

食道癌術前放射線治療が周術期生体反応に
及ぼす影響に関する検討
- 呼吸器合併症と HMGB- 1 に着目して -

たかはた りさ
高畑 りさ

(消化器病学専攻)

防衛医科大学校

平成 25 年度

目次

第1章 緒言.....	1
第2章 食道癌術前治療が周術期生体反応に与える影響に関する臨床検討	
第1節 背景.....	5
第2節 対象と方法.....	6
第3節 結果.....	8
第4節 考察.....	9
第5節 小括.....	12
第3章 消化器外科術後合併症、特に呼吸器合併症の病態形成における High Mobility Group Box Chromosomal Protein-1(HMGB-1)の役割 に関する臨床検討	
第1節 背景.....	13
第2節 対象と方法.....	14
第3節 結果.....	17
第4節 考察.....	20
第5節 小括.....	23
第4章 放射線胸部照射に伴う急性肺障害の病態形成における炎症担当細胞、特に HMGB-1 の役割に関する検討	
第1節 背景.....	24
第2節 対象と方法.....	24
第3節 結果.....	29
第4節 考察.....	31
第5節 小括.....	35

第5章 食道癌組織における HMGB-1 の発現と化学放射線療法治療効果との関連に 関する検討	
第1節 背景	37
第2節 対象と方法	37
第3節 結果	39
第4節 考察	41
第5節 小括	42
第6章 総括	43
第7章 結論	45
謝辞	47
引用文献	48
図表	60

第 1 章 緒言

食道癌に対する 3 領域リンパ節郭清を伴う食道切除再建術は、消化器外科領域において侵襲が最も大きい手術の一つであり、術後合併症の発生率も高い。頻度の高い合併症として、呼吸器合併症、反回神経麻痺、縫合不全などが挙げられ¹⁻⁷⁾、特に呼吸器合併症はときに重篤化し、急性肺障害(ALI:acute lung injury)、急性呼吸窮迫症候群(ARDS :acute respiratory distress syndrome)の病態から多臓器不全へと発展し、食道癌術後在院死亡の一番の原因となる⁸⁾。

呼吸器合併症の原因として、手術操作が頸部から腹部まで広範に及ぶこと、開胸操作を伴い肺実質への影響が大きいこと、気管周囲のリンパ節郭清を行うため、術後咳嗽反射が低下すること等、手術に起因する要因が挙げられる。それに加えて、手術侵襲により様々な炎症性サイトカインが過剰に産生され、プロテアーゼや好中球エラスターゼなどの活性化が誘導されることが報告されてきた。当科においては、プロテアーゼ阻害剤を術前より用いることで食道癌術後合併症発生率を低下できることを報告し⁹⁾、合併症対策として術前よりプロテアーゼ阻害剤の投与を行ってきた。また、術直後より好中球エラスターゼ阻害剤を用いた症例では、用いなかった症例に比較し肺酸素化能がより早期に改善し、全身性炎症症候群(SIRS:systemic inflammatory response syndrome)合併期間や集中治療室(ICU:Intensive care unit)滞在時間を短縮させることを報告し、術後呼吸器合併症の対策として、好中球エラスターゼ阻害剤の投与を行ってきた¹⁰⁾。これらの薬剤による合併症対策についての報告に加え¹¹⁻¹³⁾、術前ステロイド投与によって炎症性サイトカインの産生が有意に抑制され、

SIRS 合併期間が短縮され、術後合併症が軽減したという報告もある¹⁴⁻¹⁶⁾。他方、最近では低侵襲手術として、食道癌に対する胸腔鏡下手術が 1992 年に Cuschieri らによって初めて報告以降、2006 年に Palanivelu らが腹臥位による胸腔鏡下食道切除術(VATS-E: Video-Assisted Thoracic Surgery for Esophagus)を報告¹⁷⁾、以来国内外で行われるようになった¹⁸⁻¹⁹⁾。当科においても 2010 年 4 月以降、VATS-E を導入して、通常の右開胸症例に比べ VATS-E 症例では、周術期炎症性サイトカインの産生が有意に抑制され、術後 SIRS 合併期間が短縮し呼吸器合併症発生率が低下したことよりその低侵襲性を報告してきた²⁰⁾。

しかしながら食道癌は比較的早期より周囲リンパ節への転移を来しやすく、進行症例が多いため、手術に放射線治療、化学療法を併用した集学的治療が不可欠である。本邦では、日本臨床腫瘍研究グループ(JCOG: Japan Clinical Oncology Group)の食道がんグループによる JCOG9907 試験の結果より、臨床病期(Stage) II/III 症例においては、術前化学療法(NAC) + 外科的切除が標準治療となり広く施行されている²¹⁾。また欧米においては術前化学放射線療法(NACRT)と外科的切除単独との Meta-analysis の結果にて術前化学放射線療法の有効性が示されたことより、NACRT が標準治療として行われている²²⁻²³⁾。このように食道癌に対しては術前治療が行われることが一般的であり、かつ進行症例が多い現状においては術前放射線治療が重要な役割を占めている。これらの術前治療施行例では術後の合併症が多いとの報告があるが²⁴⁻²⁶⁾、手術侵襲に対して様々な対策が取られているのに対して、術前治療が周術期の病態形成に与える影響については十分に解明されておらず、特に術

後合併症に対する予防策が十分に取られていない実情がある。また、術前治療が食道癌周術期における炎症性メディエーターの産生に対してどのような影響を及ぼしているのか、さらにはどのようなメディエーターが術後合併症発症に深く関与しているのか、これらの解明が課題として挙げられてきた。

High mobility group box chromosomal protein-1(HMGB-1)は転写調節の補助因子として機能する核内蛋白として知られている²⁷⁾。従来核内蛋白である HMGB-1 は炎症、あるいは細胞が壊死する際には核内の封印を解かれ細胞外へ放出され、糖化蛋白の受容体として認識されている **Receptor for advanced glycation endopproducts (RAGE)**や **Toll like receptor-4(TLR-4)**に作用して転写因子である **Nuclear factor-kappa B(NF-κB)**を活性化し、炎症性サイトカインとして機能することが明らかになった²⁸⁻²⁹⁾。また、HMGB-1 は腫瘍壊死因子-α(**TNF-α:Tumor Necrosis Factor-α**)やインターロイキン-1 (**IL-1:Interleukin-1**)などの従来の炎症性メディエーターと異なり、遅れて出現する遅発性のメディエーターとしての機能が報告されている。特に敗血症及びその動物モデルにおいて惹起される急性期肺障害の際に、肺局所での障害を顕著に反映するメディエーターであるとの報告が多数ある²⁹⁻³²⁾。消化器外科領域においては、**Suda** らが食道癌周術期患者において術前血中 HMGB-1 値が術後合併症の予測因子となると報告しているが³³⁾、食道癌周術期において HMGB-1 がどのような役割を担い、どのような臓器障害につながるのかは明らかになっていない。

そこで本研究では、食道癌における術前治療が周術期生体反応に及ぼす影響、特

に化学放射線療法施行症例における呼吸器合併症との関連について明らかにするとともに、急性肺障害への関与が報告されている HMGB-1 が食道癌周術期において果たす役割を解明し、呼吸器合併症の治療標的としての有用性について臨床検討を行った。また、術前治療の中でも、特に放射線療法は照射に伴い放射性肺臓炎を発症することが知られており、呼吸器合併症発症の誘因となり得る。そこで、放射線照射が急性期肺障害の病態に与える影響や、HMGB-1 の関与を明らかにすることを目的に動物実験にて検討を行った。

第2章 食道癌術前治療が周術期生体反応に与える影響に関する臨床検討

第1節 背景

食道癌は悪性度が高く、全体の約半数を占める Stage II・III 症例の5年生存率が 30～50%と予後不良な疾患である。最も根治度が高い治療法は外科的切除であるが、比較的早期からリンパ節転移を来しやすく、根治性を高めるために化学療法や放射線療法を組み合わせた集学的治療が必要である^{34・35)}。

消化器外科領域において特に食道癌に対する根治手術は、侵襲が大きいため、手術直接死亡率が高い³⁶⁾。食道癌の手術直接死亡割合は全国食道癌登録調査報告では2.8%であり、通常の胃切除術、結腸切除術等の待機手術が1%未満であるのに対して依然として高値である。特に呼吸器合併症の発生が高率であり、重症化した呼吸器合併症の術後管理に苦慮することが多々ある^{37・42)}。

本邦では、日本臨床腫瘍研究グループ(JCOG)食道がんグループによる JCOG9907 試験の結果より Stage II/III 症例では、術前化学療法(NAC)＋外科的切除が標準治療となり広く施行されている²¹⁾。また欧米においては術前化学放射線療法(NACRT)と外科的切除単独との Meta-analysis の結果にて術前化学放射線療法の有意性が示されたことより、NACRT がみなし標準治療として行われている^{22・23)}。本邦においては周囲臓器への浸潤が疑われる T4、Stage IVa 症例においては、根治的 化学放射線療法(CRT)が標準治療となっているが、JCOG9907 の結果が報告される以前には T4 が疑われる症例に対しては、局所コントロール目的にて NACRT が施行

されてきた。

このように食道癌に対しては術前治療が行われることが一般的であり、かつ進行症例が多い現状においては術前治療が重要な役割を占めている。その一方で、NACRT 症例においては術後の合併症増加等を指摘する論文も散見される²⁴⁻²⁶⁾。しかし、術前治療が周術期の生体反応に及ぼす影響については、十分に評価されていないのが現状である。

そこで本章では、食道癌術前治療が周術期生体反応、術後合併症に及ぼす影響を明らかにすることを目的に、当科において食道癌に対して根治手術を施行した症例を対象に **retrospective** に検討を行った。

第 2 節 対象と方法

対象

2006 年～2011 年までの間防衛医科大学校外科において食道癌に対する根治手術を施行した症例のうち、胸部操作は開胸にて施行、胃管再建術を施行した 99 例を対象に、術前治療なし群(SA 群)、術前放射線化学療法施行群(NACRT 群)、術前化学療法施行群(NAC 群)の 3 群間で比較検討を行った。

方法

術前(Pre)、術直後(Post)、第 1 病日(POD1、post operative day 1: POD1)、POD3、POD5、POD7 にそれぞれ SIRS 診断基準項目、CRP について評価を行った。SIRS 診断項目は、体温<36℃ or >38℃、心拍数>90 回/分、呼吸数>20 回/分

(or $\text{PaO}_2 < 32 \text{ mmHg}$)、白血球 $> 12,000 / \mu\text{l}$ or $< 4,000 / \mu\text{l}$ のうち2項目以上を満たす場合に SIRS と診断した⁴³⁾。さらに術後合併症、術後 SIRS 合併期間、術後在院日数、ICU 滞在時間につき、3 群間で比較検討した。また、術後合併症のなかでも呼吸器合併症、特に術後人工呼吸器管理を要した重症呼吸器合併症に着目して検討を行った。呼吸器合併症、重症呼吸器合併症の定義については、後述する。臓器障害の指標として周術期の血清 BUN、Cr (腎機能)、AST、ALT (肝機能) および、 $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ (P/F: 肺酸素化能) を測定した。

術前化学療法 (NAC) のプロトコールとしては、フルオロウラシル (5-FU) $800\text{mg}/\text{m}^2$ (第 1 日・第 5 日)・シスプラチン (cis-diamminedichloro-platinum: CDDP) $\cdot 80\text{mg}/\text{m}^2$ (第 1 日) を 28 日/1 コースで 2 コース施行した。また術前化学放射線療法 (NACRT) のプロトコールは、放射線 30Gy-40Gy/15-20 回に加え、化学療法は 5-FU $\cdot 700\text{mg}/\text{m}^2$ (第 1 日・第 4 日) CDDP $\cdot 70\text{mg}/\text{m}^2$ (第 1 日) を同様に 28 日/1 コースで 2 コース施行した。手術は術前治療終了後平均 28 ± 5 日で施行した。

呼吸器合併症の定義

呼吸器合併症については、肺炎、ALI、ARDS、膿胸、乳び胸と定義した⁴⁴⁾。肺炎については、胸部 X 線あるいは胸部 CT にて新たな浸潤影を認め、 38.5°C 以上の発熱を伴っており、喀痰培養において細菌感染があり白血球数が $< 4000 / \mu\text{l}$ もしくは $12,000 / \mu\text{l}$ 以上の症例とした。ALI、ARDS については、American-European Consensus Conference on ARDS criteria により、ALI は $\text{P}/\text{F} < 300$ 、ARDS は

P/F<200、胸部X線により両側の浸潤影を伴い、臨床的に左心不全が否定されている症例とした⁴⁵⁾。人工呼吸器管理の適応については、American Thoracic Society (ATS)のAcute Respiratory Failureの基準に準じて決定した⁴⁶⁾。

統計学的解析

得られたデータは平均値±標準誤差で示した。解析はStat View 5.0 statistical software package (Abacus Concepts, Berkeley, CA)を用いて行った。2群間の比較には、Studentのt検定と χ^2 乗検定を用いた。経時的な変化については、分散分析にて検定を行った。2群間の相関については、Pearsonの相関係数を用いて検討した。いずれも $P<0.05$ をもって有意差ありとした。

第3節 結果

臨床病理学的背景因子

99症例の内訳はNACRT群30例、NAC群33例、SA群33例、であった。年齢、性別、腹部操作(開腹/腹腔鏡補助下)において3群間で有意差は認めなかった。病理学的因子においては、深達度(T)、リンパ節転移(N)、StageともにNAC群・NACRT群ではSA群に比べ進行症例が有意に多く、リンパ節郭清についても3領域郭清の割合が高かった(Table.1)。

術中・術後背景因子

手術時間、出血量、ICU 滞在時間において 3 群間で差はなかったが、術後合併症発生率を比較すると、NACRT 群・NAC 群が有意に高値であり、特に術後呼吸器合併症に対して人工呼吸器管理を要した重症呼吸器合併症の割合が、NACRT 群・NAC 群で有意に高率であった。また、周術期 SIRS 合併期間、術後在院日数が NACRT 群で有意に長かった (Table.2)。

SIRS 診断基準項目・CRP 値の比較

周術期 SIRS 診断基準項目の推移につき 3 群間で比較すると、術前から POD3 にかけて NACRT 群で有意に白血球数が低値であった。また NACRT 群、NAC 群で術直後から POD5 にかけて心拍数が有意に高値であった。また NACRT 群で POD7 の CRP 値が有意に高値であった (Table3.)。

周術期臓器障害の比較

周術期臓器障害につき比較すると、腎機能については、BUN、Cr ともに、NAC 群が他の 2 群に比較し有意に高値で経過した (Fig.1a)。肝機能については、AST、ALT ともに特に 3 群間での差はなかった (Fig.1b)。周術期肺酸素化能 (P/F) については、POD5、POD7 において NACRT 群が他の 2 群より低値であった (Fig.1c)。

第 4 節 考察

今回の検討は、Retrospective な検討であるため、3 群間の深達度、リンパ節転移、

Stage やリンパ節郭清領域に有意差を認めた。特に NAC、NACRT 症例では従来より進行症例が多いことより、得られた結果に食道癌の進行度が影響を与えた可能性は十分あり得る。しかし、その中での検討において、NAC、NACRT 施行症例では術後人工呼吸器管理を要した重症呼吸器合併症の発生率が有意に高かった。特に NACRT 症例で術後肺酸素化能の低下や術後 SIRS 合併期間、入院期間の有意な延長を認めた。また NAC 症例は周術期腎機能が他の 2 群に比較し有意に低下していた。

当科においては、Tsujiimoto らが以前行った進行食道癌手術症例に対する NACRT の影響に関する検討でも、術後 SIRS 合併期間が長く NACRT が周術期に与える影響は大きいため、その対策が重要であると報告している⁴⁰⁾。今回の検討においては NAC 施行群、NACRT 施行群は SA 群に比較して人工呼吸器管理を要する重症呼吸器合併症発生率は有意に高値であった。これまで、NACRT 療法を行っても合併症の発生率に差はないとのランダム化比較試験(RCT: Randomized controlled trial)の報告もある^{47・48)}。しかし、このような RCT と今回の検討は、対象年齢、Performance status(PS)、術前併存疾患などが異なる。また進行度についても、JCOG0907 試験を例に挙げると対象症例が、Stage II 症例は T2,T3 N0 または T1,T2 N1、Stage III 症例は T3 N1 の症例に限定されている。対して当科での NAC 症例は、N2 以上のより進行した症例が半数を占めており、RCT の結果が、実際の臨床現場の状況に全て該当するとは言い難いと思われる。

NACRT 後の手術では、呼吸器合併症が発生しやすい原因の一つとして、放射線

照射による気管・気管支の虚血が考えられる。これに伴い、術後の呼吸器合併症や気管気管支の瘻孔形成が高率となり呼吸器合併症の重症化を来す原因となっている⁴⁹⁾。そのため、手術操作においては、気道周辺の慎重な切離に加え気管支動脈の温存が気管・気管支の虚血対策に有効とされる⁵⁰⁾。しかし、放射線照射により、腫瘍周囲組織の繊維化、瘢痕化により出血及び手術時間の延長を来しやすく、手術操作により気管支動脈の損傷を来すことも多々ある。また、再建臓器に使用する胃の近位側や頸部食道において、照射に起因する血流低下によって、SA 群や NAC 群に比較して縫合不全や胃管潰瘍・胃管壊死を起こしやすい原因となっている。本研究においても、NACRT 群では術後 SIRS 合併期間が有意に延長し、術後肺酸素化能の低下、呼吸器合併症の重症化を認めた。本研究では術後人工呼吸器管理を要した重症呼吸器合併症の割合は、NACRT 群、NAC 群で同じであったが、NAC 群においては周術期肺酸素化能の有意な低下を認めておらず、人工呼吸器管理からの離脱が早いことより、SIRS 合併期間・入院期間は延長しなかったと考えられる。NAC 群では、周術期の腎機能の有意な低下を認めた。これは、腎機能障害を来しやすいシスプラチンの投与量(1 クール当り総投与量:NAC80mg/m²,NACRT70mg/m²)の違いが原因の一つだと考えられる。

本研究では照射線量が 30-40Gy の NACRT 症例のみを対象に検討を行ったが、50-60Gy を照射する根治 CRT 治療後遺残・再発癌に対してサルベージ(Salvage)手術を施行する症例も多い。しかし照射線量が増える CRT 後の Salvage 手術については、在院死亡割合 10%と通常の食道癌手術在院死亡割合 5.4%を大きく上回るも

のであり、また呼吸器合併症、縫合不全などが通常の手術よりも高いとの報告が多く⁵¹⁻⁵³⁾、NACRT 症例以上に合併症に対する対処が必要であると考えられる。

食道癌治療において今後も手術に化学療法、放射線療法を組み合わせた集学的治療が不可欠であるが、特に術前放射線治療は術後呼吸器合併症の **High risk** 症例であり、術前から重症化予測が可能なバイオマーカーの探索及び呼吸器合併症に対する予防対策が重要であろう。

第 5 節 小括

食道癌術前化学放射線療法の施行は、①周術期肺酸素化能の低下、②SIRS 合併期間の延長、③術後人工呼吸器管理を要する重症呼吸器合併症率の高さと関連した。

第 3 章 消化器外科周術期の病態形成における High Mobility Group Box Chromosomal Protein-1(HMGB-1)の役割に関する臨床検討

第1節 背景

手術に代表される外科侵襲の病態においては、侵襲局所においてマクロファージ、好中球、血管内皮細胞、繊維芽細胞などの炎症担当細胞が活性化され、TNF- α 、IL-1 などの炎症性サイトカインが産生される⁵⁴⁾。侵襲が過剰になるとこれらのサイトカインは autocrine、paracrine 作用による反応を繰り返して自己の情報を増幅し、増幅された信号が更なるサイトカインの産生を促し、結果的に全身に情報を伝達する。その際の生体反応として臨床的に SIRS と呼ばれる状態となり、しいては臓器不全を来す⁵⁵⁾。

HMGB-1 は転写調節の補助因子として機能する核内蛋白として知られているが²⁷⁾、炎症等の刺激により細胞が壊死する際に核内から細胞外へ放出された HMGB-1 は、RAGE あるいは TLR-4 に作用して NF- κ B を活性化し、炎症性サイトカインとして機能することが明らかになった²⁸⁻²⁹⁾。1999 年 Wang らが mouse の敗血症モデルで血中 HMGB-1 が高値となること、また HMGB-1 の中和抗体を用いることで病態が改善することが報告されている²⁸⁾。さらに、HMGB-1 は、TNF- α や IL-1 などの従来の炎症性メディエーターと異なり遅れて出現する遅発性のメディエーターとしての機能、急性肺障害の重症度のマーカーや治療標的としての有用性なども報告されている²⁹⁻³²⁾。

そこで本章では、消化器外科周術期における血清 HMGB-1 測定の臨床的意義を

明らかにすることを目的に、消化器手術症例の周術期における血清HMGB-1 濃度の推移を測定し、周術期SIRS との関連や合併症に伴う臓器障害との関連につき比較検討を行った。

検討は2回行い、検討1の対象患者は消化器外科待機手術症例として、検討2の対象患者を食道癌根治手術症例に限定した。

第2節 対象と方法

対象

(検討 1)

2002 年から 2005 年の間に防衛医科大学校病院外科に入院し、消化器癌に対して根治手術を施行した症例のうち、研究のために採血検体を用いることに同意を得られた 28 症例を対象に検討を行った。

(検討 2)

2009 年から 2011 年までの間、当科にて食道癌に対して胸部食道切除・胃管再建術を施行した 60 例を対象とした。これらの症例を、術後人工呼吸器管理を要した重症呼吸器合併症例 16 例と非合併症例 44 例に分け、2 群間で比較・検討を行った。

本研究は防衛医医科大学校倫理委員会の承認(承認番号 739)を受け、実施した。

方法

周術期評価項目

周術期炎症反応のマーカーとして、術前(Pre)、術直後(Post)、第 1 病日 (postoperative day 1:POD1)、POD3、POD5、POD7 のそれぞれの時期に HMGB-1 を測定した。また、SIRS 診断基準項目、CRP 値の推移について検討を行った。SIRS 診断項目は、第 2 章と同様の基準を用いて診断した。臓器障害の指標として周術期の血清 AST、ALT、BUN、Cr、肺酸素化能 ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) を測定した。

呼吸器合併症の定義

呼吸器合併症の定義、及び人工呼吸器管理の適応については、第 2 章と同様に行った。

末梢血の採取と血清分離・HMGB-1 濃度測定

術前(Pre)、POD1、POD3、POD5、POD7 に血清分離用採血管に 2-5ml 全血を採取した。血液検体を 500g、5 分間遠心分離して血清を採取し、 -80°C で凍結保存した。血清中の HMGB-1 濃度は enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法を用いて、測定を行った (Central Institute, Shino-Test Corporation, Kanagawa, Japan)。

放射線療法ならびに化学療法の治療効果の病理組織学的判定規準

(CT/CRT-grade; chemotherapy/chemoradiotherapy-grade)

術前治療に伴う原発巣の病理組織学的治療効果判定については、食道癌取扱い規約(第 10 版)の基準において下記のように判定を行った。

Grade 0 無効

癌組織・癌細胞に治療効果を認めない。

Grade 1 やや有効

増殖し得ると判断される程度の癌細胞が組織切片で癌の 1/3 以上

Grade 1a ごく軽度の効果

増殖し得ると判断される癌細胞が 2/3 以上

Grade 1b 軽度の効果

増殖し得ると判断される癌細胞が 1/3 以上で 2/3 未満

Grade 2 かなり有効

増殖し得ると判断される癌細胞が 1/3 未満

Grade 3 著効

増殖し得ると判断される癌細胞が全くみられない

統計学的解析

得られたデータは平均値±標準誤差で示した。解析は Stat View 5.0 statistical software package (Abacus Concepts, Berkeley, CA)を用いて行った。2 群間の比較には、Student の t 検定と χ^2 乗検定を用いた。また、経時的な変化については、

分散分析 (2-way repeated ANOVA) にて検定を行った。2 群間の相関については、Pearson の相関係数を用いて検討した。単変量・多変量解析については COX の比例ハザードモデルを用いて検討した。いずれも $P<0.05$ をもって有意差ありとした。

第3節 結果

(検討 1)

患者背景

全 28 症例のうち男性 22 例、女性 6 例、平均年齢は 62 ± 3 歳であった。術式別の内訳は、食道癌 6 例、胃癌 5 例、肝癌 5 例、結腸・直腸癌 12 例であった (Table4)。

血清 HMGB-1 濃度の推移

周術期の HMGB-1 濃度は、術後から POD3 まで上昇し、その後低下する傾向を認めた。POD1、POD3、POD5 の HMGB-1 濃度は術前に比較すると有意に高値であり、POD5、POD7 の HMGB-1 濃度は POD3 と比較すると有意に低値であった (Table5)。尚、この検討での術前 HMGB-1 濃度は正常範囲内であった。

血清 HMGB-1 濃度と SIRS 合併期間との相関

POD3 及び POD5 の血清 HMGB-1 濃度と SIRS 合併期間の間に正の相関を認めた。しかし、術前血清 HMGB-1 濃度と SIRS 合併期間の間に相関は認めなかった (Fig.2)。

