

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791778

研究課題名(和文)

熱傷後敗血症性肺障害モデルにおける HMGB1 の動態の解明

研究課題名(英文)

Detection of the role of High Mobility Group Box-1 on septic lung injury mice after burn injury.

研究代表者

安倍 晋也 (ABE SHINYA)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：20383896

研究成果の概要(和文)：①熱傷後敗血症モデルとなるマウスの作成の手技の確立をした。②血液・肺・肝臓・脾臓を摘出し保存検体として処理する手技の確立をした。③ELISA法を用いたサイトカイン(IL-6)・HMGB-1の測定の手技を確立させた。④熱傷後敗血症モデルマウスの熱傷とLPS投与による腸管内サイトカイン産生は空腸・回腸・大腸で認められた。さらに腸管内サイトカイン産生の主要な場は回腸であること示唆された。

研究成果の概要(英文)：①Construction of the method of making septic lung injury mice after burn injury. ②Construction of the method of get and stock the samples of blood, lung, liver and spleen of the mice. ③Construction of the method of measure of cytokines and HMGB-1. ④Ileum is considered the major place of produce cytokines in intestines of septic lung injury mice after burn injury.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：①救急医学 ②外傷学 ③侵襲学 ④外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：HMGB-1、敗血症、サイトカイン、シグナル伝達、免疫学、侵襲学

## 1. 研究開始当初の背景

重症熱傷・多発外傷患者では、敗血症・多臓器不全や急性呼吸促拍症候群などの合併症が急性期後の予後規定因子である。我々の開発した熱傷とエンドトキシンの2段階刺激による敗血症性急性肺障害モデルにおいて致命的病態は主にLPS投与後の急性肺障害によると考えたが、そのメカニズムは解明されていない。その鍵の一つがHMGB-1であると考えた。HMGB-1は核内蛋白質で、敗血症時に能動的または壊死細胞から受動的に分泌され組織

中で増加し、炎症の増幅、細胞障害に関与することが報告されている

## 2. 研究の目的

重症熱傷・多発外傷患者における敗血症・多臓器不全や急性呼吸促拍症候群などの病態の解明である。同病態の鍵となるのがHMGB-1と考え、その過剰発現後の変化につき検討することである。

### 3. 研究の方法

BALB/c マウス (Charles River Laboratories Japan, Inc, Yokohama, Japan; 雄, 7週, 23-28g) を1週間ケージで飼育後に「sham」, 「burn」の2群に分け、ペントバルビタール麻酔後に電気カミソリでマウスの背中を剃毛し、脱毛クリームを塗布後に水洗する。その翌日を DAY1 とし、それぞれのマウスをエーテル麻酔後に、剃毛後の背部を5秒間高温水蒸気に暴露し、体表面積の約15%の範囲に全層性の熱傷を作成する。Sham 群のマウスは同様に麻酔後に剃毛し、高温水蒸気には暴露しない。熱傷負荷後 DAY1, 3, 5, 7, 11 にペントバルビタールを腹腔内投与し麻酔後に、頸椎脱臼にて sacrifice し、ヘパリン入りシリンジにて心臓脱血し、肺・肝臓・脾臓を摘出する。ヘパリン加血液は1500回転/分 10分で遠心分離後-80°Cで保存する。右肺は HMGB-1・サイトカイン・アルブミンの測定に使用する。(アルブミン値は ALI 評価に使用) 左肺上葉はスライスし HE 染色のために保存する。肺・肝はスライス後に PBS にて 10-50 倍に希釈しホモジナイズし、遠心分離後に保存し、HMGB-1・サイトカイン・アルブミンを specific sandwich ELISA にて測定する。以上から、熱傷負荷後 DAY1, 3, 5, 7, 11 において、各臓器中(血液、肺、肝、脾)のサイトカインと HMGB-1 の含量を定量し、そのサイトカインバランスと HMGB-1 との関連を経日的に検討する。上記と同様に熱傷マウスを作成後、DAY11 に 3mg/kg LPS (Escherichia coli 0111:B4; Sigma Chemical, St. Louis, MO) を全てのマウス (Burn, Sham) に経静脈的に投与する。LPS 投与後に関しても各臓器中(血液、肺、肝、脾)の HMGB-1 含量を定量する。生存率との関連も検討する。

### 腸管内サイトカインの解析

熱傷マウスおよびシャムマウスに対して、熱傷作成 11 日後に 3mg/kg LPS を尾静脈から静脈内投与し、12 時間後に全小腸・大腸を摘出する。切片の一部を用いて組織学的検索を行う。その他の摘出した腸管は速やかに-80°Cで凍結保存する。空腸、回腸、横行結腸の一部を 5000 倍量の PBS ( $\mu$ L) で組織液とし、上清を遠心分離により抽出し、サイトカイン測定まで-80°Cで凍結保存する。

### 4. 研究成果

腸管内サイトカインの局在を調べるために、空腸、回腸、大腸の3箇所組織中の IL-6 量を定量したところ、熱傷マウスへの LPS 投与によって組織中 IL-6 量の増加率が大きかったのは回腸、大腸の順であり (Figure 1, Figure 2 unpublished data)、熱傷と LPS 投与によるサイトカイン産生の際は主に回腸であると考えられた。大腸におけるサイトカイン値の変化は、LPS 投与による影響が強く観察され、熱傷によるサイトカイン産生能の特異的变化は認められなかった。

Figure 1 Cytokine levels in the jejunum for sham and LPS challenge.

