

1.7.3 摂餌量

投与 1, 3 および 7 日に測定した。

13～15 時に飼料を入れた給餌器を秤量してケージにセットし、翌日の同時間帯に給餌器をケージから取り出して残量を秤量した。なお、摂餌量の表示日は、残量の測定日とした。

1.7.4 眼科的検査

投与開始前および投与 1 週（投与前の時間帯）に実施した。投与開始前は全例について、投与 1 週の検査は抗 KLH 抗体投与群および抗 HMGB1 抗体投与の 3 mg/kg 群の全例について検査を行った。

外観を肉眼的に観察したのち、直像検眼鏡（アルファプラス検眼鏡，ハイネ社）を用いて対光反射を確認した。散瞳剤（ミドリン[®]P 点眼液，参天製薬株式会社）の点眼後，スリットランプ（SL-15，興和株式会社）を用い，角膜，虹彩，結膜，水晶体および硝子体の観察を行った。次いで眼底カメラ（RC-2，興和株式会社）を用いて眼底の観察を行った。

1.7.5 尿検査

投与 1 週に実施した。

代謝ケージを用いて 8～11 時の時間帯（その日の投与前の時間帯）の新鮮尿を採取し，引き続き約 24 時間蓄積尿を採取した。採尿日の給餌は新鮮尿採取後に行い，飲水は通常通り与えた。電解質測定用の蓄積尿は測定まで超低温フリーザー（許容範囲：-90～-65°C，実測値：-84.2～-74.5°C）内で凍結保存した。測定終了後の残余試料は超低温フリーザー内に保存し，試験終了時に廃棄した。

検査項目および検査方法

| 項目 | 方法 | 単位または表示 |
|------------|--|----------|
| 尿量 | メスシリンダー測定 | mL/24 hr |
| 色調 | 肉眼的観察 | - |
| 比重 | 屈折率法，尿屈折計，株式会社アタゴ | - |
| ナトリウム (Na) | 電極法，PVA- α III， 株式会社アナリティカル・インスツルメンツ | mEq/24hr |
| カリウム (K) | 電極法，PVA- α III， 株式会社アナリティカル・インスツルメンツ | mEq/24hr |
| クロール (Cl) | 電量滴定法，PVA- α III， 株式会社アナリティカル・インスツルメンツ | mEq/24hr |

以上の 7 項目は，24 時間蓄積尿を用いて検査を行った。

| 項目 | 方法 | 単位または表示 |
|----------|------|-----------------------------------|
| pH | 試験紙法 | 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9 |
| 蛋白質 | 試験紙法 | -, ±, +, ++, +++, +++++ |
| ブドウ糖 | 試験紙法 | -, +, ++, +++, +++++ |
| ケトン体 | 試験紙法 | -, +, ++, +++ |
| ビリルビン | 試験紙法 | -, +, ++, +++ |
| 潜血 | 試験紙法 | -, +, ++, +++ |
| ウロビリノーゲン | 試験紙法 | <1, 1, 4, 8, 12 mg/dL |

以上の7項目は、新鮮尿を用いてプレテスト 8aII (和光純薬工業株式会社) により検査を行った。

尿沈渣：

採取した新鮮尿を 470 × g で 5 分間遠心分離 (設定温度： 4°C) し、得られた沈渣を鏡検した。鏡検は、弱拡大 (100 倍) で全視野を観察し、標本内の有形成分が均等に分布していることを確認した。次いで、強拡大 (400 倍) で数視野を観察し、有形成分の判別と数量の算定を行い、以下の基準で判定した。

| | - | + | ++ | +++ |
|--------|--------------|---------------------|----------------------|-----------------------------------|
| 上皮細胞 | 1 視野に 3 個未満 | 1 視野に 3 個以上 10 個未満 | 1 視野に 10 個以上 20 個未満 | 1 視野に 20 個以上 |
| 赤血球 | 1 視野に 10 個未満 | 1 視野に 10 個以上 30 個未満 | 1 視野に 30 個以上 100 個未満 | 1 視野に赤血球が重なり合ったり、過密状態で数の確認が不可能な場合 |
| 白血球 | 1 視野に 3 個未満 | 1 視野に 3 個以上 20 個未満 | 1 視野に 20 個以上 40 個未満 | 1 視野に 40 個以上 |
| 円柱 | すべての視野に皆無 | すべての視野で 1 個以上 | - | - |
| 非細胞沈渣* | 1 視野に 10 個未満 | 1 視野に 10 個以上 20 個未満 | 1 視野に 20 個以上 30 個未満 | 1 視野に結晶が重なり合ったり過密状態で数の確認が不可能な場合 |

