

## Appendix 6 - continued Individual hematological findings

Group and dose	Animal No.	APTT (sec)
Anti-KLH antibody 3 mg/kg	251	22.1
	252	18.7
	253	20.2
	254	20.5
	255	18.7
	256	21.9
Anti-HMGB1 antibody 0.75 mg/kg	257	21.4
	258	18.7
	259	19.3
	260	18.0
	261	20.0
	262	19.6
Anti-HMGB1 antibody 1.5 mg/kg	263	18.8
	264	19.0
	265	21.5
	266	19.3
	267	21.5
	268	16.8
Anti-HMGB1 antibody 3.0 mg/kg	269	19.4
	270	18.6
	271	19.8
	272	18.8
	273	18.3
	274	22.4

## Appendix 6 - continued Individual hematological findings

Group and dose	Animal No.	Differential leukocyte count						
		Eosinophils (10 <sup>3</sup> /μL)	Neutrophils (10 <sup>3</sup> /μL)	Lymphocytes (10 <sup>3</sup> /μL)	Basophils (10 <sup>3</sup> /μL)	Monocytes (10 <sup>3</sup> /μL)	Large unstained cells (10 <sup>3</sup> /μL)	
Anti-KLH antibody 3 mg/kg	251	0.11	1.53	8.66	0.02	0.17	0.14	
	252	0.02	0.72	7.27	0.02	0.08	0.07	
	253	0.06	2.86	6.75	0.02	0.19	0.05	
	254	0.09	1.12	8.05	0.02	0.20	0.13	
	255	0.09	1.40	5.94	0.02	0.12	0.10	
	256	0.07	1.10	7.94	0.04	0.10	0.10	
Anti-HMGB1 antibody 0.75 mg/kg	257	0.05	1.45	6.10	0.02	0.13	0.05	
	258	0.07	1.25	11.33	0.03	0.16	0.20	
	259	0.06	0.52	6.41	0.01	0.12	0.09	
	260	0.05	0.89	6.48	0.02	0.10	0.09	
	261	0.03	1.14	6.74	0.02	0.17	0.12	
	262	0.11	1.93	8.63	0.02	0.17	0.20	
Anti-HMGB1 antibody 1.5 mg/kg	263	0.02	0.58	6.21	0.01	0.08	0.08	
	264	0.07	0.51	7.25	0.02	0.11	0.05	
	265	0.05	0.55	7.50	0.03	0.14	0.10	
	266	0.04	0.82	6.34	0.02	0.13	0.08	
	267	0.06	1.32	5.42	0.01	0.14	0.07	
	268	0.04	1.13	5.44	0.01	0.08	0.06	
Anti-HMGB1 antibody 3.0 mg/kg	269	0.09	1.26	9.96	0.04	0.31	0.14	
	270	0.05	1.03	10.46	0.04	0.12	0.14	
	271	0.04	0.58	7.13	0.02	0.06	0.09	
	272	0.07	1.40	9.52	0.03	0.26	0.10	
	273	0.09	1.30	6.97	0.02	0.14	0.08	
	274	0.07	1.29	7.44	0.02	0.14	0.07	

## Appendix 7 Individual biochemical findings

Group and dose	Animal No.	T.Protein (g/dL)	A/G ratio	$\alpha$ 1-Globulin (g/dL)	$\alpha$ 2-Globulin (g/dL)	$\beta$ -Globulin (g/dL)	$\gamma$ -Globulin (g/dL)	Albumin (g/dL)	T.Bilirubin (mg/dL)	AST (IU/L)
Anti-KLH antibody 3 mg/kg	251	4.8	1.28	0.83	0.40	0.67	0.21	2.70	0.0	103
	252	5.2	1.34	0.89	0.40	0.73	0.20	2.98	0.0	93
	253	5.0	1.26	0.90	0.39	0.75	0.19	2.78	0.0	72
	254	5.2	1.37	0.97	0.34	0.68	0.21	3.01	0.0	92
	255	5.1	1.25	0.97	0.40	0.75	0.15	2.83	0.0	80
	256	5.1	1.19	0.91	0.39	0.73	0.30	2.77	0.0	74
Anti-HMGB1 antibody 0.75 mg/kg	257	5.1	1.24	1.00	0.38	0.66	0.24	2.82	0.0	100
	258	5.0	1.41	0.94	0.33	0.69	0.13	2.93	0.0	72
	259	4.9	1.50	0.73	0.40	0.69	0.15	2.94	0.0	95
	260	5.2	1.24	1.01	0.39	0.73	0.19	2.88	0.0	67
	261	5.1	1.27	0.94	0.38	0.73	0.19	2.86	0.0	83
	262	4.8	1.30	0.68	0.38	0.71	0.32	2.71	0.0	92
Anti-HMGB1 antibody 1.5 mg/kg	263	4.7	1.36	0.86	0.32	0.67	0.14	2.71	0.0	71
	264	5.0	1.28	0.98	0.35	0.73	0.14	2.81	0.0	89
	265	4.9	1.49	0.77	0.39	0.64	0.17	2.94	0.0	95
	266	5.2	1.32	1.01	0.39	0.69	0.15	2.96	0.0	68
	267	5.1	1.28	0.99	0.36	0.70	0.19	2.86	0.0	65
	268	5.2	1.25	0.82	0.45	0.82	0.22	2.89	0.0	83
Anti-HMGB1 antibody 3.0 mg/kg	269	5.0	1.41	0.77	0.41	0.70	0.21	2.93	0.0	74
	270	5.1	1.36	0.86	0.42	0.71	0.16	2.94	0.0	90
	271	5.1	1.32	0.84	0.40	0.80	0.17	2.90	0.0	94
	272	5.1	1.36	0.82	0.42	0.73	0.19	2.94	0.0	87
	273	4.6	1.41	0.80	0.32	0.65	0.14	2.69	0.0	69
	274	5.2	1.26	0.95	0.43	0.75	0.16	2.91	0.0	98

