

The Role of Interleukin-8 (IL-8) in Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury in Rabbits

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/2297/9263

ウサギ脳虚血後再灌流障害モデルにおける 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)

松本 哲哉

脳虚血後再灌流障害は脳神経外科領域では脳塞栓ならびに脳梗塞後の血栓溶解療法における重要な問題であり、その発生において好中球が重要な役割の一つを担っているといわれている。好中球遊走因子であるインターロイキン-8 (interleukin-8, IL-8) の脳虚血後再灌流障害における関与を検討するため、ウサギ脳を用いた局所脳虚血後再灌流の実験モデルを作成した。さらに抗 IL-8 抗体による再灌流障害の治療の可能性を検索した。脳組織ホモジネート中の IL-8 濃度は、虚血側にて再灌流後6時間で有意に上昇した。また再灌流後6時間では、病理組織学的に好中球の血管内での凝集、血管周囲腔への浸潤が認められた。IL-8 の免疫組織染色により、血管内皮が IL-8 を主に産生していることが判明した。抗 IL-8 抗体を静脈内投与すると、梗塞巣を中心としたエバンスブルーの血管外漏出、すなわち血液脳関門 (blood-brain barrier, BBB) の透過性が抑制された。このように脳虚血後再灌流障害において IL-8 が深く関与していると考えられ、抗 IL-8 抗体による脳再灌流障害の治療の可能性が示唆された。

Key words cerebral ischemia-reperfusion injury, neutrophil, interleukin-8 (IL-8), anti-IL-8 antibody

近年、脳梗塞超急性期の治療法として、いまだ不可逆的な細胞死に陥っていない領域の血流を再開させる血栓溶解療法に期待が寄せられている¹⁾²⁾。しかし、血行再開に伴い機能の回復よりむしろ逆に更なる組織傷害 (虚血後再灌流障害) の発生が問題となっている。臨床的には出血性梗塞³⁾⁴⁾や脳浮腫の増大として認められるが、血栓溶解療法を行っていない場合でも血栓の自然融解に続いて起こることもある。再灌流障害は脳梗塞以外にも心筋梗塞や臓器移植等で問題となっているが、その病態はいまだ完全には解明されていない。虚血後再灌流障害の病因の一つとして好中球が重要な役割を果たしていると考えられている⁵⁾⁶⁾。好中球は血管内皮細胞と接着し、内皮細胞に傷害を与えるのみならず、脳組織内に侵入、種々の細胞傷害物質を放出し、脳組織を傷害することも明らかになってきている。また、好中球除去⁷⁾⁸⁾や好中球の血管内皮への接着阻止が虚血後再灌流障害の軽減に有効⁹⁾¹⁰⁾との報告もなされている。

インターロイキン-8 (interleukin-8, 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サイトカイン¹¹⁾で、72個のアミノ酸よりなり¹²⁾、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、好中球を活性化しリソゾーム酵素の放出やスーパーオキシドの産生誘導¹³⁾¹⁴⁾、ロイコトリエン B4 (leukotriene B4, LTB4)²⁰⁾²¹⁾の産生誘導などの働きをする。

心筋虚血後再灌流障害²²⁾、肺虚血後再灌流障害の実験モデル

において IL-8 が検出され、ことに肺虚血後再灌流障害では抗 IL-8 抗体の投与により再灌流障害が抑制された²³⁾と報告されている。

以上より脳虚血後再灌流障害において IL-8 が関与しているかどうか、また関与しているならば抗 IL-8 抗体投与により再灌流障害の治療が可能かどうかを検討するため、ウサギを用いた脳梗塞モデルを作成し、実験を行った。

対象および方法

1. 実験動物

実験には体重 2.7~3.0kg のニュージーランド種の雌性ウサギ (三共ラボサービス, 東京) 68羽を用いた。まず前投薬として硫酸アトロピン (田辺, 東京) 0.5mg を筋肉内注射し、イソフルラン (アボット, ノースシカゴ, 米国) 3% にてマスク麻酔した。実験中の輸液、薬物の投与のため耳介に静脈路を確保し、手術台に仰臥位に固定した。前頸部縦切開にて気管を露出後、気管切開により径 3.5mm の気管内挿管チューブを約 2cm 挿入固定し、人工呼吸器 (シナノ製作所, 東京) に接続した。人工呼吸器を接続すると同時に臭化バンクロニウム (オルガノン, アムステルダム, オランダ) 2mg を静脈内投与しイソフルラン濃度を 1.5% とした。人工呼吸器は、酸素濃度 30%, 1 回換気量 15~20ml/kg, 換気回数毎分 20~25 回とし、pCO₂ が 32~40mmHg とするよう調節した。右大腿動脈を露出し、留置針

平成 8 年 11 月 29 日 受付, 平成 9 年 1 月 9 日 受理

Abbreviations: ACA, anterior cerebral artery; BBB, blood-brain barrier; BSA, bovine serum albumin; ICA, internal carotid artery; ICAM, intercellular adhesion molecule; IL-1, interleukin-1; IL-8, interleukin-8; LFA, lymphocyte function associated antigen; LT, leukotriene; MCA, middle cerebral artery; ON, optic nerve; PBS, phosphate-buffered saline; TNF, tumor necrosis factor

を留置し血圧モニターに接続して血圧を持続的に測定した。続いてウサギを腹臥位に変え頭部を固定した。補液は5%乳酸リンゲル液(大塚, 東京)を5ml/kg/時間で行い, 臭化パンクロニウムを適宜静注した。

II. 実験モデルの作成

右眼球周囲に頭皮切開を加え, 頭皮を剥離, そして眼球および眼窩内容物を摘出した。視神経管をドリルにて拡大し直径約5mmの開頭を行った。硬膜を開放し右内頸動脈, 中大脳動脈, 前大脳動脈を確認し, 右内頸動脈, 中大脳動脈起始部, 前大脳動脈起始部をZen式クリップでクリッピングを行い, 中大脳動脈閉塞モデルとした(図1)。虚血中はイソフルランの濃度を調節して, 平均血圧が55~65mmHgとなるようにした。右中大脳動脈領域の局所脳虚血モデルとして以下の3群の実験系を作成した。

