

性肺損傷マウスモデルを確立した。塩酸投与12時間後に BAL 中総細胞数ならびに好中球の増加を認めたが、RvE1 投与群においてはその増加が抑制された(総細胞数  $12.1 \pm 1.1$  vs  $6.4 \pm 1.0 \times 10^4$  cells, 各  $n=5$ ,  $p < 0.01$ ; 好中球数  $6.0 \pm 0.9$  vs  $2.5 \pm 0.8 \times 10^4$  cells,  $p < 0.01$ )。またこの時の HMGB1 の BAL 中濃度は RvE1 投与群では非投与群と比較して明らかに抑制されていた( $30.9 \pm 3.5$  vs  $15.0 \pm 2.5$  pg/ml, 各  $n=5$ ,  $p < 0.01$ )。

#### D. 考察

これまで多くの ALI/ARDS に対する基礎的研究は acute phase に対する炎症の制御に主眼が置かれて研究が行われてきた。しかし HMGB1 のように late phase に関与すると言われている分子の制御が新たな治療の鍵となる可能性が考えられる。そこで今回我々は ALI/ARDS を間接的ならびに直接的肺傷害の検討を行うために敗血症モデルならびに誤嚥性肺炎モデルを作成し、それぞれの病態における HMGB1 の制御について検討した。

はじめに、盲腸結紮穿刺による腹膜炎によって間接的に肺障害が誘発されるラット CLP モデルを用いて中和抗体による HMGB1 遮断の効果、および、臨床応用の可能性に関する検討を行った。

本動物実験において、抗生剤投与を併用せずに抗 HMGB1 抗体投与のみによって盲腸結紮穿刺ラットの血清 HMGB1 濃度を低下させ、炎症局所および遠隔臓器である肺障害を軽減し、生存率を有意に改善できること、および、HMGB1 は後期メディエーターといわれているが、モデル作製 4 時間後という比較的早期においてさえ血中濃度が著明に上昇し得ることを明らかにした。

今回、敗血症モデル作製 15 分後に抗 HMGB1 抗体を投与し、敗血症に伴う間接的肺障害を軽減することができた。我々の以前の研究結果(Suda K, et al. Dis Esophagus 2006.)では、HMGB1 は後期メディエーターであり、食道癌根治術後、IL-1 $\beta$  や IL-6 に遅れて血中に出現するため、メディエーター修飾

療法の標的として、炎症性サイトカインより幅広い治療のタイミングを有すると考えられる。副腎皮質ステロイドやウリナスタチン、メシル酸ガベキセート等、これまで食道癌根治術後におけるメディエーター修飾療法として有用性が報告されてきた薬剤はすべて術前投与のみが有効であった。本動物実験において、モデル作製後の投与により血中濃度、肺障害、生存率を改善できたことから、食道癌術前あるいは術後早期における抗 HMGB1 療法の施行によって、食道癌根治術手術侵襲による間接的肺障害を予防・軽減できる可能性が考えられる。

HMGB1 は後期メディエーターと呼ばれている。Wang H. 等の報告によると、血清 HMGB1 濃度は、LPS 投与マウスにおいてはモデル作製 8 時間後から、盲腸結紮穿刺マウスにおいてはモデル作製 18 時間後から上昇し、いずれのモデルにおいてもモデル作製 24 時間後に抗 HMGB1 抗体を投与しても生存率を有意に改善することができた。本動物実験にて用いた改良型盲腸結紮穿刺ラットにおいて、モデル作製 4 時間後という早い時点から血清 HMGB1 濃度が上昇した原因として、種差や抗生剤を投与していなかったこと等が考えられる。一方で、肝虚血再灌流モデルマウスにおいては、血清 HMGB1 濃度はモデル作製 6 時間後から上昇したという報告もあり、種差や抗生剤非投与のみならず、侵襲の種類や程度によって血清中に HMGB1 が出現してくるタイミングは変わり得ると考えられる。今回は採血量の問題から TNF $\alpha$  や IL-1 $\beta$ 、IL-6 等の炎症性サイトカインは測定しなかったが、おそらく、いずれのモデルにおいても炎症性サイトカインに遅れて HMGB1 が血清中に出現してくるという sequence は普遍的であり、その意味で HMGB1 は後期メディエーターであると考えられる。

特異的好中球エラスターゼ阻害薬であるシベレスタットナトリウムは、全身性炎症反応症候群(systemic inflammatory response syndrome: SIRS)に伴う肺結合組織の分解を抑制し、さらに肺

血管透過性の亢進を抑制することによって肺機能の改善効果を示すことが知られている。シベレスタットの効果発現に HMGB1 を介した機序が関与している可能性があると考え、改良型 CLP ラットを用いて敗血症に対するシベレスタットナトリウム投与の有効性に関する基礎的検討を行った。その結果、シベレスタット投与により、血清中の IL-10 濃度のみならず、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 濃度もまた低下し、それに遅れて HMGB1 濃度も低下する傾向を示した。シベレスタットが直接的に HMGB1 の炎症局所における発現や血中への出現を抑制するか否かについては不明であるが、敗血症に対するシベレスタットナトリウム投与は、敗血症における SIRS の病態を改善し、血清 HMGB1 濃度を低下させ、肺における IL-8 や HMGB1 の発現を抑制し、肺を中心とした重要臓器障害を抑制し、生存率を改善する可能性が示唆された。

以上、2つの動物実験による検討の結果から、血清 HMGB1 濃度を低下させる治療法が、敗血症のみならず、手術、外傷など種々の侵襲による SIRS から多臓器不全への病態進展の予防に有効である可能性が考えられた。今後、HMGB1 吸着カラムによる急性血液浄化療法の開発等、さらなる研究が期待される。

次に炎症収束に関与するといわれている抗炎症性脂質メディエーターのひとつである RvE1 を acute phase に投与することで炎症の回復が促進され、その一環として HMGB1 の局所での産生も抑制されるのではないかと考え肺直接的障害である誤嚥性肺炎モデルを用いて検討した。結果 RvE1 は好中球の集積ならびに HMGB1 の産生を抑制することが明らかになった。活性化されたマクロファージから HMGB1 の産生や好中球の遊走、活性化に関与する IL-8、TNF- $\alpha$ 、IL- $\beta$ などのメディエーターが産生されることが知られている (Andersson U, J Exp Med, 2000; Aldrige, AJ, Eur. J. Surg., 2002.)。今回の結果から RvE1 がマクロファージの活性化を抑制することで、HMGB1 の産生ならびにこれらのメデ

ィエーターの産生を抑制しその結果として好中球の気道腔内への集積が抑制された可能性が示唆された。今後実際にこれらメディエーターの測定ならびに肺胞マクロファージを用いた in vitro での検討を重ねその作用機序を明らかにしていく予定である。

## E. 結論

今年度研究の結果として

(1) ALI/ARDS 間接的肺傷害のモデルとして腹膜炎後敗血症動物を作成し、これを用いて抗 HMGB1 抗体の有効性を検討した結果、血清中 HMGB1 の抑制ならびに生存率の改善を示した。

(2) 更に同モデルに対して好中球エラストラーゼ阻害薬シベレスタットナトリウムを用いたところ投与群において肺での炎症細胞、HMGB1 陽性細胞数の抑制ならびに生存率の有意な改善を認めた。

