

200716008A

厚生労働科学研究費補助金
基礎研究成果の臨床応用推進研究事業

侵襲の運命決定因子HMGB1を分子標的とした救命的治療法の開発

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 丸山 征郎

平成20年3月

目 次

I. 総括研究報告		
侵襲の運命決定因子HMGB1を分子標的とした救命的治療法の開発 鹿児島大学・丸山征郎	-----	1
II. 分担研究報告		
1. 循環血中HMGB-1 への介入による多臓器不全の治療法の開発 鹿児島大学・丸山征郎	-----	13
2. 外科的侵襲時における臓器不全と血中HMGB-1 の動態、臓器不全の関連 慶應義塾大学・小林紘一	-----	15
3. 重症肺感染症とHMGB-1, HMGB1遮断によるARDS予防 慶應義塾大学・石坂彰敏	-----	23
4. HMGB-1除去カラム、抗体療法によるショック治療法の開発 大分大学・野口隆之	-----	28
5. 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 聖マリアンナ医科大学・中島利博	-----	30
6. 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 山口大学・前川剛志	-----	32
7. 免疫細胞におけるHMGB1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 福岡大学・安波洋一	-----	37
8. HMGB1 の細胞外放出の分子機構とその制御法の研究 国立長寿医療センター・松下健二	-----	39
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	43
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	47

I. 総括研究報告

侵襲の運命決定因子HMGB1を分子標的とした救命的治療法の開発

丸山 征郎 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・教授

研究要旨

感染症、悪性腫瘍、外傷・手術などの生体侵襲は、局所化、終息化するベクトルと、時間的空間的に拡大するベクトルを有する。後者の場合には、侵襲は周辺に拡大するのみか、遷延化し、時として原発臓器以外の第2、第3の臓器にドミノ式に傷害が波及し、臨床現場で最大の問題である“多臓器不全 (Multiple Organ Failure, MOF)”状態となる。

- それではなぜ臓器障害が、第2、第3の遠隔臓器に波及してゆくのであろうか？
- なぜ局所の病変が全身症状に発展するのであろうか？
- なぜ急性の疾患は慢性化するのであろうか？

これらの病態に介在（メディエート）する因子：いわゆるメディエーターは何であろうか？最近の進歩で、このメディエーターの一つとしてTNF α があげられ、TNF α 抗体やその受容体のインヒビター、抗体を用いた分子標的療法が慢性関節リウマチなどでは著効を示している。一方、近年になり、我々を含む海外のグループが、新規のメディエーターとしてHMGB1の関与を検証してきた。DNA結合蛋白HMGB1は多くの有核細胞、あるいは活性化マクロファージ・樹状細胞から遊離・放出されて、血行性、（そして恐らくリンパ行性）に遠隔の第2、第3の臓器に運ばれ、その遠隔臓器細胞の受容体RAGE、あるいはToll Like Recepto-2, -4に作用し、諸細胞を騒乱状態に陥れ、第2、第3の臓器障害を引き起こすこと、局所障害を慢性化、あるいは拡大すること、すなわちHMGB1こそ、炎症の遠隔臓器への“転移”、そして臓器不全、炎症慢性化の“実行因子”であり、生体侵襲の運命は循環性HMGB1の多寡によって決定されるということを証明しつつある。これらの一連の研究で明らかにされてきたことは、HMGB1は局所的には【止血】、【自然免疫】、そして最終的には、傷害組織の【修復】のアジュバントとして働く生体必須のプログラマーであるが、これが局所に留まらず、全身を循環すると、“炎症の転移”を惹起すること、全身を循環しなくとも、局所で消去されず、遷延して存在すると、“炎症の慢性化”因子として働くということである。

さらに我々は内皮細胞上のトロンボモデュリンが、HMGB1を時間的空間的に必要な部位とタイミング内に封じ込め、全身化と遷延化を防ぐことを最近見出し、Nat. Med誌などが大きく紹介・解説するところとなった。トロンボモデュリンは申請者（丸山）らによって純化・同定、クローニングされた分子で、トロンピンを凝固酵素から抗凝固酵素へて変換する内皮細胞上の膜蛋白である。

本研究は上記のように新展開をみせつつあるオンゴーイングの知見を踏まえ、【HMGB1

を分子標的とした多臓器不全の新規診断法と救命療法の開発】を目的とするものである。

A. 研究目的

1. HMGB1 の細胞外遊離機構の解明

HMGB1 の核内から細胞質、さらには細胞外への遊離機構に関しては未だ不明の点が少なくないので、これに関して、基礎的および臨床的研究をおこなった。

1) *in vivo*:

- ① どのような臨床病態の際に血中で HMGB1 が高値を示すのかと言う点について、臨床例と動物実験で解析する (小林ら)。
- ② 誤嚥性肺炎モデルマウスを作製し、その HMGB1 遊離に対する抗炎症性脂質 resolvin (RvE1) の効果を検証する (石坂ら、小林ら)。
- ③ 食道癌患者の合併症と経過と血中の HMGB1 のダイナミクスの関係を解析する (小林ら)。
- ④ 頭部外傷患者の髄液・血液中の HMGB1 を測定し、臨床症状との関連を解析する。またラット前脳虚血再還流モデルを作製し、O₂-ラディカルと HMGB1 遊離の関係を解析した (前川ら)。
- ⑤ 移植に際する自然免疫反応の際の HMGB1 の分泌機構とその役割について検討する (安波ら)

2) *in vitro*:

- ① ER ストレスと HMGB1 の細胞外遊離機構の関係を ER シャペロンの一つ gp96 のノックダウン細胞を用いて検討する (松下ら)。
- ② HMGB1 のアセチル化、脱アセチル化とその細胞外遊離の関係を解析する (中島ら)。

2. 細胞外での HMGB1 の運命に関する研究

- 1) トロンボモデュリン (TM) の N 末端に結合した HMGB1 の運命に関して調べる (丸山ら)。

3. HMGB1 のインターベンションに関する研究

- 1) HMGB1 除去カラムの効果を敗血症ラットで検

討する (野口ら、小林ら)

- 2) トキソ化抗 HMGB1 抗体作製する (丸山ら)

B. 研究方法

1. HMGB1 の細胞外遊離機構の解明

1) *in vivo*:

- ① マウスに左肺全摘術 (PNX) を施行し、残存右肺にエンドトキシン (LPS) を投与して、24 時間後の右肺の HMGB1、サイトカイン類を測定した。
- ② 左肺選択的に大腸菌 (1×10^5 コロニー) を投与して、誤嚥性肺炎マウスを作製し、HMGB1 の遊離に対する resolving E1 の効果を解析した。
- ③ 盲腸結さつ穿刺敗血症ラット (CLP) に γ グロブリンを投与し、生存率を検討した。
- ④ ヒト食道がん患者の血中 HMGB1 を経時的に測定し、合併症、術前ステロイド投与の効果を解析した。
- ⑤ 重症の頭部外傷患者の髄液と血液の HMGB1 を経時的に測定し、そのダイナミズムと臨床症状の動態について解析した。そしてラットの前脳虚血再還流モデルを作製して血中の O₂-ラディカル量と HMGB1 濃度の関連を調べた。
- ⑥ マウス肝内に同種の臍島を移植し、自然免疫応答/拒絶反応とそれの際の HMGB1 の動態を検討した。

