障害あるいは腎障害等をきたす。

生体内の枯渇したグルタチオンを補うために N-アセチルシステイン投与は有効であると考えられることから、N-アセチルシステインのアセトアミノフェン中毒時の肝機能障害に対する効果をマウス及びラットを用いて検討した (表ホ－1)。その結果、本薬剤の早期の投与がアセトアミノフェン中毒時に引き起こされる肝細胞死を抑制することが確認された。この結果は、N-アセチルシステイン投与がアセトアミノフェン中毒によって枯渇したグルタチオンの生合成にはたらき、アセトアミノフェンの反応性代謝物を解毒する基質を多量に提供することによって、反応性代謝物の肝組織への共有結合を抑制しているためと考えられた。

以上のことから N-アセチルシステインはアセトアミノフェン中毒の解毒に有効な薬剤であると考えられた。

表ホ－1　効力を裏付ける試験成績一覧表

試 験 項 目	動物種	方　法	試　験　成　績	
1. 肝細胞死に対する効果	マウス	1.2 g/kg 経口投与	アセトアミノフェン投与後 240 分以内の投与において血清グルタミル酸ピルビン酸トランスフェラーゼ活性を有意に抑制	
2. 肝組織及びタンパクへの結合に対する効果	マウス	1.2 g/kg 経口投与	アセトアミノフェン投与後 240 分以内の投与において肝組織へのアセトアミノフェンの共有結合を有意に抑制	
3. 血漿アラニンアミノトランスフェラーゼ活性に対する効果	マウス	0-600 mg/kg 経口投与	用量依存的に血漿アラニンアミノトランスフェラーゼ活性を抑制	
4. 肝組織中グルタチオン濃度に対する効果	ラット	1.2 g/kg 十二指腸への投与	アセトアミノフェン投与後 80 分の投与において肝組織中のグルタチオン濃度が増加	