## Appendix 7 - continued Individual biochemical findings

Group and dose	Animal No.	ALT (IU/L)	ALP (IU/L)	T.Cholesterol (mg/dL)	Triglycerides (mg/dL)	Phospholipids (mg/dL)	Glucose (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	IP (mg/dL)
Anti-KLH antibody 3 mg/kg	251	22	558	62	81	118	95	13.5	0.3	10.6
	252	18	347	81	90	147	120	12.9	0.3	9.4
	253	19	738	83	46	134	90	9.4	0.3	9.3
	254	15	591	96	77	168	115	15.9	0.3	9.6
	255	19	723	86	30	150	118	13.9	0.3	9.1
	256	18	565	92	69	136	86	10.5	0.3	10.3
Anti-HMGB1 antibody 0.75 mg/kg	257	21	528	82	79	136	99	12.9	0.3	9.6
	258	21	503	89	33	146	97	12.1	0.3	9.3
	259	19	505	84	38	141	111	12.4	0.3	9.4
	260	18	540	105	42	160	103	10.5	0.3	9.7
	261	20	607	86	59	139	107	10.8	0.3	10.3
	262	18	566	73	50	107	106	14.1	0.3	9.5
Anti-HMGB1 antibody 1.5 mg/kg	263	20	697	81	43	147	112	15.4	0.3	10.0
	264	19	565	57	62	113	100	18.3	0.3	11.0
	265	22	807	89	101	166	83	14.3	0.3	10.0
	266	20	671	106	45	166	87	12.9	0.3	8.7
	267	17	572	68	37	122	103	11.6	0.3	9.5
	268	27	677	92	27	134	106	13.6	0.3	8.8
Anti-HMGB1 antibody 3.0 mg/kg	269	21	446	105	114	175	86	12.7	0.3	9.3
	270	30	543	75	44	126	92	13.7	0.4	11.3
	271	21	468	79	42	138	103	7.8	0.3	9.0
	272	24	574	76	29	137	132	15.6	0.3	11.5
	273	19	382	74	44	118	96	10.3	0.3	9.5
	274	20	479	69	40	122	101	12.9	0.3	9.3

## Appendix 7 - continued Individual biochemical findings

Group and dose	Animal No.	Ca (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)
Anti-KLH antibody 3 mg/kg	251	9.6	144.6	4.68	103.5
	252	9.6	143.7	4.22	100.4
	253	9.9	142.9	4.03	102.1
	254	9.9	143.7	4.38	103.0
	255	9.9	144.7	4.34	104.4
	256	9.9	145.4	4.50	102.7
Anti-HMGB1 antibody 0.75 mg/kg	257	9.8	146.2	4.18	103.4
	258	10.1	146.2	4.11	102.2
	259	10.0	146.1	4.30	103.4
	260	9.9	145.7	4.30	102.5
	261	10.0	145.1	4.27	104.0
	262	9.6	143.4	4.56	104.6
Anti-HMGB1 antibody 1.5 mg/kg	263	9.3	146.5	3.95	104.3
	264	9.8	145.6	4.20	101.6
	265	9.5	145.5	4.12	104.5
	266	9.9	143.0	4.62	104.2
	267	9.7	145.9	4.24	103.7
	268	9.8	146.5	4.25	104.8
Anti-HMGB1 antibody 3.0 mg/kg	269	9.6	144.1	4.46	101.1
	270	9.7	146.1	4.82	102.2
	271	9.9	146.9	4.07	103.9
	272	9.8	144.5	3.84	100.8
	273	9.4	144.8	4.26	105.3
	274	9.6	146.5	4.07	101.9