1. 虚血後再灌流群

クリッピングにて常温2.5時間にわたる右脳局所虚血を開始した。2.5時間の虚血の後, クリップを解除し再灌流させた。再灌流後3時間(5羽), 6時間(8羽)の時点で実験を終了する亜群に分けた。

2. 対照群

対照として虚血負荷前の正常脳群(4羽), クリッピングを行わず, 血管の剥離のみを行い, 8.5時間放置した偽手術群(4羽), およびクリッピングにて脳虚血のみを2.5時間(4羽), 5.5時間(5羽), 8.5時間(8羽)の永久血流遮断群をもうけた。

3. 抗IL-8抗体投与群

上記と同じ脳虚血後再灌流実験において, 再灌流開始と同時にマウス抗ヒトIL-8モノクローナル中和抗体(WS-4)²⁰を投与する群(8羽)を作成した。10mgのWS-4を3mlの生理食塩水で希釈, 耳静脈内に注入した後, 6時間の再灌流を施行した。対照実験としてミエローマ蛋白(p 3. 6. 2. 8. 1)²⁰10mgを同様に静注し再灌流した群(9羽)を作成した。

III. 脳組織中のIL-8濃度測定

各実験の終了時点で塩化カリウム5mlを急速静注し, ウサギを屠殺し, 全脳を一塊として摘出した。右中大脳動脈領域の脳組織を150mg採取し, リン酸緩衝食塩水(phosphate-buffered saline, PBS)(pH 7.2)150 μ l中で十分ホモジネートした。なお, 採取部位は手術部位を除いた。その後10,000回転, 5分間遠心

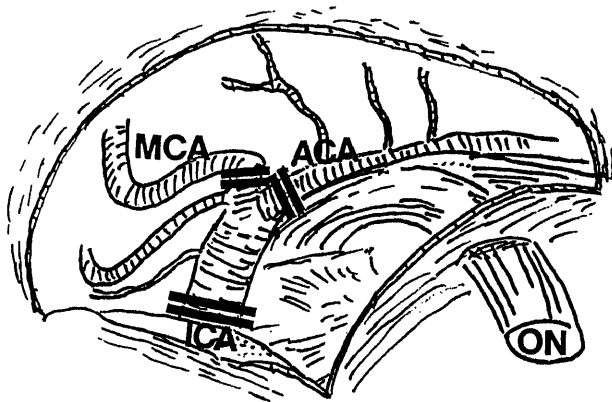


Fig. 1. Schematic drawing of the experimental procedure. Zen clips were applied to ICA, MCA, and ACA and the focal cerebral ischemia was made. Reperfusion was performed by removal of the clips.

し, 上清のみを取り-80℃で保存した。

脳組織ホモジネート上清中のIL-8濃度の測定はELISA^{21,22}にて行った。まず一次抗体としてWS-4を0.05M炭酸緩衝液(pH 9.6)にて0.5 μ g/mlの濃度に希釈し, 96穴マイクロタイタープレート(ヌンク, コペンハーゲン, デンマーク)の各穴に100 μ lずつ加え4℃で一晩インキュベーションを行った。0.05%ツイーン20, リン酸緩衝食塩水(tween-PBS)にて3度洗浄した後, 1%仔牛血清アルブミン(bovine serum albumin, BSA), リン酸緩衝食塩水(1% BSA, PBS)150 μ lを各穴に加え, 37℃で1時間インキュベーションを行った。ツイーン-PBSにて3度洗浄した後, 0.5% BSA, ツイーン-PBSにて希釈されたサンプルを100 μ lずつ加えた。また毎回IL-8濃度の標準曲線を作るため, 組換え型ウサギIL-8を13.7~10,000pg/mlの濃度に0.5% BSA, ツイーン-PBSで希釈し, 100 μ lずつ別の穴に加えた。その後プレートを4℃で一晩インキュベーションを行った。ツイーン-PBSにて5度洗浄した後, 二次抗体としてモルモット抗ウサギIL-8抗体²³を3%ポリエチレングリコール6000, ツイーン-PBSで1 μ l/mlに希釈し, 100 μ lずつ各穴に加え37℃で2時間インキュベーションを行った。ツイーン-PBSにて5度洗浄した後, アルカリフォスファターゼ標識抗モルモット免疫グロブリンG(バイオマーカー, エルサレム, イスラエル)を0.5% BSA, ツイーン-PBSで3000倍に希釈し, 100 μ lずつを各穴に加え37℃で2時間インキュベーションを行った。ツイーン-PBSにて5度洗浄した後, p-ニトロフェニールリン酸二ナトリウムをジエタノールアミンで1mg/mlの濃度に希釈し, 100 μ lずつ各穴に加え室温で30分間インキュベーションを行った。反応を止めるために1規定水酸化ナトリウムを100 μ lずつ各穴に加え, マイクロプレートリーダー(東ソー, 山口)にて405nmにおける吸光度を測定し, 標準曲線をもとにサンプル中のIL-8濃度を算出した。

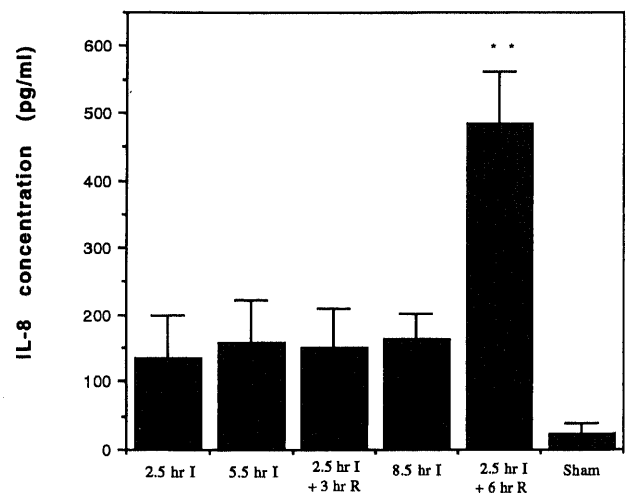


Fig. 2. IL-8 contents in the homogenate of brain tissues (pg/ml). At the indicated time, rabbits were killed and brain tissues were harvested and assayed for IL-8. The numbers of animals for each group are as follows: 2.5 hr I (ischemia for 2.5 hr) 4; 5.5 hr I (ischemia for 5.5 hr) 5; 2.5 hr I+3 hr R (ischemia for 2.5 hr+reperfusion for 3 hr) 5; 8.5 hr I (ischemia for 2.5 hr) 8; 2.5 hr I+6 hr R (ischemia for 2.5 hr+reperfusion for 6 hr) 8; Sham 4. Data are shown as $\bar{x} \pm$ SEM. ** $p < 0.05$ (ANOVA with Scheffe's multiple comparison procedure).

