

炎症反応におけるサイトカインの役割
に関する研究

宇都宮 郁

炎症反応におけるサイトカインの役割に関する研究

宇都宮 郁

目次

緒言	1
第1章 ラット・カラゲニン胸膜炎における サイトカイン産生と急性期蛋白の誘導	5
方法	6
結果	12
考察	17
第2章 炎症性サイトカインのラット胸腔内投与 による好中球遊走	36
方法	38
結果	39
考察	44
第3章 カラゲニン胸膜炎におけるサイトカイン産生 に対する抗炎症薬の影響	64
方法	65
結果	67
考察	69
総括	82
文献	86
掲載雑誌目録	100
謝辞	101

緒言

炎症はギリシャ医学より既にその記載が認められ、その4大兆候として発赤、腫脹、熱感、疼痛がある。これらの症状は刺激の加わった局所の微小血管を中心として起こる一連の生体反応の経過であり、特に血管透過性亢進と白血球浸潤が重要であると考えられている [1]。そしてこの反応の成立にはキニン、アラキドン酸代謝物、血小板活性化因子(PAF)、補体など様々なメディエーターの関与が報告されている。一方、炎症時には全身反応である発熱や急性期蛋白と呼ばれる一連の血漿蛋白の増加なども認められる。

これらの反応に対して上記のメディエーターの他に近年一連のサイトカインと呼ばれる蛋白性の因子の関与が報告されている。サイトカインは当初、免疫応答を司どる白血球間の調節因子として発見されたが、1980年代の後半にこれらの精製及び遺伝子クローニングが成功すると共に、炎症反応に寄与するいくつかのサイトカインが明らかとなってきた [2, 3, 4]。tumor necrosis factor (TNF), interleukin-1 (IL-1), IL-6, IL-8はその代表であり、炎症性サイトカインとも呼ばれる。

TNFは1975年にMeth A肉種の出血性壊死をひき起こす因子として発見された。一方、1970年代にリンパ球に対する活性化因子(lymphocyte-activating factor; LAF)が発見されたが、これはさらに古くから報告のあった蛋

白性の内因性発熱物質 (endogenous pyrogen; EP) と同一のものであることが明らかとなり、IL-1 と呼ぶことが提唱された。TNF と IL-1 はその構造およびそれぞれに対する受容体が全く異なるにもかかわらず非常に類似した生物活性を示す [2]。例えば上記の発熱および急性期蛋白の誘導、プロスタグランジン (PG) 類の産生誘導、in vivo での局所への白血球遊走、またマクロファージや血管内皮細胞をはじめとする種々の細胞に作用して IL-6, IL-8 などの 2 次的なサイトカインを含めた炎症性メディエーターを誘導する。さらに最近では好中球をはじめとする白血球の血管外への遊走に重要な白血球上および内皮細胞上の種々の接着分子の発現誘導、血管拡張物質 (endothelium-derived relaxing factor) の本体であり、また殺腫瘍活性を持つ NO の生合成酵素の誘導、ホスホリパーゼ A₂、シクロオキシゲナーゼ-2 の誘導など枚挙にいとまがない。

IL-6 もまた多機能性サイトカインの代表として挙げられる [3]。これは活性化 B 細胞に抗体産生を誘導する因子として 1985 年に平野らにより精製された [5]。その後、肝細胞に直接作用して急性期蛋白を合成させる、巨核球の成熟を誘導して血小板の増多をもたらし、ミエローマの増殖因子であるなどの作用が明らかとなった [3]。したがって in vivo での炎症刺激あるいは TNF や IL-1 による急性期蛋白の誘導は IL-6 を介することが推定されるがこれを証明した報告はまだない。

IL-8はC5a, LTB₄, fMLP, PAFなど既知の白血球遊走因子と異なる新しい好中球遊走因子として1987年に吉村らによって精製された [6]。その後、多くのポリペプチド性の遊走因子が同定され、これらは大きなファミリーを形成していることが明らかとなり現在ではこれらを総称してケモカインと呼んでいる [4]。これらのうち分子内の2つのシステイン残基の間にアミノ酸が1つ挿入されたC-X-C chemokineは好中球特異的に、システイン残基の並んだC-C chemokineは単球特異的に遊走を起こすことが知られている。炎症時およびTNF, IL-1を動物に投与した時の局所への好中球浸潤にIL-8がどの程度関わっているかについてはウサギを用いた実験報告があるが [7]、他の動物では詳しくはわかっていない。

このようにこれら炎症性サイトカインの研究は *in vitro*が中心であり、*in vivo*での検討はリウマチをはじめとする各種炎症性疾患においてこれらサイトカインの著明な上昇が認められてはいるものの [2, 3, 4]、その直接の関与ならびにサイトカイン同士の相互誘導の研究に必須と考えられる実験動物での証明はほとんどなされていない。

大石らはラットのカラゲニン胸膜炎を炎症モデルとして用い、この炎症反応にキニンやプロスタグランジンが関与することを報告した [8, 9]。さらにラットの血漿中には高分子及び低分子キニノーゲンと異なるT-キニノーゲンが存在し、急性期蛋白としてこの炎症モデルにお

いてその産生が増加することも見いだした [10]。このようにこのモデルは局所の反応が胸腔壁で隔てられているため、滲出液量、浸潤白血球数やメディエーターの定量性に優れており、局所と全身の反応の関係を解析するのに適している。そこで本研究ではこのラットの胸膜炎におけるサイトカインの役割について以下のように解析を行った。

1 ラット・カラゲニン胸膜炎におけるTNF, IL-1, IL-6産生と急性期蛋白T-キニノーゲンの誘導の動態を調べ、それぞれのサイトカイン、特にIL-6の役割を明らかにする。

2 TNF, IL-1, IL-8, CINC (rat IL-8)によるラット胸腔内への好中球遊走の機序を検索し炎症時のIL-8の役割を明らかにする。

3 カラゲニン胸膜炎におけるTNF, IL-1, IL-6, CINCの産生に対する抗炎症薬の影響を調べ、サイトカイン産生に対するPGの役割を明らかにする。

第1章 ラット・カラゲニン胸膜炎におけるサイトカイン 産生と急性期蛋白の誘導

局所で炎症が起こった時に現われる全身反応の1つとして血漿中の急性期蛋白の増加が知られている。C-reactive protein, fibrinogen, α_1 -acid glycoproteinなどがその代表として知られているがその生体内での機能については防御反応に何らかの関与があると推定されているもののいまだに明らかではない [1]。

これらの急性期蛋白を誘導する因子としてTNF, IL-1の他にhepatocyte-stimulating factor (HSP)が知られていたが1987年にGauldieらはこれがIL-6と同一の因子であることを確認した [11]。その後in vitroの実験により急性期蛋白を主に誘導するのはIL-6であってTNF, IL-1の作用は弱いことも判明した。さらにIL-6のin vivo投与により急性期蛋白の増加がラットにおいても確認された [3]。したがって急性炎症時およびTNF, IL-1による反応はIL-6を介していることが想像されるが証明はされていない。

一方1983年に岡本らはラットの血漿中に第3のキニノーゲンであるT-キニノーゲンを発見し、これがラットにおける急性期蛋白の1つであることを明らかにした [12]。既にラットにおいてテレピン油の背部皮下やカラゲニン胸膜炎においても1日後にT-キニノーゲンの上昇が報告されている [10]。

本章では *in vivo* での TNF, IL-1 による IL-6 の誘導と誘導された IL-6 による T-キニノーゲンの誘導という連鎖反応を証明するためにこのラット・カラゲニン胸膜炎を炎症モデルとして用い、胸腔滲出液中のこれらサイトカインの動態と TNF, IL-1 による IL-6 の誘導について検討した。この目的のためにラット T-キニノーゲンに対するモノクローナル抗体を初めて作製しラジオイムノアッセイと免疫組織染色法を確立した。

〈方法〉

動物

6-7週齢のSD系雄性ラット (200-300 g) は日本SLC (静岡県浜松市) より購入し、1週間の予備飼育後、使用した。5週齢のC3H/HeJ雌性マウスは日本クレア (東京) より、7週齢のBALB/cマウスは日本SLCより購入した。

サイトカインと抗サイトカイン抗体

recombinant human IL-1 α (rhIL-1 α ; sp. act. 2.26×10^7 u/mg, エンドトキシン含有量 <0.32 ng/mg), rhTNF α (sp. act. 2.55×10^6 u/mg, エンドトキシン含有量 <0.04 ng/mg), rhIL-2 および抗 rhIL-1 α 抗体 (ウサギ抗血清; 1×10^5 neutralizing units/ml) は大日本製薬 (大阪) より供与された。rhIL-6 (5.18×10^6 u/mg) と抗 rhIL-6 抗体 (1×10^5 neutralizing units/ml) は大阪大学医学部の平野俊夫博士より恵与された。

細胞株

マウス繊維芽細胞株L929は自治医科大学の松浦基博博士より、ヒトT白血病細胞株HSB.2 [13] とマウス細胞障害性T細胞株CTLL-2は自治医科大学の笠原忠博士より、IL-6依存性のマウス・ハイブリドーマMH60.BSF2 [14] は大阪大学医学部の平野俊夫博士よりそれぞれ恵与された。ラット・ヘパトーマH4IIEC3 [15] は大日本製薬より購入した。細胞の培養には10%の被動化された(56°C, 30 min)牛胎児血清(FCS; M. A. Bioproducts)を含むRPMI 1640 (GIBCO)を用いた。またCTLL-2とMH60.BSF2の培養にはrhIL-2 (20 u/ml) と rhIL-6 (5 u/ml) をそれぞれ添加した。

IL-1 アッセイ

サンプル中のIL-1活性はMizelらの報告した方法により測定した [16]。すなわちC3H/HeJマウスの胸腺細胞を1 μ g/mlのフィトヘマグルチニン (PHA; Wellcome)存在下に希釈したサンプルと72時間培養し、その増殖増強活性を³H-thymidine (Amersham) の取り込みによって評価した。標準曲線はrhIL-1 α を用いて描いた。

ヒトT白血病細胞株HSB.2からのIL-1依存的なIL-2産生

上記のIL-1活性を確認するため、希釈したサンプルをIL-1依存的にIL-2を産生するHSB.2 C5B2細胞 [13] に添加し、24時間後の培養上清中のIL-2活性を測定した。IL-2活性はCTLL-2細胞の15時間後の増殖活性を³H-thymidine の取り込みによって評価することにより測定

した。標準曲線は rhIL-2 を用いて描いた。

IL-6 アッセイ

IL-6 活性は IL-6 依存性細胞株 MH60.BSF2 の 48 時間後の増殖活性により測定した [14]。標準曲線は rhIL-6 を用いて描いた。この細胞は IL-1, 2, 3, 4, 5, インターフェロン, コロニー刺激因子などの他のサイトカインとは反応しないことが報告されている。

TNF アッセイ

TNF 活性は L929 細胞に対する細胞障害活性によって測定した [17]。すなわち希釈したサンプルを L929 細胞と 24 時間培養し、生細胞をクリスタルバイオレットにて染色して 550 nm の吸光度を測定した。標準曲線は rhTNF を用いて描いた。

実験的炎症モデル

ラットのカラゲニン足浮腫は既報 [18] にしたがって、生理食塩液に溶解した 1 % のカラゲニン (Sigma) 0.1 ml をエーテル麻酔下に、ラットの後足の皮内に投与することにより惹起した。ラットの胸膜炎は 2 % のカラゲニン 0.1 ml を右胸腔内に注入することにより惹起し、一定時間後放血致死させた。血液と胸腔滲出液は、1/10 容量の 3.8 % クエン酸ナトリウムを含むポリエチレンチューブに採取した。細胞を遠心分離して得た血漿と、浸潤した細胞を含まない胸腔滲出液はリン酸緩衝液 (PBS) に透析した後 -70 °C に保存した。

また rhIL-1 α (1×10^5 u) または rhTNF α (2×10^4 u)

をラットの胸腔内に投与して一定時間後に採血し放血致死させ、胸腔内を1 mlの生理食塩液で2回洗浄した。さらに別の実験としてrhIL-1 α (1×10^4 u/20 μ l) と被動化した正常ウサギ血清または抗rhIL-1 α 抗体0.1 mlを37 °C, 1時間反応させたものについても胸腔内に投与し、1時間後の胸腔洗浄液および血液を採取した。それらの血漿中のIL-6活性とT-キニノーゲン量を測定した。

ゲル濾過

0.02 %のポリエチレングリコール4000 (Merck) を含むPBSで平衡化したSephacryl S-200 カラム (2.2 x 95 cm, Pharmacia) に3時間後または5時間後の胸腔滲出液1 mlを供して流速25 ml/h, 分画サイズ2.5 mlにてゲル濾過を行った。それぞれの分画についてIL-1とIL-6活性を測定した。分子量マーカーとしては牛血清アルブミン (69,000), 卵白アルブミン (45,000), 大豆トリプシンインヒビター (20,100), チトクロムC (12,400)を用いた。

等電点電気泳動

2.5 %のBio-Lyte 3/10 (Bio-Rad)を含むショ糖濃度勾配 (0-50 %) をカラム (25 ml)内に調製し、200 μ lの4時間後の胸腔滲出液をこの中央に供して4 °C, 400 Vにて24時間等電点電気泳動を行った。陰極には0.1 Mのリン酸、陽極には0.25 Mのエチレンジアミンを用いた。泳動後1 mlずつ分画し、pHと280 nmの吸光度を測定した。そして各分画をBio-Lyteを除去するためPBSに対して透