血清 HMGB-1 濃度と SIRS 診断基準項目との相関

血清 HMGB-1 濃度と SIRS 診断基準項目との相関について検討を行った。

POD3 の血清 HMGB-1 濃度と POD3、POD5 の心拍数との間に正の相関を認めた ($R=0.51$, $P<0.01$, $R=0.56$, $P<0.01$: Fig. 3a)。また、POD5 の血清 HMGB-1 濃度と POD5、POD7 の心拍数との間に正の相関を認めた ($R=0.59$, $P<0.01$, $R=0.64$, $P<0.01$: Fig. 3b)。しかし、その他の SIRS 診断基準項目 (呼吸数、体温、白血球数) において有意な相関は認めなかった。

血清 HMGB-1 濃度と臓器障害との相関

血清 HMGB-1 濃度と各種臓器障害との関連につき検討を行った。腎機能、肝機能と血清 HMGB-1 濃度との間に有意な相関は認めなかったが、POD3 の HMGB-1 濃度と POD3 の $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ との間に負の相関を認めた ($R=-0.56$, $P<0.01$: Fig. 4)。

(検討 2)

患者背景因子

全 60 例のうち重症呼吸器合併症 (合併症群) は 16 例 (26.6%)、非合併症 (非合併症群) は 44 例 (73.4%) であった。術前臨床病理学的背景因子を 2 群間で比較検討すると、年齢、性別、術前呼吸機能、CT/CRT-grade を含む病理学的因子に 2 群間で有意差は認めなかったが、術前治療群で重症呼吸器合併症群の割合が高い傾向であった ($P=0.05$) (Table 6)。

術中因子について2群間で比較すると、合併症群では有意に胸腔内吻合が多く、3領域郭清の症例が多かった($P<0.005$)。また、合併症群で有意に手術時間が長く、術中出血量も多かった($P<0.05$) (Table7)。

術後因子について比較すると、合併症群では術後 SIRS 合併期間、術後在院日数が有意に長く、在院死亡率も有意に高かった($P<0.005$) (Table8)

食道癌周術期における SIRS 診断規準項目の推移

SIRS 診断基準項目の推移を2群間で比較すると、合併症群で心拍数、呼吸数が有意に高値で経過した($P<0.05$, repeated ANOVA) (Fig.5)

食道癌周術期における肺酸素化能(P/F)の推移

合併症群では POD1 以降 P/F 値が低値で経過し、POD3 において有意に低値であった($P<0.05$) (Fig.6)。

食道癌周術期における血清中 HMGB-1 濃度の推移

血清中 HMGB-1 値は2群ともに第5病日まで漸増し、合併症群で術前において有意に高値であった($P<0.05$) (Table9)。

血清中 HMGB-1 濃度と臓器障害との相関

血清 HMGB-1 値と各種臓器要害との相関について検討すると、術前血清

HMGB-1 値と POD3 の P/F 値との間に負の相関を認めた($r=-0.485$, $P<0.005$) (Fig.7a)。腎機能・肝機能との間に有意な相関は認めなかった (Fig.7b, 7c)。

術前血清中 HMGB-1 濃度に関する単変量・多変量解析

術前血清中 HMGB-1 濃度に影響を与える因子を単変量・多変量解析にて検討したところ、年齢(>70 歳; HR:1.353 $P<0.05$)、CT/CRT-grade(0/1a; HR:1.451 $P<0.05$)が独立した因子として選択された (Table10)。

第3 病日肺酸素化能 (P/F) に関する単変量・多変量解析

合併症群において肺酸素化能が有意に低値であった POD3 の P/F 値に影響を与える因子を単変量・多変量解析にて検討すると、術前治療(あり; HR:3.127 $P<0.01$)、術前血清 HMGB-1 値(>3.0 ng/ml; HR:3.136 $P<0.01$)がそれぞれ独立した因子として選択された (Table11)。

第4節 考察

消化器外科手術症例を対象とした検討1では、周術期において血清中 HMGB-1 は POD3 をピークに上昇を認め、ピーク値の POD3 の HMGB-1 は術後 SIRS 合併期間や SIRS 診断基準項目(心拍数)、肺酸素化能と相関を認めた。また、食道癌手術症例を対象とした検討 2 では、周術期において重症呼吸器合併症群では術前血清 HMGB-1 値が非合併症群に比較し有意に高値であった。また術前血清 HMGB-1 値

は POD3 の肺酸素化能と有意に負の相関を認め、この肺酸素化能に影響を与える因子としては、多変量解析の結果、術前治療有り、術前 HMGB-1 濃度が有意な因子として抽出された。さらに、術前の血中 HMGB-1 濃度に影響を与える因子に関する多変量解析の結果、年齢が 70 歳以上の症例や、術前治療による効果が少ない症例 (CT/CRT- grade:0/1a) ほど高値であった。

1999 年 Wang らがマウス敗血症モデルにおいて血中 HMGB-1 値が上昇し、中和抗体を用いることで病態が改善することを報告して以来²⁸⁾、敗血症^{56・57)}のみならず出血性ショック⁵⁸⁾、急性肺傷害⁵⁹⁾、心筋障害^{60・61)}、虚血再灌流障害などの急性炎症^{62・63)}、慢性関節リウマチや動脈硬化などの慢性炎症⁶⁴⁾、悪性腫瘍の増殖や浸潤、転移等⁶⁵⁾様々な病態における HMGB-1 発現亢進の報告がある。しかし、消化器外科待機手術症例あるいは、食道癌根治手術周術期における報告はほとんどない。Suda らが、食道癌周術期患者において術前血中 HMGB-1 値が術後合併症の予測因子となると報告しているが³³⁾、周術期において HMGB-1 がどのような役割を担い、どのような臓器障害につながるのかは明らかになっていない。本研究においては、HMGB-1 は周術期腎機能、肝機能とは相関を認めなかったが、検討 1 では POD3 の血中 HMGB-1 値と POD3 の肺酸素化能が、検討 2 においては、術前血中 HMGB-1 値が POD3 の肺酸素化能とそれぞれ負の相関を認め、術後の肺障害への関与が示唆された。以上のことより術前 HMGB-1 は食道癌術後重症呼吸器合併症の予測因子となる可能性が考えられた。Bitto らは、肺局所における HMGB-1 の発現が肺障害患者の予後不良因子であると報告しており⁶⁶⁾、HMGB-1 発現は侵襲下での肺障害に

おける重要なマーカーであると思われる。

検討 2 において、術前 HMGB-1 値は、術前治療施行症例において、治療効果が低い症例 (CT/CRT-grade: 0/1a) においてより高値であった。このことより、血中 HMGB-1 が術前治療の反応性に関与することが示唆された。健常成人の血中 HMGB-1 値が 2.36 ± 0.28 (ng/ml) であるのに対して、本研究における食道癌根治手術施行症例での血中 HMGB-1 値は、 4.03 ± 0.48 (ng/ml) と高値であった。つまり食道癌においては、その他の上皮性腫瘍同様⁶⁷⁻⁶⁸⁾、担癌状態によって血中 HMGB-1 が高発現している可能性が考えられる。HMGB-1 は術前治療により necrosis をおこした細胞や、活性化されたマクロファージや樹状細胞より分泌されることが知られている²⁸⁻²⁹⁾。また、HMGB-1 はその受容体である RAGE に結合し、細胞内シグナルである NF- κ B を活性化し、炎症反応を惹起するが⁶⁷⁾、Izzo らは、食道癌患者の腫瘍組織における活性化 NF- κ B の発現が術前化学放射線療法の治療効果と相関しており、治療により誘導される活性化 NF- κ B の発現が多いほど術前治療の効果が低く、予後も不良であると報告している⁶⁹⁾。したがって、術前の血中 HMGB-1 値は腫瘍組織内の HMGB-1、特に術前治療の反応性に影響されるものと考えられた。

また、術前 HMGB-1 値は、70 歳以上の患者においてより高値であった。Zhou らは LPS 投与後の血中 HMGB-1 値は若年マウスより老齢マウスにおいてより高値であったと報告している⁷⁰⁾。Enokido らは老齢マウスの脳での HMGB-1 発現が若年マウスより亢進していたことより、HMGB-1 と年齢とに関係があると報告している⁷¹⁾。また高齢者では年齢に伴う臓器機能の低下により、特に腎機能が低下する症例が多く、

HMGB-1 のクリアランス低下が術前 HMGB-1 値に反映された可能性があるが、詳しい検討は今後の研究の課題としたい。

本章では、POD5 までの血清中 HMGB-1 の推移を検討した。十分な症例数が得られず、有意差は認めなかったが、POD7 での採血検体が得られた症例で比較すると、POD7 の血清 HMGB-1 濃度は非合併症群では 7.0 ± 2.3 ng/ml であったのに対して、重症呼吸器合併症群が、 15.0 ± 4.9 ng/ml と高値であり、重症呼吸器合併症群では周術期後期においても血清 HMGB-1 が高値になるものと推察された。HMGB-1 は通常のサイトカインと比較し術後後期になって上昇する傾向があり、今後さらに長期間での推移を検討する必要性が示唆された。

本研究の結果から、消化器外科手術周術期、特に侵襲が大きく呼吸器合併症が重症化しやすい食道癌根治手術周術期において、術前血中 HMGB-1 高値症例は術後の重症呼吸器合併症発症の予測因子となるとともに、術前治療効果に影響されることが示された。

第 5 節 小括

消化器外科手術周術期、食道癌根治手術周術期において血中 HMGB-1 は術後肺酸素化能の低下や呼吸器合併症の重症化と関連しており、周術期における肺障害の重要なマーカーの一つであると示唆された。

また、術前血中 HMGB-1 値には、術前治療への抵抗性の関与が示唆された。

第4章 放射線胸部照射に伴う急性肺障害の病態形成における炎症担当細胞、特に

HMGB-1 の役割に関する検討

第1節 背景

これまでの臨床検討により、食道癌における術前化学放射線療法施行症例では術後呼吸器合併症の発生率が高く、また術前血清中 HMGB-1 値が術後重症呼吸器合併症予測因子であることが示唆された。

放射線照射に伴い照射後数カ月で発症する放射線肺臓炎およびそれに引き続く肺線維症は時に重篤となる。このような肺臓炎の病態に至ることは稀ではあるが、照射後呼吸器合併症が多いことより、放射線照射に伴い肺障害を来しやすい病態が急性期に生じているものと推察される。

そこで本章では、動物を用いて放射線全胸郭照射モデルを作成、照射後の肺組織における変化、特に HMGB-1 の関与に着目し、照射後急性肺障害の病態形成における炎症担当細胞の役割を明らかにすることを目的に検討を行った。

第2節 対象と方法

動物

C57BL/6 (8 週齢、 20 ± 2 g)雄性マウス (Japan SLC Inc. Hamamatsu, Japan) を用いた。本研究は防衛医科大学校動物倫理委員会の承認を受け (承認番号 11075)、ガイドラインに基づいて実施した。

モデルの作成とサンプリング

(1)検討 1

ペントバルビタール腹腔内投与による全身麻酔下にマウスを専用の固定具に固定、10mm 鉛板にて頭頸部及び腹部を被覆した後、X 線照射装置 (HITACHI MBR-1505R2, Tokyo, Japan)を用いて 0.5 Gy/分、150 kV、5 mA にて 8 Gy の全胸郭照射を施行、その後 2 週間自由摂食にて飼育した。

2 週間後にペントバルビタール腹腔内投与による全身麻酔下に開腹し、下大静脈 (IVC)より全血を採取、500 g、10 分の遠心により血清を分離し解析までの間-80 °C にて保管した。続いて経気管支的に 20-gauge の elastic チューブを挿入、リン酸緩衝食塩水 (PBS:Phosphate Buffered Saline)1.0 ml を 2 回注入・回収し肺胞洗浄液 (BALF :Bronchoalveolar lavage fluid)を採取した。採取後 500 g、2 分遠心の後、上清を回収し-80 °C にて保管した。続いて肺組織を採取、10 %ホルマリンにて固定後 5 µm の薄切を作成、Hematoxylin-Eosin 染色及び E-Selectin、HMGB-1 の免疫染色を施行した。また、一部の肺組織を液体窒素にて凍結の後-80 °C で保管した。マウスは各群 10 匹ずつを用いた。

(2)検討 2

検討 1 同様、放射線照射後 2 週間経過したマウスに LPS (*Escherichia coli* O111:B4; Sigma, St. Louis, Mo)を 50 µg/200 µl にて尾静脈より静注、1、3、6、24 時間後にそれぞれ ペントバルビタール腹腔内投与による全身麻酔下に検討 1 同様、

血清、BALF、肺組織を採取し保管した。

検討 1、検討 2 とともに、放射線照射を施行して 2 週間経過したマウス(Radiation 群)と、放射線照射を施行せず 2 週間経過したマウス(Control 群)の 2 群間でそれぞれ比較検討を行った。マウスは各群・各時間 10 匹ずつを用いた。

(3) 検討 3

検討 2 同様、放射線照射後 2 週間経過したマウスに LPS 50 µg/200 µl にて尾静脈より静注、6 時間後にそれぞれ ペントバルビタール腹腔内投与による全身麻酔下に血漿、BALF を採取し肺血管透過性を測定した。尚、この検討においては、放射線照射 2 週間経過したマウスに LPS を静注、その後 30 分後に抗 HMGB-1 ポリクローナル抗体 (Central Institute, Shino-Test Corporation, Kanagawa, Japan) を 2mg/kg/mouse にて腹腔内投与したマウス(Radiation+Ab 群)の 3 群間でそれぞれ検討を行った。マウスは各群 10 匹ずつを用いた。

Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

血清及び BALF 中のサイトカイン濃度は、TNF-α(BD Biosciences, San Diego, CA)、Macrophage Inflammatory Protein-2(MIP-2)(R&D, Boston, MA)、HMGB-1 (Central Institute, Shino-Test Corporation, Kanagawa, Japan)を用いて ELISA 法にて測定を行った。

組織学的検討

肺組織については、ヘマトキシリン・エオジン染色 (H-E 染色) 及び免疫組織学的染色による検討を行った。免疫組織学的染色は、まず 10%ホルマリン固定後パラフィン切片を 4 μ m に薄切、キシレンで脱パラフィン後、エタノール濃度を次第に漸減し親水処理を行った。さらにオートクレーブにて 120 $^{\circ}$ C, 15 分間の抗原賦活を施行後、3 % 過酸化水素を用いて内因性ペルオキシダーゼの抑制を行った。尚、非特異反応の抑制には 2 %ブタ血清を使用した。E-Selectin は抗 E-Selectin ポリクローナル抗体 (BioVision Research Products, CA, USA) を 1000 倍希釈にて、HMGB-1 は抗 HMGB-1 モノクローナル抗体 (GTX62170, GeneTex,) を 1000 倍希釈にて、一次抗体とし、4 $^{\circ}$ Cにて Over night にて反応させた。二次抗体は Envision system anti-mouse and rabbit (DakoCytomation) を使用し、室温 1 時間放置、0.1 %の diaminobenzidine (DAB) 溶液で 1 分間の発色の後、ヘマトキシリンで核染色を施行した。

肺単核球 (MNCs)・BALF 中 MNCs の分離及びフローサイトメトリーによる表面抗原の解析

放射線照射 2 週間後 Radiation 群及び Control 群より肺組織を採取した。肺組織を細切したのち 0.05 %collagenase-RPMI に trypsin inhibitor 10 μ l/mouse を加えたのち懸濁、37 $^{\circ}$ C、15 分温浴にて加温した。肺組織懸濁液をメッシュ上にてすりつぶした後 33% Percoll solution に溶解させた後 500 g で 20 分間遠心分離し、上

清に浮遊した肺細胞を除去、肺MNCsを含むペレットを採取した。得られたペレットは erythrocyte lysis solution (0.17mM NH₄Cl, 0.01mMEDTA, 0.1Mtris, pH7.3) で赤血球を溶解させ、さらに 10%fetal calf serum(FCS)RPMI 1640 medium で 2 回洗浄したのち得られたMNCsを、BALF については、500g で 2 分遠心後同様に 2 回洗浄し得られたペレットをそれぞれフローサイトメトリー解析に用いた。

肺MNCs 及びBALF 細胞の表面抗原をAnti-CD16/32(2.4G2,BD PharMingen, San Diego, CA)による pre-incubation により FC γ II/III receptor を blocking した後、モノクローナル抗体(monoclonal antibodies; mAbs)を用いて、FITC-conjugated anti-F4/80 mAb(eBioscience, San Diego, CA) 、PE-conjugated anti-CD68 mAb(FA-11, AbD Serotec, Oxford, UK)、APC-conjugated anti-CD11b mAb(eBioscience, San Diego, CA)による 3 色展開法で解析した。

肺組織における血管透過性の検討

血管透過性については、Sio らの方法にて測定した⁷²⁾。マウスを犠死させる 2 時間前に FITC 標識された albumin (Sigma-Aldrich, A9771)を 5 mg/kg にて尾静脈より静脈投与、ペントバルビタール腹腔内投与による全身麻酔下に IVC より採血し、全血を採取、続いて PBS1.0 ml にて 1 回注入・回収し BALF を採取した。全血については、500 g、10 分にて遠心し血清を分離、BALF については 500 g、2 分遠心後上清を回収した。

血清及び BALF 検体の FITC 濃度を蛍光プレートリーダー(excitation=494 nm,

emission=520 nm)にて測定、血清/BALF の比を肺血管透過性とした。

尚、Radiation 群と Control 群で、PBS もしくは LPS 投与 6 時間後における検体を採取、PBS 投与の Control 群の平均値を 1 として、他の 4 群の比を求めて 5 群間での比較検討を行った。

統計学的検討

得られたデータは平均値±標準偏差で示した。解析は Stat View 5.0 statistical software package (Abacus Concepts, Berkeley, CA)を用いて行った。2 群間の比較には、Student の *t* 検定を用いた。2 群間の相関については、Pearson の相関係数を用いて検討した。いずれも $P<0.05$ をもって有意差ありとした。

第 3 節 結果

(1) 検討 1

照射後白血球数及び白血球分画の経時的推移を測定したところ、照射 1 週間後をピークに白血球数、好中球数、リンパ球数が低下、その後 2 週間目に照射前の値に回復した(Fig.8)。したがって、臨床においては、術前治療後、白血球及び分画の回復を確認した後に手術を施行することを想定して、照射 2 週間後の検討を行うプロトコールとした。

放射線照射 2 週間後の血清サイトカイン産生能については、TNF- α 、MIP-2、HMGB-1 とともに Control 群、Radiation 群で有意差は認められなかった(Fig.9a)。し

かし、BALF 中サイトカイン値は TNF- α 、MIP-2 ともに Radiation 群が有意に高値であり(P<0.05)、HMGB-1 も有意差は認めないが、高い傾向を認めた(Fig.9b)。

肺組織での変化を H-E 染色にて比較すると、Radiation 群において、肺胞壁の肥厚、肺胞間質への炎症細胞の浸潤の所見を認めた(Fig.10)。また、E-Selectin 免疫染色では、Control 群では E-Selectin の発現は認めなかったが、Radiation 群では、肺の血管内皮細胞に E-Selectin の発現を認めた(Fig.11)。HMGB-1 免疫染色では、HMGB-1 は肺胞壁、気管支壁、血管内皮細胞、間質の炎症細胞の核に発現を認め、特に Radiation 群では肺胞間質に浸潤した炎症細胞における発現亢進が認められた(Fig.12)。

肺組織単核球及び BALF 中単核球の表面抗原の変化を見ると、肺組織、BALF 中ともに Radiation 群で F4/80(+)の細胞に占める CD11b(+)の細胞の割合が増加しており、特に BALF 中において顕著であった(Fig.13)。肺組織単核球、BALF ともに採取された細胞数に 2 群間で差は認めなかった。

(2) 検討 2

LPS 投与後経時的な血清中サイトカイン産生能の比較を行うと、TNF- α は投与 1 時間後に(P<0.05)、MIP-2 は 3 時間後、6 時間後に(P<0.05)、HMGB-1 は 3 時間後(P<0.05)、6 時間後(P<0.005)において Radiation 群が有意に高値であった(Fig.14)。

特に血清中 HMGB-1 発現の亢進が顕著であった LPS 投与 6 時間後における組

組織での変化を見ると、両群ともに肺組織全体に広がる肺胞壁の肥厚及び間質への炎症細胞の浸潤を認めたが、**Radiation** 群においてより顕著であった(**Fig.15**)。また **HMGB-1** の発現を免疫染色にて比較すると **Radiation** 群において、間質に浸潤した炎症細胞に一致して発現の亢進を認めた(**Fig.16**)

(3)検討 3

PBS投与及び **LPS** 投与 6 時間後の肺血管透過性を比較すると、**LPS** 投与 6 時間後においては、**Control** 群に比較し **Radiation** 群で有意な血管透過性の亢進を認めた。また、**HMGB-1** に対する中和抗体を投与すると有意に血管透過性の亢進が抑制された(**Fig.17**)。

第4節 考察

食道癌治療において放射線照射は重要な役割を担う。食道癌においては、縦郭及び鎖骨上・頸部リンパ節への照射が主となるが、正常な肺への放射線照射はある程度避けられず、合併症として照射後数カ月で発症する放射線肺臓炎およびそれに引き続く肺線維症は時に重篤化しかつ致死的となり得ることより、治療を行う上での線量制限因子となっている⁷³⁻⁷⁴⁾。通常術前化学放射線療法あるいは根治的照射において放射線肺臓炎・肺線維症を発症することは稀であるが、術後呼吸器合併症発生率が高値であることより、放射線照射による何らかの影響を受けている可能性が示唆される。

放射線照射による急性肺障害の発生機序に関してはいまだ不明な点が多いが、早

期に見られる病理学的変化に、肺胞隔壁及び肺胞内へのマクロファージ、リンパ球や好中球などの炎症細胞浸潤が見られること⁷⁵⁾、肺胞洗浄液(BALF)中の細胞組成においてリンパ球や好中球の割合が著明に増加すること等よりいわゆる炎症反応の関与があると考えられている⁷⁶⁾。Rubeらは12Gyの全胸郭照射施行後 mouse の肺組織における炎症性サイトカインの mRNA を経時的に測定したところ、TNF- α 、IL-1 α 、IL-6 が二峰性に上昇することを報告している⁷⁷⁾。

放射線肺障害に関する実験的検討では、その障害は 2-8Gy の一回照射線量では発現しにくい、10Gy 以上の一回照射線量では発現しやすいと報告されており⁷⁸⁻⁸⁰⁾、通常の検討では、10-12Gy での報告が多い。本研究は、放射線肺臓炎モデルでの検討ではなく、放射線照射後に手術を行うことを想定した実験系であるため、放射線照射自体の障害は軽度であるが、その後非致死量の LPS を投与する second attack モデルでの生体反応及び病態の解析を目的とした。食道癌における根治照射での線量が 50-60Gy であるのに対して、術前照射は 30-40Gy が一般的である。そこで臨床における食道癌の術前照射を念頭に、従来の実験モデルにおける線量の 75%dose である 8Gy での検討を行った。

本研究においても、照射 1 週間後をピークに白血球数、好中球数、リンパ球数が低下、その後 2 週間目に照射前の値に回復した。これは、照射に伴う骨髄抑制が約 2 週間で回復したと考えられることより、second attack については、照射 2 週間後に行うプロトコルを設定した。

通常肺障害の病態は、侵襲により肺胞マクロファージから TNF- α や IL-1 が産生さ

れる。これらの炎症細胞は肺血管内皮細胞を刺激し表面に **E-Selectin** を発現する。血流に乗って肺の微小血管に運ばれてきた白血球はセレクトリンリガンドを発現し、**E-selectin** と結合、**rolling** を引き起こす。また、炎症により発現したケモカインにより白血球が活性化されると細胞表面でインテグリンの活性化がおこり、血管内皮表面に発現したインテグリンリガンドである **ICAM-1/LFA-1** および **VCAM-1/VLA-4** 経路を介して内皮細胞と白血球が強固に接着し(**sticking**)、白血球が血管内皮間隙を通り局所の組織内へ浸潤していく(**transmigration**)。この病態における放射線照射の影響を検討するため、まず照射 2 週間後における炎症性サイトカインの推移、炎症性サイトカインを産生する肺胞マクロファージの機能変化、血管内皮障害を引き起こす血管内皮細胞の中でも、最も早期に発現する **E-selectin** の発現、また、既存の炎症性サイトカインのみではなく、臨床検討における関与が示唆された **HMGB-1** の関与に着目し、検討を行った。

まず、照射 2 週間後においては、血中サイトカイン産生では照射の有無における差は認めなかったが、BALF 中蛋白濃度、**TNF- α** 、**MIP-2** の産生は有意に亢進しており、**HMGB-1** についても有意差はないが亢進の傾向を認めた。

照射 2 週間後の肺組織においては一部の肺胞隔壁の肥厚及び肺胞隔壁、肺胞内への炎症細胞の浸潤が認められた。また、これらの炎症細胞に一致して免疫染色により **HMGB-1** の発現も認めており、照射に伴う肺局所での **HMGB-1** 発現の亢進が確認できた。これは、肺障害モデルにおいては全身反応より局所の反応がより顕著に生じたとする **Ueno** らの報告に矛盾しない³²⁾。

