

ウサギ脳損傷モデルにおけるインターロイキン-8(IL-8)の役割

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9393

ウサギ脳損傷モデルにおけるインターロイキン-8 (IL-8) の役割

金沢大学医学部医学科脳神経外科学講座 (主任: 山下純宏教授)

木 嶋 保

頭部外傷直後に続発する二次的障害は予後を悪化させる重要な因子である。脳損傷後の脳浮腫の発生とインターロイキン-8 (interleukin-8, IL-8) との関係に着目し、ウサギ凍結脳損傷モデルを用いて抗IL-8中和抗体による脳浮腫の治療の可能性を検討した。正常対照群および偽手術群の脳水分含有率はそれぞれ79.3±0.1%, 79.3±0.1%であった。凍結脳損傷モデル6時間後, 12時間後, 24時間後, 48時間後, 72時間後の脳水分含有率はそれぞれ82.5±0.3%, 83.2±0.2%, 83.9±0.2%, 84.0±0.2%, 81.8±0.2%であった。6時間後から24時間後までは経時的に増加し24~48時間後で最大となった。病理組織学的に好中球主体の炎症細胞は6時間後にクモ膜下腔細静脈内皮細胞へ接着し, さらに血管外クモ膜下腔へ浸潤した。脳実質内壊死巣にはリンパ球優位の炎症細胞を認めた。また壊死巣周囲の脳浮腫組織に多数の小出血斑を認めた。24時間後には好中球主体の炎症細胞が壊死巣辺縁を取り囲み, 脳浮腫組織の出血斑は増加していた。72時間後では好中球主体の炎症細胞は辺縁よりさらに内部に浸潤し, 脳浮腫組織の出血斑は減少した。7日後では炎症細胞は壊死巣中心部に凝集し脳浮腫組織の出血斑は消失して反応性星状膠細胞の増殖を認めた。IL-8の免疫組織化学染色では6時間後に好中球およびリンパ球に陽性所見を認めた。脳損傷直後に抗IL-8中和抗体を静脈内投与すると脳水分含有率やアルブミンの血管外漏出は減少し, 脳浮腫組織の出血も抑制された。また好中球主体の炎症細胞の浸潤も抑制された。以上の結果より脳損傷後の脳血液関門 (blood-brain barrier) の透過性や好中球の浸潤にIL-8が関与していると考えられ, 脳損傷後の浮腫などの二次的損傷に対して抗IL-8中和抗体投与による治療の可能性が示唆された。

Key words brain edema, cold injury, interleukin-8 (IL-8), neutrophil

頭部外傷直後に続発する二次的障害は予後を悪化させる重要な因子である。この二次的障害は臨床的には脳浮腫の増大として認められ, 治療は主に浸透圧利尿薬投与に頼っているのが現状である^{1)~4)}。脳浮腫の原因としていくつかのメカニズムが報告されているが, 総じて神経細胞, 星状膠細胞, 血管内皮細胞を含む脳実質や毛細血管などの炎症に対する反応と考えられている⁵⁾。二次的脳損傷の機序としては血液脳関門 (blood-brain barrier, BBB) の破壊に伴う脳浮腫の発生⁶⁾, 浸潤した炎症細胞から放出される活性酸素や蛋白分解酵素による組織障害^{7,8)}, 細胞外の興奮性アミノ酸増加に伴う細胞内カルシウム濃度上昇による神経細胞死⁹⁾などが挙げられているが, その病態はいまだ完全には解明されていない¹⁰⁾。最近の報告では, 二次的損傷の病態に好中球が重要な役割を果たしていると考えられている^{11,12)}。好中球は血管内皮細胞と接着し, 内皮細胞に障害を与え, BBBを破壊するだけでなく, 脳実質に浸潤し種々の細胞障害物質を放出して脳組織を障害する¹³⁾。また, 好中球減少症モデルや, あるいは好中球の血管内皮への接着阻止が脳損傷後の二次的損傷を軽減する^{14)~17)}。

近年, 好中球浸潤が強い免疫複合体型急性糸球体腎炎¹⁸⁾や敗血症誘導性成人呼吸窮迫症候群 (adult respiratory distress

syndrome, ARDS)¹⁹⁾の実験モデルにおいてインターロイキン-8 (interleukin-8, IL-8) が検出され, 抗IL-8中和抗体の投与によって二次的障害が抑制されることが報告されている。また, 脳虚血後再灌流障害モデル²⁰⁾においてもIL-8の検出と抗IL-8中和抗体の投与により脳浮腫が抑制されることが報告されておりBBBとIL-8の関与が注目されている。

IL-8はリポ多糖体 (lipopolysaccharide, LPS) 刺激ヒト末梢血単核球の培養上清より精製されたケモカイン²¹⁾で, 72個のアミノ酸よりなり²²⁾, 分子量は約8,000である。IL-8は好中球走化性作用を有するのみならず, 好塩基球やT細胞の活性化, 骨髄より末梢血への好中球の動員, 好中球を活性化してリソゾーム酵素の放出, 活性酸素の産生誘導^{23,24)}, ロイコトリエンB4 (leukotriene B4, LTB4)の産生誘導^{25,26)}などの働きをする。また, IL-8はウサギにも存在するが, 齧歯類 (マウス, ラット) には存在しない²⁷⁾。ウサギIL-8はヒトIL-8と高い相同性を認め, ヒト抗IL-8中和抗体によって中和される²⁸⁾。このことより, IL-8に関する動物実験モデルには主にウサギが用いられている。

以上より, 脳損傷後の二次的損傷におけるIL-8の関与, および抗IL-8中和抗体投与により二次的損傷の抑制効果を検討するため, ウサギ凍結脳損傷モデルを用いて実験を行った。

平成10年11月25日受付, 平成10年12月28日受理

Abbreviations : ARDS, adult respiratory distress syndrome; BBB, blood-brain barrier; IL-1, interleukin-1; IL-8, interleukin-8; LTB4, leukotriene B4; LPS, lipopolysaccharide; LT, leukotriene; PBS, phosphate-buffered saline

対象および方法

I. 実験動物

体重2.7～3.0 kgのニュージーランド種雌ウサギ(ニノックスラボサプライ, 石川) 72羽を用いた。硫酸アトロピン(田辺, 東京) 0.2 mg/kgと塩酸ケタミン(三共, 東京) 65 mg/kgの筋肉内注射により麻酔した。

II. 実験モデルの作製

左頭頂部に約3 cmの皮膚切開を加え頭蓋骨を露出した。冠状縫合上で矢状縫合より左側へ7 mmの点を中心に歯科用ドリルで頭蓋骨に内板のみを薄く残すように直径10 mmの穴を開けた。液体窒素を満たした直径8 mmのアルミ製凍結損傷用プローブを頭蓋骨内板に60秒間圧着した後に皮膚縫合した。