IV. 病理組織学的検討

実験終了後直ちに摘出したウサギ (13羽) 脳を4%パラホルムアルデヒドで固定した。これらのパラフィン切片を作成し、HE染色を行った。

V. 免疫組織学的検討

免疫染色はアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合法にておこなった。パラフィン切片を脱パラフィンし、1%過酸化水素を含むメタノールにて内因性ペルオキシダーゼのブロックを行った後、非特異的反応を阻害するため10% BSA を室温にて10分間反応させた。一次抗体として60 μ g/mlに希釈したWS-4を4 $^{\circ}$ Cにて一晩反応させた。試薬対照として同濃度に希釈した抗トキソプラズマ細胞膜抗体 (TpM-1) をWS-4のかわりに用いて同様の操作を行った。二次抗体としてビオチン標識ヤギ抗マウス IgG (ダコ, カーペンテリア, 米国) を室温にて30分間反応させた。次に酵素試薬としてペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (ダコ) を室温にて30分間反応させた。各反応の後に0.01M-PBSにて3分間4回の洗浄を行った。発色はジアミノベンチジン-テトラヒドロクロライドを主成分としたペルオキシダーゼ発色基質 (シグマ, セントルイス, 米国) を用いた。核染色はヘマトキシリンにて行い、脱水、キシロール透徹の後、封入し検鏡した。

VI. 抗 IL-8 抗体 (WS-4) の血液脳関門 (blood-brain barrier, BBB) 透過性における影響

抗体投与群において、5.5時間の再灌流後にエバンスブルー

(ナカライテスク, 京都) を乳酸リンゲル液で溶解し3%の濃度とし、5mlを耳静脈から注入、その30分後にウサギを屠殺した。摘出した脳をウサギ脳スライサー (ASI, ウォーレン, 米国) を用いて2mmのスライスとし、視神経交叉から前5mm後5mmまでの6スライスを写真撮影した。これらをコンピューター (アップルコンピューター, クペルチノ, 米国) に画像取り込み、エバンスブルーにて青染した部分の総面積を NIH イメージにて測定し、6スライス全体の同側半球面積に対する百分率で表現した。

VII. 統計学的検討

得られた成績はすべて平均値 \pm 標準誤差 (SEM) にて表記した。平均の差の検定には1元配置分散分析法を用い、危険率5%未満をもって有意差ありとみなした。

成 績

I. 脳虚血後再灌流実験における組織内 IL-8 濃度の変化

虚血前の正常脳では4例とも感度以下であった。偽手術群では2例で64.0pg/ml, 27.3pg/mlと低値の濃度を示したが、それ以外の2例では感度以下であった。2.5時間虚血のみ、2.5時間虚血後3時間再灌流、2.5時間虚血後6時間再灌流モデルのIL-8濃度はそれぞれ134 \pm 66pg/ml, 151 \pm 58pg/ml, 485 \pm 78pg/mlであり、5.5時間虚血、8.5時間虚血モデルにおいてはそれぞれ157 \pm 64pg/ml, 163 \pm 38pg/mlであった。2.5時間虚血後6時間再灌流モデルでは2.5時間虚血後3時間再灌流、8.5時