Appendix 8 Individual necropsy findings

Organs and findings	Group and dose		Anti-KLH antibody 3 mg/kg		Anti-HMGB1 antibody 0.75 mg/kg		Anti-HMGB1 antibody 1.5 mg/kg												
	Animal No.																		
	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	
All organs and tissues	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR

Grade sign: -, none; +, mild; ++, moderate; +++, marked.  
 No appreciable changes in all other organs and tissues.

Appendix 8 - continued Individual necropsy findings

Group and dose	Anti-HMGB1 antibody 3.0 mg/kg						
Organs and findings	Animal No.	269	270	271	272	273	274
All organs and tissues		NR	NR	NR	NR	NR	NR

Appendix 9 Individual absolute and relative organ weights

Group and dose	Animal No.	Final body weight		Brain		Pituitary		Submaxillary glands	
		(g)	(g)	(g/100 gB.W.)	(mg)	(mg/100 gB.W.)	(g)	(g/100 gB.W.)	
Anti-KLH antibody 3 mg/kg	251	207.2	2.02	0.97	8.5	4.1	0.45	0.22	
	252	224.0	1.95	0.87	9.2	4.1	0.47	0.21	
	253	224.2	2.03	0.91	10.2	4.5	0.43	0.19	
	254	208.7	2.05	0.98	8.9	4.3	0.42	0.20	
	255	215.3	2.03	0.94	8.2	3.8	0.42	0.20	
	256	211.7	2.01	0.95	7.7	3.6	0.46	0.22	
Anti-HMGB1 antibody 0.75 mg/kg	257	210.9	2.06	0.98	8.9	4.2	0.42	0.20	
	258	220.7	1.96	0.89	9.9	4.5	0.44	0.20	
	259	214.7	1.88	0.88	10.1	4.7	0.40	0.19	
	260	214.8	2.01	0.94	11.2	5.2	0.49	0.23	
	261	220.0	2.07	0.94	9.1	4.1	0.41	0.19	
	262	206.2	1.95	0.95	9.0	4.4	0.42	0.20	
Anti-HMGB1 antibody 1.5 mg/kg	263	211.2	2.04	0.97	7.7	3.6	0.43	0.20	
	264	212.3	2.09	0.98	8.7	4.1	0.44	0.21	
	265	224.0	2.10	0.94	9.6	4.3	0.46	0.21	
	266	212.3	2.09	0.98	9.9	4.7	0.41	0.19	
	267	227.8	2.08	0.91	10.0	4.4	0.44	0.19	
	268	207.4	1.98	0.95	8.2	4.0	0.45	0.22	
Anti-HMGB1 antibody 3.0 mg/kg	269	216.6	2.09	0.96	8.9	4.1	0.44	0.20	
	270	206.4	2.04	0.99	8.5	4.1	0.42	0.20	
	271	228.2	2.00	0.88	11.9	5.2	0.42	0.18	
	272	217.2	1.99	0.92	10.9	5.0	0.53	0.24	
	273	210.0	1.89	0.90	8.8	4.2	0.39	0.19	
	274	202.6	2.02	1.00	8.5	4.2	0.37	0.18	