また、BALF 中及び肺組織中単核球系細胞での表面抗原の変化をみると、特に BALF 中において F4/80 陽性細胞に占める CD11b(+)細胞の割合が増加していた。通常単核球系細胞の代表であるマクロファージは貪食能と TNF- α に代表される炎症性サイトカイン産生能を併せ持つ。Kinoshita らは、肝臓におけるマクロファージである Kupffer 細胞においては、CD68(+)細胞は主に貪食能が、CD11b(+)細胞は TNF- α 産生能がそれぞれ高いことを報告している⁸¹⁾。肺組織・BALF 中においても同様に、放射線照射後単核球系細胞の表面抗原が CD11b(+)細胞優位となりよりサイトカインを産生しやすい状況になっていると言える。この際肺局所に浸潤する炎症細胞は従来より肺組織に存在したものではなく、骨髓由来であることが mouse に GFP 標識細胞を骨髓移植したモデルにおいて報告されており⁸²⁾、肺組織単核球あるいは肺泡マクロファージ中に発現する CD11b(+)細胞についても、骨髓由来の細胞であると推察される。一方、CD68(+)細胞については、放射線照射に対して抵抗性を持つことが報告されており⁸³⁾、本研究においても BALF/肺組織単核球系細胞中の CD68(+) $\cdot$ F4/80(+)細胞については、照射前後において有意差はなかった。

LPS 投与による Second attack に伴う反応を見ると、血中 TNF- α 、MIP-2 及び HMGB-1 の産生亢進が認められており、特に HMGB-1 産生の亢進が顕著であった。肺組織においても LPS 投与 6 時間後では肺泡隔壁の著明な肥厚及び炎症細胞の顕著な浸潤を認め、HMGB-1 の発現亢進が局所でも確認できた。HMGB-1 は従来核内蛋白であり、肺組織においても、肺泡壁細胞、血管内皮細胞、気管支壁、好中球、マクロファージ等の炎症細胞での発現が認められる。これらの細胞が放射線あるいは

LPS 投与による刺激を受けることにより局所から血中に放出される。LPS 投与後血中における HMGB-1 産生能の亢進は、これら局所の細胞が放出したものと考えられる。過去の検討において、LPS の気管内投与によって惹起される ALI の病態において HMGB-1 値が上昇し、HMGB-1 を block することで病態の改善が見られたとの報告がある²⁹⁾。また、HMGB-1 は sepsis により惹起される肺傷害のメディエーターであるとの報告もある³⁰⁻³¹⁾。Ueno らは、敗血症性ショックが原因で ALI になった臨床症例、あるいは LPS 気管内投与による急性肺障害モデル mouse の肺胞洗浄液中の HMGB-1 濃度が血中に比較するとより顕著な上昇をしており、抗 HMGB-1 抗体投与により肺血管透過性亢進が抑制されたことから、HMGB-1 が肺局所での障害を顕著に反映するメディエーターであると報告している³²⁾。本研究においては、Radiation 群において有意な肺血管透過性亢進を認め、中和抗体の投与により血管透過性亢進が抑制された。血管内皮細胞障害による E-Selectin 発現亢進とともに、HMGB-1 が血管内皮を刺激し ICAM-1、VCAM-1 の発現を亢進するとの報告もあり⁸⁴⁻⁸⁵⁾、肺血管透過性亢進には、HMGB-1 の発現亢進も関与したものと考えられる。

以上のことより、HMGB-1 は、放射線照射に伴う急性肺障害の病態に大きく関与しており、今後これらの病態に対する治療標的になるものと考えられた。

第 5 節 小括

放射線全胸郭照射モデルを作製、照射に伴う肺障害の病態形成に関与する炎症細胞、特に肺胞マクロファージの働きと HMGB-1 の発現に着目し検討を行った。

本研究において照射後の肺障害の病態における、サイトカイン・ケモカインの産生亢進には肺単核球系細胞における表面抗原の変化が関与しているものと考えられた。これに伴い、照射後は特に肺局所における炎症反応の亢進を認めた。また、肺血管の透過性亢進を認めたが、これらの病態には、血管内皮細胞における **E-Selectin** の発現及び **HMGB-1** 発現の亢進が関与しているものと推察された。また、照射後 **LPS** 投与による **Second attack** において血中サイトカイン・ケモカイン産生亢進を認め、**LPS** に対する反応性の増大によるものだと推察された。

以上のような炎症細胞の関与により、照射後急性肺障害の病態が形成されたと考えられる。これらの病態の中で、**HMGB-1** は重要な働きを担っており、照射後急性肺障害の治療標的として今後検討する必要がある。

第 5 章 食道癌組織における HMGB-1 の発現と化学放射線療法治療効果との関連 に関する検討

第1節 背景

第 3 章で、消化器外科周術期、特に食道癌根治手術周術期における呼吸器合併症と血清中 HMGB-1 との関連が示された。また、多変量解析において術前 HMGB-1 濃度に影響を与える因子として、術前治療効果判定 (CT/CRT-grade) が選択され、CT/CRT-grade が 0/1a の症例は 1b 以上の症例に比較して術前 HMGB-1 値が有意に高値であった。これらの結果より、術前血中 HMGB-1 値が術前治療の影響を受けている可能性が考えられた。

そこで本章においては、食道癌前治療、特に化学放射線療法に着目し、治療前後における血清中 HMGB-1 値の推移と免疫組織学的染色による食道癌腫瘍組織での HMGB-1 の発現の推移より、食道癌組織における化学放射線療法と HMGB-1 との関連を明らかにすることを目的に検討を行った。

第 2 節 対象と方法

対象

2011 年から 2012 年までの間、当科にて食道癌に対して根治的化学放射線療法 (CRT) を施行した 10 例を対象とし、血清中及び内視鏡生検組織中 HMGB-1 の推移について検討した。本研究は防衛医科大学校倫理委員会の承認を受け実施した

(承認番号 739)。

方法

末梢血の採取と血清分離・HMGB-1 濃度測定

CRT 施行前、及び CRT 施行後に血清分離用採血管に 2-5ml 全血を採取した。血液検体を 500g、10 分間遠心分離して血清を採取し、-80℃で凍結保存した。血清中の HMGB-1 濃度は enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法を用いて、測定を行った (Central Institute, Shino-Test Corporation, Kanagawa, Japan)。

免疫組織学的検討

病理組織検体については、HMGB-1 による免疫組織学法による検討を行った。また、腫瘍組織での発現を確認するため、連続切片においてサイトケラチンの免疫組織学法による検討も行った。CRT 前・後に施行した内視鏡検査時の生検検体を 10%ホルマリン固定後パラフィン切片を 4μm に薄切、キシレンで脱パラフィン後、エタノール濃度を次第に漸減し親水処理を行った。オートクレーブにて 120℃15 分間の抗原賦活を施行後、3%過酸化水素を用いて内因性ペルオキシダーゼの抑制を行った。非特異反応の抑制には 2%ブタ血清を使用した。HMGB-1は抗 HMGB-1 モノクローナル抗体(GTX62170, GeneTex,)を 500 倍希釈にて、サイトケラチンは抗ヒトサイトケラチン・マウスモノクローナル抗体(MNF116, Dako Cytomation)を50倍希釈にてそれぞれ一次抗体とし、4℃にて Over night にて反応させた。二次抗体は Envision system anti-mouse and rabbit(Dako Cytomation)を使用し、室温 1 時間放置、

0.1%の diaminobenzidine(DAB)溶液で 5 分間の発色の後、ヘマトキシリンで核染色を施行した。

判定は、400 倍視野にて食道腫瘍部分及び非腫瘍部分の 1 視野あたりの HMGB-1 陽性細胞を計 3 視野にて計測、3 視野の平均値を測定値と規定した。

統計学的検討

得られたデータは平均値±標準誤差で示した。解析は Stat View 5.0 statistical software package (Abacus Concepts, Berkeley, CA)を用いて行った。2 群間の比較には、Student の *t* 検定を用いた。2 群間の相関については、Pearson の相関係数を用いて検討した。いずれも $P<0.05$ をもって有意差ありとした。

第3節 結果

患者背景

CRT 施行症例の詳細を Table.12 に示した。平均年齢は 72 ± 3 歳、10 例すべて男性であった。照射線量の平均値は 58.2Gy であった(50-60Gy)。10 例中 3 例に遺残腫瘍に対する Salvage 手術が施行された(Table.12)。

CRT 施行前後における血清 HMGB-1 値の推移

血清 HMGB-1 値は CRT 前 6.08 ± 1.9 ng/ml に対して CRT 後 3.13 ± 1.7 ng/ml と減少していたが、有意差は認めなかった。10 例のうち、Response Evaluation

Critical in Solid Tumor(RECIST)分類にて完全奏功(Complete Response:CR)もしくは部分奏功(Partial Response:PR)と診断された 8 例と、安定(Stable Disease:SD)もしくは進行(Progressive Disease:PD)と診断された 2 例に分けて検討すると、CR/PR 症例では治療後に血中 HMGB-1 値の低下を認めたが、SD/PD 症例では上昇、もしくは不変の状態であった (Fig.18)。尚、健常成人における HMGB-1 値は 2.36 ± 0.28 (ng/ml)であり、食道癌担癌患者に比較し有意に低値であった。

CRT 施行前後における食道癌組織中 HMGB-1 発現の推移

食道癌腫瘍組織に核内に HMGB-1 の陽性の細胞を認め、これらの細胞は連続切片の検討でサイトケラチンの発現を認めた (Fig.19)。食道癌腫瘍組織中における HMGB-1 陽性細胞は CRT 前 72.6 ± 3.8 個/400 倍視野に対して CRT 後は 25.1 ± 13.0 個/400 倍視野と有意に減少していた ($P < 0.05$)。CRT の治療効果別に検討すると、PR/CR 症例では HMGB-1 陽性細胞数の低下を認めたが、SD/PD 症例では不変もしくは上昇傾向を認めた (Fig.20a,20b)。

血清 HMGB-1 値と組織中 HMGB-1 値の相関

血清 HMGB-1 値と食道癌腫瘍組織中 HMGB-1 値の相関をみると、全体において正の相関の傾向を認めた ($R=0.476$, $P=0.053$)。これを CRT 施行前、施行後に分けて検討すると、CRT 前では相関は認めなかったが、CRT 後においては強い正の相関

を認め ($R=0.979$ 、 $P<0.001$)、治療効果の少ない症例 (SD/PD 症例) において血清 HMGB-1 が高値であった (Fig.21)。

第 4 節 考察

本章では、CRT による治療効果が得られた症例では、腫瘍縮小とともに血清・食道癌組織中 HMGB-1 は低下、対して、治療効果が低い症例では、血清・食道癌組織中 HMGB-1 は高値のまま推移し、CRT 後の血清 HMGB-1 値と食道癌組織中 HMGB-1 陽性細胞数は正の相関を認めた。

HMGB-1 の発現は様々な上皮性腫瘍で増加していることが報告されており、胃癌、結腸・直腸癌、肝細胞癌、乳癌、膵臓癌および悪性黒色腫等において正常組織に比較し高発現であり、HMGB-1 と受容体である RAGE との相互作用が腫瘍の転移においても大きく影響を与えると報告されている^{67-68,86)}。食道癌の Cell line における検討では HMGB-1 発現が化学放射線療法による予後に関連するとの報告があり⁸⁷⁾、ヒト頭頸部癌組織と扁平上皮癌細胞株の SCC7 において HMGB-1 および受容体である RAGE の発現が亢進しているとの報告がある⁸⁸⁾。これらの研究では、主に治療による壊死細胞、あるいは腫瘍周囲に浸潤した炎症細胞が HMGB-1 を放出する細胞とされている。しかし、腫瘍そのものが HMGB-1 を発現しているとの報告もある⁸⁹⁾。本研究においても、食道癌腫瘍組織の HMGB-1 染色では核に免疫活性を発現する細胞群を認めたが、これらは連続切片で上皮細胞マーカーであるサイトケラチン陽性であり食道癌細胞と考えられた。また、CRT 後の血清中 HMGB-1 と食道癌腫瘍組織中

HMGB-1 値が相関を認めたことより、食道癌腫瘍細胞が HMGB-1 放出細胞である可能性が示唆された。

第 3 章において、我々は術前血清 HMGB-1 値が術前治療効果に関連することを示した。本研究においても、CRT による治療効果が認められた症例 (PR/CR 症例) では、血清中・食道癌組織中における HMGB-1 の発現の低下が認められた。また、CRT 後については血清中と食道癌組織中 HMGB-1 に正の相関を認めており、CRT 後食道癌患者において血清 HMGB-1 値が食道癌腫瘍組織における CRT 治療効果を反映していることが明らかとなった。

第 3 章の検討では、術前治療効果が低い症例 (CT/CRT-grade:0/1a) で、血清 HMGB-1 値が高値であり、術前血清 HMGB-1 高値症例が術後重症呼吸器合併症に関与していることを示した。本章においても、症例数は少ないが治療効果が低い症例では食道癌組織中・血清 HMGB-1 が高値であることが示された。本章は、根治的 CRT 施行症例で検討したため、術後重症呼吸器合併症との関連については明らかにされていない。今後は、手術施行症例における組織中・血清 HMGB-1 発現と重症呼吸器合併症の関連について更なる検討が必要である。

第 5 節 小括

食道癌腫瘍組織中および血清 HMGB-1 の発現の推移と化学放射線療法による治療効果に関連を認めた。

第6章 総括

食道癌に対する術前治療、特に術前化学放射線療法が周術期生体反応及び呼吸器合併症の病態に与える影響について、HMGB-1 に着目し臨床的、実験的に検討した。

1. 食道癌術前化学放射線療法は、周術期肺酸素化能の低下、SIRS 合併期間に影響を与え、術後人工呼吸器管理を要する重症呼吸器合併症率が高かった。したがって、食道癌術前治療症例の周術期生体反応を理解し、その病態解明と合併症予防対策が必要であると示唆された。
2. 消化器外科手術周術期、食道癌根治手術周術期において血中 HMGB-1 は術後肺酸素化能の低下や呼吸器合併症の重症化と関連しており、周術期における肺障害の重要なマーカーの一つであると示唆された。また、術前血中 HMGB-1 値は術前治療後の抵抗性が関与することが示唆された。
3. 照射後の肺障害の病態においては、サイトカイン・ケモカインの産生亢進には肺単核球系細胞における表面抗原の変化が関与しているものと考えられた。また、肺血管の透過性亢進を認めたが、これらの病態には、血管内皮細胞における E-Selectin の発現及び HMGB-1 発現の亢進が関与しているものと推察された。照射後 LPS 投与による Second attack において血中サイトカイン・ケモカイン産生亢進を認め、LPS に対する反応性の増大によるものだと推察された。以上のような炎症細胞の関与により、照射後急性肺障害の病態が形成されたと考えられ、これらの病態の中で、HMGB-1 は重要な働きを担っており、照射後急性肺障害の治療標的となり得ることが示唆され

た。

4. 食道癌腫瘍組織中および血中 HMGB-1 の発現の推移と化学放射線療法による治療効果に関連を認めた。

第7章 結論

食道癌に対して、術前化学放射線療法を施行した症例では呼吸器合併症の割合が有意に高く、術後 **SIRS** 合併期間が有意に延長していた。食道癌周術期血中 **HMGB-1** の推移を検討したところ、肺酸素化能が術前治療および術前 **HMGB-1** と負の相関を認めた。また、術前血清中 **HMGB-1** 値は術前治療の治療効果と相関があった。以上のことより、食道癌周術期において血中 **HMGB-1** は重症呼吸器合併症の予測因子となり、その発現が術前治療の影響を受けていることが示唆された。

術前放射線照射と術後呼吸器合併症との関連を明らかにするために、動物実験で検討を行ったところ、肺において照射後組織中での **HMGB-1** 発現が亢進、**Second attack** モデルでの検討では、**LPS** 投与後 6 時間後に血中 **HMGB-1** 濃度が有意に高値であった。以上のことより **HMGB-1** が照射後肺障害における重要なマーカーであることが示唆された。

また食道癌における化学放射線療法と **HMGB-1** との関連を検討するため、食道癌腫瘍組織における **HMGB-1** 発現と血清中 **HMGB-1** について治療前後での検討を行った。治療効果が得られた症例では、腫瘍組織中及び血中 **HMGB-1** 発現の低下を認めた。しかし、治療効果の得られなかった症例では、発現の低下が認められず、**HMGB-1** が食道癌における治療効果に大きく関与している可能性が窺えた。

以上のことより **HMGB-1** は、重症呼吸器合併症の発症に深く関与しているマーカーであるとともに、術前治療効果を反映する重要な因子であることが示唆された。重症呼吸器合併症の **High risk** 症例は、術前血中 **HMGB-1** 高値、あるいは組織中

HMGB-1 高発現症例であり、術前化学放射線療法を施行された症例においては、抗 HMGB-1 療法が重症呼吸器合併症に対する治療戦略となり得る可能性が示唆された。

謝辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました防衛医科大学校外科学講座の長谷和生教授に深甚なる感謝の意を表します。また、長きに渡り終始直接御指導、御教示を頂きました防衛医科大学校研究センター外傷研究部門の小野聡准教授、防衛医科大学校外科学講座辻本広紀講師、防衛医科大学校免疫微生物講座の木下学准教授に深く感謝致します。御校閲を賜りました防衛医科大学校内科学講座の穂苅量太教授、防衛医科大学校分子生体学講座の守本祐司准教授に感謝致します。また、防衛医科大学校研究センター外傷研究部門の齋藤大蔵教授をはじめ、御協力を頂きました防衛医科大学校研究センター外傷研究部門ならびに教室の皆様、放射線治療に御尽力を賜りました防衛医科大学校放射線科ならびに教室の皆様に心より感謝致します。

本研究の主旨は、第 110-112 回日本外科学会定期学術集会、第 65-68 回日本消化器外科学会総会、第 23-25 回日本外科感染症学会、第 66 回 食道学会、第 27 回 Shock 学会総会、第 19 回外科侵襲とサイトカイン研究会等において発表した。

引用文献

1. Baba M, Aikou T, Yoshinaka H, Natsugoe S, Fukumoto T, Shimazu H, et al. Long-term results of subtotal esophagectomy with three-field lymphadenectomy for carcinoma of the thoracic esophagus. *Ann Surg.* 1994;219(3):310-6.
2. Fujita H, Kakegawa T, Yamana H, Shima I, Toh Y, Tomita Y, et al. Mortality and morbidity rates, postoperative course, quality of life, and prognosis after extended radical lymphadenectomy for esophageal cancer. Comparison of three-field lymphadenectomy with two-field lymphadenectomy. *Ann Surg.* 1995;222(5):654-62.
3. Udagawa H, Akiyama H. Surgical treatment of esophageal cancer: Tokyo experience of the three-field technique. *Dis Esophagus.* 2001;14(2):110-4.
4. Altorki N, Kent M, Ferrara C, Port J. Three-field lymph node dissection for squamous cell and adenocarcinoma of the esophagus. *Ann Surg.* 2002;236(2):177-83.
5. Tachibana M, Kinugasa S, Yoshimura H, Shibakita M, Tonomoto Y, Dhar DK, et al. Clinical outcomes of extended esophagectomy with three-field lymph node dissection for esophageal squamous cell carcinoma. *Am J Surg.* 2005;189(1):98-109.
6. Ferahkose Z, Anadol AZ, Gokbayir H, Dursun A, Ozturk E. Three-field lymph node dissection in the treatment of thoracic esophageal carcinoma: the Turkish experience. *Dis Esophagus.* 2006;19(4):232-7.
7. Nakamura M, Iwahashi M, Nakamori M, Ishida K, Naka T, Iida T, et al. An analysis of the factors contributing to a reduction in the incidence of pulmonary complications following an esophagectomy for esophageal cancer.

Langenbecks Arch Surg. 2008;393(2):127-33.

8. Popping DM, Elia N, Marret E, Remy C, Tramer MR. Protective effects of epidural analgesia on pulmonary complications after abdominal and thoracic surgery: a meta-analysis. Arch Surg. 2008;143(10):990-9; discussion 1000.

9. Ono S, Aosasa S, Mochizuki H. Effects of a protease inhibitor on reduction of surgical stress in esophagectomy. Am J Surg. 1999;177(1):78-82.

10. Ono S, Tsujimoto H, Hiraki S, Takahata R, Kimura A, Kinoshita M, et al. Effects of neutrophil elastase inhibitor on progression of acute lung injury following esophagectomy. World J Surg. 2007;31(10):1996-2001.

11. Sato N, Endo S, Kimura Y, Ikeda K, Aoki K, Iwaya T, et al. Influence of a human protease inhibitor on surgical stress induced immunosuppression. Dig Surg. 2002;19(4):300-5.

12. Suda K, Kitagawa Y, Ozawa S, Miyasho T, Okamoto M, Saikawa Y, et al. Neutrophil elastase inhibitor improves postoperative clinical courses after thoracic esophagectomy. Dis Esophagus. 2007;20(6):478-86.

13. Sato A, Kuwabara Y, Shinoda N, Kimura M, Ishiguro H, Fujii Y. Use of low dose dopamine, gabexate mesilate and ulinastatin reduces the water balance and pulmonary complication in thoracic esophagectomy patients. Dis Esophagus. 2005;18(3):151-4.

14. Sato N, Koeda K, Ikeda K, Kimura Y, Aoki K, Iwaya T, et al. Randomized study of the benefits of preoperative corticosteroid administration on the postoperative morbidity and cytokine response in patients undergoing surgery for esophageal cancer. Ann Surg. 2002;236(2):184-90.

15. Takeda S, Takeda S, Kim C, Ikezaki H, Nakanishi K, Sakamoto A, et

- al. Preoperative administration of methylprednisolone attenuates cytokine-induced respiratory failure after esophageal resection. *J Nippon Med Sch.* 2003;70(1):16-20.
16. Yano M, Taniguchi M, Tsujinaka T, Fujiwara Y, Yasuda T, Shiozaki H, et al. Is preoperative methylprednisolone beneficial for patients undergoing esophagectomy? *Hepatogastroenterology.* 2005;52(62):481-5.
17. Palanivelu C, Prakash A, Senthilkumar R, Senthilnathan P, Parthasarathi R, Rajan PS, et al. Minimally invasive esophagectomy: thoracoscopic mobilization of the esophagus and mediastinal lymphadenectomy in prone position--experience of 130 patients. *J Am Coll Surg.* 2006;203(1):7-16.
18. 能城 浩, 岩崎 寛, 中村 勝, 内山 明. 【マスターしておきたい標準的内視鏡外科手術】 胸部食道癌に対する腹臥位鏡視下食道切除術. 外科治療. 2009;100(増刊):474-81.
19. 磯垣 淳, 河村 祐, 春田 周, 吉村 文, 稲葉 一, 篠原 寿, et al. 【ここまできた食道疾患の内視鏡下治療・外科手術】 内視鏡外科手術 食道癌に対する左半腹臥位食道切除術. 外科治療. 2009;100(6):783-9.
20. Tsujimoto H, Takahata R, Nomura S, Yaguchi Y, Kumano I, Matsumoto Y, et al. Video-assisted thoracoscopic surgery for esophageal cancer attenuates postoperative systemic responses and pulmonary complications. *Surgery.* 2012;151(5):667-73.
21. Ando N, Kato H, Igaki H, Shinoda M, Ozawa S, Shimizu H, et al. A randomized trial comparing postoperative adjuvant chemotherapy with cisplatin and 5-fluorouracil versus preoperative chemotherapy for localized advanced squamous cell carcinoma of the thoracic esophagus (JCOG9907). *Ann Surg Oncol.* 2012;19(1):68-74.

22. Urschel JD, Vasan H. A meta-analysis of randomized controlled trials that compared neoadjuvant chemoradiation and surgery to surgery alone for resectable esophageal cancer. *Am J Surg.* 2003;185(6):538-43.
23. Sjoquist KM, Burmeister BH, Smithers BM, Zalcberg JR, Simes RJ, Barbour A, et al. Survival after neoadjuvant chemotherapy or chemoradiotherapy for resectable oesophageal carcinoma: an updated meta-analysis. *Lancet Oncol.* 2011;12(7):681-92.
24. Reynolds JV, Ravi N, Hollywood D, Kennedy MJ, Rowley S, Ryan A, et al. Neoadjuvant chemoradiation may increase the risk of respiratory complications and sepsis after transthoracic esophagectomy. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2006;132(3):549-55.
25. Boyle MJ, Franceschi D, Robinson DS, Livingstone AS. Neoadjuvant therapy for esophageal cancer: standard of care or elusive myth? *Am Surg.* 2001;67(10):956-65.
26. Kelley ST, Coppola D, Karl RC. Neoadjuvant chemoradiotherapy is not associated with a higher complication rate vs. surgery alone in patients undergoing esophagectomy. *J Gastrointest Surg.* 2004;8(3):227-31; discussion 31-2.
27. Bustin M. Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high mobility-group chromosomal proteins. *Mol Cell Biol.* 1999;19:5237-46.
28. Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science.* 1999;285(5425):248-51.
29. Abraham E, Arcaroli J, Carmody A, Wang H, Tracey KJ. HMG-1 as a mediator of acute lung inflammation. *J Immunol.* 2000;165(6):2950-4.