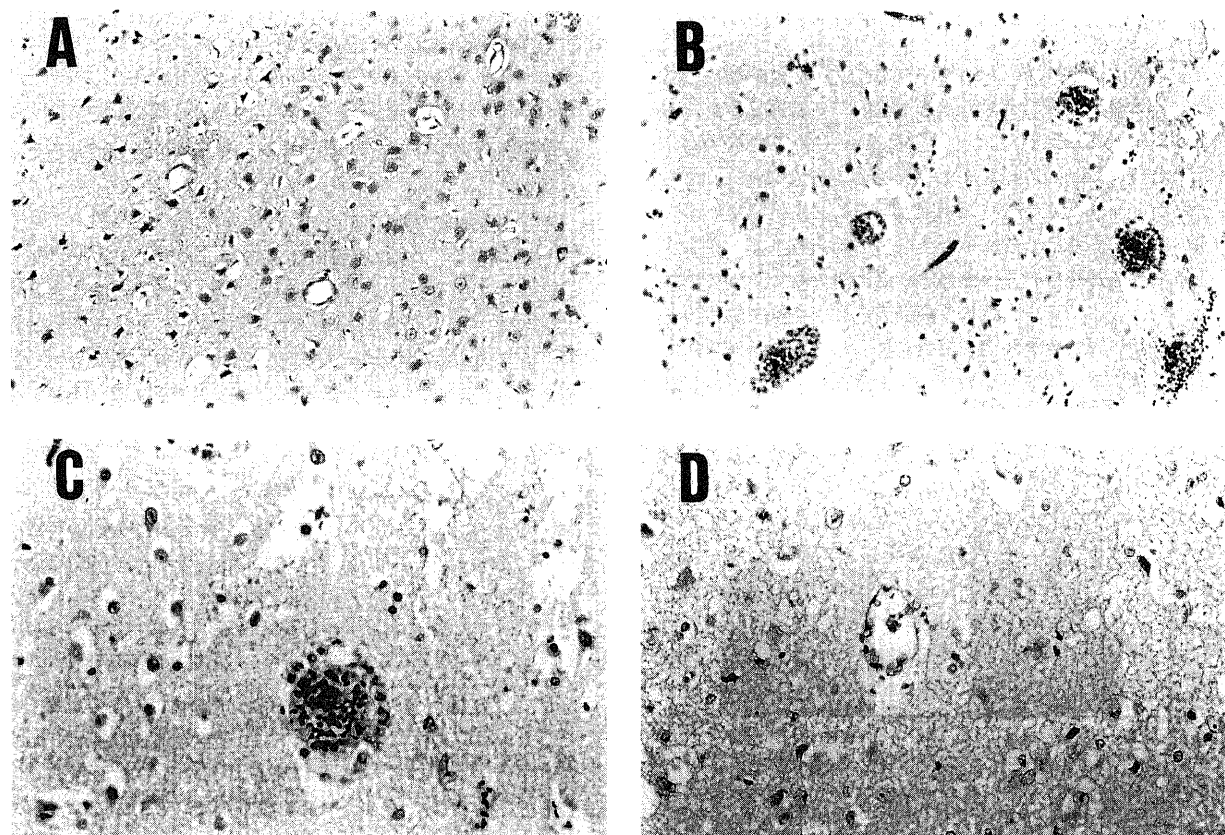


Fig.3. Histological examination of brain tissues. (A) After reperfusion for 3 hr. (B) and (C) After reperfusion for 6hr. (D) After intravenous injection of anti-IL-8 antibody (WS-4). HE-stained sections at $\times 50$ (A, B, D) or $\times 100$ (C) magnification.

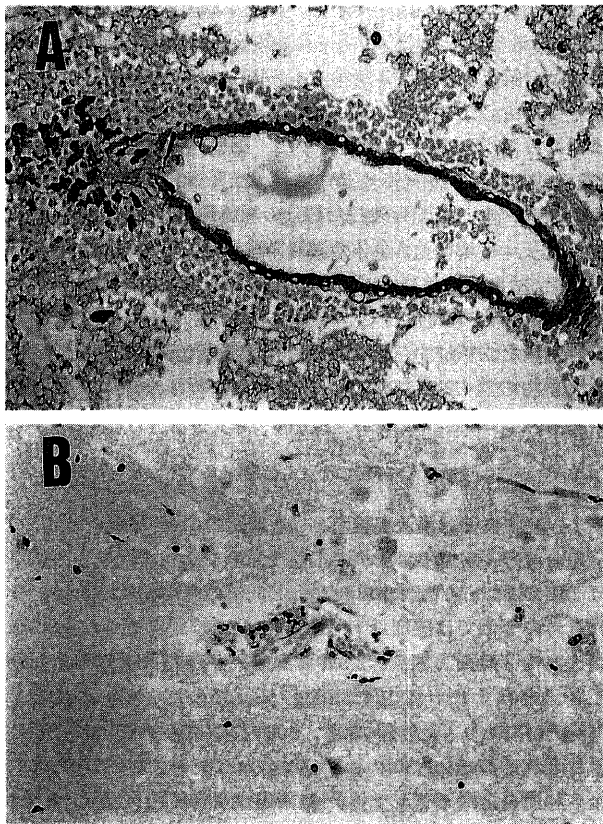


Fig. 4. Immunohistochemical analysis on brain tissue reperfused for 6hr. After immunostaining using either monoclonal anti-IL-8 antibody, WS-4 (A) or the control monoclonal antibody with the same isotope, TpM-1 (B). $\times 100$.

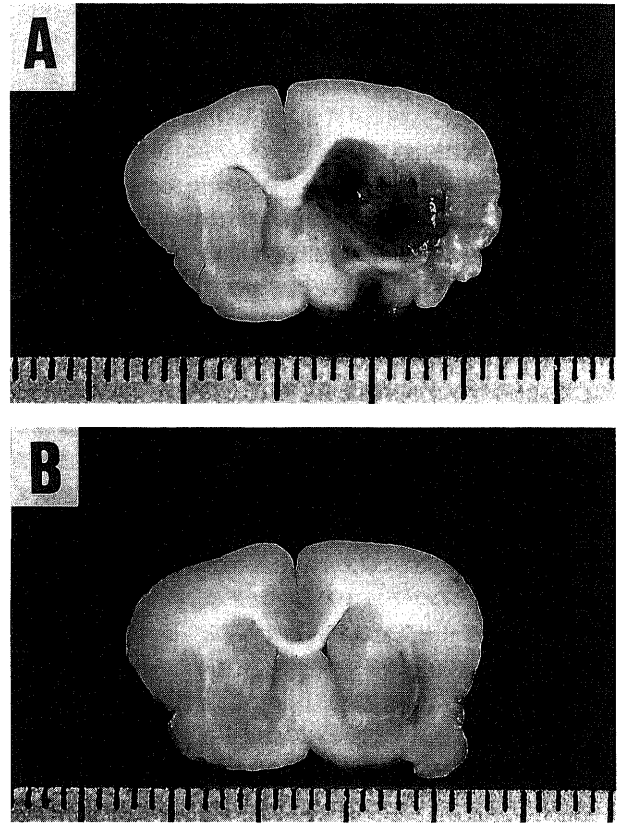


Fig. 6. Photographs of the brain slices showing the effect of anti-IL-8 antibody on Evans blue dye staining in representative animals from the 6hr reperfusion group. (A) Evans blue dye in a control antibody-treated rabbit. (B) Evans blue dye in an anti-IL-8 antibody-treated rabbit.

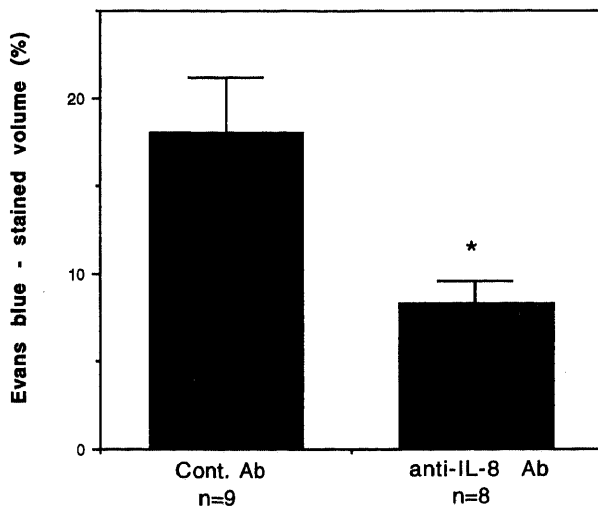


Fig. 5. Effect of anti-IL-8 antibody on BBB permeability. Evans blue dye-stained volumes were calculated on serial cerebral sections and were expressed as the percentage of the examined slices. Data are shown as $\bar{x} \pm \text{SEM}$. $*p < 0.05$ (Mann-Whitney's U test).

