

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。

このようなデータから著者らは、局所性の HMGB1 を障害局所に封じ込め、全身化を防いでいる装置として T-TM システムが大きな役割を果たしているものと想定している (図 2)。しかるに先行する病態 (エンドトキシン血症、サイトカイン血症など) で、血管内皮細胞上の TM がダウンレギュレーションされていると、"TMthreshold" を超えて、HMGB1 が循環血中を循環し、これが遠隔臓器の炎症、血管内凝固など、すなわち SIRS、DIC、ショック、多臓器不全につながるものと考えられた。ここに、遺伝子組換え体の TM を補充する理論的根拠があるものと考えている。

かかる意味からも HMGB1 除去カラムの作成を現実化したい。

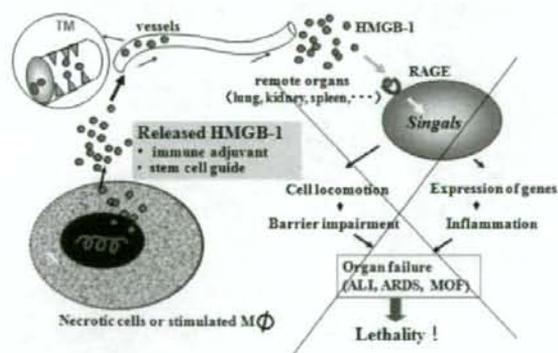


図 2. トロンピン-TM システムによる HMGB1 局所封閉の仕組み

## E. 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

小林絃一 慶応義塾大学医学部外科 教授

北川雄光 慶応義塾大学医学部外科 教授

### 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やブレオマイシン誘発性肺線維症へ及ぼす影響を明らかにした。肺切除は残存肺に HMGB1 を始めとする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やブレオマイシン誘発性肺線維症を悪化させると考えられた。また残存肺に生じる occult lung injury が小開胸下に行うことにより軽減され、術後の呼吸器合併症の発症や重篤化を抑制する可能性が示唆された。

また治療に難渋する劇症肝不全の病態に HMGB1 が関与していると考え、HMGB1 制御が劇症肝不全の病態を改善するという仮説のもと、マウス劇症肝炎モデルを用いて検討した。結果劇症肝炎モデルでは HMGB1 の上昇を認め、更に HMGB1 阻害が劇症肝不全の生存率において改善を示した。

### A. 研究目的

(1) 肺切除術施行後の残存肺に肺炎を合併しやすく、また重篤化する率が高いことが知られている。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。そこで我々は3つのマウス肺切除モデルを用いて肺切除術が残存肺へ及ぼす影響を明らかにした。

【実験 1】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する。

【実験 2】間質性肺炎を合併する肺癌患者に肺切除術を施行すると、術後急性増悪を来しやすい。間質性肺炎モデルとしてブレオマイシン(BLM)誘発性肺線維症があり、急性期に肺損傷を生じ、その後線維化が生じる。肺全摘が BLM 誘発性肺損傷・線維化に及ぼす影響を明らかにする。

【実験 3】胸腔鏡を用いて小さな創で肺切除を行う手術が低侵襲手術として普及している。しかし臨床では標準化された研究の組み立てが困難であり、侵襲の評価も難しい。そこでマウスにおいて左肺全摘術を施行し、5mm の小さな創で肋間筋以外の筋肉を切断しない小開胸手術と、20mm の創で筋肉切断と肋骨切断を伴う大開胸手術とで術後の回復を比較する。

3つの実験で、残存肺に生じる変化を肺損傷の面から比較し、特に High mobility group box 1(HMGB1)に注目する。

(2) 広範な肝細胞壊死を特徴とする劇症肝不全において HMGB1 が病態に深く関わっているという仮説のもと、劇症肝不全において新たな治療法を開発すべく本実験に着想した。今回の研究は HMGB1 阻害が劇症肝不全の病態改善につながる

かどうかを明らかにすることを目的とする。

## B. 研究方法

(1) 【実験 1】 C57BL/6 マウス(雄性, 8 週齢)に対し経口挿管して人工呼吸管理下(1 回換気量 0.2ml、換気回数 80/分、PEEP 2cm/H<sub>2</sub>O、FiO<sub>2</sub>: 0.21)に左肺全摘(PNX)を施行し、残存右肺にエンドトキシン(LPS)を経気管投与する。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、HMGB1 の濃度を測定、評価する。

【実験 2】 C57BL/6 マウスに対し人工呼吸器管理下で右肺に塩酸ブレオマイシン(BLM)1.0 mg/kg(通常肺線維症を生じさせる 1/3 量)或いは生理食塩水を経気管投与した後、左肺全摘術或いは sham operation を施行する。

【実験 3】 C57BL/6 マウスに左肺切除術(PNX)を施行する。小開胸群(Mini-ThX)では 5mm の創で肋間筋以外の筋肉を切断せずに開胸する。大开胸群(後側方開胸: PLT-ThX)では 20mm の創で筋肉を切断し、第 5 肋間にて開胸し、第 6 肋骨を切断する。手術後の体重変化と摂食量を開胸のみの群も含め 4 群で評価する。また術後 24 時間で、肺湿乾重量比と肺血管透過性、肺胞洗浄液中の HMGB1 濃度測定を行った。

(2) <実験 1: ラット劇症肝不全モデルにおける HMGB-1 動態の検討> (1) SD ラット(体重 250-300 g)にイソフルレン全身麻酔下に D-ガラクトサミン(1.4 g/Kg)を陰茎静脈より静脈内投与し、薬剤性劇症肝不全を誘発する。(2) 劇症肝不全誘発後 12 時間毎に各種パラメータを測定・評価し、HMGB-1 動態を検討する。  
<実験 2: ラット劇症肝不全モデルにおける抗 HMGB1 抗体投与の予後改善効果の検討> (1) <実験 1> と同様のラット薬剤性劇症肝不全モデルを作成する。(2)(1)の直後に、治療群に対しては抗 HMGB1 抗体(6mg/Kg)を、

対照群にはコントロール抗体を(6mg/Kg)を静脈内投与し劇症肝不全誘発後 12 時間毎に各種パラメータを測定・評価し、HMGB1 動態および、治療効果を検討する。

## C. 研究結果

(1) 【実験 1】 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(Figure 1)、炎症細胞の集積を認めた(Figure 2)。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 HMGB1 の濃度が有意に上昇した(Figure 3)。

