

図1 ApoE<sup>-/-</sup>マウスの大動脈洞動脈硬化巣病変部位におけるHMGB1の免疫組織化学的発現の同定。A: HMGB1 (赤色染色)は、内膜層の細胞に染色が認められ、また動脈硬化巣に瀰漫性に広がっている。中膜層の細胞はHMGB1を発現していない。B: 一次抗体としてウサギHMGB1抗体の代わりに非特異的ウサギIgG抗体を使い、同部位を染色した。切片はヘマトキシリンで核染色した。図下のバーは、100 $\mu$ mを表す。

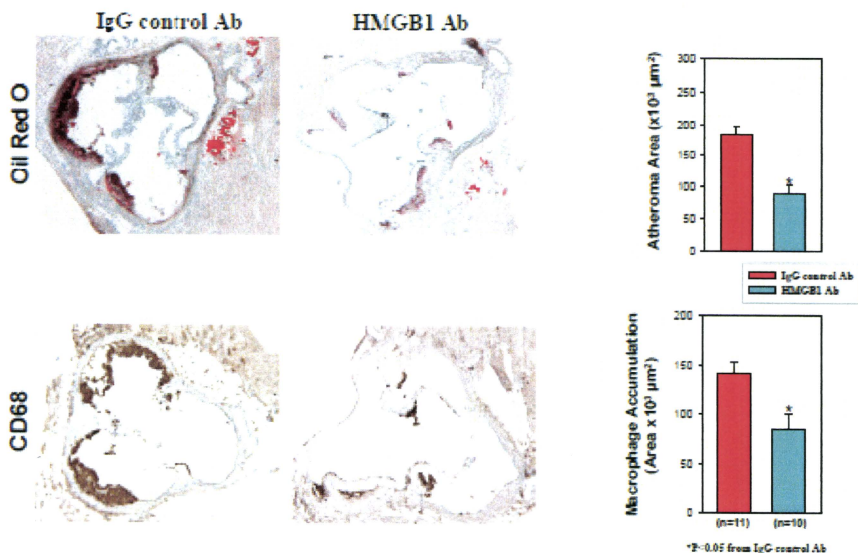


図2 ApoE<sup>-/-</sup>マウスの大動脈洞動脈硬化巣病変部位  
 上段:動脈硬化巣の組織染色。下段:CD68陽性のマクロファージ染色。  
 左:対照抗体投与。右:抗HMGB1抗体投与。棒グラフはそれぞれの面積の定量結果を示す。

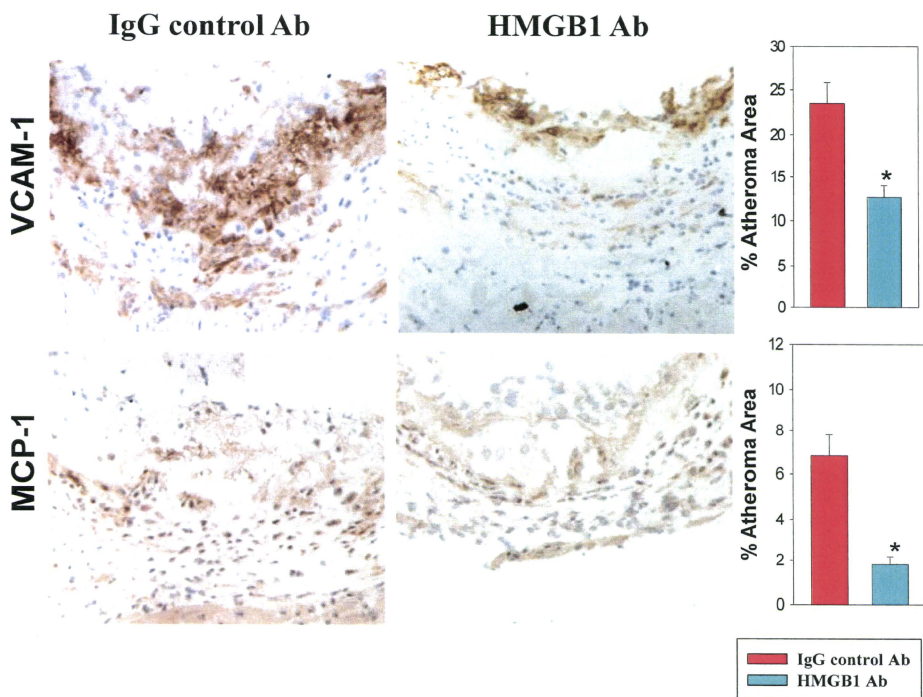


図3 ApoE<sup>-/-</sup>マウスの大動脈洞動脈硬化巣病変部位  
 上段:動脈硬化巣のVCAM-1免疫染色。下段:MCP-1免疫染色。  
 左:対照抗体投与。右:抗HMGB1抗体投与。棒グラフはそれぞれの面積の定量結果を示す。