2) *in vitro*

- ① RE シャペロンの一つである gp96 を siRNA を使い、ノックダウンした RAW 細胞をエンドトキシン (LPS) で刺激して、HMGB1 の遊離を解析した。
- ② 薬剤誘発性でかつ分泌シグナルを付加した HMGB1 過剰発現細胞を作製した。そしてこの HMGB1 遺伝子過剰発現マウスの作製を試みた。

2. 細胞外での HMGB1 の運命に関する研究

1) 試験管内でトロンビン (+) の条件下にトロンボモデュリン (TM) と HMGB1 をインキュベーションし、TM の N 末端に結合した HMGB1 の運命を経時的に電気泳動パターンから解析した。

3. HMGB1 のインターベンションに関する研究

- 敗血症モデルラットを作製し、ヘパリノイド HMGB1 除去カラムの救命効果を検討した。
- ヒト化抗 HMGB1 抗体の作成に着手した。

C. 研究結果

1. HMGB1 の細胞外遊離機構の解明

1) *in vivo*:

- PNX 群と LPS + PNX 群とでは、残存右肺においてコントロール群に比較して肺胞浄液中の HMGB1 は、有意に上昇していた。血中の HMGB1 も PNX 群でコントロールに比し、有意に上昇していた (図 1)。

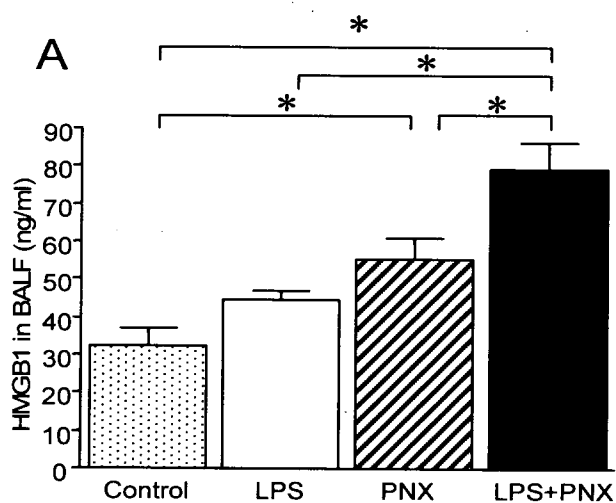


図 1 : (A) High mobility group box 1 protein (HMGB1) concentration in bronchoalveolar lavage fluid (BALF).

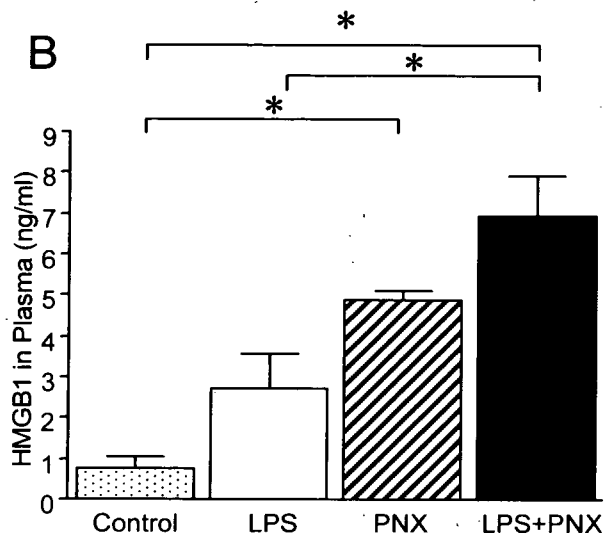


図 1 : (B) HMGB1 concentration in plasma. HMGB1 increased significantly in both BALF and plasma of the PNX group compared to the control group. Values are means \pm SE; $n = 6$. * $P < 0.05$.

臨床の食道癌においては、術前より血中 HMGB1 が高値を示す症例は、術後も血中 HMGB1 が有意に高値を持続し、かつ術後合併症の頻度も高かった。

- 誤嚥性肺炎モデルマウスにおいて、RevE1 は大腸菌の肺内における増殖を 1/3 に抑制した。
- CLP モデルラットにおいて術前ステロイド投与は術直前の HMGB1 が有意に低値を示し、合併症の発症を抑制した。また γ グロブリンも HMGB1 遊離の抑制と、生存率の改善を認めた。
- 正常者の髄液中には HMGB1 は検出されないが、頭部外傷患者の髄液には HMGB1 が検出され、特に予後不良患者の髄液では著明な高値を示した。
- 前脳虚血再還流モデルにおいては、Sham 手術群に比較し、際還流群で血中の HMGB1 は有意に高値を示した。しかし、この上昇に対する SOD (5 U/g.b.w) の投与の効果は有意でなかった (図 2-a)。このモデルにおいて、再還流 1 時間後の $O_2 \cdot$ 量を反映する Total Q と HMGB1 濃度は図 3 に示すごとく $Y = 0.416 + 14.567$,

$R^2=0.7378$ と有意の正相関を認めた (図 4)。

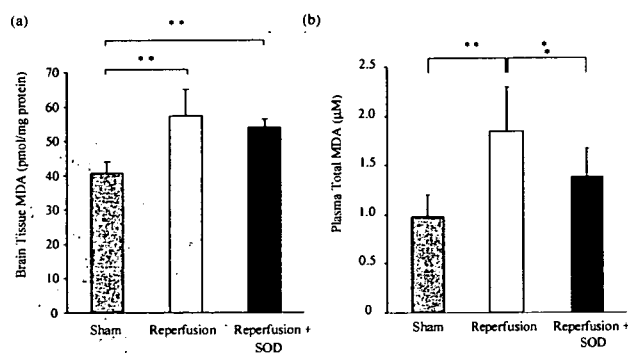


図 2-a. Malondialdehyde levels in forebrain tissue (a) and in plasma (b) at one hour after reperfusion.

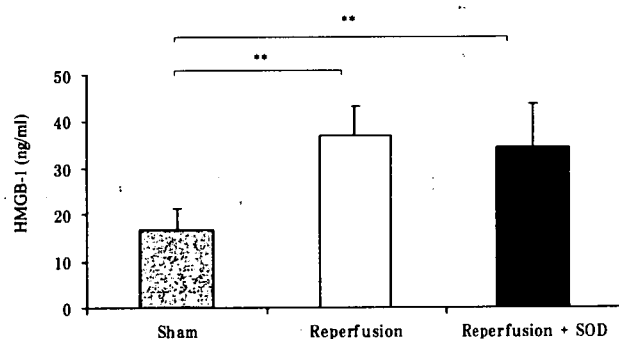


図 2-b. Plasma HMGB-1 levels at one hour after reperfusion.