間虚血のみのモデルに比べて脳内 IL-8 濃度は有意に高値であった (図 2, $p < 0.05$).

II. 病理組織学的所見

2.5時間虚血, 2.5時間虚血後3時間再灌流モデルでは脳組織に好中球はほとんど見られないのに対し, 2.5時間虚血後6時間再灌流モデルでは細血管内に明らかな好中球の凝集が見られ, 血管周囲腔への好中球浸潤を認めた. 脳実質への好中球浸潤も見られたが, その数は多くはなかった. 一方, WS-4を投与した群ではこれらの好中球の凝集, 浸潤は抑制されていた (図3).

III. 免疫組織学的所見

6時間再灌流後のウサギ脳の IL-8 に対する免疫染色において, 血管内皮に陽性所見を認めた. 試薬対照として TpM-1 を一次抗体として用いたものでは, 染色されなかった. このことから, この免疫染色性は IL-8 蛋白に特異的なものと考えられた (図4).

IV. 抗 IL-8 抗体 (WS-4) の BBB 透過性に対する影響

コントロール抗体 (P3. 6. 2. 8. 1) を再灌流開始直後に静注した群では, エバンスブルーに染色された脳の総面積の比率は $17.6 \pm 3.2\%$ であったが, WS-4 投与群では $8.3 \pm 1.3\%$ と有意に ($p < 0.05$) 低下した (図5). 代表的なスライスの写真を図6に示す. WS-4 の静脈内投与により, 虚血後再灌流後の BBB の破綻によるエバンスブルーの血管透過性は抑制された.

考 察

虚血後再灌流障害は、1981年 Granger ら²⁷⁾より提唱されて以来、虚血性微小循環障害を基盤とした各臓器の機能破綻の主因として注目を集め、現在では心筋梗塞、腸間膜動脈閉塞、脳梗塞、肺梗塞などの病態生理を説明するうえで欠かせない概念となった。心筋梗塞、脳梗塞における血栓溶解療法が普及するにつれ、また臓器移植技術が進歩するにつれ、虚血後再灌流障害が注目されているが、その病態はいまだ完全には解明されていない。各臓器で虚血後再灌流障害における好中球の役割の重要性が指摘され、活性化した好中球が血管内皮と接着し、内皮細胞に損傷を与えたり、微小循環障害を引き起こし、また浸潤した好中球が活性酸素を放出し、組織傷害を引き起こすことが再灌流障害の大きな原因の一つと考えられている。虚血後再灌流障害に限らず急性炎症反応時には局所への好中球の浸潤を伴うが、そのためには血管内皮細胞と白血球の相互反応として白血球が血管内皮上を転がる転回 (rolling)、好中球の活性化 (activation)、一定時間以上同一部位にとどまる膠着 (adhesion)、血管内皮細胞間隙を通過し血管外に出ていく遊走 (migration) の各段階が必要である。この複雑な機構については未だ不明な点も多く、きわめて多くの因子が関与していると考えられているが、大略以下の如くに考えられている²⁸⁾。

炎症反応が起こると好中球は血管内皮細胞と緩やかに接着し、転回を始める。この転回現象は白血球膜上に表出される L-セレクトリンと血管内皮上の P-, E-セレクトリンを含むセレクトリンファミリーが関与することが明らかとなっている。転回に引き続いて観察されるのが膠着現象である。白血球の膠着には、白血球膜上のインテグリンと血管内皮の細胞間接着分子 (intercellular adhesion molecule, ICAM)-1, 2 の結合が重要とされている²⁹⁾。インテグリンは、 α -サブユニット (CD-11a, 11b, 11c) と β -サブユニット (CD-18) により構成され、その結合形態として、リンパ球機能抗原 (lymphocyte function antigen, LFA)-1 (CD-11a/CD-18) と ICAM-1, 2, Mac-1 (CD-11b/CD-18) と ICAM-1 が知られている。

炎症局所においては、マクロファージ、上皮細胞などの組織常在性の細胞が活性化され、様々な炎症性サイトカイン [インターロイキン (interleukin, IL)-1, 腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor, TNF), インターフェロン-ガンマ (interferon- γ , IFN- γ) 等] を放出する。これらのサイトカインにより活性化された血管内皮細胞は、ICAM-1 をはじめとした接着分子を多量に発現するようになる。また、活性化された炎症局所の細胞は、IL-8, 単球走化性活性化因子 (monocyte chemotactic activating factor, MCAF) や血小板活性化因子 (platelet activating factor, PAF) などの白血球活性化因子を血中に放出し、このような因子により活性化された好中球上では、LFA-1, Mac-1 などの分子が質的機能的調節を受けており、それぞれのリガンドへの親和性を獲得し、血管内皮への膠着が生じる。

続いて白血球は血管内皮間隙を通過し基底膜を破り血管外に遊走する。これに伴い、血管内皮と基底膜間に留まっていた高分子物質も血管外に放出されることになり血管周囲の浮腫は助長され、また白血球由来の組織傷害因子の作用により炎症は増悪する。白血球の活性化に伴う各種炎症性メディエーターの放出は遊走に必須と考えられており、エラスターゼやコラゲナーゼといった蛋白分解酵素は白血球の基底膜破壊に重要である。

強力な組織傷害因子として注目されている活性酸素は、血管内皮傷害と間隙の開大にも直接関与するのみならず、蛋白分解酵素群の活性化へも作用することが知られている。よって、白血球からの活性酸素放出は、炎症成立、組織傷害のあらゆる段階で重要な役割をはたすことが予想される。

さて、脳虚血再灌流障害においても上記の機構が働いていると考えられ³⁰⁻³²⁾、好中球除去³³⁾、セレクトリンのレクチンドメインの合成オリゴペプチド投与³⁴⁾、CD18³⁵⁾、CD11b^{12) 13) 15)}、ICAM-1^{11) 12)}、Mac-1^{12) 14)} に対する抗体投与により、神経症状の改善、虚血領域への白血球浸潤の減少、脳浮腫の軽減、梗塞巣の縮小が見られたとする報告が相次いでなされている。抗 CD18 抗体投与の無効例の報告³⁶⁾もあるが、その効果は虚血時間、再灌流時間により異なるものと思われる。