1. 凍結脳損傷群

凍結脳損傷6時間後(5羽), 12時間後(6羽), 24時間後(6羽), 48時間後(5羽), 72時間後(5羽), 7日後(3羽)に脳組織を摘出した。

2. 対照群

正常対照群(7羽)および偽手術群として頭蓋骨を内板のみ薄く残した群(7羽)を作成した。後者は48時間後に脳組織を摘出した。

3. 抗IL-8中和抗体投与群

上記と同じ脳損傷モデルにおいて, 凍結脳損傷後に10 mgの Maus抗ヒトIL-8モノクローナル中和抗体(WS-4)²⁸⁾を10 mlの生理食塩水で希釈し, 耳静脈から10分間で静脈内投与し6時間後(3羽), 24時間後(8羽), 72時間後(3羽)に脳組織を摘出した。対照実験としてミエローマ蛋白(p3.6.2.8.1)²⁹⁾10 mgを同様に静脈内投与し6時間後(3羽), 24時間後(8羽), 72時間後(3羽)に脳組織を摘出した。

III. 脳水分含有率測定³⁰⁾

大腿動脈切開にて脱血後, 断頭し直ちに脳組織を摘出した。健側大脳半球および小脳を切除し患側大脳半球のみを測定した。まず脳組織の乾燥前の重量(湿重量)を測定し, 次に乾燥器(120℃)の中で48時間置き乾燥させた後の重量(乾燥重量)を測定し, 以下の式により脳水分含有率を算出した(乾燥重量法)。

$$\text{脳水分含有率(\%)} = (\text{湿重量} - \text{乾燥重量}) / (\text{湿重量}) \times 100$$

IV. 脳浮腫指数測定³⁰⁾

乾燥重量法で求めた正常脳と脳挫傷脳の水分含有率から下記の式で算出した。(swelling percentage)

$$\text{脳浮腫指数(\%)} =$$

$$(\text{挫傷脳の水分含有率} - \text{正常脳の水分含有率}) / \text{正常脳の水分含有率} \times 100$$

V. 病理組織学的検討

脳損傷後のウサギを麻酔下に, 0.1Mリン酸緩衝生理食塩水(phosphate-buffered saline, PBS)に4%パラフォルムアルデヒドを加えた固定液400 mlを上行大動脈より注入し灌流固定を行った。直ちに脳組織を摘出し同固定液による48時間の浸漬固定を追加した。パラフィン包埋後4 μmの組織切片を作製し, HE染色およびKlüver-Barrera染色を行った。

VI. 免疫組織化学的検討

免疫染色はアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体(avidine-biotin-peroxidase complex)法とマイクロウエーブ迅速試料処理装置MI-77型(東屋医科機械, 東京)を用いる賦活法に

行った。パラフィン切片を脱パラフィンしPBSで洗浄後, 抗原賦活処理を行った。広口ビーカーに0.1Mクエン酸緩衝液とスライドガラスを入れ, 400W, 90℃で連続15分間煮沸反応を行った。0.3%過酸化水素加メタノールで内因性ペルオキシダーゼを失活させ, PBSで洗浄後, 非特異的反応抑制のため5%スキムミルク(Difco Laboratories, Detroit, USA)を1時間作用させた。一次抗体, 二次抗体, およびアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ反応はマイクロウエーブ(出力300Wで3分間の間欠照射)を使用した。アルブミン免疫染色の一次抗体としてヤギ抗ウサギアルブミンIgG抗体(Organon Teknika Corporation, Durham, USA)を8 μg/mlに希釈し反応させた。二次抗体としてビオチン標識マウス抗ウマIgG抗体(Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA)を反応させた。また, IL-8免疫染色では一次抗体として120 μg/mlに希釈したWS-4を反応させた。対照として同濃度に希釈したマウスミエローマ蛋白(p3.6.2.8.1)をWS-4のかわりに用いて同様の操作を行った。二

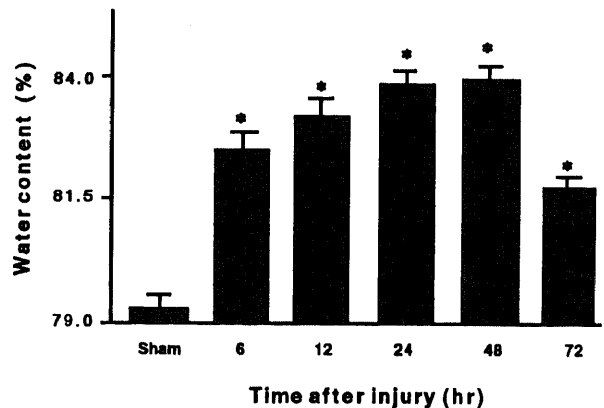


Fig. 1. Water content in the injured hemisphere 6, 12, 24, 48, 72 hr and 7 days after a cold injury. Water content gradually increases and reaches its peak 24-48 hr after injury. Data are shown as $\bar{x} \pm \text{SEM}$. * $p < 0.05$ (Student's t test).

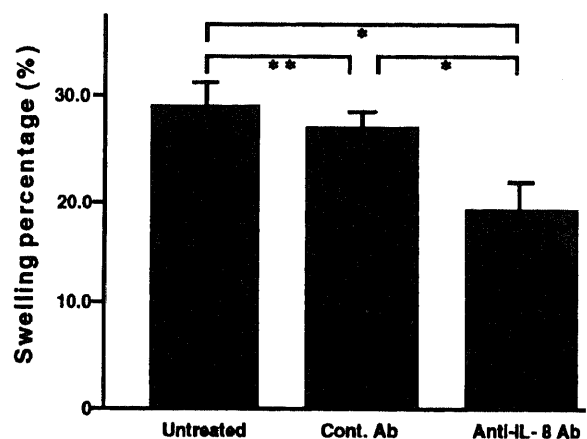


Fig. 2. Effect of anti-IL-8 antibody on brain edema measured by dry-wet method. Brain edema is determined as swelling percentage. Administration of anti-IL-8 antibody decreased the swelling percentage of the damaged hemisphere. Data are shown as $\bar{x} \pm \text{SEM}$. * $p < 0.05$ (Student's t test), ** not significant.