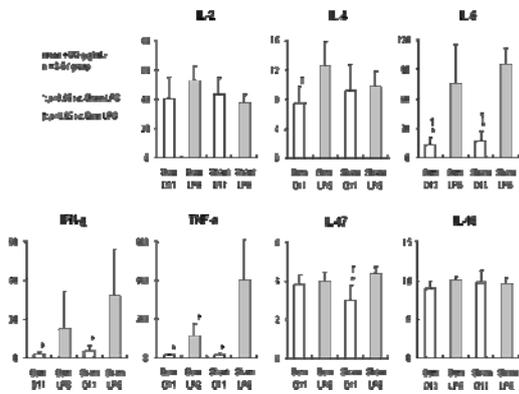
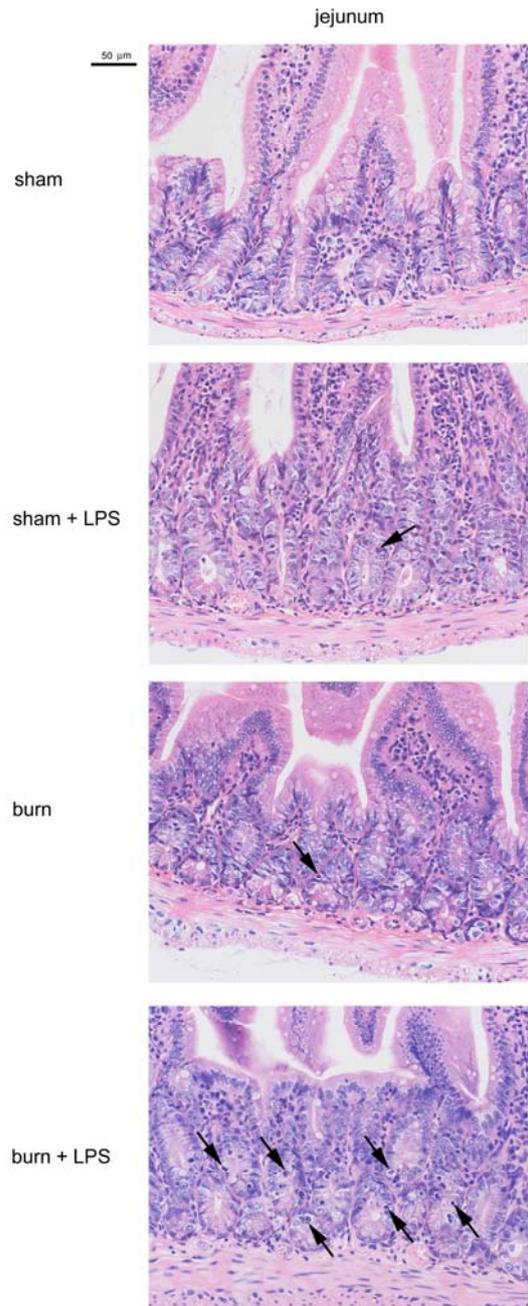
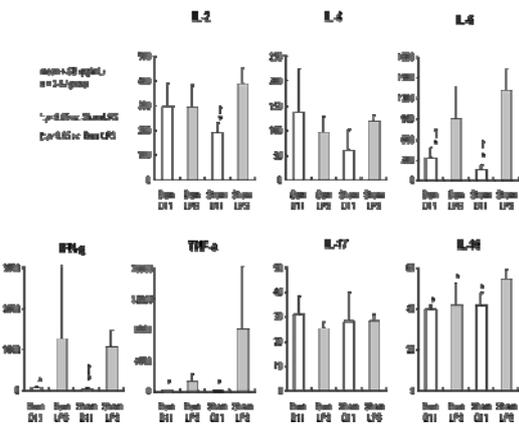


Figure 2 Cytokine levels in the jejunum for sham and LPS challenge.



組織学的検索では熱傷後LPS投与群マウス空腸、回腸、大腸では絨毛にアポトーシスを認めたがshamでははっきりしなかった。  
(写真、矢印：アポトーシス所見)

各種検体における HMGB-1 の定量では、熱傷とエンドトキシン の 2 段階刺激による敗血症性急性肺障害モデル (LPS 投与後の急性肺障害) において、HMGB-1 の過剰発現が LPS に対する過剰反応性を増強する可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

①安倍晋也、熱傷 two-hit モデルにおける腸管内サイトカイン動態の解析、第 17 回 外科侵襲とサイトカイン研究会、平成 22 年 12 月 11 日、幕張

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

安倍 晋也 (ABE SHINYA)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：20383896

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし