

図6 MCAOラット脳のアクアポリン-4発現と抗HMGB1抗体の効果



## In vitro BBB system

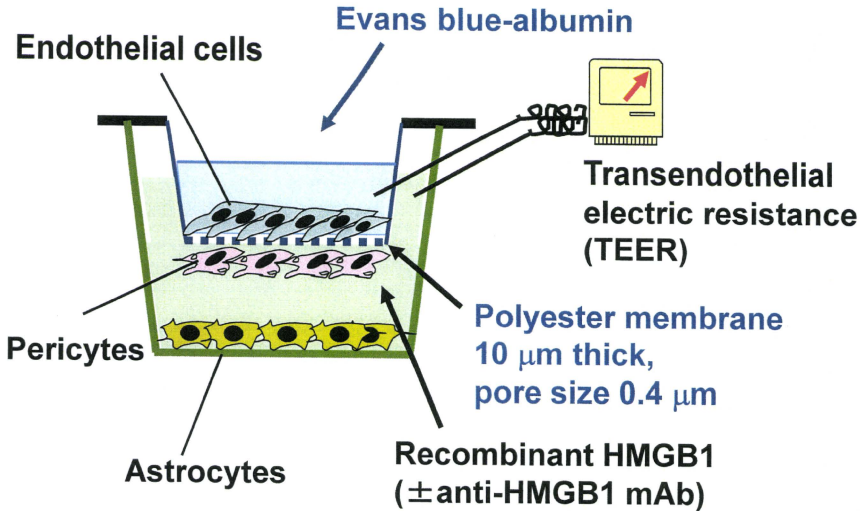


図8 試験管内血液-脳関門(BBB)培養系の模式図

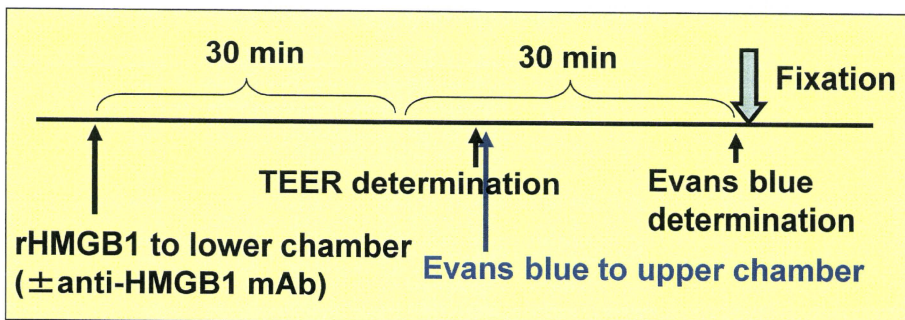


図9 試験管内血液-脳関門(BBB)培養系を用いた実験プロトコール

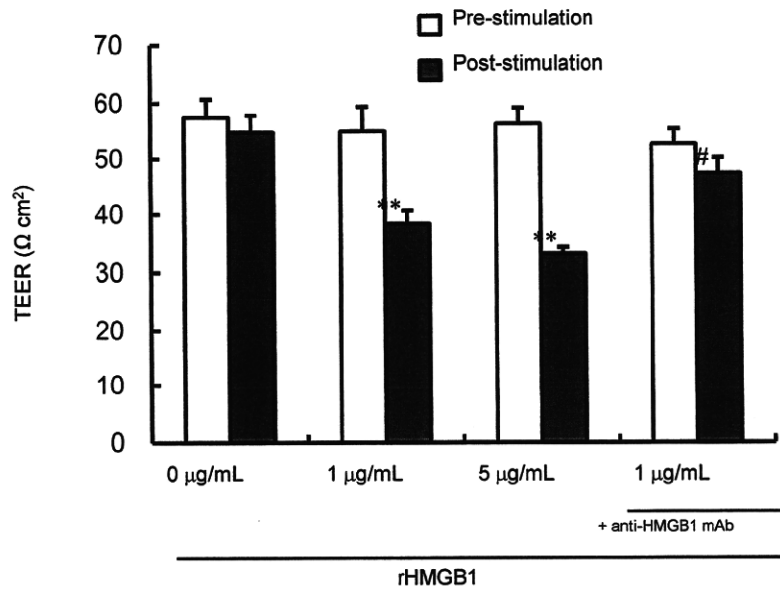
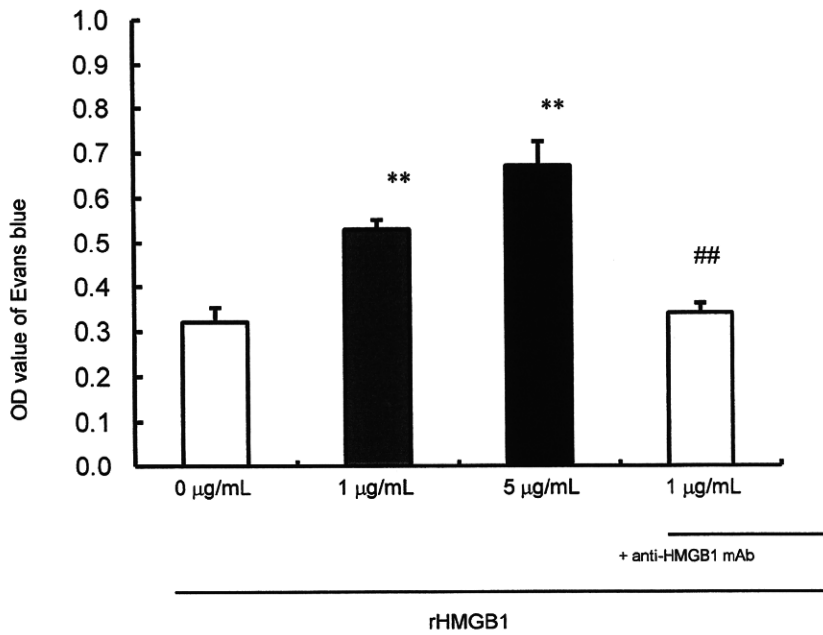
**A****B**