30. van Zoelen MA, Ishizaka A, Wolthuis EK, Choi G, van der Poll T, Schultz MJ. Pulmonary levels of high-mobility group box 1 during mechanical ventilation and ventilator-associated pneumonia. *Shock*. 2008;29(4):441-5.
31. Parrish W, Ulloa L. High-mobility group box-1 isoforms as potential therapeutic targets in sepsis. *Methods Mol Biol*. 2007;361:145-62.
32. Ueno H, Matsuda T, Hashimoto S, Amaya F, Kitamura Y, Tanaka M, et al. Contributions of high mobility group box protein in experimental and clinical acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170(12):1310-6.
33. Suda K, Kitagawa Y, Ozawa S, Saikawa Y, Ueda M, Abraham E, et al. Serum concentrations of high-mobility group box chromosomal protein 1 before and after exposure to the surgical stress of thoracic esophagectomy: a predictor of clinical course after surgery? *Dis Esophagus*. 2006;19(1):5-9.
34. Saeki H, Morita M, Nakashima Y, Sonoda H, Hashimoto K, Egashira A, et al. Neoadjuvant chemoradiotherapy for clinical stage II-III esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*. 2011;31(9):3073-7.
35. Fujiwara Y, Yoshikawa R, Kamikonya N, Nakayama T, Kitani K, Tsujie M, et al. Trimodality therapy of esophagectomy plus neoadjuvant chemoradiotherapy improves the survival of clinical stage II/III esophageal squamous cell carcinoma patients. *Oncol Rep*. 2012;28(2):446-52.
36. Haga Y, Beppu T, Doi K, Nozawa F, Mugita N, Ikei S, et al. Systemic inflammatory response syndrome and organ dysfunction following gastrointestinal surgery. *Crit Care Med*. 1997;25(12):1994-2000.
37. Law SY, Fok M, Wong J. Risk analysis in resection of squamous cell carcinoma of the esophagus. *World J Surg*. 1994;18(3):339-46.
38. Nagawa H, Kobori O, Muto T. Prediction of pulmonary complications

after transthoracic oesophagectomy. *Br J Surg.* 1994;81(6):860-2.

39. Simone M, Mutter D, Rubino F, Dutson E, Roy C, Soler L, et al. Three-dimensional virtual cholangioscopy: a reliable tool for the diagnosis of common bile duct stones. *Ann Surg.* 2004;240(1):82-8.

40. Tsujimoto H, Ono S, Chochi K, Sugasawa H, Ichikura T, Mochizuki H. Preoperative chemoradiotherapy for esophageal cancer enhances the postoperative systemic inflammatory response. *Jpn J Clin Oncol.* 2006;36(10):632-7.

41. Tsutsui S, Moriguchi S, Morita M, Kuwano H, Matsuda H, Mori M, et al. Multivariate analysis of postoperative complications after esophageal resection. *Ann Thorac Surg.* 1992;53(6):1052-6.

42. Whooley BP, Law S, Murthy SC, Alexandrou A, Wong J. Analysis of reduced death and complication rates after esophageal resection. *Ann Surg.* 2001;233(3):338-44.

43. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med.* 1992;20(6):864-74.

44. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. *Am Rev Respir Dis.* 1989;139(4):1058-9.

45. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, et al. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994;149(3 Pt 1):818-24.

46. Confalonieri M, Potena A, Carbone G, Porta RD, Tolley EA, Umberto Meduri G. Acute respiratory failure in patients with severe

community-acquired pneumonia. A prospective randomized evaluation of noninvasive ventilation. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160(5 Pt 1):1585-91.

47. Lee JL, Park SI, Kim SB, Jung HY, Lee GH, Kim JH, et al. A single institutional phase III trial of preoperative chemotherapy with hyperfractionation radiotherapy plus surgery versus surgery alone for resectable esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Oncol.* 2004;15(6):947-54.

48. Natsugoe S, Okumura H, Matsumoto M, Uchikado Y, Setoyama T, Yokomakura N, et al. Randomized controlled study on preoperative chemoradiotherapy followed by surgery versus surgery alone for esophageal squamous cell cancer in a single institution. *Dis Esophagus.* 2006;19(6):468-72.

49. Ellerman JE, Brown CK, de Vera M, Zeh HJ, Billiar T, Rubartelli A, et al. Masquerader: high mobility group box-1 and cancer. *Clin Cancer Res.* 2007;13(10):2836-48.

50. Fujita H, Hawahara H, Yamana H, Shirohazu G, Yoshimura Y, Minami T, et al. Mediastinal lymphnode dissection procedure during esophageal cancer operation--carefully considered for preserving respiratory function. *Jpn J Surg.* 1988;18(1):31-4.

51. Nakamura T, Hayashi K, Ota M, Eguchi R, Ide H, Takasaki K, et al. Salvage esophagectomy after definitive chemotherapy and radiotherapy for advanced esophageal cancer. *Am J Surg.* 2004;188(3):261-6.

52. Tachimori Y, Kanamori N, Uemura N, Hokamura N, Igaki H, Kato H. Salvage esophagectomy after high-dose chemoradiotherapy for esophageal squamous cell carcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2009;137(1):49-54.

53. Takeuchi H, Saikawa Y, Oyama T, Ozawa S, Suda K, Wada N, et al. Factors influencing the long-term survival in patients with esophageal cancer who underwent esophagectomy after chemoradiotherapy. *World J Surg.* 2010;34(2):277-84.
54. Aosasa S, Ono S, Mochizuki H, Tsujimoto H, Osada S, Takayama E, et al. Activation of monocytes and endothelial cells depends on the severity of surgical stress. *World J Surg.* 2000;24:10-6.
55. Bone R. Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: what we do and do not know about cytokine regulation. *Crit Care Med* 1996;24:163-72.
56. Hatada T, Wada H, Nobori T, Okabayashi K, Maruyama K, Abe Y, et al. Plasma concentrations and importance of High Mobility Group Box protein in the prognosis of organ failure in patients with disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost.* 2005;94(5):975-9.
57. Kosai K, Seki M, Yanagihara K, Nakamura S, Kurihara S, Izumikawa K, et al. Elevated levels of high mobility group box chromosomal protein-1 (HMGB-1) in sera from patients with severe bacterial pneumonia coinfecting with influenza virus. *Scand J Infect Dis.* 2008;40(4):338-42.
58. Kim JY, Park JS, Strassheim D, Douglas I, Diaz del Valle F, Asehnoune K, et al. HMGB1 contributes to the development of acute lung injury after hemorrhage. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005;288(5):L958-65.
59. Abe S, Hayashi H, Seo Y, Matsuda K, Kamio K, Saito Y, et al. Reduction in serum high mobility group box-1 level by polymyxin B-immobilized fiber column in patients with idiopathic pulmonary fibrosis with acute exacerbation. *Blood Purif.* 2011;32(4):310-6.

60. Yamashita A, Nishihira K, Matsuura Y, Ito T, Kawahara K, Hatakeyama K, et al. Paucity of CD34-positive cells and increased expression of high-mobility group box 1 in coronary thrombus with type 2 diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 2012;224(2):511-4.
61. Wang Q, Cheng Y, Xue FS, Yuan YJ, Xiong J, Li RP, et al. Postconditioning with vagal stimulation attenuates local and systemic inflammatory responses to myocardial ischemia reperfusion injury in rats. *Inflamm Res*. 2012;61(11):1273-82.
62. Ni B, Liu Y, Zhenyu C. Glycyrrhizin protects spinal cord and reduces inflammation in spinal cord ischemia-reperfusion injury. *Int J Neurosci*. 2013.
63. Zhang YX, Zhang JR, Wang ZG. Mycophenolate mofetil affects monocyte Toll-like receptor 4 signaling during mouse renal ischemia/reperfusion injury. *Chin Med J (Engl)*. 2013;126(7):1224-9.
64. Andersson U, Erlandsson-Harris H. HMGB1 is a potent trigger of arthritis. *J Intern Med*. 2004;255(3):344-50.
65. Arumugam T, Ramachandran V, Gomez SB, Schmidt AM, Logsdon CD. S100P-derived RAGE antagonistic peptide reduces tumor growth and metastasis. *Clin Cancer Res*. 2012;18(16):4356-64.
66. Bitto A, Barone M, David A, Polito F, Familiari D, Monaco F, et al. High mobility group box-1 expression correlates with poor outcome in lung injury patients. *Pharmacol Res*. 2010;61(2):116-20.
67. Riuzzi F, Sorci G, Donato R. The amphoterin (HMGB1)/receptor for advanced glycation end products (RAGE) pair modulates myoblast proliferation, apoptosis, adhesiveness, migration, and invasiveness. Functional inactivation of RAGE in L6 myoblasts results in tumor formation

in vivo. *J Biol Chem*. 2006;281(12):8242-53.

68. Akaike H, Kono K, Sugai H, Takahashi A, Mimura K, Kawaguchi Y, et al. Expression of high mobility group box chromosomal protein-1 (HMGB-1) in gastric cancer. *Anticancer Res*. 2007;27(1A):449-57.

69. Izzo JG, Wu X, Wu TT, Huang P, Lee JS, Liao Z, et al. Therapy-induced expression of NF-kappaB portends poor prognosis in patients with localized esophageal cancer undergoing preoperative chemoradiation. *Dis Esophagus*. 2009;22(2):127-32.

70. Zhou M, Wu R, Dong W, Leong J, Wang P. Accelerated apoptosis contributes to aging-related hyperinflammation in endotoxemia. *Int J Mol Med*. 2010;25(6):929-35.

71. Enokido Y, Yoshitake A, Ito H, Okazawa H. Age-dependent change of HMGB1 and DNA double-strand break accumulation in mouse brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;376(1):128-33.

72. Sio SW, Puthia MK, Lu J, Mochhala S, Bhatia M. The neuropeptide substance P is a critical mediator of burn-induced acute lung injury. *J Immunol*. 2008;180(12):8333-41.

73. McDonald S, Rubin P, Phillips TL, Marks LB. Injury to the lung from cancer therapy: clinical syndromes, measurable endpoints, and potential scoring systems. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1995;31(5):1187-203.

74. Morgan GW, Breit SN. Radiation and the lung: a reevaluation of the mechanisms mediating pulmonary injury. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1995;31(2):361-9.

75. Travis EL. The sequence of histological changes in mouse lungs after single doses of x-rays. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1980;6(3):345-7.

76. Roberts CM, Foulcher E, Zaunders JJ, Bryant DH, Freund J, Cairns

D, et al. Radiation pneumonitis: a possible lymphocyte-mediated hypersensitivity reaction. *Ann Intern Med.* 1993;118(9):696-700.

77. Rube CE, Uthe D, Wilfert F, Ludwig D, Yang K, Konig J, et al. The bronchiolar epithelium as a prominent source of pro-inflammatory cytokines after lung irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005;61(5):1482-92.

78. Chen L, Brizel DM, Rabbani ZN, Samulski TV, Farrell CL, Larrier N, et al. The protective effect of recombinant human keratinocyte growth factor on radiation-induced pulmonary toxicity in rats. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004;60(5):1520-9.

79. Khan MA, Hill RP, Van Dyk J. Partial volume rat lung irradiation: an evaluation of early DNA damage. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1998;40(2):467-76.

80. Gross NJ. Pulmonary effects of radiation therapy. *Ann Intern Med.* 1977;86(1):81-92.

81. Kinoshita M, Uchida T, Sato A, Nakashima M, Nakashima H, Shono S, et al. Characterization of two F4/80-positive Kupffer cell subsets by their function and phenotype in mice. *J Hepatol.* 2010;53(5):903-10.

82. Ahn GO, Tseng D, Liao CH, Dorie MJ, Czechowicz A, Brown JM. Inhibition of Mac-1 (CD11b/CD18) enhances tumor response to radiation by reducing myeloid cell recruitment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(18):8363-8.

83. Chiang CS, Fu SY, Wang SC, Yu CF, Chen FH, Lin CM, et al. Irradiation promotes an m2 macrophage phenotype in tumor hypoxia. *Front Oncol.* 2012;2:89.

84. Fiuza C, Bustin M, Talwar S, Tropea M, Gerstenberger E, Shelhamer JH, et al. Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human

microvascular endothelial cells. *Blood*. 2003;101(7):2652-60.

85. Bae JS, Rezaie AR. Activated protein C inhibits high mobility group box 1 signaling in endothelial cells. *Blood*. 2011;118(14):3952-9.

86. Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(4):331-42.

87. Suzuki Y, Mimura K, Yoshimoto Y, Watanabe M, Ohkubo Y, Izawa S, et al. Immunogenic tumor cell death induced by chemoradiotherapy in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 2012;72(16):3967-76.

88. Choi J, Lee MK, Oh KH, Kim YS, Choi HY, Baek SK, et al. Interaction effect between the receptor for advanced glycation end products (RAGE) and high-mobility group box-1 (HMGB-1) for the migration of a squamous cell carcinoma cell line. *Tumori*. 2011;97(2):196-202.

89. Tang D, Kang R, Zeh HJ, 3rd, Lotze MT. High-mobility group box 1 and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1799(1-2):131-40.

Table1. 臨床病理学的患者背景

		NACRT(n=30)	NAC(n=36)	SA(n=33)	P-value
年齢	(歳)	65±8	66±9	69±9	0.1548 *
性別	男性	26(86.7)	34(94.5)	23(69.7)	0.0648 #
	女性	4(13.3)	2(5.5)	10(30.3)	
腹部操作	開腹	21(70.0)	22(61.1)	20(60.6)	0.6855 #
	腹腔鏡	9(30.0)	14(38.9)	13(39.4)	
深達度	T1	3(10.0)	2(5.6)	12(36.4)	0.0251 #
	T2	3(10.0)	4(11.1)	3(9.1)	
	T3	20(66.7)	27(75.0)	17(51.5)	
	T4	4(13.3)	3(8.3)	1(3.0)	
リンパ節転移	N0	11(36.7)	5(13.9)	19(57.6)	0.007 #
	N1	8(26.7)	11(30.6)	9(27.3)	
	N2	8(26.7)	9(25.0)	2(6.1)	
	N3	2(6.7)	8(22.2)	1(3.0)	
	N4	1(3.3)	3(8.3)	2(6.1)	
pStage	Stage I	1(3.3)	1(2.8)	10(30.3)	0.0009 #
	Stage II	12(40.0)	7(19.4)	12(36.4)	
	Stage III	10(33.3)	19(52.8)	8(24.2)	
	Stage IV	7(23.3)	9(25.0)	3(9.1)	
郭清領域	2 領域	5(16.7)	13(36.1)	21(63.6)	0.0006 #
	3 領域	25(83.3)	23(63.9)	12(36.4)	

Mean±SE *Student's t-test # χ^2 test

NACRT: Neoadjuvant chemoradiotherapy 術前化学放射線療法

NAC: Neoadjuvant chemotherapy 術前化学療法

SA: Surgery alone 手術単独

Table2. 患者背景②(術中・術後要因)

	NACRT(n=30)	NAC(n=36)	SA(n=33)	P-value
合併症(全体)	21/30(70.0)	21/36(58.3)	12/33(36.4)	0.0235 #
縫合不全	8/30(26.7)	4/36(11.1)	2/33(6.1)	0.0517 #
呼吸器合併症	16/30(53.3)	16/36(44.4)	8/33(24.2)	0.0522 #
重症呼吸器合併症	11/30(36.7)	13/36(36.1)	3/33(9.1)	0.0161 #
手術時間(分)	528.9±24.3	486.6±18.0	465.2±25.7	0.1486 *
出血量 (g)	846.4±90.4	874.4±112.7	769.4±115.7	0.7727 *
ICU 滞在時間(時間)	44.6±7.0	37.3±5.2	29.8±3.1	0.1520 *
術後入院日数 (日)	45.8±7.2	34.5±5.4	27.6±2.3	0.0494 *
SIRS 合併期間 (日)	4.3±0.4	2.7±0.4	3.5±0.5	0.032 *

Mean±SE *Student's t-test # χ^2 test

NACRT: Neoadjuvant chemoradiotherapy 術前化学放射線療法

NAC: Neoadjuvant chemotherapy 術前化学療法

SA: Surgery alone 手術単独

Table3. 食道癌周術期におけるSIRS診断基準項目・CRP値の推移

		Pre	Post	POD1	POD3	POD5	POD7
白血球数 (/μl)	NACRT	** †† 4730=394	6096=712	* 7746=500	* 8816=466	8066=535	9983=707
	NAC	6152=281	7216=569	9241=516	9627=748	9014=508	11016=645
	SA	6184=342	7781=550	9242=494	10209=533	9515=696	9787=651
体温 (°C)	NACRT	*36.5=0.1	38.0=0.1	38.2=0.1	37.8=0.1	37.6=0.2	37.4=0.2
	NAC	36.4=0.1	37.61=0.2	38.0=0.1	37.5=0.1	37.5=0.1	37.2=0.1
	SA	36.2=0.1	37.90=0.1	38.1=0.1	37.6=0.1	37.4=0.1	37.4=0.1
心拍数 (/分)	NACRT	78.0=3.6	†93.9=2.6	93.2=2.7	101.2=3.8	*104.9=3.2	98.9=3.0
	NAC	77.9=2.3	*90.7=2.4	*93.1=2.1	98.3=3.2	101.5=3.2	97.3=3.9
	SA	71.9=2.1	81.9=2.2	86.5=2.7	95.5=2.4	96.7=2.8	97.7=3.0
呼吸数 (/分)	NACRT	16.5=0.5	16.2=0.6	18.8=0.7	17.8=0.6	20.4=0.6	20.4=0.5
	NAC	15.6=0.4	*15.7=0.5	18.9=0.6	19.2=0.8	19.7=0.7	19.7=0.9
	SA	17.0=0.3	17.5=0.5	19.9=0.5	20.5=0.7	19.6=0.4	20.0=0.6
CRP (g/dl)	NACRT	0.92=0.19	1.75=0.52	10.56=0.61	15.16=1.21	10.53=1.34	*11.22=1.56
	NAC	1.18=0.30	1.44=0.23	10.95=0.71	17.56=1.18	11.34=1.15	10.12=1.03
	SA	0.95=0.20	1.25=0.27	10.00=0.74	15.27=1.20	8.51=1.06	7.53=1.12

NACRT: Neoadjuvant chemoradiotherapy Pre: Pre operation † P<0.001 vs SA ** P<0.005 vs NAC
NAC: Neoadjuvant chemotherapy Post: Immediately after operation †† P<0.01 vs SA # P<0.05 vs NAC
SA: Surgery alone POD: Post operative day * P<0.05 vs SA

Mean=SE Student's t-test

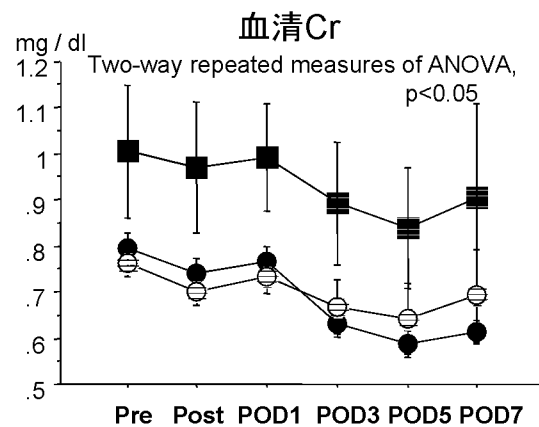
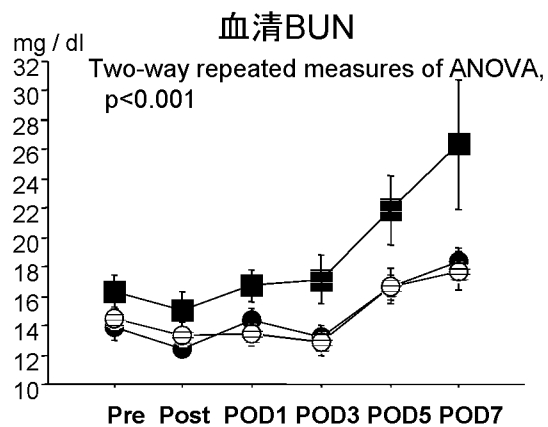


Fig.1a 周術期腎機能の推移

BUN、Crともに NAC 群が有意に高値で経過した。

Mean ± SE

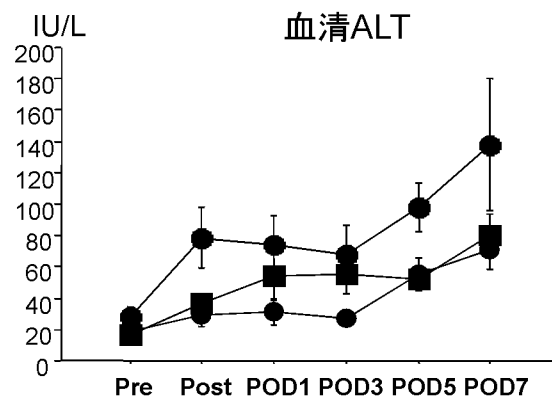
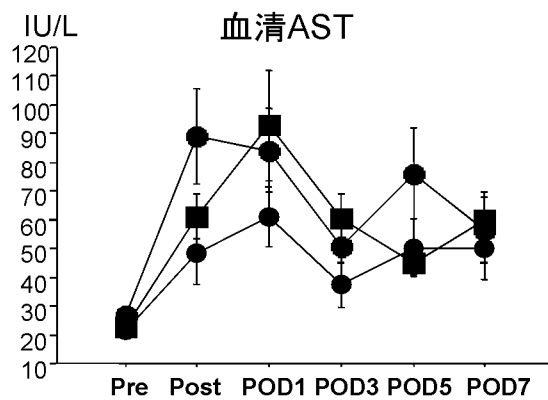


Fig.1b 周術期肝機能の推移

3 群間で有意差は認めなかった。

Mean ± SE

● NACRT群
■ NAC群
○ SA群

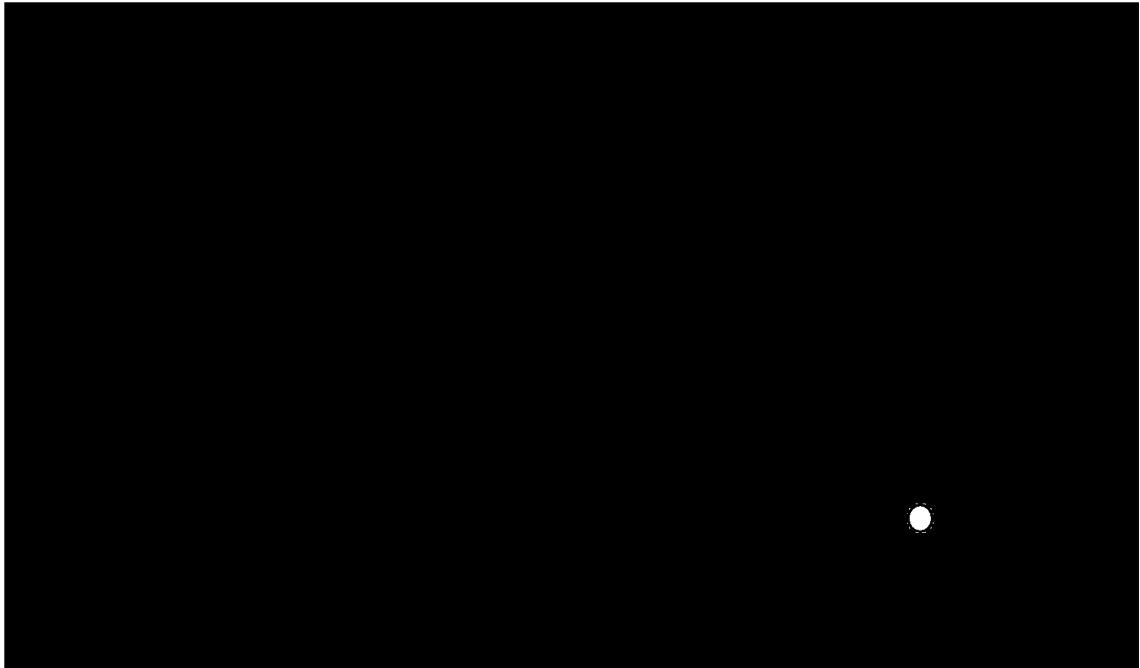


Fig.1c 周術期肺酸素可能($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$)の推移

NACRT 群が POD5 以降、他の 2 群に比較し有意に低値で経過した。

Table4. 臨床病理学的背景因子

年齡	62±3
性別	
男性	22
女性	6
原疾患	
食道癌	6
胃癌	5
肝臓癌	5
大腸癌	12
手術時間 (分)	412.3±50.2
出血量(g)	1155.0±197.0
SIRS 合併期間(日)	1.49±0.4
術後 ICU 滞在時間 (時間)	37.2±17.6

Mean=SE

Table5. 消化器外科待機手術周術期の血清中 H\NGB-1 濃度の推移

	Pre	POD1	POD3	POD5	POD7
HNGB-1(ng/ml)	1.32±0.40	5.81±1.71*	6.78±1.46**	3.69±0.97**=	2.36±0.76**=

Mean±SE Student's t-test *P<0.05 vs pre operation

Pre: Pre operation **P<0.005 vs pre operation

POD: Post operative day #P<0.05 vs POD3.