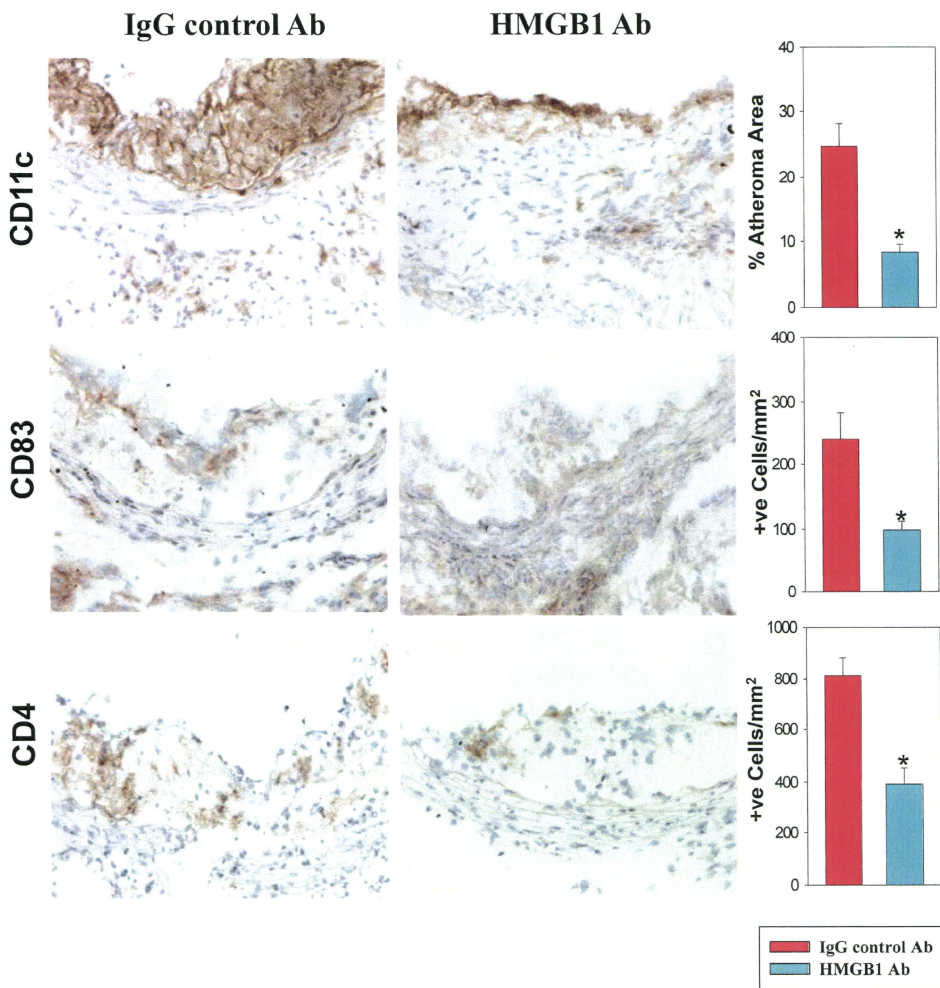


図4 ApoE<sup>-/-</sup>マウスの大動脈洞動脈硬化巣病変部位

上段:動脈硬化巣のCD11c免疫染色。 中段:CD83免疫染色

下段:CD4免疫染色。

左:対照抗体投与。右:抗HMGB1抗体投与。棒グラフはそれぞれの面積あるいは陽性細胞数の定量結果を示す。

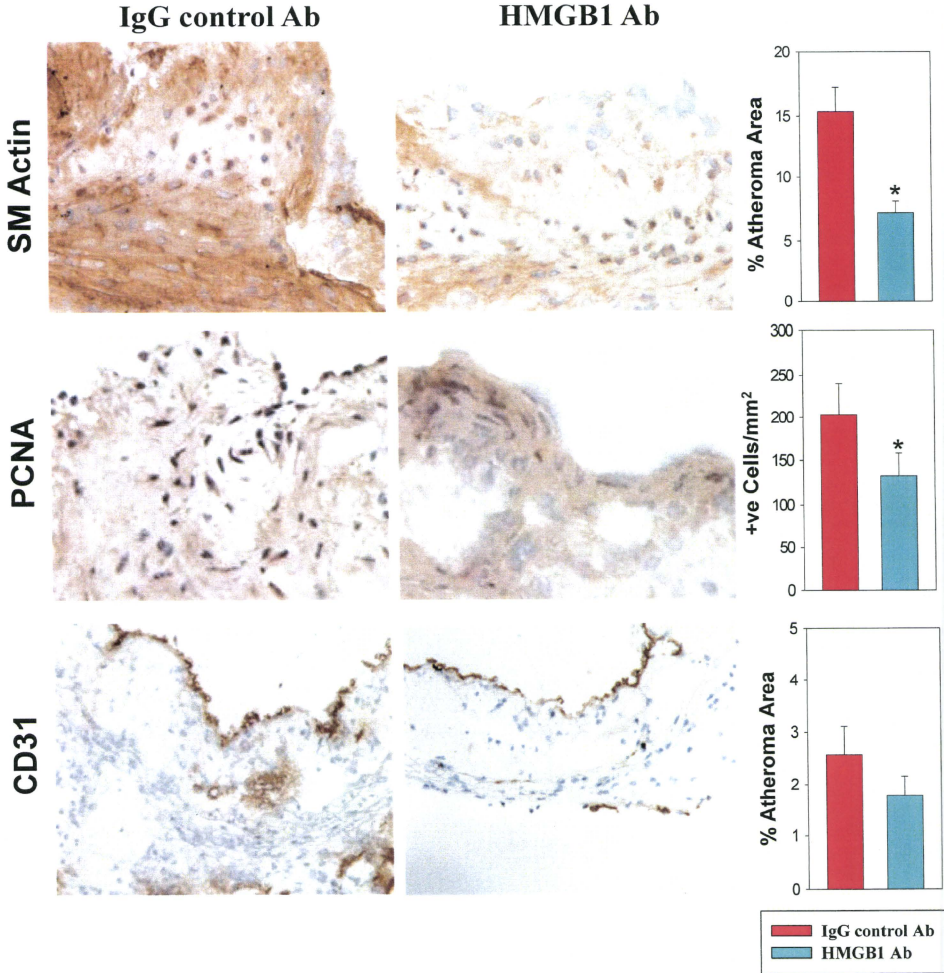


図5 ApoE<sup>-/-</sup>マウスの大動脈洞動脈硬化巣病変部位  
 上段:動脈硬化巣のSM Actin免疫染色。中段:PCNA免疫染色  
 下段:CD31免疫染色。  
 左:対照抗体投与。右:抗HMGB1抗体投与。棒グラフはそれぞれの面積あるいは陽性細胞数の定量結果を示す。

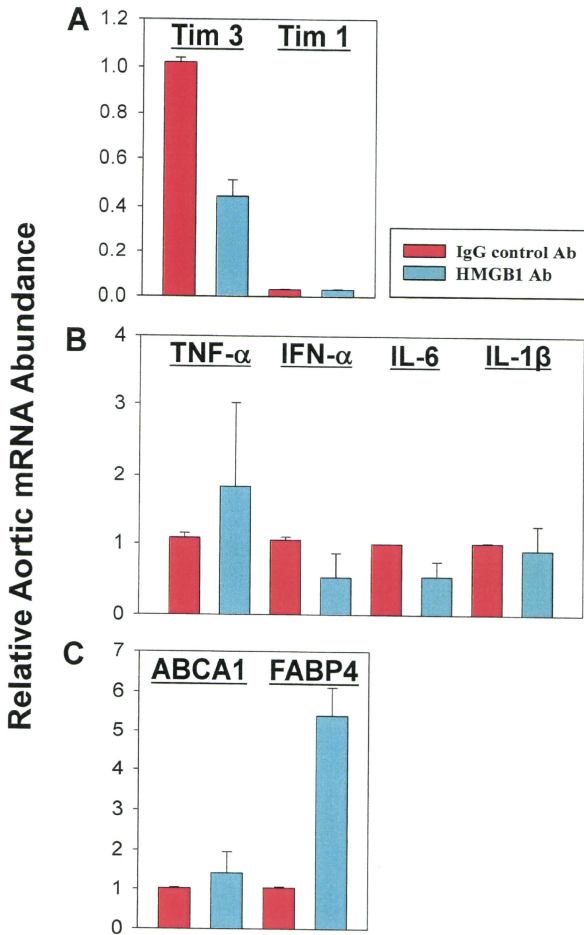


図6 ApoE<sup>-/-</sup>マウスの大動脈洞動脈硬化巣病変部位の遺伝子発現  
 A: Tim3 とTim1 B: 炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-1 $\beta$ )  
 C: ABCA1 とFABP4  
 赤: 対照抗体投与。青: 抗HMGB1抗体投与。

表1 高脂肪食を8週間摂取したApoE<sup>-/-</sup>マウスの  
血漿中脂質レベル