## Appendix 9 - continued Individual absolute and relative organ weights

Group and dose	Animal		Thyroids		Heart		Lungs		Thymus	
	No.	(mg)	(mg/100 gB.W.)	(g)	(g/100 gB.W.)	(g)	(g/100 gB.W.)	(g)	(g/100 gB.W.)	
Anti-KLH antibody 3 mg/kg	251	16.8	8.1	0.97	0.47	1.09	0.53	0.37	0.18	
	252	17.2	7.7	0.95	0.42	1.04	0.46	0.79	0.35	
	253	18.6	8.3	1.12	0.50	1.08	0.48	0.75	0.33	
	254	15.8	7.6	0.88	0.42	1.12	0.54	0.65	0.31	
	255	13.0	6.0	0.94	0.44	1.08	0.50	0.56	0.26	
	256	13.4	6.3	1.03	0.49	1.06	0.50	0.54	0.26	
Anti-HMGB1 antibody 0.75 mg/kg	257	14.9	7.1	0.97	0.46	1.02	0.48	0.57	0.27	
	258	18.1	8.2	1.03	0.47	1.19	0.54	0.55	0.25	
	259	13.9	6.5	1.03	0.48	1.10	0.51	0.63	0.29	
	260	15.3	7.1	1.02	0.47	1.07	0.50	0.74	0.34	
	261	18.0	8.2	1.12	0.51	1.06	0.48	0.62	0.28	
	262	12.6	6.1	0.94	0.46	1.18	0.57	0.72	0.35	
Anti-HMGB1 antibody 1.5 mg/kg	263	13.7	6.5	1.06	0.50	1.03	0.49	0.48	0.23	
	264	14.6	6.9	0.91	0.43	1.10	0.52	0.48	0.23	
	265	13.4	6.0	1.14	0.51	1.13	0.50	0.72	0.32	
	266	18.1	8.5	0.90	0.42	1.03	0.49	0.70	0.33	
	267	16.3	7.2	1.15	0.50	1.11	0.49	0.61	0.27	
	268	14.5	7.0	0.95	0.46	1.14	0.55	0.53	0.26	
Anti-HMGB1 antibody 3.0 mg/kg	269	13.4	6.2	1.01	0.47	1.13	0.52	0.82	0.38	
	270	15.4	7.5	0.96	0.47	1.16	0.56	0.50	0.24	
	271	16.7	7.3	1.05	0.46	1.11	0.49	0.65	0.28	
	272	15.5	7.1	1.05	0.48	1.10	0.51	0.75	0.35	
	273	14.7	7.0	0.96	0.46	0.98	0.47	0.58	0.28	
	274	16.2	8.0	1.04	0.51	1.10	0.54	0.72	0.36	

Appendix 9 - continued Individual absolute and relative organ weights

Group and dose	Animal No.	Liver		Spleen		Kidneys		Adrenals	
		(g)	(g/100 gB.W.)	(g)	(g/100 gB.W.)	(g)	(g/100 gB.W.)	(mg)	(mg/100 gB.W.)
Anti-KLH antibody 3 mg/kg	251	7.23	3.49	0.55	0.27	1.82	0.88	49.1	23.7
	252	8.74	3.90	0.76	0.34	2.12	0.95	60.1	26.8
	253	8.26	3.68	0.91	0.41	1.91	0.85	51.6	23.0
	254	7.27	3.48	0.60	0.29	1.93	0.92	46.4	22.2
	255	7.74	3.59	0.57	0.26	2.00	0.93	48.5	22.5
	256	7.34	3.47	0.72	0.34	1.97	0.93	56.2	26.5
	257	7.39	3.50	0.73	0.35	1.76	0.83	57.2	27.1
Anti-HMGB1 antibody 0.75 mg/kg	258	7.83	3.55	0.60	0.27	1.96	0.89	51.4	23.3
	259	7.63	3.55	0.65	0.30	2.15	1.00	43.6	20.3
	260	7.47	3.48	0.81	0.38	1.99	0.93	51.7	24.1
	261	8.01	3.64	0.76	0.35	2.08	0.95	44.5	20.2
	262	7.10	3.44	0.72	0.35	1.89	0.92	45.2	21.9
	263	7.26	3.44	0.53	0.25	1.80	0.85	43.9	20.8
Anti-HMGB1 antibody 1.5 mg/kg	264	7.26	3.42	0.68	0.32	1.79	0.84	55.8	26.3
	265	7.65	3.42	0.78	0.35	2.08	0.93	56.3	25.1
	266	7.88	3.71	0.75	0.35	2.16	1.02	48.0	22.6
	267	8.01	3.52	0.68	0.30	2.16	0.95	51.8	22.7
	268	7.43	3.58	0.70	0.34	1.84	0.89	47.2	22.8
	269	7.50	3.46	0.74	0.34	1.85	0.85	51.8	23.9
Anti-HMGB1 antibody 3.0 mg/kg	270	6.68	3.24	0.63	0.31	1.80	0.87	41.8	20.3
	271	8.34	3.65	0.63	0.28	2.46	1.08	50.1	22.0
	272	7.58	3.49	0.78	0.36	2.04	0.94	51.2	23.6
	273	7.39	3.52	0.71	0.34	2.08	0.99	45.0	21.4
	274	7.20	3.55	0.71	0.35	1.89	0.93	47.2	23.3