(3) ALI/ARDS 直接的肺傷害のモデルとして塩酸投与による誤嚥性肺炎動物モデルを作成し、これに対して炎症収束に関与する抗炎症性脂質メディエーター RvE1 を投与したところ、好中球の気道内集積ならびに HMGB1 産生の抑制を認めた。

以上より HMGB1 の制御によって ALI/ARDS 病態の改善の可能性が示唆された。今後更に詳細な検討を加えそれぞれの作用機序を明らかにしていくことで本疾患に対して新たなる治療戦略への確立につながることを期待している。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究業績

### 1. 論文発表

1. Anti-High-Mobility Group Box Chromosomal Protein 1 Antibodies Improve Survival of Rats with Sepsis. Koichi Suda, Yuko Kitagawa, Soji Ozawa, Yoshiro Saikawa, Masakazu Ueda, Masahito Ebina, Shingo Yamada, Satoru Hashimoto, Shinji Fukata, Edward Abraham,

Yosuke Funakoshi, Satoru Hashimoto, Ikuro Maruyama, Masaki Kitajima, Akitoshi Ishizaka

World Journal of Surgery, 30, 1755-1762, 2006

## 2. 学会発表

1. 須田康一, 北川雄光, 小澤壯治, 宮庄拓, 岡本実, 才川義朗, 田坂定智, 田淵悟, 安藤崇史, 平岩訓彦, 横田博, 石坂彰敏, 北島政樹: 好中球エラスターゼ阻害薬によるケミカルメディエーター制御～基礎的および臨床的検討～. 第42回日本腹部救急医学会総会, 東京, 2006.

2. 須田康一, 北川雄光, 小澤壯治, 宮庄拓, 岡本実, 才川義朗, 田坂定智, 田淵悟, 安藤崇史, 平岩訓彦, 横田博, 石坂彰敏, 北島政樹: 敗血症に対する好中球エラスターゼ阻害薬投与の効果～動物モデルを用いた検討～. 第106回日本外科学会定期学術集会, 東京, 2006.

3. 須田康一, 北川雄光, 小澤壯治, 宮庄拓, 岡本実, 才川義朗, 上田政和, 横田博, 石坂彰敏, 北島政樹: Septic lung に対する好中球エラスターゼ阻害薬投与の効果～動物モデルを用いた検討～. 第61回日本消化器外科学会定期学術総会, 横浜, 2006.

5. 須田康一, 北川雄光, 竹内裕也, 宮庄拓, 岡本実, 福永興壺, 小澤壯治, 横田博, 石坂彰敏, 北島政樹: High-mobility group box chromosomal protein 1 (HMGB1)を標的とした高度な外科的侵襲に伴う急性肺損傷の予防と対策～基礎的および臨床的検討～. 第19回日本外科感染症学会総会, 東京, 2006.

6. 須田康一, 北川雄光, 竹内裕也, 宮庄拓, 岡本実, 才川義朗, 福永興壺, 小澤壯治, 横田博, 石坂彰敏, 北島政樹: High-mobility group box chromosomal protein 1 (HMGB1)を標的としたケミカルメディエーター制御～基礎的および臨床的検討～. 第107回日本外科学会定期学術集会, 大阪, 2007.

7. 須田康一, 北川雄光, 竹内裕也, 宮庄拓, 岡本実, 福永興壺, 石川廣記, 横田博, 石坂彰敏, 北島政樹: HMGB1を指標としたラット体外循環モデルの侵襲評価. 第62回日本消化器外科学会定期学術総会, 東京, 2007.

## 国外

1. Koichi Suda, Yuko Kitagawa, Soji Ozawa, Taku Miyasho, Minoru Okamoto, Shingo Yamada, Yoshiro Saikawa, Masakazu Ueda, Sadatomo Tasaka, Hiroshi Yokota, Ikuro Maruyama, Akitoshi Ishizaka, Masaki Kitajima.: Neutrophil elastase inhibitor (Sivelestat) suppresses HMGB1 expression in lungs and improves survival of rats with sepsis. EMBO (European Molecular Biology Organization) Workshop On Innate Danger Signals and HMGB1, Milano, Italy, February 8-11, 2006.

2. Koichi Suda, Yuko Kitagawa, Soji Ozawa, Taku Miyasho, Minoru Okamoto, Yoshiro Saikawa, Masakazu Ueda, Sadatomo Tasaka, Satoshi Tabuchi, Takashi Ando, Kunihiko Hiraiwa, Hiroshi Yokota, Akitoshi Ishizaka, Masaki Kitajima: Effect of neutrophil elastase inhibitor (Sivelestat) treatment for postoperative clinical courses after transthoracic esophagectomy. 10th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus, Adelaide, South Australia, February 22-25, 2006

H. 知的財産権の出願。登録状況（予定を含む）  
特に無し

## HMGB-1除去カラム、抗体療法によるショック治療法の開発

野口 隆之 大分大学医学部・脳・神経機能統御講座・教授

### 研究要旨

ラット敗血症モデルを用いて HMGB1 の制御により、敗血症の治療効果が得られるかを検討する。制御法としては血液吸着療法による血液中からの除去療法を吸着カラムにて実施することを中心に検討する。

#### A. 研究目的

敗血症は現在も救急集中治療領域では難治性の高い疾患である。この原因の一つに致死性因子である HMGB1 が関連していることが指摘されている。HMGB1 を吸着カラムを使用することで血液中から除去し、新たな治療法の開発による救命率の向上に繋げることを目的とする。

#### B. 研究方法

HMGB1 吸着カラムを作成し、非吸着カラム、空カラム（体外循環の影響をみるもの）と比較検討する。LPS 投与によりラットエンドトキシンモデルを用いて HMGB1 吸着カラムの血中 HMGB1 濃度、生存率への影響を検討した。

#### C. 研究結果

HMGB1 吸着カラムは非吸着カラム、空カラムに比し LPS 投与による血中 HMGB1 の上昇を抑制することができた。また非吸着カラム、空カラムのラット生存率が 11%, 0%であったのに対して吸着カラムでは生存率を 66.7%にまで改善できた。

#### D. 考察

敗血症により血中 HMGB1 が上昇してくるが、この HMGB1 を吸着カラムを用いて除去することで血中

HMGB1 濃度の上昇が抑制できた。がある。またこの抑制は生存率の改善にも繋がった。従ってヒトでの吸着カラムの開発は敗血症の新たな救命療法になると考えられる。

#### E. 結論

HMGB1 吸着カラムはラットエンドトキシンモデルの生存率が改善でき、有効でありヒトへの開発応用が期待できる。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究業績

1. 論文発表
2. 学会発表

Iwasaka H: New therapeutic approach for sepsis with HMGB1 absorber. 6th World Congress of International Society for Apheresis. World Apheresis Association 11th Congress, 27th Annual Meeting of the Japanese Society for Apheresis (2007)