折した後 1L-1 と 1L-6 の活性を測定した。

T-キニノーゲンに対するモノクローナル抗体の作製

精製ラット T-キニノーゲン（循環器病センターの加藤久雄、円城寺慶一両博士および九州大学の岩永貞昭博士より恵与された） $15\text{ }\mu\text{g}$ をフロインド完全アジュバントと *Bordetella pertussis* (2×10^9 個、北里大学の中瀬安清博士より恵与された) の死菌と共に BALB/c マウスの腹腔内に投与して初回免疫とした。その後 2 週間ごとに $30\text{ }\mu\text{g}$ の T-キニノーゲンを同様に注射した。 $20\text{ }\mu\text{g}$ の T-キニノーゲンと 2 mg の水酸化アルミニウムゲルを注射した最終免疫の 3 日後にマウスの脾臓を摘出し脾臓細胞 3×10^8 個とミエローマ細胞 P3-X63-Ag8-U1（国立がんセンターの関根輝彬博士より恵与された） 6×10^7 個を 45% ポリエチレングリコールと $5\text{ }\mu\text{g/ml}$ のポリ L-アルギニン（Sigma）を用いて融合させた。融合細胞を $100\text{ }\mu\text{M}$ のヒポキサンチン（同仁化学）と $16\text{ }\mu\text{M}$ のチミジン（同仁化学）を含む HT 培地に懸濁し $75\text{ }\mu\text{l}$ ずつ 3 枚の 96 穴プレートに分注した。HAT 選択は 1 日後に $0.4\text{ }\mu\text{M}$ のアミノプテリン（Fluka）を含む HAT 培地 $150\text{ }\mu\text{l}$ を添加することにより行った。

抗体産生細胞を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) によりスクリーニングし、9 個の陽性の細胞を得た。これらを限界希釈法によりクローニングし、確立されたクローン (A3H12, D2H8) をマウスの腹腔内に投与して大量の抗体を腹水として得た。

T-キニノーゲンのラジオイムノアッセイ

T-キニノーゲンの標識は Na^{125}I を用い、クロラミンT法にて行った[19]。ラジオイムノアッセイ(RIA)は ^{125}I -T-キニノーゲンに標準T-キニノーゲンまたはサンプルを加え、さらにモノクローナル抗体を加えて1晩4°Cにてインキュベートし、B/F分離にはStaphylococcus aureusの細胞壁成分であるZysorbin (Zymed, 2 mg/ml)を用いて行った。T-キニノーゲン1-32 ng/tubeの間で良好な標準曲線が描けた。また高分子および低分子キニノーゲンとの交差性は0.05%未満であった。

肝臓の免疫組織染色

ラットの肝臓を門脈より生理食塩液で灌流した後摘出し4%パラホルムアルデヒド(TAAB)にて固定した。エタノールで脱水後パラフィンで包埋した組織から3 μmの切片をスライドガラス上に装着した。キシレンでパラフィンを除去し内在性のパーオキシダーゼを0.3%の過酸化水素で枯渇させた。免疫染色はavidin-biotin-peroxidase kit (ABC kit; Vector Laboratories)とT-キニノーゲンに対するモノクローナル抗体を用いて行った。発色には3,3'-ジアミノベンチジン(和光純薬)と0.01%の過酸化水素を用い、ヘマトキシリンによる2重染色を行った。

またT-キニノーゲンに対するポリクローナル抗体(ウサギ抗血清)による染色もPeroxidase-anti-peroxidase (PAP)法により行った。すなわち正常ブタ血清

(DAKOPATTS)で非特異的な結合を阻害した後、抗T-キニノーゲン抗体と抗ウサギIgG (DAKOPATTS)、パーオキシダーゼ抗パーオキシダーゼ (DAKOPATTS) を反応させて上記と同様に発色させた。

ラット・ヘパトーマH4IIEC3からのT-キニノーゲン産生

ラット・ヘパトーマH4IIEC3 (4×10^5 cells/0.4 ml/well) を rhIL-1 α または rhIL-6 と共に72時間培養した後、その上清中のT-キニノーゲン量をRIAにより測定した。

<結果>

カラゲニン足浮腫における血漿中T-キニノーゲン量

ラット・カラゲニン足浮腫モデルにおける炎症反応の進展と血漿中のT-キニノーゲン量の経時変化を比較したところFig. 1Aに示すように足の腫れは3-8時間後に最大となり25時間以後には減少していった。一方T-キニノーゲンは3時間後では正常レベルとほとんど変わらず、8時間後より上昇し始め、24-48時間後に正常の約6倍の最大値をとり、以後徐々に減少し、96時間後には正常の約3倍となった (Fig. 1B)。

肝臓でのT-キニノーゲンの生合成を調べる目的で上記のラットの肝臓の免疫組織染色を行った。ABC法を用いたところモノクローナル抗体のない染色では肝組織の発色は見られなかったが、Fig. 2に示すように正常ラットの組織切片においていくつかの実質細胞がモノクローナ

ル抗体により染まっていることがわかる(①)。この発色はカラゲニン足浮腫の3-8時間後に次第に強くなり(②-③)、24時間後には著明な陽性細胞の増加が認められた(④)。96時間後の発色も正常よりはまだ強かった(⑤)。なお、PAP法による染色の結果、足浮腫惹起24時間後の肝臓においてアルブミンの産生量は正常ラットとほぼ同じであるのに対してT-キニノーゲン量が選択的に増加していることを確認した(データ省略)。

カラゲニン胸膜炎の胸腔滲出液中のTNF, IL-1, IL-6活性

正常ラット胸腔内の液量は0.05 ml未満であり常在細胞数は約 7×10^6 個である。常在細胞はその約8割を単球が占め、好中球はほとんど認められない。カラゲニン胸膜炎を惹起させると1時間後で既に滲出液量は0.2 mlに達しているが、この時はまだほとんど好中球の浸潤は見られない(Fig. 3A)。2-3時間後にかけては滲出液量、浸潤白血球数共に著明な増加を示し、滲出液量はそのまま16時間後まで増加を続け、浸潤白血球数は8時間後で最大となった。この白血球数の増加は主に好中球の増加によるものであった。一方、正常ラットの胸腔内のTNF, IL-1, IL-6活性はそれぞれ 0.088 ± 0.009 u, 0.44 ± 0.15 u, 0.88 ± 0.49 u ($n = 4$)であった。胸膜炎惹起後1時間でこれらのサイトカインレベルは既に20倍以上の高値を示した(Fig. 3B)。TNFはまだ好中球がほとんど浸潤していない2時間後に最大となり以後5

時間までにその活性は激減した。IL-1活性は滲出液量とほぼ平行して増加し3時間後に最大値をとり、これもまた5時間後に激減した。IL-6活性はTNF、IL-1活性に比べてややゆっくりと好中球浸潤に伴って増加し始め、4-5時間後に最大となった後に徐々に減衰していったが、16時間後においてもまだ高値を示した。

IL-1依存性IL-2産生によるIL-1活性の確認

C3H/HeJマウスの胸腺細胞を用いたIL-1アッセイにはIL-2のみならずIL-6も反応してしまうことが報告されたため [20]、別法、すなわちIL-1に依存してIL-2を産生するヒトT白血病細胞株HSB.2 C5B2を用いたアッセイにより滲出液中のIL-1活性の確認をした。Table 1に示すように3時間後の滲出液を直接CTLL-2細胞に添加しても増殖が起こらないことからまず滲出液中にはIL-2活性がないことがわかった。しかしこれをHSB.2 C5B2細胞に加えて培養した上清中にはIL-2活性が現れた。IL-6は5000 u/mlの高濃度でもこのアッセイに活性を示さず、また rhIL-1 α (0.2 u/ml) によるIL-2産生を増強することもなかった。

胸腔滲出液のゲル濾過

滲出液中のIL-1とIL-6の分子量を推定する目的で、3時間後と5時間後の滲出液をSephacryl S-200カラムを用いてゲル濾過を行った。Fig. 4にその代表的なパターンを示すが、3時間後の滲出液では胸腺細胞を用いて測定したIL-1活性は約20 kDの位置に溶出された (A)。こ

の位置はIL-1で誘導されたIL-2活性の位置とも一致した(B)。IL-6活性はこのIL-1活性よりもわずかではあるが高分子側に溶出された。分子量マーカーとの比較によりこのIL-1およびIL-6の分子量はそれぞれ約18 kD, 22 kDと推定され、これらはヒトやマウスで報告されている値とほぼ一致する[2, 3]。5時間後の滲出液ではIL-1活性はほとんど認められなかったが(C,D) IL-6は3時間後と同じ位置にさらに高い活性が溶出された。この結果はFig. 3のIL-1とIL-6の活性の増減とよく一致している。

胸腔滲出液の等電点電気泳動

4時間後の滲出液を等電点電気泳動した結果、IL-1活性はその大部分がpH 5.2の位置を中心に溶出された(Fig. 5)。またpH 7付近にもわずかだが認められた。このことから滲出液中のIL-1活性はほとんどが α 型[2]であることが示唆された。IL-6活性はIL-1よりもわずかに塩基性側(pH 5.6)に溶出された。

胸膜炎ラットの血漿中IL-6

胸膜炎を惹起したラットにおいてIL-6活性は血漿中にもその一過性の上昇が観察された。Fig. 6Aはカラゲニン胸膜炎での血漿中のIL-6活性の経時変化を示している。惹起1時間後ではIL-6はまだ正常レベルだが2時間後までに正常の2-3倍へと徐々に増加し始め、その後急激に上昇し4時間後に最大となってまたその後急激に減少した。

rhIL-1 α (1×10^5 u) を胸腔内に投与した場合には

血漿中IL-6は急増し、1時間後にカラゲニン胸膜炎の4時間後と同程度の最大値をとった (Fig. 6B)。その後、減少し8時間後には正常値に戻った。

rhTNF α (2×10^4 u) を投与した場合はrhIL-1 α の場合よりもやや遅れ、3時間後にカラゲニン、rhIL-1 α 投与と同程度の血漿中IL-6の最大値をもたらし、8時間後にはほぼ正常値にまで減少した (Fig. 7)。

胸膜炎ラットの血漿中T-キニノーゲン

カラゲニン胸膜炎の血漿中T-キニノーゲン量を特異的なRIAによって測定した結果、8時間後までに徐々に増加し、16時間後には正常の約10倍にまで達した (Fig. 6A)。rhIL-1 α (1×10^5 u) を投与した場合には8時間後で既に正常の7-8倍に増加しカラゲニンの場合よりも有意に高かった ($P < 0.01$, Fig. 6B)。その後20時間後まで増加した。

rhIL-1 α によるIL-6の誘導に対する抗rhIL-1 α 抗体の効果

rhIL-1 α による血漿中IL-6の誘導がrhIL-1 α の作用によるものであることを証明するために抗rhIL-1 α 抗体による中和試験を行った。その結果、rhIL-1 α に対するウサギ抗血清をrhIL-1 α (1×10^4 u) と共に胸腔内に注射したラットではrhIL-1 α 単独投与群に比べて明らかに血漿中のIL-6活性がほぼ正常レベルにまで抑制されていた (Fig. 8)。なお胸腔内のIL-1活性はこの抗体により99%以上抑制されていることを確認している (データ省

略)。

免疫組織染色による胸膜炎ラットの肝臓でのT-キニノーゲン産生

胸膜炎ラットの肝臓の組織切片上のT-キニノーゲン抗原を、ポリクローナル抗体を用いてPAP法により免疫染色した。カラゲニン足浮腫の場合と同様カラゲニン胸膜炎惹起後16時間のラットの肝臓において多数の陽性細胞が盛んなT-キニノーゲン合成を行っていることが示された (Fig. 9C)。rhIL-1 α (1×10^5 u) を投与したラットにおいても3時間後にいくつかの陽性細胞が現れ (Fig. 9A)、20時間後にはT-キニノーゲン産生の著明な促進が認められたが (Fig. 9B)、その程度はカラゲニン胸膜炎よりもやや弱かった。

ラット・ヘパトーマH4II EC3からのT-キニノーゲン産生に対するIL-1とIL-6の影響

Fig. 10Aに示すように、H4II EC3ヘパトーマ細胞からのT-キニノーゲン産生はrhIL-6の用量依存的に増加した。またこのrhIL-6の作用は抗rhIL-6抗体により完全に抑制された。これに反してrhIL-1 α は 1×10^5 u/mlの高濃度をもってしてもT-キニノーゲンの産生を誘導することはできなかった (Fig. 10B)。

<考察>

Fig. 1に示したようにカラゲニン足浮腫では炎症反応

がほぼ3時間後に最大となっているにもかかわらず、その時には血漿中のT-キニノーゲン量は正常レベルのままである。T-キニノーゲンが最大となるのは炎症のおさまった24時間以後である。肝臓でのT-キニノーゲン産生と血漿中のレベルを比べてみると (Fig. 2) 3時間後に陽性細胞が増加し始め、8時間後にはその発色が強まっている。血漿中のT-キニノーゲンの増加はこれより少しずつ遅れているようである。そして24時間後には肝臓でのT-キニノーゲン合成が最大となり、血漿中でも増加する。96時間後には血漿中のT-キニノーゲンは減少してはいるもののまだ高値を保っているのに対し、肝臓での産生は正常レベルに近い、というように肝臓での生合成が血漿中での変動に先行している。このことは血漿中のT-キニノーゲンが肝臓に由来していることを示しているが、それならば炎症局所から肝臓の実質細胞にT-キニノーゲン産生を誘導する何らかの因子も炎症反応が盛んな時間帯に血中を伝わったはずである。このような、急性炎症における急性期蛋白の増加の遅れは以前より知られ、局所から放出される因子として肝細胞刺激因子 (hepatocyte-stimulating factor) が報告された [11]。これがIL-6であるが *in vivo* の炎症モデルでこのようなサイトカインの動態を調べようとする時、足浮腫モデルでは組織の滲出液の定量的な採取は困難であるため、組織化学的な検討しか行えないであろう。そこで適切なモデルとして次に胸膜炎モデルに着目した。

カラゲニン胸膜炎の胸腔滲出液量、浸潤白血球数とTNF、IL-1、IL-6活性の経時変化を比較すると (Fig. 3A, 3B)、液量と白血球数が著明に増加する前にまずTNFが2時間後に最大の産生を示すことがわかる。IL-1はTNFよりやや遅れて上昇し、その動態は4時間後までは液量のそれにほぼ平行しているようである。IL-6はIL-1よりもさらに遅れて、5時間後までは白血球数と共に増加した。しかし5時間以降はこれらサイトカインレベルが減少していくにもかかわらず液量と白血球数は増加を続けた。以上の結果からまず第一に、これらサイトカインが炎症刺激によって産生され、この先行したサイトカインが2次的なサイトカインやアラキドン酸代謝物をはじめとするメディエーターを誘導することによって炎症反応の進展に寄与していることが示唆される。第二に *in vivo* においてもTNFがIL-1を、そしてこの両者がIL-6を誘導することが示唆され、*in vitro*の報告 [3] を裏づけている。これらのサイトカインの胸腔内での産生細胞を同定するためには今後、免疫染色などの検討を加える必要があるが、好中球がまだ浸潤してこない1時間後において既にそのレベルが上昇していることと一般に細胞あたりのサイトカインの産生能力はマクロファージが高いことを考えると胸腔内に約80%を占める単球がカラゲニンの刺激に応じてサイトカインを産生し始めることはまちがいないと思われる。一方好中球も近年になってその能力は低いもののサイトカインを産生することが報告されて