図10 試験管内BBB培養系を用いた組換え体HMGB1活性の検出と抗HMGB1抗体の効果

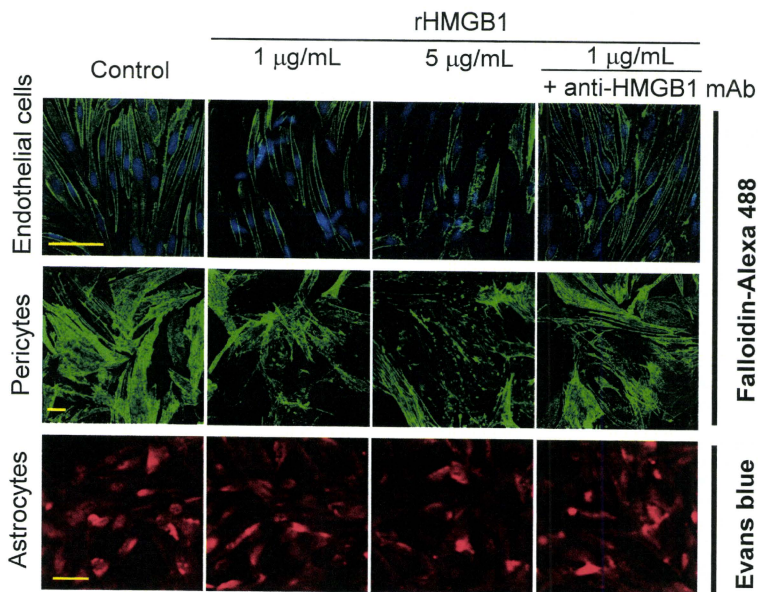
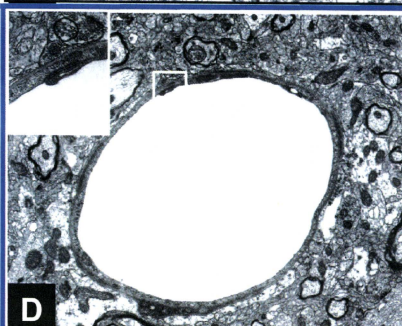
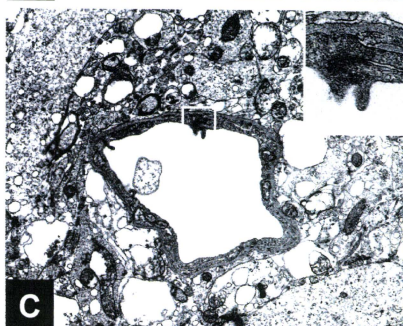
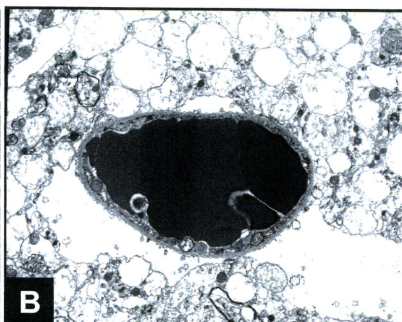
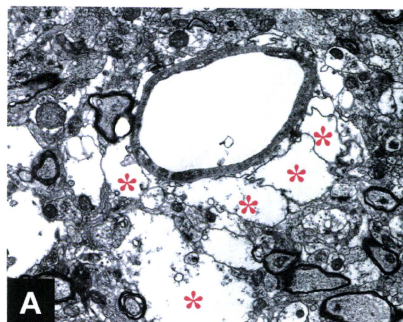