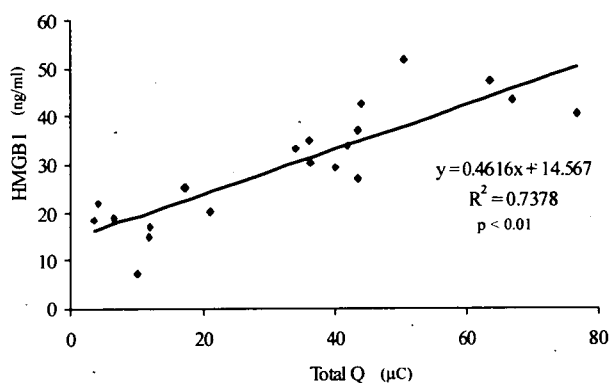


図 3. Correlation between Plasma HMGB-1 levels and total Q value of O₂-.

- ⑥ マウス肝内同種同系膵島移植の実験系で HMGB1 は膵島移植後早期 6 時間後をピークに上昇し、NKT 細胞、Gr-1+CD11b+細胞が活性化され、炎症性サイトカイン発現が誘導された。そして移植膵島が破壊されたが、これは抗 HMGB1 抗体投与で抑制された。
- ⑦ テトラサイクリンリプレッサー (TetR) を導入したマウスは 7 例得られたが、得られた個体の半数は生後直ぐ死亡し、生存している個体は導入遺伝子のコピー数が少なかった。

2) *in vitro*:

- ① gp96 siRNA を導入した Raw 細胞における LPS 刺激による HMGB1 遊離は約 50%抑制された。この遺伝子 Tg マウスの結果は上述の通りであった。

2. 細胞外での HMGB1 の運命に関する研究

- 1) トロンボモデュリン (TM) の N 末端に結合した HMGB1 の運命に関して調べた結果、TM に結合した HMGB1 はトロンビン・TM 複合体により、HMGB1 の N 末端側 11 残基のアルギニンの部位で限定分解されていた (図 4)。

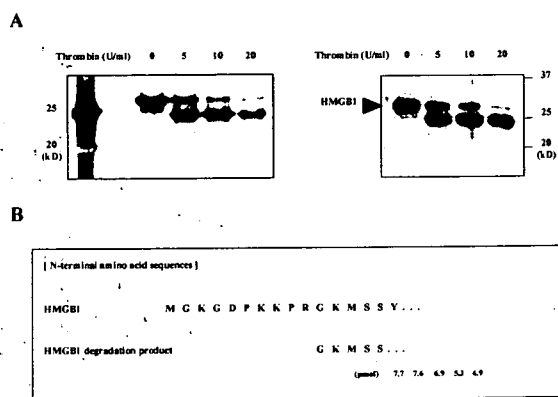


図 4. トロンビン・TM による HMGB1 の分解

3. HMGB1 のインターベンションに関する研究

- 1) HMGB1 除去カラムの救命効果
HMGB1 吸着カラムは非吸着カラム、空カラムに比し、LPS 投与敗血症モデルラットの血中

HMGB1 の上昇を抑制した。また非吸着カラム、空カラムのラットの生存率がそれぞれ11%、0%であったのに比し、吸着カラムの生存率は66.7%であった。

2) ヒト化抗 HMGB1 抗体を6種作成し得た。現在その HMGB1 中和活性を検討中である。

D. 考察

小林らの実験的肺切除術後の残存肺では、血管透過性が亢進し、浮腫も生じ、好中球とマクロファージも集積していた。これらのことから、肺切除後の残存肺は不顕性、或いは潜在性の肺損傷“occult lung injury”の状態にあるものと考えられた。もしこの肺切除術後残存肺の“occult lung injury”の状態に細菌感染が加われば、肺損傷が悪化することが予想される。これが臨床において肺切除術後肺炎が生じやすく、重篤化しやすい原因と考えられる。

また、肺切除術後は血漿中と肺胞洗浄液中の HMGB1 濃度が上昇していた。恐らく肺局所に蓄積した HMGB1 がトロンボモデュリンなどのバリアーを超えて蓄積すると、HMGB1 自体にバリアー障害活性、透過性亢進活性が存在するので、肺局所から全身化のベクトルへと向かい、

“occult lung injury” ⇒ “manifest lung disease” ⇒ “Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)” へと進展・進行するものと考えられる。

一方、石坂らは、これまで多くの急性、および、慢性の肺障害、ARDSなどの発症病理に HMGB1 が関与することを明らかにしてきたが、今回は臨床で問題となる誤嚥性肺炎モデルマウスを作製し、この病態の増悪に HMGB1 が関係していること、そして抗炎症性脂質メディエーター RvE1 が病態と HMGB1 上昇を抑制することを明らかにした。

また CLP モデルラットにおいてγグロブリン大量投与が生存率を高めることを証明した。

前川らは引き続き、臨床例における頭部外傷と

HMGB1 の関係について研究し、HMGB1 は単に重篤度のバイオマーカーにとどまらず、髄液内が HMGB1 のリザーバーとなり、脳の遅発性障害因子ともなりうることを示唆するデータを得た。さらに、前脳虚血再還流ラットモデルを作製し、再還流に際し、 O_2^- が産生され、これが脳神経細胞を障害し、HMGB1 の遊離を促進することを明らかにした。

丸山らは HMGB1 は局所では組織因子の発現を強め、止血のメディエーターとしても働くが、流血中ではトロンビンが HMGB1 のコファクターとしても作用し、遠隔臓器に虚血性の臓器障害、すなわち DIC の発症に対し、エンハンサーとして重要な役割を果たしていることを臨床例、動物実験で証明した。

そしてこの局所性の HMGB1 を時間的、空間的に局所、一過性に封じ込め、“benign HMGB1”として働かせ、全身性の“malignant HMGB1”へと防ぐのが血管内皮細胞上のトロンボモデュリンであるというコンセプトを提出した。そしてトロンボモデュリンの N 末端レクチン様ドメインに結合した HMGB1 は、トロンボモデュリンの E456 ドメインに結合したトロンビンによって分解されることを明らかにした。このように血管内皮細胞上のトロンボモデュリンは血管外の創傷治癒機転を、血管内皮細胞に持ち込まないように働いている血管内皮細胞の守護神的存在であることを明らかにした。

このような点からみると、遺伝子組み換え型トロンボモデュリンは、血中 HMGB1 のインターベンションという視点からも、一つの方法として期待されよう。

また安波らの研究で、移植の拒絶反応では自然免疫が作動し、HMGB1 はこの際のメディエーターとして働くことを明らかにした。そして抗体による HMGB1 のインターベンションが拒絶反応制御につながることを証明した。

基礎的研究では、HMGB1 の細胞外遊離機構を解明するため、変異 HMGB1 を発現したトラ

ンスジェニック動物が中島らによって作成中であり、成功が待たれる。

さらに松下らの実験結果では、血管内皮細胞からは、自然に、あるいは虚血刺激で細胞外に放出されることが示されたが、この放出に ER シャペロン蛋白 Gp96 が働いていることを示した。