急性炎症時における好中球の遊走、活性化に関係している因子として LTB₄^{33) 34)}、活性化補体第 5 成分³⁵⁾、スーパーオキシド^{36) 37)}、IL-8 などが知られている。IL-8 の試験管内での活性は、好中球に対しては補体リセプター I 型 (CR-1) や接着因子の Mac-1 などの発現の誘導^{37) 40)}、未刺激血管内皮細胞への付着の誘導、形態変化、走化性、活性酸素の産生、リゾソーム酵素の放出、LTB₄ 産生⁴¹⁾などがあげられる。そして、肺虚血後再灌流障害では、IL-8 が重要な役割をはたしており、抗 IL-8 抗体により再灌流障害を抑制することができた²⁸⁾との報告がある。そこで著者らは脳虚血後再灌流障害において、この IL-8 に注目し、ウサギを用いて脳虚血後再灌流障害モデルを作成、IL-8 の関与を検討した。

脳組織ホモジネート上清中の IL-8 濃度の時間的変化を見ると、2.5時間虚血後および2.5時間虚血3時間再灌流後においてはごく低レベルの IL-8 濃度であったが、2.5時間虚血6時間再灌流後においてはそれまでと比べ有意に高い IL-8 濃度を示しており、再灌流後3時間から6時間の間に脳組織がより多くの IL-8 蛋白を産生していると考えられた。対照実験として施行した8.5時間虚血群の IL-8 濃度は、2.5時間虚血群とはほぼ同レベルであり、6時間再灌流後における IL-8 の増加は虚血後の再灌流によるものであり、単に虚血時間が長くなったためではないと考えられた。虚血のみでもそれが侵襲となり低いながらも IL-8 産生を起こすが、虚血後の再灌流がそれ以上の侵襲を与え、さらに IL-8 を産生させたと考えられた。

病理組織学的には、再灌流後3時間までは好中球をほとんど認めなかったが、再灌流後6時間では著明な好中球の血管内凝集と血管周囲腔への浸潤を認めた。好中球の浸潤は脳実質にも認められたが、著明といえるようなものではなかった。これらの所見は脳組織ホモジネート中の IL-8 濃度の上昇とよく相関していると考えられた。IL-8 に対する抗血清は試験管内においてレクチン接着因子 (lectin adhesion molecule-1) と β 2 インテグリンの発現を抑制し、好中球の血管内皮への接着を阻害するとの報告⁴²⁾もあるが、本研究では抗 IL-8 抗体の静脈内投与により、好中球の血管内凝集と血管周囲腔への浸潤が抑制され、IL-8 が好中球の血管内皮への接着、走化に重要な役割を果たしていることが示唆された。

抗 IL-8 抗体の静脈内投与により、エバンスブルーに染色される体積はコントロール抗体投与に比べて有意に減少し、これは再灌流障害時の BBB の透過性が抑制されたことを示している。BBB の透過性の亢進は脳浮腫を引き起こすことより、抗 IL-8 抗体は脳浮腫抑制作用をもつことが判明した。組織学的所見と

照らし合わせると、抗 IL-8 抗体の投与により好中球の活性化、血管内皮への接着の阻害、各種炎症性メディエーターや活性酸素放出などの抑制が生じ、その結果、血管内皮傷害による BBB の透過性の亢進が抑制されたものと思われる。

今回の実験では、脳虚血後再灌流障害における血管透過性の亢進が IL-8 による好中球の浸潤と共に生じていることが示されたが、IL-8 の有意な発現以前の再灌流後 3 時間ですでに脳腫脹が発生しているものも見うけられた。これは、IL-8 の発現以前にアラキドン酸カスケードによる産生物質⁴³⁾、活性酸素、補体成分、血小板活性化因子⁴⁴⁾、種々のサイトカイン^{45)~47)}などが再灌流障害における脳浮腫形成に関与している可能性を示唆している。実際に、アラキドン酸代謝を阻害することにより、脳虚血後再灌流早期の血管透過性の亢進を抑制⁴⁸⁾、IL-1 のブロッカーの投与により脳浮腫形成を抑制⁴⁹⁾したとの報告もある。

今回、我々は、脳虚血後再灌流障害急性期における IL-8、好中球の役割について検討したが、亜急性期、慢性期における役割についても今後検討していく予定である。

結 論

脳虚血後再灌流障害における IL-8 の関与の有無について検討するために、ウサギを用い、2.5 時間局所脳虚血、2.5 時間虚血後 3 時間および 2.5 時間虚血後 6 時間再灌流の実験モデルを作成した。さらに、抗 IL-8 抗体の投与により脳虚血後再灌流障害の軽減が可能かどうかを検討し、以下の結論を得た。

1. 脳組織ホモジネート中の IL-8 濃度は、再灌流後 3 時間に比べ再灌流後 6 時間に有意に上昇した ($p < 0.05$)。また、再灌流を行わない 8.5 時間虚血のみでは有意な IL-8 濃度の上昇は認めなかった。

2. 組織学的には、再灌流後 3 時間までは好中球の血管外浸潤を認めなかったが、再灌流後 6 時間では好中球の血管内での凝集、血管周囲腔への浸潤を認めた。脳実質内への浸潤も認めたが、その数は多くはなかった。

3. 免疫組織染色により、主に血管内皮に IL-8 蛋白が存在していると思われた。

4. 抗 IL-8 中和抗体の静脈内投与により、虚血後再灌流時の好中球の血管内凝集、浸潤が抑制された。

5. 抗 IL-8 抗体の静脈内投与により、BBB の透過性を抑制した。

以上より、脳虚血後再灌流障害における好中球の浸潤には IL-8 が関与しており、抗 IL-8 抗体の投与により再灌流時の脳浮腫の進行を抑制することが可能であると考えられた。今後、脳虚血後の再灌流障害に対して、抗 IL-8 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、御指導と御校閲を賜りました金沢大学脳神経外科学講座山下純宏教授ならびに金沢大学がん研究所薬理部、東京大学公衆衛生学講座松島綱治教授に深く感謝の意を表します。また御指導、御助言を戴きました金沢大学脳神経外科学講座池田清延講師、研究にあたり多大な御協力を戴きました金沢大学がん研究所薬理部向田直史助教授、原田明久博士に厚くお礼申し上げます。最後に、終始ご協力を戴きました金沢大学脳神経外科学教室および金沢大学がん研究所薬理部の諸先生方、ならびに今村明子技官に深く感謝いたします。