1）N-アセチルシステインによる解毒作用

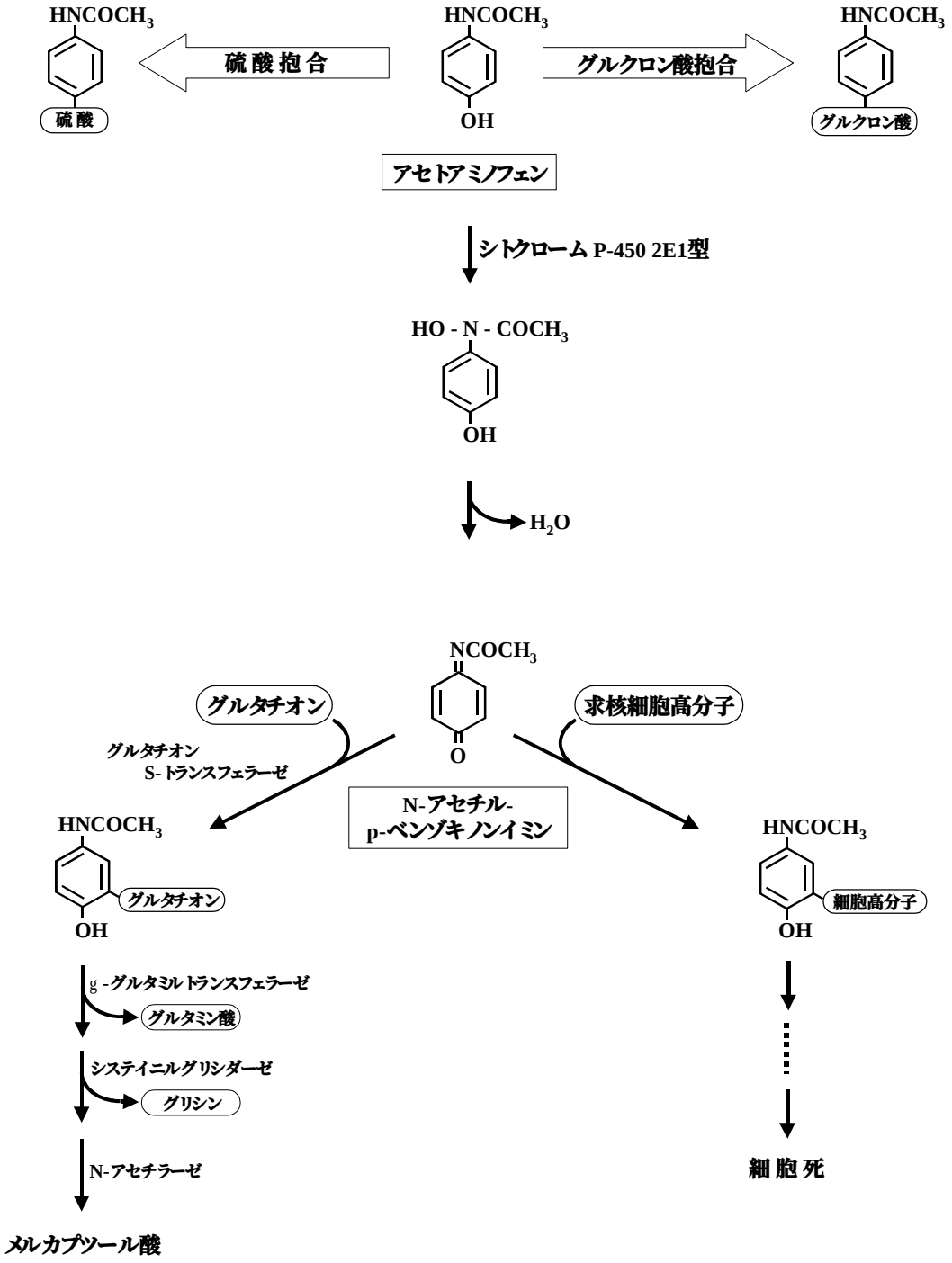
(1)アセトアミノフェン中毒の発現メカニズム

解熱鎮痛作用を有するアセトアミノフェンは、経口摂取するとそのほとんどは速やかに消化管から吸収される（　　）。アセトアミノフェンのヒトにおける代謝を図ホ－1 に示した（　　）。アセトアミノフェンのヒト尿中における代謝物は、その大部分がグルクロン酸抱合体(49～54%)と硫酸抱合体(28～33%)であり、2～3%は代謝されずアセトアミノフェンとして存在する。また、およそ 15%はシトクローム P-450 代謝経路に入り、代謝産物としてアリール化剤である N-アセチル-p-ベンゾキノンイミンと 3-ヒドロキシアセトアミノフェンを生じ、それぞれチオール体あるいはカテコール体となって尿中へ排泄される（　　）。アセトアミノフェン中毒において重要な役割を果たしているのは前者の N-アセチル-p-ベンゾキノンイミンであるといわれており、N-アセチル-p-ベンゾキノンイミンとタンパクとの結合体が、アセトアミノフェン中毒の子供（　　）、あるいは、アセトアミノフェン投与のマウス（　　）において血清中に増加していたとの報告がある。

一般的にアリール化剤の未変化体または代謝物は反応性に富み、強力な毒性を有することがある。それらは少量であればグルタチオン抱合反応によってグルタチオン抱合体となり胆汁中に排出され、さらにいくつかの反応を経てメルカプツール酸として尿中に排泄される。この一連の排泄までの経路が生体にとって重要な防御機構の一つである。しかしながら、アセトアミノフェンの多量摂取あるいはシトクローム P-450 の活性化増幅などによって N-アセチル-p-ベンゾキノンイミンが過剰量産生すると、グルタチオンがすばやく枯渇し、N-アセチル-p-ベンゾキノンイミンが無毒化されずに蓄積する。例えば、健常人への 3 g のアセトアミノフェン投与で、グルタチオン抱合体の生成クリアランスが低下するといわれており（　　）、すでにグルタチオンの減少が生じていることが考えられる。また、慢性アセトアミノフェン中毒患者の血漿グルタチオン量が、アセトアミノフェンを投与していないヒトのそれより有意に減少しており（　　）、中毒患者でグルタチオン量が低下していることがうかがわれる。