次抗体としてビオチン標識ヤギ抗マウスIgG抗体 (DAKO, Glostrup, Denmark) を反応させた。各反応後にPBSで洗浄した。アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合法と0.005%過酸化水素加0.02%ジアミノベンチジン (3-3'-diaminobenzidine) (Sigma, St.Louis, USA) 処理により発色させ、ヘマトキシリンで核染色を行った。アルブミンの免疫染色はWS-4投与群、およ

びミエローマ蛋白投与群とも同時に施行した。

Ⅶ. 統計学的検討

得られた成績はすべて $\bar{x} \pm \text{SEM}$ にて表記した。統計学的有意差はF検定による等分散の検定を行い、分散が等しい時にはStudentのt検定を、等しくない時にはWelchのt検定を行った。危険率5%未満をもって有意差ありと判定した。

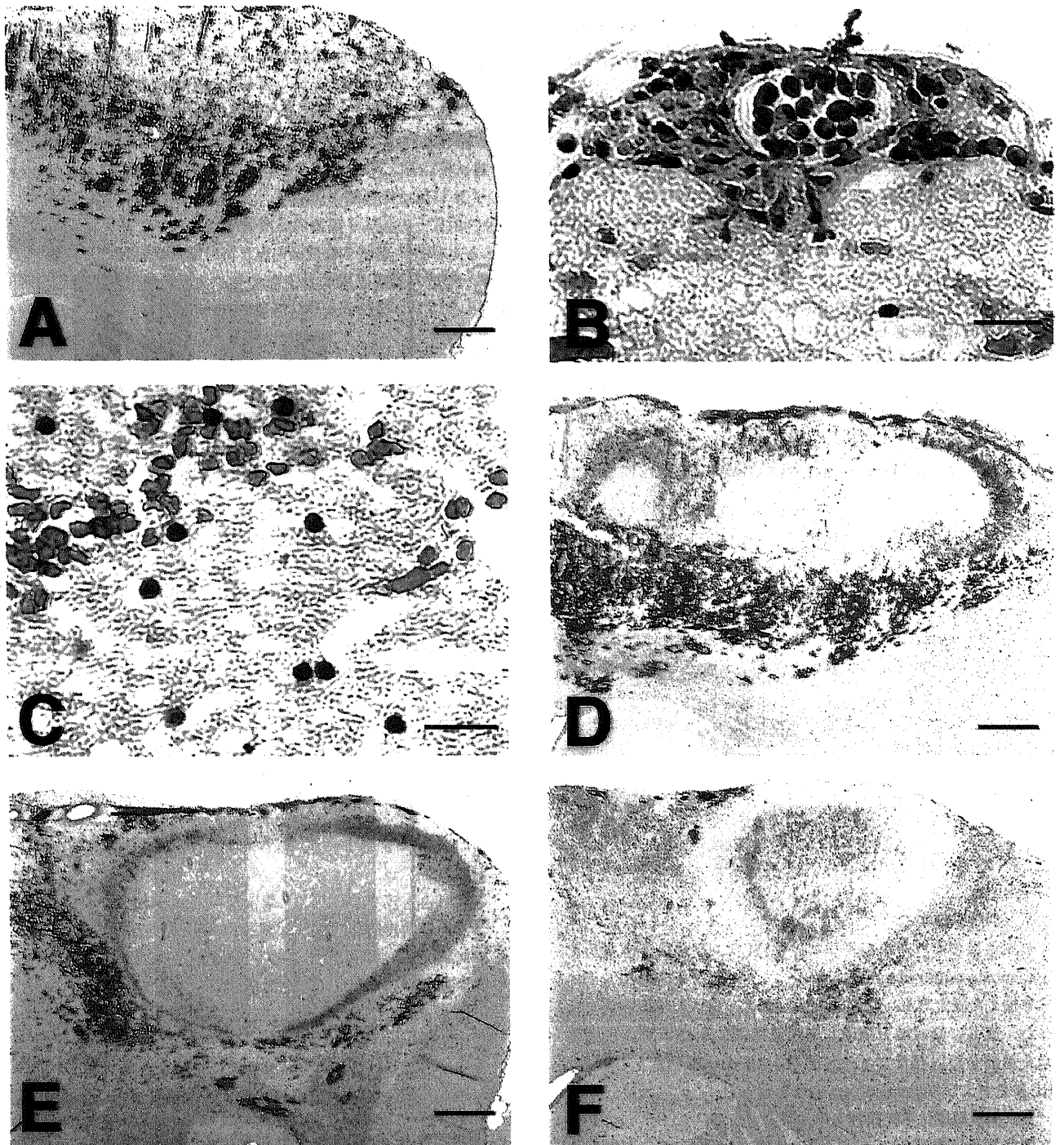


Fig. 3. Histology of inflammatory cell reaction following brain cold injury. (A, B, C) 6hr, (D) 24hr, (E) 72hr, (F) 7days after the injury. Neutrophils are aggregated in the subarachnoid venule (B). Lymphocytes are infiltrated in the necrotic area of brain parenchyma (C). Bar = 1mm (A, D, E, F). Bar = 25 μm (B, C).

成 績

I. 凍結脳損傷モデルにおける脳水分含有率の変化

正常対照群および偽手術群の脳水分含有率はそれぞれ79.3 ± 0.1%, 79.3 ± 0.1%であった。凍結脳損傷後6時間, 12時間, 24時間, 48時間, 72時間の脳水分含有率はそれぞれ82.5 ± 0.3%, 83.2 ± 0.2%, 83.9 ± 0.2%, 84.0 ± 0.2%, 81.8 ± 0.2%であった。6時間から24時間までは経時的に増加し24~48時間で最大となった。72時間後には減少した(図1)。この結果より脳水分含有率が最大となる24~48時間が最も脳浮腫が最大になると判断し凍結脳損傷24時間後のモデルでWS-4投与の効果と比較検討した。非投与群の脳浮腫指数は28.9 ± 1.9%であった。ミエローマ蛋白投与群では脳浮腫指数は25.8 ± 1.9%であった。WS-4投与群では脳浮腫指数は18.7 ± 2.4%であった。

WS-4投与群では, 非投与群およびミエローマ蛋白投与群に比べて脳浮腫指数は有意に ($p < 0.05$) 低下した。非投与群とミエローマ蛋白投与群では脳浮腫指数に有意差は認めなかった(図2)。

II. 病理組織学的検討

凍結脳損傷6時間後のモデルでは好中球主体の炎症細胞のクモ膜下腔細静脈内皮細胞への接着, およびクモ膜下腔への浸潤を認めた(図3, A, B)。また脳実質内壊死巣にはリンパ球優位の浸潤を認めた(図3, C)。壊死巣周囲の脳浮腫組織に多数の小出血斑を認めた。好中球主体の炎症細胞の浸潤は24時間後には壊死巣辺縁部に及んでいた。壊死巣のリンパ球は減少し, 脳浮腫組織の出血斑は増加していた(図3, D)。72時間後では好中球主体の炎症細胞は壊死巣を取り囲む様に分布した。脳浮腫組織の出血斑は減少した(図3, E)。7日後には壊死巣の中心部に凝