いる [21]。胸腔内への著しい好中球浸潤とサイトカイン産生のピーク (3-5 時間) が重なることを考えると好中球もこのモデルにおいてサイトカイン産生に寄与していると推定されるが、この両細胞による詳細な寄与の割合については今後の検討を必要とする。

Waage らは髄膜炎患者の脊髄液中に TNF, IL-1, IL-6 活性を検出し、IL-6 のみが白血球数と相関することを報告している [22]。彼らはさらにウサギの実験的髄膜炎モデルを用いて髄液中への白血球浸潤に先行して TNF, IL-1, IL-6 が連続的に産生されるのを認めている。これとは対照的に後藤らは炎症局所において IL-1 を産生するのは好中球であると長い間主張し続けてきた。彼らのマウスの腹膜炎を用いた実験では好中球浸潤と IL-1 産生の時間経過がよく一致している [23]。そして 4 時間後に単離した好中球は IL-1 を産生するが 24 時間後ではしないことを確認している。我々の胸膜炎モデルは初期のサイトカインの動態については Waage らのそれと似ているが、好中球浸潤とサイトカインの上昇が一致する点で異なっている。この点では後藤らの報告に近いが、我々のモデルでは好中球数とサイトカインレベルが 8 時間以降は一致しておらず、両報告の中間のようである。今後、種々の炎症モデルでのデータの蓄積が待たれる。

3 種のサイトカインのうち TNF と IL-1 活性は 5 時間以降に特に活性が激減している。この理由としては実際にサイトカインの産生が低下していることの他にインヒビ

ターの存在が考えられる。IL-1については1990年にIL-1レセプターアンタゴニストが精製され [24]、その後後藤らはウサギのIL-1レセプターアンタゴニストを炎症局所より精製し、ウサギ腹膜炎において後期のIL-1活性の低下がこのインヒビターの混在によることを報告した [25]。我々のモデルでは5時間後の胸腔滲出液のIL-1活性がゲル濾過した後も現れなかったことから (Fig. 4C, 4D) 分離可能なIL-1インヒビターの存在は考えにくい、IL-1とIL-1レセプターアンタゴニストの分子量 (約20 kD) は近い、ラット胸膜炎においてもこのインヒビターが現れる可能性はある。

今回滲出液中のラットIL-1活性を確認するためにヒトの白血病細胞株HSB.2を用いた (Table 1, Fig. 4B, 4D)。一般にヒトのサイトカインはマウスの細胞に対して活性を示すがその逆はないといわれている。今回の結果はラットのIL-1を検出する上でのこの細胞の有用性を示しているが、精製ラットIL-1を用いた確認と等電点電気泳動後 (Fig. 5) の滲出液の活性を測定する必要がある。滲出液中のIL-1は α 型であることが推定されたためにIL-1胸腔内投与の実験ではrhIL-1 α を用いたが、ラットIL-1 α に対するウサギ抗血清によって滲出液中のマウス胸腺細胞を用いた測定でのIL-1活性が90%以上抑制されることも確認している (第3章参照)。HSB.2細胞を用いた系での確認も必要と思われる。

TNFとIL-1活性は血漿中では検出限界以下であったが

IL-6活性は正常ラットにおいても測定できた(約1 u/ml)。そしてカラゲニン胸膜炎惹起後4時間でそのレベルは約30倍に上昇した (Fig. 6A)。同じ時間に胸腔内のIL-6濃度はその200倍にも達しているため、血中に誘導されたIL-6は胸腔内からの単純な拡散による可能性もある。しかしながらrhIL-1 α を胸腔内に投与した場合にも血漿中IL-6は1時間後に誘導された (Fig. 6B)。この作用はIL-1自身の作用であることが抗体の中和試験によって明らかである (Fig. 8)。この場合胸腔内のIL-6のピークは3時間後であり、その値はわずか200 u/mlであった (データ省略)。このことはIL-1が胸腔内から血中に速やかに移行し、血管内の細胞に作用してIL-6を誘導することを示唆している。したがってカラゲニン胸膜炎の血漿中IL-6は胸腔内から拡散したIL-6と、3時間後に胸腔内で最大となるIL-1によるその1時間後(4時間後)の血中で誘導されたIL-6の総和であると考えられる。どちらがどの程度寄与しているかについては今後の検討を要する。またこの血中でのIL-6の産生細胞が血液中の白血球であるか、あるいは内皮細胞であるかも興味のある課題である。

カラゲニン胸膜炎では血漿中のIL-6は4時間後にピークをとり、T-キニノーゲンは16時間後になって上昇している (Fig. 6A)。一方rhIL-1 α を投与した場合はIL-6のピークは1時間後でありT-キニノーゲンは8時間後に既に上昇している (Fig. 6B) というようにrhIL-1 α の方

が反応が少しずつ早くなっている。IL-6のピークからT-キニノーゲンの増加までの時間はほぼ同程度と考えられる。またrhTNF α を投与した場合は血漿中のIL-6のピークは3時間後であり (Fig. 7)、これはカラゲニン胸膜炎において胸腔滲出液中にTNFが最大 (Fig. 3B) となつてから血漿中IL-6が最大となる (Fig. 6A) までの時間にはほぼ等しい。

これらの事実はカラゲニン胸膜炎では炎症刺激によってまず局所でTNF, IL-1が産生され、これらが血中でIL-6を誘導し、血漿中T-キニノーゲンを増加させるという連鎖反応を示唆している。さらにラット・ヘパトーマを用いた実験 (Fig. 10) から肝臓の実質細胞に直接作用してT-キニノーゲン産生を促進するのはIL-1ではなくてIL-6であることが明らかである。したがってカラゲニン胸膜炎でのT-キニノーゲン増加におけるTNFとIL-1の役割はIL-6を誘導する段階までであって、直接のT-キニノーゲン産生促進作用はIL-6に依存していると考えられる。ただし、急性期蛋白の誘導因子はほとんどIL-6であるが、サイトカインに対する反応性は個々の蛋白によって若干異なっており、TNFやIL-1に直接反応するものも存在する [26]。今回の我々のモデルはこのような複数のサイトカインによる一連の急性期蛋白の誘導という複雑な経路のうちの明確に役割分担された部分のみを取り出した好例と言えるであろう。なおこれらの結果はラットにIL-1やIL-6を投与して α_1 -システインプロテアーゼイン

ヒビター (T-キニノーゲン) を含む急性期蛋白の増加を認めた他の報告 [3, 27] とよく一致している。

rhIL-1 α を胸腔内投与したラットでは、RIAによって示された血漿中T-キニノーゲンの上昇から予想された通り肝臓においても20時間後にその合成が促進されていることが免疫組織染色の結果より明らかとなった (Fig. 9B)。しかしながらその程度は16時間後のカラゲニン胸膜炎に比べて弱かった (Fig. 9C)。この差は急性炎症時でのこの蛋白の合成促進にTNFなどの他の因子が関与することを示唆している。今後 rhTNF α 投与ラットの肝臓の免疫染色を行うと共にTNFとIL-1の相乗作用についても検討する必要があると考えられる。

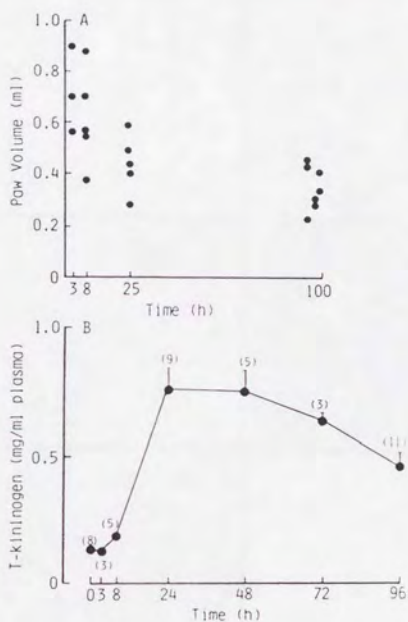


Fig. 1 A: Time course of rat paw swelling after carrageenin injection. B: Changes in the levels of T-kininogen in the plasma of paw edema-induced rats. Rats were intradermally injected with 0.1 ml of 1 % carrageenin in saline solution. Plasma T-kininogen level was measured by RIA using antibody A3H12 at the indicated times after the carrageenin injection. Numbers in parenthesis indicate the number of animals used.

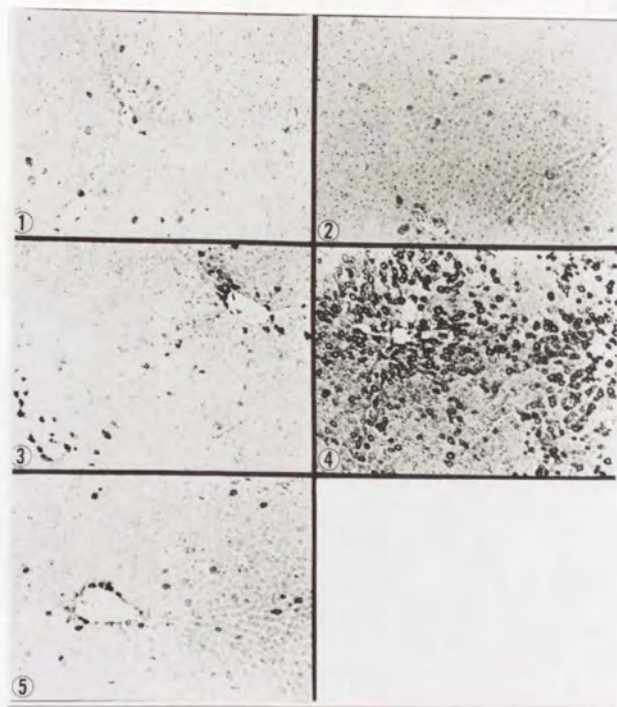


Fig. 2 Light microscopic observation of rat liver after carrageenin injection, stained by the ABC method. Liver specimens: control, not stimulated ①, at 3 h ②, 8 h ③, 24 h ④, and 96 h ⑤ after the carrageenin injection (x 250). In this case monoclonal antibody, A3H12, was used as a first antibody.

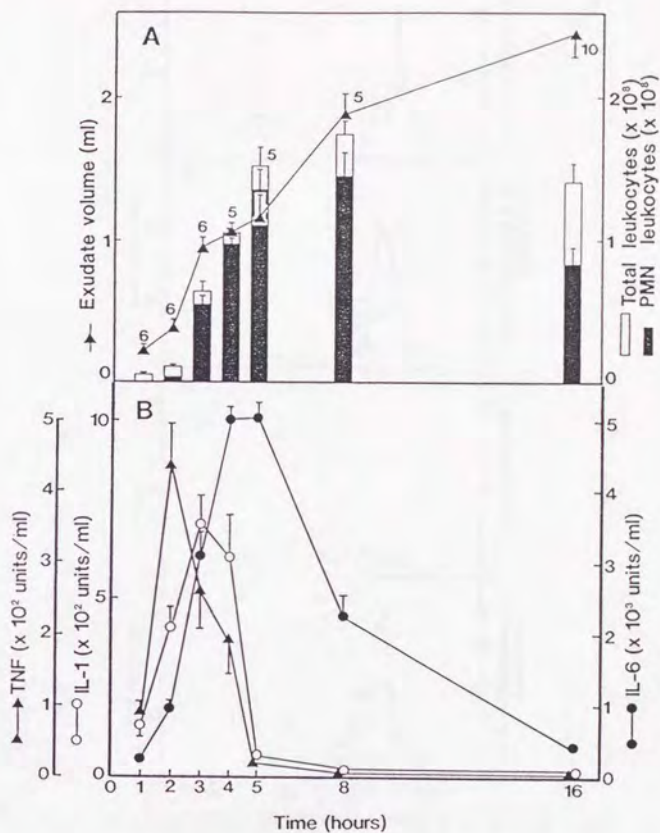


Fig. 3 Time courses of exudate accumulation and leukocyte migration (A), and those of activities of TNF, IL-1 and IL-6 in the exudate (B) during carrageenin-induced pleurisy in rats. Rats received the intrapleural injection of 0.1 ml of 2 % carrageenin. TNF activity, IL-1 activity determined by thymocyte co-stimulator assay and IL-6 activity were expressed as units/ml of the exudate. Figures at the top of columns indicate the number of animals used, and the values are expressed as means with SE as vertical bars.

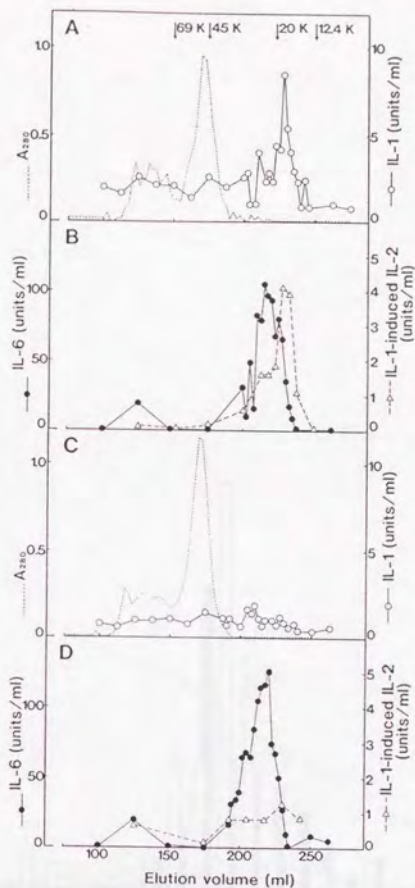


Fig. 4 Sephacryl S-200 column chromatography of the pleural fluids. Typical elution patterns of 3 h pleural fluid (A, B), and those of the 5 h one (C, D) are shown. A, C: IL-1 activity measured by thymocyte co-stimulator assay. B, D: IL-1-induced IL-2 activity and IL-6 activity. The IL-2 level was expressed as the value obtained after subtraction of the control value of the supernatant of HSB.2 C5B2 cells treated with phytohemagglutinin (20 μ g/ml) alone (1.5 U/ml). Figures at the top of panel A indicate m. w. of marker proteins eluted.