E. 結論

HMGB1 のダイナミズムが、細胞、臓器、個体レベル（ヒトおよびラット、マウス）で明らかになった。

動物ならびにヒト臨床例での多くの研究から、血中 HMGB1 が炎症の“転移”、多臓器不全、さらにはショックの必要にして十分な条件であることが判明した。そして中和抗体、吸着カラムの有効性がラットにおいて示されたので、次には大型動物、そしてヒトへの展開を期すつもりである。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究業績

1. 論文発表

1. Sato F, Maruyama S, Hayashi H, Sakamoto I, Yamada S, Uchimura T, Morita Y, Ito Y, Yuzawa Y, Maruyama I, Matsuo S. High Mobility Group Box Chromosomal Protein 1 in Patients with Renal Diseases. *Nephron Clin Pract.* 108(3): c194-c201. 2008
2. Hiwatashi K, Ueno S, Abeyama K, Kubo F, Sakoda M, **Maruyama I**, Hamanoue M, Natsugoe S, Aikou T. A novel function of the receptor for advanced glycation end-products (RAGE) in association with tumorigenesis and tumor differentiation of HCC. *Ann Surg Oncol.* 15(3):923-33. 2008.
3. Morimoto Y, Kawahara KI, Tancharoen S, Kikuchi K, Matsuyama T, Hashiguchi T, Izumi Y, **Maruyama I**. Tumor necrosis factor-alpha stimulates gingival epithelial cells to release high mobility-group box 1. *J Periodontol Res.* 43(1): 76-83. 2008.
4. Kawahara K, Setoyama K, Kikuchi K, Biswas KK, Kamimura R, Iwata M, Ito T, Morimoto Y, Hashiguchi T, Takao S, **Maruyama I**. HMGB1 release in co-cultures of porcine endothelial and human T cells. *Xenotransplantation.* 14(6):636-41. 2007.
5. Yasuhara D, Hashiguchi T, Kawahara K, Nakahara T, Harada T, Taguchi H, Yamada S, **Maruyama I**, Inui A. High mobility group box 1 and refeeding-resistance in anorexia nervosa. *Mol Psychiatry.* 12(11):976-7. 2007.
6. Noma S, Matsuyama W, Mitsuyama H, Suetsugu T, Koreeda Y, Mizuno K, Higashimoto I, Kakihana Y, Hashiguchi T, **Maruyama I**, Osame M, Arimura K. Two cases of acute exacerbation of interstitial pneumonia treated with polymyxin B-immobilized fiber column hemoperfusion treatment. *Intern Med.* 46(17): 1447-54. 2007
7. Taniguchi N, Yoshida K, Ito T, Tsuda M, Mishima Y, Furumatsu T, Ronfani L, Abeyama K, Kawahara K, Komiya S, **Maruyama I**, Lotz M, Bianchi ME, Asahara H. Stage-specific secretion of HMGB1 in cartilage regulates endochondral ossification. *Mol Cell Biol.* 27(16):5650-63. 2007.
8. Inoue K, Kawahara K, Biswas KK, Ando K, Mitsudo K, Nobuyoshi M, **Maruyama I**. HMGB1 expression by activated vascular smooth muscle cells in advanced human atherosclerosis plaques.

- Cardiovasc Pathol. 16(3):136-43. 2007.
9. Taira T, Matsuyama W, Mitsuyama H, Kawahara KI, Higashimoto I, **Maruyama I**, Osame M, Arimura K. Increased serum high mobility group box-1 level in Churg-Strauss syndrome. Clin Exp Immunol. 148(2):241-7. 2007.
 10. 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
 11. Kawahara K, Tancharoen S, Hashiguchi T, Unoshima M, Ito T, Kikuchi K, Morimoto Y, Shimizu T, Oyama Y, Takenouchi K, Arimura S, Taniguchi N, Iwata M, Iwasaka H, **Maruyama I**. Inhibition of HMGB1 by deep ocean water attenuates endotoxin-induced sepsis. Med Hypotheses. 68(6):1429-30. 2007
 12. Izumi Y, Gika M, Shinya N, Miyabashira S, Imamura T, Nozaki C, Kawamura M, and **Kobayashi K**. Hemostatic efficacy of a recombinant thrombin-coated polyglycolic acid sheet coupled with liquid fibrinogen, evaluated in a canine model of pulmonary arterial hemorrhage. J Trauma 63: 783-787; discussion 787, 2007.
 13. Izumi Y, Yamamoto M, Kawamura M, Adachi T, and **Kobayashi K**. Cross-linked poly (gamma-glutamic acid) attenuates peritoneal adhesion in a rat model. Surgery 141: 678-681, 2007.
 14. 酒井宏水, 堀之内宏久, 山本学, 池田栄二, 武岡真司, 高折益彦, 土田英俊, **小林絃一** ヘモグロビン小胞体(HbV)-リコンビナントアルブミン分散溶液による 40%交換輸血 ラット脾臓内 HbV 代謝と造血に関する 2 週間の観察 日本輸血細胞治療学会誌 53 巻 1 号 Page47-55 2007
 15. 渡辺真純, 小林絃一, **石坂彰敏** マイクロサンプリング法 気管支学 29 巻 5 号 Page309-313, 2007
 16. 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, 山田晋吾, 小澤壯治, 横田博, **丸山征郎**, **石坂彰敏**, 北島政樹: ラット敗血症モデルに対する抗 HMGB1 療法の有効性に関する検討. エンドトキシン血症救命治療研究会誌 11(1) : 216-222, 2007.
 17. Koichi Suda, Yuko Kitagawa, Soji Ozawa, Taku Miyasho, Minoru Okamoto, Yoshiro Saikawa, Masakazu Ueda, Shingo Yamada, Sadatomo Tasaka, Yosuke Funakoshi, Satoru Hashimoto, Hiroshi Yokota, **Ikuro Maruyama**, **Akitoshi Ishizaka**, Masaki Kitajima. Neutrophil elastase inhibitor improves postoperative clinical courses after thoracic esophagectomy. *Dis Esophagus* 2007; **20**: 478-486.
 18. Iwasaka H: Three-step research strategies for ARDS: new target molecules—ACE2, HMGB1, and HSP47. *J Anesth* 2007 (21) 122-123
 19. Hagiwara S, Iwasaka H, Matsumoto S, **Noguchi T**. Nafamostat mesilate inhibits high-mobility group box 1 by lipopolysaccharide stimulation in murine macrophage RAW 264.7. *Shock*. 2007 Apr; **27**(4):429-35.