- #### H. 知的財産権の出願。登録状況（予定を含む）
- 特に無し

## アセチル化／脱アセチル化によるHMGB1の機能変換の分子機構の解明

中島 利博

聖マリアンナ医科大学・難病治療研究センター ゲノム医科学研究部門・教授

### 研究要旨

炎症の後期メディエーターとして知られるようになった HMGB1 は、壊死細胞からの受動的放出とマクロファージや単球細胞などからの能動的分泌の2つの経路により細胞外へと移行する。この2つの経路における HMGB1 には修飾の違いが報告されている。具体的には受動的放出では HMGB1 はアセチル化されず、能動的分泌では HMGB1 はアセチル化されている。HMGB1 の配列中にはいくつかアセチル化される部位があるが、その内の1つは HMGB1 のレセプターの1つ RAGE の認識部位と重なっている。つまり受動的に放出される HMGB1 と能動的に分泌される HMGB1 の間に機能的な差異が存在する可能性がある。そこで本研究では、マウス個体レベルにおける HMGB1 のアセチル化修飾の意義を検証するため、各種 HMGB1 トランスジェニックマウスを作製している。

### A. 研究目的

HMGB1 配列中の RAGE 認識部位のリジン残基は、能動的に分泌される際にアセチル化される (Bonaldi et. al. EMBO J 2003)。このアセチル化はリジン残基の電荷を変化させ、RAGE との結合力も変化すると予想されるが、これまで細胞外へ移行した後の HMGB1 のアセチル化修飾について検討した報告はない。そこで本研究では、敗血症など、HMGB1 関連疾患における HMGB1 アセチル化修飾の意義をマウス個体レベルで解析する。

### B. 研究方法

長い HMGB1 研究の歴史の中でトランスジェニックマウスの報告がないことから、HMGB1 の強制発現が致死的可能性と強制発現をさせても細胞外への放出が起らず表現形に変化がない可能性が予想された。そこでこれらの可能性を回避するため、HMGB1 の遺伝子を薬剤誘導性プロモーターの下流に配置し、さらに強制分泌が可能ないように分泌

シグナルを付加した遺伝子を構築した。さらに焦点のアセチル化部位に関しては、非アセチル化型の変異とアセチル化状態を模倣する擬アセチル化型の変異を導入した遺伝子を構築した。

### C. 研究結果

培養細胞レベルにおいて構築した各 HMGB1 遺伝子は薬剤（テトラサイクリン）により発現誘導可能であった。現在、マウスへ導入する HMGB1 遺伝子の発現制御のために、テトラサイクリンリプレッサー（TetR）を発現するマウスを作製し、TetR の発現確認を行っている。

### D. 考察

培養細胞レベルで HMGB1 のアセチル化について市販の抗体を用いて試験を行ったが検出されなかった。アセチル化を認識する特異抗体の作製が必要であると考えられた。

## E. 結論

培養細胞レベルでは HMGB1 遺伝子の発現制御が可能であり、初の HMGB1 トランスジェニックマウスの作製が期待される。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究業績

### 1. 論文発表

1. Wu W, Nishikawa H, Hayami R, Sato K, Honda A, Aratani S, Nakajima T, Fukuda M, Ohta T. BRCA1 Ubiquitinates RPB8 in Response to DNA Damage. *Cancer Res* 67(3): 951-58. 2007
2. Satoshi Yamasaki, Naoko Yagishita, Takeshi Sasaki, Minako Nakazawa, Yukihiko Kato, Tadayuki Yamadera, Eunkyung Bae, Sayumi Toriyama, Rie Ikeda, Lei Zhang, Kazuko Fujitani, Eunkyung Yoo, Kaneyuki Tsuchimochi, Tomohiko Ohta, Natsumi Araya, Hidetoshi Fujita, Satoko Aratani, Katsumi Eguchi, Setsuro Komiya, Ikuro Maruyama, Nobuyo Higashi, Mitsuru Sato, Haruki Senoo, Takahiro Ochi, Shigeyuki Yokoyama, Tetsuya Amano, Jaeseob Kim, Steffen Gay, Akiyoshi Fukamizu, Kusuki Nishioka, Keiji Tanaka and Toshihiro Nakajima "Cytoplasmic destruction of p53 by the endoplasmic reticulum-resident ubiquitin ligase 'Synoviolin'. " *The EMBO Journal* 26:113-122 2007
3. Satoshi Yamasaki, Naoko Yagishita, Kaneyuki Tsuchimochi, Yukihiko Kato, Takeshi Sasaki, Tetsuya Amano, Moroe Peppu, Haruhito Aoki, Hiroshi Nakamura, Kusuki Nishioka and Toshihiro Nakajima "Resistance to endoplasmic reticulum stress is an acquired cellular characteristic of rheumatoid synovial cells " *International Journal of Molecular Medicine*. 18:113-117 2006
4. Tomoo Sato, Koji Konomi, Satoshi Yamasaki, Satoko Aratani, Kaneyuki Tsuchimochi, Masahiro Yokouchi, Kayo Masuko-Hongo, Naoko Yagishita, Hiroshi Nakamura, Setsuro Komiya, Moroe Beppu, Haruhito Aoki, Kusuki Nishioka, Toshihiro Nakajima. "Comparative Analysis of Gene Expression Profiles in Intact Versus Damaged Regions of Human Osteoarthritic Cartilage " *Arthritis and Rheumatism* 54 (3) : 808-817 2006.3
5. Naoko Yagishita, Satoshi Yamasaki, Kusuki Nishioka and Toshihiro Nakajima. "Role of Synoviolin in rheumatoid arthritis: possible clinical relevance" *Future Rheumatology* 1(1):31-36 2006
6. Satoko Aratani, Takayuki Oishi; Hidetoshi Fujita, Minako Nakazawa, Ryouji Fujii, Naoko Imamoto, Yoshihiro Yoneda, Akiyoshi Fukamizu, Toshihiro Nakajima "The nuclear import of RNA helicase A is mediated by importin- $\alpha$ 3" *Biochemical and Biophysical Research Communications* 340:125-133 2006

### II. 知的財産権の出願。登録状況（予定を含む） 特に無し

## 救急頭部外傷患者における血中・髄液中HMGB1の動態と生命予後

前川剛志 山口大学大学院医学系研究科救急・生体侵襲制御医学・教授

### 研究要旨

重症頭部外傷症例は多部位の外傷を合併して来院することが多い。脳局所挫傷部位の傷害はもとより、その周辺は出血や虚血、低酸素で二次的にも傷害・修飾される。本年はラットで頭部外傷モデルを確立すると共に、臨床症例でくも膜下出血、心肺停止蘇生後を中心として HMGB1 を測定し、急性中枢神経障害の病態への関与を調べた。本研究では weight drop 法によりラットの頭部外傷モデルを確率した。また臨床症例における急性重症中枢神経障害時における血液や髄液の HMGB1 を測定し、その経日的変化、上昇度と神経障害の病態との関係、患者の生命予後との関連について検討を行った。その結果、神経学的に異常のないヒト CSF 中には HMGB1 は存在せず、くも膜下出血術後患者および心肺停止蘇生後患者の CSF 中で上昇し、中枢神経障害時の病態と密接に関連することがわかった。また、心肺停止蘇生後 48 時間の CSF 中では HMGB1 は著明に上昇し、中枢神経障害の予後予測マーカーとして有用であると考えられた。今後、確立したラット頭部外傷モデルで HMGB1 関連脳障害に対するトロンボモジュリン等による治療効果を検討する。また重症頭部外傷患者で HMGB1 を測定する。