Treatment	Total Cholesterol (mmol/l)	HDL- Cholesterol (mmol/l)	LDL- cholesterol (mmol/l)	Triglyceride s (mmol/l)
IgG Control Ab	7.55 ± 0.33	1.27 ± 0.05	5.19 ± 0.22	2.46 ± 0.22
HMGB1 Ab	7.70 ± 0.38	1.30 ± 0.08	5.45 ± 0.29	2.14 ± 0.13

サル脳梗塞モデルに関する研究

研究分担者 伊達 勲 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授  
武田 吉正 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・講師

研究要旨

ニホンザルの大脳動脈から動脈バルーンカテーテルを挿入し、総頸動脈を経て中大脳動脈起始部で、バルーンを膨らませ、2時間の虚血を負荷した。2時間後にバルーンを閉じ再開通させた。血流再開通48時間後に深麻酔下にサル脳を灌流固定し、脳梗塞の評価を行った。HMGB1 トランスロケーションを虚血コアとペナンブラで評価した。

A. 研究目的

前年度までにラット MCAO 2時間閉塞・再灌流モデルで明らかにできた抗 HMGB1 単クローン抗体の梗塞巣縮小効果を霊長類でも確認するために、ニホンザルを用いて低侵襲の血管内動脈バルーンカテーテル法による中大脳動脈閉塞・再灌流モデルを作製し、脳梗塞巣形成、HMGB1 トランスロケーションについて明らかにする。