図11 試験管内BBB培養系を用いた組換え体HMGB1活性の検出と抗HMGB1抗体の効果：細胞形態

## 対照抗体

End feet  
の腫脹

微小血栓



Tight junction  
の破綻

抗HMGB1抗体

図12 MCAOラット脳BBB破綻の透過型電子顕微鏡像(A-C)と抗HMGB1抗体の効果(D)

D

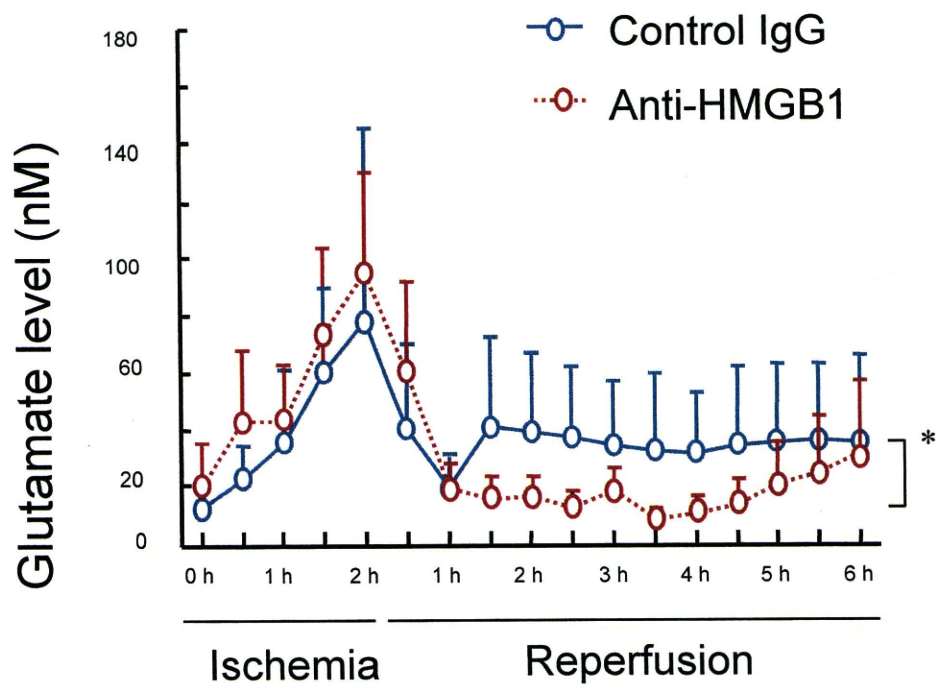
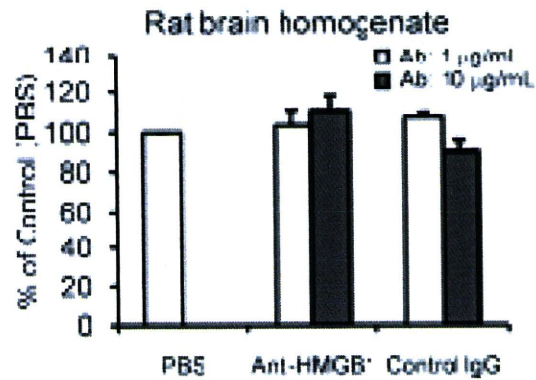