### A. 研究目的

HMGB1 の生体侵襲への関与を検討する。重症中枢神経障害をきたす主な疾患として、頭部外傷、脳卒中、心肺停止蘇生後などがあげられる。各病態で二次的中枢神経障害の根幹をなすものは、様々な形での脳虚血や脳内に出血した血液であることが指摘されている。本研究では、動物実験による頭部外傷時の HMGB1 の検討と、臨床症例における各急性中枢神経障害時の血液や脳脊髄液 (CSF) の HMGB1 を測定し、頭部外傷を含む急性重症中枢神経障害における HMGB1 の動態と生命予後を検討する。

### B. 研究方法

ラットの頭部外傷モデルは全身麻酔、人工呼吸下に血圧、血液ガス等をモニターし、頭部をステレ

オタキックフレームに固定して、weight drop 法で作成した。

臨床では重症脳障害患者の研究に関して、そのプロトコルを本院の医薬品等治験・臨床研究等審査委員会で承認を得て、本人または代諾者のインフォームドコンセントを得た。本年度は頭部外傷患者数が多く得られなかったため、くも膜下出血患者、心肺停止患者の脳脊髄液 (CSF) または、血液で HMGB1 を ELISA キットにより測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験については本学の生命科学実験施設に動物実験使用に関する倫理委員会の承認を得て実施した。臨床研究については本院の医薬品等治験・臨床研究審査委員会で承認された同意説明書を代諾者に示し、文書および口頭による十分な説

験・臨床研究審査委員会で承認された同意説明書を代諾者に示し、文書および口頭による十分な説明を行い、代諾者の自由意志による同意を文書で得た。

### C. 研究結果

本年度はラットの頭部外傷モデルを確立できた。頭部外傷では外傷性くも膜下出血、外傷脳局所およびその周辺脳組織の虚血が起こるので、前者ではくも膜下出血患者 16 例で、後者では心肺停止蘇生後患者 13 例で HMGB1 を測定した。

図 1 にくも膜下出血クリッピング術後患者 CSF 中の HMGB1 の経日的な変動を示す。対照群の HMGB1 は測定限界以下であったが、くも膜下出血患者群では第 3 病日、第 7 病日まで高値を示し、第 14 病日でも検出された。しかし、くも膜下出血後の脳血管攣縮と HMGB1 との関連は認めなかった。

心肺停止蘇生後患者予後良好群と予後不良群における動脈血、内頸静脈血、CSF の HMGB1 の値をそれぞれ表 1, 2, 3 に示す。動脈血中 HMGB1 は心肺蘇生後 6 時間、24 時間に上昇し、48 時間後には正常化した。内頸静脈血中 HMGB1 は予後良好群では 6, 24 時間に上昇し、48 時間後に正常化した。予後不良群では 6 時間後に上昇し、24 時間後には正常化し、48 時間後には再上昇する傾向がみられた。CSF は 48 時間後にのみ、HMGB1 を測定したが、6 ヶ月後の予後良好群では、対照群と有意差がなかったが、予後不良群では顕著な上昇を示した。

以上の結果より、侵襲の運命決定因子 HMGB1 は急性中枢神経障害の予後判定マーカーとして有用であることが示唆された。

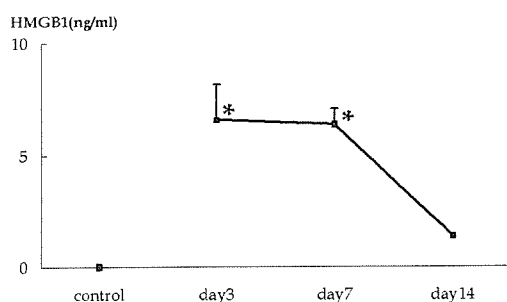


Figure 1

(図 1) Elevation of HMGB1 in CSF of Post-operative SAH patients.

(表 1)

Dirrefence of HMGB1 by Neurological Outcome in Cardio-Pulmonary Resuscitated Patients

Arterial Blood	(ng/ml) Mean ± SD		
	6hr	24hr	48hr
Control (n=35)	3.9 ± 3.8	3.9 ± 3.8	3.9 ± 3.8
Good Outcome (n=6)	8.8 ± 6.7	11.5 ± 3.1	1.9 ± 1.4
Poor Outcome (n=7)	8.2 ± 6.8	8.1 ± 12.5	3.2 ± 2.1

(表 2)

Dirrefence of HMGB1 by Neurological Outcome in Cardio-Pulmonary Resuscitated Patients

Internal Jugular Blood	(ng/ml) Mean ± SD		
	6hr	24hr	48hr
Control (n=35)	3.9 ± 3.8	3.9 ± 3.8	3.9 ± 3.8
Good Outcome (n=5)	11.9 ± 6.2	10.7 ± 4.7	5.5 ± 9.6
Poor Outcome (n=5)	7.4 ± 6.0	2.8 ± 3.4	6.8 ± 3.6

(表 3)

Dirrefence of HMGB1 by Neurological Outcome in Cardio-Pulmonary Resuscitated Patients

Cerebro-Spinal Fluid	(ng/ml) Mean ± SD
	48hr
Control (n=35)	0.4 ± 0.4
Good Outcome (n=5)	0.2 ± 0.4
Poor Outcome (n=7)	34.0 ± 43.4

Good Outcome : GR, MD, Poor Outcome : SD, VS, Death by GOS, Control : Peripheral venous blood

### D. 考察

#### 1) 達成度

当初の計画ではラット頭部外傷モデルで HMGB1 の中枢神経障害における病態との関わりを検討し、リコンビナント・トロンボモジュリンによる治療効果を見る予定であったが、本年度はモデルの作成のみに終わった。しかし、ヒトのくも膜下出血、心肺停止 (全脳虚血)・蘇生後という急性重症脳障害患者の脳脊髄液中 HMGB1 の上昇が予後予測因子となり得ることを証明し、その分意義は非常に大きかった。

#### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について



急性中枢神経障害患者の CSF で HMGB1 を測定した報告はなく、これらの結果は学術的・国際的に高く評価されると思われる。また、HMGB1 がこれらの患者の予後予測因子となり得るので、患者の治療方針を立てる上で非常に有用であり、その社会的意義は非常に高い。

### 3) 今後の展望

HMGB1 が急性中枢神経障害の病態に深く関わり、その濃度上昇が神経細胞死に影響する可能性が高くなったので、本年度確率できたラット頭部外傷モデルを用いて、当初の計画を進める。即ちリコンビナント・トロンボモジュリンや各種抗体を用いて、HMGB1 に関連する障害に対する治療効果を検討する。

## E. 結論

本年度の研究では HMGB1 は神経学的に異常のないヒト CSF 中には存在せず、くも膜下出血術後患者および心肺停止蘇生後患者の CSF 中で上昇した。すなわち、HMGB1 は急性中枢神経障害時の病態と密接に関連することが分かった。また、心肺停止・蘇生後 48 時間の CSF 中では著明に上昇し、6 ヶ月後の中枢神経障害の予後予測マーカーとして利用し得ることを証明した。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究業績