##P<0.005 vs POD3.

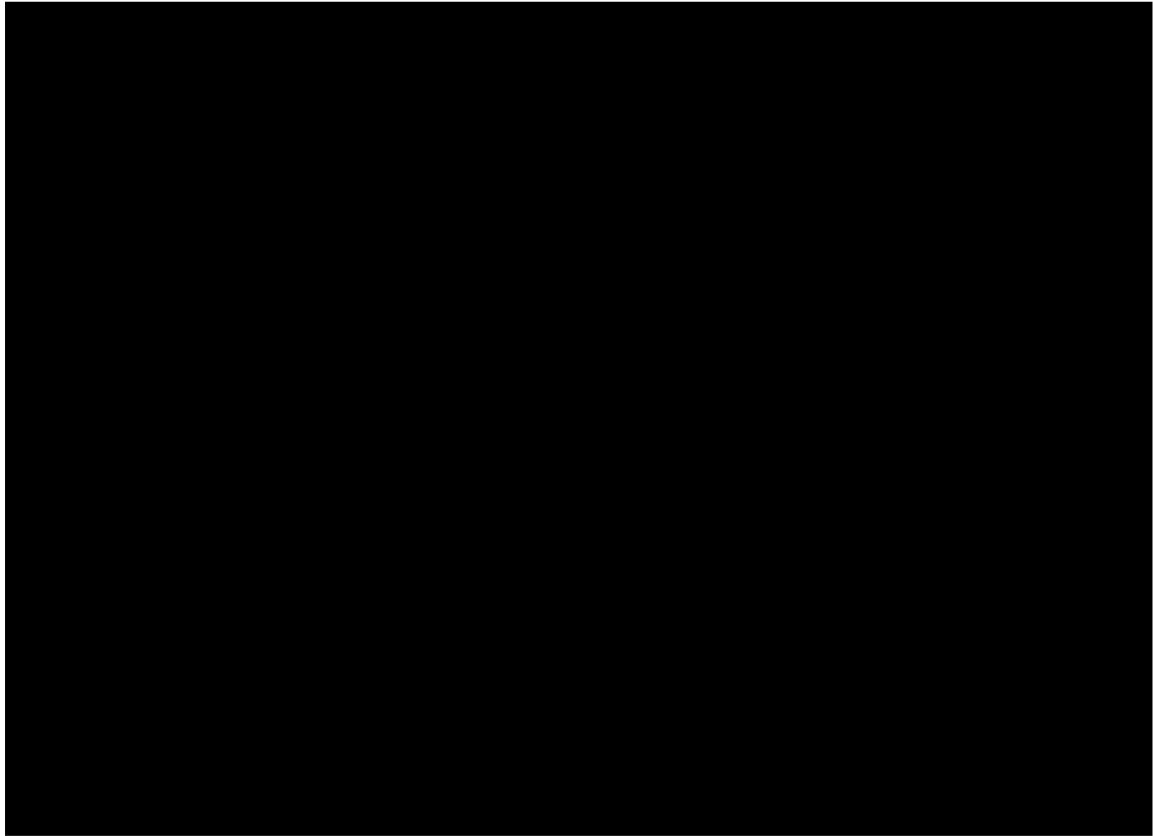


Fig.2 SIRS 期間と血清 HMGB-1 との相関

POD3、POD5 の血清 HMGB-1 濃度と SIRS 期間に正の相関を認めた。

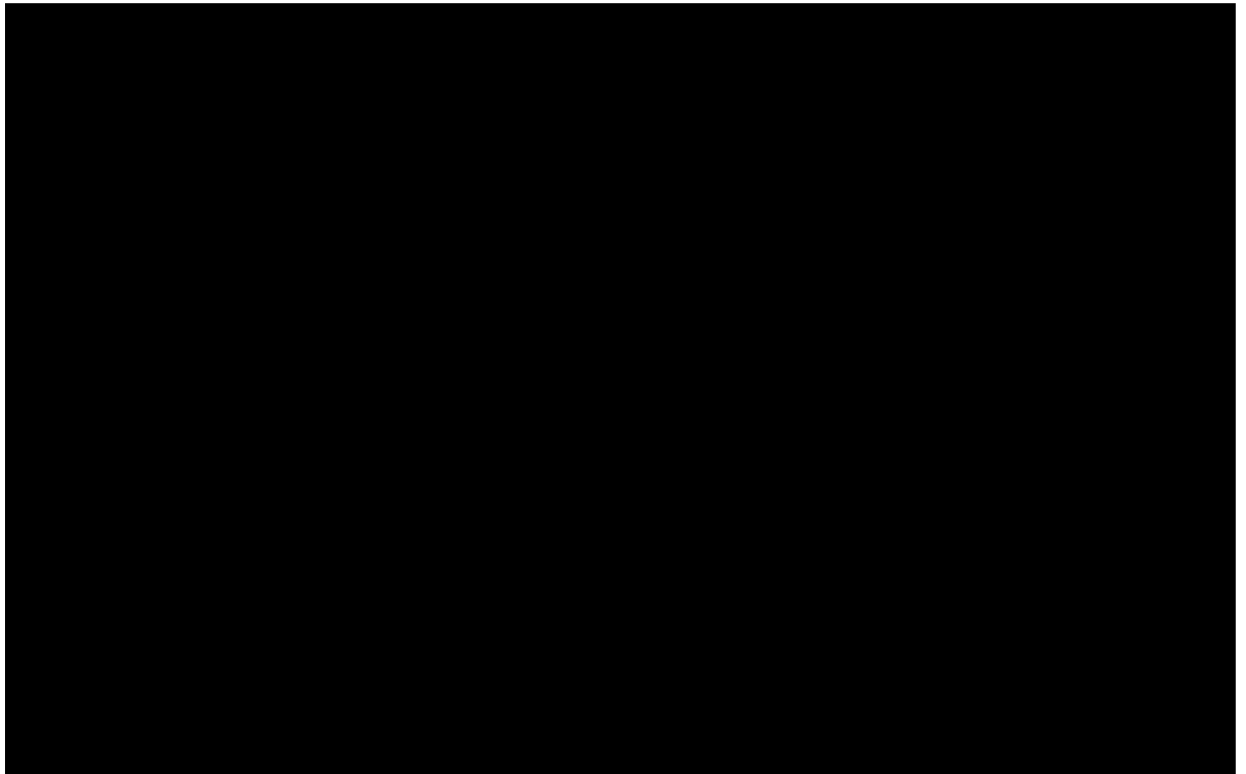


Fig.3 心拍数と血清 HMGB-1 との相関

SIRS 診断基準項目のうち POD3/POD5 の心拍数が POD3 の血清 HMGB-1 と、POD5/POD7 の心拍数と POD5 の血清 HMGB-1 にそれぞれ正の相関を認めた。



Fig.4 肺酸素化能と血清中 HMGB-1 の相関

POD3 の肺酸素化能と POD3 血清 HMGB-1 値に負の相関を認めた。

Table6. 術前臨床病理学的背景因子

		重症呼吸器合併症 (n=16)	非合併症 (n=44)	p-value
年齢		69=9	67=9	0.4307 *
性別	男性	15(93.7%)	37(84.1%)	0.3304 =
	女性	1(6.3%)	7(15.9%)	
術前肺機能	%VC	107.6=16.1	109.2=18.2	0.7674 *
	FEV1.0%	77.1=9.7	78.2=11.8	0.9283 *
	DLCO	13.8=4.2	15.4=4.4	0.2120 *
術前治療	手術単独	3(18.8%)	20(45.5%)	0.0500 =
	NACRT/NAC	13(81.2%)	24(54.5%)	
CT CRT-grade	0	2(15.4%)	0(0%)	0.1224 =
	1a	9(69.2%)	19(76.0%)	
	1b	2(15.4%)	6(24.0%)	
浸達度	T1	2(12.5%)	11(27.8%)	0.2171 =
	T2	4(25.0%)	4(9.1%)	
	T3	8(50.0%)	27(61.4%)	
	T4	2(12.5%)	2(4.5%)	
リンパ節転移	N0	5(31.3%)	21(47.7%)	0.4307 =
	N1	4(25.0%)	12(27.3%)	
	N2	5(31.3%)	6(13.6%)	
	N3	2(12.5%)	5(11.4%)	
遠隔転移	M0	15(93.8%)	43(97.7%)	0.4479 =
	M1	1(6.2%)	1(2.3%)	
pStage	I	2(12.5%)	12(27.2%)	0.6278 =
	II	5(31.3%)	9(20.5%)	
	III	8(50.0%)	20(45.5%)	
	IV	1(6.2%)	3(6.8%)	

Mean ± SE *Student's t-test = χ^2 test

NACRT/NAC: Neoadjuvant chemoradiotherapy/ Neoadjuvant chemotherapy

術前化学放射線療法/ 術前化学療法

CT CRT-grade: chemotherapy/chemoradiotherapy-grade

放射線療法ならびに化学療法の治療効果の病理組織学的判定基準

Table7. 患者背景(術中因子)

		重症呼吸器合併症 (n=16)	非合併症 (n=44)	p-value
吻合部位	頸部	0(0%)	10(22.7%)	0.0367 #
	胸腔内	16(100%)	34(63.0%)	
胸部操作	開胸	14(87.5%)	30(68.2%)	0.1346 #
	胸腔鏡	2(12.5%)	14(31.8%)	
腹部操作	開腹	6(37.5%)	10(22.7%)	0.2525 #
	腹腔鏡	10(62.5%)	34(77.3%)	
郭清領域	2 領域	3(18.8%)	29(65.9%)	0.0012 #
	3 領域	13(81.2%)	15(34.1%)	
手術時間	(分)	507.5±77.0	443.0±99.9	0.0229 *
胸部操作時間	(分)	167.5±45.6	148.1±51.5	0.1914 *
出血量	(g)	905.3±775.8	559.0±419.1	0.0305 *
輸血	あり	7(43.8%)	13(29.5%)	0.3020 *
	なし	9(56.2)	31(70.5%)	

Mean±SE *Student's t-test # χ^2 test

Table8.患者背景(術後因子)

		重症呼吸器合併症 (n=16)	非合併症 (n=44)	p-value
縫合不全	あり	2(12.5%)	7(15.9%)	0.7436 #
	なし	14(87.5%)	37(84.1%)	
術後 ICU 滞在時間	(時間)	33.4±28.4	25.0±13.2	0.1251 *
術後入院日数	(日)	61.5±50.6	29.7±18.3	0.0017 *
術後 SIRS 期間	(日)	5.6±2.1	3.5±2.6	0.0049 *
術後 30 日死亡		2(12.5%)	0(0.0%)	0.0171 #
在院死		8(50.0%)	0(0.0%)	<0.0001 #

Mean±SE *Student's t-test # χ^2 test

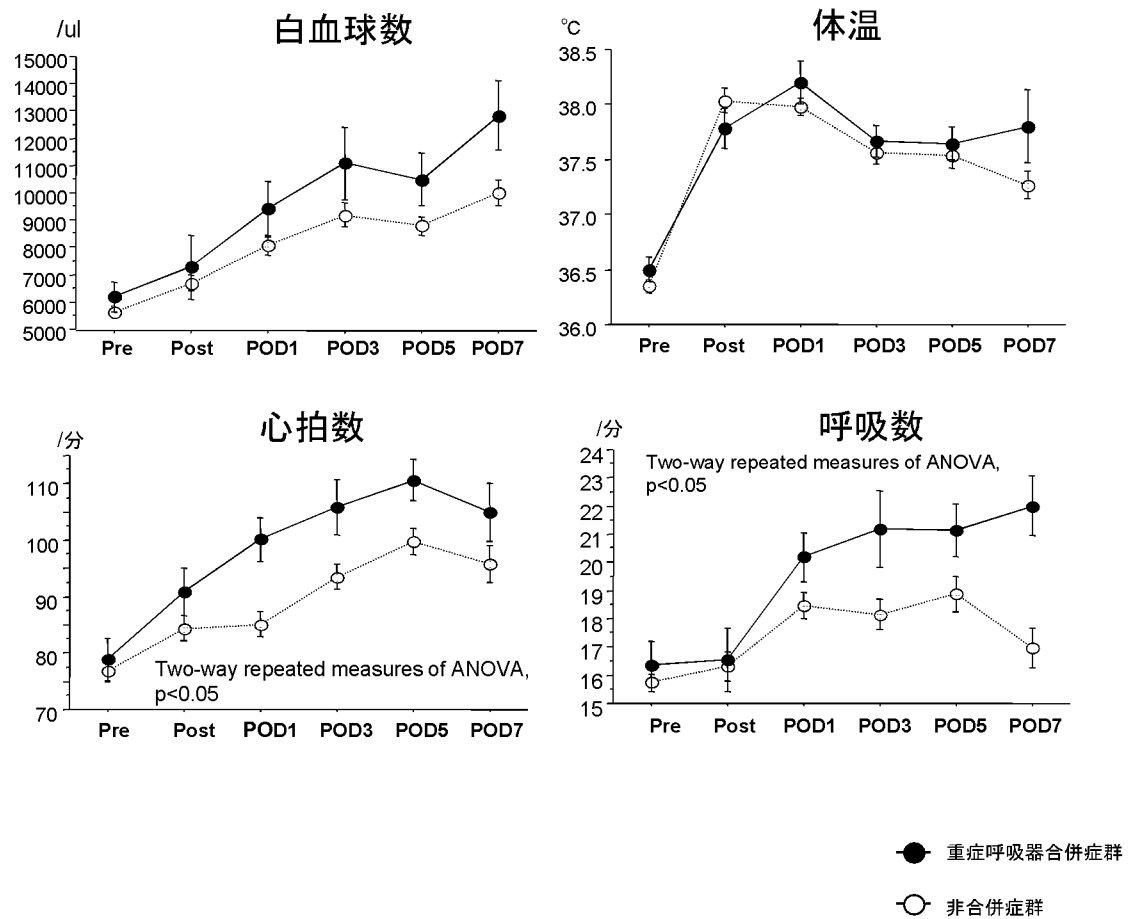


Fig.5 周術期 SIRS 診断基準項目の推移

心拍数と呼吸数において重症呼吸器合併症群が有意に高値で経過した。

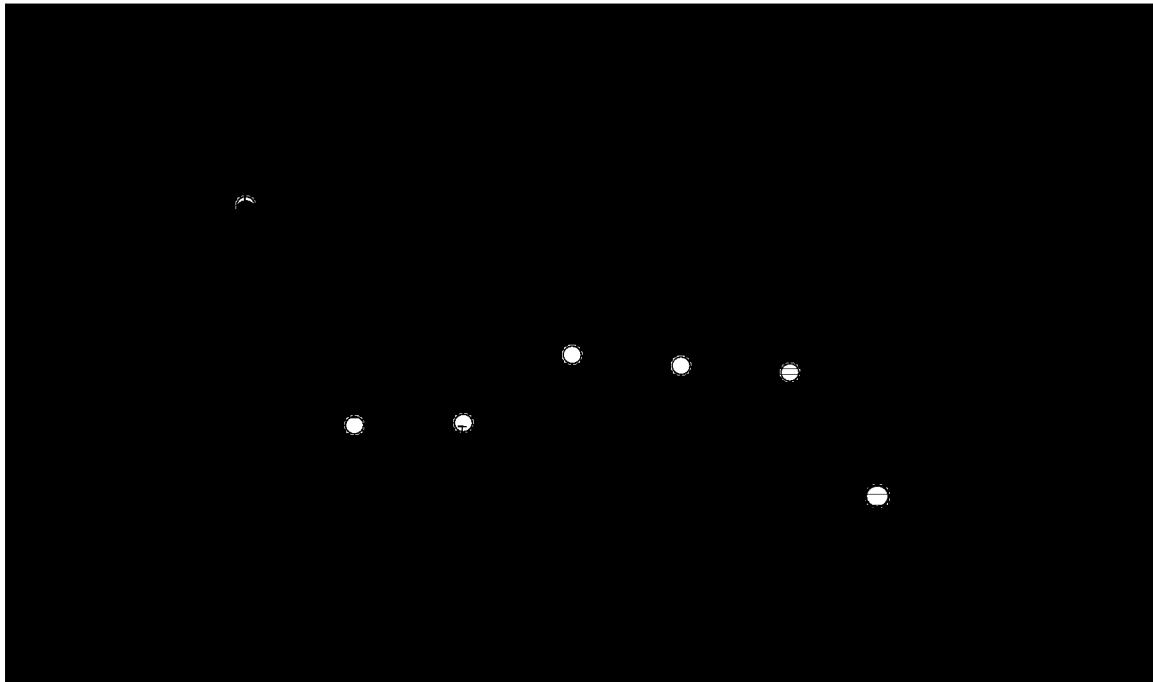


Fig.6 周術期肺酸素化能の推移

重症呼吸器合併症群は POD3 の肺酸素化能が有意に低値で、その後も低値で経過した。

Table9.食道癌 同術期における血清中 HMGB-1 濃度の推移

		Pre	Post	POD1	POD3	POD5
HMGB-1	重症呼吸器合併症	5.80±1.40 *	7.08±1.20	10.30±2.84	10.17±2.08	13.00±4.54
(ng/ml)	非合併症	3.47±0.43	5.86±0.80	8.69±1.48	10.20±1.49	12.72±3.01

Mean±SE

Pre: Pre operation

Post: Immediately after operation

POD: Post operative day

*P<0.05 vs. 非合併症

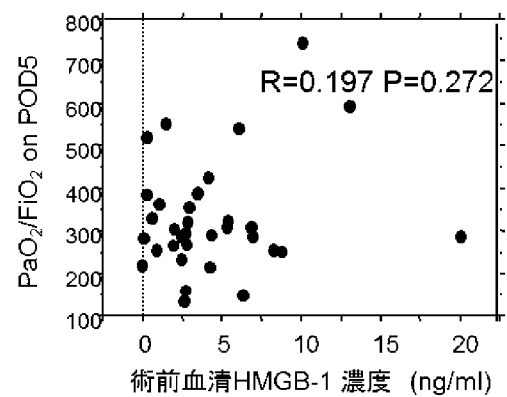
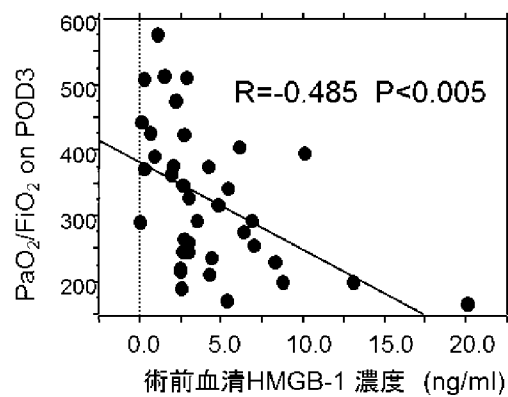


Fig.7a 術前血清 HMGB-1 と肺酸素化能の相関

術前血清 HMGB-1 と POD3 の肺酸素化能に負の相関を認めた。

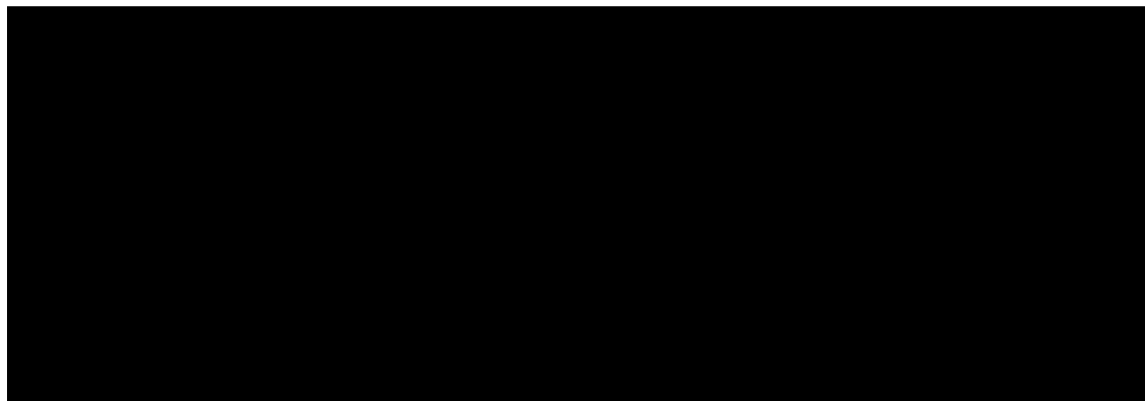


Fig.7b 術前血清 HMGB-1 と腎機能(血清 Cr)との相関

腎機能と相関は認めなかった。

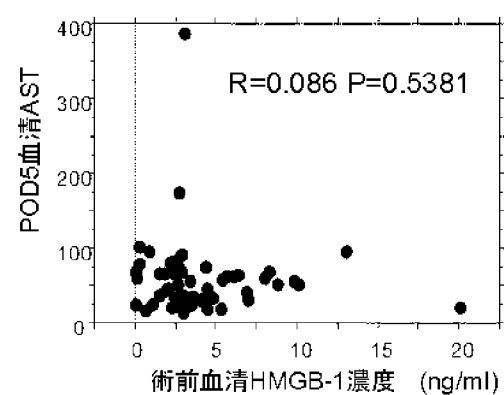
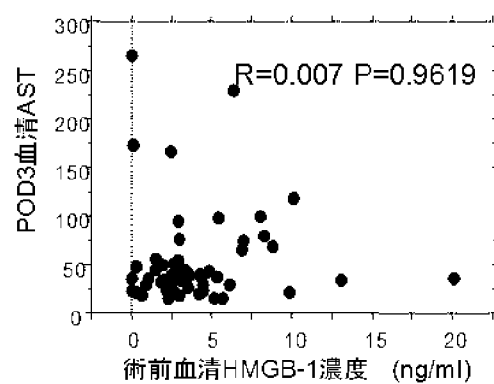


Fig.7c 術前血清 HMGB-1 と肝機能(血清 AST)との相関

肝機能と相関は認めなかった。

Table10.術前血清中 HMGB-1 濃度に関する単変量・多変量解析

	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	Hazard ratio	95% CI	p-value	Hazard ratio	95% CI	p-value
年齢 (>70 歳)	1.581	0.894-2.796	0.0073	1.353	0.622-2.939	0.0025
性別(女性)	1.48	0.657-3.332	0.3439			
術前治療(あり)	1.631	0.936-2.840	0.0836			
深達度(T3,4)	1.298	0.725-2.324	0.3795			
リンパ節転移(N2,3)	0.957	0.529-1.730	0.8831			
遠隔転移(M1)	1.562	0.378-6.456	0.5380			
CT/CRT-grade (0/1a)	1.394	0.562-3.454	0.0173	1.451	0.577-3.644	0.0357