図13 MCAOラット線条体の細胞外グルタミン酸濃度と抗HMGB1抗体の効果



A



B

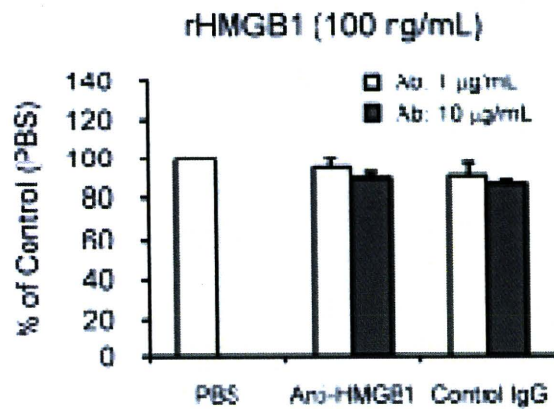


図14 MCAOラットに治療薬として投与された抗HMGB1抗体は、Elisa に影響しない

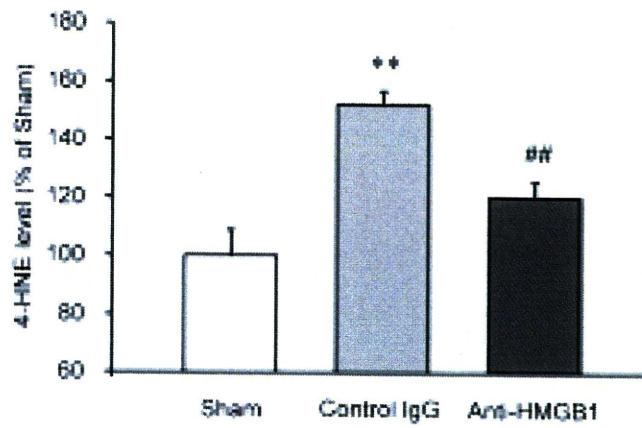


図15 MCAOラットの血中4-HNEの上昇と抗HMGB1抗体の効果

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）  
分担研究報告書

抗 HMGB1 抗体の毒性試験

研究分担者 吉野 正 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授  
松川 昭博 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究要旨

ラットを用いて、抗 HMGB1 ラット単クローン抗体の6日間反復投与毒性実験を実施した。その結果、一般状態、血球細胞、血液生化学、尿検査、重要臓器の病理所見のいずれにおいても重大な有害作用は出現しなかった。急性単回投与毒性実験の結果と併せて、抗 HMGB1 抗体は、急性投与の範囲で安全に使用できる薬物であると考えられる。