Figure 1

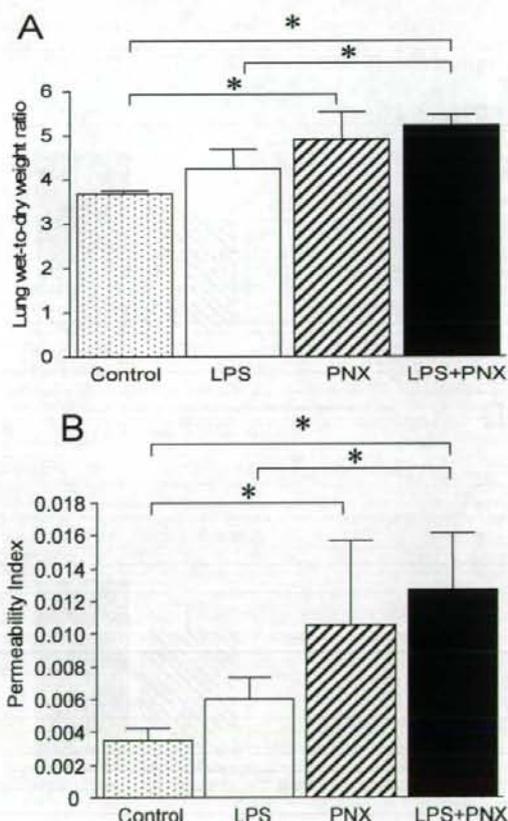


Figure 2

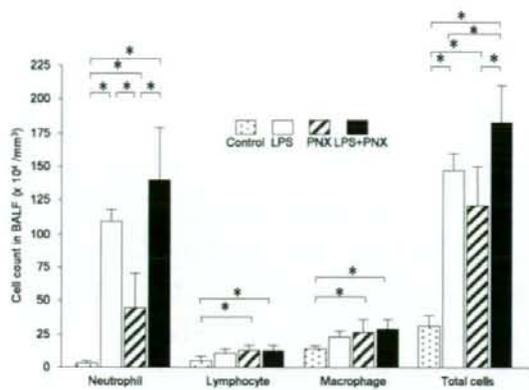
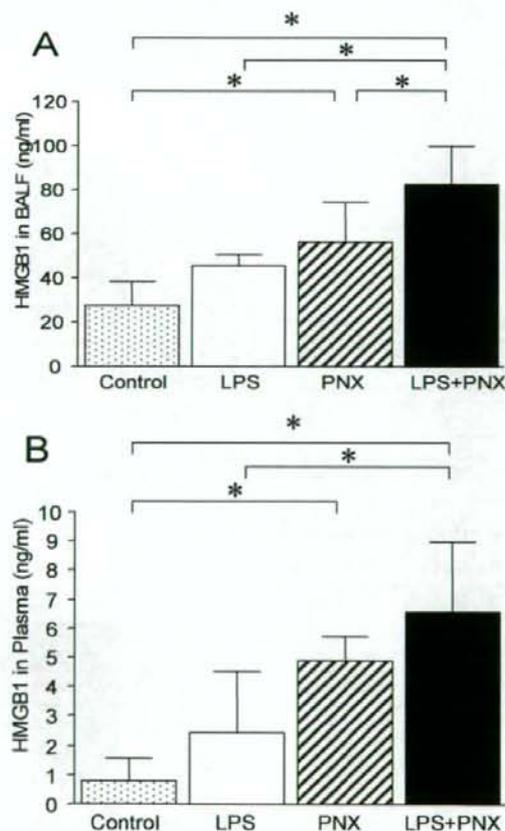


Figure 3



【実験2】術後7日目、残存右肺での肺血管透過性と肺浮腫、BALF中の炎症細胞数は、BLMに肺全摘が加わることで有意に亢進、増加した (Figure 4)。BLM単独と比較して組織学的に残存右肺で線維化が著明で (Figure 5)、コラーゲン含量も2倍に増加した (Figure 6)。またBALF中では、BLM単独と比較し、肺線維化に関与すると考えられているメディエーター、IL-1 $\beta$ (1.4倍)、IL-6(3倍)、MCP-1(3.7倍)、RANTES(2倍)、KC(3.8倍)、HMGB1(1.4倍)の濃度が有意に上昇していた (Figure 7)。

Figure 4

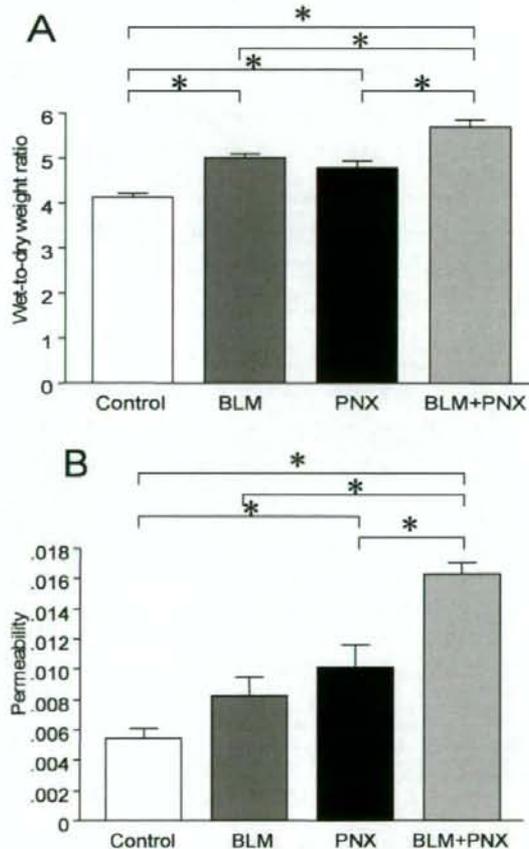


Figure 5

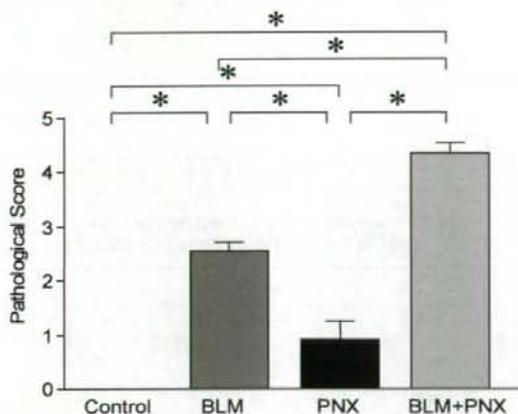


Figure 6

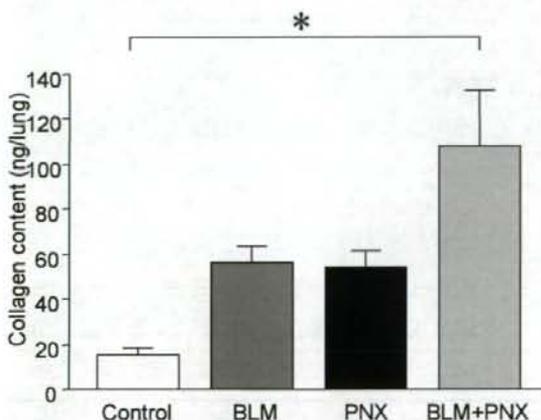
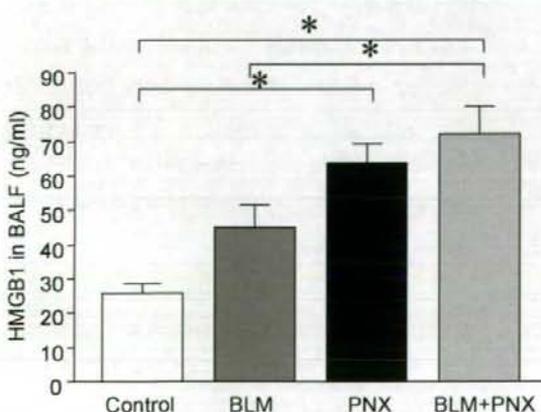