*：主に磷酸塩， 尿酸塩結晶。

1.7.6 血液学的検査

投与期間終了時の剖検時に実施した。

ペントバルビタール・ナトリウム 30 mg/kg を腹腔内に投与して麻酔した後、後大

静脈腹部より血液約 2 mL を採取した。血液凝固系検査には、3.8 w/v%クエン酸ナトリウム 0.1 mL を入れた試験管に血液 0.9 mL を分注し、1,870×g で 15 分間遠心分離（設定温度 4°C）して得られる血漿を用いた。他の検査には、残りの血液を EDTA-2K 2 mg 加採血ビン（SB-41, シスメックス株式会社）に分注したものをを用いた。動物は、採血前に 16～19 時間絶食させた。

| 検査項目および検査方法 | | |
|--|--|----------------------|
| 項目 | 方法 | 単位 |
| 白血球数 | レーザー光学法 | ×10 ³ /μL |
| 赤血球数 (RBC) | レーザー光学法 | ×10 ⁴ /μL |
| ヘモグロビン量 (Hgb) | シアンメトヘモグロビン法 | g/dL |
| ヘマトクリット値 | $\frac{RBC \times MCV}{10^3}$ | % |
| 平均赤血球容積 (MCV) | レーザー光学法 | fL |
| 平均赤血球血色素量 (MCH) | $\frac{Hgb}{RBC} \times 10^3$ | pg |
| 平均赤血球血色素濃度 (MCHC) | $\frac{Hgb}{RBC \times MCV} \times 10^5$ | g/dL |
| 網状赤血球数 | RNA 染色レーザー光学法 | ×10 ⁴ /μL |
| 血小板数 | レーザー光学法 | ×10 ⁴ /μL |
| 白血球分画 | レーザー光学法・酵素染色吸光度散乱光量分類法 | ×10 ³ /μL |
| 上記 10 項目は総合血液学検査装置 (ADVIA 120, Bayer Diagnostics Manufacturing Ltd.) を用いて測定した。 | | |
| 項目 | 方法 | 単位 |
| プロトロンビン時間 (PT) | 散乱光検出方式 | 秒 |
| 活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) | 散乱光検出方式 | 秒 |
| 上記 2 項目は全自動血液凝固測定装置 (Sysmex CA-5000, シスメックス株式会社) を用いて測定した。 | | |

1.7.7 血液生化学的検査

投与期間終了時の剖検時に実施した。

血液学的検査用の採血に引き続き、深麻酔下に後大静脈腹部より採取した血液 2～4 mL を室温で約 60 分間放置後、1,870×g で 10 分間遠心分離（設定温度 4°C）して得られる血清を用いた。血清は測定まで超低温フリーザー（許容範囲：-90～-65°C，実測値：-84.2～-74.5°C）内で凍結保存した。測定終了後の残余試料は超低温フリーザー内に保存し、試験終了時に廃棄した。