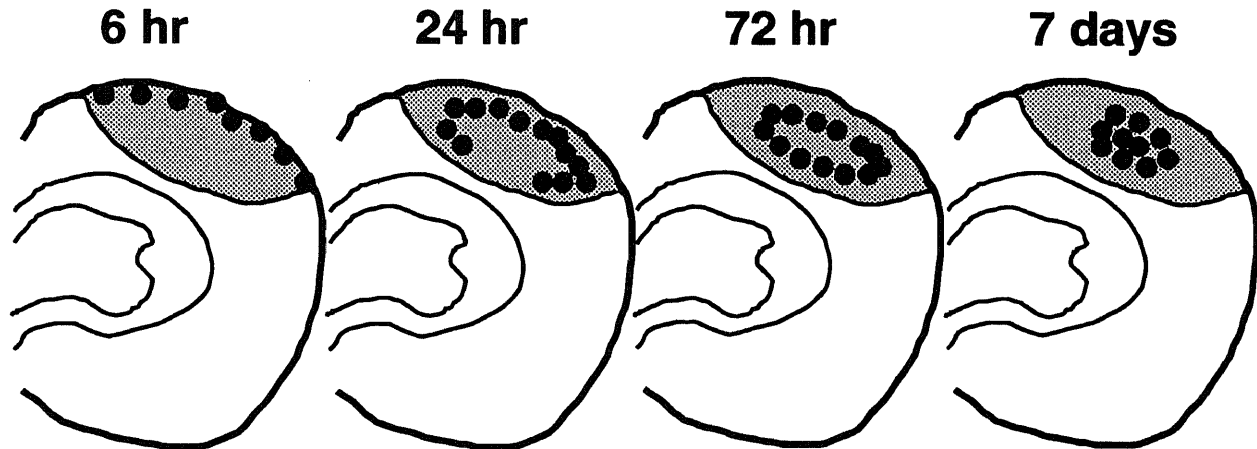


Fig. 4. A diagram showing the temporal profile of neutrophil infiltration into the brain following a cold injury. Neutrophils are infiltrated in the subarachnoid space (6hr), seen distributed in peripheral rim of the necrotic area (24hr), then, surround the area (72hr), and finally aggregate in the center (7days). ●, neutrophils; gray area, necrotic area.

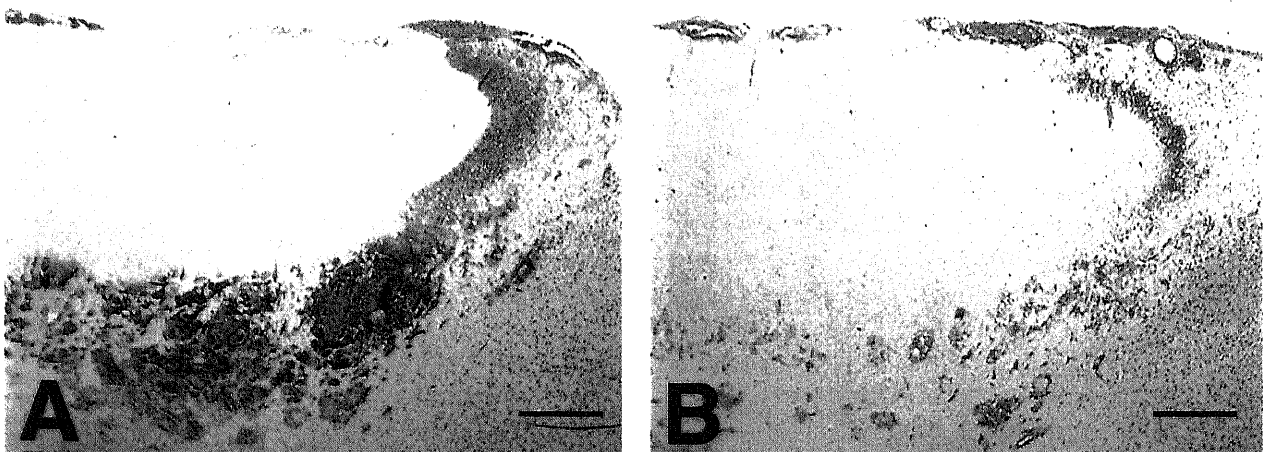


Fig. 5. Histology showing the effect of anti-IL-8 antibody on secondary brain injury following a cold injury. Neutrophil infiltration in the necrotic area and hemorrhage in the edematous tissue are diminished by the administration of anti-IL-8 antibody. A control antibody-treated rabbit 24hr after the injury (A). An anti-IL-8 antibody-treated rabbit (B). Bar = 1mm. Klüber-Barrera stain.

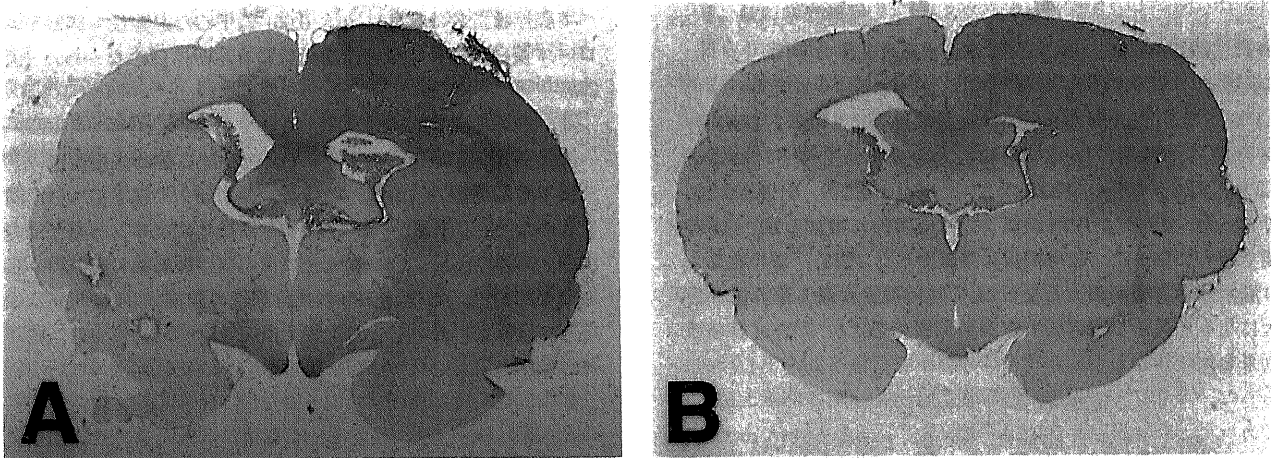


Fig. 6. Immunohistochemistry for serum albumin 24hr following a cold injury. In a control antibody-treated rabbit extravasated serum albumin immunoreactivity is seen in the contralateral hemisphere as well as in the injured hemisphere(A). In an anti-IL-8 antibody-treated rabbit, the immunoreactivity is confined within the vicinity of the necrotic area (B).