Figure 7



【実験3】術直後の体重変化に有意差を認めなかったが、術後1日から5日目までの体重減少が小開胸群で有意に少なかった( $p < 0.05$ ) (Figure 8)。術前の体重に回復するまでに要する日数は小開胸群では $3.0 \pm 0.6$ 日、大開胸群では $5.3 \pm 0.8$ 日だった。術後24時間までの摂食量は小開胸群で有意に多かった( $p < 0.05$ )。また、肺湿乾重量比( $4.2 \pm 0.2$  vs  $6.0 \pm 0.7$ ;  $p < 0.05$ ) (Figure 9)及び肺血管透過性( $0.006 \pm 0.001$  vs  $0.008 \pm 0.001$ ;  $p < 0.05$ ) (Figure 10)、肺胞洗浄液中のHMGB1濃度( $49 \pm 9$  vs  $123 \pm 30$  ng/ml;  $p < 0.05$ )は大開胸群と比較して小開胸群では有意に低値であった(Figure 11)。

Figure 8

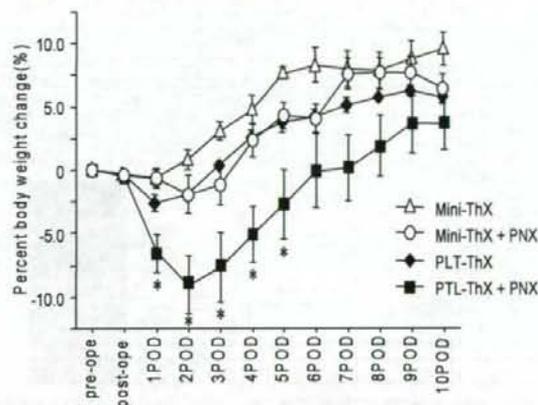


Figure 9

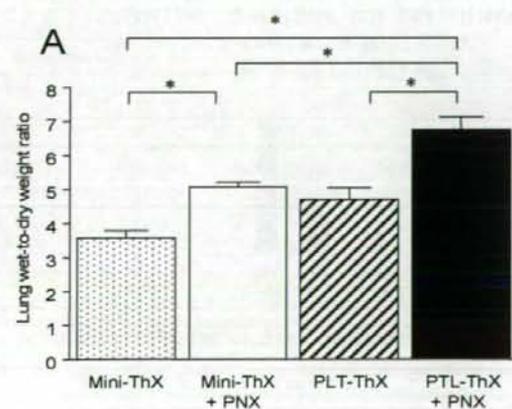


Figure 10

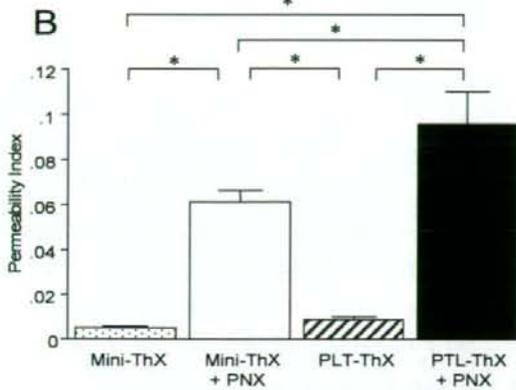
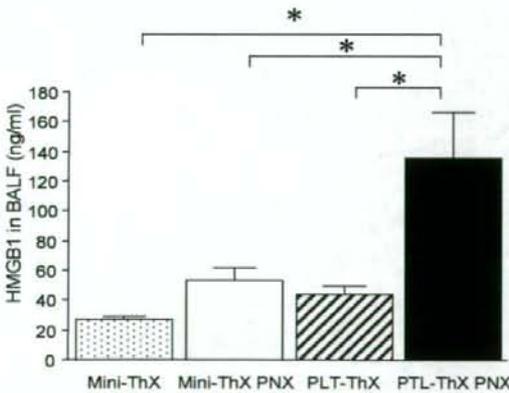
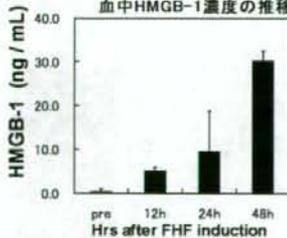


Figure 11



(2) <実験1> 劇症肝不全誘導後に経時的に血清 HMGB1の上昇が確認された (図1)。

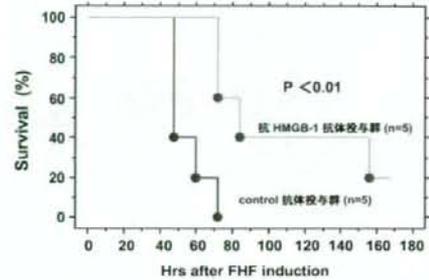
図1. ラット劇症肝不全モデルにおける 血中HMGB-1濃度の推移



<実験2> 抗HMGB-1抗体投与群では control 抗体投与群と比較して有意に生存率が改善した (図2)。劇症肝不全誘発48時間後の血清中HMGB1

は、対照群が $39.9 \pm 3.54$  (pg/mL)であったのに対し、治療群では $11.4 \pm 4.68$  (pg/mL)と上昇が抑制された。また同採血においてAST ( $17333 \pm 3136$  Vs  $6746 \pm 1698$  IU/mL)、ALT ( $11065 \pm 3073$  Vs  $6373 \pm 1427$  IU/mL)、LDH ( $6764 \pm 4462$  Vs  $1879 \pm 1050$  IU/mL)が、治療群で有意に低値を示した ( $p < 0.05$ )。

図2. ラット劇症肝不全モデルに対する 抗HMGB-1抗体投与の治療効果 (生存曲線)