検査項目および検査方法

| 項目 | 方法 | 単位 |
|---|----------------------------------|-------|
| 総蛋白質 (T. Protein) | Biuret 法 | g/dL |
| 総ビリルビン (T. Bilirubin) | Vanadate oxidation 法 | mg/dL |
| AST | UV-rate 法 | IU/L |
| ALT | UV-rate 法 | IU/L |
| アルカリ性フォスファターゼ (ALP) | p-Nitrophenylphosphate 基質法 | IU/L |
| 総コレステロール (T. Cholesterol) | COD-HDAOS 法 | mg/dL |
| トリグリセライド | GPO-HDAOS 法, glycerol blanking 法 | mg/dL |
| リン脂質 | Choline oxidase-DAOS 法 | mg/dL |
| グルコース | Hexokinase-G-6-PDH 法 | mg/dL |
| 尿素窒素 (BUN) | Urease-GLDH 法 | mg/dL |
| クレアチニン | Creatininase-HMMPS 法 | mg/dL |
| 無機リン (IP) | PNP-XOD 法 | mg/dL |
| カルシウム (Ca) | MXB 法 | mg/dL |
| 以上の 13 項目は, 自動分析装置 (7170, 株式会社日立製作所) を用いて測定した. | | |
| 血清蛋白質分画 (総蛋白質量×各画分の比率) | Cellulose acetate 膜電気泳動法 | g/dL |
| アルブミン | 総蛋白質および血清蛋白質分画のアルブミン画分より算出 | g/dL |
| A/G 比 | 血清蛋白質分画より算出 | |
| 以上の 3 項目は, 自動電気泳動装置 (AES320, オリンパス株式会社) を用いて測定した. | | |
| ナトリウム (Na) | 電極法 | mEq/L |
| カリウム (K) | 電極法 | mEq/L |
| クロール (Cl) | 電量滴定法 | mEq/L |
| 以上の 3 項目は, 電解質分析装置 (PVA-αIII, 株式会社アナリティカル・インスツルメンツ) を用いて測定した. | | |

1.7.8 剖検

投与期間終了時の採血後に, 放血致死させ, 速やかに解剖してすべての器官および組織について異常の有無を検査した.

1.7.9 器官重量

剖検後, 下記の器官重量 (絶対重量) を測定し, 剖検日の体重を基に体重比器官重量 (相対重量) を算出した

脳, 下垂体, 顎下腺 (舌下腺を含む), 甲状腺 (上皮小体を含む), 心臓, 肺 (気管支を含む), 胸腺, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 副腎, 精囊, 前立腺, 精巣, 精巣上体

1.7.10 病理組織学的検査

以下の各器官および組織を 10 vol%中性緩衝ホルマリン溶液（ただし、眼球および視神経はダビドソン液で、精巣および精巣上体はブアン液でそれぞれ前固定）で固定して保存した。抗 KLH 抗体投与群、並びに抗 HMGB1 抗体投与の 1.5 および 3 mg/kg 群については、パラフィン切片としたのち、ヘマトキシリン・エオジン染色を施して鏡検した。両側性の器官は両側とも保存（ただし、大腿骨、皮膚、乳腺、坐骨神経および大腿二頭筋は右側のみ保存）し、検査は右側（ただし、上皮小体については左右のいずれか）について実施した。特殊染色は不要と判断したため実施しなかった。

大脳、小脳、延髄、下垂体、脊髄（胸部）、眼球、視神経、ハーダー腺、下顎部リンパ節、顎下腺、舌下腺、耳下腺、甲状腺、上皮小体、心臓、肺（気管支を含む）、気管、舌、胸腺、肝臓、膵臓、脾臓、腎臓、副腎、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、腸間膜リンパ節、膀胱、精囊、前立腺、精巣上体、精巣、大腿骨、大腿骨骨髓、胸骨、胸骨骨髓、乳腺、皮膚（下腹部）、大動脈（胸部）、坐骨神経、大腿二頭筋、投与部位

1.8 試験途中の死亡例および瀕死例の処置

発生はなかった。

1.9 統計学的解析

1.9.1 処理項目

体重、摂餌量、尿検査（定量値）、血液学的検査、血液生化学的検査および器官重量（絶対および相対重量）

1.9.2 処理方法

コンピュータシステム（MiTOX-PPL、三井造船システム技研株式会社）を用いて群ごとに平均値と標準偏差を求めた。抗 KLH 抗体投与群と抗 HMGB1 抗体投与各群について、分散の均一性を Bartlett 法により検定した（有意水準 5%）。