アセトアミノフェンの代謝物が肝障害の発現に関与していることを示唆する実験的事実として、肝代謝酵素を誘導したラットの肝細胞にアセトアミノフェンを曝露させると肝細胞障害性を示すという報告がある（　　）。具体的に未変化体あるいはどの代謝物が影響を及ぼしたのかは言及されていないものの、アセトアミノフェンの活性代謝産物が肝細胞高分子と結合し、肝壊死を招くとも報告されている（　　）ことから、N-アセチル-p-ベンゾキノンイミンが関与している可能性が高いと考えられる。別の実験では過酸化脂質量の増加が認められ代謝物が酸化的に細胞障害を示す可能性も報告されている（　　）。また、鉄キレート剤の投与によってアセトアミノフェンによるヒドロキシルラジカルの発生を抑制すると一時的に肝細胞障害が緩和されることからも肝障害に対して脂質過酸化等の酸化性ストレスの関与が示唆されている（　　）。

その他としてアセトアミノフェンの過量摂取は肝障害以外に腎障害（　　）、白内障の発症（　　）及び心臓（　　）に対する障害を引き起こすという報告もある。



図ホ－1　ヒトにおけるアセトアミノフェンの代謝

(2)肝障害に対するN-アセチルシステインの効果

①アセトアミノフェン投与マウスの血清グルタミル酸ピルビン酸トランスアミナーゼ活性に対する効果

［方法］

Swiss系雄性マウス（18～25 g）にアセトアミノフェン（1 g/kg）を経口投与し、その20分前、60、240、360あるいは480分後にN-アセチルシステイン（1.2 g/kg）を経口投与した。アセトアミノフェン投与6、12及び24時間後に採血し、血清グルタミル酸ピルビン酸トランスアミナーゼ活性を測定した。コントロール群にはアセトアミノフェン投与60分後に精製水を投与した。

［成績］

アセトアミノフェン投与マウスの血清グルタミル酸ピルビン酸トランスアミナーゼ活性に対するN-アセチルシステインの効果を表ホ－2に示した。

アセトアミノフェン経口投与6、12及び24時間後のコントロールにおける血清グルタミル酸ピルビン酸トランスアミナーゼ活性は時間の経過に依存して増加した。一方、アセトアミノフェン投与20分前あるいは60分後のN-アセチルシステインの投与では6、12及び24時間後において有意に血清グルタミル酸ピルビン酸トランスアミナーゼ活性を抑制した。また、アセトアミノフェン投与240分後のN-アセチルシステインの投与でも12及び24時間後において有意に血清グルタミル酸ピルビン酸トランスアミナーゼ活性を抑制したが、アセトアミノフェン投与360あるいは480分後のN-アセチルシステインの投与ではコントロールと比較して有意な差は認められなかった。

以上の結果からアセトアミノフェンによる肝細胞死はN-アセチルシステインの早期投与によって抑制可能であると考えられた。

表ホ－2 マウスにおけるN-アセチルシステイン（NAC）の経口投与時間とアセトアミノフェン経口過量投与によるSGPT値上昇に対する効果の比較

投与物質	投与時間（分）	測定時間					
		6時間		12時間		24時間	
		生存率	SGPT活性	生存率	SGPT活性	生存率	SGPT活性
コントロール（精製水）	+60	29/34	2945±631	45/55	6090±997	35/52	11686±1461
NAC	-20	15/16	77±13**	25/25	100±10**	23/24	211±86**
NAC	+60	14/14	114±22**	14/15	78±8**	18/18	64±5**
NAC	+240	25/28	1451±357	32/38	2224±469**	32/38	912±237**
NAC	+360	－	－	9/11	8156±2409	9/11	3036±1009
NAC	+480	－	－	10/10	9390±2149	3/10	9812±1280