#### D. 考察

- (1) 肺切除は残存肺に HMGB1 を始めとする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。線維化モデルでは、肺全摘後の残存肺で BLM による肺損傷が悪化し、線維化も促進された。肺全摘によって惹起された炎症性サイトカインやケモカイン、HMGB1 が形成するネットワークの関与が示唆された。マウス肺切除術モデルにおいて体重減少と摂食量とで外科的侵襲を評価すると、小開胸では大開胸と比較して低侵襲であった。また、残存肺に生じる occult lung injury も小開胸により軽減されており、術後の呼吸器合併症の発症や重篤化を抑制する可能性が示唆された。
- (2) 劇症肝不全の病態に HMGB1 が深く関与しており、HMGB1 制御が劇症肝不全の病態を改善すると考えられた。

## E. 結論

- (1) 肺切除は残存肺に HMGB1 を始めとする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やブレオマイシン誘発性肺線維症を悪化させると考えられた。また残存肺に生じる occult lung injury が小開胸下に行うことにより軽減され、術後の呼吸器合併症の発症や重篤化を抑制する可能性が示唆された。
  - (2) HMGB1 制御がラット劇症肝不全モデルの病態と予後を改善した。
2. 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、小林絃一。肺切除術後の残存肺には急性肺損傷が潜在する。第 47 回日本呼吸器学会学術講演会。2007.5.10-12. 東京
  3. 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、小林絃一。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。第 24 回日本呼吸器外科学会総会。2007.5.17-19. 横浜

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Tajima, A., Kohno, M., Watanabe, M., Izumi, Y., Tasaka, S., Maruyama, I., Miyasho, T., and Kobayashi, K. Occult injury in the residual lung after pneumonectomy in mice. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 7: 1114-1120, 2008.
2. Kakizaki, T., Kohno, M., Watanabe, M., Tajima, A., Izumi, Y., Miyasho, T., Tasaka, S., Fukunaga, K., Maruyama, I., Ishizaka, A., and Kobayashi, K. Exacerbation of Bleomycin-Induced Injury and Fibrosis by Pneumonectomy in the Residual Lung of Mice. *J Surg Res*, 2008.

### 2. 学会発表

#### 国内学会

1. 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、小林絃一。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。第 107 回日本外科学会定期学術集会 2007.4.11-13. 大阪
4. 河野光智、田島敦志、柿崎徹、渡辺真純、泉陽太郎、川村雅文、堀之内宏久、小林絃一。胸腔鏡下肺切除術が残存肺に及ぼす影響について—マウス肺切除モデルにおける検討—。第 60 回日本胸部外科学会定期学術集会。2007.10.17-20. 仙台、
5. 河野光智、田島敦志、柿崎徹、江間俊哉、池田達彦、渡辺真純、泉陽太郎、川村雅文、堀之内宏久、小林絃一。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。第 20 回日本内視鏡外科学会総会。2007.11.19-21. 仙台
6. 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、and 小林絃一。肺切除により残存肺でのエンドトキシン投与急性肺損傷は悪化する。第 48 回日本呼吸器学会学術講演会 2008.6.15-17. 神戸
7. 河野光智、柿崎徹、田島敦志、渡辺真純、江間俊哉、泉陽太郎、川村雅文、堀之内宏久、and 小林絃一。肺全摘術は術後残存肺での肺

線維化を悪化させる マウス肺全摘+ブレオマイシン誘発性肺線維症モデルでの検討. 第108回日本外科学会定期学術集会, 2008.5.15-17.長崎

8. 河野光智, 田島敦志, 池田達彦, 江間俊哉, 泉陽太郎, 渡辺真純, 堀之内宏久, 川村雅文, and 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. 第49回日本肺癌学会総会, 2008.11.13,14.北九州
9. 高野公德, 篠田昌宏, 他 (1/16). ブタ劇症肝不全モデルにおける血清中 HMGB-1 動態の検討. 日本消化器病学会, 福岡, 2008.5.
10. 高野公德, 篠田昌宏, 他(1/16).ブタ劇症肝不全モデルにおける血清中 HMGB1 動態の検討.日本外科学会, 長崎, 2008.5.
11. 高野公德,他. ブタ劇症肝不全モデルにおける血清中 High-mobility group box 1 動態.日本消化器外科学会, 札幌, 2008.7.
12. 篠田昌宏,高野公德,他 (1/16). 薬剤誘導性ブタ劇症肝不全モデルにおける血清中 HMGB-1 動態の検討. 日本移植学会, 大阪, 2008.9.

#### 国際学会

1. Takano K, Shinoda M, Tanabe M, et al (1/16). An increased serum level of high-mobility group BOX-1 in the fulminant hepatic failure model. American Society of Transplantation 12th Annual Winter Symposium, Palm Springs, 2008.3.
2. Takano K, Shinoda M, et al (1/16). An increased serum level of high-mobility

group box 1 in the pig fulminant hepatic failure model. Digestive Disease Week, San Diego, 2008.5.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当せず

## 重症肺感染症と HMGB-1, HMGB1 遮断による ARDS 予防に関する研究

石坂彰敏 慶應義塾大学医学部内科学教室呼吸器内科・教授

### 研究要旨

ALI/ARDS の原因疾患（病態）として敗血症、誤嚥性肺炎、侵襲の大きな外科的手術、重度の局所炎症性疾患などがあげられる。我々は ALI/ARDS において HMGB1 が重要なメディエーターのひとつであることはすでに報告しているが（Ueno H, *Am J Respir Crit Care Med*, 2004）、これら原因疾患における HMGB1 を制御することで ALI/ARDS の病態を改善できるのではないかと考え動物疾患モデルおよび患者の臨床検体を用いて検討を行った。結果、(1)誤嚥性肺炎マウスモデルにおいて抗炎症性脂質メディエーターレゾルビン E1(RvE1)が細菌の増殖を抑制するとともに HMGB1 産生を制御した。(2) 抗生剤を使用しない CLP ラットに対する  $\gamma$ グロブリン製剤投与実験により、汎発性腹膜炎による敗血症に対する  $\gamma$ グロブリン製剤大量投与は HMGB1 の産生を抑制し、本疾患における有効性が示唆された。(3) 食道癌手術において手術直前の血清 HMGB1 濃度の測定により術後合併症発症の高危険群を予測できる可能性が示唆された。また、ステロイド投与により高 HMGB1 血症を改善できる可能性が示唆された。

以上より HMGB1 の制御は ALI/ARDS の原因疾患（病態）を改善しうることが示唆され、また侵襲の大きな手術後の合併症の予測マーカーになりうる可能性が考えられた。