## Appendix 9 - continued Individual absolute and relative organ weights

Group and dose	Animal No.	Seminal vesicle		Prostate		Epididymides		Testes	
		(g)	(g/100 gB.W.)	(g)	(g/100 gB.W.)	(g)	(g/100 gB.W.)	(g)	(g/100 gB.W.)
Anti-KLH antibody 3 mg/kg	251	0.66	0.32	0.29	0.14	0.32	0.15	2.46	1.19
	252	0.41	0.18	0.22	0.10	0.32	0.14	2.36	1.05
	253	0.62	0.28	0.26	0.12	0.33	0.15	2.26	1.01
	254	0.41	0.20	0.20	0.10	0.30	0.14	2.25	1.08
	255	0.48	0.22	0.22	0.10	0.31	0.14	2.25	1.05
	256	0.49	0.23	0.21	0.10	0.32	0.15	2.34	1.11
Anti-HMGB1 antibody 0.75 mg/kg	257	0.47	0.22	0.26	0.12	0.29	0.14	2.25	1.07
	258	0.65	0.29	0.28	0.13	0.37	0.17	2.49	1.13
	259	0.56	0.26	0.21	0.10	0.33	0.15	2.45	1.14
	260	0.66	0.31	0.21	0.10	0.34	0.16	2.72	1.27
	261	0.44	0.20	0.22	0.10	0.31	0.14	2.23	1.01
	262	0.56	0.27	0.14	0.07	0.35	0.17	2.54	1.23
Anti-HMGB1 antibody 1.5 mg/kg	263	0.53	0.25	0.21	0.10	0.33	0.16	2.37	1.12
	264	0.52	0.24	0.25	0.12	0.29	0.14	2.47	1.16
	265	0.56	0.25	0.20	0.09	0.29	0.13	2.41	1.08
	266	0.60	0.28	0.26	0.12	0.32	0.15	2.36	1.11
	267	0.54	0.24	0.26	0.11	0.37	0.16	2.60	1.14
	268	0.51	0.25	0.25	0.12	0.34	0.16	2.31	1.11
Anti-HMGB1 antibody 3.0 mg/kg	269	0.59	0.27	0.27	0.12	0.36	0.17	2.37	1.09
	270	0.55	0.27	0.19	0.09	0.33	0.16	2.47	1.20
	271	0.63	0.28	0.20	0.09	0.31	0.14	2.61	1.14
	272	0.51	0.23	0.21	0.10	0.31	0.14	2.37	1.09
	273	0.53	0.25	0.15	0.07	0.26	0.12	2.55	1.21
	274	0.59	0.29	0.21	0.10	0.31	0.15	2.27	1.12

Appendix 10 Individual histopathological findings

Organs and findings	Group and dose																	
	Anti-KLH antibody 3 mg/kg				Anti-HMGB1 antibody 0.75 mg/kg				Anti-HMGB1 antibody 1.5 mg/kg				Anti-HMGB1 antibody 1.5 mg/kg					
Animal No.	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268
<b>Digestive system</b>																		
Tongue	NR	NR	NR	NR	NR	NR	*	*	*	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	NR
Esophagus	NR	NR	NR	NR	NR	NR	*	*	*	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	NR
Stomach	NR	NR	NR	NR	NR	NR	*	*	*	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	NR
Duodenum	NR	NR	NR	NR	NR	NR	*	*	*	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	NR
Jejunum	NR	NR	NR	NR	NR	NR	*	*	*	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	NR
Ileum	NR	NR	NR	NR	NR	NR	*	*	*	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	NR
Cecum	NR	NR	NR	NR	NR	NR	*	*	*	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	NR
Colon	NR	NR	NR	NR	NR	NR	*	*	*	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	NR
Rectum	NR	NR	NR	NR	NR	NR	*	*	*	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	NR
Submaxillary gland	NR	NR	NR	NR	NR	NR	*	*	*	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	NR
Sublingual gland	NR	NR	NR	NR	NR	NR	*	*	*	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	NR
Parotid gland	NR	NR	NR	NR	NR	NR	*	*	*	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	NR
Liver	NR	NR	NR	NR	NR	NR	*	*	*	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	NR
Pancreas	NR	NR	NR	NR	NR	NR	*	*	*	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	NR
<b>Respiratory system</b>																		
Trachea	NR	NR	NR	NR	NR	NR	*	*	*	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	NR
Lung																		
Metaplasia,osseous	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Embolus,hair	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Accumulation,foam cell,alveolus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Hematopoietic system</b>																		
Thymus	NR	NR	NR	NR	NR	NR	*	*	*	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	NR
Submaxillary lymph node	NR	NR	NR	NR	NR	NR	*	*	*	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	NR
Mesenteric lymph node	NR	NR	NR	NR	NR	NR	*	*	*	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	NR
Spleen																		
Hematopoiesis,extramedullary	-	+	+	-	-	-	*	*	*	*	*	*	*	-	+	+	+	+
Bone marrow (sternum)	NR	NR	NR	NR	NR	NR	*	*	*	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	NR
Bone marrow (femur)	NR	NR	NR	NR	NR	NR	*	*	*	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	NR
<b>Cardiovascular system</b>																		
Heart	NR	NR	NR	NR	NR	NR	*	*	*	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	NR
Aorta	NR	NR	NR	NR	NR	NR	*	*	*	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	NR
<b>Urinary system</b>																		
Kidney																		
Dilatation,pelvic cavity	-	-	-	-	+	-	*	*	*	*	*	*	*	-	-	-	-	-

Grade sign: -, none; +, mild; ++, moderate; +++, marked.  
NR: no remarkable changes.