生存動物の平均値±標準誤差を示す（単位：I.U./L）。
SGPT: 血清グルタミル酸ピルビン酸トランスアミナーゼ
NAC: N-アセチルシステイン
有意差はコントロールとの比較で示す: **P < 0.01（Wilcoxon順位和検定）。

② アセトアミノフェンの肝組織への共有結合に対する効果

［方法］

Swiss 系雄性マウス（18～25 g）に[^{3}H]-アセトアミノフェン（1 g/kg、946 dpm/nmol）を経口投与し、その 20 分前、60、240、360 あるいは 480 分後に N-アセチルシステイン（1.2 g/kg）を経口投与した。アセトアミノフェン投与 6、12 及び 24 時間後に肝臓を摘出し、ホモジナイズ後、液体シンチレーションカウンターで放射能活性を測定した。コントロール群にはアセトアミノフェン投与 60 分後に精製水を投与した。

［成績］

アセトアミノフェンの肝組織への共有結合に対する N-アセチルシステインの効果を図ホ－2 に示した。

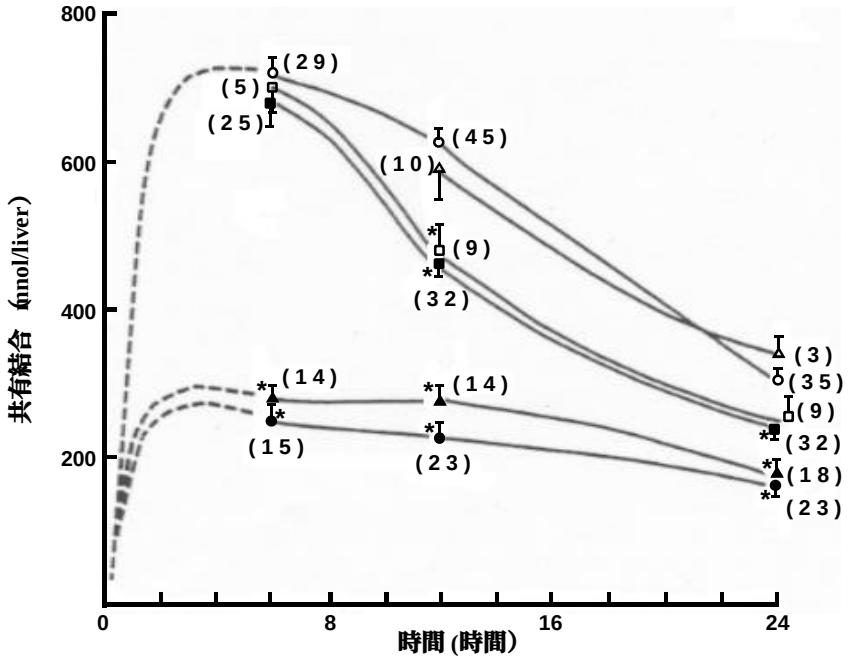
アセトアミノフェンを経口投与するとアセトアミノフェンの肝組織との共有結合量が増加した。

アセトアミノフェン投与 20 分前及び 60 分後の N-アセチルシステインの投与は肝組織へのアセトアミノフェンの結合をコントロールと比較して有意に抑制し、アセトアミノフェン投与の 24 時間後においてもその有意な抑制は認められた。

アセトアミノフェン投与 240 及び 360 分後の N-アセチルシステインの投与はアセトアミノフェンの肝組織への結合をアセトアミノフェン投与の 12 時間後に有意に抑制したが、24 時間後における肝組織への結合は 240 分後の N-アセチルシステイン投与によってのみ有意に抑制した。

アセトアミノフェン投与 480 分後の N-アセチルシステインの投与はいずれの時点においても抑制しなかった。

以上の結果から N-アセチルシステインの早期投与はアセトアミノフェンの肝組織への共有結合を抑制すると考えられた。



図ホ－2　N-アセチルシステイン投与時間と肝組織へのアセトアミノフェン共有結合阻害効果との関係

N-アセチルシステインの投与はアセトアミノフェン投与前 20 分（●）、投与後 60 分（▲）、240 分（■）、360 分（□）及び 480 分（△）に行った。コントロールとして精製水のみの投与を行った（○）。
平均値±標準誤差、（ ）内の数字はサンプル数。
有意差はコントロールとの比較で示す: *P < 0.05 (Tukey's **多重比較検定**)。