文 献

1) Okada Y, Sadoshima S, Nakane H, Utsunomiya H,

Fujishima M. Early computed tomography findings for acute brain embolism. *Stroke* 22: 20-24, 1992

2) Stephen M D. Tissue rescue therapy for acute ischaemic stroke. *J Clin Neurosci*. 2 (1):7-15, 1995

3) del Zoppo G J, Poeck K, Pessin M S. Recombinant tissue plasminogen activator in acute thrombotic and embolic stroke. *Ann Neurol* 32: 78-86, 1992

4) Okada Y, Yamaguchi T, Minematsu K, Miyashita T, Sawada T, Sadoshima S, Fujishima M, Omae T. Hemorrhagic transformation on cerebral embolism. *Stroke* 20: 589-593, 1989

5) del Zoppo G J, Schmid-Schonbein G W, Moni E, Copeland B R, Cang C-M. Polymorphonuclear leukocyte occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons. *Stroke* 22: 1276-1283, 1991

6) Vasthare U S, Heinel L A, Rosenwasser R H, Tuma R F. Leukocyte involvement in cerebral ischemia and reperfusion injury. *Surg Neurol* 33: 261-265, 1990

7) Hallenbeck J M, Dutka A J, Tanishima T, Kochanek P M, Kumaroo K K, Thompson C B, Obrenovitch T P, Contreras T J. Polymorphonuclear leukocyte accumulation in brain regions with low blood flow during the early postischemic period. *Stroke* 17: 246-253, 1986

8) Okada Y, Copeland B R, Mori E, Tung M-M, Thomas W S, del Zoppo G J. P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 expression after focal brain ischemia and reperfusion. *Stroke* 25: 201-210, 1994

9) Shiga Y, Onodera H, Kogure K, Yamasaki Y, Shozuhara H, Sendo F. Neutrophil as a mediator of ischemic edema formation in the brain. *Neurosci Lett* 125: 110-112, 1992

10) Matsuo Y, Onodera H, Shiga Y, Nakamura M, Ninomiya M, Kihara T, Kogure K. Correlation between myeloperoxidase quantified neutrophil accumulation and ischemic brain injury in the rat.; effect of neutrophil depletion. *Stroke* 25: 1469-1475, 1994

11) Zhang R L, Chopp M, Jiang N, Tang W X, Prostack J, Manning A M, Anderson D. Anti-Intercellular Adhesion Molecule-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient but not permanent middle cerebral artery occlusion in the Wistar rat. *Stroke* 26: 1438-1443, 1995

12) Zhang R L, Chopp M, Li Y, Zaloga C, Jiang N, Joans M L, Miyasaka M, Ward P. A. Anti-Intercellular Adhesion Molecule-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Neurology* 44: 1747-1751, 1994

13) Matsuo Y, Onodera H, Shiga Y, Shozuhara H, Ninomiya M, Kihira T, Tamatani T, Miyasaka M, Kogure K. Role of adhesion molecules in brain injury after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Brain Res* 656: 344-352, 1994

14) Chopp M, Zhang R L, Chen H, Li Y, Jiang N, Rusche J R. Postischemic administration of anti-Mac-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Stroke* 25: 869-876, 1994

15) Chen H, Chopp M, Zhang R L, Bodzin G, Chen Q, Rusche J R, Todd R F III. Anti-CD11b monoclonal antibody reduces ischemic cell damage after transient focal cerebral ischemia in