B. 研究方法

国際 stroke 委員会で推奨するサルの虚血モデルを用いた実験を計画し、実施した。従来の開頭によるアプローチは侵襲的であったため、我々は血管内手技による、低侵襲な脳梗塞モデルを目標とした。日本バイオリソースから供給を受けたニホンザル（体重 4-8.5 kg）にケタミンを筋注し、全身麻酔の上、血管造影を行いながら、カテーテルを腹大動脈～下行大動脈～上行大動脈経由し、サル特有の Bovine arch にアプローチし、カテーテルを留置する。その上で、そこからバルーン付きマイクロワイヤーを確認しながら総頸動脈～内頸動脈に進

めた上で、バルーンを拡張し、2時間の血行遮断を行い、その後バルーンを収縮させ、血流の再開を確認した。その後、体温を保って覚醒させた。再灌流後、サルには患側の片麻痺症状を呈しており、再灌流 48 時間後、静脈麻酔で安楽死させ、ホルマリン還元固定を行った上で、血管と脳を取り出し、組織の検討を行った。

C. 研究結果

マクロの組織学的評価においては、血管においては、Bovine arch の確認ができた。また、ヒトと比べると、前方循環（内頸動脈-中大脳動脈-前大脳動脈）に比し、後方循環（椎骨動脈-脳底動脈）の血管の発達が目立った。脳組織においては、脳梗塞は尾状核頭を中心に、前大脳動脈領域に目立った。

脳固定後のパラフィン包埋切片を用いて、虚血脳部位 HMGB1 トランスロケーションを評価したところ、虚血コアから HMGB1 陽性構造が消失し、相対虚血領域では、細胞質に HMGB1 陽性像を有する神経細胞が見出された。



## D. 考察

ニホンザルではその血管走行の特徴から、ラットで実施したような中大脳動脈起始部でのバルーンによる血管内腔の閉塞は難しいことがわかった。しかし、今回実施したような内頸動脈レベルでの閉塞でも、尾状核頭を中心に、前大脳動脈領域に脳梗塞巣を形成させることができた。虚血コアとペナンブラに相当する領域では、ラットの虚血脳で観察されたのと同様の HMGB1 トランスロケーションが神経細胞に認められた。したがって、この現象は霊長類にも共通する生体応答であると結論できる。

## E. 結論

ニホンザルを用いて、血管内動脈カテーテル法による低侵襲手術によって、脳梗塞モデルを作製した。脳虚血部位において、げっし類で観察されたのと同様の HMGB1 トランスロケーションが明らかにされた。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

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.

### 2. 学会発表

該当なし

## 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

## ニホンザルの脳梗塞モデルに関する研究

伊達 勲、武田 吉正

### 目的：

前年度までにラット MCAO 2 時間閉塞・再灌流モデルで明らかにできた抗 HMGB1 単クローン抗体の梗塞巣縮小効果を霊長類でも確認するために、ニホンザルを用いて低侵襲の血管内動脈バルーンカテーテル法による中大脳動脈閉塞・再灌流モデルを作製し、脳梗塞巣形成、HMGB1 トランスロケーションについて明らかにする。

### 実験プロトコール

手術：(図 1, 2)

1. 麻酔：ケタラルール (10mg/kg, im) を投与して、睡眠導入する。アトロピン 0.2mg/kg/iv, ペンタゾン 1mg/kg/iv を投与し、サルを固定装置に上向き固定し、気管内挿管を行う。酸素 49%, 笑気 50%, イソフルレン 1%, 吸入麻酔を維持する。
2. 左上腕動脈、静脈ルートを取る。動脈から採血し、手術前、手術中、手術終了各時間の血液ガスを測定する。
3. 右上肢にカフを巻く、血圧、心拍数を連続観察する。
4. Balloon Occlusion 手術を行う。
5. 体温 (37°C) を保って、脳血流を測定しながら 2 時間中大脳動脈の閉塞。
6. 再灌流直後に単クローン抗体あるいは、対照抗体 (400  $\mu$ g/kg) 静注する。

検査項目と神経学的評価：

1. 再灌流後 3 時間、6 時間、24 時間でサルの病状を観察し、神経麻痺症状を評価する。
2. 一定時間後、ケタラルール (10mg/kg, im) 麻酔下静脈採血を実施する。
3. 再灌流後 24 or 48 時間後、ペントバルビタール 100mg/kg の静注で安楽死させ、ホルマリン灌流固定を行う。  
脳を取り出し、組織学的に観察し、脳虚血状態を多角的に検討する。特にラット脳で認められた HMGB1 トランスロケーションに注目する。
4. 血漿 (血清) の保存。

### 結果と考察

最初に、血管撮影にて、Aorta から左鎖骨下動脈、右腕頭動脈の順に分岐し、右腕頭動脈から左右の総頸動脈、左の鎖骨下動脈と分岐していく、いわゆる Bovine aortic arch の形式をとっていることを確認した。次に、その経路を経て、右総頸動脈から更に右内頸動脈、右中大脳動脈まで PercuSurge GW と呼ばれる、ヒトの血管内手術で Embolic Protection Device として使われるバルーンつきワイヤーを上げて行ったが、バルーンが中大脳動脈では安定しなかったため、今回はトライアルとして片側の内頸動脈の遮断にすることとした。体温(37°C)を保った状態で、2時間片側の内頸動脈を閉塞し、その後バルーンを収縮させ、血流の再開を確認した。その後、体温を保って覚醒させた。再灌流後、サルには患側の片麻痺症状を呈しており、再灌流後 48 時間後、静脈麻酔で安楽死させ、ホルマリン還流固定を行った上で、血管と脳を取り出した。血管においては、Bovine aortic arch を確認できた。また、ヒトと比べると、前方循環(内頸動脈-中大脳動脈-前大脳動脈)に比し、後方循環(椎骨動脈-脳底動脈)の血管の発達が目立った。前大脳動脈は artigos artery の形式をとっていた。