A. 研究目的

抗 HMGB1 ラット単クローン抗体の6日間反復投与毒性実験を実施し、急性単回投与の結果と併せて安全性に関する情報を得る。

B. 研究方法

SD系雄性ラットに、抗 HMGB1 ラット単クローン抗体（#10-22, IgG2a サブクラス）を0, 0.75, 1.5, 3.0 mg/kg の用量で6日間連続静脈内投与した。対照として抗 *Keyhole limpet hemicyanin* 抗体（IgG2a）を3.0 mg/kg の用量で同様に投与した。抗体投与ラットの一般状態、体重変化、食餌摂取量を1週間チェックし、7日目に血球細胞、血液生化学、尿検査を実施し、さらにホルマリン固定標本について、全身47組織臓器の組織所見を検討する。

C. 研究結果

抗 HMGB1 単クローン抗体0.75, 1.5, 3.0 mg/kg の6日間連続静脈内投与は、対照抗体投与と比較し、ラットの一般状態、体重増加、食餌摂取量のいずれにおいても、有意の差を

生じることはなかった。

抗体投与7日目で調べた、赤血球数、ヘマトクリット、白血球数、白血球分類、血小板数、APTT、PT は、対照群といずれの投与用量の抗 HMGB1 抗体投与群で差はなく、すべて正常値の範囲内であった。血液生化学検査項目の総蛋白、グロブリン、アルブミン、ビリルビン、AST、ALT、ALP の何れにも、両群間で有意の差はなく、すべて正常値の範囲内であった。尿検査に両群間で差はなかった。心臓、腎臓、肝臓、肺、脳、脾臓、胃、小腸、大腸、前立腺、膀胱を含む全身47組織臓器の病理学的検索の結果、抗 HMGB1 抗体のいずれの用量においても異常所見は認められなかった。

D. 考察

抗 HMGB1 単クローン抗体0.75, 1.5, 3.0 mg/kg の6日間連続静脈内投与は、調べられた評価項目の何れにおいても対照抗体投与群との間に差はなく、またすべての測定値は正常範囲内にあったことから、反復投与において有害作用を生じることはなかったと結

論できる。

## E. 結論

前年度において、10 mg/kg i.v.単回投与のプロトコールで急性毒性実験を行なったが、重要臓器にいかなる障害性の病理所見も認めなかった。今年度の反復投与毒性試験の結果と併せ、抗 HMGB1 抗体の急性投与は、調べられた用量範囲で有害作用なく安全に使用できる投与方法であると結論できる。

## F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Zhang J, Takahashi HK, Liu K, Wake K, Liu R, Maruo T, Date I, Yoshino T, Ohtsuka A, Mori S, Nishibori M, Anti-HMGB1 mAb Protects the Blood-Brain Barrier from Ischemia-Induced Disruption in Rats. **Stroke**. In press.

### 2. 学会発表

Nishibori M, Zhang J, Takahashi HK, Liu K, Wake H, Liu R, Maruo T, Date I, Yoshino T, Ohtsuka A, Mori S. A novel anti-HMGB1 treatment for brain infarction: protection of BBB disruption. The 4<sup>th</sup> international HMGB1 symposium signals of tissue damage, Helsinki, 2010.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

該当なし

### 2. 実用新案登録

該当なし

### 3. その他

該当なし

## 抗 HMGB1 単クローン抗体のラットにおける 1 週間反復静脈内投与毒性試験

吉野 正、松川 昭博、西堀 正洋

### 試験目的

抗 HMGB1 単クローン抗体の安全性に関する非臨床試験の一環として、抗 HMGB1 単クローン抗体をラットに 1 週間反復静脈内投与し、その毒性徴候について検討した。