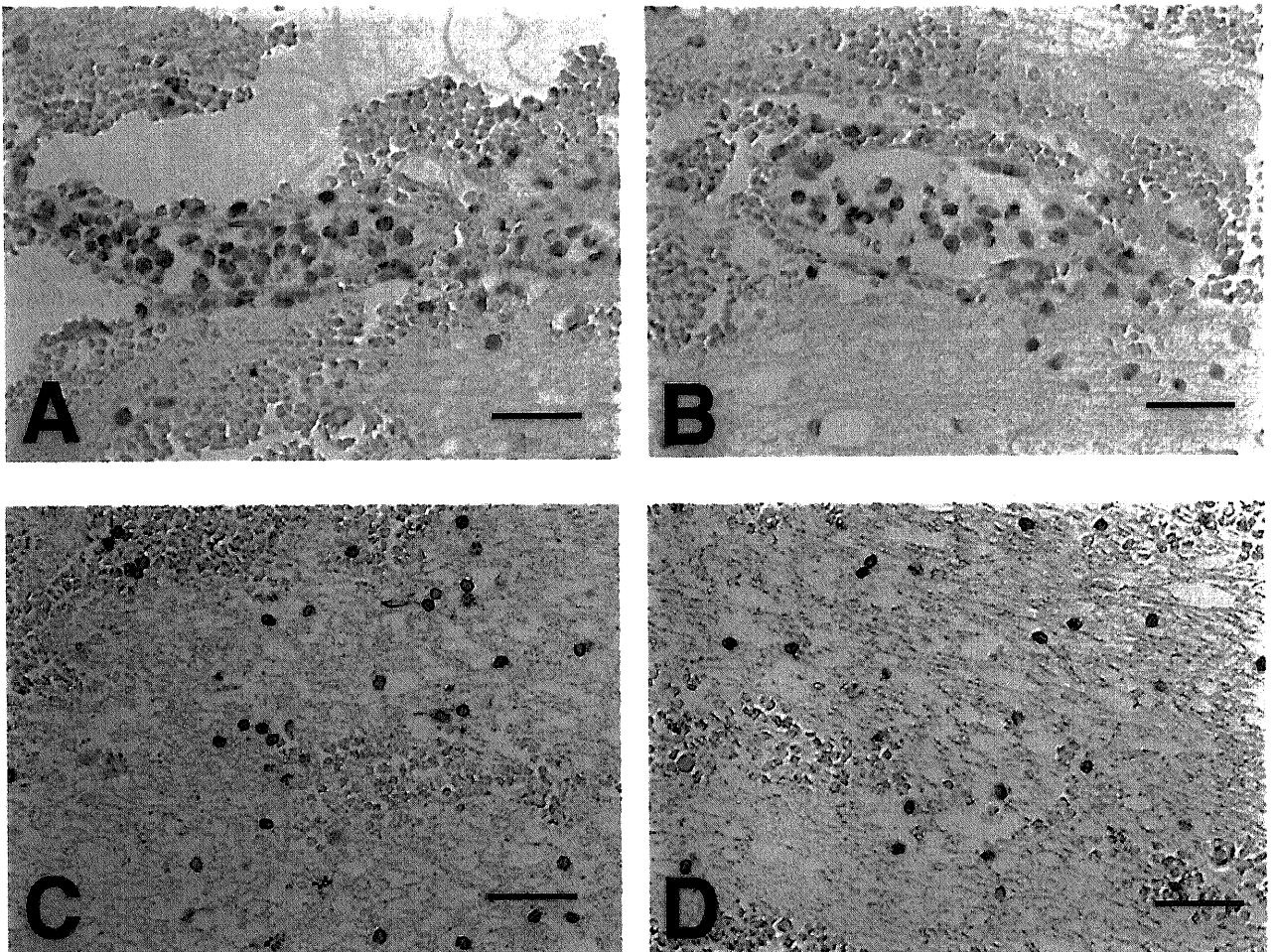


Fig. 7. Immunohistochemistry for IL-8 6hr following a cold injury. IL-8 is positive on neutrophils (A) and lymphocytes (C) infiltrated in the necrotic area. Negative control on each serial sections (B, D) Bar = 50 μ m .

集する炎症細胞を認め、脳浮腫組織の出血斑はほぼ消失し反応性星状膠細胞が増殖していた(図3, F)。以上の炎症細胞の浸潤を主とする組織学的変化を図4に図式的に示した。

凍結脳損傷24時間後のモデルでWS-4投与の効果と比較検討した。ミエローマ蛋白投与群では、非投与群と同様に壊死巣辺縁への好中球を主とする炎症細胞の浸潤、および脳浮腫組織の出血斑を多数認めた(図5, A)。WS-4投与群では好中球主体の炎症細胞の浸潤、および脳浮腫組織の出血斑は抑制されていた(図5, B)。

Ⅲ. 免疫組織化学的検討

凍結脳損傷24時間後のアルブミン免疫染色においてはWS-4投与群(図6, B)ではミエローマ蛋白投与群(図6, A)に比べて陽性部分の面積の縮小と染色性の低下を認めた。

凍結脳損傷6時間後の免疫染色では、好中球(図7, A)およびリンパ球(図7, C)に陽性所見を示した。凍結脳損傷12時間以後ではIL-8陽性細胞は認めなかった。対照としてミエローマ蛋白を一次抗体として用いたものでは、すべて陰性であった(図7, B, D)。