分散が均一な場合は、Dunnett の多重比較検定を用いて抗 KLH 抗体投与群と抗 HMGB1 抗体投与各群との比較を行った。分散が均一でない場合は、Steel の多重比較検定を用いて抗 KLH 抗体投与群と抗 HMGB1 抗体投与各群との比較を行った。いずれの場合も有意水準を 1 および 5% とし、両側検定とした。

1.10 コンピュータシステムへの登録

当該試験を実施するに当たり、この試験計画を MiTOX-PPL に登録して運用した。

2. 結果

2.1 一般状態

結果を Table 1 に示した。

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、赤色尿が認められた。赤色尿は、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。本変化は、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。

2.2 体重

結果を Figure 1 および Table 2 に示した。

抗 HMGB1 抗体投与各群とも抗 KLH 抗体投与群とほぼ同様の体重推移を示し、抗 HMGB1 抗体投与に関連すると考えられる変化は認められなかった。

2.3 摂餌量

結果を Figure 2 および Table 3 に示した。

抗 HMGB1 抗体投与各群とも抗 KLH 抗体投与群とほぼ同様の摂餌量推移を示し、抗 HMGB1 抗体投与に関連すると考えられる変化は認められなかった。

2.4 眼科的検査

結果を Table 4 に示した。

抗 HMGB1 抗体投与各群および抗 KLH 抗体投与群で異常は認められなかった。

2.5 尿検査

結果を Table 5 に示した。

抗 HMGB1 抗体投与各群で投与に関連すると考えられる変化は認められなかった。なお、一般状態で赤色尿が観察された動物においても尿色調の変化や潜血反応の陽性などは確認されなかった。

2.6 血液学的検査

結果を Table 6 に示した。

抗 HMGB1 抗体投与各群で投与に関連すると考えられる変化は認められなかった。

2.7 血液生化学的検査

結果を Table 7 に示した。

抗 HMGB1 抗体投与各群で投与に関連すると考えられる変化は認められなかった。

2.8 剖検

結果を Table 8 に示した。

抗 HMGB1 抗体投与各群および抗 KLH 抗体投与群で肉眼的異常は認められなかった。

2.9 器官重量

結果を Table 9 に示した。

抗 HMGB1 抗体投与各群で投与に関連すると考えられる変化は認められなかった。

2.10 病理組織学的検査

結果を Table 10 に示した。

抗 KLH 抗体投与群では、脾臓の髄外造血および甲状腺の異所性胸腺組織がそれぞれ 2/6 例でみられた。また、腎臓の腎盂拡張、肺の骨化生、肺の被毛塞栓、甲状腺の総後体遺残および下垂体中間葉の嚢胞がそれぞれ 1/6 例で認められた。

抗 HMGB1 抗体投与群では、3.0 mg/kg 群の 1/6 例で肺に泡沫細胞の集簇がみられた。しかし、本変化は自然発生性に認められエラー! 参照元が見つかりません。、発生頻度も低いことから、抗 HMGB1 抗体投与に関連性はないと判断した。また、1.5 mg/kg 群の 4/6 例および 3.0 mg/kg 群の 2/6 例で脾臓の髄外造血、1.5 および 3.0 mg/kg 群の各 1/6 例で肺の骨化生が認められた。更に、肺の被毛塞栓および下垂体中間葉の嚢胞が 1.5 mg/kg 群の各 1/6 例で、甲状腺の異所性胸腺組織および甲状腺の総後体遺残が 3.0 mg/kg 群の各 1/6 例で認められた。しかし、これらの変化は、自然発生性に認められることエラー! 参照元が見つかりません。、静脈内投与によって認められる変化であることエラー! 参照元が見つかりません。あるいは抗 KLH 抗体投与群でも認められる変化であることから、いずれも抗 HMGB1 抗体投与に関連して生じた変化ではないと判断した。このほか、1.5 mg/kg 群の 1/6 例で精巣上体のリンパ球浸潤がみられたが、同様の変化が 3.0 mg/kg 群では認

められなかったことから、抗 HMGB1 抗体投与に関連した変化ではないと判断した。

3. 考察および結論

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.