③ アセトアミノフェン投与マウスの血漿アラニンアミノトランスフェラーゼ活性に対する効果

［方法］

雄性 Swiss ICR マウス（18-21 g）にアセトアミノフェンを 500 mg/kg 及び N-アセチルシステインを 0-600 mg/kg の範囲で経口投与した。投与 24 時間後に血漿アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）活性を測定した。

［成績］

アセトアミノフェン投与マウスの血漿アラニンアミノトランスフェラーゼ活性に対する N-アセチルシステインの効果を表ホ－3 に示した。

N-アセチルシステインは用量依存的に血漿アラニンアミノトランスフェラーゼ活性の上昇を抑制した。

表ホ－3　N-アセチルシステインによるアセトアミノフェン肝毒性の予防に対する効果

	アセトアミノフェン 500 mg/kg	
NAC	生存数	血漿ALT
(mg/kg)	(24 hr)	(units/ml)
0	10/10	2237 ± 453
75	10/10	2288 ± 316
150	10/10	727 ± 223
300	10/10	72 ± 23*
450	8/8	27 ± 2*
600	7/7	34 ± 6*

データは平均値±標準誤差で示した。
ALT: アラニンアミノトランスフェラーゼ
*P < 0.05：NAC 非投与マウスに対してチューキー様多重比較検定を行った。