### 要約

抗 HMGB1 単クローンの安全性に関する非臨床試験の一環として、抗 HMGB1 抗体を 0.75, 1.5 および 3.0 mg/kg の投与量で 1 群各 6 匹の雄性 Crl:CD(SD)ラットに 1 週間反復静脈内投与し、その毒性について検討した。投与容量は 5 mL/kg とした。また、比較対照として、雄 6 匹に抗 KLH 抗体 (投与量: 3 mg/kg) を 5 mL/kg の投与容量で投与した。検査項目として、一般状態観察、体重測定、摂餌量測定、眼科的検査、尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検、器官重量測定および病理組織学的検査を設定した。以下に結果を示す。

抗 KLH 抗体投与群および抗 HMGB1 抗体投与群とも投与期間を通して、死亡例の発生はなかった。

抗 KLH 抗体投与群では、投与 4~6 日の投与後 1 時間にそれぞれ 1/6 例で赤色尿が認められた。

抗 HMGB1 抗体投与群では、赤色尿が投与 4 日の投与後 1 時間に 0.75 mg/kg 群の 6/6 例、1.5 mg/kg 群の 5/6 例、3.0 mg/kg 群の 4/6 例で観察された。赤色尿は、0.75 mg/kg 群では投与 7 日まで 4/6 例で観察されたが、1.5 および 3.0 mg/kg 群では投与 5 日以降は発現例数が減少し、1.5 mg/kg 群では投与 6 日、3.0 mg/kg 群では投与 7 日には赤色尿は観察されなかった。

以上のように、抗 HMGB1 抗体により 0.75 mg/kg 群から赤色尿が認められた。なお、同様の変化は比較対照として設定した抗 KLH 抗体投与群でも観察されており、変化の程度に差はみられなかった。

**1. 材料および方法**

**1.1 被験物質, 対照物質および媒体**

**1.1.1 被験物質**

**1.1.1.1 名称**

抗 HMGB1 抗体

**1.1.1.2 ロット番号**

#10-22, HM20100115

**1.1.1.3 性状**

0.01M Sodium phosphate-buffered saline (pH 7.4) 液の凍結品

**1.1.1.4 純度**

80%

**1.1.1.5 保存条件および保存場所**

機器室 A044 の超低温フリーザーに冷凍 (実測値: -80.5~-74.0°C, 許容範囲: -90~-65°C), 気密, 遮光保存した.

**1.1.1.6 取扱い上の注意**

凍結融解を避けた. また, 使用する際は, 白衣, 保護メガネ, マスクおよび手袋を着用した.

**1.1.2 対照物質**

**1.1.2.1 名称**

抗 KLH 抗体

**1.1.2.2 ロット番号**

KLH20100115

**1.1.2.3 入手量**

53 mg

**1.1.2.4 供給源**

国立大学法人 岡山大学

**1.1.2.5 性状**

0.01M Sodium phosphate-buffered saline (pH 7.4) 液の凍結品

**1.1.2.6 純度**

80%

**1.1.2.7 保存条件および保存場所**

機器室 A044 の超低温フリーザーに冷凍 (実測値: -80.5~-74.0°C, 許容範囲: -90~-65°C), 気密, 遮光保存した。

**1.1.2.8 取扱い上の注意**

凍結融解を避けた。また, 使用する際は, 白衣, 保護メガネ, マスクおよび手袋を着用した。

**1.1.2.9 残余の対照物質の処理**

試験委託者に 2010 年 3 月 15 日に返却した。

**1.1.3 媒体**

0.01M Sodium phosphate-buffered saline

**1.1.3.1 原液の名称**

PBS pH 7.4 (phosphate buffered saline 1×)

**1.1.3.2 媒体の調製法**

投与液調製日に PBS pH 7.4 (phosphate buffered saline 1×) を注射用水 (株式会社大塚製薬工場, ロット番号: 9J79) で 0.01M に希釈した。

**1.2 試験系****1.2.1 動物種**

ラット

**1.2.2 系統**

CrI:CD(SD)