20. Hagiwara S, Iwasaka H, **Noguchi T**: Nafamostat mesilate inhibits the expression of HMGB1 in lipopolysaccharide –induced acute lung injury. *J Anesth* 2007 (21) 164-170
21. Hagiwara S, Iwasaka H, Matsumoto S, **Noguchi T**. Nafamostat mesilate inhibits high-mobility group box 1 by lipopolysaccharide stimulation in murine macrophage RAW 264.7. *Shock*. 2007. 27(4):429-35.
22. Hagiwara S, Iwasaka H, Matsumoto S, **Noguchi T**. Changes in cell culture temperature alter release of inflammatory mediators in murine macrophagic RAW264.7 cells. *Inflamm Res*. 2007. 56(7):297-303.
23. Hagiwara S, Iwasaka H, Matsumoto S, **Noguchi T**: High dose antithrombin III inhibits HMGB1 and improves endotoxin-induced acute lung injury in rats. *Intensive Care Med* 2007 Oct 17, (Epub ahead of print)
24. Hagiwara S, Iwasaka H, Shinguu C, **Noguchi T**: Effect of enteral vs. parenteral nutrition on inflammation and cardiac function in a rat model of endotoxin-induced sepsis. *Shock* 2008 in press
25. Hagiwara S, Iwasaka H, Uchino T, and **Noguchi T**: High Mobility Group Box 1 induces a negative inotropic effect on the left ventricle in an isolated rat heart model of septic shock: a pilot study. *Circulation Journal* 2008 in press
26. Yagishita N, Yamasaki S, Nishioka K, **Nakajima T**. Synoviolin, protein folding and the maintenance of joint homeostasis. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2008;4(2):91-7.
27. Yamasaki S, Yagishita N, Nishioka K, **Nakajima T**. The roles of synoviolin in crosstalk between endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and p53 pathway. *Cell Cycle*. 2007;6(11):1319-23.
28. 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*. 2007;67(3):951-8.
29. Yamasaki S, Yagishita N, Sasaki T, Nakazawa M, Kato Y, Yamadera T, Bae E, Toriyama S, Ikeda R, Zhang L, Fujitani K, Yoo E, Tsuchimochi K, Ohta T, Araya N, Fujita H, Aratani S, Eguchi K, Komiya S, **Maruyama I**, Higashi N, Sato M, Senoo H, Ochi T, Yokoyama S, Amano T, Kim J, Gay S, Fukamizu A, Nishioka K, Tanaka K, **Nakajima T**. Cytoplasmic destruction of p53 by the endoplasmic reticulum-resident ubiquitin ligase 'Synoviolin'. *EMBO J*. 2007;26(1):113-22.
30. T Kajiwara, Y Tomita, S Okano, T Iwai, **Y Yasunami**, Y Yoshikai, K Nomoto, R Tominaga, H Yasui. Effects of cyclosporin A on the activation of NKT cells induced by α -galactosylceramide. *Transplantation* 83:184-192, 2007
31. Masayuki Satoh, **Yohichi Yasunami**, Nobuhide Matsuoka, Masahiko Nakano, Takeshi Itoh, Tomoyuki Nitta, Keizo Anzai, Junko Ono, Masaru Taniguchi, Seiyo Ikeda. Successful islet transplantation to two recipients from a single donor by targeting pro-inflammatory cytokines in mice. *Transplantation* 83(8):1085-1092, 2007
32. Iwai T, Tomita Y, Kajiwara T, Onzuka T, Okano S, **Yasunami Y**, Yoshikai Y, Nomoto K, Tominaga R.

- The immunoregulatory role of NKT cells in cyclophosphamide-induced tolerance. *Transplantation* 84(12): 1686-95, 2007
33. Into T, Inomata M, Nakashima M, Shibata K, Häcker H, **Matsushita K**. Regulation of MyD88-dependent signaling events by S-nitrosylation retards toll-like receptor signal transduction and initiation of acute-phase immune responses. *Mol Cell Biol.* 28(4):1338-47 (2008)
 34. Kanno Y, Into T, Lowenstein CJ, **Matsushita K**. Nitric oxide regulates vascular calcification by interfering with TGF- signalling. *Cardiovasc Res.* 77(1):221-30(2008)
 35. Inomata M., Into T., Ishihara Y., Nakashima M., Noguchi T., and **Matsushita K**. Arginine-specific gingipain A from *Porphyromonas gingivalis* induces Weibel-Palade body exocytosis and enhanced activation of vascular endothelial cells through protease-activated receptors. *Microbes Infect.* 9(12-13): 1500-1506 (2007)
 36. Into, T., Dohkan, J., Inomata, M., Nakashima, M., Shibata, K., and **Matsushita, K**. Synthesis and characterization of a dipalmitoylated lipopeptide derived from paralogous lipoproteins of *Mycoplasma pneumoniae*. *Infect Immun.* 75(5): 2253-2259 (2007)
 37. Into, T., Kanno, Y., Dohkan, J., Nakashima, M., Inomata, M., Shibata, K., Lowenstein, C.J., and **Matsushita, K**. Pathogen recognition by Toll-like receptor 2 activates Weibel-Palade body exocytosis in human aortic endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 282(11): 8134-8141 (2007)
- Into, T., and **Matsushita, K**, Recognition of bacterial compounds by aortic endothelial cells activates Weibel-Palade body exocytosis. *Inflammation and Regeneration* 27(2): 112-116 (2007)
- ## 2. 学会発表
1. 河野光智, 田島敦志, 柿崎徹, 江間俊哉, 渡辺真純, 泉陽太郎, 川村雅文, 堀之内宏久, **小林 紘一** マウス肺切除モデルにおける小開胸と大開胸の手術侵襲の比較 日本呼吸器外科学会雑誌 21 巻 3 号 Page402(2007.04)
 2. 田島敦志, 河野光智, 渡辺真純, 泉陽太郎, 川村雅文, 堀之内宏久, **小林 紘一** 肺切除術後の残存肺には急性肺損傷が潜在する 日本呼吸器外科学会雑誌 21 巻 3 号 Page375(2007.04)
 3. 河野光智, 田島敦志, 渡辺真純, 田坂定智, 泉陽太郎, 川村雅文, 堀之内宏久, **石坂彰敏**, **小林 紘一** 肺切除術後の残存肺には急性肺損傷が潜在する 日本呼吸器学会雑誌 45 巻増 Page149(2007.04)
 4. 河野光智, 田島敦志, 渡辺真純, 泉陽太郎, 川村雅文, 堀之内宏久, **小林 紘一** 肺切除による外科的侵襲の本態は術後残存肺での HMGB1 をはじめとする炎症性サイトカインの濃度上昇と血管透過性の亢進である 日本外科学会雑誌 108 巻臨増 2 Page280(2007.03)
 5. 福永興壺：抗炎症性脂質メディエーター レゾルビンと肺炎症性疾患. 第 13 回日本エンドトキシン研究会 イブニングシンポジウム
 6. 福永興壺：魚油と抗血栓、抗炎症. 2007 第 5 回日本予防医学会 シンポジウム