### A. 研究目的

我々は重症肺感染症と HMGB1, HMGB1 遮断による Acute lung injury/ Acute respiratory distress syndrome (ALI/ARDS) 予防を目的として下記 5 項目について研究を遂行してきた。すなわち今回の研究期間を通じて我々は ALI/ARDS あるいは感染症、敗血症疾患動物モデルを用いて血清 HMGB1 を制御させることが病態進展の制御に有効であるのではないかと考え実験を進めた。また食道癌手術などの大きな外科的侵襲を要する手術の場合 ALI/ARDS が重篤な合併症のひとつであるが、この際の血清 HMGB1 濃度が臨床経過の予測因子

や重症度のマーカーとなり得るかについて検討した。

- (1) 誤嚥性肺炎マウスモデルにおける HMGB1 の発現に対する抗炎症性脂質メディエーターレゾルビン E1(RvE1)による制御についての検討。
- (2) 盲腸結紮穿刺(Cecal ligation and puncture; CLP)ラットに対する  $\gamma$ グロブリン製剤投与の有効性と HMGB1 の制御について検討する。
- (3) 食道癌根治術症例における術前 HMGB1 値と術後経過の関係に関して検討する。

## B. 研究方法

- (1) 7週齢 C57BL/6 雄性マウスに RvE1 (100 ng, 100 $\mu$ l 生理食塩液) あるいはコントロールとして生理食塩液 (100 $\mu$ l) を尾静脈投与し、その 30 分後に左肺選択的に塩酸 (25 $\mu$ l, pH1.0, 0.1N) 投与を行った。12 時間後に再度左肺選択的に大腸菌 ( $1 \times 10^5$  コロニー) を投与した。大腸菌投与 24 時間後にマウスより左肺を採取してホモジナイズした後 agar plate 上で 24 時間培養し、得られた colony forming units (CFU) から左肺内大腸菌数を求め、左肺内大腸菌数/投与した大腸菌数=クリアランス比として RvE1 が肺内での大腸菌の増殖を抑制するかを検討した。さらにホモジナイズした際に得られた上清を用いて好中球ミエロペルオキシダーゼ (MPO) 濃度および HMGB1 産生量について検討した。
- (2) ラット (SD, 8 週齢, 250-300g, オス) を用いて CLP モデルを作成した。モデル作成 24 時間前, 12 時間前, モデル作成直前の計 3 回, 大量投与 (High) 群 (n=11) :  $\gamma$  グロブリン 150mg/3ml/回, 通常量投与 (Low) 群 (n=10) :  $\gamma$  グロブリン 30mg/3ml/回, コントロール (High) 群 (n=12) : 生理食塩水 3ml/回を皮下注し, 7 日間生存観察を行った。次に, 各群 n=12 において血清 HMGB1 値および各種サイトカイン値 (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10) を手術 4 時間後, 8 時間後, 20 時間後, 44 時間後に測定した。さらに, 各種臓器機能を評価するために採血 (alb, LDH, AST, ALT, BUN, Cr, エンドトキシン値, 手術 4 時間後, 各群 n=6), 肺の病理組織像 (手術 8 時間後, 各群 n=3) についても検討した。
- (3) 2004 年 8 月~2006 年 5 月に食道癌根治術を施行した 33 例 (術前ステロイド非投与群) および 2006 年 3 月~2007 年 7 月に食道癌根治術を施行した 24 例 (術前ステロイド投与群) の術直前の HMGB1 濃度と術後合併症の関係に関して検討を行った。

## (倫理面への配慮)

動物実験に関しては慶應義塾大学医学部倫理委員会承認のもと, 無用の苦痛を動物に与えないような手段を用いて施行した。また, 患者血清採取に関しても, 慶應義塾大学医学部倫理委員会承認のもと, 患者の同意を得た上で施行した。

## C. 研究結果

- (1) RvE1 投与群ではコントロール (CTL) 群に比べ塩酸投与後の肺内における大腸菌の増殖が約 1/3 に抑制された (RvE1 vs CTL:  $0.60 \pm 0.21$  vs  $3.55 \pm 1.26$ ,  $p < 0.05$ )。また肺の MPO 濃度は RvE1 投与群において有意に低下した (RvE1 vs CTL:  $613 \pm 333$  vs  $1010 \pm 315$  ng/ml,  $p < 0.05$ )。さらに HMGB1 濃度についても有意な低下を認めた (RvE1 vs CTL:  $280.8 \pm 43.9$  vs  $367.0 \pm 25.8$  ng/ml,  $p < 0.05$ )。
- (2) 手術 7 日後の生存率は High 群 : 8/11 (73%), Low 群 : 4/10 (40%), コントロール群 : 4/12 (33%) であり, Low 群では生存率の改善を認めなかったが, High 群では有意に生存率が改善した ( $p = 0.037$ )。  
手術 4 時間後の採血では腎機能の指標となる BUN, Cr 値の上昇が High 群で有意に抑制された ( $p < 0.05$ )。肺組織像を含む他の臓器機能およびエンドトキシン値においても同様の傾向が見られたが, 有意差は認めなかった。  
経時採血におけるサイトカインの評価では, 手術 4 時間後における HMGB1 値の上昇が High 群では有意に抑制された ( $p < 0.05$ )。他のサイトカイン (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10) においては同様の傾向は見られなかった。
- (3) 術前ステロイド非投与, 術前ステロイド投与のいずれの群においても, 術後非手術操作関連合併症を発症した症例が, 発症しなかった症例と比較して有意に術直前の血清 HMGB1 濃度が高値であった。また, 術前ステロイド投

与群は、非投与群に比べて有意に術直前血清 HMGB1 濃度が低値であり、重篤な合併症の発症率が低い傾向を認めた。

#### D. 考察

- (1) 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 は塩酸肺障害後 2 次的に起こった細菌の増殖を制御しさらに HMGB1 の産生量を抑制した。今回の RvE1 投与は塩酸肺障害が惹起する直前の投与であり、昨年度報告した RvE1 が塩酸肺障害後の好中球の集積を抑制した結果をふまえると RvE1 の予防的投与が炎症の広がりを抑制し細菌性肺炎の増悪を防ぐ可能性が考えられる。炎症の増悪の遷延に関与すると言われている HMGB1 の産生も RvE1 が結果的に制御することで誤嚥性肺炎の増悪を防ぐことが示唆された。
- (2) 抗生剤を使用しない CLP ラットに対する  $\gamma$  グロブリン製剤投与実験により、汎発性腹膜炎による敗血症に対する  $\gamma$  グロブリン製剤大量投与の有効性が示唆された。肺組織像を含む各種臓器機能の評価では、 $\gamma$  グロブリン製剤を投与することにより dose-dependent に臓器障害を抑制できる傾向があり、血清 BUN, Cr 値においては有意差を認めた。これまでの検討により、当 CLP モデルは術後 4-8 時間における高 HMGB1 血症が生存率を規定する重要な因子であることが推測されている。今回の検討においても術後 8 時間以内に死亡する重症度の高いラットでは生存例に比し、手術後 4 時間における HMGB1 値が有意に高かった。一方、他のサイトカインでは同様の傾向は見られず、術後の HMGB1 値の上昇が  $\gamma$  グロブリン製剤の大量投与により抑制されたことが、臓器障害を軽減できた要因のひとつと考えられた。