抗 HMGB1 抗体投与群では死亡の発生はなかったが, 一般状態では抗 HMGB1 抗体投与群で投与後 4~7 日に赤色尿が認められた. 赤色尿は, 投与後 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. 0.75 mg/kg 群の赤色尿は投与 7 日にも 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 日に赤色尿は観察されなかった. 一方, 比較対照として設定した抗 KLH 抗体投与群においても投与 4 日の投与後 1 時間に 1/6 例で赤色尿が認められ, 投与 6 日まで投与後 1 時間に 1/6 例で観察された. 発現例数は, 抗 KLH 抗体投与群よりも抗 HMGB1 抗体投与群で多かったが, いずれも投与後 1 時間に発現し, 翌日の投与前までには回復する変化で, 尿色調の変化や潜血反応の陽性化も認められておらず, 変化の程度に明らかな差はみられなかった. これらのことから, 本試験で認められた赤色尿は抗 HMGB1 抗体の影響によって生じた変化ではないと考えられた. しかし, 赤色尿が発生した詳細については, 血液学的検査で溶血を示唆する変化はなく, 病理組織学的検査においても腎臓および膀胱に器質的变化もなかったことから, 明らかではなかった.

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, 同様の变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.

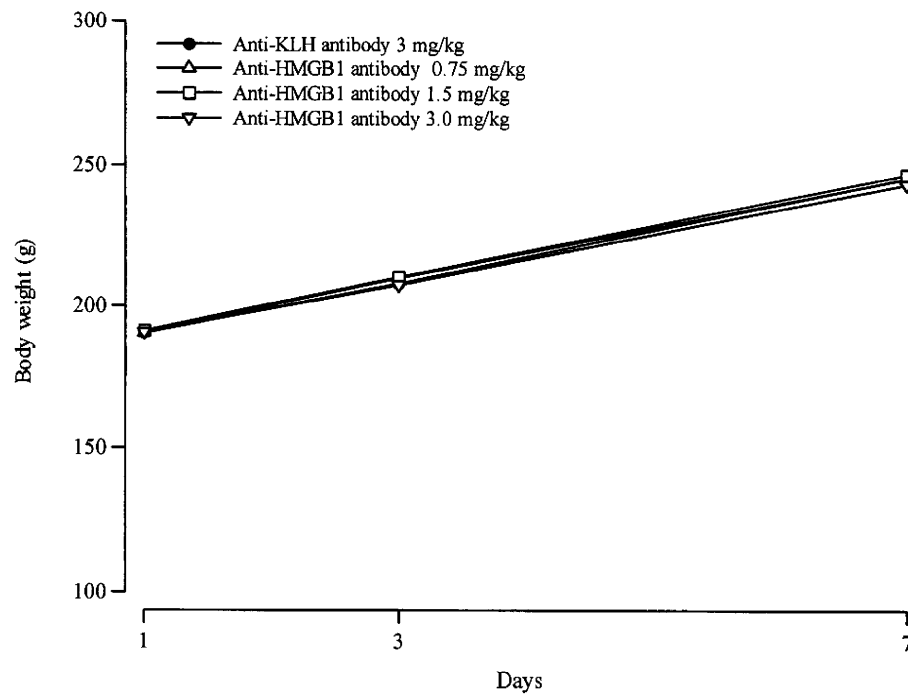


Figure 1 Body weight changes

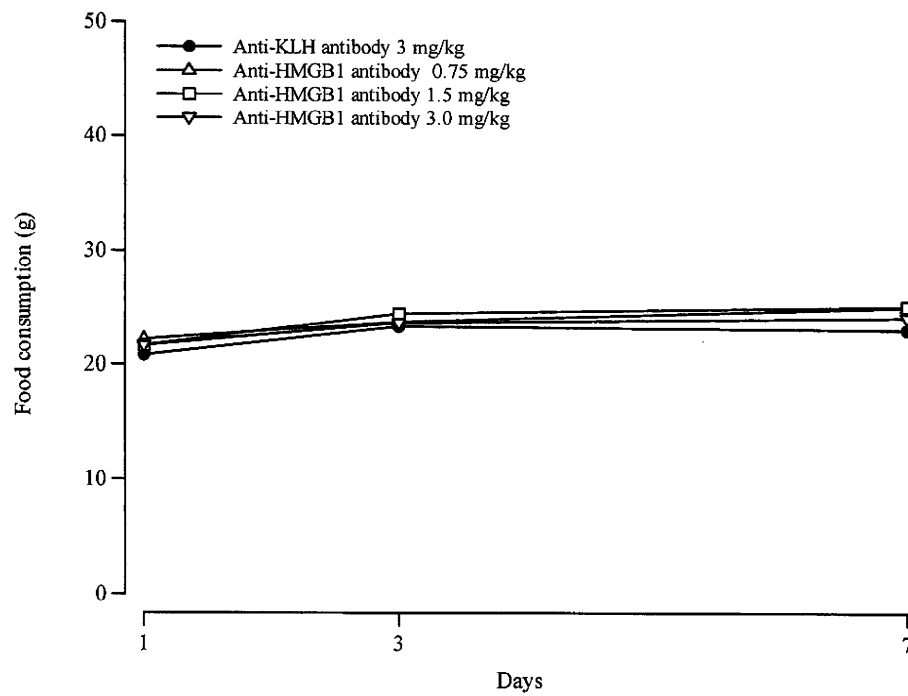


Figure 2 Food consumption

Table 1 Clinical signs

| Group and dose | Clinical sign | Days | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------------------|--------------------|------|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|
| | | 1 | | 2 | | 3 | | 4 | | 5 | | 6 | | 7 | |
| | | PRE | 1 hr | PRE | 1 hr | PRE | 1 hr | PRE | 1 hr | PRE | 1 hr | PRE | 1 hr | PRE | 1 hr |
| Anti-KLH antibody 3 mg/kg | Number of examined | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| | No abnormality | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| | Reddish urine | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Anti-HMGB1 antibody 0.75 mg/kg | Number of examined | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| | No abnormality | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 0 | 0 | 6 | 2 | 6 | 2 | 6 | 2 |