7. 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: ラット敗血症モデルに対する抗 HMGB1 療法の有効性に関する検討. 第 11 回エンドトキシン血症救命治療研究会, 東京, 2007. 要望演題
8. 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. ワークショップ
9. 須田康一, 竹内裕也, 才川義朗, 宮庄拓, 岡本実, 福永興壺, 横田博, 石坂彰敏, 北川雄光: ラット手術侵襲モデルを用いた HMGB1 吸着カラムの有効性に関する検討. 第 1 回 iPUC-II (integrated Pulmonary Circulation Research-II), 東京, 2007. 口演
10. 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. ポスター
11. 須田康一, 竹内裕也, 宮庄拓, 岡本実, 和田則仁, 才川義朗, 福永興壺, 山田晋吾, 横田博, 丸山征郎, 石坂彰敏, 北川雄光: 侵襲に対する生体反応の予測と制御～HMGB1 を標的とした新たな治療戦略～. 第 13 回日本エンドトキシン研究会, 鹿児島, 2007. シンポジウム
12. 須田康一, 竹内裕也, 和田則仁, 才川義朗, 宮庄拓, 岡本実, 福永興壺, 横田博, 石坂彰敏, 北川雄光: ラット手術侵襲モデルを用いた HMGB1 吸着カラムの性能評価. 第 20 回日本外科感染症学会総会, 東京, 2007. 口演
13. 須田康一, 竹内裕也, 宮庄拓, 岡本実, 和田則仁, 才川義朗, 福永興壺, 山田晋吾, 横田博, 丸山征郎, 石坂彰敏, 北川雄光: HMGB1 を標的とした侵襲に対する生体反応の予測と制御. 第 12 回エンドトキシン血症救命治療研究会, 福岡, 2008. ワークショップ
14. 岩坂日出男: HMGB1 を標的とした血液浄化療法の可能性 (シンポジウム) 第 18 回日本血液浄化学会学術集会
15. 長谷川輝, 岩坂日出男, 萩原聡, 日高正剛, 野口隆之: 敗血症の致死性メディエータ HMGB1 に対する HSP の効果 第 2 回臨床ストレス応答学会
16. 松下健二: 一酸化窒素制御を基盤とした血管病治療の新戦略. レドックス生命科学第 170 委員会研究会 “レドックス研究のフロンティア”. 大阪. 2007 年 3 月 13 日
17. 松下 健二: エキソサイトーシス制御を基盤とした血管病治療の新戦略. 第 8 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム. 金沢. 2007 年 6 月 8 日.
18. 松下 健二: 高血圧が炎症を惹起する仕組み. 第 6 回松本ボンフォーラム. 塩尻. 2007 年 5 月 12 日.
19. 猪俣 恵, 引頭 毅, 中島 美砂子, 野口 俊英, 松下 健二: 第 50 回春季日本歯周病学会学術大会. 横須賀. 2007 年 5 月 19 日.

20. 松下健二 血管病としての歯周病の分子病態
第 49 回歯科基礎医学会学術大会サテライトシ
ンポジウム IV. 札幌. 2007 年 8 月 29 日.
21. 松下健二 : 公開市民講座 “ステキに歳を重
ねるために一歯周病予防から始めるエイジ
ングケア” 第 13 回口腔保健シンポジウム. 大
阪. 2007 年 7 月 7 日
22. 松下健二 ステキに歳を重ねるために一生活
習慣病・歯周病予防によるエイジングケア中
部ものづくりネットワーク講演会. 名古屋.
2007 年 8 月 2 日.
23. 松下健二 ステキに歳を重ねるために一歯周
病予防から始めるエイジングケア NPO バイ
オものづくり中部第 1 回医療機器分科会特別
講演. 名古屋. 2007 年 9 月 1 日.
24. 松下健二 ステキに歳を重ねるために一生活
習慣病予防から始めるエイジングケア 第 9
回東三河合同産学官技術交流会. 名古屋. 2007
年 9 月 5 日
25. 松下健二 : Meet the specialist 2007 “エキソサ
イトーシス制御を基盤とした血管病治療の可
能性 “. 東京 2007 年 11 月 22 日
26. 松下健二 : 循環器関連疾患の up-to-date “血管
病としての歯周病の治療戦略” 名古屋 2007 年
12 月 22 日.
27. 松下健二 : エキソサイトーシス制御を基盤と
した新しい脳血栓塞栓症治療法の開発 第 33
回本脳卒中学会総会 2008 年 3 月、京都
- H. 知的財産権の出願。登録状況（予定を含む）
（以下はすべて外国にも）出願中
1. 抗 HMGB 1 抗体を含む臓器移植拒絶抑制
剤 日本出願番号：特願 2007-034280
 2. 抗 HMGB 1 抗体を含む臓器移植拒絶抑制
剤 日本出願番号：特願 2007-034293
 3. ヒト HMGB 1 に特異的に結合する抗体を有
効成分として含有する治療剤 日本出願番
号：特願 2007-034325

II. 分担研究報告

循環血中HMGB-1 への介入による多臓器不全の治療法の開発

丸山 征郎 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・教授

研究要旨

生体は侵襲（外傷、感染など）に際し、以下のような時間的、空間的にヒエラルキーをもった応答をする。

- ① 当該局所で血小板や顆粒球のあらかじめ、貯蔵されていた因子（セロトニンやATP, エラスターゼなど）の放出、
- ② 膜脂質からの脂質メディエーター（PGs、ロイコトリエン、内因性カンナビノイドなど）の産生
- ③ 転写因子(NF- κ B, AP-1 など)を介した生体防御因子類(血液凝固因子、TNF α , IL-1 β など)の de novo の合成、である。これらは①⇒②⇒③の順番で、局所から全身へ、early phase から late phase へと拡大してゆく。そしてこれらの①、②、③の全てのプログラムが障害されたとき、すなわち細胞壊死の際には核から、DNA結合蛋白HMGB 1が遊離放出されて、免疫（特に自然免疫）、止血、幹細胞の動員など生体防御反応のアデュバントとして働くことが判明しつつある。しかしこのHMGB 1が血管内に流入して循環すると、反応が遠隔臓器に播種されて、これがショック、DIC、そして多臓器不全のメディエーターとして働くことが判明してきた。我々は、「HMGB 1を侵襲局所へ“封じ込め”、循環血中への流入を阻止している」仕組みとして、内皮細胞膜蛋白のトロンボモデュリン(TM)が重要な働きを有していることを明らかにした。本研究は上記のような事実を背景として、循環血中のHMGB 1への介入による多臓器不全の治療法を開発することである。本年度は、①HMGB 1の局所での作用発現に対するコファクター存在の研究と、②HMGB 1の活性発現制御について、分子細胞学的に研究した。

A. 研究目的

1. HMGB 1の作用発現になんらかのコファクター（補助因子）が存在するか？

昨年の暮れから今年に掛けて、HMGB 1の作用は、細菌性DNA (CpGDNA)、IL-1 β で増強されることが報告されている。また我々はトロンビンがHMGB 1の作用を増強することを報告している。そこで今回は、HMGB 1の多彩な