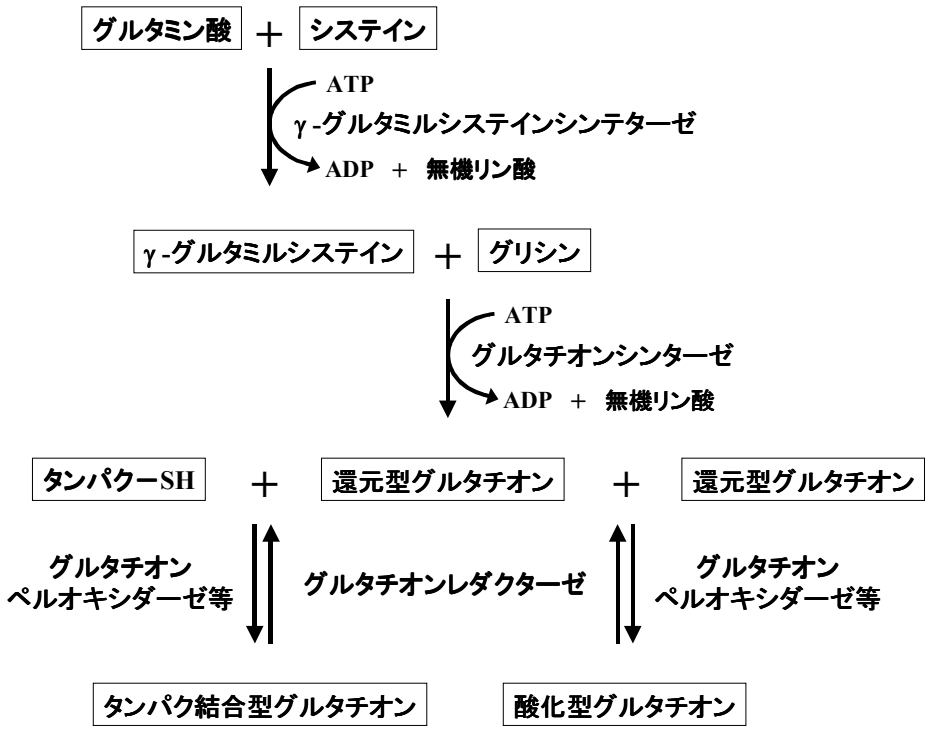
④ N-アセチルシステインによる脂質過酸化の抑制機序

脂質過酸化はグルタチオンの枯渇によって生じると考えられるため、N-アセチルシステインあるいはその投与によって補われたグルタチオンの抗酸化作用によって脂質過酸化は抑制されると考えられる。従って、グルタチオンの枯渇によって生体内に存在する活性酸素種の消去効率が悪化することも考えられるが、N-アセチルシステインの補充はこの観点においても有効に作用すると考えられる。また、N-アセチル-p-ベンゾキノンイミンが直接的に酸化障害を引き起こす可能性があり、その酸化障害を防ぐこともN-アセチルシステインの解毒のメカニズムとして考えることができる。

2）グルタチオン産生に対するN-アセチルシステインの効果

(1) グルタチオン生合成

アセトアミノフェンの代謝物であるN-アセチル-p-ベンゾキノンイミンのような毒性を有する物質の排泄に必要であるグルタチオンはグルタミン酸－システイン－グリシンから成るトリペプチドである。グルタチオンの生合成を図ホ－3に示した。生体内にとりこまれたN-アセチルシステインは、γ-グルタミルシステインシンテターゼによってL-グルタミン酸及びATPと反応し、中間体であるγ-グルタミルシステインが生成される。さらに、γ-グルタミルシステインは、グルタチオン合成酵素によってグリシン及びATPと反応し還元型グルタチオンとなる。グルタチオンは還元型のほかに、タンパク質のシステイン残基と結合したタンパク結合型グルタチオンあるいは生体内において少量ではあるが還元型グルタチオン2分子がジスルフィド結合した酸化型グルタチオンとしても存在し、グルタチオンレダクターゼによって還元型グルタチオンとなり、グルタチオン抱合反応に移行する。しかしながら、システインを含むメルカプツール酸が体外へ排泄されることで生体内のシステイン量が減少するうえに、毒性をもつ物質が多量であるとグルタチオンの生合成が追いつかなくなってグルタチオン枯渇が生じる。



図ホ－3　グルタチオンの生合成

(2)アセトアミノフェン投与ラットのグルタチオン合成に対する効果

［方法］

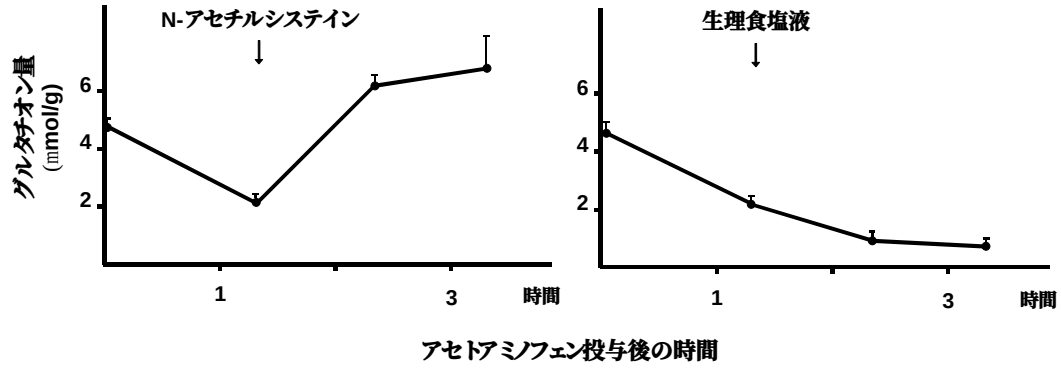
雄性 SD ラット（250～300 g）の十二指腸にアセトアミノフェン（1 g/kg）を直接投与し、80 分後に N-アセチルシステイン（1.2 g/kg）あるいは生理食塩液を同様に十二指腸へ投与した。アセトアミノフェン投与前、投与 80、140 及び 200 分後に肝組織中のグルタチオン濃度を測定した。