### 1. 論文発表

特に無し

### 2. 学会発表

特に無し

## H. 知的財産権の出願。登録状況（予定を含む）

特に無し

免疫細胞におけるHMGB1の発現と拒絶反応の関連の解明。  
HMGB1への介入による拒絶反応の制御法の開発に関する研究

安波 洋一 福岡大学医学部・助教授

研究要旨

HMGB1 が膵島移植拒絶反応に必須の役割を担っており、HMGB1 を標的にした治療法、抗 HMGB1 抗体投与により拒絶反応が制御できることが明らかとなった。

A. 研究目的

免疫細胞における HMGB1 の発現と拒絶反応との関連を解明し、HMGB1 への介入による拒絶反応の制御法を開発する。

B. 研究方法

拒絶反応に於ける HMGB1 の役割をマウス肝内膵島移植の実験系で解析した。

（倫理面への配慮）

本研究プロジェクトは福岡大学アニマルセンター動物実験倫理委員会で承認された。

C. 研究結果

マウス肝内同種同系膵島移植の実験系で肝内での早期移植膵島障害にNK T細胞、Gr-1+CD11b+細胞が、また effector molecule としては炎症性サイトカイン、NOが必須の役割を果たしていることが判明した。また、抗 HMGB1 抗体で早期移植膵島障害が制御できることが判明した。

D. 考察

インスリン依糖尿病の新規治療法として膵島細胞移植の臨床応用が開始されている。拒絶反応による移植膵島障害が臨床膵島移植の最大の課題であるが、本研究成果はその新規制御法となる可能

性が高く、臨床膵島移植の成績向上に大きく寄与する事が期待される。

E. 結論

HMGB1 を標的にした新規治療法の臨床導入により、膵島移植の治療成績の向上が期待できることが示唆された。今後は前臨床試験としての大動物を用いた研究が必要となる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究業績

1. 論文発表

1. T Iwai, Y Tomita, I Shimizu, Y Yasunami, T Kajiwara, S Okano, M Yoshikai, M Taniguchi, K Nomoto, H Yasui. Regulatory roles of NKT cells in the induction and maintenance of cyclophosphamide-induced tolerance. J Immunol 177(12): 8400-8409. 2006

H. 知的財産権の出願。登録状況（予定を含む）

発明の名称：抗 HMGB1 抗体を含む臓器移植拒絶抑制剤  
出願日：2007/2/15 出願番号：2007-34280  
発明者：安波洋一、丸山征郎、山田晋吾  
特許出願人：福岡大学、鹿児島大学、シノテスト

## HMGB1の細胞外放出の分子機構とその制御法の研究 特にSNARE, NO分子との関係に関する研究

松下 健二 国立長寿医療センター研究所・口腔疾患研究部・部長

### 研究要旨

血管内皮細胞における HMGB1 の放出制御を一酸化窒素 (NO) および N-エチルマレイミド感受性因子 (NSF) を標的として試みた。その結果、HMGB1 の放出は、NOS 阻害剤 および NSF 阻害剤で抑制されなかった。また、HMGB1 は NO の過剰産生を誘導し、組織傷害を引き起こす可能性が示唆された。

### A. 研究目的

HMGB1 と一酸化窒素 (NO) との関連性を血管内皮細胞培養系を用いて検討する。次いで一酸化窒素 (NO) および、N-エチルマレイミド感受性因子 (NSF) を分子標的とした HMGB1 の放出制御の可能性を検討することを目的とした。

### B. 研究方法

動脈由来血管内皮細胞 (HAEC) を低酸素条件下で培養したときの、HMGB1 の放出と NO および NO 合成酵素発現との関連性を ELISA, western blot、および RT-PCR 法で検討した。C57/B6 マウス、iNOS KO マウス、および eNOS KO マウスの片側総頸動脈を結紮し、脳血管性認知症モデルを作成した。次いで、抗 HMGB1 抗体による脳壊死の抑制効果および NO の関与を組織化学的に検討した。

(倫理面への配慮)

本研究で用いる遺伝子操作や疾患モデル動物については、所属研究機関の各専門委員会の承認を受けて行った。また、疾患モデル動物の処置については動物愛護精神にのっとり慎重に行った。剖検脳の解析にあたっては所属研究機関の倫理委員会の承認を得て行った。

### C. 研究結果

低酸素下で HAEC を培養すると、1 時間以内に HMGB1 の放出がみられた。低酸素下で誘導される HMGB1 の放出は、NOS 阻害剤 L-NANE あるいは NSF 阻害剤 (TAT-NSF800) で抑制されなかった。HMGB1 は血管内皮細胞培養系において iNOS および NO を強く誘導した。脳虚血モデルマウスの血清中に、経時的に HMGB1 の増加が認められた。また、同血清中に NOx の上昇が認められた。脳虚血マウスにおける脳組織傷害は、抗 HMGB1 抗体の投与で軽減された。さらに、iNOS KO マウスにおける脳虚血では、野生型マウスのそれに比べて有意に脳組織の壊死が軽減された。

### D. 考察

HMGB1 の放出機序は未だ不明な点が多いが、NO および NSF はその放出制御に関わっていない可能性が示唆された。さらに、HMGB1 によって誘導される過剰の NO は、低血圧、脳循環障害を引き起こし、脳虚血における脳障害を増悪する可能性が考えられた。

#### E. 結論

血管内皮細胞からの HMGB1 の放出は、NO および NSF によって制御されていない。また、脳虚血時に放出される HMGB1 は NO の過剰産生を促し、脳障害を増悪している可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究業績

特に無し

#### H. 知的財産権の出願。登録状況（予定を含む）

特に無し

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

1. M. Watanabe, N. Hasegawa, A. Ishizaka, K. Asakura, Y. Izumi, K. Eguchi, M. Kawamura, H. Horinouchi, **K. Kobayashi**. Early Pulmonary Resection for *Mycobacterium Avium* Complex Lung Disease Treated With Macrolides and Quinolones. *Ann Thorac Surg*. 81(6): 2026-30. 2006
2. H. Horinouchi, K. Asakura, Y. Kimura, K. Takeuchi, M. Kawamura, M. Watanabe, K. Eguchi, **K. Kobayashi**. [Prognosis of surgically treated thymic epithelial tumors] *Nippon Geka Gakkai Zasshi*. 107(6): 262-7. 2006
3. Anti-High-Mobility Group Box Chromosomal Protein 1 Antibodies Improve Survival of Rats with Sepsis. Koichi Suda, Yuko Kitagawa, Soji Ozawa, Yoshiro Saikawa, Masakazu Ueda, Masahito Ebina, Shingo Yamada, Satoru Hashimoto, Shinji Fukata, Edward Abraham, Yosuke Funakoshi, Satoru Hashimoto, **Ikuro Maruyama**, Masaki Kitajima, **Akitoshi Ishizaka**. *World Journal of Surgery*, 30, 1755-1762, 2006
4. Wu W, Nishikawa H, Hayami R, Sato K, Honda A, Aratani S, **Nakajima T**, Fukuda M, Ohta T. BRCA1 Ubiquitinates RPB8 in Response to DNA Damage. *Cancer Res* 67(3): 951-58. 2007
5. Satoshi Yamasaki, Naoko Yagishita, Takeshi Sasaki, Minako Nakazawa, Yukihiro Kato, Tadayuki Yamadera, Eunkyung Bae, Sayumi Toriyama, Rie Ikeda, Lei Zhang, Kazuko Fujitani, Eunkyung Yoo, Kaneyuki Tsuchimochi, Tomohiko Ohta, Natsumi Araya, Hidetoshi Fujita, Satoko Aratani, Katsumi Eguchi, Setsuro Komiya, Ikuro Maruyama, Nobuyo Higashi, Mitsuru Sato, Haruki Senoo, Takahiro Ochi, Shigeyuki Yokoyama, Tetsuya Amano, Jaeseob Kim, Steffen Gay, Akiyoshi Fukamizu, Kusuki Nishioka, Keiji Tanaka and **Toshihiro Nakajima** "Cytoplasmic destruction of p53 by the endoplasmic reticulum-resident ubiquitin ligase 'Synoviolin'. " *The EMBO Journal* 26:113-122 2007
6. Satoshi Yamasaki, Naoko Yagishita, Kaneyuki Tsuchimochi, Yukihiro Kato, Takeshi Sasaki, Tetsuya Amano, Moroe Peppu, Haruhito Aoki, Hiroshi Nakamura, Kusuki Nishioka and **Toshihiro Nakajima** "Resistance to endoplasmic reticulum stress is an acquired cellular characteristic of rheumatoid synovial cells " *International Journal of Molecular Medicine*. 18:113-117 2006
7. Tomoo Sato, Koji Konomi, Satoshi Yamasaki, Satoko Aratani, Kaneyuki Tsuchimochi, Masahiro Yokouchi, Kayo Masuko-Hongo, Naoko Yagishita, Hiroshi Nakamura, Setsuro Komiya, Moroe Beppu, Haruhito Aoki, Kusuki Nishioka, **Toshihiro Nakajima**. "Comparative Analysis of Gene Expression Profiles in Intact Versus Damaged Regions of Human Osteoarthritic Cartilage " *Arthritis and Rheumatism* 54 (3) :808-817. 2006.

8. Naoko Yagishita, Satoshi Yamasaki, Kusuki Nishioka and **Toshihiro Nakajima**. "Role of Synoviolin in rheumatoid arthritis: possible clinical relevance" *Future Rheumatology*. 1(1):31-36.2006
9. Satoko Aratani, Takayuki Oishi; Hidetoshi Fujita, Minako Nakazawa, Ryouji Fujii, Naoko Imamoto, Yoshihiro Yoneda, Akiyoshi Fukamizu, **Toshihiro Nakajima** "The nuclear import of RNA helicase A is mediated by importin- $\alpha$ 3" *Biochemical and Biophysical Research Communications* 340:125-133 2006
10. T Iwai, Y Tomita, I Shimizu, **Y Yasunami**, T Kajiwara, S Okano, M Yoshikai, M Taniguchi, K Nomoto, H Yasui. Regulatory roles of NKT cells in the induction and maintenance of cyclophosphamide-induced tolerance. *J Immunol* 177(12): 8400-8409. 2006
11. Ito T, Kawahara K, Nakamura T, Yamada S, Nakamura T, Abeyama K, Hashiguchi T, **Maruyama I**. High-mobility group box 1 protein promotes development of microvascular thrombosis in rats. *J Thromb Haemost.* 5(1): 109-16. 2007

#### IV. 研究成果の刊行物・別刷



# Early Pulmonary Resection for *Mycobacterium Avium* Complex Lung Disease Treated With Macrolides and Quinolones

Masazumi Watanabe, MD, PhD, Naoki Hasegawa, MD, PhD, Akitoshi Ishizaka, MD, PhD, Keisuke Asakura, MD, Yotaro Izumi, MD, PhD, Keisuke Eguchi, MD, PhD, Masafumi Kawamura, MD, PhD, Hirohisa Horinouchi, MD, PhD, and Koichi Kobayashi, MD, PhD

Departments of Surgery and Internal Medicine, School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan

**Background.** The purpose of this study was to examine the postoperative outcomes of patients with *Mycobacterium avium* complex (MAC) lung lesions persisting despite treatment with multiple antibiotics.

**Methods.** Patients with localized pulmonary lesions persisting despite extensive state-of-the-art antimicrobial chemotherapy became candidates for surgical resection. Twenty-two patients who were expected to retain sufficient postoperative pulmonary function were included in this study. These patients received chemotherapy for 2 to 37 months (mean, 17). Surgical procedures were lobectomy (n = 15), segmentectomy (n = 4), and partial lung resection (n = 6). Three patients underwent bilateral resections.

**Results.** *Mycobacterium avium* complex causing bronchiectasis or cavitory lesions was detected preoperatively in all 22 patients. There was no major operative morbidity or mortality. Postoperative chemotherapy was continued for 6 to 35 months. All patients were alive and well at follow-ups ranging from 6 to 164

months (median, 46). Both vital capacity and forced expiratory volume in 1 second after surgery were maintained at 89% and 84% of the preoperative values, respectively. *Mycobacterium avium* complex disappeared from sputum after surgery in all patients. In 1 patient, 4 months after resection of a cavitory lesion, MAC-positive sputum presumed to be from the contralateral lung lesion became negative during continuation of chemotherapy.

**Conclusions.** The long-term outcomes of patients operated on for MAC resistant to antimicrobial chemotherapy were excellent. For such patients, we recommend surgery before the disease becomes exceedingly advanced and nonresectable. Additionally, in extensive disease, the excision of large cavitory bacterial foci may assist the medical management of contralateral lesions.

(Ann Thorac Surg 2006;81:2026-30)

© 2006 by The Society of Thoracic Surgeons

The detection of nontuberculous mycobacterial lung diseases has improved as a result of advances in diagnostic methods [1, 2]. *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*, generally referred to as the *Mycobacterium avium* complex (MAC), are the most common in Japan. Although MAC has been treated with multiple drugs, including clarithromycin or levofloxacin, cure with medications alone remains difficult to achieve, especially in patients with cavitory or bronchiectatic lesions. Therefore, surgical resection continues to play an important role in the management of this disorder. The aim of this study was to retrospectively examine the outcomes of patients who underwent pulmonary resections for MAC disease.

## Patients and Methods

This study was carried out in accordance with the guidelines set by the Japanese Ministry of Health, Labor, and Welfare. The Institutional Review Board approved this study, and informed consent was waived. Surgical and medical records of all patients who underwent pulmonary resection for MAC pulmonary disease between January 1, 1990, and July 31, 2005, at Keio University Hospital were reviewed. Smears, cultures, and polymerase chain reaction examinations of sputum or bronchial washings were performed before surgery. Samples submitted to the microbiology laboratory were concentrated and decontaminated by standard methods. Smears were screened by both the fluorochrome method and Ziel-Nielsen staining. At the same time, samples were tested by an Amplicor *Mycobacterium* DNA detection kit (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan), and cultured in a liquid medium (BBL MGIT; Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey). Microdilution antimycobacterial susceptibility test, BrothMIC, (Kyokuto

Accepted for publication Jan 5, 2006.

Address correspondence to Dr Watanabe, 35 Shinanomachi, Shinjuku, Tokyo 160-8582, Japan; e-mail: masazumi@sc.itc.keio.ac.jp.