活性がどのようにCpGDNAで増強されるのかを、3D gene tip法で網羅的に解析した。

2. 内皮細胞のトロンボモデュリンに結合して、その活性が中和されたHMGB 1はその後どのような運命をたどるのか？

局所性HMGB 1が血管内に侵入する時には、血管内皮細胞表面の、内皮細胞のTMと結合し、

活性が中和される。しかしHMGB1とその後の運命については不明である。そこでこの点について研究した。

B. 研究方法

1. HMGB1の活性に対する細菌DNA；CpG DNAの補助作用に関する研究

培養ヒト臍帯静脈血管内皮細胞に対して、1) HMGB1、2) CpG-DNA、3) HMGB1&CpG-DNA と4) HMGB1&Control CpG-DNA 刺激を行った。刺激3時間後の遺伝子発現変化を各刺激群対非刺激コントロールにて3D-Gene DNA チップで観察した。さらに、特定の遺伝子に対しては Real time PCR 解析を行った。

2. トロンボモデュリン (TM) 結合HMGB1の運命に関する研究

TMとHMGB1を *in vitro* でインキュベートし、これにトロンピンを添加して、HMGB1分子の経時的変化のプロフィールを電気泳動上に解析した。

C. 研究結果

1. DNA チップでコントロールに対して2倍以上の変化の認められたのは、HMGB1 単独(685 遺伝子)、CpG-DNA 単独 (265 遺伝子)、HMGB1&CpG-DNA 共刺激 (879 遺伝子)、HMGB1&Control CpG-DNA 共刺激 (579 遺伝子) であった。特に、HMGB1 を含む刺激で接着因子やサイトカイン・ケモカイン等に4倍以上の発現増強が認められた。CpGDNA+HMGB1 で発現が有意に増強されたのは、 β -defensin 118 precursor protein, glucokinase regulator protein, prolin-rich-carboxyl glutamic acid protein 3, HLA-class II であった。
2. HMGB1 と TM のプレインキュベーションで HMGB1・TM 複合体が形成されたが、それに TM を添加すると、HMGB1 の N 末端側の 11 番目のアミノ酸の部位で分解されることが確認された。

D. 考察

1. 3D-Gene DNA チップを用いての HMGB1 刺激による血管内皮細胞の遺伝子発現の解析結果、これまでの報告と同様の遺伝子の変化に加えて、複数のケモカイン等においても発現増強が認められた。一方、CpG-DNA 単独での影響は HMGB1 のそれに比較して弱く、サイトカインやケモカインの発現増強は示さなかった。今後、HMGB1 と CpG-DNA の相加&相乗効果の解析検討を進めていくと同時に、刺激に対する内皮細胞と免疫系の細胞の相違点などを検討していく予定である。

2. HMGB1 は TM の N 末端のレクチン様ドメインと結合し、HMGB1 の炎症促進的な活性は中和されることは既に発表していたが、今回、この TM 分子上の HMGB1 はトロンピンによって、N 末の 11 アミノ酸残基の部位で限定分解されることが示された。この部位はトロンピンがその他の基質で蛋白を分解される部位と同じアルギニン部位であった。

敗血症性ショックの患者血中にもこの N 末を欠いた HMGB1 が検出された。

G. 研究業績

1. 論文発表

Ko-ichi Kawahara, Kamal Krishna Biswas, Hideo Iwasaka, Sonshin Takao, Teruto Hashiguchi, Ikuro Maruyama et al. CRP induces high-mobility group box-1 protein release through activation of p38MAPK in macrophage RAW264.7 cells. Cardiovascular Pathology. In press.

Sato F, Maruyama S, Hayashi H, Sakamoto I, Yamada S, Uchimura T, Morita Y, Ito Y, Yuzawa Y, Maruyama I, Matsuo S. High Mobility Group Box Chromosomal Protein 1 in Patients with Renal Diseases. Nephron Clin Pract. 108(3): c194-c201. 2008

Hiwatashi K, Ueno S, Abeyama K, Kubo F, Sakoda M,

- Maruyama I, Hamanoue M, Natsugoe S, Aikou T. A novel function of the receptor for advanced glycation end-products (RAGE) in association with tumorigenesis and tumor differentiation of HCC. *Ann Surg Oncol.* 15(3):923-33. 2008.
- Morimoto Y, Kawahara KI, Tancharoen S, Kikuchi K, Matsuyama T, Hashiguchi T, Izumi Y, Maruyama I. Tumor necrosis factor-alpha stimulates gingival epithelial cells to release high mobility-group box 1. *J Periodontal Res.* 43(1): 76-83. 2008.
- Kawahara K, Setoyama K, Kikuchi K, Biswas KK, Kamimura R, Iwata M, Ito T, Morimoto Y, Hashiguchi T, Takao S, Maruyama I. HMGB1 release in co-cultures of porcine endothelial and human T cells. *Xenotransplantation.* 14(6):636-41. 2007.
- Yasuhara D, Hashiguchi T, Kawahara K, Nakahara T, Harada T, Taguchi H, Yamada S, Maruyama I, Inui A. High mobility group box 1 and refeeding-resistance in anorexia nervosa. *Mol Psychiatry.* 12(11):976-7. 2007.
- Noma S, Matsuyama W, Mitsuyama H, Suetsugu T, Koreeda Y, Mizuno K, Higashimoto I, Kakihana Y, Hashiguchi T, Maruyama I, Osame M, Arimura K. Two cases of acute exacerbation of interstitial pneumonia treated with polymyxin B-immobilized fiber column hemoperfusion treatment. *Intern Med.* 46(17): 1447-54. 2007
- Taniguchi N, Yoshida K, Ito T, Tsuda M, Mishima Y, Furumatsu T, Ronfani L, Abeyama K, Kawahara K, Komiya S, Maruyama I, Lotz M, Bianchi ME, Asahara H. Stage-specific secretion of HMGB1 in cartilage regulates endochondral ossification. *Mol Cell Biol.* 27(16):5650-63. 2007.
- Inoue K, Kawahara K, Biswas KK, Ando K, Mitsudo K, Nobuyoshi M, Maruyama I. HMGB1 expression by activated vascular smooth muscle cells in advanced human atherosclerosis plaques. *Cardiovasc Pathol.* 16(3):136-43. 2007.
- Taira T, Matsuyama W, Mitsuyama H, Kawahara KI, Higashimoto I, Maruyama I, Osame M, Arimura K. Increased serum high mobility group box-1 level in Churg-Strauss syndrome. *Clin Exp Immunol.* 148(2):241-7. 2007.
- 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
- Kawahara K, Tancharoen S, Hashiguchi T, Unoshima M, Ito T, Kikuchi K, Morimoto Y, Shimizu T, Oyama Y, Takenouchi K, Arimura S, Taniguchi N, Iwata M, Iwasaka H, Maruyama I. Inhibition of HMGB1 by deep ocean water attenuates endotoxin-induced sepsis. *Med Hypotheses.* 68(6):1429-30. 2007
- E. 知的財産権の出願。登録状況（予定を含む）
（以下はすべて外国にも）出願中
1. 抗HMGB1抗体を含む臓器移植拒絶抑制剤
日本出願番号：特願 2007-034280
 2. 抗HMGB1抗体を含む臓器移植拒絶抑制剤
日本出願番号：特願 2007-034293
 3. ヒトHMGB1に特異的に結合する抗体を有効成分として含有する治療剤
日本出願番号：特願 2007-034325