［成績］

アセトアミノフェン投与ラットの肝組織中のグルタチオン濃度に対する N-アセチルシステインの効果を図ホ－4 に示した。

ラットにアセトアミノフェンを投与すると肝組織中のグルタチオン濃度は減少した。アセトアミノフェン投与 80 分後に N-アセチルシステインあるいは生理食塩液を投与すると、生理食塩液投与群においてグルタチオンは減少したままであったが、N-アセチルシステイン投与群ではグルタチオン濃度が増加し、140 分以降も減少することはなかった。グルタチオンの合成速度は生理食塩液投与群で 0.54 μmol/h であったが、N-アセチルシステイン投与群ではその約 5 倍の 2.69 μmol/h であった。

以上の結果から、アセトアミノフェンによるグルタチオンの枯渇は N-アセチルシステインの投与によって補えると考えられた。



図ホ－4　アセトアミノフェン過量投与後の肝組織中グルタチオン濃度に対するN-アセチルシステインの効果
平均値±標準誤差（n=4）

2．一般薬理試験

総　　括

アセチルシステインの一般薬理試験として自発運動、中枢神経系、呼吸器系、循環器系、自律神経系、平滑筋、消化器系に対する作用及び局所麻酔作用について検討した結果を表ホ－4 に示した。アセチルシステインの 20mg/kg の投与で一過性の血圧上昇、100mg/kg の投与で自発運動の亢進、500mg/kg の投与で小腸炭末輸送能の抑制、また 100 及び 500mg/kg の投与で疼痛反応発現時間の短縮が認められたが、その他の中枢神経系、呼吸器系、循環器系、自律神経系及び平滑筋に対して一般薬理作用上認めるべき影響はほとんどなかった。

表ホ－4　一般薬理試験成績一覧表

項　目		動 物 種	試験方法、投与経路、投与量	試験結果
一般症状・中枢神経	自発運動量に対する作用	ICR 系マウス（4 週齢）	自動計数装置による測定 皮下投与：100，　500mg/kg	100mg/kg 投与群のみ運動亢進
	鎮痛作用	ICR 系マウス（4 週齢）	熱板法 皮下投与：100，　500mg/kg	いずれの濃度も疼痛反応発現時間の短縮
			Stretching 法 皮下投与：100，　500mg/kg	影響なし
	ﾍﾟﾝﾄﾊﾞﾙﾋﾞﾀｰﾙﾅﾄﾘｳﾑ催眠に対する作用	ICR 系マウス（4 週齢）	ﾍﾟﾝﾄﾊﾞﾙﾋﾞﾀｰﾙﾅﾄﾘｳﾑ（50mg/kg、腹腔内投与）による正向反射消失の回復時間の測定 腹腔内投与：50，　1000mg/kg	影響なし
	ﾍﾞﾒｸﾞﾘﾄﾞ痙攣に対する作用	ICR 系マウス（5 週齢）	ﾍﾞﾒｸﾞﾘﾄﾞ腹腔内投与による LD_{50} を Litchfield-Wilcoxon 法により算出 腹腔内投与：1g/kg	影響なし
呼吸・循環器系	ウサギ血圧・呼吸及び心電図に対する作用	日本白色種ウサギ（体重 2~2.5kg）	ﾍﾟﾝﾄﾊﾞﾙﾋﾞﾀｰﾙﾅﾄﾘｳﾑ（30mg/kg）麻酔下、右総頸動脈血圧、呼吸及び第 2 誘導心電図を記録 静脈内投与：5，　10，　20mg/kg	影響なし
	ネコ血圧・呼吸及び心電図に対する作用	ネコ（体重約 3kg）	ﾍﾟﾝﾄﾊﾞﾙﾋﾞﾀｰﾙﾅﾄﾘｳﾑ（30mg/kg）麻酔下、右総頸動脈血圧、呼吸及び第 2 誘導心電図を記録 静脈内投与：5，　10，　20mg /kg	20mg/kg 投与群で一過性の血圧上昇が認められたが、心拍数に変化なし
	ウサギ摘出耳介血管に対する作用	日本白色種ウサギ（体重 2~2.5kg）	Krawkow-Pissemski 法 0.5%溶液、0.1mL 注入	影響なし
自律神経系及び平滑筋	ﾓﾙﾓｯﾄ摘出回腸に対する影響	Hartley 系 雄性モルモット (体重 400~500g)	Magnus 法 10^{-6}，10^{-4} M	影響なし
	ラット摘出子宮に対する作用	Wistar 系 非妊娠ラット (体重約 150g)	Magnus 法 10^{-6}，10^{-4} M	影響なし
	瞳孔径に対する作用	日本白色種ウサギ	白熱灯光源及び赤色微光照明下で Haab 式瞳孔計で測定 点眼投与：3%溶液	影響なし
消化器系	小腸炭末輸送能に対する作用	ICR 系マウス（4 週齢）	炭末法 皮下投与：100mg/kg，500mg/kg	500mg/kg 投与群で抑制
局所麻酔作用	ﾓﾙﾓｯﾄ角膜反射に及ぼす影響	Hartley 系 雄性モルモット (体重 300~400g)	角膜知覚計による測定 点眼投与：3%溶液	影響なし