| | Reddish urine | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 6 | 0 | 4 | 0 | 4 | 0 | 4 |
| Anti-HMGB1 antibody 1.5 mg/kg | Number of examined | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| | No abnormality | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 1 | 1 | 6 | 3 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| | Reddish urine | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 5 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Anti-HMGB1 antibody 3.0 mg/kg | Number of examined | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| | No abnormality | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 2 | 2 | 6 | 3 | 6 | 5 | 6 | 6 |
| | Reddish urine | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 | 0 | 3 | 0 | 1 | 0 | 0 |

Table 2 Body weights

| Group and dose | Body weight (g) on day | | | |
|-----------------------------------|------------------------|-------|-------|-------|
| | 1 | 3 | 7 | |
| Anti-KLH antibody 3 mg/kg | N | 6 | 6 | 6 |
| | Mean | 190.6 | 207.9 | 245.6 |
| | S.D. | ±4.6 | ±6.8 | ±8.5 |
| Anti-HMGB1 antibody 0.75 mg/kg | N | 6 | 6 | 6 |
| | Mean | 190.7 | 209.6 | 245.5 |
| | S.D. | ±3.0 | ±4.2 | ±7.0 |
| Anti-HMGB1 antibody 1.5 mg/kg | N | 6 | 6 | 6 |
| | Mean | 191.4 | 210.1 | 246.9 |
| | S.D. | ±5.1 | ±5.6 | ±6.6 |
| Anti-HMGB1 antibody 3.0 mg/kg | N | 6 | 6 | 6 |
| | Mean | 190.9 | 207.3 | 243.4 |
| | S.D. | ±5.9 | ±6.8 | ±9.6 |

Not significantly different from Anti-KLH antibody group.