Cox 比例ハザードモデル

CI: Confidence intervals

CT/CRT-grade: chemotherapy/chemoradiotherapy-grade 放射線療法ならびに化学療法の治療効果の病理組織学的判定基準

Table11.POD3 肺酸素化能に関する単変量・多変量解析

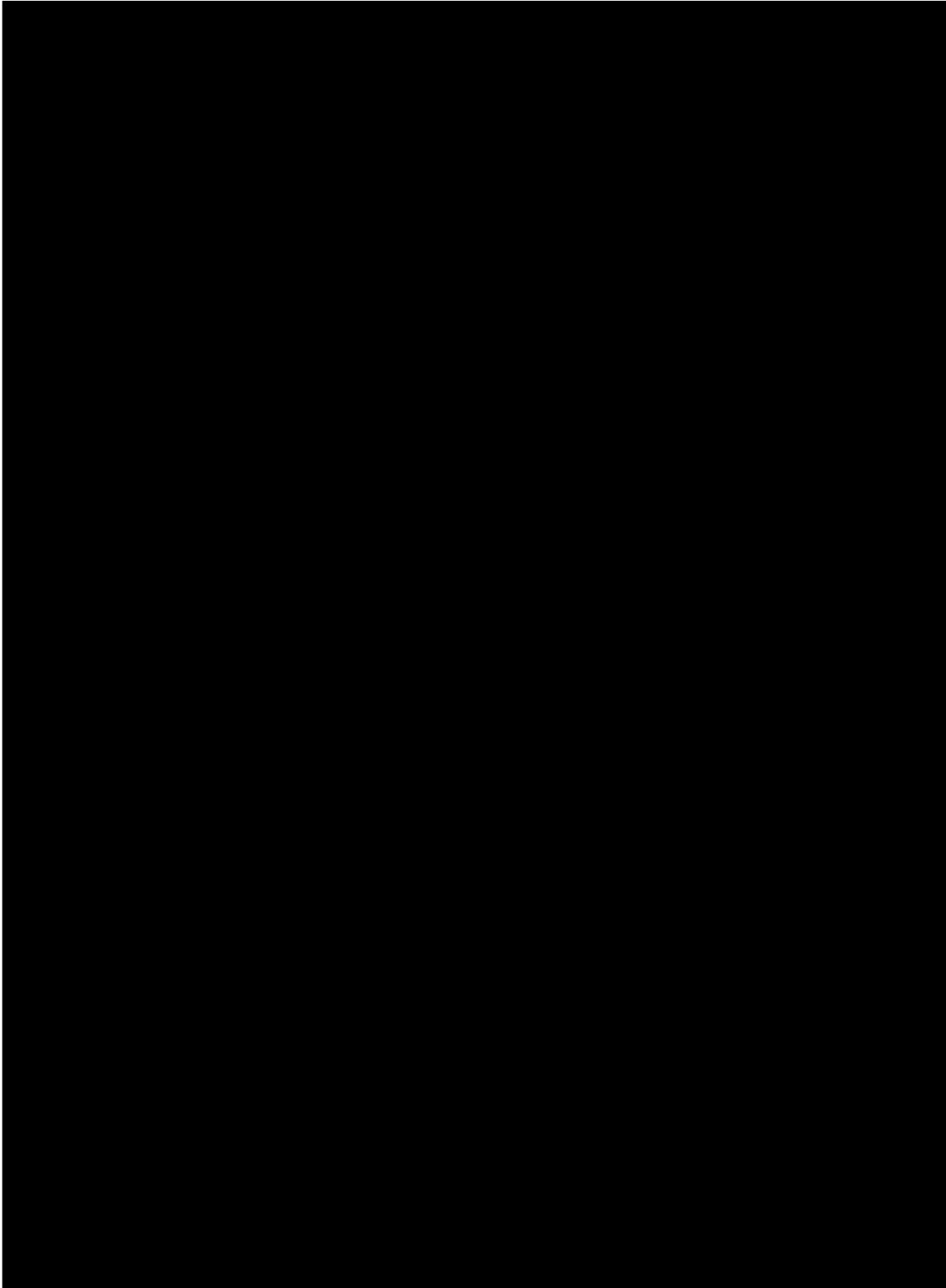
	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	Hazard ratio	95% CI	p-value	Hazard ratio	95% CI	p-value
年齢(>70)	0.705	0.437-1.138	0.0797			
性別 (男性)	0.837	0.414-1.692	0.5243			
術前治療 (あり)	1.332	0.821-2.162	0.0179	2.729	1.24-6.001	0.0124
%VC (異常)	1.502	0.456-4.946	0.5031			
FEV1.0% (異常)	0.760	0.367-1.572	0.4598			
DLCO (異常)	1.363	0.642-2.894	0.4195			
深達度 (T3,4)	1.095	0.562-2.133	0.7902			
リンパ節転移(N2,3)	1.399	0.701-2.795	0.3409			
遠隔転移 (M1)	3.511	0.789-15.635	0.0995			
手術時間(>450 分)	1.239	0.663-2.315	0.5030			
輸血 (あり)	2.538	1.380-4.921	0.0059	1.082	0.492-2.380	0.8442
胸部操作(開胸)	2.718	1.309-5.647	0.0073	1.581	0.746-3.349	0.2314
郭清領域 (3 領域)	1.885	0.989-3.592	0.0540			
術前 HMGB-1 (>3.0)	2.801	1.346-5.830	0.0059	2.869	1.252-6.574	0.0126
CT/CRT-grade (1b)	1.399	0.518-3.780	0.5073			

Cox 比例ハザードモデル

CI: Confidence intervals

CT/CRT-grade: chemotherapy/chemoradiotherapy-grade

放射線療法ならびに化学療法の治療効果の病理組織学的判定基準



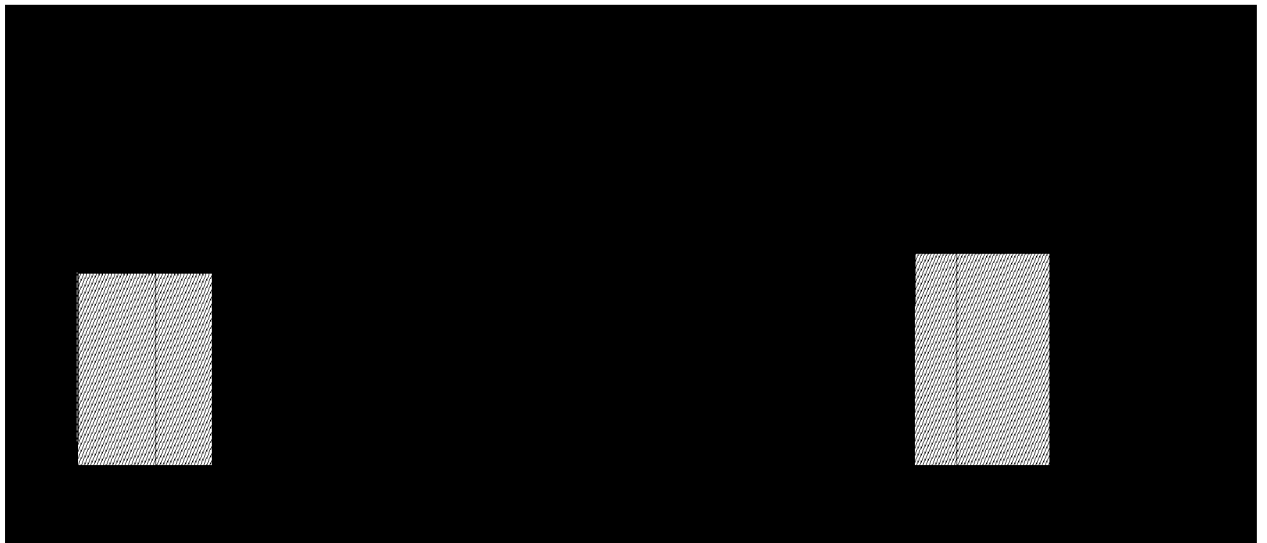


Fig.9a 血中サイトカイン産生能の比較

血中サイトカイン濃度は2群間で差を認めなかった。 各群 n=10 Mean±SE

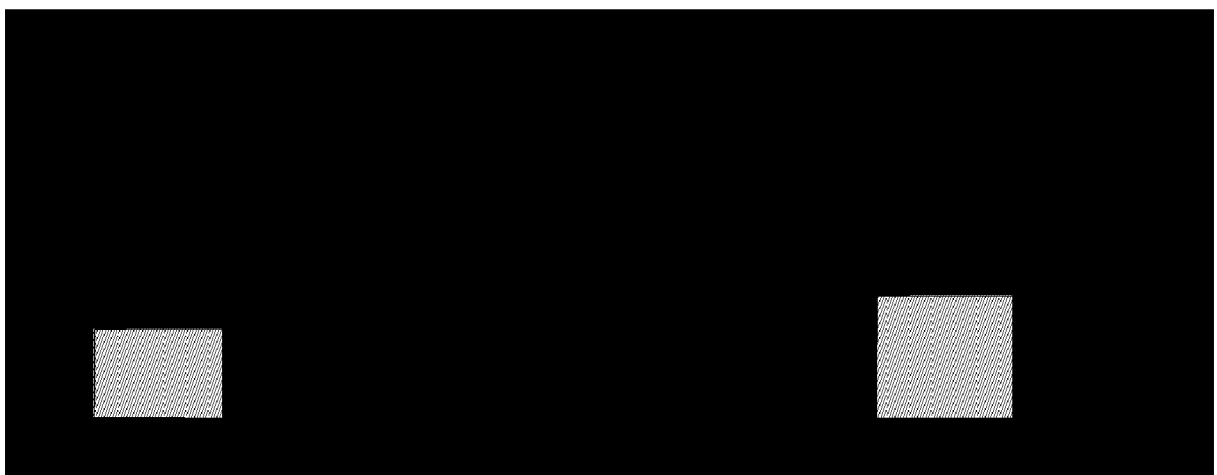


Fig.9b 肺胞洗浄液(BALF)中サイトカイン産生能の比較

BALF 中 TNF- α 、MIP-2 濃度は有意に Radiation 群で高値であった。HMGB-1 も有意差はない
が高い傾向を認めた。

各群 n=10 Mean±SE *P<0.05

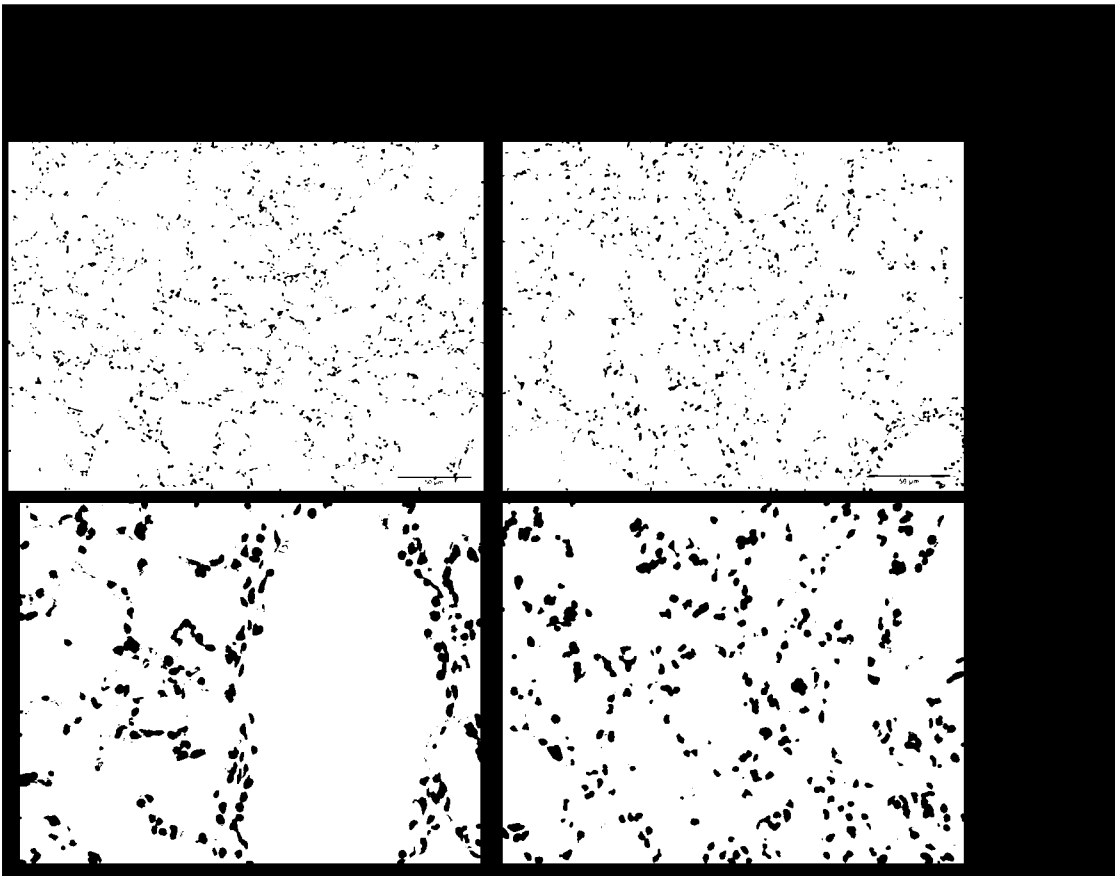


Fig.10 肺組織 H-E 染色

Radiation 群では肺胞壁の肥厚、間質への炎症細胞の浸潤を認める。

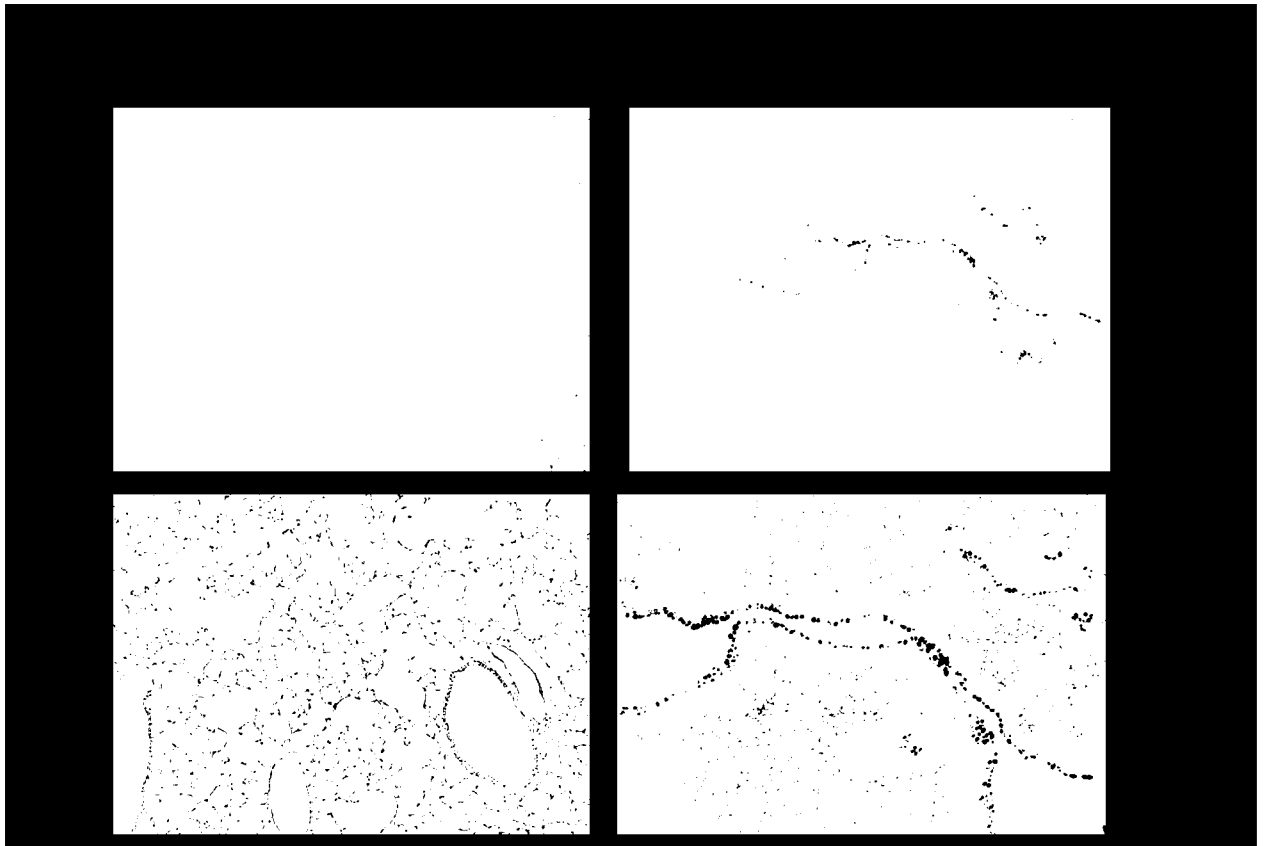


Fig.11 肺組織における E-Selectin 免疫染色

Control 群では E-Selectin の発現を認めないが、Radiation 群では、血管内皮、気管支壁等に発現を認めた。

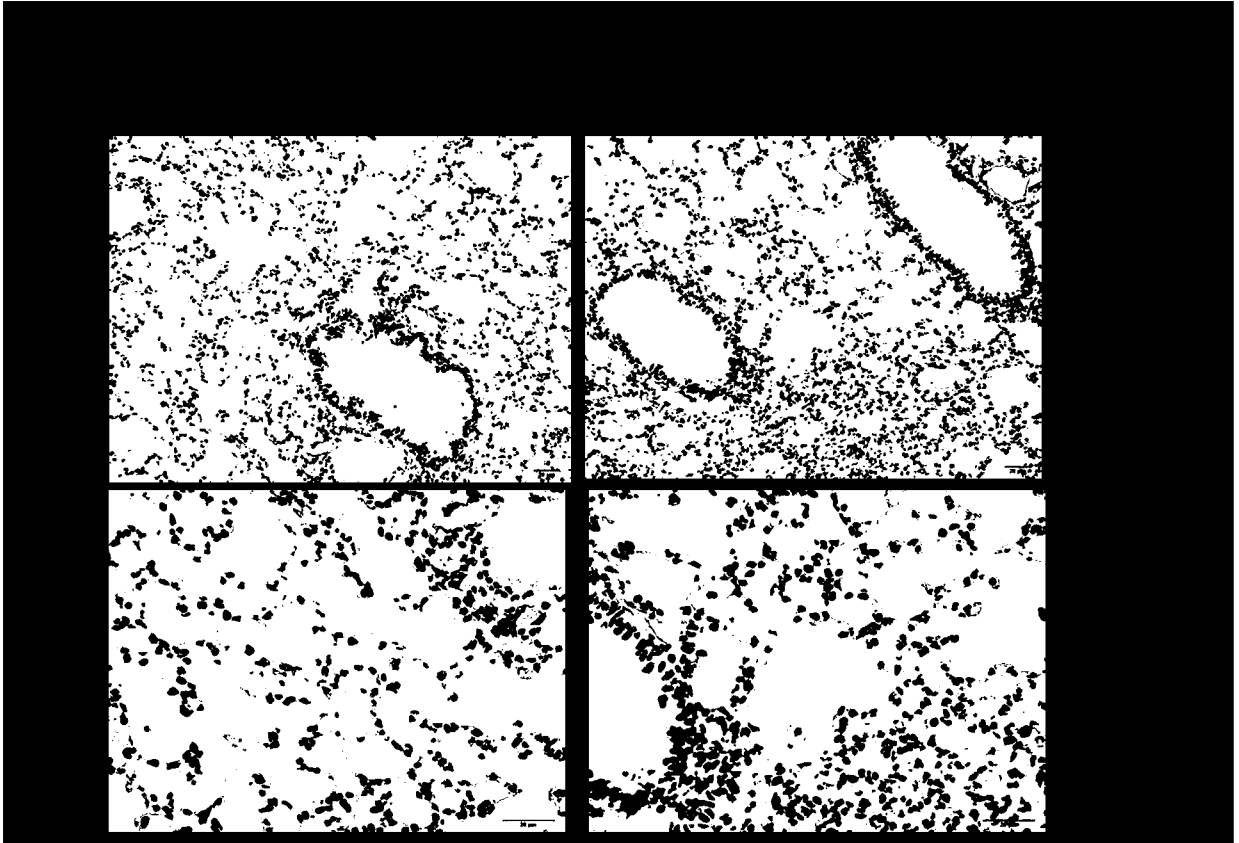
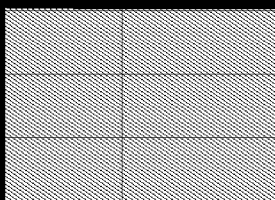
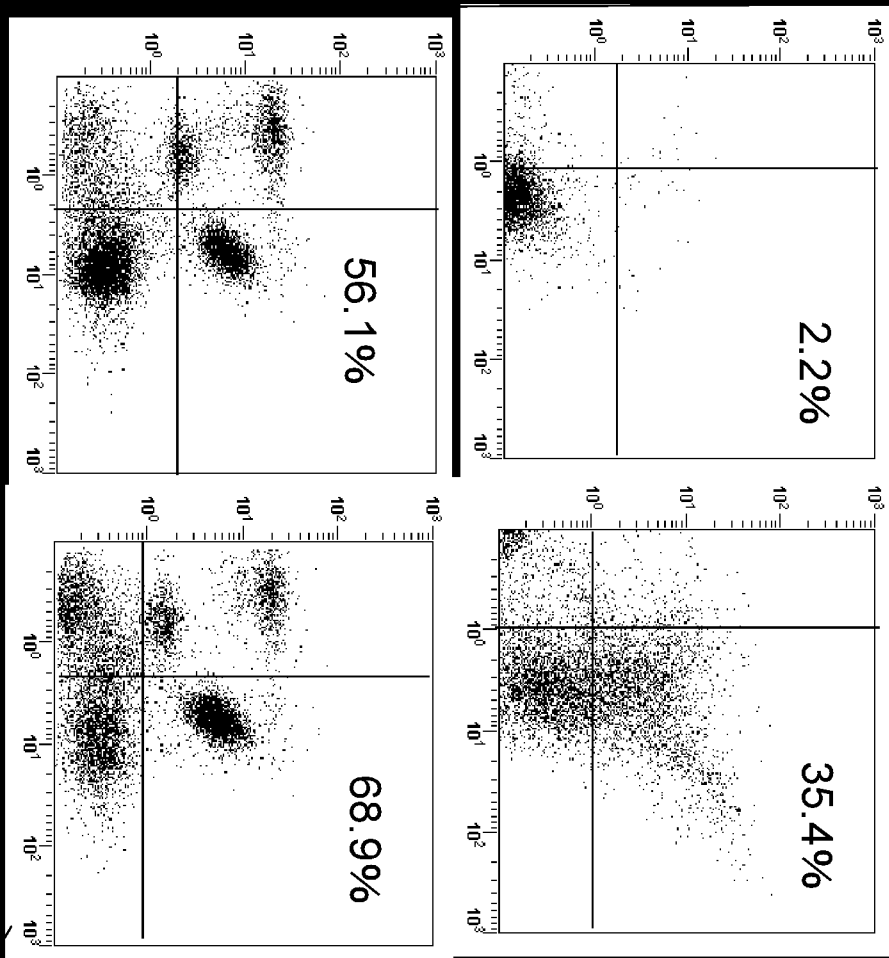


Fig.12 肺組織における HMGB-1 免疫染色

Radiation 群では、間質に浸潤した炎症細胞に HMGB-1 陽性細胞の浸潤を認める。



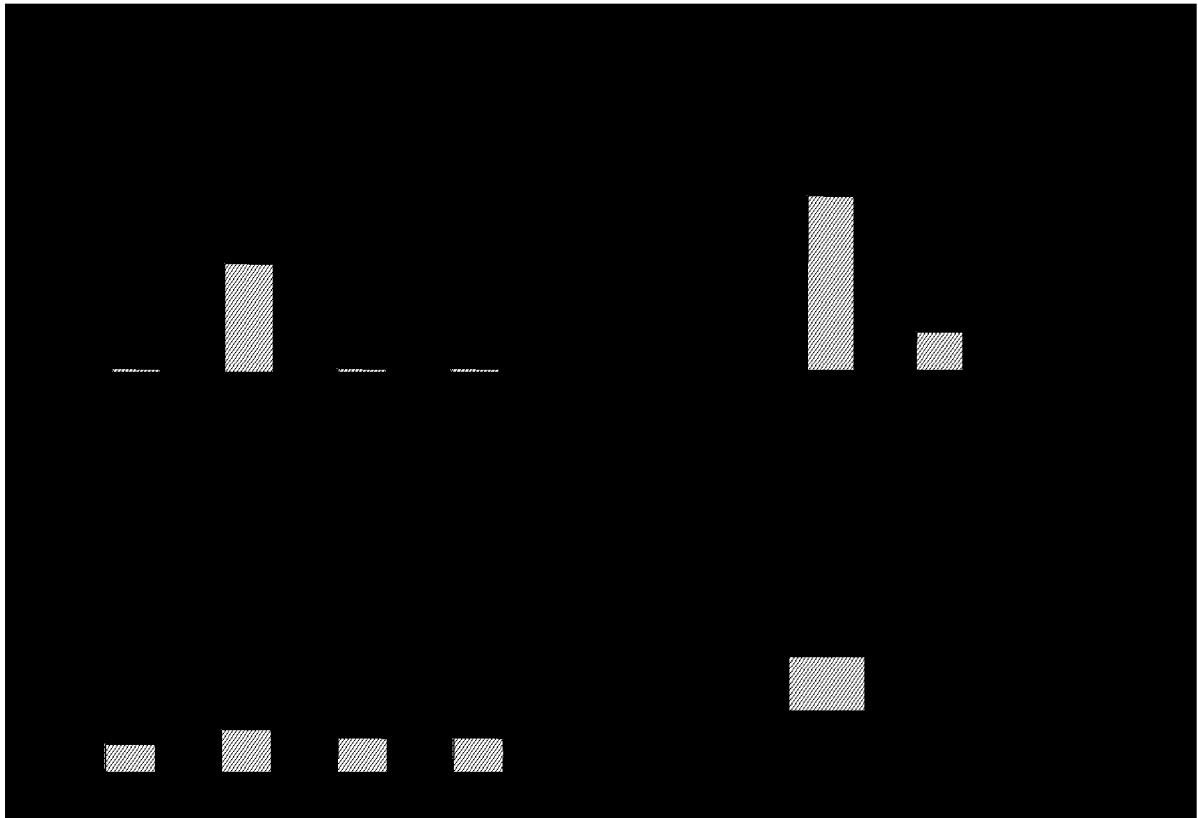


Fig.14 LPS 投与後血中サイトカイン産生能の比較

TNF- α は 1 時間後、MIP-2 は 3・6 時間後、HMGB-1 は 3・6 時間後にそれぞれ Radiation 群が有意に高値であった。

各群・各時間 n=10 Mean $\pm$ SE *P<0.05 **P<0.005

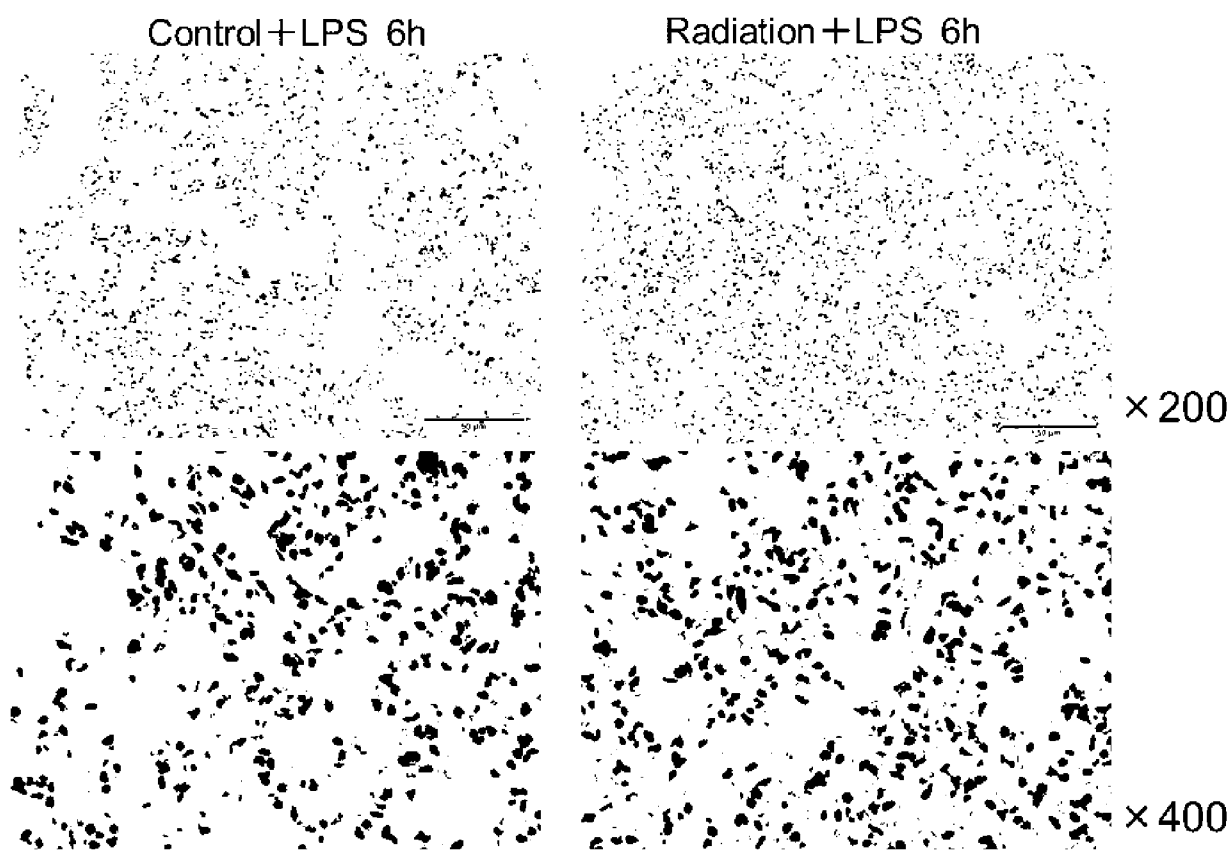


Fig.15 LPS 投与 6 時間後の肺組織での変化(H-E 染色)