考 察

脳は再生機能を持たず、しかも機能が局在するため外傷にきわめて弱い臓器の一つである。脳の一時的損傷は外傷そのものを防ぐ以外現段階では治療は困難である。しかし、外傷後の脳組織の二次的損傷に関しては損傷部位の広がりを抑制できると考えられている。近年、各臓器で急性炎症に伴う組織の二次的損傷の発生に好中球が重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。活性化した好中球が血管内皮に接着し、内皮細胞に損傷を与えることにより血管透過性を亢進させて浮腫を生じたり、組織に浸潤した好中球が活性酸素などの組織障害物質を放出して組織をさらに損傷すると考えられている^{6)~13)}。脳損傷においてもこのような機構が働いていると考えられている。具体的には好中球減少症、Mac-1に対する抗体投与、補体リセプターI型(CR-1)投与により好中球の浸潤や脳浮腫の抑制が認められている^{14)~17)}。好中球の血管外への遊走には接着分子が重要な働きをなし、IL-8はこれらの細胞接着分子の活性を高めるとされている。IL-8は好中球に対しMac-1やリンパ球機能抗原(lymphocyte function antigen)-1などの細胞接着分子の活性を高める^{31)~33)}のみではなく好中球の走化性、形態変化、細胞内リソゾーム酵素の放出、補体第5成分の活性化³⁴⁾、活性酸素³⁵⁾³⁶⁾やLTB₄の産生^{37)~39)}の誘導など多彩な作用が認められる。実際、急性炎症モデルで抗IL-8中和抗体投与による炎症抑制作用が報告されている。具体的には肺虚血再灌流障害モデルにおいては肺組織への好中球の浸潤を抑制し⁴⁰⁾、免疫複合体急性糸球体腎炎モデルでは糸球体への好中球の浸潤やタンパク尿の出現を抑制し¹⁸⁾、脳虚血後再灌流障害モデルではBBBの透過性が抑制され²⁰⁾、LPS/IL-1誘導性関節炎モデルにおいては関節腫脹、軟骨破壊、好中球や単核球の浸潤が抑制され⁴¹⁾、ARDS様肺障害モデルにおいては肺組織への好中球の浸潤とそれに伴う肺浮腫、ならびに肺胞構造の破壊を著明に抑制する¹⁹⁾。脳損傷後の脳浮腫は、BBBの透過性亢進による血液由来の浮腫液が細胞間隙に浸出する機序、すなわち血管原性浮腫(vasogenic edema)と脳実質細胞の細胞膜障害により細胞内液が増加し膨化する機序、すなわち細胞毒性浮腫(cytotoxic edema)が組み合わさって発生する⁶⁾⁴²⁾。今回の実験に用いた凍

結脳損傷モデルは脳皮質細胞の局所的な急性壊死と壊死巣辺縁の脳細胞の脳血管透過性の亢進をきたし血管原性浮腫と好中球の浸潤がおこると考えられている⁵⁾。脳浮腫の経時的変化を見ると、6時間後から脳水分含有率は増加し24時間後で最大となった。72時間後に脳水分含有率は減少し、このモデルでの脳浮腫が最も強くなるのは24~48時間であった。この結果は、これまで報告されているラットやネコなど他の実験動物を用いた凍結脳損傷モデルでの脳浮腫の経時的変化とほぼ同じであり⁴³⁾⁴⁴⁾、脳浮腫を評価するモデルとして妥当と思われた。脳浮腫が最大となる24時間後のモデルで検討すると、ミエローマ蛋白投与群に比べてWS-4投与群では脳浮腫指数は有意に減少した。また、血清アルブミンの血管外漏出を評価するアルブミンの免疫染色⁴⁵⁾では、ミエローマ蛋白投与群に比べWS-4投与群は形態的に脳浮腫が減少した。また、脳浮腫組織の出血斑は24時間後に最も増化する傾向を認めたが、WS-4投与により出血斑は減少した。BBBの透過性の亢進は脳浮腫、アルブミンの漏出や脳浮腫組織の出血を引き起こすと考えられ、これらの結果はBBBの透過性が抑制されたことによる二次的脳損傷の軽減を示している。以上より抗IL-8中和抗体はBBBの透過性を抑制し二次的脳損傷としての脳浮腫抑制作用があると考えられた。

本研究のモデルで壊死巣に浸潤した炎症細胞のほとんどは分葉状の多形核を有した細胞であり形態的に好中球であった。損傷後6時間後では好中球はクモ膜下腔の細静脈血管内皮細胞に接着していた。この所見は一般に組織で炎症急性期に炎症細胞が細静脈より血管外の組織に浸潤するメカニズムと同様に考えられる⁴⁵⁾。また、最初にクモ膜下腔の血管にこのような変化が見られたことは、脳実質内の血管よりもクモ膜下腔の血管がより透過性が高いことで説明される。24時間後では好中球を主とする炎症細胞は、クモ膜下腔から脳表部の壊死巣辺縁部に多く分布した。この所見は、クモ膜下腔から拡張した血管周囲腔(Virchow-Robin space)に分布した好中球が、脳実質へと浸潤したものと考えられる。72時間後では好中球は壊死巣を完全に取り囲む様に辺縁に分布した。この所見は脳実質血管の透過性が最も亢進した際に直接脳実質に浸潤した好中球と、クモ膜下腔から浸潤してきた好中球で形成されたものと考えられる。辺縁に存在した好中球は7日後には壊死巣中心部に向かって凝集した。この機序に関してはIL-8の関与は不明である。また、7日後では壊死巣辺縁や脳浮腫組織に相当する部分には、反応性星状膠細胞の増殖が顕著に見られた。これは凍結脳損傷に対する脳組織の修復反応と捉えることができる⁴⁶⁾。本研究でWS-4投与により、浸潤細胞の減少を認めたことから抗IL-8中和抗体はBBBの透過性を抑制するだけでなく、好中球主体の炎症細胞の血管外への遊走も抑制すると考えられる。また、ラットによる凍結脳損傷モデルでの好中球浸潤の報告もなされているが、我々のモデルよりはるかに炎症細胞の浸潤は弱い⁴⁷⁾。これはIL-8が齧歯類に存在しないことと深く関係し、IL-8が好中球の血管内皮への接着と血管外への遊走に関与していることを裏づける所見であると考えられる。

IL-8の免疫染色は6時間後でのみ陽性であった。これはIL-8の産生が炎症の早期に限られるという報告と一致する。陽性細胞は好中球とリンパ球に認められたが、これは受容体に結合したIL-8、もしくは産生したIL-8が陽性所見を呈したとも考えられる^{48)~50)}がさらに検討を要するところである。

結 論

脳損傷後の二次的損傷におけるIL-8の関与のついて検討するために、ウサギを用いた凍結脳損傷モデルを作成した。抗IL-8中和抗体の投与より二次的損傷の軽減が可能かどうか検討し、以下の結論を得た。

1. 凍結損傷モデルで脳浮腫は24～48時間で最大となった。
2. 組織学的には、6時間後に好中球主体の炎症細胞はクモ膜下腔細静脈内皮細胞への接着およびクモ膜下腔への浸潤を認めた。脳実質への浸潤は、6時間後ではリンパ球優位で、その後は好中球主体の浸潤を認めた。
3. 抗IL-8中和抗体の静脈内投与により、BBBの透過性が抑制され、脳浮腫および浮腫組織の出血の軽減を認めた。
4. 抗IL-8中和抗体の静脈内投与により、脳損傷後の好中球主体の炎症細胞の浸潤が抑制された。
5. 免疫組織化学染色により、好中球およびリンパ球にIL-8の陽性所見を認めた。