Appendix 10 - continued Individual histopathological findings

Organs and findings	Group and dose		Anti-HMGB1 antibody																			
	Animal No.		Anti-KLH antibody 3 mg/kg							Anti-HMGB1 antibody 0.75 mg/kg							Anti-HMGB1 antibody 1.5 mg/kg					
	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268				
Urinary system																						
Urinary bladder	NR	NR	NR	NR	NR	NR	*	*	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR			
Genital system																						
Testis	NR	NR	NR	NR	NR	NR	*	*	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR			
Epididymis	-	-	-	-	-	-	*	*	*	*	*	*	-	-	-	-	+	-	-			
Cellular infiltration,lymphocyte																						
Prostate	NR	NR	NR	NR	NR	NR	*	*	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR			
Seminal vesicle	NR	NR	NR	NR	NR	NR	*	*	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR			
Mammary gland	NR	NR	NR	NR	NR	NR	*	*	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR			
Endocrine system																						
Pituitary	-	-	+	-	-	-	*	*	*	*	*	*	-	+	-	-	-	-	-			
Cyst,intermediate lobe																						
Thyroid	-	-	-	+	+	-	*	*	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-			
Ectopic tissue,thymic																						
Remnant,ultimobranchial body	-	NR	NR	NR	NR	NR	*	*	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR			
Parathyroid	NR	NR	NR	NR	NR	NR	*	*	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR			
Adrenal	NR	NR	NR	NR	NR	NR	*	*	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR			
Nervous system																						
Cerebrum	NR	NR	NR	NR	NR	NR	*	*	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR			
Cerebellum	NR	NR	NR	NR	NR	NR	*	*	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR			
Medulla oblongata	NR	NR	NR	NR	NR	NR	*	*	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR			
Spinal cord	NR	NR	NR	NR	NR	NR	*	*	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR			
Optic nerve	NR	NR	NR	NR	NR	NR	*	*	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR			
Sciatic nerve	NR	NR	NR	NR	NR	NR	*	*	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR			
Special sense organs																						
Eye	NR	NR	NR	NR	NR	NR	*	*	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR			
Harderian gland	NR	NR	NR	NR	NR	NR	*	*	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR			
Musculoskeletal system																						
M. biceps femoris	NR	NR	NR	NR	NR	NR	*	*	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR			
Sternum	NR	NR	NR	NR	NR	NR	*	*	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR			
Femur	NR	NR	NR	NR	NR	NR	*	*	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR			
Integumentary system																						
Integument	NR	NR	NR	NR	NR	NR	*	*	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR			

Appendix 10 - continued Individual histopathological findings

Group and dose	Anti-KLH antibody 3 mg/kg			Anti-HMGB1 antibody 0.75 mg/kg			Anti-HMGB1 antibody 1.5 mg/kg											
	Animal No.																	
Organs and findings	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268
Others	NR	NR	NR	NR	NR	NR	*	*	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Tail (treated site)	NR	NR	NR	NR	NR	NR	*	*	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	NR	NR

Appendix 10 - continued Individual histopathological findings

Organs and findings	Group and dose		Anti-HMGB1 antibody 3.0 mg/kg					
	Animal No.		269	270	271	272	273	274
Digestive system								
Tongue	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Esophagus	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Stomach	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Duodenum	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Jejunum	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Ileum	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Cecum	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Colon	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Rectum	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Submaxillary gland	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Sublingual gland	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Parotid gland	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Liver	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Pancreas	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Respiratory system								
Trachea	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Lung								
Metaplasia,osseous	-	-	-	-	-	+	-	-
Embolus,hair	-	-	-	-	-	-	-	-
Accumulation,foam cell,alveolus	-	-	-	-	-	-	-	+
Hematopoietic system								
Thymus	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Submaxillary lymph node	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Mesenteric lymph node	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Spleen								
Hematopoiesis,extramedullary	-	-	-	-	-	+	-	+
Bone marrow (sternum)	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Bone marrow (femur)	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Cardiovascular system								
Heart	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Aorta	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Urinary system								
Kidney	-	-	-	-	-	-	-	-
Dilatation,pelvic cavity	-	-	-	-	-	-	-	-