LPS 投与により両群とも肺胞壁の顕著な肥厚、間質への炎症細胞の浸潤を認めるが、Radiation 群ではその変化が顕著であった。

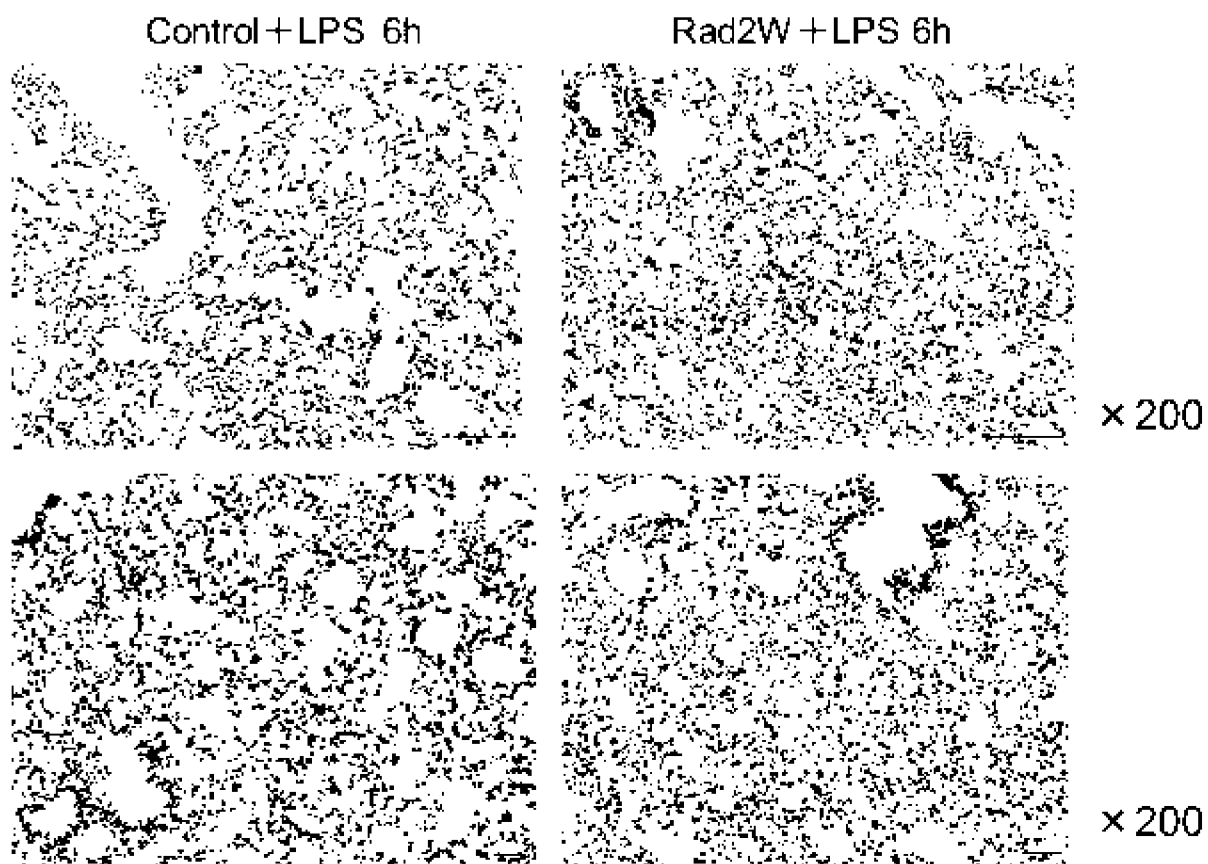


Fig.16 LPS 投与 6 時間後の肺組織における HMGB-1 免疫染色

H-E 染色で認められた間質に浸潤した炎症細胞に一致して HMGB-1 陽性の細胞を認める。

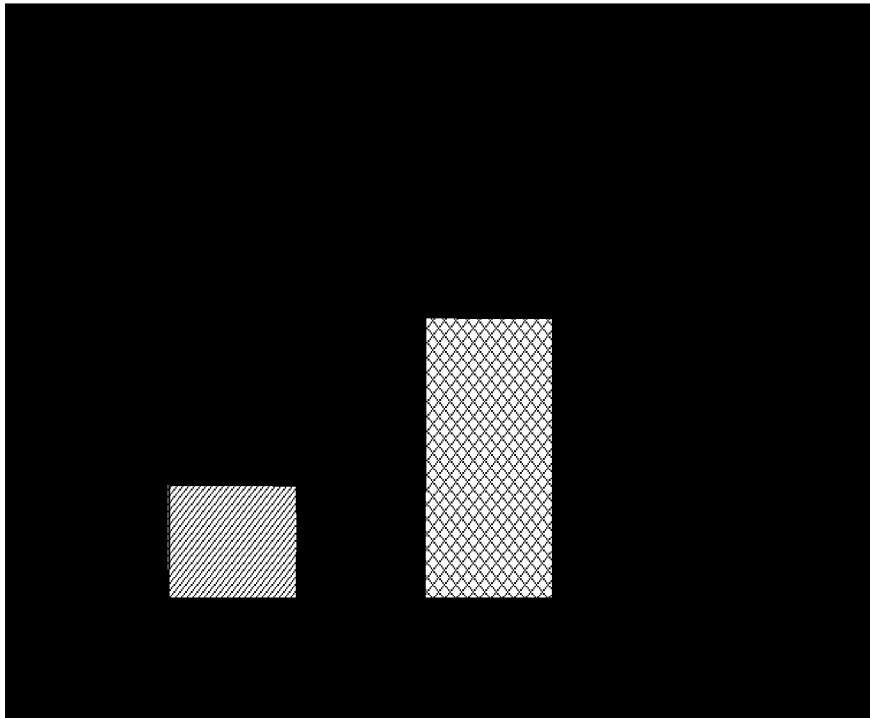


Fig.17 LPS 投与 6 時間後の肺血管透過性の検討

Control 群に比較し、Radiation 群では肺血管の透過性亢進を認めた。また、HMGB-1 中和抗体の投与により血管透過性の有意な改善を認めた。 各群 n=10

*P<0.05 **P<0.005

***P<0.001 vs Control+PBS

Table.12 根治的化学放射線療法施行症例

	年齢(歳)	性別	cTNM	cStage	Radiation (Gy)	RECIST
1	70	男性	T3N2M0	Ⅲ	60	PR
2	72	男性	T2N0M0	Ⅱ	60	CR
3	70	男性	T4N2M0	Ⅳa	52	PR
4	79	男性	T3N2M0	Ⅲ	60	PR
5	73	男性	T4N1M0	Ⅳa	60	CR
6	72	男性	T1N0M0	I	60	PD
7	70	男性	T4N3M0	Ⅳa	62	PR
8	76	男性	T1N4M0	Ⅳa	60	PR
9	70	男性	T3N2M1	Ⅲ	60	SD
10	68	男性	T2N4M0	Ⅳa	50.4	PR

RECIST: Response Evaluation Criteria in Solid Tumor 固形がんに対する治療効果判定規準

CR: Complete Response 完全奏功

PR: Partial Response 部分奏功

PD: Progressive Disease 進行

SD: Stable Disease 安定

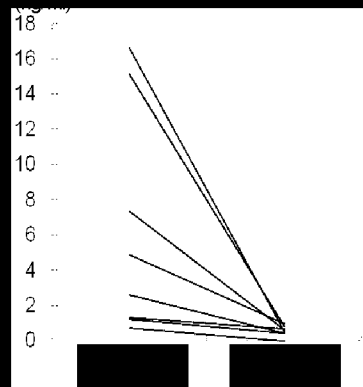
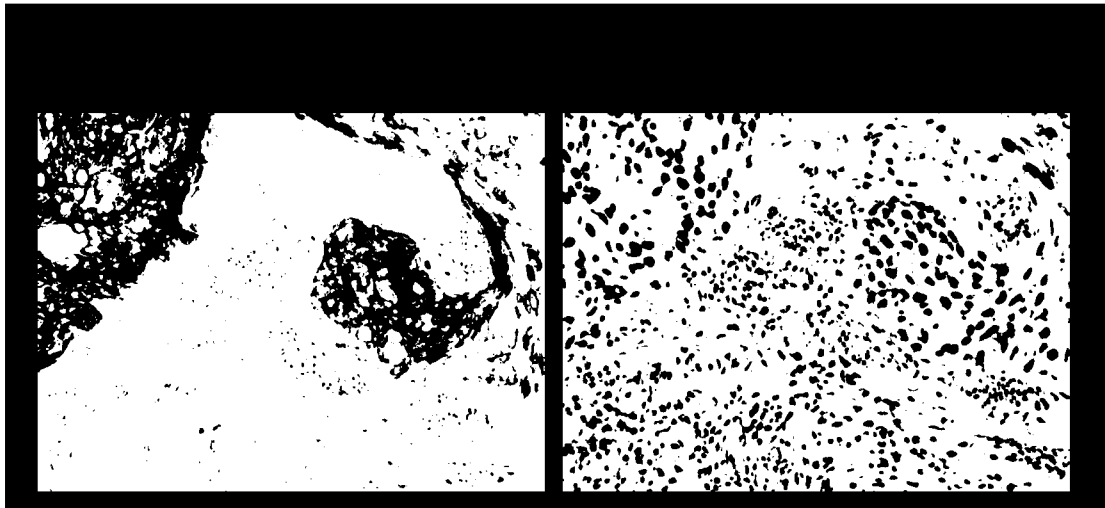


Fig.18 化学放射線療法(CRT)前後の血清 HMGB-1 の推移

全症例で比較すると、CRT 前後で低下しているが、有意差はなかった。

CRT に対する治療効果別に検討すると、PR/CR 症例では、有意な HMGB-1 値の低下を認めたが、SD/PD 症例では不変・増加を認めた。



×400

Fig.19 食道癌連続組織切片におけるサイトケラチン免疫染色とHMGB-1 免疫染色
サイトケラチン陽性の食道癌組織の核に HMGB-1 陽性細胞の発現を認める。

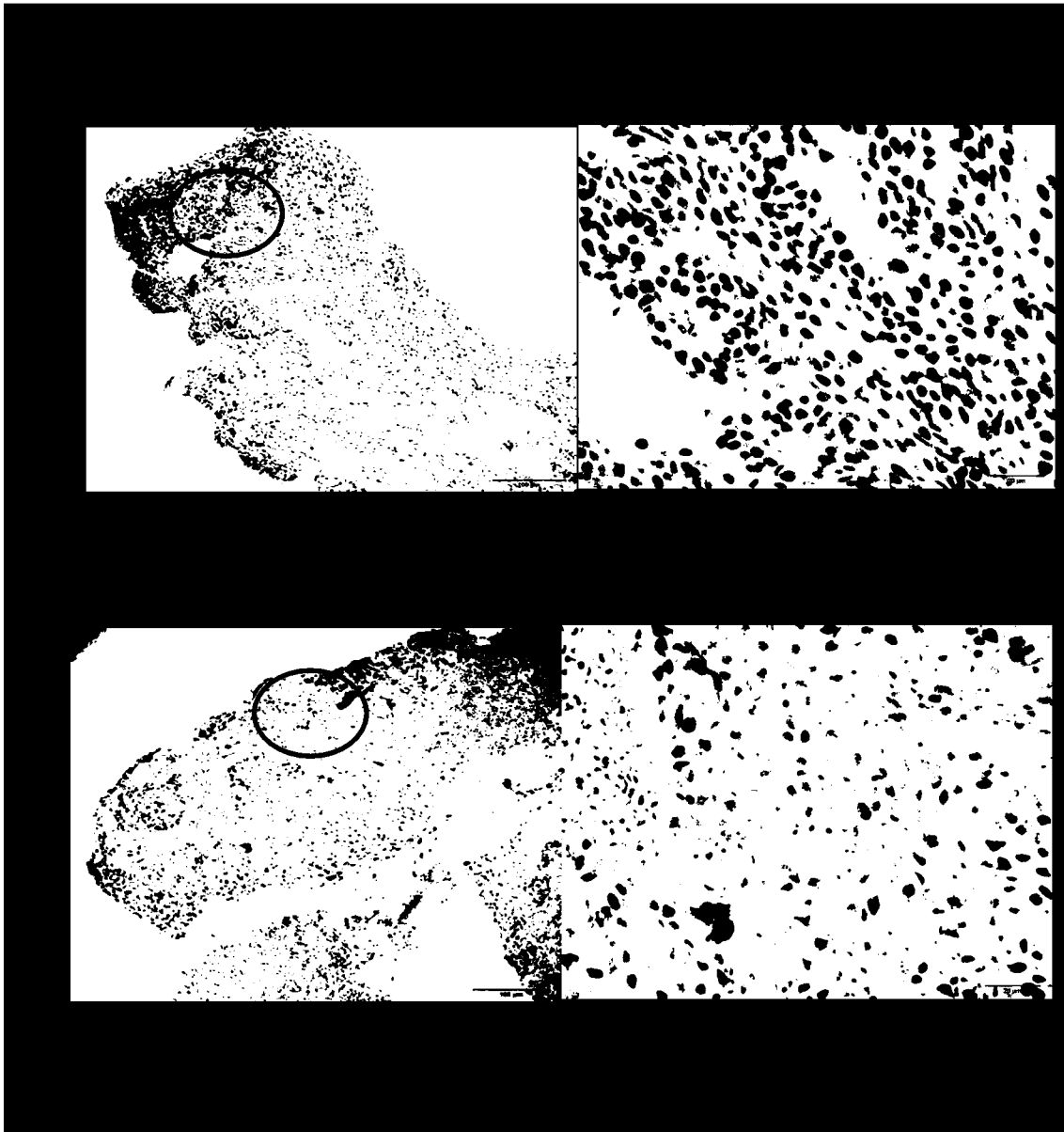


Fig.20a CRT 前後における食道癌組織 HMGB-1 陽性細胞の比較

食道癌組織での HMGB-1 免疫染色の結果治療前後で 400 倍視野における HMGB-1 陽性細胞が減少した。

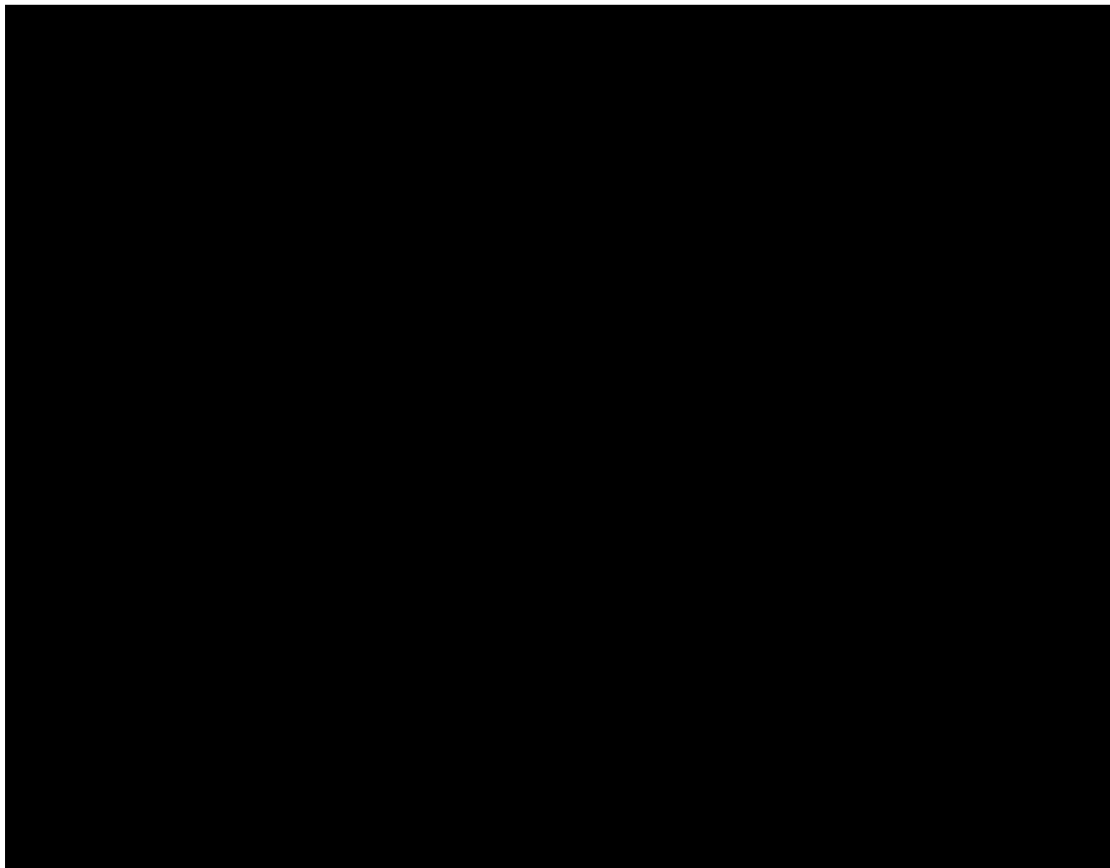


Fig.20b CRT 前後における食道癌組織 HMGB-1 陽性細胞の推移

CRT 治療前後で 400 倍視野における HMGB-1 陽性細胞の数が有意に減少した。

CRT に対する治療効果別に検討すると、PR/CR 症例では有意な HMGB-1 の低下を認めたが、SD/PD 症例では不変あるいは CRT 後の増加が認められた。

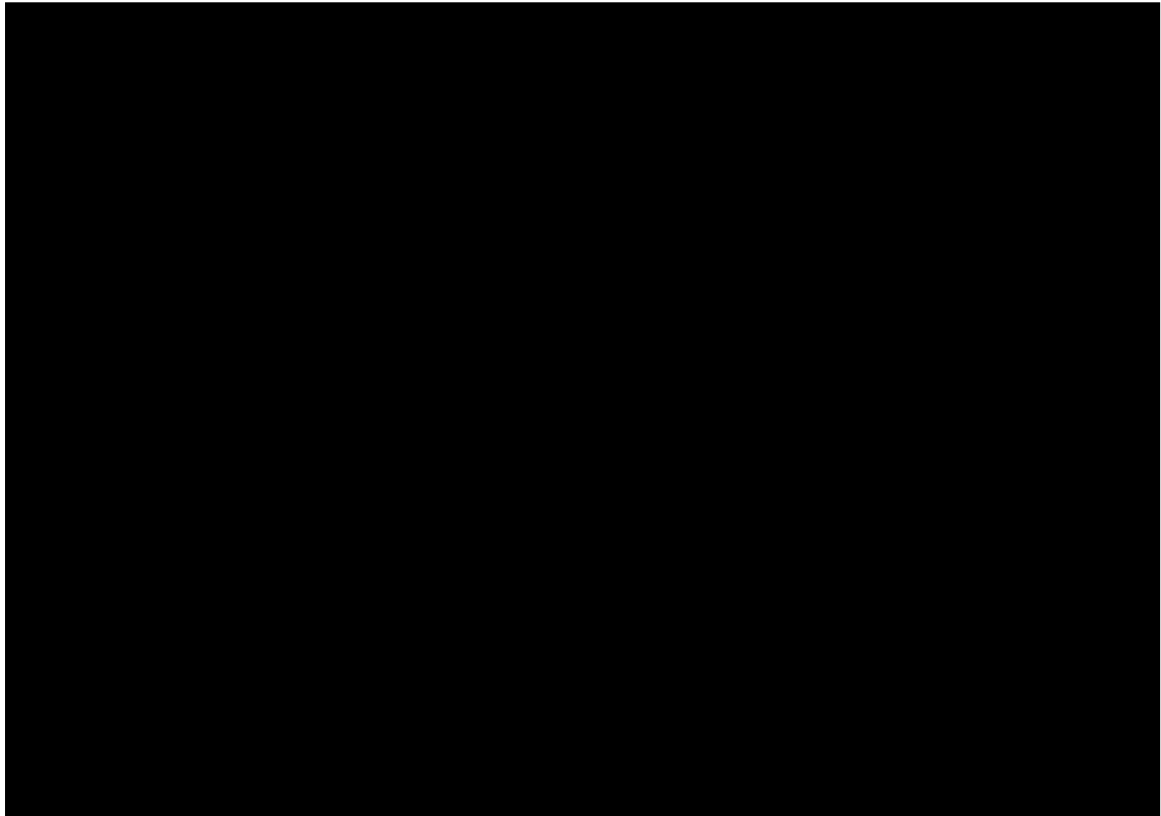


Fig.21 血清 HMGB-1 と食道癌組織 HMGB-1 陽性細胞の相関

全検体で比較すると、血清 HMGB-1 と食道癌腫瘍組織中の HMGB-1 陽性細胞数に正の相関の傾向を認めた。

治療前後で比較すると、治療前には相関がなかったが、治療後には強い正の相関を認めた。

参 考 論 文

1. Postoperative serum concentrations of High Mobility Group Box Chromosomal Protein-1 correlates to the duration of SIRS and pulmonary dysfunction following gastrointestinal surgery
(消化器外科待機手術症例における術前血清 HMGB-1 濃度が術後 SIRS 期間・肺機能障害と関連する) (基礎論文 1)

たか はた り さ
高 畑 り さ

(消化器病学専攻)

防 衛 医 科 大 学 校

平成 25 年度

Postoperative Serum Concentrations of High Mobility Group Box Chromosomal Protein-1 Correlates to the Duration of SIRS and Pulmonary Dysfunction Following Gastrointestinal Surgery

Risa Takahata, M.D.,* Satoshi Ono, M.D.,^{†1} Hironori Tsujimoto, M.D.,* Shuichi Hiraki, M.D.,* Akifumi Kimura, M.D.,* Manabu Kinoshita, M.D.,‡ Hiromi Miyazaki, Ph.D.,† Daizoh Saitoh, M.D.,† and Kazuo Hase, M.D.*

*Department of Surgery, National Defense Medical College, Tokorozawa, Saitama, Japan; †Division of Traumatology, Research Institute, National Defense Medical College Tokorozawa, Saitama, Japan; and ‡Department of Immunology and Microbiology, National Defense Medical College, Tokorozawa, Saitama, Japan

Submitted for publication January 24, 2011

Objective. To clarify the time course of changes in the serum HMGB-1 concentrations in patients undergoing major gastrointestinal surgery, and to investigate whether the serum HMGB-1 levels correlate with the postoperative clinical course of the patients.