**1.2.3 選択の理由**

本系統は毒性試験に汎用されており, バックグラウンドデータが豊富である。

**1.2.4 購入動物数および性別**

雄 27 匹

**1.2.5 供給源**

日本チャールス・リバー株式会社  
神奈川県横浜市港北区新横浜 3-17-6 (〒222-0033)

**1.2.6 生産場**

日本チャールス・リバー株式会社 日野飼育センター  
滋賀県蒲生郡日野町下駒月 735 番地 (〒529-1633)

**1.2.7 週齢**

入荷時	5 週齢
投与時	6 週齢

**1.2.8 入荷時体重範囲**

121.9～134.4 g

**1.2.9 検疫および馴化**

入荷時に種，系統，週齢，動物数および性別を確認し，一般状態および外観を観察するとともに体重を測定した。検疫馴化期間は 5 日間とし，この間に一般状態の観察を毎日 1 回，体重測定を 2 回（入荷日を含む）および眼科的検査（1.7.4 項参照）を行い，異常が認められなかった動物のみを試験に供した。

**1.2.10 検疫馴化期間中の識別方法**

入荷時に，動物の尾に油性フェルトペンで検疫動物番号を記入するとともに，試験番号，検疫動物番号および性別を表示したラベルを各ケージの前面に付けた。

**1.2.11 群分け**

投与開始前の検査として実施した一般状態観察，体重測定および眼科的検査の結果から眼科的検査で雄 1 例を除外し，投与開始前日にその日の体重を基に層別連続無作為化法で群分けした。残余動物については，試験から除外するとともに，ペントバルビタール・ナトリウムの過剰投与により，安楽死処分した。

**1.2.12 群分け後の識別方法**

動物番号を刻印した耳標を取付けるとともに，試験番号，動物番号，投与量および性別を表示したラベルを各ケージの前面に付けた。



### 1.3 環境条件

#### 1.3.1 飼育環境

##### 1.3.1.1 温度

22.9～23.7°C（許容範囲：21～27°C）

##### 1.3.1.2 湿度

52.5～64.6%（許容範囲：35～75%）

##### 1.3.1.3 換気

10～20 回/時

##### 1.3.1.4 照明

7 時点灯，19 時消灯の 12 時間

#### 1.3.2 飼育器材

##### 1.3.2.1 ケージ

ステンレススチール製（W226×D346×H198 mm）

##### 1.3.2.2 ケージ架台

ステンレススチール製

##### 1.3.2.3 収容動物数

検疫馴化期間中は 1 ケージ当たり 2～3 匹，群分け後は 1 ケージ当たり 1 匹

##### 1.3.2.4 給餌器

ステンレススチール製

##### 1.3.2.5 飼育器材の交換頻度

ケージ，ケージ架台および給餌器

群分け時に交換

受皿

1 週間に 2 回交換

#### 1.3.3 洗浄および消毒

飼育器材は，水洗した後に高圧蒸気滅菌した。飼育室は毎日清掃し，消毒薬（次亜塩素酸ナトリウム）を浸したモップで清拭した。

### **1.3.4 飼料**

#### **1.3.4.1 種類**

固型飼料（CRF-1，オリエンタル酵母工業株式会社）

#### **1.3.4.2 滅菌方法**

高圧蒸気滅菌

#### **1.3.4.3 給餌方法**

自由摂取

#### **1.3.4.4 汚染物質の確認**

オリエンタル酵母工業株式会社が Eurofins Scientific 社に委託して実施したロットごとの分析結果を入手し，飼料中の夾雑物が試験施設の許容基準値を満たしていることを確認した。