- rat. *Ann Neurol* 35: 447-452, 1994
- 16) Yoshimura T, Matsushima K, Oppenheim J J, Leonard E J. Neutrophil chemotactic factor produced by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human blood mononuclear leukocyte: Partial characterization and separation from interleukin-1 (IL-1). *J Immunol* 139: 788-793, 1987
- 17) Matsushima K, Morishita K, Yoshimura T, Lavu S, Kobayashi Y, Lee W, Appella E, Kung H F, Leonard E J, Oppenheim J J. 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: 1883-1893, 1988
- 18) Shroder J M, Inrowitz 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: 3474-3483, 1987
- 19) Peveri P, Waltz A, Dewald B, Baggiolini M. A novel neutrophil activating factor produced by human mononuclear phagocytes. *J Exp Med* 167: 1547-1559, 1988
- 20) Shroder J M. The monocyte-derived neutrophil activating peptide (NAP-1/interleukin-8) stimulates human neutrophil arachidonate-5-lipoxygenase, but not the release of cellular arachidonate. *J Exp Med* 170: 847-863, 1989
- 21) Thomsen M K, Larsen C G, Kirstein D, Skak-Nielsen T, Ahnfelt-Ronne I, Thestrup-perdersen K. Recombinant human interleukin-8 is a potent activator of canine neutrophil aggregation, migration, and leukotriene B4 biosynthesis. *J Invest Dermatol* 96: 260-266, 1991
- 22) Ivey C L, Williams F M, Collins P D, Jose P J, Williams T J. Neutrophil chemoattractants generated in two phases during reperfusion of ischemic myocardium in the rabbit. *J Clin Invest* 95: 2720-2728, 1995
- 23) 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: 654-657, 1993
- 24) Ko Y, Mukaida N, Panyutich A, Voitenok N, Matsushima K, Kawai T, Kasahara T. A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for human interleukin-8. *J Immuno Methods* 149: 227-235, 1992
- 25) Knoop P M, Destree A, Hyman R. Antibody-Induced changes in expression of an immunoglobulin surface antigen. *Eur J Immuno* 3: 251-259, 1973
- 26) Harada A, Sekido N, Kuno K, Akiyama M, Kasahara T, Mukaida N, Matsushima K. Expression of recombinant rabbit interleukin-8 (IL-8) in *Escherichia coli* and establishment of the essential involvement of IL-8 in recruiting neutrophils into lipopolysaccharide-induced inflammatory site of rabbit skin. *Int Immunol* 5: 681-690, 1993
- 27) Granger D N, Rutigli G, McCord J M. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology* 81: 22-29, 1981
- 28) 黒瀬 巖, 樋口 肇, Granger D N. 炎症-白血球の血管外遊走. *現代医療* 26: 3139-3146, 1994
- 29) Carlos T, Harlan J M. Membrane proteins involved in phagocytic adherence to endothelium. *Immunol Rev* 144: 15-28, 1990
- 30) Morikawa E, Zhang S-M, Seko Y, Toyoda T, Kirino T. Treatment of focal cerebral ischemia with synthetic oligopeptide corresponding to lectin domain of selectin. *Stroke* 27: 951-956, 1996
- 31) Mori E, del Zoppo G J, Chambers J D, Copeland B R, Arfors K E. Inhibition of polymorphonuclear leukocyte adherence suppress no-reflow after focal cerebral ischemia in baboons. *Stroke* 23: 712-718, 1992
- 32) Takeshima R, Kirsch J R, Koehler R C, Gomoll A W, Traystman R J. Monoclonal leukocyte antibody does not decrease the injury of transient focal cerebral ischemia in cats. *Stroke* 23: 247-252, 1992
- 33) Klausner J M, Paterson I S, Kobzik L, Valeri R, Shepro D, Hechtman H B. Leukotrienes but not complement mediates limb ischemia-induced lung injury. *Ann Surg* 209: 462-470, 1989
- 34) Goldman G, Welbourn R, Klausner J M, Valeri C R, Shepro D, Hechtman H B. Oxygen free radicals are required for ischemia-induced leukotriene B4 synthesis and diapedesis. *Surgery* 111: 287-293, 1992
- 35) Till G O, Johnson K J, Kunkel R, Ward P A. Intravascular activation of complement and acute lung injury: Dependency on neutrophils and toxic oxygen metabolites. *J Clin Invest* 69: 1126-1135, 1982
- 36) Grisham M B, Hernandez L A, Granger D N. Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *Am J Physiol* 251: G567-574, 1986
- 37) Petrone W F, English D K, Wong K, McCord J M. Free radicals and inflammation. Superoxide-dependent activation of a neutrophil chemotactic factor in plasma. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 77: 1159-1163, 1980
- 38) Carveth H J, Bohnsack J F, McIntyre T M, Baggiolini M, Prscott S M, Zimmerman G A. Neutrophil activating factor (NAF) induces polymorphonuclear leukocyte adherence to endothelial cells and to subendothelial matrix proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 162: 387-393, 1989
- 39) Detmers P A, Lo S K, Olsen-Egbert E, Walz A, Baggiolini M, Cohn Z A. Neutrophil activating protein/interleukin-8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils. *J Exp Med* 171: 1155-1162, 1990
- 40) Paccard J P, Schifferli J A, Baggiolini M. NAP-1/IL-8 induces up-regulation of CR-1 receptors in human neutrophil leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 166: 187-192, 1990
- 41) Schroder J M. 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: 847-863, 1989
- 42) Huber A R, Kunkel S L, Todd R F III, Weiss S J. Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science* 254: 99-102, 1991
- 43) Moncada S, Vane J R. Arachidonic acid metabolites and the interactions between platelets and blood-vessel walls. *N Engl J*

Med 300: 1142-1147, 1979

44) Lindsberg P G, Hallenbeck J M, Feuerstein G. Platelet-activating factor in stroke and brain injury. *Ann. Neurol* 30: 117-129, 1991

45) Szaflarski J, Burtrum D, Silverstein F S. Cerebral hypoxia-ischemia stimulates cytokine gene expression in perinatal rats. *Stroke* 26: 1093-1100, 1995

46) Maeda Y, Matsumoto M, Hori O, Kuwabara K, Ogawa S, Yan S D, Ohtsuji T, Kinoshita T, Kamada T, Stern D M. Hypoxia/reoxygenation-mediated induction of astrocyte interleukin 6: a paracrine mechanism potentially enhancing

neuron survival. *J Exp Med* 180: 2297-2308, 1994

47) Minami M, Kuraishi Y, Yabuuchi K, Yamazaki A, Satoh M. Induction of Interleukin-1 beta mRNA in rat brain after transient forebrain ischemia. *J Neurochem* 58: 390-392, 1992

48) Chen J, Weinstein P R, Graham S H. Attenuation of postischemic brain hypoperfusion and reperfusion injury by the cyclooxygenase-lipoxygenase inhibitor BW755C. *J Neurosurg* 83: 99-104, 1995

49) Yamasaki Y, Matsuura N, Shozuhara H, Onodera H, Itoyama Y, Kogure K. Interleukin-1 as a pathogenic mediator of ischemic brain damage in rats. *Stroke* 26: 676-680, 1995

The Role of Interleukin-8 (IL-8) in Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury in Rabbits Matsumoto Tetsuya, Department of Neurosurgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med Soc.*, **106**, 25—32 (1997)

Key words cerebral ischemia-reperfusion injury, neutrophil, interleukin-8 (IL-8), anti-IL-8 antibody

Abstract

Cerebral ischemia-reperfusion injury is a serious problem for neurosurgeons in thrombolytic therapy for patients who have suffered a stroke. Neutrophils are considered as a major etiologic factor in reperfusion injury. The aim of the present study is to determine the role of IL-8, a neutrophil chemotactic factor, in cerebral reperfusion injury and to evaluate the therapeutic potentiality of anti-IL-8 neutralizing monoclonal antibody (WS-4) to reduce injury. In the present study, 68 female New Zealand rabbits were used. They sustained focal cerebral ischemia for 2.5 hrs followed by 3 hrs or 6 hrs reperfusion. Reperfusion for 6 hrs significantly ($p < 0.05$) increased the IL-8 level in brain tissue homogenate and enhanced the neutrophil aggregation in small vessels and infiltration into the perivascular space as compared with reperfusion for 3 hrs. Immunohistological analysis showed that the IL-8 protein was expressed in the endothelial cells in the brain slices of the 6 hr reperfusion group. Administration of anti-IL-8 antibody inhibited the extravasation of Evans blue dye in the infarct area, that is, the increased permeability of the blood-brain barrier, significantly ($p < 0.05$). These findings suggested that IL-8 plays an important role in cerebral ischemia-reperfusion injury. It is expected that antagonists against IL-8 would be clinically useful for preventing cerebral ischemia-reperfusion injury.