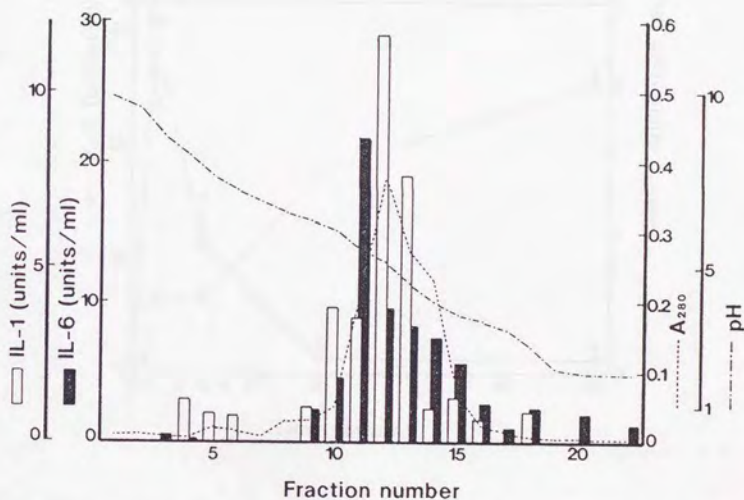


Fig. 5 Isoelectric focusing of a 4 h pleural fluid. Two hundred microliters of 4 h pleural fluid was applied onto the column. One milliliter fractions were collected, dialyzed, and tested in the thymocyte co-stimulator and IL-6 assay.

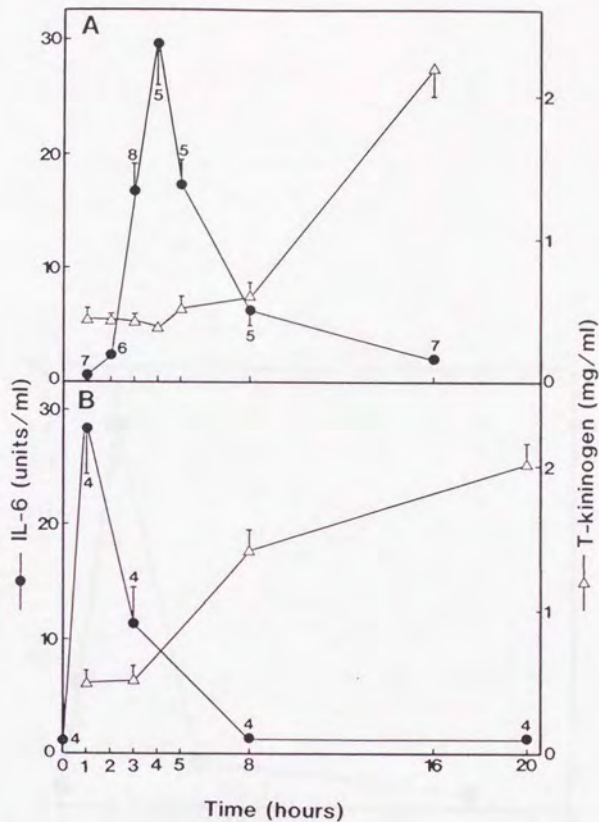


Fig. 6 Time courses of plasma levels of IL-6 and T-kininogen in rats after intrapleural injection of carrageenin (A) or rhIL-1 α (B). Plasma IL-6 activity was expressed as units/ml of plasma. Figures by the closed circles indicate the number of animals used, and the values are expressed as means with SE as vertical bars. A significant ($P < 0.01$) increase in T-kininogen level induced by rhIL-1 α (1×10^5 u) above that induced by carrageenin was observed at 8 h.

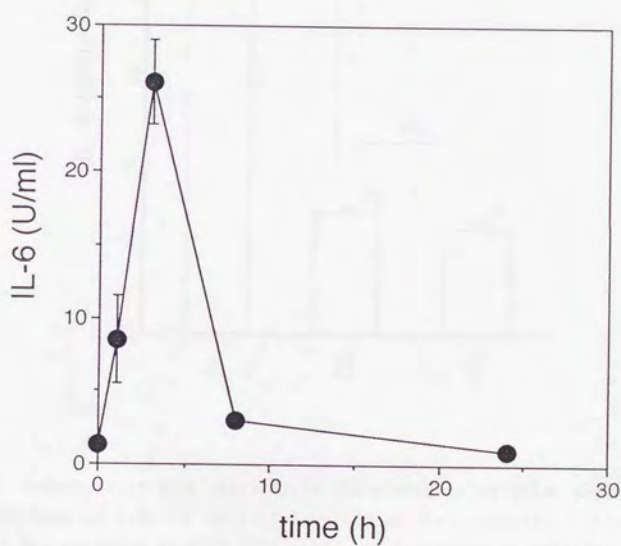


Fig. 7 Time course of plasma IL-6 level in rats after intrapleural injection of rhTNF α (2×10^4 u). Plasma IL-6 activity was expressed as units/ml of plasma. The values are expressed as means with SE as vertical bars. $n=3-5$.

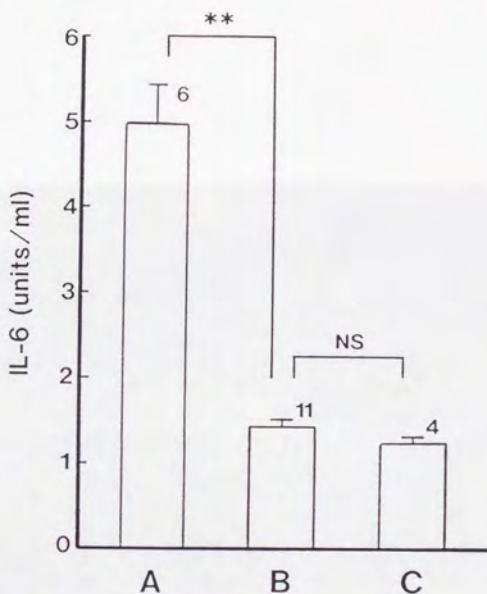


Fig. 8 Induction of IL-6 activity in the plasma by rhIL-1 α and counteraction with antibody to rhIL-1 α on rhIL-1 α -induced IL-6 activity. Plasma level of IL-6 was measured by MH60.BSF2 cells and expressed as units/ml. RhIL-1 α (1×10^4 u/20 μ l with 0.1 ml heated rabbit serum (A), or a mixture of rhIL-1 α , 1×10^4 u/20 μ l with antiserum to rhIL-1 α (0.1 ml) (B) was injected into the rat pleural cavity and 1 h later the plasma was drawn. C, control plasma level of IL-6. Figures by the columns indicate number of rats and the values are expressed as means with SE as vertical bars. **: significant difference at $P < 0.01$, NS; not significant.

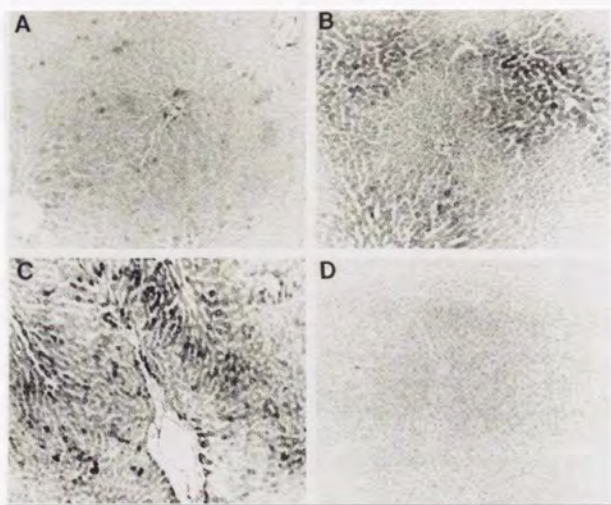


Fig. 9 Immunohistochemical observation of T-kininogen in rat liver. Liver specimens were stained by the PAP method (x 190). A, liver specimen from a rat injected with rhIL-1 α (1×10^5 u) and killed at 3 h; B, at 20 h; C, from a carrageenin-injected rat killed at 16 h; and D, a control specimen in the anti-T-kininogen antiserum was replaced by PBS.

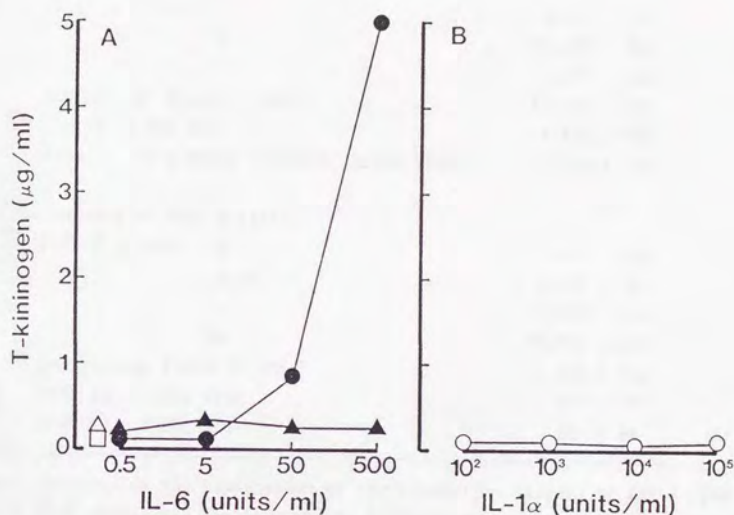


Fig. 10 Production of T-kininogen by rat hepatoma H4 IIEC3 cells cultured with rhIL-6 (A) or rhIL-1 α (B). Hepatoma cells (4×10^5 cells/0.4 ml) were cultured with indicated concentrations of rhIL-1 α (○) or rhIL-6 (●) for 72 h, and T-kininogen level in the supernatant was measured by RIA. In A, inhibition of T-kininogen production by anti-rhIL-6 antiserum (at a 1/40 dilution) is also shown (▲). Control levels of T-kininogen in the supernatants of cells cultured with medium alone (□) and anti-rhIL-6 antibody alone (▲) are illustrated.

Table 1 IL-2 production by HSB.2 cells cultured with pleural fluid

		IL-2 activity ^a (cpm \pm SE)
Stimulants of HSB.2 cells		
rhIL-1 α (U/ml)	0	2,328 \pm 290
	0.2	10,366 \pm 248
	2	34,354 \pm 476
3-h pleural fluid (1/100) ^b		18,139 \pm 360
rhIL-6	5,000 U/ml	2,626 \pm 352
rhIL-1 α (0.2 U/ml) + rhIL-6 (5,000 U/ml)		9,645 \pm 136
Stimulants of CTLL-2 cells		
rhIL-2 (U/ml)	0	382 \pm 130
	1.25	8,557 \pm 62
	5	30,096 \pm 845
	20	87,751 \pm 847
3-h pleural fluid (1/100) ^c		253 \pm 118
rhIL-1 α	1,000 U/ml	479 \pm 59
rhIL-6	3,000 U/ml	564 \pm 28

^aIL-2 activity of the supernatant of the incubation mixture of HSB.2 C5B2 cells with stimulants was measured by [³H]thymidine uptake by CTLL-2 cells. HSB.2 C5B2 cells (1×10^6 /ml) were incubated with stimulants and phytohemagglutinin (20 μ g/ml) for 24 h, and the supernatants were diluted 18-fold as the final concentration in the IL-2 assay. Each value is the average of triplicate experiments \pm SE.

^b1/100 dilution as the final concentration for HSB.2 C5B2 stimulation.

^c1/100 dilution as the final concentration for CTLL-2 stimulation.

第2章 炎症性サイトカインのラット胸腔内投与による 好中球遊走

局所に炎症刺激が加わると、急性期蛋白の増加などの全身反応に先だって局所への白血球遊走が起こる。このうち最も早く浸潤してくるのは好中球であるが、これに関与するメディエーターとしてはC5a, PAF, LTB₄などが知られている [1]。これらの他にいくつかのサイトカインが動物に注射した時に好中球遊走を起こすがそのうちTNFとIL-1の作用は直接的ではなく [28, 29]、蛋白合成を介した間接的な作用であることが報告されている [30]。1987年から1988年にかけて吉村と松島らはTNFやIL-1によって誘導される新たなポリペプチド性の好中球遊走因子を精製し [6]、遺伝子クローニングを行い [31]、これをインターロイキン8と名付けた [4]。したがって現在ではin vivoでのTNFとIL-1による好中球浸潤はIL-8の誘導を介すると考えられており、ウサギの炎症モデルにおいてその好中球遊走にIL-8が本質的に関与していることが報告されている [7]。

一方IL-8の発見以後多数のポリペプチド性の白血球遊走因子が同定され、これらは巨大なファミリーを形成することが明らかとなった [4]。ケモカイン (chemokine) と総称されるこれらの因子には好中球特異的なC-X-C chemokineと単球特異的なC-C chemokineが含まれるが、前者はさらにIL-8に近縁の分子や、元来メラノーマの成

長因子として発見された Melanoma Growth Stimulatory Activity (MGSA/gro) に近縁の分子 [32]、というように亜群に分類することができる。渡辺らはラット腎臓の上皮細胞株を IL-1 β で刺激した培養上清から好中球遊走因子 cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC) を精製し C-X-C chemokine の中でも IL-8 よりも MGSA/gro に近い因子として報告した [33]。ラットの炎症モデルにおける CINC の関与も報告され始めている [34]。ラット IL-8 と呼べる遊走因子は現在のところまだ発見されていない [35]。

IL-8 および CINC のラットへの投与による *in vivo* での好中球遊走については既にいくつかの報告があるが [36, 37, 38, 39] 同じ炎症モデルで両者の効力を比較した実験はない。また炎症局所でのサイトカインの相互作用、特に TNF, IL-1 による IL-8 の誘導を考慮するとこれら4種のサイトカインを含めた包括的な評価が望まれる。

本章ではこれらのサイトカインをラットの胸腔内に投与することによりその好中球遊走活性を評価した。さらにアクチノマイシン D (AcD) を用いてそれらの作用に蛋白合成が必要かどうか調べた。また抗炎症薬として重要なデキサメタゾン (Dex) は、IL-8 の産生を mRNA レベルで抑制することが知られているので [40]、この効果についても検討した。