- (3) 術前血清 HMGB1 濃度が術後経過の予測因子として有用である可能性が、今回の研究結果により示された。また、ステロイド投与によって高 HMGB1 血症の状態を改善できる可能性や、術前からの高 HMGB1 血症を改善することによって術後経過を改善できる可能性が示唆された。

#### E. 結論

- (1) 誤嚥性肺炎マウスモデルにおいて RvE1 は塩酸投与による肺障害後の大腸菌の増殖ならびに肺内への好中球の過剰な浸潤と HMGB1 の産生を抑制した。
- (2)  $\gamma$  グロブリン製剤大量投与が HMGB1 を解した機序で敗血症の病態を改善する可能性が示唆された。
- (3) 術直前の血清 HMGB1 濃度の測定により術後合併症発症の高危険群を予測できる可能性が示唆された。また、ステロイド投与により高 HMGB1 血症を改善できる可能性が示唆された。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 須田康一, 北川雄光, 竹内裕也, 宮庄拓, 岡本実, 才川義朗, 福永興孝, 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.
2. 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.

### 3. 学会発表

#### 国内

1. 福永興彦：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
2. 福永興彦：魚油と抗血栓、抗炎症. 2007 予防医学会 シンポジウム
3. 須田康一, 北川雄光, 竹内裕也, 宮庄拓, 岡本実, 才川義朗, 福永興彦, 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
4. 須田康一, 北川雄光, 竹内裕也, 宮庄拓, 岡本実, 才川義朗, 福永興彦, 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
5. 須田康一, 竹内裕也, 才川義朗, 宮庄拓, 岡本実, 福永興彦, 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
6. 須田康一, 北川雄光, 竹内裕也, 宮庄拓, 岡本実, 福永興彦, 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
7. 須田康一, 竹内裕也, 宮庄拓, 岡本実, 和田則仁, 才川義朗, 福永興彦, 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
8. 須田康一, 竹内裕也, 和田則仁, 才川義朗, 宮庄拓, 岡本実, 福永興彦, 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
9. 須田康一, 竹内裕也, 宮庄拓, 岡本実, 和田則仁, 才川義朗, 福永興彦, 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
10. 吉川貴久, 須田康一, 竹内裕也, 宮庄拓, 岡本実, 山田晋吾, 横田博, 丸山征郎, 石坂彰敏, 北川雄光：敗血症に対する  $\gamma$  グロブリン製剤の有効性に関する基礎的検討. 第 63 回日本消化器外科学会総会, 北海道, 2008. 口演
11. 吉川貴久, 須田康一, 竹内裕也, 大山隆史, 宮庄拓, 岡本実, 山田晋吾, 横田博, 丸山征郎, 石坂彰敏, 北川雄光：食道癌手術患者の HMGB-1 術前値の臨床的意義の検討.

第 15 回外科侵襲とサイトカイン研究会, 岩手, 2008. 口演

12. 吉川貴久, 須田康一, 竹内裕也, 大山隆史, 宮庄 拓, 岡本 実, 山田晋吾, 横田 博, 丸山征郎, 石坂彰敏, 北川雄光: 食道癌手術患者の HMGB-1 術前値の臨床的意義の検討. 第 109 回日本外科学会定期学術集会, 福岡, 2009. ポスター

#### 海外

1. Takahisa Yoshikawa, Hiroya Takeuchi, Koichi Suda, Taku Miyasho, Minoru Okamoto, Shingo Yamada, Hiroshi Yokota, Ikuro Maruyama, Akitoshi Ishizaka, Yuko Kitagawa ; Preoperative HMGB-1 levels possibly relate to the occurrence of postoperative complications after esophagectomy. The 3<sup>rd</sup> International Damaged Associated Molecular Pattern Molecules (DAMPs) and Alarmins Symposium. PA, USA, 2008. Poster
2. Takano K, Shinoda M, Tanabe M, et al (1/16) . An increased serum level of high-mobility group BOX-1 in the fulminant hepatic failure model. American Society of Transplantation 12th Annual Winter Symposium, Palm Springs, 2008.3.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

## 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・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。また重症患者管理に重要な抗凝固薬、血糖値と HMGB1 についても検討する。

#### 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。HMGB1 を吸着カラムを使用することで血液中から除去し、新たな治療法の実現による救命率の向上に繋げることを目的とする抗凝固薬の HMGB1 制御への影響を検討する。さらに HMGB1 活性に影響する薬剤、血糖値について検討する。

#### 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。また LPS 投与ラットでの各種薬剤、高血糖の影響についても検討した。

#### （倫理面への配慮）

本研究での動物実験に際して、動物の愛護及び管理に関する法律、実権動物の飼育及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準を遵守するとともに、大分大学規定の動物実験の実施に関する基本指針、動物の処分方法に関する指針に基づき、実験計画書を動物実験委員会に申請し、委員会の承認を得て、適正な飼育保管基準に即し、本研究を実施し

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。また種々の抗凝固薬は HMGB1 の活性を制御した。

#### D. 考察

敗血症により血中 HMGB1 が上昇してくるが、この HMGB1 を吸着カラムで除去することで血中 HMGB1 濃度の上昇を抑制できた。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。さらに種々の抗凝固薬も HMGB1 活性を抑制しカラムとの併用も考慮される。高血糖の管理も HMGB1 制御に重要と考えられた。

#### 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。同時に種々の抗凝固薬による HMGB1 活性の抑制、血糖管理の必要性が認識された。

## 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／海里マリン病院 部長

### 研究要旨

炎症の後期メディエーターとして知られる 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分泌される。これらの経路における HMGB1 には転写後修飾の違いがあることが報告され、能動的分泌される HMGB1 はアセチル化されていることが明らかにされている。アセチル化修飾を受けるリジン残基はそのレセプターの1つである RAGE 結合領域内にあることから、受動的に放出される HMGB1 と細胞壊死により分泌された HMGB1 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た。また血清中に放出された HMGB1 の機能を明らかにするため、様々な病態モデルマウスを作製し HMGB1 の発現量を検討した。

### 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。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。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。また HMGB1 は細胞の増殖や免疫応答においても機能することから、様々な病態モデル動物を用いて HMGB1 の関与さらにはアセチル化による調節についても検討していく。