［結 果］

1) 一般症状及び中枢神経系に及ぼす影響

(1) 自発運動量に及ぼす影響（100 及び 500mg/kg の皮下投与）

N-アセチルシステインの 100mg/kg 群のみで運動が亢進した。

(2) 鎮痛作用

①熱板法（100 及び 500mg/kg の皮下投与）

N-アセチルシステインの 100、500mg/kg 群は疼痛反応発現時間を短縮した。

②Stretching 法（100 及び 500mg/kg の皮下投与）

N-アセチルシステインの 100、500mg/kg 群は stretching の回数に影響を及ぼさなかった。

(3) ペントバルビタールナトリウム催眠に対する作用（50 及び 1000mg/kg の腹腔内投与）

N-アセチルシステインの 50、1000mg/kg 群は影響を及ぼさなかった。

(4) ベメグリド痙攣に対する作用（1g/kg の腹腔内投与）

N-アセチルシステインの 1g/kg 群は影響を及ぼさなかった。

2) 呼吸及び循環器系に及ぼす影響

(1) ウサギ血圧・呼吸及び心電図に対する作用（5、10 及び 20mg/kg の静脈内投与）

N-アセチルシステインの 5、10、20mg/kg 群はいずれの項目に対しても影響を及ぼさなかった。

(2) ネコ血圧・呼吸及び心電図に対する作用（5、10 及び 20mg/kg の静脈内投与）

N-アセチルシステインの 20mg/kg 群は一過性の血圧上昇を認めたが、心拍数に影響を及ぼさなかった。

(3) ウサギ摘出耳介血管に対する作用（0.5%溶液の動脈内注入）

N-アセチルシステイン 0.5%溶液の 0.1mL 注入は流量に影響を及ぼさなかった。

3) 自律神経系及び平滑筋に及ぼす影響

(1) モルモット摘出回腸に対する作用（10^{-6} 及び 10^{-4}M）

N-アセチルシステインの 10^{-6}、10^{-4}M 群はアセチルコリン収縮に影響を及ぼさなかった。

(2) ラット摘出子宮に対する作用（10^{-6} 及び 10^{-4}M）

N-アセチルシステインの 10^{-6}、10^{-4}M 群はアセチルコリン収縮に影響を及ぼさなかった。

(3) ウサギ瞳孔径に対する作用（3%溶液の点眼投与）

N-アセチルシステイン 3%溶液の点眼投与は影響を及ぼさなかった。

4) 消化器系に及ぼす影響(炭末法、100 及び 500mg/kg の皮下投与)

N-アセチルシステインの 500mg/kg 群では小腸炭末輸送能を抑制した。

5) 局所麻酔作用（3%溶液の点眼投与）

N-アセチルシステイン 3%溶液の点眼はモルモット角膜反射に影響を及ぼさなかった。