＜方法＞

ラット胸腔内への好中球遊走

6週齢のSprague-Dawley系ラット（日本SLC）を1週間予備飼育後、実験に用いた。

化学合成されたCINC（ペプチド研（大阪）より供与された）、rhIL-8, rhTNF α , rhIL-1 α （大日本製薬より供与された）を滅菌生理食塩液に溶解し、それぞれ0.1 ml/ratとして右胸腔内に投与した。AcD（Sigma）は1または10 μ gを各サイトカインと共に投与した。Dex（Sigma）は0.5%カルボキシメチルセルロース溶液に懸濁し、サイトカイン投与の3時間前に0.5 mg/kgを腹腔内に投与した。

一定時間後、第1章に述べた方法によってエーテル麻酔下に頸動脈より採血し、放血致死させた後開胸し、胸腔内を1 mlの滅菌生理食塩液で2回洗浄した。血液と胸腔洗浄液中の白血球数を自動血球計数装置SysmexF-800（東亜医用電子、神戸）で測定した。また血液細胞と胸腔細胞の塗抹標本作製し、ギムザ染色により白血球の分類を行い、好中球数を算定した。

カラゲニン胸膜炎モデルは第1章と同様に作製した。
サイトカインアッセイ

TNF, IL-1, IL-6活性の測定は第1章と同様に行った。CINCはエンザイムイムノアッセイ（免疫生物研（藤岡）により供与された）により測定した。このEIA kitは

rhIL-8の5 μ g/mlに対しても交差性を示さなかった。検出限界は約80 pg/mlであった。

統計処理

結果は平均値 \pm 標準誤差で表示し、各群間の比較はstudentのt検定にて行い、 $P<0.05$ を有意とした。

<結果>

カラゲニン胸膜炎滲出液中のCINC

正常ラットの胸腔内CINCは検出限界以下 (<0.08 ng) であった。カラゲニン胸膜炎惹起後1時間後よりCINCは検出され、その後IL-1と同様の増加のパターン (Fig. 11B) を示し、4時間後にピークをとった後激減し、8時間以降はほぼ正常レベルに戻った (Fig. 11C)。胸腔内への好中球浸潤は1時間後ではまだほとんど見られないが2時間後より現れ3時間以降に急増して8時間後に最大となった (Fig. 11A)。血漿中のCINCレベルはTNF, IL-1と同様検出限界以下であった。

CINCとrhIL-8による胸腔内への好中球遊走

第1章で述べたように正常ラットの胸腔内に好中球はほとんど認められないが、CINC (1 μ g) を胸腔内投与すると1時間後に既に好中球数の増加が見られ、その数は3-5時間後に最大となり、8時間後には減少した (Fig. 12c)。この作用は3時間後において用量依存的であった。胸腔内総白血球数は8時間後までは好中球数の増減

に対応して変化した。20時間後には好中球数が減少したのに対し総白血球数は8時間後とほぼ同レベルであった (Fig. 12a)。同様に rhIL-8 を投与した場合にも3時間後に最大となる用量依存的な好中球遊走が認められたが (Fig. 13c)、8時間後でもCINCの場合ほど減少はせず、総白血球数は8時間後に最大となった (Fig. 13a)。

胸腔内への著明な好中球遊走作用に比べて、CINCおよび rhIL-8 投与後の血中の白血球数は一定の傾向を持った大きな変化は示さなかった (Fig. 12b, 12d, 13b, 13d)。rhTNF α と rhIL-1 α による胸腔内への好中球遊走

rhTNF α (2×10^4 u) の胸腔内投与により胸腔内の好中球数は増加し、8時間後に最大となり24時間後には減少したが、それでも最大時の約半数は存在していた (Fig. 14a)。総白血球数は8時間後まではこの好中球数の上昇に伴って増加したがそれ以後も増加を続けた。rhIL-1 α (1×10^5 u) もまた好中球浸潤をひき起こしたがその反応はTNFやCINC、IL-8に比べ遅かった (Fig. 14b)。好中球数の有意な増加 ($P < 0.01$) は3時間後に観察され、総白血球数の増加 ($P < 0.01$) は5時間後になって漸く認められた。それらの数は24時間後までほとんど変化しなかった。

血中への作用としては、rhTNF α は投与後1-5時間に (Fig. 14c)、rhIL-1 α は投与後1-3時間後に (Fig. 14d) それぞれ著明な ($P < 0.01$) 一過性の白血球数の減少をもたらした。最大で約70%の減少が3時間後に認められ

た。さらにこの一過性の好中球減少はその後増加に転じ、rhTNF α では8時間以降に (Fig. 14c)、rhIL-1 α では5時間以降に (Fig. 14d) 有意な ($P < 0.05$) 好中球増加が観察された。rhIL-1 α 投与では8時間以後に有意な ($P < 0.05$) 白血球増加も起こった。さらにrhTNF α は3時間後に、rhIL-1 α は1時間後に血中で正常の20-30倍の一過性のIL-6を誘導した (第1章参照)。

胸腔内へ好中球が浸潤し始め、かつ血中の白血球数が最小となる3時間後においてrhTNF α とrhIL-1 α による用量反応性を調べた。両者による胸腔内への好中球遊走の用量作用曲線はFig. 15a, 15bに示すようにベル型となった。また有効量の範囲はCINCとrhIL-8のそれ (Fig. 12c, Fig. 13c) よりも広いことがわかった。これに対してrhTNF α とrhIL-1 α による血中の白血球数減少は単純な用量依存性を示し、rhTNF α は 2×10^3 u以上で、rhIL-1 α は 1×10^4 u以上で有意な作用を示した (Fig. 15c, 15d)。

rhTNF α とrhIL-1 α による胸腔内でのCINCの誘導

rhTNF α とrhIL-1 α による好中球遊走が遊走因子の誘導によるものか調べる目的で、両者の投与後の胸腔内CINCレベルを測定した。rhTNF α (2×10^4 u) と rhIL-1 α (1×10^5 u) により内在性のCINCは急速に誘導され、1時間後に10-20 ngの最大値をとった後減少し8時間以後は検出限界以下 (< 0.08 ng) となった (Fig. 16)。これに反してrhIL-8によるCINCの誘導はほとんど

認められなかった。1 時間後のわずかな上昇は正常値に対して有意ではない。

一方、rhTNF α と rhIL-1 α 投与後の胸腔内のそれぞれの残存活性を測定したところ、Table 2 に示すように 1 時間後で既にどちらも 30-40 % にまで減少し、その後も 24 時間後まで減衰するのみであった。

サイトカインによる好中球遊走に対する AcD の影響

それぞれのサイトカインによる胸腔内への好中球遊走が蛋白合成を介するかどうか調べる目的で AcD 1 μ g または 10 μ g を各サイトカインと共に胸腔内に投与し、3 時間後の胸腔内の白血球数を測定した。rhTNF α と rhIL-1 α の投与量は胸腔内へ有意な好中球遊走をひき起こしかつ血中の白血球数の有意な減少を起こす (Fig. 15) 2×10^3 u と 1×10^4 u をそれぞれ選んだ。rhTNF α による 3 時間後の胸腔内への好中球浸潤は AcD の用量依存的に抑制され、特に 10 μ g ではほぼ完全に抑制された (Fig. 17a)。総白血球数もこの好中球数の減少に平行して AcD により有意に抑制された。rhIL-1 α の場合も同様であった (Fig. 17b)。この結果は rhTNF α と rhIL-1 α によって増加した 3 時間後の総白血球数の AcD による減少は好中球数の減少によるものであることを端的に示している。これに反して rhIL-8 と CINC による好中球数ならびに総白血球数の増加に対しては AcD は全く影響を示さなかった (Fig. 17c, 17d)。

rhTNF α と rhIL-1 α により誘導された CINC 産生に対する

AcDの影響

rhTNF α (2×10^3 u) と rhIL-1 α (1×10^4 u) を胸腔内に投与した場合には、著明な好中球遊走の起こる3時間後では既にCINCは低値となったがそれに先行する1時間後においてそれぞれ約10 ng, 8 ngのCINCが一過性に誘導された (Fig. 18)。したがって3時間後ではAcDのCINCに対する影響は明らかではないが1時間後の上昇したCINC産生をAcDは用量依存的に抑制し、10 μ gではほぼ完全に抑制した。

胸腔内のIL-6産生についても測定した結果、rhTNF α によるIL-6産生は1時間後にAcDにより抑制傾向が認められ、3時間後では10 μ gで有意に抑制された(データ省略)。rhIL-1 α の場合もほぼ同様の結果であった。

サイトカインによる好中球遊走に対するDexの影響

各サイトカインによる胸腔内への好中球遊走に対するDex (0.5 mg/kg) の効果を検討したところ rhTNF α (2×10^3 u), rhIL-1 α (1×10^4 u), rhIL-8 (5 μ g) による3時間後の好中球遊走はいずれも完全ではないが有意に抑制された (Fig. 19A, 19B, 19C)。また総白血球数も有意に抑制され、この減少が好中球数の減少によることが明らかである。ところがCINC (1 μ g) による好中球遊走および総白血球数に対してはDexは全く影響を示さなかった (Fig. 19D)。

サイトカインによる胸腔内IL-6の誘導とそれに対するDexの影響

rhTNF α (2×10^3 u) と rhIL-1 α (1×10^4 u) によって3時間後に胸腔内に著明なIL-6活性が誘導された (Fig. 20A, 20B)。また rhIL-8 (5μ g) によってもこれらに匹敵する量のIL-6が誘導されることが明らかとなった (Fig. 20C)。この誘導されたIL-6のうち rhTNF α と rhIL-8 によるIL-6産生はDexによって著明に抑制されたが (Fig. 20A, 20C) rhIL-1 α によるIL-6産生については抑制傾向はあるものの有意ではなかった (Fig. 20B)。一方CINCによるIL-6産生はほとんど認められなかった (Fig. 20D)。

＜考察＞

カラゲニン胸膜炎における胸腔内への好中球浸潤とCINC産生の時間経過を比較するとCINCの方が約1時間程好中球浸潤に先行して増加しており、またその量は4時間後に約400 ngに達している (Fig. 11A, 11C)。一方300 ngのCINCを胸腔内に投与後1時間で 10^7 個以上の好中球が胸腔内に集積している (Fig. 12c)。したがってカラゲニン胸膜炎モデルの好中球遊走にはCINCが少くとも一部は関与していると考えられる。今後抗CINC抗体を用いた直接の証明が必要であると考えられる。

カラゲニン胸膜炎での胸腔内のCINC産生とTNF, IL-1活性の時間経過を比較するとCINCはTNFよりやや遅れ、IL-1とはほぼ同じ挙動を示している (Fig. 11B, 11C)。し

たがって第1章で述べたIL-6と同様にこの場合もTNF, IL-1によりCINCが誘導される可能性がある。今後抗TNF, 抗IL-1抗体を用いた検討が必要である。5時間以降ではTNF, IL-1活性よりもさらに強くCINCは激減した。5時間後の滲出液中にはIL-1のインヒビターのみならず他のサイトカインに対するインヒビターも現れるのかも知れない。またこの時間以降も好中球浸潤が起きていることを考えると後期には別の好中球遊走因子が働く可能性がある。渡辺らはラットの空気嚢炎症モデルの滲出液からいくつかのC-X-C chemokineを精製したが、いずれもMGSA/groのタイプでありラットIL-8ではなかった [35]。一方Mulliganらはラットの実験的肺肺炎が抗CINC抗体では抑制されず、抗ヒトIL-8抗体によって著明に抑制されることを報告した [41]。したがってラットIL-8の存在については今後の研究が待たれるところであるが、いずれにせよ局所の滲出液には複数の遊走因子が含まれるであろう。

サイトカインの単独投与による胸腔内への好中球遊走の実験では、今回調べた4種のサイトカイン (CINC, rhIL-8, rhTNF α , rhIL-1 α) はいずれもラットにおいてin vivoで好中球遊走活性を示すことが明らかとなった。各サイトカインによる好中球浸潤は8時間後まではいずれの場合も総白血球数の増減とほぼ平行しており、好中球に対し特異的な作用であることがわかる (Fig. 12a, 12c, 13a, 13c, 14a, 14b)。その後24時間では好

中球数は減少するのに対し総白血球数はrhTNF α と rhIL-1 α の場合に特に増加している (Fig. 14a, 14b)。このことは後期になると単球系の細胞が浸潤してくることを示唆している。1988年に松島らはIL-8の他にTNF, IL-1によって誘導されるmonocyte chemotactic and activating factor (MCAF)を単離したが [4] このMCAFによるin vivoでの単球遊走に関する研究はIL-8に比べて非常に遅れている。したがって今回のrhTNF α と rhIL-1 α による後半での単球の遊走にはMCAFを含む遊走因子の関与が考えられる。

4種のそれぞれのサイトカインの最大投与量は約 $1-6 \times 10^{-10}$ molの範囲内にある (CINC $1 \mu\text{g} = 1.4 \times 10^{-10}$ mol, rhIL-8 $5 \mu\text{g} = 6.3 \times 10^{-10}$ mol, rhTNF α $2 \times 10^4 \text{ u} = 4.6 \times 10^{-10}$ mol, rhIL-1 α $1 \times 10^5 \text{ u} = 2.4 \times 10^{-10}$ mol)。ほぼ近い値ながら各サイトカインによる胸腔内への好中球遊走の時間経過はそれぞれ特徴的なパターンを示した (Fig. 12c, 13c, 14a, 14b)。どのサイトカインが最も強い作用を持つかはrhTNF α と rhIL-1 α の用量反応性が複雑 (Fig. 14a, 14b)なので一概には決められない。しかしこれらのサイトカインはその好中球遊走を起こす機序の違いによりCINC, rhIL-8とrhTNF α , rhIL-1 α との2群に大きく分類できる。その理由は以下の通りである。1) CINCとrhIL-8による好中球遊走はrhTNF α とrhIL-1 α によるそれよりも早い反応であった (Fig. 12c, 13c, 14a, 14b)。2) 3時間後の

rhTNF α と rhIL-1 α による好中球遊走の用量作用曲線は CINC と rhIL-8 によるそれと異なり、ベル型を示した (Fig. 15a, 15b)。3) rhTNF α と rhIL-1 α は 3 時間後に最小となる一過性の著明な血中の白血球減少をひきおこしたが (Fig. 14c, 14d)、CINC と rhIL-8 にはそのような作用はなかった (Fig. 12b, 13b)。4) rhTNF α と rhIL-1 α による好中球遊走は AcD により抑制されたが (Fig. 17a, 17b) rhIL-8 と CINC によるそれは抑制されなかった (Fig. 17c, 17d)。5) rhTNF α と rhIL-1 α により胸腔内に内在性の CINC 産生の亢進が見られたが rhIL-8 は CINC を誘導しなかった (Fig. 16)。さらに前者は血中で IL-6 を誘導したが後者はしなかった (データ省略)。これらの事実は TNF と IL-1 が CINC を含む蛋白性の好中球遊走因子を誘導することによってその作用を発揮するのに対し、CINC と rhIL-8 はそれ自身が直接好中球に作用して局所へ集積させることを示している。Cybulsky らは [30] 既に TNF と IL-1 によるウサギの皮内への好中球浸潤に蛋白合成が関与することを報告している。今回の結果はこれらの報告と一致しているが誘導される具体的な好中球遊走因子の一つ (CINC) をさらに示したものと見える。