外科的侵襲時における臓器不全と血中 HMGB-1 の動態、臓器不全の関連に関する研究

小林 紘一 慶應義塾大学医学部 呼吸器外科・教授

河野 光智 慶應義塾大学医学部 呼吸器外科・助教

研究要旨

肺切除術施行後の残存肺には肺炎を合併しやすく、また重篤化する率も高い。手術侵襲のためと考えられているが、そのメカニズムの詳細は不明である。マウス肺切除モデルにおいて、肺切除がエンドトキシン誘発性肺損傷へ及ぼす影響を明らかにした。C57BL/6 マウスに対し左肺全摘(PNX)を施行し、残存右肺にエンドトキシン(LPS)を経気管支投与し、24 時間後に右肺で肺血管透過性と肺湿乾重量比、気管支肺胞洗浄液(BALF)中の細胞数、BALF 中の種々のサイトカイン、炎症性メディエーターとして注目を集める HMGB1 の濃度を測定、評価した。肺切除を行わない Control 群と比較して、PNX 単独群で残存右肺に有意な血管透過性亢進と肺内水分量の増加、炎症細胞の集積を認めた。PNX+LPS 群では LPS 単独群と比較して肺損傷が悪化した。また肺切除により BALF 中で IFN- γ や HMGB1 の濃度が有意に上昇した。肺切除は残存肺に HMGB1 を含む種々の炎症性メディエーターの惹起を伴う occult lung injury を生じさせ、これらを介してエンドトキシン誘発性肺損傷を悪化させると考えられた。

A. 研究目的

悪性肺腫瘍などに対して肺切除術を施行された患者は残存肺に肺炎を起こしやすい。そして肺切除術後の肺炎は通常の肺炎に比べて悪化しやすく、急性肺損傷/急性呼吸促迫症候群 (ALI/ARDS) に陥って致命的となる率が高い。(呼吸器合併症を生じる率は約 3%、そのうち 40~50%は死に至る。) 肺切除の外科的侵襲が存在する状態に肺炎が生じたことにより肺損傷が悪化すると考えられるが、その侵襲の本態及びメカニズムは不明である。残存肺において肺損傷の面から検討した研究も調べた限りでは存在しない。HMGB1 蛋白質が炎症、ショックと臓器不全のメディエーターとして注目を集め、特に種々の原因による肺損傷への関与が数

多く報告されているが、術後の肺損傷における HMGB1 の関与を検討した報告はない。

18 年度までの研究では、マウス左肺全摘モデルにおいて、肺切除を行わないコントロール群の右肺と比較して、左肺切除術後の残存右肺では有意な血管透過性亢進と肺内水分の増加、炎症細胞の集積を認めた。組織学的に残存肺では浮腫性変化を認めた。また HMGB1 は肺胞洗浄液中で 2 倍、血漿中では 5 倍と有意に上昇していた。肺切除術後の残存肺には急性肺損傷が潜在する状態”occult lung injury”が生じており、これが外科的侵襲の本態であると考えられた。その発生機序には HMGB1 の関与が示唆された。

19 年度は更に肺全摘術後の残存肺にエンドトキ

シン(LPS)を経気管支投与して、急性肺損傷を生じさせるモデルを新たに作成し、肺損傷の悪化及びその機序への HMGB1 の関与、及びその他の種々の炎症性メディエーターの関与について検討した。

B. 研究方法

1. マウス左肺全摘モデル

C57BL/6 マウス、雄性、8週齢を使用し、肺切除とエンドトキシンの有無により、以下の4群をn=7で作成した。

1. Control 群:

生理食塩水経気管投与

2. LPS 群:

LPS 経気管投与

3. Pneumonectomy (PNX) 群:

生食経気管投与+左肺切除術

4. LPS+PNX 群:

LPS 経気管支投与 + 左肺切除術

人工呼吸器 (麻酔)

両群、人工呼吸器管理を行う。マウスをケタミン(90mg/kg body weight)+キシラジン(9mg/kg body weight)の皮下注射にて麻酔をかけた後、20G サーフローにて経口挿管する。FiO₂ 40%、一回換気量0.5ml、換気回数40/分、PEEP 2cm/H₂Oで維持する。挿管からすべての手技が終了するまでの人工呼吸器管理の時間は両群で30分とする。

左肺全摘

左第5肋間開胸、左肺門にて気管支、肺動静脈を一括して5-0絹糸にて結紮後切離し左肺全摘術を施行する。

経気管投与 (LPS または、生理食塩水)

挿管、人工呼吸器管理を開始後、

LPS from *Escherichia coli* (serotype O55: B5 phenol extract) saline solution 150 μ gを生理食塩水30 μ lに溶解してゆっくりと経気道投与する。

(LPS+PNX群が24時間生存できる量に設定した。通常の肺損傷実験での投与量の1/2程度。)

コントロール群と肺切除群は生理食塩水のみを同量経気道投与する。

検体採取の手順

肺透過性測定のため、ヒトアルブミン(25 μ g/100 μ l of human serum albumin, Buminate, Baxter Health Corporation, Glendale, CA)を犠牲死させる1時間前に尾静脈から静注する(血漿中ヒトアルブミンとBAL中漏出したヒトアルブミンを測定してその比率を測定することにより、透過性を評価できる)。

手術後24時間でマウスを犠牲死させる(ケタミン(90mg/kg body weight)+キシラジン(9mg/kg body weight)の皮下注射+脱血(採血))。

末梢血

Heparin 100unit/100 μ lを静注後、下大静脈から可能な限り採血する。

生化学

血液の残りはマイクロチューブにとり、氷冷しておく。後に3000rpm、10分、4 $^{\circ}$ Cにて遠心し、上清をクライオチューブに入れ、-70 $^{\circ}$ Cで冷凍保存する。plasma中のタンパク、サイトカイン測定に使用する。

気管支肺胞洗浄

肺を摘出、下葉以外の右肺にてBAL(生食0.5mlで2回)を行う。0.8ml程度回収できるはずである(回収量を記録する)。氷冷しておく。後に3000rpm、5分、4 $^{\circ}$ Cにて遠心し、上清をクライオチューブ2本に入れ、-70 $^{\circ}$ Cで冷凍保存してサイトカイン測定に使用する。沈渣は100 μ lの生食に溶解しなおし、ウノペットを使用して細胞数を測定する。スライドガラスに塗沫標本を作成してディフクイックで染色し、後に分画をカウントする。

肺湿乾重量比

右下葉は気管支中枢を5-0絹糸にて結紮後、切り離しておく。重量を予め測定しておいたガラスチューブに入れて湿重量を測定しておく。後にvacuum ovenで24時間乾燥させ、乾重量を測定する。

組織標本