ホルマリン固定脳の検索で、前脳大脳皮質領域と大脳基底核領域の脳梗塞巣形成が HE-染色標本で明らかにされた。非虚血側を比較対照として虚血側の神経細胞死ならびに HMGB1 トランスロケーションを評価した。その結果、上述の脳部位からの神経細胞の消失と、神経細胞核に発現する HMGB1 抗原の消失が認められた(図 4-図 6)。以上の結果は、ラット MCA 2 時間閉塞・再灌流モデルで得た結果と極めて酷似するものであった。また、虚血側の脳血管で、血管壁内に強い HMGB1 陽性構造物が多数認められた(図 7)。このような陽性所見は、非虚血側では認められなかった。今後、血管内構造物の細胞種や細胞内局在等の解析が必要である。

ニホンザル雄性 8.5kg

麻酔 笑気-イソフルラン-酸素

IC虚血(動脈内バルーンカテーテル法)

KLH IgG投与

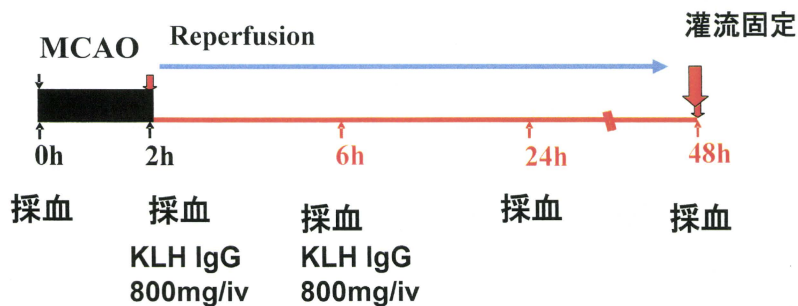
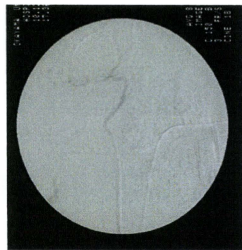
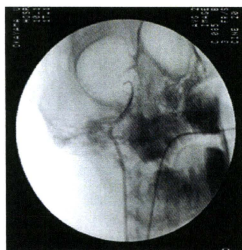
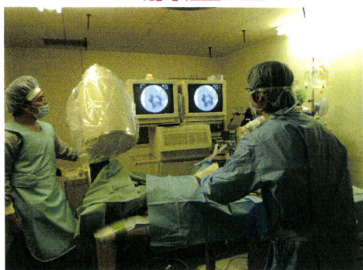