© 2006 by The Society of Thoracic Surgeons  
Published by Elsevier Inc

0003-4975/06/\$32.00  
doi:10.1016/j.athoracsur.2006.01.031

Table 1. Clinical Characteristics of Patients

Patient	Age (years)/ Sex	Diagnostic Manifestation	Pretreatment (Duration, Months)	Main Lesion	Surgical Procedure	Posttreatment (Duration, Months)	Outcomes (Months)
1	34/M	Hemoptysis	INH+RFP+EB 20	Ectasis	R Low Lobectomy	INH+RFP+EB 6	164A
2	51/W	CXR	INH+RFP+CAM+OFLX 30	Ectasis <sup>a</sup>	R Mid Lobectomy+Up Wedge / L lingula segmentectomy+Up Wedge	INH+RFP+CAM 6	101A
3	59/W	Hemoptysis	CAM 12	Ectasis <sup>a</sup>	R Mid lobectomy+Up Wedge	RFP+CAM 12	78A
4	34/W	CXR	INH+RFP+CAM+LVFX 6	Cavity	R Up Wedge/L Up Wedge	INH+RFP+CAM+LVFX 7	73A
5	61/W	Cough, sputum	RFP+INH+CAM 20	Ectasis <sup>a</sup>	R Mid Lobectomy+S6 Wedge	INH+RFP+CAM 7	69A
6	49/W	CXR, hemoptysis	INH+RFP+EB 24	Cavity	R S2 segmentectomy	CAM+EB 7	61A
7	57/M	Sputum	RFP+EB+CAM 6	Ectasis	R Low Lobectomy	RFP+EB 3	59A
8	61/W	CXR	LVFX+CAM 15	Ectasis <sup>a</sup>	R Mid Lobectomy	CAM+LVFX 6	59A
9	55/W	Sputum	INH+RFP+CAM 7	Ectasis	RS6 segmentectomy+Up Wedge	LVFX 6	59A
10	52/W	CXR	CAM+LVFX 7	Ectasis <sup>a</sup>	L Up Wedge/R Mid Lobectomy+Up Wedge	CAM+LVFX 5	51A
11	59/W	Sputum	RFP+EB+CAM+SPFX 37	Cavity	R Up Lobectomy+Low Wedge	RFP+EB+CAM+SPFX_35	46A
12	41/M	CXR	INH+RFP+EB 24	Cavity	R Up Lobectomy	INH+RFP+EB_6	46A
13	63/M	CXR	EB+RFP+CAM 12	Cavity	R Up Wedge	EB+RFP+CAM 6	46A
14	77/M	Cough, sputum	INH+RFP+EB 2	Ectasis	R Up Wedge	INH+RFP+EB 6	36A
15	72/W	CXR	CAM 8	Ectasis <sup>a</sup>	R Mid Wedge	CAM 6	23A
16	58/M	CXR	EB+RFP+CAM 20	Cavity	R S1,2 segmentectomy	CAM 6	22A
17	53/W	Hemoptysis	CAM 33	Ectasis <sup>a</sup>	R Mid Lobectomy	CAM 9	20A
18	37/M	CXR	EB+RFP+CAM+LVFX 14	Cavity	R Up Lobectomy	EB+RFP+CAM+LVFX 6	19A
19	54/W	Hemoptysis	INH+RFP+EB+SM+PZA24_CAM32	Cavity	R Mid Lobectomy+Low Wedge	CAM 6	16A
20	60/W	Sputum	EB+RFP+CAM+LVFX+KM24	Ectasis <sup>a</sup>	R Up+Mid Lobectomy	EB+RFP+CAM6	15A
21	71/W	CXR	CAM+LVFX 20	Ectasis <sup>a</sup>	R Mid Lobectomy+S6 segmentectomy	CAM 6	14A
22	30/W	CXR	EB+RFP+CAM+LVFX+SM 14	Ectasis	R Up Lobectomy	CAM 6	6A

<sup>a</sup> Middle lobe or lingular type.

A = alive; CAM = clarithromycin; CXR = chest roentgenogram; EB = ethambutol; INH = isoniazid; KM = kanamycin; L = left; Low = lower lobe; LVFX = levofloxacin; M = man; Mid = middle lobe; OFLX = ofloxacin; PZA = pirazinamid; R = right; RFP = rifampicin; SM = streptomycin; SPFX = suparfloracin; Up = upper lobe; W = woman; Wedge = wedge resection.

Pharmaceutical Industrial, Tokyo, Japan) was performed to examine drug sensitivity in 9 recent cases. Minimum inhibitory concentrations of 10 drugs were measured.

The surgical indications in this series of patients were (1) MAC disease refractory to multiple drug therapy, including clarithromycin, rifampicin, ethambutol, or levofloxacin; (2) localized pulmonary lesions; and (3) sufficient predictive postoperative pulmonary function.

## Results

### Patient Population

Between January 1, 1990, and July 31, 2005, pulmonary resections for MAC were performed in 15 women and 7

men ranging in age between 30 and 77 years (mean, 54). The main characteristics of the patient population are shown in Table 1. No patients suffered from immunodeficient disorders, such as human immunodeficiency virus. One patient, however, had primary lung cancer combined with MAC pulmonary disease. All patients underwent lung resection to treat MAC disease and not for diagnostic purposes.

### Preoperative Condition and Chemotherapy

Ten asymptomatic patients with abnormal findings on chest roentgenograms at health maintenance examinations were diagnosed with MAC disease. The other 12 patients had symptoms, including productive cough in 6

Table 2. Results of Pulmonary Function Test Before and After Surgery

	Total Cases (n = 18)			Lobectomy <sup>a</sup> (n = 11)		
	Before Surgery	After Surgery	p Value	Before Surgery	After Surgery	p Value
Vital capacity (L)	3.08 ± 0.77	2.74 ± 0.84	0.0001	2.98 ± 0.68	2.73 ± 0.82	0.007
Percent vital capacity (%)	99.4 ± 11.1	92.3 ± 14.2	0.02	95.6 ± 10.3	91.3 ± 14.4	0.21
FEV1.0 (L)	2.34 ± 0.67	1.97 ± 0.65	0.0001	2.33 ± 0.78	1.98 ± 0.70	0.0003
FEV1.0% (%)	72.4 ± 20.7	73.6 ± 10.8	0.82	70.2 ± 25.9	74.0 ± 12.6	0.67

<sup>a</sup> Lobectomy includes both lobectomy and wider resection.

FEV = forced expiratory volume.

and hemoptysis in 6. All patients had either a cavitary or a bronchiectatic lesion on chest computed tomography (CT). The lesions were predominantly cavities in 8 and predominantly bronchiectasis in 14 patients. In 9 women, the lesions were in the middle lobe or the lingular segment, that is, the so-called middle lobe or lingular type.

The MAC infections were confirmed in all patients from cultures or MAC-polymerase chain reaction methods performed in sputum or bronchoalveolar lavage fluid before surgery, according to the criteria of the American Thoracic Society [3]. All patients had received preoperative medications for 2 to 37 months (mean, 17). Clarithromycin was administered in 18 patients, combined with a new quinolone agent such as levofloxacin, ofloxacin or sparfloxacin in 9, and with rifampicin and ethambutol in 6 patients. Single-drug therapy was performed in 3 patients because they refused combined drug therapy because of adverse effects. In 9 recent cases, drugs were selected according to the results of microdilution antimycobacterial susceptibility test.

The performance status at the time of surgery was 0 in 19 patients and 1 in 3 patients.