CINC と rhIL-8 による胸腔内への好中球遊走能を比べると CINC の方が rhIL-8 よりも 5 倍以上強かった (Fig. 12c, 13c)。渡辺らは CINC をラットの皮内に投与して好中球浸潤を確認している [38]。また平沢らは空気嚢モデルを用いて CINC の *in vivo* での効果を確認しており [39]、

この時の投与量は今回の胸腔内投与で用いた量とよく一致している。rhIL-8をラットの皮内 [36, 37] に投与して好中球浸潤を調べた実験もあるが同じシステムで比較したのは本研究が初めてである。in vitroではラットの好中球に対してはヒトのIL-8やMGSA/groよりもCINCの方が約100倍遊走作用が強いこと、そしてIL-8とMGSA/groの効力についてはほとんど差がないことが報告されている [38]。逆にラットの好中球に対するヒトのIL-8の遊走作用はヒトの好中球に対するそれに対して約1/100であることも報告されている [37]。もしそうであれば今回のCINCの遊走作用の強さはCINCとIL-8という分子の違いのためではなくてラットの好中球のヒトとラットのサイトカインに対する反応性の差に起因すると考えられるであろう。

rhTNF α とrhIL-1 α によって1時間後に胸腔内に著明に誘導されたCINC (Fig. 18) は3時間後のこれらサイトカインによる好中球遊走 (Fig. 17a, 17b) を説明できるであろうか。時間の面から考察すると、外から投与したCINCが最大に好中球浸潤をひきおこすのに3-5時間要するので (Fig. 12c) rhTNF α とrhIL-1 α によって1時間後に誘導されたCINCがさらに2時間後 (3時間後) に好中球をよびよせることは充分考えられる。さらに蛋白合成阻害剤であるAcDによるこの先行したCINCレベルの抑制のパターン (Fig. 18) と3時間後の好中球浸潤の抑制のパターン (Fig. 17a, 17b) は非常によく一致し

ている。一方胸腔内のTNFとIL-1活性は単純に減少するのみであった (Table 2)。これらの事実はCINCがTNFとIL-1による *in vivo*での好中球遊走におけるメディエーターとなりうることを示唆している。しかしながらFig. 12cにおいて100 ngのCINCによる好中球遊走がかなり少ないことを考えるとrhTNF α とrhIL-1 α によって誘導された10-20 ngのCINCでは有意な作用を示すことができるのか疑問が残る。またAcDは非特異的な蛋白合成阻害剤であるため、他のさらに有効な複数の遊走因子を抑制する可能性も充分ある。したがってTNFとIL-1による好中球遊走にCINCがどの程度関与しているかについては今後抗CINC抗体を用いた抑制試験により解析する必要がある。いずれにしてもTNFとIL-1はアラキドン酸代謝物の産生に関与する酵素の誘導作用もあるため、CINCだけでは説明できず、IL-8を含めた未知の因子が介在する可能性がある。

rhTNF α とrhIL-1 α の投与後血中の白血球数は一過性に減少した (Fig. 14c, 14d)。これはエンドトキシンショック時によく知られた現象であり、TNFとIL-1がその主なメディエーターであることがウサギなどでは既に明らかとなっている [42]。しかしラットにおいてはTNFとIL-1による白血球減少の報告自体があまり見当たらない。したがって今回の結果はTNFとIL-1のこの作用をラットにおいても確認した基礎的データとしての価値もあるといえる。Fig. 15に示すように血中の白血球数が有意に

減少する投与量において (rhTNF α : 2×10^3 u 以上、rhIL-1 α : 1×10^4 u 以上) 胸腔内の白血球数も減少していくこと、しかもそれは浸潤してくる好中球数の減少によることがわかる。実際の白血球数があまり変化していないと仮定すると、この結果から白血球の一部特に好中球が血管と組織(胸腔内)の間、おそらく血管内皮細胞上に接着している可能性が推定される。近年接着分子の研究が進み、TNF、IL-1によって誘導されるE-セレクトインなどがin vivoで炎症の進展に寄与することが報告されている [43]。したがって今回の高用量のrhTNF α とrhIL-1 α による白血球減少の機序には接着分子が関係しているかも知れない。IL-8は比較的弱い作用ながら血中の好中球を増加させることが報告されているが [4]、今回の結果では用量に依存した明確な作用は認められなかった (Fig. 13d)。またCINC投与後の血中の白血球数の変動を記録したのは本研究が初めてであるが、この場合も有意な影響は観察されなかった (Fig. 12c, 12d)。

サイトカインによるラット胸腔内への好中球遊走に対するDexの作用はAcDの作用に比べてはるかに複雑である。まず第一にDexは直接的な好中球遊走因子であるはずのサイトカインのうちCINCによる反応には全く影響しなかったにもかかわらずrhIL-8による好中球遊走を有意に抑制してしまった (Fig. 19C, 19D)。これは、rhIL-8とCINCの分子の違いか、ラットの反応性に関係するのか、あるいはリコンビナント製品と化学合成品という違いな

のか、いくつかの原因は挙げられるがいずれにしてもその機序については現在のところ不明である。Fig. 20C, 20Dに示すようにrhIL-8がIL-6を誘導しCINCはしないことからIL-8が何らかの走化因子をさらに誘導する可能性もある。IL-6の白血球に対する走化性については報告されていない。平沢らはラット空気嚢炎症モデルにおいてCINCによる好中球遊走がDexによって抑制されることを報告したが [39]、今回の胸膜炎での結果とは合致しない。第二にrhTNF α , rhIL-1 α , rhIL-8による好中球遊走に対するDexの抑制効果はAcDのそのように完全なものではなかった。投与量はカラゲニン胸膜炎を十分に抑制する量なので(第3章参照)問題はないと思われる。rhTNF α とrhIL-1 α により誘導される1時間後の胸腔内CINC量をDexが抑制するかどうか調べたところわずかに抑制傾向が認められる程度であった(データ省略)。in vitroではDexによってIL-8も [40] CINCも [44] 著明にその産生が抑制されることが報告されている。したがって今回の結果からはin vivoではDexによる好中球遊走因子の産生の抑制はされにくいこと、TNFとIL-1による好中球遊走にはCINC以外のDex感受性の因子を介することが示唆されたことになる。

サイトカインによる3時間後の胸腔内でのIL-6誘導の結果はrhIL-8にその作用があり、CINCにはないことを示している (Fig. 20C, 20D)。これもIL-8とCINCの差であるかも知れない。今後rhIL-8投与後の急性期蛋白の変動

についても検討する必要がある。TNFとIL-1によるIL-6の誘導についてはよく知られておりDexによるその抑制もin vitroで報告されている [45]。しかし今回の結果ではrhTNF α とrhIL-8によるIL-6の誘導はDexによって著明に抑制されたがrhIL-1 α による作用に対する抑制は有意ではなかった (Fig. 20A, 20B, 20C)。しかし1時間後では有意に抑制していたので (データ省略) in vivoでのrhIL-1 α によるIL-6誘導作用に対するDexの抑制効果はrhTNF α やrhIL-8の場合に比べて長くは続かないと考えられる。

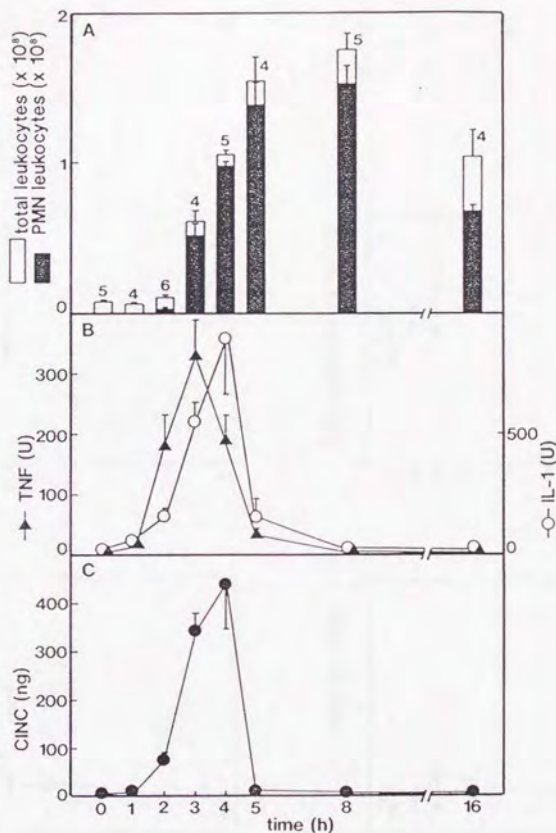


Fig. 11 Time course of leukocyte migration (A), and that of activities of TNF and IL-1 (B), and CINC level (C) during carrageenin- induced pleurisy in rats. Rats received the intrapleural injection of 0.1 ml of 2 % carrageenin. IL-1 activity determined by thymocyte co-stimulator assay and TNF activity were expressed as total units in the exudate. Figures at the tops of columns indicate the number of animals used, and the values are expressed as means with SE as vertical bars.

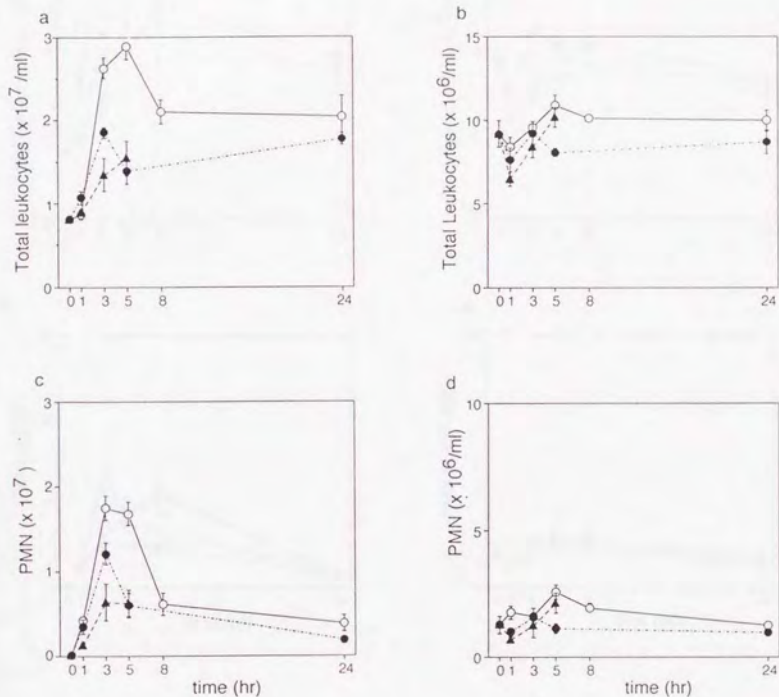


Fig. 12 Time courses of the number of leukocytes (a, b) and neutrophils (c, d) in pleural cavity (a, c) and in peripheral blood (b, d) by intrapleural injection of ClNC 0.1 μg (\blacktriangle), 0.3 μg (\bullet) and 1 μg (\circ). The values are expressed as means with SE of 4-5 rats except 0 h control group (n=8).

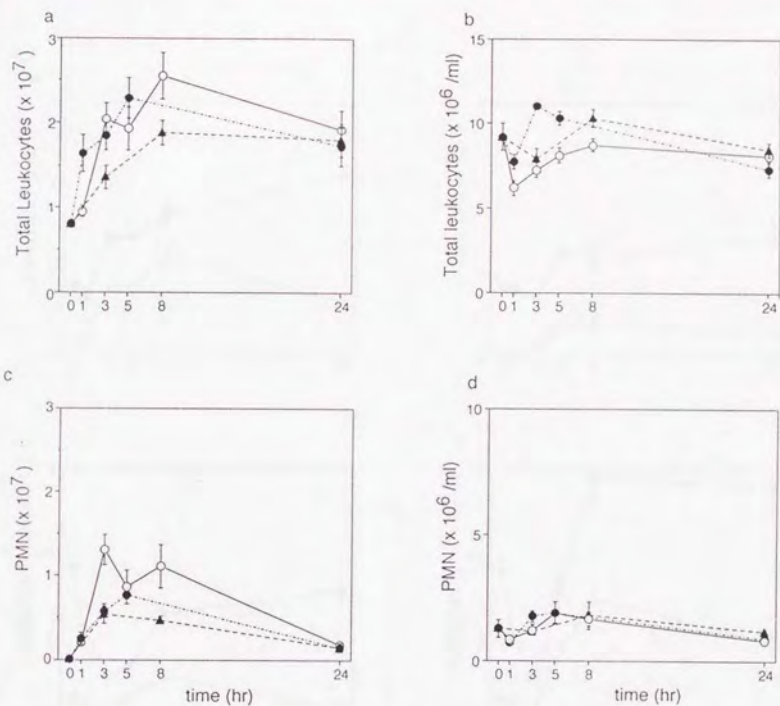


Fig. 13 Time courses of the number of leukocytes (a, b) and neutrophils (c, d) in pleural cavity (a, c) and in peripheral blood (b, d) by intrapleural injection of rhlL-8 0.2 μ g (▲), 1 μ g (●) and 5 μ g (○). The values are expressed as means with SE of 11-14 rats (dose 5 μ g) or 4-5 rats (other doses except 1 μ g at 24 h: n=3, and 0 h control: n=8).