Methods. Twenty-eight patients with alimentary tract carcinoma who underwent elective gastrointestinal surgery were enrolled in this study. The correlation between the serum HMGB-1 levels and the postoperative clinical course were evaluated.

Results. Serum HMGB-1 concentrations in patients who underwent surgery for gastrointestinal cancer increased gradually during postoperative days, and reached peak concentrations on postoperative day 3 (POD3). There was a statistically significant positive correlation between the serum HMGB-1 levels on POD3 or POD5 and the duration of SIRS ($r = 0.68$, $P < 0.001$, $r = 0.45$, $P < 0.05$, respectively). A significantly positive correlation was found between the serum HMGB-1 levels on POD3 or POD5 and the heart rates on POD3 or POD5. Furthermore, there was a negative correlation between the serum HMGB-1 levels and PaO₂/FiO₂ ratio on POD3.

Conclusions. Serum HMGB-1 levels increase after major gastrointestinal surgery, and the serum peak HMGB-1 levels correlate with the duration of SIRS and postoperative pulmonary dysfunction. © 2011

Elsevier Inc. All rights reserved.

Key Words: HMGB-1; SIRS; pulmonary dysfunction; gastrointestinal surgery.

INTRODUCTION

Surgical injury sometimes can be a life-threatening complication, not only due to the stress itself, but also from the immune response to the injury and the subsequent development of an infection with or without any associated organ dysfunction. Prevention of perioperative complications is a major focus in the care of major gastrointestinal surgery patient. An excessive proinflammatory response to injury and an overcompensatory anti-inflammatory response to injury have been associated with the development of systemic inflammatory response syndrome (SIRS) or multiple organ dysfunction [1]. Surgical injury activates peripheral blood monocytes, lymphocytes, neutrophils, and endothelial cells, which results in the release of proinflammatory cytokines such as TNF α and IL-1 β [2]. The systemic release of these proinflammatory cytokines plays a pivotal role in the pathogenesis of subsequent systemic inflammatory disorders, such as acute lung injury and, ultimately, mortality [3, 4]. However, these cytokines have a short circulating half-life, and their release occurs early after the onset of surgical injury.

Wang et al. identified high mobility group box chromosomal protein 1 (HMGB-1) as a possible late mediator of sepsis, unlike TNF and IL-1, HMGB-1 release occurs late after the injection of either bacteria or bacteria products into mice [5]. HMGB-1 is a nuclear DNA

¹ To whom correspondence and reprint requests should be addressed at Division of Traumatology, Research Institute, National Defense Medical College, Namiki 3-2, Tokorozawa, Saitama, 359-8513, Japan. E-mail: satoshi@ndmc.ac.jp.



binding protein with important physiologic roles, including the determination of nucleosomal structure and binding of transcription factors to their cognate DNA sequences [6]. HMGB-1 is released from the majority of necrotic cells, and is also secreted by activated macrophages and dendritic cells [5, 7]. Extracellular HMGB-1 acts as a crucial late mediator of endotoxin shock, fecal peritonitis, and acute lung injury [8]. The serum concentrations of HMGB-1 significantly increase 16–32 h after lipopolysaccharide injection in mice and, furthermore, serum concentrations of HMGB-1 are significantly higher in critically ill patients with sepsis than in non-critically ill patients [5]. The role of HMGB-1 in humans, especially in patients with major gastrointestinal surgery, which may lead to organ dysfunction, has not yet been fully investigated.

The present study was designed to clarify the time course of changes in serum HMGB-1 concentrations in major gastrointestinal surgery, and to investigate whether the serum HMGB-1 levels correlate with the postoperative clinical course and the occurrence of organ dysfunction in such patients.

MATERIALS AND METHODS

Characteristics of the Patients

Twenty-eight patients with alimentary tract carcinoma, who underwent elective gastrointestinal surgery via a laparotomy and who was treated at the Department of Surgery I of the National Defense Medical College Hospital, were considered for this study. This study included six patients with esophageal cancer who underwent an esophagectomy and reconstruction with retrosternal gastric mobilization using a right posterolateral thoracotomy and laparotomy, five patients with gastric cancer who underwent a gastrectomy by a laparotomy, five patients with hepatic cancer who underwent a hepatectomy by a laparotomy, and 12 patients with colon cancer who underwent a colectomy by a laparotomy. Blood samples were taken from all patients before operation (Pre), on the first postoperative day (POD1), third postoperative day (POD3), fifth postoperative day (POD5), and seventh postoperative day (POD7).

This protocol was approved by the Institutional Review Board of National Defense Medical College Hospital.

Postoperative Clinical Course Evaluation

The criteria of SIRS were determined on POD1, POD3, POD5, and POD7. The development of SIRS was also considered. The criteria

TABLE 1

Clinical Features in Patients Undergoing Major Gastrointestinal Surgery

Age	61.8	6	2.9	y
Gender				
Male			22	
Female			6	
Primary causes				
Esophageal cancer			6	
Gastric cancer			5	
Hepatic cancer			5	
Colorectal cancer			12	
Operation time (min)	412.3	6	50.2	
Blood loss during operation (mL)	1155.0	6	197.0	
Duration of SIRS	1.49	6	0.4	
ICU stay (h)	37.2	6	17.6	

SIRS = systemic inflammatory response Syndrome; ICU = intensive care unit.

for SIRS include the presence of more than two of the following: body temperature $>38^{\circ}\text{C}$ or $<36^{\circ}\text{C}$; heart rate >90 bpm; respiratory rate >20 breaths/min or $\text{PaCO}_2 < 32$ Torr; and WBC count $>12,000$ cell/ mm^3 , <4000 cells/ mm^3 , or 10% immature (bands) forms. These criteria were based on those established by the Members of the American College of Chest Physicians/Society of Clinical Care Medicine Consensus Conference Committee [9]. In addition, the serum C-reactive protein (CRP) concentrations were measured at the same time points as one of the routine laboratory tests. The serum markers of liver function such as total bilirubin, AST, and ALT, those of renal function such as BUN and creatinine, and the degree of hypoxia according to the ratio of arterial oxygen tension (PaO_2) to the fractional concentration of inspired oxygen (FiO_2 : $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) were also evaluated.

HMGB-1 Analysis

All blood samples were centrifuged and the sera were stored at -80°C . The serum HMGB-1 concentration was measured at five time points (Pre, POD1, 3, 5, 7) by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; Central Institute, Shino-Test Corporation, Kanagawa, Japan).

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the Stat View 5.5 statistical software package (Abacus Concepts, Berkeley, CA). Differences between the two groups were evaluated by unpaired Student t-test and Fisher's exact probability test. The correlation between HMGB-1 and the duration of SIRS, the $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ratio, and heart rate were analyzed by the Spearman's correlation coefficient. All statistical significance was determined at $P < 0.05$.

TABLE 2

Time Course of Changes in Serum HMGB-1 Concentrations Following Major Gastrointestinal Surgery

	Before operation	POD1	POD3	POD5	POD7
HMGB-1 (ng/ml)	1.32 6 0.40	5.81 6 1.71*	6.78 6 1.46 ^y	3.69 6 0.97* ^z	2.36 6 0.76 ^x

POD = postoperative day.

* $P < 0.05$ versus before operation.

^y $P < 0.005$ versus before operation.

^z $P < 0.05$ versus POD3.

^x $P < 0.005$ versus POD3.

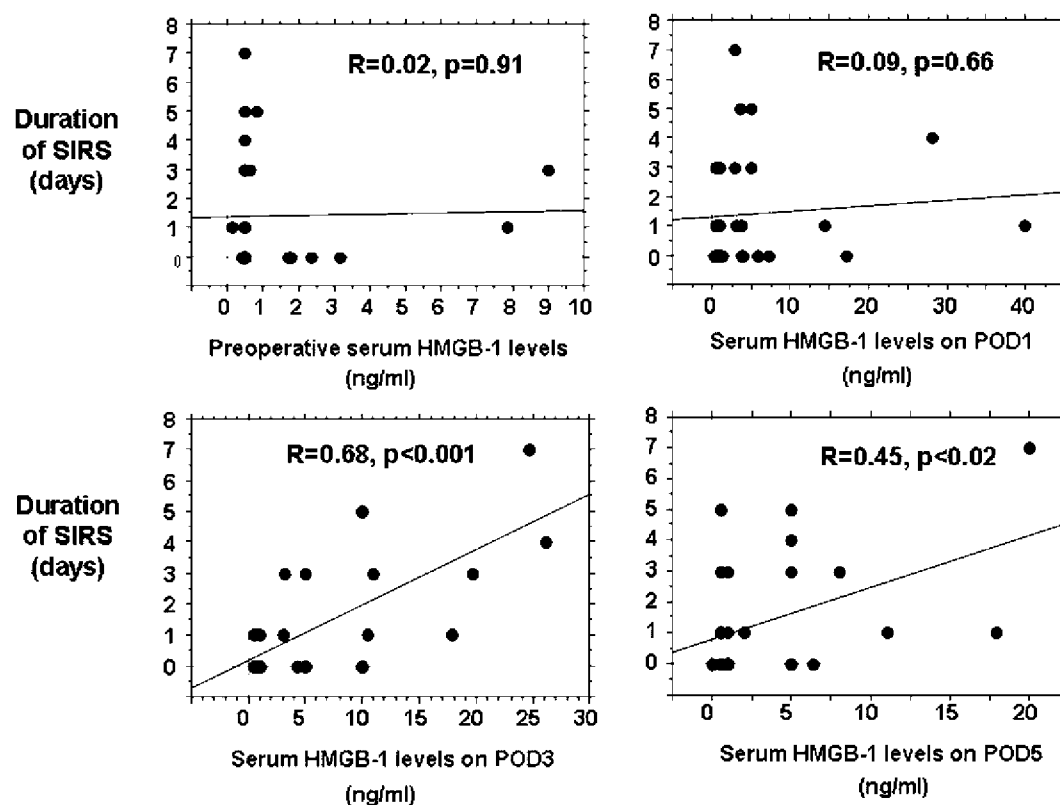


FIG. 1. Correlation between the serum HMGB-1 concentrations and the duration of SIRS. A statistically significant correlation was observed between the serum HMGB-1 concentrations on POD3 or POD5 and the duration of SIRS.

RESULTS

Patients Characteristics of Major Gastrointestinal Surgery

Twenty-eight patients with alimentary tract carcinoma who underwent elective gastrointestinal surgery were enrolled in this study. Clinical features in these patients are listed in Table 1. The mean operation times, blood loss during the operation, duration of SIRS, and ICU stay times are also listed in Table 1.

Time Course of Changes in Serum HMGB-1 Concentrations

The serum HMGB-1 concentrations increased gradually during the POD3 until reaching peak concentrations, and thereafter gradually decreased until POD7 (Table 2). The serum HMGB-1 concentrations on POD1, POD3, and POD5 were significantly higher than those of before operation. Furthermore, the serum HMGB-1 concentrations on POD5 and POD7 were significantly lower than those of POD3.

Correlation of Serum HMGB-1 Concentrations and the Duration of SIRS

There was a statistically significant correlation between serum HMGB-1 concentrations on POD3 and

the duration of SIRS ($r = 0.68$, $P < 0.001$), and a significant positive correlation was also found between serum HMGB-1 concentrations on POD5 and the duration of SIRS ($r = 0.45$, $P < 0.02$; Fig. 1). However, there was no significant correlation between the preoperative serum HMGB-1 concentrations or those seen on POD1 and the duration of SIRS.

Correlation of Serum HMGB-1 Concentrations and the Criteria of SIRS

There was a statistically significant correlation between the serum HMGB-1 concentrations on POD3 and the heart rate on POD3 or POD5 ($r = 0.51$, $P < 0.01$, $r = 0.56$, $P < 0.01$, respectively; Fig. 2A). Furthermore, a significant positive correlation was found between the serum HMGB-1 concentrations on POD5 and the heart rate on POD5 or POD7 ($r = 0.59$, $P < 0.01$, $r = 0.64$, $P < 0.001$, respectively; Fig. 2B). On the other hand, no significant correlation was seen between the serum HMGB-1 concentrations and the other criteria of SIRS (respiratory rate, body temperature, WBC). No significant correlation was seen between the serum HMGB-1 concentrations and the CRP levels.

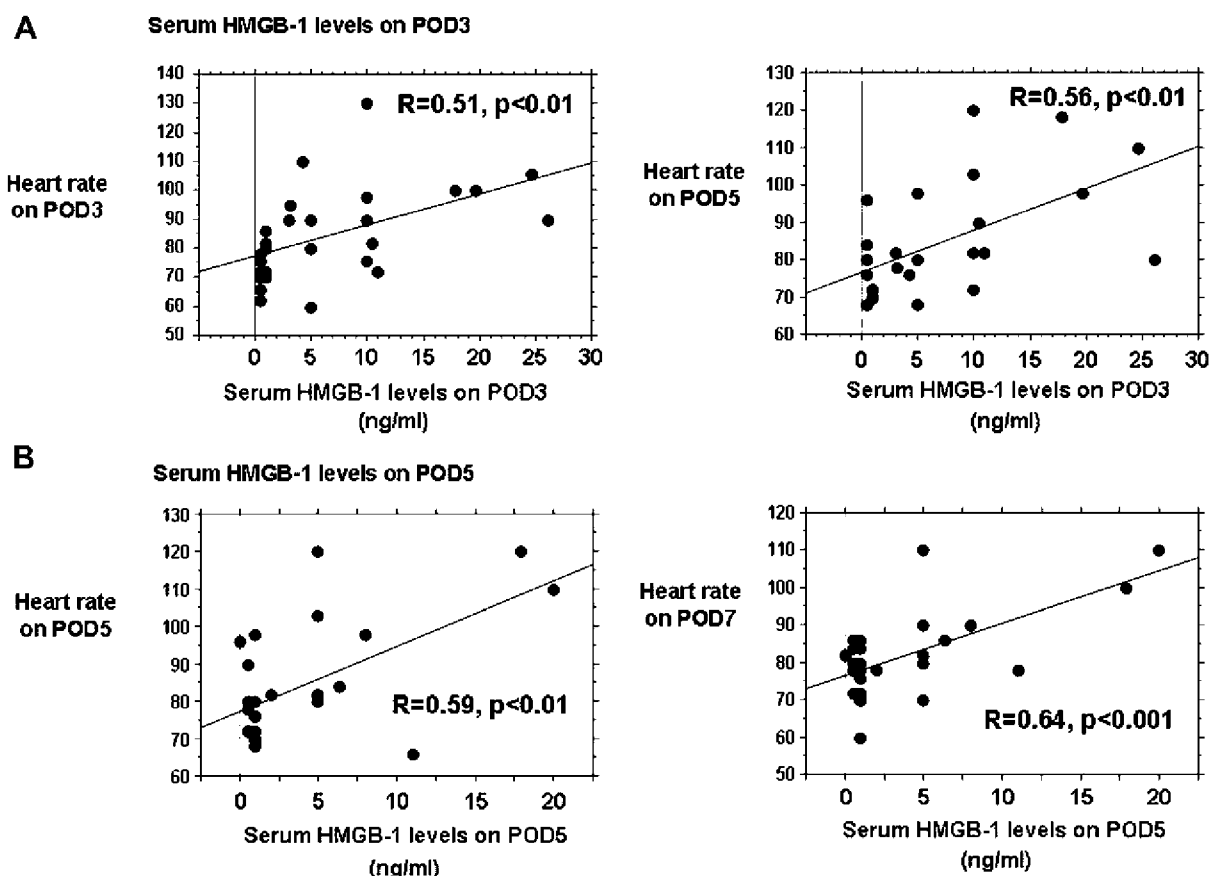


FIG. 2. Correlation of the serum HMGB-1 concentrations and the heart rate. There was a statistically significant correlation between the serum HMGB-1 concentrations on POD3 or POD5 and the heart rates on POD3, POD5, or POD7.

Correlation of Serum HMGB-1 Concentrations and Organ Function

There was a statistically significant negative correlation between the serum HMGB-1 concentrations and the PaO₂/FiO₂ ratio on POD3 ($r = -0.56$, $P < 0.01$, Fig. 3). No significant correlation was seen between the serum HMGB-1 concentrations on the preoperative day or POD1 and the PaO₂/FiO₂ ratio on POD1, POD3, or POD5.

No significant correlation was seen between the serum HMGB-1 concentrations and the liver or renal function (data not shown).

DISCUSSION

The current study revealed that the serum HMGB-1 levels increased significantly in comparison to the base line values following the major gastrointestinal

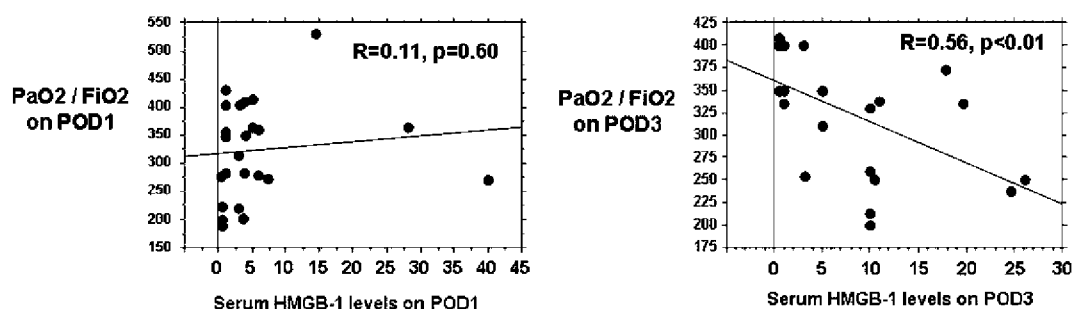


FIG. 3. Correlation between the serum HMGB-1 concentrations and the PaO₂/FiO₂ ratio. There was a statistically significant negative correlation between the serum HMGB-1 concentrations and the PaO₂/FiO₂ ratio on POD3.

surgery, and the peak levels of HMGB-1 correlated with the duration of SIRS and the degree of hypoxia according to PaO₂/FiO₂ ratio.

Previous studies showed that serum HMGB-1 levels increase in patients with sepsis [10], [11] and hemorrhagic shock [12]. HMGB-1 concentrations increase not only in critically ill patients with sepsis but also in patients free of sepsis with hemorrhagic shock. Suda et al. showed the postoperative serum HMGB-1 concentrations to possibly be a predictive marker for complications after an esophagectomy [13]. However, the role of HMGB-1 in humans, especially in patients undergoing major gastrointestinal surgery, which may lead to organ dysfunction, has not yet been fully investigated. Therefore, the current study evaluated the time course of serum HMGB-1 levels following major gastrointestinal surgery. Our results showed that the serum HMGB-1 concentrations are also increased in patients free of sepsis following invasive gastrointestinal surgery, and reached peak concentrations on POD3.

The present study evaluated the correlation of serum HMGB-1 levels and the criteria of SIRS and organ dysfunction. The role of HMGB-1 in humans; however, especially in SIRS following elective gastrointestinal surgery, which may lead to organ dysfunction such as acute lung injury (ALI), has not been fully investigated. The current data show that the peak HMGB-1 levels were significantly correlated with the duration of SIRS and heart rates. These data indicate that patients with high HMGB-1 concentrations may easily develop organ dysfunction. HMGB-1 binds to the receptor for advanced glycation end-products (RAGE) and stimulates cytokine synthesis through NF- κ B [14], thereby resulting in a vicious cycle of the enhanced production of proinflammatory cytokines induced by invasive surgery. We cannot explain the reason why a significant correlation was observed between the serum HMGB-1 levels and the heart rates, however, recent reports indicate that HMGB-1 may play a role in LPS-induced myocardial contractile dysfunction [15, 16].

Furthermore, there is a negative correlation between the peak HMGB-1 levels and the PaO₂/FiO₂ ratio. Previous reports indicated that the intratracheal injection of HMGB-1 results in the development of ALI, and blockade of HMGB-1 decreases the severity of LPS-induced ALI [7], thus implicating HMGB-1 as a mediator of sepsis-associated lung injury [17, 18]. HMGB-1 directly increases the permeability of enterocyte monolayers and impairs intestinal barrier function through a mechanism that depends on the formation of nitric oxide and peroxynitrite [19]. Similar effects on epithelial tight junctions in the lung by HMGB-1 would lead to the development of intestinal pulmonary edema, independent of any proinflammatory actions. Recently, high HMGB-1 concentrations were found in

the pulmonary epithelial lining fluid of patients with acute lung injury, suggesting that this mediator is present at the site of local tissue injury [20]. Bitto et al. reported that HMGB-1 expression correlates with poor outcome in lung injury patients [21]. The current data also show that serum HMGB-1 concentrations on POD3 are a predictive marker for postoperative pulmonary dysfunction after invasive gastrointestinal surgery. Our present study was designed to investigate whether the serum HMGB-1 levels correlate with the postoperative clinical course and the occurrence of organ dysfunction in patients with major gastrointestinal surgery. Therefore, the degree of hypoxia according to the ratio of arterial oxygen tension (PaO₂) to the fractional concentration of inspired oxygen (FiO₂: PaO₂/FiO₂) was evaluated as a pulmonary function. Although the evaluation with a chest radiograph was always performed in such patients, we used the P/F ratio as a surrogate method for evaluating pulmonary dysfunction in this study.

In conclusion, the serum HMGB-1 levels were observed to increase gradually after invasive gastrointestinal surgery and they reached peak levels on POD3, and these peak levels of HMGB-1 were found to correlate with the duration of SIRS and postoperative pulmonary dysfunction.

REFERENCES

1. Bone RC. Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: What we do and do not know about cytokine regulation. *Crit Care Med* 1996;24:163.
2. Aosasa S, Ono S, Mochizuki H, et al. Activation of monocytes and endothelial cells depends on the severity of surgical stress. *World J Surg* 2000;24:10.
3. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002;420:885.
4. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003;348:138.
5. Wang H, Bloom O, Zhang M, et al. HMGB-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 1999;285:248.
6. Bustin M. Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high mobility-group chromosomal proteins. *Mol Cell Biol* 1999;19:5237.
7. Abraham E, Arcaroli J, Carmody A, et al. HMGB-1 as a mediator of acute lung inflammation. *J Immunol* 2000;165:2950.
8. Bianchi ME, Manfredi AA. High-mobility group box 1 (HMGB1) protein at the crossroads between innate and adaptive immunity. *Immunol Rev* 2007;220:35.
9. Committee of the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992;20:864.
10. Hatada T, Wada H, Nobori T, et al. Plasma concentrations and importance of High Mobility Group Box protein in the prognosis of organ failure in patients with disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost* 2005;94:975.
11. Kosai K, Seki M, Yanagihara K, et al. Elevated levels of high mobility group box chromosomal protein-1 (HMGB-1) in sera from patients with severe bacterial pneumonia coinfecting with influenza virus. *Scand J Infect Dis* 2008;40:338.

12. Kim JY, Park JS, Strassheim D, et al. HMGB1 contributes to the development of acute lung injury after hemorrhage. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;288:L958.
13. Suda K, Kitagawa Y, Ozawa S, et al. Serum concentrations of high-mobility group box chromosomal protein 1 before and after exposure to the surgical stress of thoracic esophagectomy: A predictor of clinical course after surgery? *Dis Esophagus* 2006;19:5.
14. Yang H, Wang H, Tracey KJ. HMG-1 rediscovered as a cytokine. *Shock* 2001;15:247.
15. Hagiwara S, Iwasaka H, Uchino T, et al. High mobility group box 1 induces a negative inotropic effect on the left ventricle in an isolated rat heart model of septic shock: A pilot study. *Circ J* 2008;72:1012.
16. Xu H, Su Z, Wu J, et al. The alarmin cytokine, high mobility group box 1, is produced by viable cardiomyocytes and mediates the lipopolysaccharide-induced myocardial dysfunction via a TLR4/phosphatidylinositol 3-kinase gamma pathway. *J Immunol* 2010;184:1492.
17. van Zoelen MA, Ishizaka A, Wolthuis EK, et al. Pulmonary levels of high-mobility group box 1 during mechanical ventilation and ventilator-associated pneumonia. *Shock* 2008;29:441.
18. Parrish W, Ulloa L. High-mobility group box-1 isoforms as potential therapeutic targets in sepsis. *Methods Mol Biol* 2007;361:145.
19. Sappington PL, Yang R, Yang H, et al. HMGB1 B box increases the permeability of Caco-2 enterocytic monolayers and impairs intestinal barrier function in mice. *Gastroenterology* 2002;123:790.
20. Ueno H, Matsuda T, Hashimoto S, et al. Contributions of high mobility group box protein in experimental and clinical acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:1310.
21. Bitto A, Barone M, David A, et al. High mobility group box-1 expression correlates with poor outcome in lung injury patients. *Pharmacol Res* 2009;61:116.