### B. 研究方法

アセチル化の有無による機能の違いを検討するため、時期特異的に発現を誘導できる細胞外分泌型、非アセチル化型、疑アセチル化型の変異体

HMGB1 発現ベクターを構築した。細胞レベルでの HMGB1 のアセチル化機能を解析するために、これらのベクターを用いて変異体 HMGB1 を発現する stable cell line を構築した。さらに個体レベルでの機能解析のため野生型マウスの受精卵および HMGB1 の発現を非誘導時に抑制する tet リプレッサーマウスの受精卵に挿入しトランスジェニックマウスの作製を行った。またアセチル化 HMGB1 を特異的に検出するため、リジン残基をアセチル化したペプチドを抗原として抗アセチル化 HMGB1 抗体の樹立を試みた。病態モデルマウス（骨粗鬆症モデル、コラーゲン誘導型関節炎、腎繊維化モデル、遅延型アレルギーモデル）を作製し、マウスの血清および組織を採取した。血清中の HMGB1 量を ELISA を用いて測定した。

### C. 研究結果

細胞において構築した各変異体 HMGB1 の薬剤依存的な発現が認められ、細胞外分泌型 HMGB1 は培養上清中においても検出できた。HMGB1 トランスジェニックマウスを作製するため細胞分泌型 HMGB1 を導入した。その結果得られた個体はほとんど野生型であり、HMGB1 遺伝子をもったほとんどの個体は生後 3 週間以内に死亡した。生存しているマウスからは外来の分泌型 HMGB1 のタンパク質発現は認められなかった。また tet リプレッサー遺伝子と HMGB1 を同時に持つ個体は得られなかった。アセチル化 HMGB1 ペプチドに対する抗体作製を試みた結果、現在のところアセチル化型のみを特異的に認識する抗体は得られていない。

病態マウスで血清中 HMGB1 の発現量を調べたところ、塩化ビクリル誘導のアレルギー皮膚炎のマウスにおいて同時にユビキチン化酵素を抑えた場合に炎症と発現量に逆相関が見られた。

### D. 考察

薬剤依存的にアセチル化 HMGB、細胞質 HMGB1 を発現する細胞が得られた。これらは HMGB1 の機能解析において有用なツールとなりうると期待される。しかし導入した分泌型 HMGB1 発現する個体は得られなかったことから、細胞外での HMGB1 の過剰な発現が生体内において毒性を持つことが示唆された。そのため時期・組織特異的な発現を調節しうるトランスジェニックマウスを確立する必要があると考えられる。病態モデルの解析においてタンパク質の分解調節が HMGB1 と関与、もしくは表現型を検出しやすくしている可能性が示唆された。

### E. 結論

GB1 遺伝子導入マウスの結果から HMGB1 は個体内において重要な機能を担っていることが示唆

された。また HMGB1 は敗血症以外の病態モデルにおいても変化が見られたことから、HMGB1 の機能解析において新たな知見が得られると期待される。

これらの解析を通してアセチル化による機能変換を明らかにすることにより、修飾特異的に HMGB1 のシグナルの活性化や抑制を制御することが可能になると期待される。

## 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

分担研究者 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

協力研究者 藤田 基 山口大学大学院医学系研究科救急・生体侵襲制御医学・助教

### 研究要旨

重症頭部外傷は、脳挫傷後の虚血や出血などにより発生したスーパーオキシドラジカル ( $O_2^{\cdot-}$ ) などの活性酸素種により二次的に傷害・修飾される。基礎実験ではラット前脳虚血再灌流モデルで HMGB1 と  $O_2^{\cdot-}$  の関連を検討すると共に、高濃度酸素投与、高血糖状態、アロプリノール投与の HMGB1- $O_2^{\cdot-}$  への影響を検討した。臨床症例では、重症頭部外傷患者および重症中枢神経障害患者である心肺停止蘇生後脳症とくも膜下出血患者の血液・髄液の HMGB1 を測定し、急性中枢神経障害の病態への関与を調べた。その結果、ラット前脳虚血再灌流モデルでは再灌流後に  $O_2^{\cdot-}$  の上昇を認め、また脳組織中および血液中の HMGB1 は上昇し、 $O_2^{\cdot-}$  産生量と HMGB1 濃度に正の相関を認めた。高濃度酸素投与、アロプリノール投与により再灌流後の  $O_2^{\cdot-}$  の抑制を認め、また脳組織中および血液中の HMGB1 の上昇を抑制した。高血糖状態では  $O_2^{\cdot-}$  の異常な産生亢進を認め、脳組織中および血液中 HMGB1 も増加していた。また臨床例において、重症頭部外傷・心肺停止蘇生後脳症・くも膜下出血患者の血液中および髄液で HMGB1 は上昇し、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。各種中枢神経障害マーカーと HMGB1 に正の相関が認められ、また CSF 中の HMGB1 が著明に上昇する患者では 6 ヶ月後の神経学的予後は不良であることから、HMGB1 は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。

### A. 研究目的

HMGB1 の重症中枢神経障害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原因因子として、様々な形で放出される活性酸素種 (ROS) が指摘されている。本研究では、基礎研究としてラット前脳虚血再灌流モデルで HMGB1 とスーパーオキシドラジカル ( $O_2^{\cdot-}$ ) の関連を検討すると

共に、高濃度酸素投与、高血糖状態、アロプリノール投与の脳虚血再灌流時の HMGB1 と  $O_2^{\cdot-}$  に与える効果を検討する。臨床研究では、重症頭部外傷・心肺停止蘇生後脳症・くも膜下出血といった急性中枢神経障害症例において、血液や脳脊髄液 (CSF) の HMGB1 を測定し、その動態と中枢神経障害マーカーとの相関、および神経学的予後を検討する。

## B. 研究方法

### 1. 基礎研究

①ラット前脳虚血再灌流モデルにおける HMGB1 と  $O_2^{\cdot-}$  の関連について

ラットの前脳虚血再灌流モデルは全身麻酔、人工呼吸（吸入酸素濃度  $F_I O_2$ : 0.4）下に血圧、血液ガス等をモニターし、脱血性低血圧と両側総頸動脈結紮で作成した。

対照群は虚血時に両側総頸動脈結紮は行わず、脱血性低血圧のみとした。前脳虚血再灌流を行う虚血再灌流群、前脳虚血再灌流を行い再灌流 20 分後に SOD を投与する虚血再灌流+SOD 群、および対照群の 3 群で検討を行った。前脳虚血を 20 分間行った後に再灌流を行い、再灌流 60 分後まで観察した。頸静脈内に  $O_2^{\cdot-}$  電極を挿入し、経時的に脳灌流血中の  $O_2^{\cdot-}$  値を測定した。虚血再灌流+SOD 群では、再灌流 20 分後に SOD 5 U/g b.w. を静脈内投与した。再灌流 60 分後に血清を採取後、冷生食で灌流し脳組織を採取した。