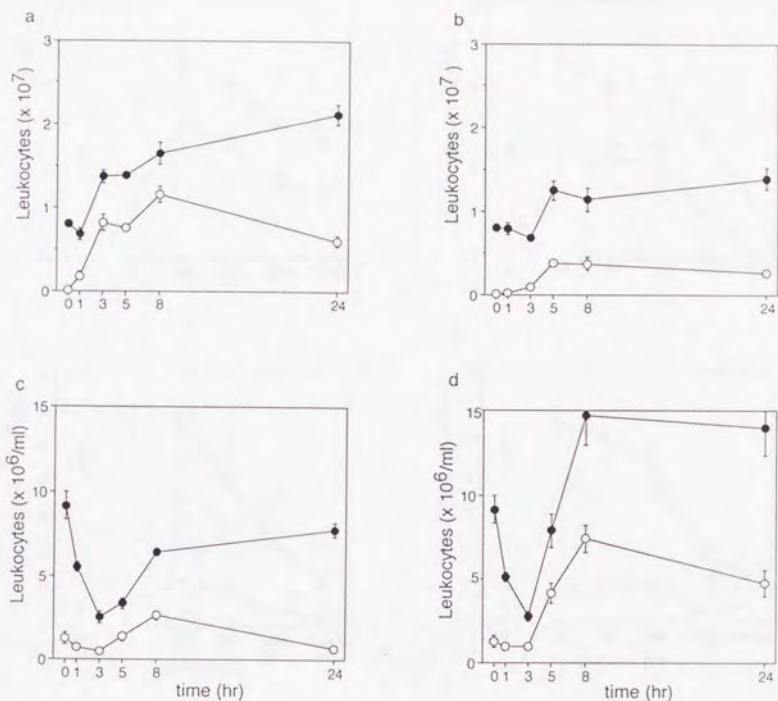


Fig. 14 Time courses of the number of leukocytes (●) and neutrophils (○) in pleural cavity (a, b) and in peripheral blood (c, d) by intrapleural injection of rhTNF α 2×10^4 u (a, c) or rhIL-1 α 1×10^5 u (b, d). The values are expressed as means with SE of 4-6 rats except 0 h control group (n=8).

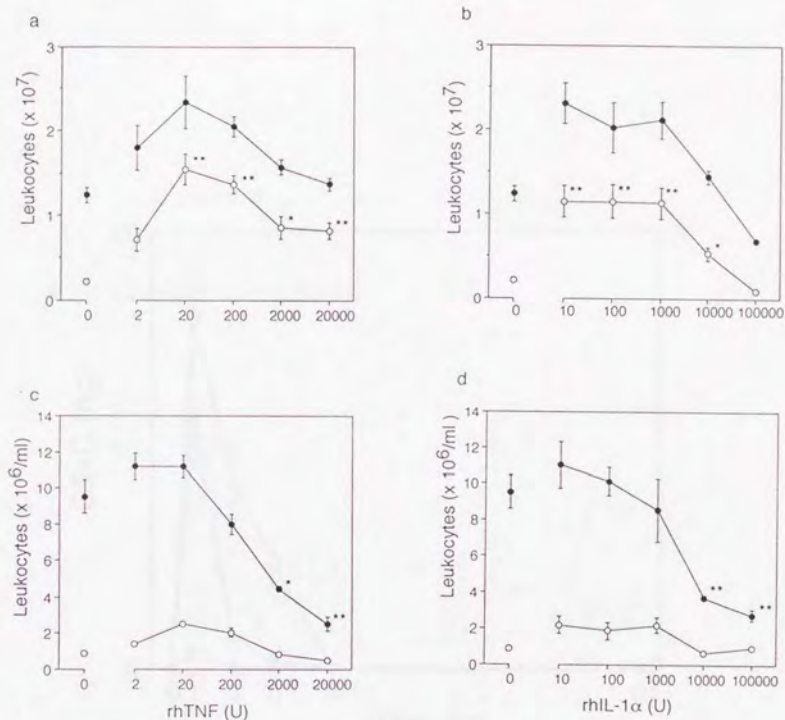


Fig. 15 Dose response of the infiltration of leukocytes (●) and neutrophils (○) into pleural cavity (a, b) and leukopenia (c, d) by intrapleural injection of rhTNF α (a, c) and rhIL-1 α (b, d) at 3 h. The group of dose 0 received intrapleural injection of saline. The values are expressed as means with SE of 4-8 rats. *P<0.05 and **P<0.01 vs dose 0 group.

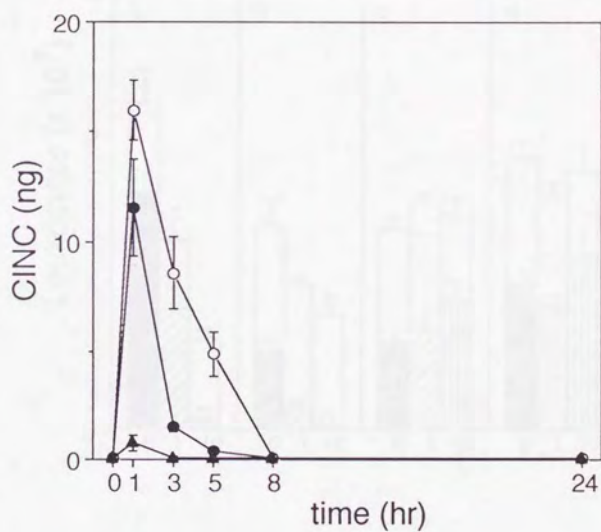


Fig. 16 CINC induction in pleural cavity by intra-pleural injection of rhTNF α 2×10^4 u (●), rhIL-1 α 1×10^5 u (○) or rhIL-8 5μ g (▲). The values are expressed as means with SE and the numbers are the same in corresponding groups in Fig. 13 and 14.

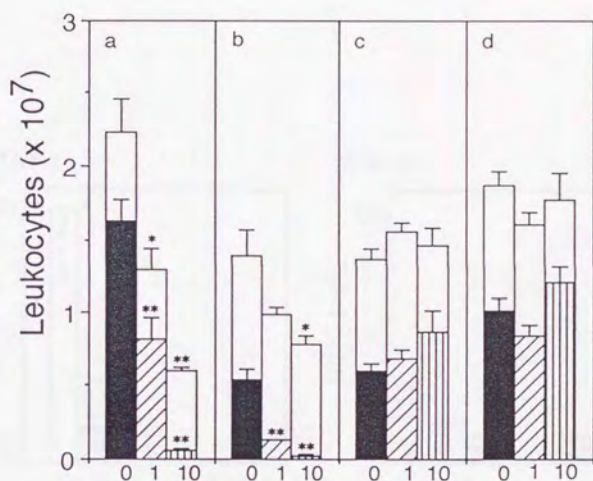


Fig. 17 Effect of actinomycin D (AcD) on cytokine-induced neutrophil accumulation in pleural cavity at 3 h. AcD 1 or 10 μ g was injected concomitantly with rhTNF α 2×10^3 u (a), rhIL-1 α 1×10^4 u (b), CINC 1 μ g (c) or rhIL-8 5 μ g (d). The number of leukocytes (open + closed columns) and neutrophils (closed columns) are shown. The values are expressed as means with SE of 4-5 rats. *P<0.05 and **P<0.01 vs cytokine alone (AcD dose 0).

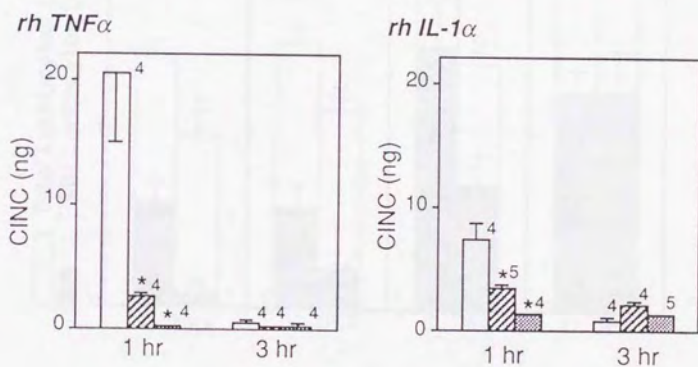


Fig. 18 Effect of actinomycin D (AcD) on rhTNF α - and rhIL-1 α -induced CINC production in pleural cavity. AcD 1 μ g (▨) or 10 μ g (▩) was injected concomitantly with rhTNF α 2 \times 10³ u (a) or rhIL-1 α 1 \times 10⁴ u (b). The values are expressed as means with SE of 4-5 rats. *P<0.05 vs cytokine alone (AcD dose 0, □).

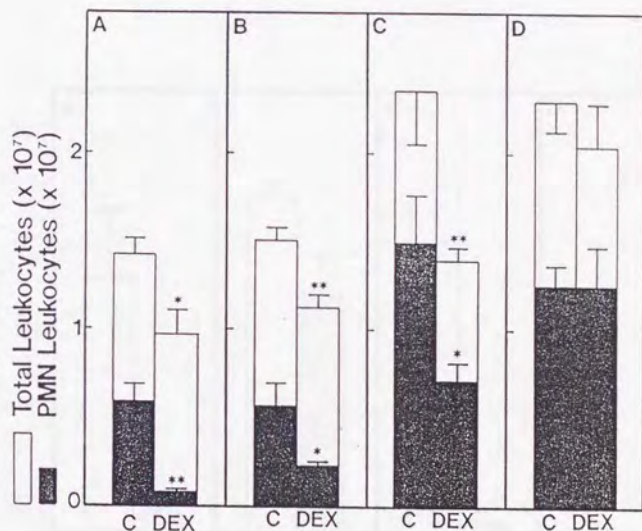


Fig. 19 Effect of dexamethasone (DEX) on cytokine-induced neutrophil accumulation in pleural cavity at 3 h. DEX (0.5 mg/kg) was injected intraperitoneally 3 h before intrapleural injection of rhTNF α 2 x 10³ u (A), rhIL-1 α 1 x 10⁴ u (B), rhIL-8 5 μ g (C) or CINC 1 μ g (D). The number of leukocytes (open + closed columns) and neutrophils (closed columns) are shown. The values are expressed as means with SE of 3-5 rats. *P<0.05 and **P<0.01 vs cytokine alone.

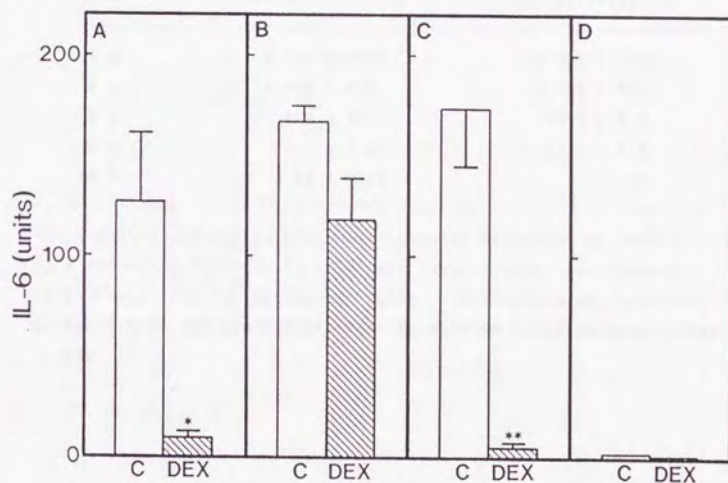


Fig. 20 Effect of dexamethasone (DEX) on cytokine-induced IL-6 activity in pleural cavity. DEX (0.5 mg/kg) was injected intraperitoneally 3 h before intrapleural injection of rhTNF α 2×10^3 u (A), rhIL-1 α 1×10^4 u (B), rhIL-8 5μ g (C) or CINC 1μ g (D). IL-6 activity was expressed as total units in the exudate and the values are expressed as means with SE of 3-5 rats. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs cytokine alone.

Table 2 Attenuation of TNF and IL-1 activities in pleural cavity

Time	TNF activity (u)	IL-1 activity (u)
1 h	8,217 \pm 2765	27,250 \pm 2666
3 h	1,494 \pm 427	1,205 \pm 401
5 h	128 \pm 66	30.2 \pm 5.9
8 h	5.1 \pm 2.9	18.1 \pm 7.4
24 h	0.54 \pm 0.09	< 0.16

TNF and IL-1 activities after intrapleural injection of rhTNF α (2×10^4 u) or rhIL-1 α (1×10^5 u), respectively, are shown as rhTNF α and rhIL-1 α equivalent units. The values are expressed as means \pm SE and the numbers are the same in corresponding groups in Fig. 16.