以上より脳損傷後の二次的損傷にIL-8が関与しており、抗IL-8中和抗体の投与により二次的損傷を抑制することが可能であると考えられた。今後、脳損傷後の二次的損傷に対して抗IL-8中和抗体をはじめとしたIL-8アンタゴニストの臨床応用が期待される。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と後校閲を賜りました金沢大学医学部脳神経外科学講座山下純宏教授に深甚なる謝辞を表します。また、終始直接の御指導を賜りました同教室の木多真也講師に心から感謝いたします。抗体を提供していただきました東京大学医学部・大学院医学系研究科社会医学専攻衛生学松島綱治教授に深く御礼申しあげます。最後に御支援と御協力を頂きました金沢大学脳神経外科学講座の皆様にも心から感謝いたします。

なお、本研究の一部は第11回「脳と免疫」研究会(1998, 金沢)において発表した。

文 献

- 1) Shackford SR, Mackersie RC, Holbrook TL, Davis JW, Hollingsworth FP, Hoyt DB, Wolf PL. The epidemiology of traumatic death. A population-based analysis. *Arch Surg* 128: 571-5, 1993
- 2) Wald SL, Shackford SR, Fenwick J. The effect of secondary insults on mortality and long-term disability after severe head injury in a rural region without a trauma system. *J Trauma* 34: 377-81, 1993
- 3) Chesnut RM, Marshall LF, Klauber MR, Blunt BA, Baldwin N, Eisenberg HM, Jane JA, Marmarou A, Foulkes MA. The role of secondary brain injury in determining outcome from severe head injury. *J Trauma* 34: 216-22, 1993
- 4) Faden AI, Salzman S. Pharmacological strategies in CNS trauma. *Trends Pharmacol Sci* 13: 29-35, 1992
- 5) 伊藤梅男. 脳浮腫研究の最近の動向. *神経外傷* 17: 129-154, 1994
- 6) Klatzo I, Piraux A, Laskowski EJ. The relationship between edema, blood-brain barrier and tissue elements in a local brain injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 17: 548-564, 1958
- 7) Bullock R, Kuroda Y, Teasdale GM, McCulloch J. Prevention of post-traumatic excitotoxic brain damage with NMDA antagonist drugs: a new strategy for the nineties. *Acta Neurochir Suppl Wien* 55: 49-55, 1992
- 8) Lindsberg PJ, Hallenbeck JM, Feuerstein G. Platelet-activating factor in stroke and brain injury. *Ann Neurol* 30: 117-29, 1991
- 9) Tymianski M, Tator CH. Normal and abnormal calcium homeostasis in neurons: a basis for the pathophysiology of traumatic and ischemic central nervous system injury. *Neurosurgery* 38: 1176-95, 1996
- 10) Gennarelli TA. Mechanisms of brain injury. *J Emerg Med* 1: 5-11, 1993
- 11) Bednar MM, Raymond S, McAuliffe T, Lodge PA, Gross CE. The role of neutrophils and platelets in a rabbit model of thromboembolic stroke. *Stroke* 22: 44-50, 1991
- 12) Zhuang J, Shackford SR, Schmoker JD, Anderson ML. The association of leukocytes with secondary brain injury. *J Trauma* 35: 415-22, 1993
- 13) Wilson JT, Gross CE, Bednar MM, Shackford SR. U83836E reduces secondary brain injury in a rabbit model of cryogenic trauma. *J Trauma* 39: 473-7, 1995
- 14) Uhl MW, Biagas KV, Grundl PD, Barmada MA, Schiding JK, Nemoto EM, Kochanek PM. Effects of neutropenia on edema, histology, and cerebral blood flow after traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma* 11: 303-15, 1994
- 15) Clark RS, Carlos TM, Schiding JK, Bree M, Fireman LA, DeKosky ST, Kochanek PM. Antibodies against Mac-1 attenuate neutrophil accumulation after traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma* 13: 333-41, 1996
- 16) Kaczorowski SL, Schiding JK, Toth CA, Kochanek PM. Effect of soluble complement receptor-1 on neutrophil accumulation after traumatic brain injury in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 15: 860-4, 1995
- 17) Carlos TM, Clark RS, Franicola HD, Schiding JK, Kochanek PM. Expression of endothelial adhesion molecules and recruitment of neutrophils after traumatic brain injury in rats. *J Leukoc Biol* 61: 279-85, 1997
- 18) Wada T, Tomosugi N, Naito T, Yokoyama H, Kobayashi K, Harada A, Mukaida N, Matsushima K. Prevention of proteinuria by the administration of anti-interleukin 8 antibody in experimental acute immune complex-induced glomerulonephritis. *J Exp Med* 180: 1135-40, 1994
- 19) Yokoi K, Mukaida N, Harada A, Watanabe Y, Matsushima K. Prevention of endotoxemia-induced acute respiratory distress syndrome-like lung injury in rabbits by a monoclonal antibody to IL-8. *Lab Invest* 76: 375-84, 1997
- 20) Matsumoto T, Ikeda K, Mukaida N, Harada A, Matsumoto Y, Yamashita J, Matsushima K. Prevention of cerebral edema and infarct in cerebral reperfusion injury by an antibody to interleukin-8. *Lab Invest* 77: 119-25, 1997
- 21) Yoshimura T, Matsushima K, Oppenheim JJ, Leonard EJ. Neutrophil chemotactic factor produced by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human blood mononuclear leukocytes: partial characterization and separation from interleukin 1 (IL 1). *J Immunol* 139: 788-93, 1987