Table 3 Food consumption

| Group and dose | Food consumption (g) on day | | | |
|-----------------------------------|-----------------------------|------|------|------|
| | 1 | 3 | 7 | |
| Anti-KLH antibody 3 mg/kg | N | 6 | 6 | 6 |
| | Mean | 20.8 | 23.2 | 22.9 |
| | S.D. | ±2.1 | ±2.8 | ±1.0 |
| Anti-HMGB1 antibody 0.75 mg/kg | N | 6 | 6 | 6 |
| | Mean | 22.1 | 23.6 | 24.9 |
| | S.D. | ±0.9 | ±1.6 | ±1.4 |
| Anti-HMGB1 antibody 1.5 mg/kg | N | 6 | 6 | 6 |
| | Mean | 21.6 | 24.3 | 25.0 |
| | S.D. | ±2.2 | ±1.9 | ±1.4 |
| Anti-HMGB1 antibody 3.0 mg/kg | N | 6 | 6 | 6 |
| | Mean | 21.6 | 23.5 | 24.0 |
| | S.D. | ±1.5 | ±1.8 | ±1.8 |

Not significantly different from Anti-KLH antibody group.

Table 4 Ophthalmological findings

| Group and dose | Ophthalmological findings | Time in weeks | |
|-----------------------------------|---------------------------|---------------|--------|
| | | Before | Week 1 |
| Anti-KLH antibody 3 mg/kg | Number of examined | 6 | 6 |
| | No abnormality | 6 | 6 |
| Anti-HMGB1 antibody 0.75 mg/kg | Number of examined | 6 | |
| | No abnormality | 6 | |
| Anti-HMGB1 antibody 1.5 mg/kg | Number of examined | 6 | |
| | No abnormality | 6 | |
| Anti-HMGB1 antibody 3.0 mg/kg | Number of examined | 6 | 6 |
| | No abnormality | 6 | 6 |

Before: before dosing.

Table 5 Urinary findings

| Group and dose | | Urine volume (mL/24hr) | Specific gravity | Na (mEq/24hr) | K (mEq/24hr) | Cl (mEq/24hr) |
|-----------------------------------|------|---------------------------|------------------|------------------|-----------------|------------------|
| Anti-KLH antibody 3 mg/kg | N | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| | Mean | 6.7 | 1.065 | 1.199 | 2.149 | 1.594 |
| | S.D. | ±3.0 | ±0.015 | ±0.150 | ±0.223 | ±0.216 |
| Anti-HMGB1 antibody 0.75 mg/kg | N | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| | Mean | 7.7 | 1.055 | 1.086 | 2.117 | 1.523 |
| | S.D. | ±3.9 | ±0.016 | ±0.231 | ±0.472 | ±0.322 |
| Anti-HMGB1 antibody 1.5 mg/kg | N | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| | Mean | 6.6 | 1.062 | 1.079 | 2.092 | 1.564 |
| | S.D. | ±2.2 | ±0.015 | ±0.225 | ±0.329 | ±0.272 |
| Anti-HMGB1 antibody 3.0 mg/kg | N | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| | Mean | 6.9 | 1.059 | 1.079 | 2.065 | 1.518 |
| | S.D. | ±2.7 | ±0.013 | ±0.301 | ±0.422 | ±0.369 |

Not significantly different from Anti-KLH antibody group.

Table 5 - continued Urinary findings

| Group and dose | Number of animals | Color | | pH | | Protein | Glucose | Ketone body | Bilirubin | Occult blood | Urobilinogen (mg/dL) | |
|-----------------------------------|-------------------|-------|---|-----|-----|---------|---------|-------------|-----------|--------------|----------------------|-----|
| | | Y | | 7.5 | 8.0 | | | | | | | 8.5 |
| Anti-KLH antibody 3 mg/kg | 6 | 6 | 6 | 0 | 3 | 3 | 5 | 1 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| Anti-HMGB1 antibody 0.75 mg/kg | 6 | 6 | 6 | 1 | 0 | 5 | 5 | 1 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| Anti-HMGB1 antibody 1.5 mg/kg | 6 | 6 | 6 | 0 | 5 | 1 | 2 | 4 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| Anti-HMGB1 antibody 3.0 mg/kg | 6 | 6 | 6 | 0 | 3 | 3 | 4 | 2 | 6 | 6 | 6 | 6 |

Abbreviation: Y, yellow.