## Appendix 10 - continued Individual histopathological findings

Organs and findings	Group and dose		Anti-HMGB1 antibody 3.0 mg/kg					
	Animal No.		269	270	271	272	273	274
Urinary system								
Urinary bladder			NR	NR	NR	NR	NR	NR
Genital system								
Testis			NR	NR	NR	NR	NR	NR
Epididymis			-	-	-	-	-	-
Cellular infiltration,lymphocyte			NR	NR	NR	NR	NR	NR
Prostate			NR	NR	NR	NR	NR	NR
Seminal vesicle			NR	NR	NR	NR	NR	NR
Mammary gland			NR	NR	NR	NR	NR	NR
Endocrine system								
Pituitary			-	-	-	-	-	-
Cyst,intermediate lobe			-	-	-	-	-	-
Thyroid			+	-	-	-	-	+
Ectopic tissue,thymic			-	-	-	-	-	-
Remnant,ultimobranchial body			NR	NR	NR	NR	NR	NR
Parathyroid			NR	NR	NR	NR	NR	NR
Adrenal			NR	NR	NR	NR	NR	NR
Nervous system								
Cerebrum			NR	NR	NR	NR	NR	NR
Cerebellum			NR	NR	NR	NR	NR	NR
Medulla oblongata			NR	NR	NR	NR	NR	NR
Spinal cord			NR	NR	NR	NR	NR	NR
Optic nerve			NR	NR	NR	NR	NR	NR
Sciatic nerve			NR	NR	NR	NR	NR	NR
Special sense organs								
Eye			NR	NR	NR	NR	NR	NR
Harderian gland			NR	NR	NR	NR	NR	NR
Musculoskeletal system								
M. biceps femoris			NR	NR	NR	NR	NR	NR
Sternum			NR	NR	NR	NR	NR	NR
Femur			NR	NR	NR	NR	NR	NR
Integumentary system								
Integument			NR	NR	NR	NR	NR	NR



Appendix 10 - continued Individual histopathological findings

Group and dose	Anti-HMGB1 antibody 3.0 mg/kg					
Animal No.	269	270	271	272	273	274
Organs and findings	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Others Tail (treated site)	NR	NR	NR	NR	NR	NR

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

粥状動脈硬化症モデルに関する研究

研究分担者 榎野 博史 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授  
森 秀治 就実大学薬学部・教授  
高橋 英夫 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究要旨

アポリポタンパク E ノックアウトマウスに高脂肪食負荷して作製されるアテローム性動脈硬化症における抗 HMGB1 単クローン抗体の慢性投与効果の解析を、局所浸潤細胞のマーカー、産生サイトカイン発現に注目して行った。

A. 研究目的

動脈硬化症は、生活習慣病において症状を顕在化させることなしに進行し、また一定以上の進行をきたすと、脳梗塞、心筋梗塞、腎障害などの重大疾患発症の原因となる。したがって、その発症を的確に検査し、新しい治療法を確立することが、臨床医学上極めて重要である。本年度の研究において、マウスの動脈硬化症モデルを用いて動脈硬化巣形成における HMGB1 の関与と抗 HMGB1 抗体の慢性投与効果を明らかにし、ヒト動脈硬化症に対する治療薬としての抗体薬開発に向けて、基本情報を得る。

B. 研究方法

ApoE ノックアウトマウスに生後 6 週目から高脂肪食（脂質 20%含有）を 8 週間負荷し、粥状動脈硬化症を発症させる。このモデル動物を用いて、抗 HMGB1 単クローン抗体の投与効果を検討した。抗 HMGB1 抗体あるいは対照抗体は、200 µg の用量を 1 日間隔で静脈内投与した。モデルマウスをホル

マリンで灌流固定し、大動脈起始部の粥状動脈硬化巣を抗 HMGB1 抗体で免疫染色する。リアルタイム PCR 用サンプルは、大動脈起始部の粥状動脈硬化巣から総 RNA を抽出し、鋳型 DNA を逆転写酵素によって合成した。粥状動脈硬化巣の単球・樹状細胞・平滑筋細胞・リンパ球の細胞集積は、それぞれの細胞マーカーを免疫組織化学的に染色することで評価した。組み換え体 HMGB1 の単球遊走活性は、マウス腹腔内への単球遊走と RAW264.7 遊走を用いて評価した。