### **1.3.5 飲水**

#### **1.3.5.1 種類**

井戸水

#### **1.3.5.2 消毒方法**

次亜塩素酸ナトリウムを添加（約 2 ppm）

#### **1.3.5.3 給水方法**

自由摂取（自動給水装置）

#### **1.3.5.4 分析**

水質検査を 6 ヶ月ごとにニチゴー九州株式会社に依頼し，その分析結果が水道法水質基準に適合していることを確認した。

### **1.4 投与**

#### **1.4.1 投与経路**

静脈内投与

#### **1.4.2 経路の選択理由**

基礎研究における投与経路で，将来的臨床応用を考慮した。

#### 1.4.3 投与回数および投与期間

1日1回，週7日，1週間投与とした．投与開始日を投与1日（Day 1）とし，投与開始週を投与1週（Week 1）と起算した．

#### 1.4.4 投与回数および投与期間の選択理由

ヒトでの急性期治療を想定して選択した．

#### 1.4.5 投与方法

ラット静注用保定器に保定したラットの尾静脈にディスポーザブル注射筒（2.5 mL テルモ社株式会社）および翼付静注針（27G，テルモ社株式会社）を用いて投与した．投与速度は，1 mL/min とした．

#### 1.4.6 投与時刻

9:20～11:58 の時間帯に投与を行った．

#### 1.4.7 投与方法の選択理由

ラットの静脈内投与で通常用いられる方法である．

#### 1.4.8 投与量

抗 HMGB1 抗体の投与量は，0.75，1.5 および 3.0 mg/kg とし，投与容量は 5 mL/kg とした．抗 KLH 抗体の投与量は，3 mg/kg とし，投与容量は 5 mL/kg とした．投与液量はいずれも最新の体重を基に算出した．

#### 1.4.9 投与量設定の根拠

薬理作用の得られた用量の2倍量まで反復投与することとした．

### 1.5 投与液の調製

#### 1.5.1 調製方法

##### 1.5.1.1 抗 KLH 抗体投与液（18 mL 調製の場合）

抗 KLH 抗体を融解してポリプロピレン製容器（滅菌済み）1本にまとめ，転倒混和した．メスシリンダーおよびメスピペットで融解した抗 KLH 抗体を秤量し，媒体（0.01M Sodium phosphate-buffered saline）を加え，所定の濃度になるようにメスアップした．転倒混和し，7本の褐色ガラスバイアルに分注した．

##### 1.5.1.2 抗 HMGB1 抗体投与液（18 mL 調製の場合）

抗 HMGB1 抗体を融解してポリプロピレン製容器（滅菌済み）1本にまとめ，転倒混和した．メスシリンダーを用いて融解した抗 HMGB1 抗体を秤量し，媒体

(0.01M Sodium phosphate-buffered saline) を加え、所定の濃度になるようにメスアップした。転倒混和し、7本の褐色ガラスバイアルに分注した（全量を使用した）。

### 1.5.2 調製頻度

投与1日の投与前に1回行った。

### 1.5.3 保存条件および保存場所

被験物質混合物は薬用冷蔵庫に冷所（実測値：4.4～5.9°C，許容範囲：1～15°C），気密，遮光保存する。

### 1.5.4 投与液の識別方法

投与液を入れたガラス容器に、試験番号，被験物質あるいは対照物質名，濃度，投与量，調製日，保存条件，使用期限および調製者名を記入したラベルを貼付した。

### 1.5.5 投与液中での被験物質の安定性

冷蔵保存で安定である。なお，凍結融解は避ける。

## 1.6 群構成

試験群	投与量 (mg/kg)	投与液濃度 (mg/mL)	性別	使用 動物数	動物番号
抗 KLH 抗体投与群	3	0.6	雄	6	251～256
	0.75	0.15	雄	6	257～262
抗 HMGB1 抗体投与群	1.5	0.3	雄	6	263～268
	3.0	0.6	雄	6	269～274

## 1.7 観察，検査および測定 of 頻度，並びに方法

### 1.7.1 一般状態

投与前，投与後約1時間（投与後30分～1.5時間）に一般状態の観察および生死の確認を行った。

### 1.7.2 体重

投与1，3および7日に測定し，剖検日には最終体重も測定した。