#### Medical Therapy in Our Hospital

The outline of MAC medical therapy at the outpatient clinic of internal medicine in the recent 5-year period is as follows. Patients who were found at health screenings without symptoms were followed up for 3 to 6 months at the outpatient clinic. If the findings on chest roentgenogram worsened during this period, chemotherapy was started even in asymptomatic patients. Twenty-five patients with primary MAC disease were treated in our hospital during this 5-year period. Two patients had cavitary lesions, and other patients had bronchiectatic lesions or granular shadows. Each patient was treated by rifampicin, ethambutol, clarithromycin, and levofloxacin basically. The findings of sputum culture converted from positive to negative in 20 patients within 6 months. In the other 5 patients, the sputum culture remained positive, and consequently, these 5 patients underwent pulmonary resection. (Note: 5 of these 22 patients who underwent surgery are included in this study. The other patients in this study were referred to us from other facilities after receiving initial medical therapy.)

#### Surgical Procedures and Pathology

Bilateral lung resections were performed in 3 patients, including sequential bilateral resections within 1 day in 1 patient (no. 4). Resections of multiple lung regions were performed in 10 patients. The primary surgical procedures consisted of lobectomy in 14, bilobectomies in 1, segmentectomy in 4, and wedge resection of the lung in 6 patients. All wedge resections were performed using stapling devices. In 1 patient with lung cancer, the tumor was excised by left lower lobectomy, and partial resection of the upper lobe was performed for MAC. Wedge resection was performed by thoracoscopy using three ports in 3 patients. Lobectomy was performed assisted by thoracoscopy in 1 patient. We limited the thoracoscopic procedures to cases with small lesions because direct palpation is important to secure enough surgical margin in MAC patients. Thoracoplasty was performed in 1 patient (no. 11), with right upper lobectomy, because of insufficient expansion of remaining middle and lower lobes and existence of large postresectional pleural space.

Microscopic findings showed granulomatous inflammation with necrosis in all cases. In all surgical specimens, MAC was confirmed by microbiological methods including polymerase chain reaction.

#### Postoperative Follow-Up

Patients after surgery received follow-up every 3 or 4 months. Chest roentgenographic finding was checked in every patient. Smears, cultures, and polymerase chain reaction examinations of sputum were performed in patients with sputum. There was no postoperative mortality or major complication. One patient needed home oxygen therapy soon after discharge, but it was discontinued 2 months after surgery. All patients were alive 6 to 164 months after surgery. The median survival was 46 months. The results of postoperative pulmonary function testing, which was performed at more than 6 months after surgery (range, 6 to 156 months; median, 52), were available in 18 patients and are shown together with the preoperative data in Table 2. Both vital capacity and forced expiratory volume in 1 second were reduced significantly after resection. Both values, however, were maintained at 89% and 84% of preoperative values, respectively. The results were not significantly different

between patients who received lobectomy or wider resection ( $n = 11$ ). The performance status after surgery was unchanged in all patients. The nutritional status of these patients was good and was not different before and after surgery.

Postoperative chemotherapy was administered to all patients. Positive sputum finding was observed in 2 patients after resection but became negative after postoperative chemotherapy. In 1 patient (no. 11), MAC-positive sputum detected after surgery became negative 4 months later while on chemotherapy. In another patient (no. 20), contralateral MAC lesions regressed after the resection of a large cavitory lesion.

### Comment

The management of MAC pulmonary infection has made progress since the introduction of oral macrolides, and quinolones antibiotics. However, recent reports indicate that the medical treatment of MAC remains challenging. The conversion rates of sputum cultures from positive to negative with clarithromycin-containing regimens has been reported to be between 54% and 87% [4–8]. Moreover, reported recurrence rates after conversion range between 20% and 44% [4, 5, 7, 8]. Therefore we performed this retrospective study to evaluate the role of surgical resection after chemotherapy containing macrolides and quinolones.

Our main surgical indication is the persistence of localized lesions despite administration of multiple drugs listed earlier. Despite the administration of clarithromycin for 6 to 37 months in 18 patients who had cavitory or bronchiectatic lesions, the MAC lesions had persisted; and these organized MAC-infected lesions were uncontrollable by drug therapy alone, including clarithromycin. As recommended by several others [9, 10], we proceeded with surgical treatment early, when medical treatment appeared ineffective, before the lesions had become inoperable. In all our patients, the findings of MAC in the sputum became negative after surgery. Compared with reported postoperative conversion rates between 87% and 100% [9–13], our favorable results may attributable to the early performance of surgery.

Reports of long-term results of medical treatment for MAC pulmonary disease are very few. In the study of Kobashi and colleagues [14], the response rate of 115 patients treated according to proposed guidelines (rifampicin plus ethambutol plus streptomycin plus clarithromycin) was significantly better than that before the guidelines were established in primary MAC disease. However, poor outcomes, namely, “worsening” and “death,” were still high in secondary MAC disease, at 23.1% and 10.3%. Although our follow-up is shorter, complete resection appeared to improve prognosis.

The MAC diseases were found at health maintenance examination in 10 asymptomatic patients of 22 (45%) in this series. The other 12 patients had mild symptoms. Because we performed surgery at an early stage of the disease, the rates of wedge or segmental resections were higher than reported by others. None of our patients

required a pneumonectomy, and none suffered a major postoperative complication. Reported rates of major complications, such as bronchopleural fistulae and respiratory failure, associated with more invasive surgery, have been 0% to 42% [9–13]. Therefore, it appears important to avoid invasive surgery, such as pneumonectomy, if possible. Both vital capacity and forced expiratory volume in 1 second after resection were reduced slightly in this series. The performance status after surgery, however, was maintained even in lobectomy cases.

Our surgical procedures did not routinely include thoracoplasty, even after upper lobectomy, which was performed in 4 of our patients. We performed thoracoplasty in a single patient, who presented with a huge residual pleural space. Several authors [10, 13] have recommended muscle flaps to buttress the bronchial stump, and obliterate the empty space after pneumonectomy.

We performed three thoracoscopic wedge resections in this series of patients. Although it is a less invasive and technically easier procedure, resections of bronchiectatic lesions with secure surgical margins are difficult. Wedge resection was performed mainly for small cavitory lesion keeping enough margin along the bronchial wall with palpation in this series. Therefore, we limited our thoracoscopic wedge resections to one side and performed minithoracotomies on the other side in 1 patient (no. 4).

We observed 2 noteworthy patients, in whom contralateral lesions improved without organizing pulmonary changes, after resection of large cavitory lesions. We hypothesize that the resection of major bacterial foci may facilitate the chemotherapeutic management of lesions not associated with cavities or bronchiectasis.

In conclusion, we recommend that surgical treatment of MAC pulmonary lesions be performed before the disease becomes too advanced, and difficult to resect. Patients treated with a clarithromycin-containing regimen for more than 6 months for MAC pulmonary disease with cavitory or bronchiectatic lesions, even when asymptomatic, should be viewed as candidates for surgery, as it is associated with low morbidity and mortality. In extensive disease, after the resection of major cavitory bacterial foci, the contralateral lesions can be further managed postoperatively by chemotherapy.

### References

1. Kennedy TP, Weber DJ. Nontuberculous mycobacteria. An underappreciated cause of geriatric lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149:1654–8.
2. Kennedy MP, O'Connor TM, Ryan C, et al. Nontuberculous mycobacteria: incidence in Southwest Ireland from 1987 to 2000. *Respir Med* 2003;97:257–63.
3. American Thoracic Society. Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156(Suppl):S1–25.
4. Wallace RJ Jr, Brown BA, Griffith DE, et al. Clarithromycin regimens for pulmonary *Mycobacterium avium* complex. The first 50 patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:1766–72.