図1 サル脳虚血モデルの作製プロトコール

## 麻酔の導入



## 動脈バルーンカテ による脳虚血



## 直視下での脳虚血 評価

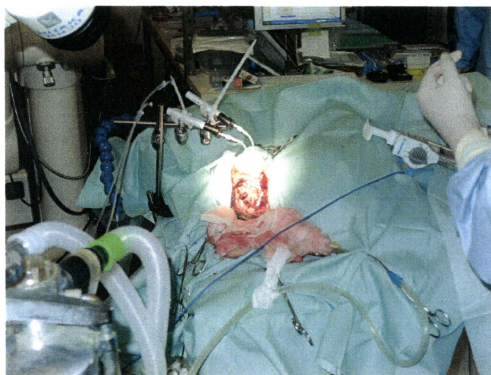


図2 サル脳虚血モデル作製の外科手術

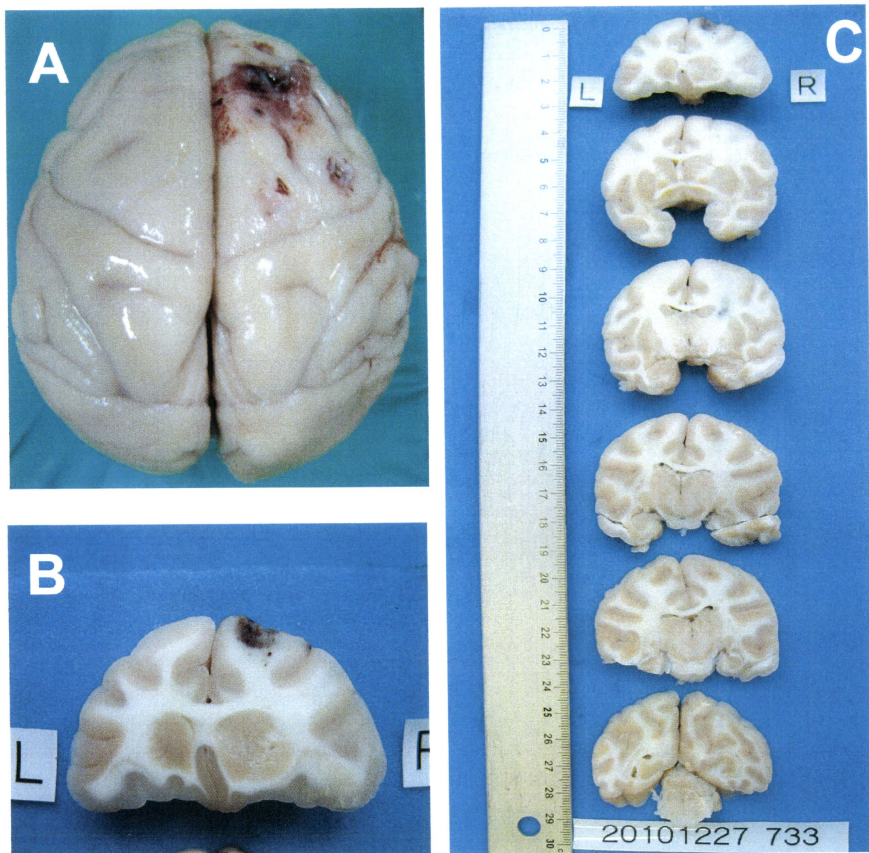
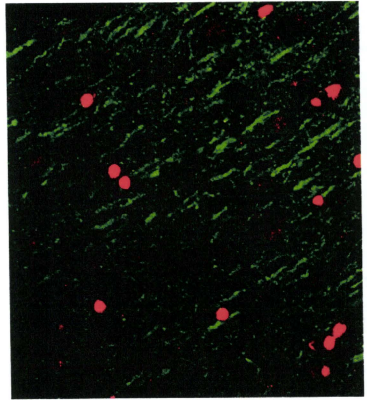
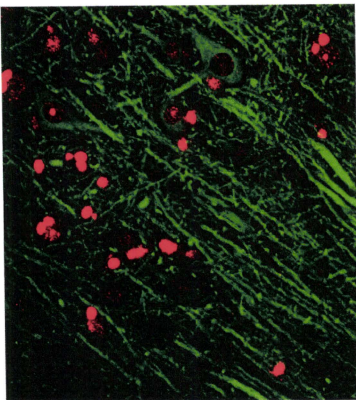
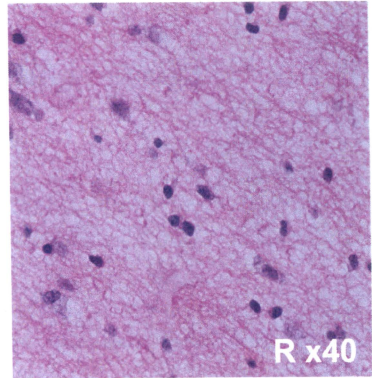
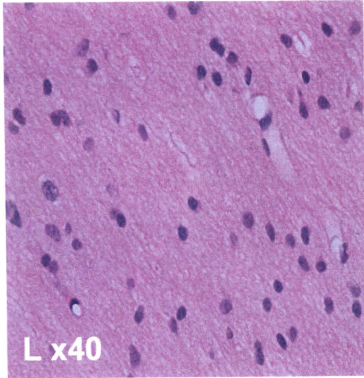
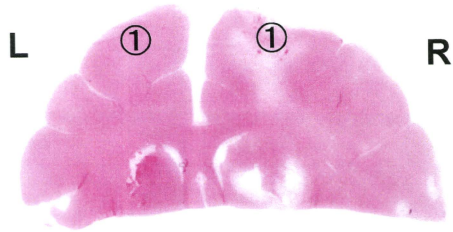
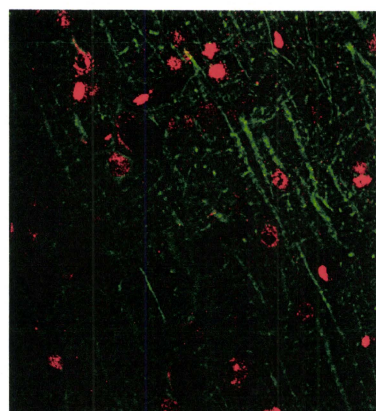
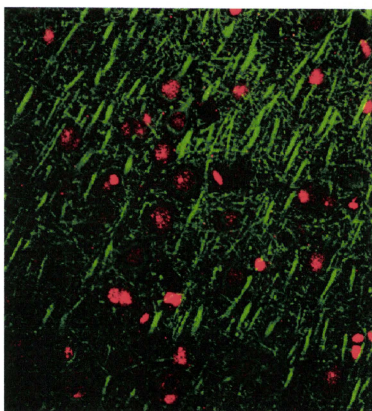
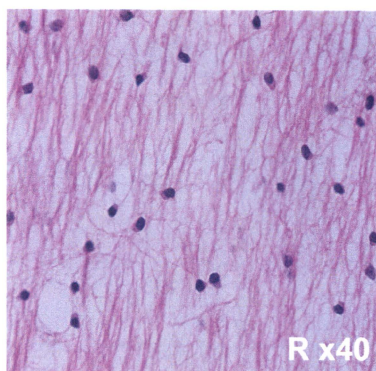
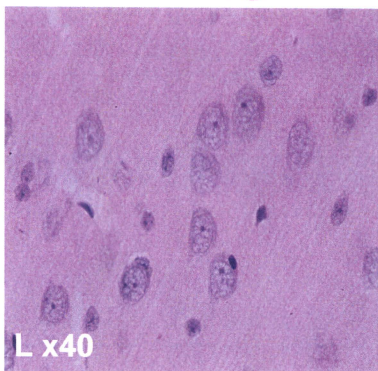
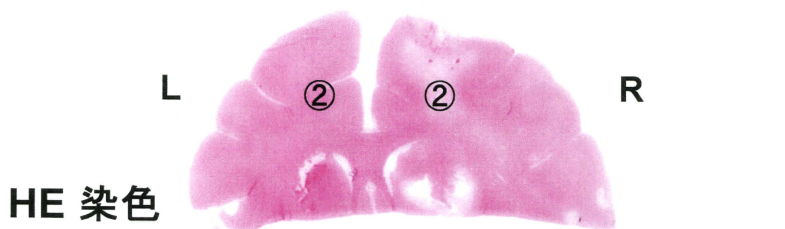