- 22) Matsushima K, Morishita K, Yoshimura T, Lavu S, Kobayashi Y, Lew W, Appella E, Kung HF, Leonard EJ, Oppenheim JJ. Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J Exp Med* 167: 1883-93, 1988
- 23) Schroder JM, Mrowietz U, Morita E, Christophers E. Purification and partial biochemical characterization of a human monocyte-derived, neutrophil-activating peptide that lacks interleukin 1 activity. *J Immunol* 139: 3474-83, 1987
- 24) Peveri P, Walz A, Dewald B, Baggiolini M. A novel neutrophil-activating factor produced by human mononuclear phagocytes. *J Exp Med* 167: 1547-59, 1988
- 25) Schroder JM. The monocyte-derived neutrophil activating peptide (NAP/interleukin 8) stimulates human neutrophil arachidonate-5-lipoxygenase, but not the release of cellular arachidonate. *J Exp Med* 170: 847-63, 1989
- 26) Thomsen MK, Larsen CG, Thomsen HK, Kirstein D, Skak NT, Ahnfelt RI, Thestrup PK. Recombinant human interleukin-8 is a potent activator of canine neutrophil aggregation, migration, and leukotriene B4 biosynthesis. *J Invest Dermatol* 96: 260-6, 1991
- 27) Harada A, Kuno K, Nomura H, Mukaida N, Murakami S, Matsushima K. Cloning of a cDNA encoding a mouse homolog of the interleukin-8 receptor. *Gene* 142: 297-300, 1994
- 28) Ko Y, Mukaida N, Panyutich A, Voitenok NN, Matsushima K, Kawai T, Kasahara T. A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for human interleukin-8. *J Immunol Methods* 149: 227-35, 1992
- 29) Knopt PM, Destree A, Hyman R. Antibody-Induced changes in expression of an immunoglobulin surface antigen. *Eur J Immunol* 3: 251-259, 1973
- 30) Eliot KAC, Jasper HH. Measurement of experimental brain swelling and shrinkage. *Am J Physiol* 157: 122-129, 1949
- 31) Carveth HJ, Bohnsack JF, McIntyre TM, Baggiolini M, Prescott SM, Zimmerman GA. Neutrophil activating factor (NAF) induces polymorphonuclear leukocyte adherence to endothelial cells and to subendothelial matrix proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 162: 387-93, 1989
- 32) Detmers PA, Lo SK, Olsen EE, Walz A, Baggiolini M, Cohn ZA. Neutrophil-activating protein 1/interleukin 8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils. *J Exp Med* 171: 1155-62, 1990
- 33) Paccaud JP, Schifferli JA, Baggiolini M. NAP-1/IL-8 induces up-regulation of CR1 receptors in human neutrophil leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 166: 187-92, 1990
- 34) Till GO, Johnson KJ, Kunkel R, Ward PA. Intravascular activation of complement and acute lung injury. Dependency on neutrophils and toxic oxygen metabolites. *J Clin Invest* 69: 1126-35, 1982
- 35) Grisham MB, Hernandez LA, Granger DN. Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *Am J Physiol* 251: 567-574, 1986
- 36) Petrone WF, English DK, Wong K, McCord JM. Free radicals and inflammation: superoxide-dependent activation of a neutrophil chemotactic factor in plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 1159-63, 1980
- 37) Armao D, Kornfeld M, Estrada EY, Grossetete M, Rosenberg GA. Neutral proteases and disruption of the blood-brain barrier in rat. *Brain Res* 767: 259-64, 1997
- 38) Goldman G, Welbourn R, Klausner JM, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Oxygen free radicals are required for ischemia-induced leukotriene B4 synthesis and diapedesis. *Surgery* 111: 287-93, 1992
- 39) Schroder JM. The monocyte-derived neutrophil activating peptide (NAP/interleukin 8) stimulates human neutrophil arachidonate-5-lipoxygenase, but not the release of cellular arachidonate. *J Exp Med* 170: 847-63, 1989
- 40) Sekido N, Mukaida N, Harada A, Nakanishi I, Watanabe Y, Matsushima K. Prevention of lung reperfusion injury in rabbits by a monoclonal antibody against interleukin-8. *Nature* 365: 654-7, 1993
- 41) 赤星 透. 抗ケモカイン療法による炎症抑制. *臨床免疫* 30: 1194-1198, 1998
- 42) Klatzo I. Neuropathological aspects of brain edema. *J Neuropathol Exp Neurol* 26: 1-14, 1967
- 43) Murakami K, Kondo T, Sato S, Li Y, Chan PH. Occurrence of apoptosis following cold injury-induced brain edema in mice. *Neuroscience* 81: 231-7, 1997
- 44) Vorbrodt AW, Lossinsky AS, Wisniewski HM, Suzuki R, Yamaguchi T, Masaoka H, Klatzo I. Ultrastructural observations on the transvascular route of protein removal in vasogenic brain edema. *Acta Neuropathol Berl* 66: 265-73, 1985
- 45) 矢田純一. 食細胞-好中球とマクロファージ. *医系免疫学*, 第5版, 221-235頁, 中外医学社, 東京, 1997
- 46) Maeda M, Akai F, Yanagihara T. Neuronal integrity and astrocytic reaction in cold injury: an immunohistochemical investigation. *Acta Neuropathol Berl* 94: 116-23, 1997
- 47) Nag S. Cold-injury of the cerebral cortex: immunolocalization of cellular proteins and blood-brain barrier permeability studies. *J Neuropathol Exp Neurol* 55: 880-8, 1996
- 48) Ehrlich LC, Hu S, Sheng WS, Sutton RL, Rockswold GL, Peterson PK, Chao CC. Cytokine regulation of human microglial cell IL-8 production. *J Immunol* 160: 1944-8, 1998
- 49) Aloisi F, Care A, Borsellino G, Gallo P, Rosa S, Bassani A, Cabibbo A, Testa U, Levi G, Peschle C. Production of hemolymphopoietic cytokines (IL-6, IL-8, colony-stimulating factors) by normal human astrocytes in response to IL-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 149: 2358-66, 1992
- 50) Smyth MJ, Zachariae CO, Norihisa Y, Ortaldo JR, Hishinuma A, Matsushima K. IL-8 gene expression and production in human peripheral blood lymphocyte subsets. *J Immunol* 146: 3815-23, 1991

Effects of Anti-Interleukin-8 (IL-8) antibody on Prevention of Traumatic Brain Edema. Tamotsu Kijima, Department of Neurosurgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 -8640-J. Jusen Med Soc., **108**, 2-10 (1999)

Key words brain edema, cold injury, interleukin-8 (IL-8), neutrophil

Abstract

IL-8 involvement in neutrophil activation and chemotaxis is important in inflammatory responses. The aim of the present study is to determine the role of IL-8, a neutrophil chemotactic factor, in brain cold injury and to evaluate the therapeutic potential of an anti-IL-8 neutralizing monoclonal antibody (WS-4) in reducing the progress resulting brain edema. A cold lesion of the left parietal cortex was induced in 72 female New Zealand rabbits. Hemispheric edema was measured by using the dry-wet method 6, 12, 24, 48, 72 hr and 7 days after the injury. Brain water content was maximal at 24-48 hr. Histological analysis showed neutrophil aggregation in the subarachnoid vessels and infiltration into the subarachnoid space and brain parenchyma. Immunohistochemical analysis showed that the IL-8 protein was expressed by neutrophils and lymphocytes in the necrotic area 6 hr after injury. Administration of anti-IL-8 antibody inhibited the extravasation of serum albumin in the edematous area and decreased the water content of the damaged hemisphere with statistical significance ($p < 0.05$). These findings suggest that IL-8 plays an important role in the development of brain edema following a cold injury, and that antagonists against IL-8 may prove clinically useful in preventing secondary brain injuries.