$O_2^{\cdot-}$  は電流値として測定し、虚血前のベース値からの上昇分  $\Delta I$  (nA) で検討した。また、 $\Delta I$  を単位時間で積分して得られた電荷量  $Q$  (C、単位時間に発生した  $O_2^{\cdot-}$  量を反映) の検討も行った (図 1)。

再灌流 60 分後の血清で HMGB1 濃度を ELISA キットで測定し、また脂質過酸化物質であるマロン酸アルデヒド (malondialdehyde: MDA) を血清および脳組織中で測定した。

②ラット前脳虚血再灌流モデルでの高濃度酸素投与、高血糖状態、アロプリノール投与の検討  
ラットの前脳虚血再灌流モデルは全身麻酔、人工呼吸（吸入酸素濃度  $F_I O_2$ : 0.4）下に血圧、血液ガス等をモニターし、脱血性低血圧と両側総頸動脈結紮で作成した。

前脳虚血を 10 分間行った後に再灌流を行い、再灌流 120 分後まで観察した。頸静脈内に  $O_2^{\cdot-}$  電極を挿入し、経時的に脳灌流血中の  $O_2^{\cdot-}$  値を測定し

た。再灌流 120 分後に血清を採取後、冷生食で灌流し脳組織を採取した。

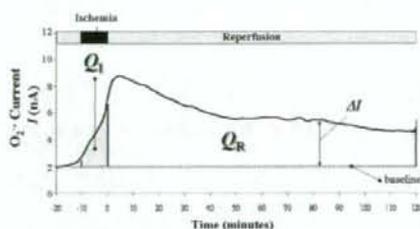
再灌流 120 分後の脳組織および血清で HMGB1 濃度を ELISA キットで測定した。

(1) 高濃度酸素投与の影響について  
前脳虚血再灌流を行い再灌流後も  $F_I O_2$  を 0.4 に保つ正常酸素群、再灌流後から  $F_I O_2$  を 1.0 に上昇させる高濃度酸素群の 2 群で検討を行った。

(2) 高血糖状態の影響について  
虚血作成前に 20%ブドウ糖液を投与し血糖値 300 mg/dL 以上を達成した高血糖群、および生食を投与した正常血糖群の 2 群で検討を行った。

(3) アロプリノールの効果について  
虚血作成の 24 時間および 1 時間前にアロプリノール 100  $\mu$ g/g を投与するアロプリノール低濃度群、アロプリノール 200  $\mu$ g/g を投与するアロプリノール高濃度群、生食を投与する対照群の 3 群で検討を行った。

図1 Evaluation of  $O_2^{\cdot-}$  Current



### 2. 臨床研究

①重症頭部外傷患者における血清および髄液中 HMGB1 の検討  
重症頭部外傷患者 12 例の脳脊髄液 (CSF)、または血液で HMGB1 を ELISA キットにより測定し、受傷 6 ヶ月後の神経学的予後による差を検討した。また、血清のみが入手できた別の重症頭部外傷症例群 (18 例) において各種神経障害マーカー (NSE、

S100B、GFAP) を血清で測定し、血清 HMGB1 との相関について検討した。

②心肺停止蘇生後患者における血清および髄液中 HMGB1 の検討

心肺停止蘇生後患者 13 例における脳脊髄液 (CSF)、動脈血および頸静脈血で HMGB1 を ELISA キットにより測定し、神経学的予後の差で検討した。

③くも膜下出血患者の髄液中 HMGB1 の検討

くも膜下出血患者 32 例の脳脊髄液 (CSF) で HMGB1 を ELISA キットにより測定し、発症 6 ヶ月後の神経学的予後による差を検討した。また、各種神経障害マーカー (NSE、S100B、GFAP) と酸化ストレスマーカー (MDA) を測定し、HMGB1 との相関を検討した。

(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、本院または関連病院の医薬品等治験・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明を行い、代諾者の自由意志による同意を文書で得た。

(倫理面への配慮)

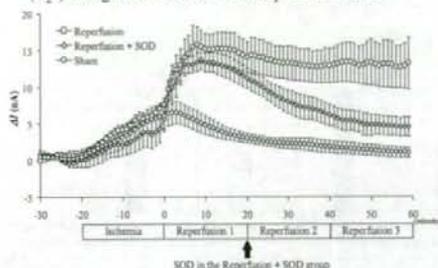
## C. 研究結果

### 1. 基礎研究

①ラット前脳虚血再灌流モデルにおける HMGB1 と  $O_2^-$  の関連について

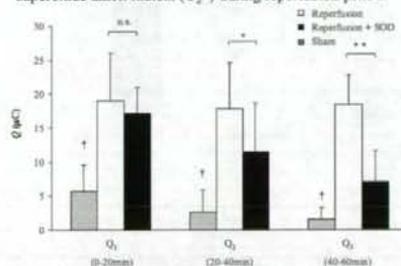
図 2 に頸静脈内で測定した  $O_2^-$  電流値の上昇値  $\Delta I$  を示す。虚血後から 3 群ともに電流値の上昇を認め、再灌流直後から虚血再灌流群、虚血再灌流+SOD 群では電流値の更なる上昇を認めた。虚血再灌流+SOD 群では、再灌流 20 分後の SOD 投与後から電流値の低下を認めた。

図 2. The actual reacted current of superoxide anion radical ( $O_2^-$ ) during forebrain ischemia and reperfusion in rats



再灌流後 20 分毎の電荷量  $Q$  を図 3 に示す。再灌流 20 分後までは、再灌流群と再灌流+SOD 群には差がなかったが、再灌流 20 分から 40 分後、40 分から 60 分後では、再灌流+SOD 群では、虚血再灌流群に比ぶ有意に低値であった ( $Q_2: p < 0.05$ ,  $Q_3: p < 0.01$ )。対照群に対し、虚血再灌流を行った 2 群は、経過中の  $Q$  値は有意に高値であった ( $p < 0.01$ )

図 3. Difference of the quantity of electricity ( $Q$ ) of superoxide anion radical ( $O_2^-$ ) during reperfusion period.



脳組織中および血清 MDA を図 4 に示す。虚血再灌流群および虚血再灌流+SOD 群の脳組織中の MDA は対照群に対して有意に高値であった ( $p < 0.01$ )。虚血再灌流群および虚血再灌流+SOD 群の間には有意差を認めなかった。虚血再灌流群の血清 MDA は、対照群に対して有意に高値であった ( $p < 0.01$ )。虚血再灌流+SOD 群の血清 MDA は、虚血再灌流群に対して有意に抑制された ( $p < 0.05$ )。