図3 サル脳固定後の外観と冠状断面



赤:HMGB1染色 緑:MAP-2染色

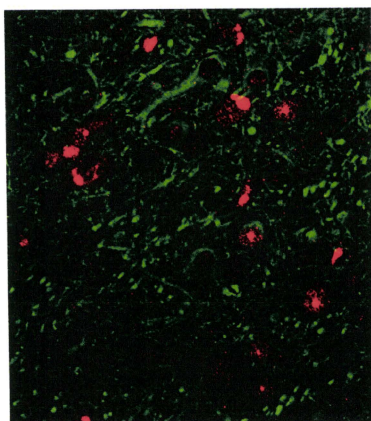
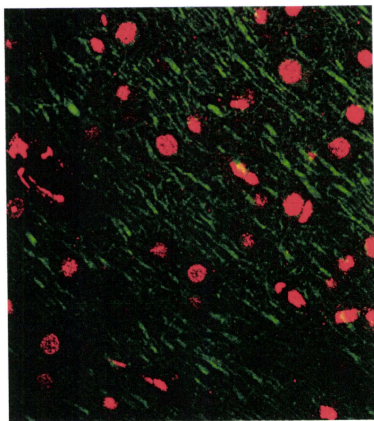
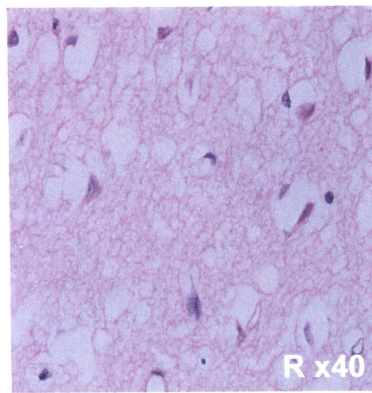
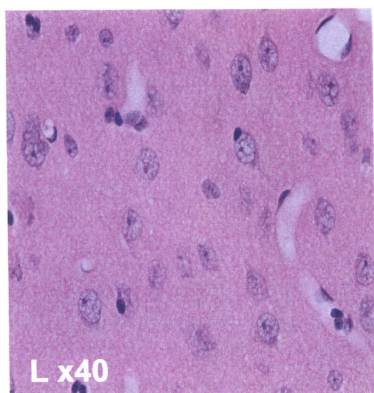
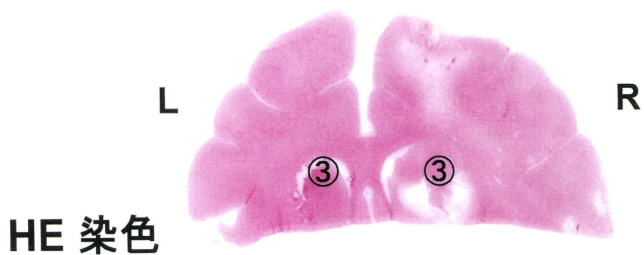
図4 サル虚血脳部位のHE染色とHMGB1