Grade sign: -, none; ±, trace; +, slight; ++, moderate; +++, severe; +++++, very severe.

Table 5 - continued Urinary findings

| Group and dose | Number of animals | Urinary sediment | | | | | |
|-----------------------------------|-------------------|------------------|--------------|------------|-------|----------|--|
| | | Epithelial cells | Erythrocytes | Leukocytes | Casts | Crystals | |
| Anti-KLH antibody 3 mg/kg | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | |
| Anti-HMGB1 antibody 0.75 mg/kg | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | |
| Anti-HMGB1 antibody 1.5 mg/kg | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | |
| Anti-HMGB1 antibody 3.0 mg/kg | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | |

Grade signs are as follows.

- Epithelial cells: -, < 3/field; +, 3/field ≤ and < 10/field; ++, 10/field ≤ and < 20/field; +++, ≥ 20/field.
- Erythrocytes : -, < 10/field; +, 10/field ≤ and < 30/field; ++, 30/field ≤ and < 100/field; +++, countless.
- Leukocytes : -, < 3/field; +, 3/field ≤ and < 20/field; ++, 20/field ≤ and < 40/field; +++, ≥ 40/field.
- Casts : -, none; +, ≥ 1/all field.
- Crystals : -, < 10/field; +, 10/field ≤ and < 20/field; ++, 20/field ≤ and < 30/field; +++, countless.

Table 6 Hematological findings

| Group and dose | Leukocytes (10 ³ /μL) | Erythrocytes (10 ⁴ /μL) | Hemoglobin (g/dL) | Hematocrit (%) | MCV (fL) | MCH (pg) | MCHC (g/dL) | Reticulocyte (10 ⁴ /μL) | Platelets (10 ⁴ /μL) | PT (sec) |
|-----------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|----------------------|-------------------|-------------|-------------|----------------|---------------------------------------|------------------------------------|-------------|
| Anti-KLH antibody 3 mg/kg | N | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| | Mean | 9.23 | 661 | 13.8 | 41.1 | 62.3 | 20.8 | 46.7 | 134.2 | 12.8 |
| | S.D. | ±1.11 | ±38 | ±0.3 | ±1.2 | ±2.8 | ±1.0 | ±5.8 | ±11.1 | ±0.6 |
| Anti-HMGB1 antibody 0.75 mg/kg | N | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| | Mean | 9.16 | 662 | 13.3 | 39.7 | 60.0 | 20.0 | 51.0 | 140.4 | 12.4 |
| | S.D. | ±2.34 | ±22 | ±0.3 | ±0.9 | ±0.6 | ±0.3 | ±5.4 | ±5.4 | ±0.5 |
| Anti-HMGB1 antibody 1.5 mg/kg | N | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| | Mean | 7.43 | 648 | 13.3 | 39.7 | 61.3 | 20.5 | 50.4 | 135.2 | 12.4 |
| | S.D. | ±0.64 | ±22 | ±0.5 | ±1.5 | ±2.3 | ±0.6 | ±4.5 | ±12.0 | ±0.5 |
| Anti-HMGB1 antibody 3.0 mg/kg | N | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| | Mean | 10.09 | 626 | 13.2 | 39.2 | 62.8 | 21.1 | 44.9 | 130.9 | 12.3 |
| | S.D. | ±1.78 | ±28 | ±0.5 | ±1.8 | ±2.9 | ±1.1 | ±4.9 | ±13.7 | ±0.5 |

Not significantly different from Anti-KLH antibody group.

Table 6 - continued Hematological findings

| Group and dose | APTT (sec) |
|-----------------------------------|-------------------|
| Anti-KLH antibody 3 mg/kg | 6 20.4 ±1.5 |
| Anti-HMGB1 antibody 0.75 mg/kg | 6 19.5 ±1.2 |
| Anti-HMGB1 antibody 1.5 mg/kg | 6 19.5 ±1.8 |
| Anti-HMGB1 antibody 3.0 mg/kg | 6 19.6 ±1.5 |

Not significantly different from Anti-KLH antibody group.