C. 研究結果

前年度の研究において、マウスの粥状動脈硬化巣局所では HMGB1 が高発現しており、それらは泡沫細胞内とその周辺領域に認められることを明らかにしている。抗 HMGB1 単クローン抗体の 8 週間連続投与によって、対照マウスで認められる粥状動脈硬化巣の形成が約半分に縮小し、集積する単球も有意に低下することがわかった。さらに、樹状細胞数、CD4 陽性 T リンパ球数、遊走平滑筋細胞数、

VCAM-1, MCP-1 発現が有意に低下することがわかった。組み換え体 HMGB1 を使った単球遊走活性試験から、HMGB1 には単球遊走活性があることがわかった。抗 HMGB1 抗体の慢性投与は、血中総コレステロール、HDL-, LDL-コレステロール、中性脂肪の各値には影響しなかった。

#### D. 考察

抗 HMGB1 単クローン抗体による慢性治療は、血中脂質レベルに影響することなく、粥状動脈硬化巣を縮小することができた。粥状動脈硬化巣には HMGB1 が高発現していたことから、抗体は同部位での HMGB1 活性を阻害した可能性がまず考えられる。その結果、別の実験でも示された単球遊走の抑制、血管内皮細胞活性化の抑制、平滑筋細胞遊走の抑制、炎症性サイトカイン産生の抑制が齎されたと考えられる。

#### E. 結論

抗 HMGB1 単クローン抗体による粥状動脈硬化症の治療は、脂質代謝に全く影響せず、HMGB1 の起炎性サイトカイン作用に拮抗することにより、強い抗動脈硬化作用を発揮すると考えられる。このような作用機序の薬物は現在存在せず、将来的に極めて有望であると考えられる。

#### 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

Kanellakis P, Agrotis A, Kyaw TS, Koulis C, Ahrens I, Mori S, Takahashi HK, Liu K, Peter K, Nishibori M, Bobik A. High-Mobility Group Box Protein 1 Neutralization Reduces Development of Diet-Induced Atherosclerosis in

Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31 (2):313-9,2011.

##### 2. 学会発表

Bobik A, Kanellakis P, Argotis A, Koulis C, Ahrens I, Peter K, Mori S, Takahashi HK, Liu K, Nishibori M. A proatherogenic role for HMGB1 in atherosclerosis. *Circulation*, 120: S1155, 2009.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

WIPO 出願 PCT/JP2010/066683, アテローム動脈硬化抑制剤, 二祖彫り正洋他.

##### 2. 実用新案登録

該当なし

##### 3. その他

該当なし

## マウス粥状動脈硬化症モデルに関する研究

横野 博史、森 秀治、高橋 英夫

### 目的：

動脈硬化症は、生活習慣病において症状を顕在化させることなしに進行し、また一定以上の進行をきたすと、脳梗塞、心筋梗塞、腎障害などの重大疾患発症の原因となる。したがって、その発症を的確に検査し、新しい治療法を確立することが臨床医学上極めて重要である。昨年度の研究において、ヒト動脈血管閉塞性疾患と血漿 HMGB1 値との間に有意の相関関係があることを明らかにした。本年度の研究において、マウスの動脈硬化症モデルを用いて動脈硬化巣形成における HMGB1 の関与と抗 HMGB1 抗体の慢性投与効果を明らかにし、ヒト動脈硬化症に対する治療薬としての抗体薬開発に向けて、基本情報を得る。

### 結果と考察：

前年度の研究において、マウスの粥状動脈硬化巣局所では HMGB1 が高発現しており、それらは泡沫細胞内とその周辺領域に認められることを明らかにしている (図 1)。抗 HMGB1 単クローン抗体の 8 週間連続投与によって、対照マウスで認められる粥状動脈硬化巣の形成が約半分に縮小し、集積する単球も有意に低下することがわかった (図 2)。さらに、樹状細胞数 (図 4)、CD4 陽性 T リンパ球数 (図 4)、遊走平滑筋細胞数 (図 5)、VCAM-1, MCP-1 発現 (図 3) が有意に低下することがわかった。組み換え体 HMGB1 を使った単球遊走活性試験から、HMGB1 には単球遊走活性があることがわかった。抗 HMGB1 抗体の慢性投与は、血中総コレステロール、HDL-, LDL-コレステロール、中性脂肪の各値には影響しなかった (表 1)。

抗 HMGB1 単クローン抗体による慢性治療は、血中脂質レベルに影響することなく、粥状動脈硬化巣を縮小することができた。粥状動脈硬化巣には HMGB1 が高発現していたことから、抗体は同部位での HMGB1 活性を阻害した可能性がまず考えられる。その結果、別の実験でも示された単球遊走の抑制、血管内皮細胞活性化の抑制、平滑筋細胞遊走の抑制、炎症性サイトカイン産生の抑制が齎されたと考えられる。