赤:HMGB1染色 緑:MAP-2染色

図5 サル虚血脳部位のHE染色とHMGB1





赤:HMGB1染色 緑:MAP-2染色

図6 サル虚血脳部位のHE染色とHMGB1

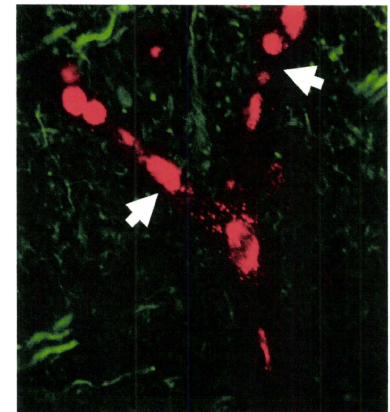
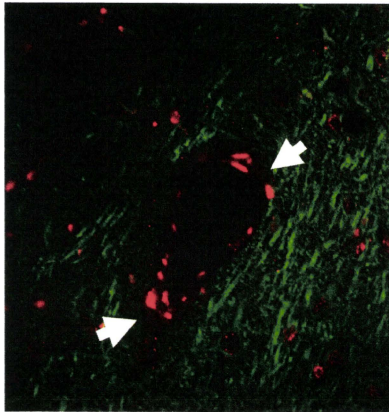
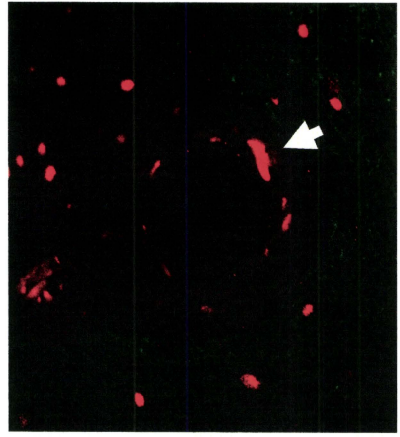
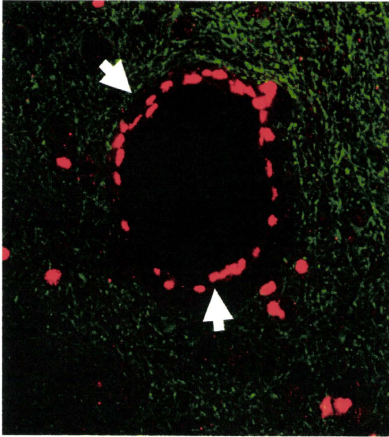


図7 虚血脳部位で認められたHMGB1陽性血管構造

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

標識抗体の作製と生体内動態解析

研究分担者 榎本 秀一 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授  
劉 克約 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・助教  
西堀 正洋 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究要旨

抗 HMGB1 ラット単クローン抗体 (#10-22) を抗原結合性を 60 % 保持した状態で、DOTA 修飾することに成功した。さらに  $^{64}\text{Cu}$  を DOTA に結合させた後、ゲル濾過により標識抗体のみを分離し、生体内動態解析のための Positron Emission Tomography (PET) 用プローブとした。この標識抗体と対照抗体を中大脳動脈閉塞・再灌流 (MCAO) モデルラット尾静脈から投与し、生体内分布・動態について評価を行った。

A. 研究目的

前年度までに、抗 HMGB1 ラット単クローン抗体 (#10-22) のビオチン標識化を試みたが、この標識体は抗原結合性を完全に消失することが、組換え体ヒト HMGB1 を固相化した Elisa で明らかとなった。そこで本年度は、抗体の標識法として新規に 1,4,7,10-tetraazacyclo dodecane- $N,N,N,N'$ -tetraacetic acid (DOTA) を用いる。修飾抗体の抗原結合性について評価した後、 $^{64}\text{Cu}$ -DOTA 標識を行い、生体内動態解析用 PET プローブとする。ラット MCAO モデルに標識抗体を尾静脈投与し、抗体の脳内移行を含む生体内動態についてのデータを得る。

B. 研究方法

1. DOTA 修飾条件の検討

抗 HMGB1 ラット単クローン抗体 (#10-22) の 1,4,7,10-tetraazacyclo dodecane- $N,N,N,N'$ -tetraacetic acid (DOTA) 修飾条件を、反応基質比、その

2. 修飾抗体の抗原結合性の評価

作製された修飾抗体の抗原結合性を、組換え体ヒト HMGB1 固相化プレートを用いて評価する。修飾前の抗体結合量との比較で抗原結合性を評価する。

3.  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA 標識抗体の作製と分離

サイクロトロンで作製された  $^{64}\text{Cu}$  を上述の DOTA 修飾抗体と反応させ、 $^{64}\text{Cu}$ -DOTA 標識抗体を得る。フリーの  $^{64}\text{Cu}$  を分離するため、ゲル濾過カラムで  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA 標識抗体の分離を行う。

4. MCAO ラットへの  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA 標識抗体の投与と PET 撮像

治療用抗体の投与方法と同じ静脈内投与で  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA 標識抗体を投与し、一定時間後に PET 撮像する。

5. 脱血後脳切片のオートラジオグラフィー

血管内に残る血中  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA 標識抗体を脱血と灌流により除いた後、脳スライスを作製し、オートラジオグラフィーを実施する。

## C. 研究結果

抗原結合能を 60 % 維持した DOTA 修飾条件を得ることができた。 $^{64}\text{Cu}$ -DOTA 標識抗体をゲル濾過カラムを用いてフリーの $^{64}\text{Cu}$ から分離することができた。MCAOの脳虚血部位に対照抗体、抗 HMGB1 抗体ともに集積する像が PET 撮像で得られた。集積量は、抗 HMGB1 抗体の方が多い傾向であった。脱血後の脳スライスを用いたオートラジオグラフィーでは逆に、対照抗体の脳内移行が多い傾向にあった。

## D. 考察

ビオチン標識体とは異なり、抗原結合性を 60%保持する今回作製された $^{64}\text{Cu}$ -DOTA 標識抗体は、生体内動態の研究に十分使用できることが明らかとなった。生体内動態ならびに脳内移行の問題に関しては、さらに個体数を増やして解析する必要がある。血中動態の解析は、次年度に計画されている。

## E. 結論

PET 解析の使用に耐える $^{64}\text{Cu}$ -DOTA 標識抗 HMGB1 抗体を得ることができた。

## 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

該当なし

### 2. 学会発表

該当なし

## 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