第3章 カラゲニン胸膜炎におけるサイトカイン産生に対する抗炎症薬の影響

第1章と第2章においてカラゲニン胸膜炎の胸腔滲出液中にTNF, IL-1, IL-6, CINCといった炎症性サイトカインが連続的に現れ、炎症の進展に寄与しうることを述べた。サイトカインレベルの上昇する時間帯にはこのような蛋白性の因子以外にも脂質メディエーターをはじめとする多くの因子が血管透過性や白血球浸潤に関与している [1]。そしてそれらの反応は決して独立した作用の単純な総和ではなく、一つの因子が他の因子の作用や産生に絶えず影響を及ぼしながら成立している。

例えばTNFとIL-1の広範な作用にはホスホリパーゼやシクロオキシゲナーゼの誘導や副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)の誘導も含まれるが、これらの結果として産生されたPGやグルココルチコイドは今度は逆にTNF, IL-1の産生を抑制するというネガティブ・フィードバック機構が存在する [2]。しかしながらこれらの知見はin vitroの実験によって得られたものがほとんどでありin vivoでどの程度関与しているかについては不明な点が多い。カラゲニン胸膜炎の滲出液中にはPGE₂が検出されているため [9] 炎症局所においてもPGE₂によるサイトカイン産生の制御があることが予想される。

本章ではこのようなin vivoでのPGE₂によるサイトカイン産生の調節という仮説に基ずき、カラゲニン胸膜炎

の滲出液中のサイトカイン産生に対する抗炎症薬インドメタシンとデキサメタゾンの影響について解析し、炎症局所でのサイトカイン産生の制御機構について考察した。

〈方法〉

カラゲニン胸膜炎と抗炎症薬の投与

カラゲニン胸膜炎モデルは第1章と同様に作製した。インドメタシン (Sigma) とデキサメタゾン (Sigma) は0.5 %カルボキシメチルセルロースに懸濁し、インドメタシンは1または10 mg/kgをカラゲニン投与の30分前に、デキサメタゾンは0.5 mg/kgを3時間前にラットの腹腔内に投与した。サンプルの採取は第1章と同様に行った。サイトカインアッセイ

サンプル中のTNF, IL-1, IL-6, CINCは第1章および第2章に述べた方法により測定した。インドメタシンとデキサメタゾンはこの実験条件ではこれらの測定系に対し影響を示さなかった。

滲出液中のTNF活性はハムスターの抗マウスTNFモノクローナル抗体TN3-19.12 (ワシントン医科大学のRobert D. Schreiber博士より恵与された) と希釈した滲出液を室温で1時間反応させた後にTNFアッセイをすることにより中和試験を行った。この抗体はラットのTNFに交差することが報告されている [46]。滲出液中のIL-1活性についてはリコンビナント・ラットIL-1 α [47] をウサ

ギに免疫して得られたポリクローナル抗体（ μ エーザイより供与された）を用いて同様に中和試験を行った。

PGE₂の酵素免疫測定法（EIA）

胸腔滲出液を、過剰なPGE₂産生を阻止するために50 μ g/mlのインドメタシン存在下に回収して遠心分離後、その上清をSEP-PAK C18カラム（Waters）を用いて既報[48]のようにPGE₂を抽出した。すなわちサンプルをSEP-PAK C18カラムに供し蒸留水10 ml、15 %エタノール10 ml、ベンゼン10 mlで洗浄しメタノール4 mlにて溶出させた。この溶出画分を蒸発乾固させ、PGE₂のEIA kit（Cayman Chemical）の緩衝液に溶解させてPGE₂量を測定した。この抽出操作による回収率は約70 %であった。

胸腔常在細胞からのサイトカイン産生

ラットの胸腔内を滅菌生理食塩液で洗浄することにより常在細胞を回収した。これを24穴プレートにまきこみ（ 1×10^6 cells/ml）PGE₂（ 10^{-8} - 10^{-6} M）存在下にlipopolysaccharide（LPS, 055:B5, Difco, 10 μ g/ml）で刺激し10 % FCS-RPMI1640培地中で20時間培養後の上清中のサイトカインを測定した。また内在性のPGE₂産生を阻止するためにインドメタシン（ 10^{-5} M）を加え、外因性のPGE₂の効果のみが評価できるようにした。PGE₂はこの濃度ではサイトカインのアッセイ系に影響をおよぼさなかった。

統計処理

結果は平均値 \pm 標準誤差で表示し、各群間の比較は

studentのt検定にて行った。ただし、TNFとIL-1活性の中和試験と常在細胞からのサイトカイン産生のデータについてはDunnett's multiple comparisonにより検定した。いずれの場合も $P<0.05$ を有意とした。

〈結果〉

インドメタシンとデキサメタゾンの抗炎症作用

カラゲニン胸膜炎に対する抗炎症薬インドメタシンとデキサメタゾンの効果を炎症惹起3時間後において調べた。この時間を選んだ理由は第1章で見たように滲出液の滲出速度が非常に速くなる時であり、好中球浸潤もそれが総白血球数の約80%に達するほど顕著になっているからである。また4種のサイトカインTNF、IL-1、IL-6、CINCも共存して高値を示しているからである。インドメタシンは胸腔滲出液量を用量依存的に減少させた(Fig. 21A)。デキサメタゾンの抑制効果はさらに強かった。浸潤白血球数についてはインドメタシンが高用量(10 mg/kg)で有意な抑制を示し、デキサメタゾンはさらに著明に抑制した(Fig. 21B)。この減少は主に好中球数の減少によるものであった。

インドメタシンとデキサメタゾンの胸膜炎でのサイトカイン産生に対する影響

デキサメタゾン投与により3時間後の胸腔滲出液中のTNF、IL-1、IL-6、CINC産生はすべて有意に抑制された

(Fig. 22A, 22B, 22C, 27A)。一方インドメタシンはTNF, IL-1産生を用量依存的に増加させたが (Fig. 22A, 22B)、IL-6, CINC産生を有意に抑制した (Fig. 22C, 27A)。

インドメタシンによって増加したTNFとIL-1活性がTNFとIL-1 α の分子の作用によるものか確認するために特異的な抗体を用いた中和試験を行った。既に第1章で等電点電気泳動によりこのIL-1が主に α 型であることを示している。Fig. 23に示すように対照群のラットのTNF, IL-1活性もインドメタシン投与群のそれらもハムスターの抗マウスTNF抗体および抗ラットIL-1ウサギ抗血清によってそれぞれ同様にかつ90%以上活性が抑制されることがわかる。したがって滲出液中のIL-1が α 型であることが確認されたとともに、インドメタシンによって確かにTNFとIL-1の産生が増強されていることが示された。

血漿中に増加したIL-6に対してはインドメタシンは1 mg/kgではさらに上昇させること、また10 mg/kgでは抑制する傾向が認められたがいずれも有意な作用ではなかった (Fig. 24)。デキサメタゾンは血漿中のIL-6活性を著明に抑制した。

胸腔滲出液中のPGE₂量

カラゲニン胸膜炎の胸腔滲出液中のPGE₂量はインドメタシンによってもデキサメタゾンによっても著明に抑制された (Fig. 25)。

胸腔常在細胞からのサイトカイン産生に対するPGE₂の影

置

胸腔常在細胞をPGE₂存在下にLPS (10 μ g/ml) で刺激すると培養上清中のTNF活性はPGE₂の用量依存的に著明に抑制された (Fig. 26A)。IL-1活性もPGE₂の10⁻⁷ M以上で有意に抑制された (Fig. 26B)。対照的にIL-6活性はPGE₂の10⁻⁸ M以上で有意に増加した (Fig. 26C)。またCINCはPGE₂の存在下でわずかに増加傾向を示した (Fig. 27B)。

＜考察＞

カラゲニン胸膜炎においてインドメタシンは胸腔滲出液量を有意に抑制し (Fig. 21A) 10 mg/kgでは浸潤白血球数も抑制した (Fig. 21B)。この時胸腔内のPGE₂はデキサメタゾン投与の場合と同様に著明に抑制されていた (Fig. 25)。PGE₂は白血球遊走よりも血管透過性亢進作用を主に持つため、これらの結果はインドメタシンがシクロオキシゲナーゼを阻害して [49] PGE₂の産生を抑制することにより抗炎症作用を発揮することをよく示している。

しかしながらインドメタシンのサイトカイン産生に対する効果はデキサメタゾンのそれと非常に異なっていた (Fig. 22)。滲出液中のTNFとIL-1は抗体の中和試験によっても確認されたように (Fig. 23) インドメタシンによって著明に産生が増加したのに対し、IL-6産生は抑

制された (Fig. 22)。このようなインドメタシンによる TNF, IL-1 の産生増強と IL-6 の産生抑制については主に *in vitro* を中心に多くの報告がある [50, 51, 52]。今回の結果はそれらとよく一致するものであるが炎症の現場にある滲出液中での発見であることを強調したい。また CINC 産生もインドメタシンにより有意に抑制されることが示されたが、用量依存的ではなく、その効果も IL-6 産生に対するものに比べて弱かった (Fig. 27A)。IL-8 や CINC に対するインドメタシンの効果を調べたのは本研究が初めてであるが、今後他のモデルでの検討が必要であらう。

胸腔細胞に PGE_2 を添加してサイトカイン産生を調べた *in vitro* の実験では PGE_2 により TNF と IL-1 の産生は抑制され、IL-6 の産生は促進された (Fig. 26)。この結果は Fig. 22 の結果とちょうど逆になっている。これらの事実はこれらのサイトカイン産生が炎症局所で PGE_2 によって制御されていることを示唆している。すなわち炎症局所で産生された PGE_2 が同じくそこで産生される TNF や IL-1 をある程度抑制し、IL-6 産生を増強している状況があるのだが、そこへインドメタシンの作用が加わってこの PGE_2 産生が抑えられることにより TNF, IL-1 は抑制が解除されて産生が増大し IL-6 についてはその逆が起こることになるのであろう (Fig. 28)。このような機序は *in vitro* でも報告されている [2, 53]。CINC については PGE_2 によってわずかにその産生が増加の傾向を示すにと

どまった (Fig. 27B)。この結果は Fig. 27A のインドメタシンによる CINC 産生の抑制効果が IL-6 産生のそれに比べて弱いことと関係があるかも知れない。他の研究者達も *in vitro* において PGE_2 は IL-8 の産生に影響しないことを最近報告している [54]。今後 PGE_2 を直接カラゲニンと共に胸腔内に投与し *in vivo* でもこのようなサイトカイン産生の変動がみられるか確認する必要がある。

ところでこれらのサイトカイン産生を議論する上で忘れてはならない点は TNF, IL-1 が IL-6 や IL-8 を著明に誘導するというよく知られた性質である [3, 4]。実際本研究でも第 1 章で既に述べたようにこのラットの胸膜炎モデルにおいて TNF と IL-1 は IL-6 を胸腔内および血漿中に誘導している。したがってインドメタシンによって増強された TNF, IL-1 産生 (Fig. 22) は IL-6 の産生を増加させてもよかったはずである。おそらく PGE_2 産生を抑制することによる IL-6 産生抑制作用の方が TNF, IL-1 による IL-6 産生促進作用よりも強いのであろう。また CINC について、インドメタシンの 10 mg/kg 投与による胸腔内での CINC 産生抑制作用が 1 mg/kg の場合よりも強くなっていないのは (Fig. 27A) 10 mg/kg 投与時の著明に増加した TNF, IL-1 が CINC をある程度誘導しているため、その効果がインドメタシンの作用を打ち消していると考えられることもできる。同様にインドメタシンが血漿中の IL-6 活性には有意な変化をもたらさなかったのは (Fig. 24) 血中に移行した TNF, IL-1 による血中での IL-6 産生誘導

に対しては局所のPGE₂減少によるIL-6産生抑制作用はあまりおよばなかったからではないかと考えられる。

デキサメタゾンではカラゲニン胸膜炎の胸腔滲出液量および浸潤白血球数を強く抑制した (Fig. 21)。この抗炎症作用は他の炎症モデルでも既に実証されている [55]。デキサメタゾンは胸腔滲出液中のTNF, IL-1, IL-6, CINCそしてPGE₂産生も著明に抑制した (Fig. 22, 25, 27A)。IL-6の場合は血中での産生も強く抑制した (Fig. 24)。この他にもデキサメタゾンはホスホリパーゼA₂の阻害によりアラキドン酸代謝物やPAFなどの炎症に関与するメディエーターの産生を抑制する [56]。したがってデキサメタゾンの強い抗炎症作用機序は複雑ではあるが上記のようなサイトカインを含む広範な炎症性メディエーターの抑制にあると考えられる。

デキサメタゾンがTNF, IL-1, IL-6, IL-8のような炎症性サイトカインを遺伝子の転写レベルで抑制することは数多くのin vitroの研究により既に明らかとなっている [40, 45, 57, 58]。したがってカラゲニン胸膜炎においてもこの直接的な抑制作用によりサイトカイン産生が低下したと考えられる。つまりデキサメタゾンによりPGE₂産生はインドメタシン投与の時と同様に抑制されているが、これによる間接的な制御よりも直接サイトカインの遺伝子レベルで抑制する効果の方が強いのであろう。

以上のようにサイトカインの炎症局所における産生の

面からそれを調節する因子としてPGE₂を例にとって示してきたが、観点を変えてサイトカインの、炎症反応自身に対する意義について考察すると、インドメタシン投与の場合に得られた結果はいささか矛盾をはらんでいるといわざるをえない。すなわちTNF, IL-1産生が亢進している時に炎症が抑えられているということは、炎症反応にサイトカインが関与していないことを示唆しているからである。この結果はインドメタシンの抗炎症効果がデキサメタゾンよりも弱いことと関係があるのかも知れない。つまり完全に抑えきれないで残っている滲出液量や浸潤白血球数の部分がサイトカインやシクロオキシゲナーゼ代謝産物以外のメディエーターの効果であるという考え方である。また増加したTNF, IL-1の作用がもっと遅い時間帯に発現してくる可能性もある。インドメタシンが数日後の炎症反応をむしろ悪化させる可能性もあり、今後比較的後の時間においてサイトカインレベルに対するインドメタシンの影響を検討する必要も残っている。

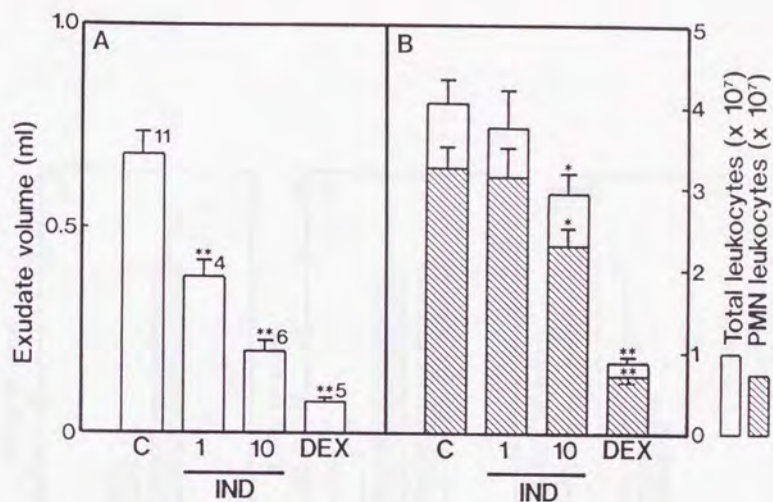


Fig. 21 Effect of indomethacin and dexamethasone on the exudate accumulation (A) and leukocyte migration (B) in rats with carrageenin-induced pleurisy at 3 h. Rats received an intrapleural injection of 0.1 ml of 2 % carrageenin 3 h before killing. Indomethacin (IND, 1 or 10 mg/kg) or dexamethasone (DEX, 0.5 mg/kg) was injected intraperitoneally 30 min or 3 h, respectively, before carrageenin injection. Control animals (C) received a carrageenin injection only. Hatched columns express the number of polymorphonuclear leukocytes among the total leukocytes in the exudates. Figures on the columns in (A) indicate number of rats used in each group, and the numbers are the same in corresponding groups in (B). The values are expressed as means with SE as vertical bars. *, **Significant difference at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively, when compared with the control value (C).

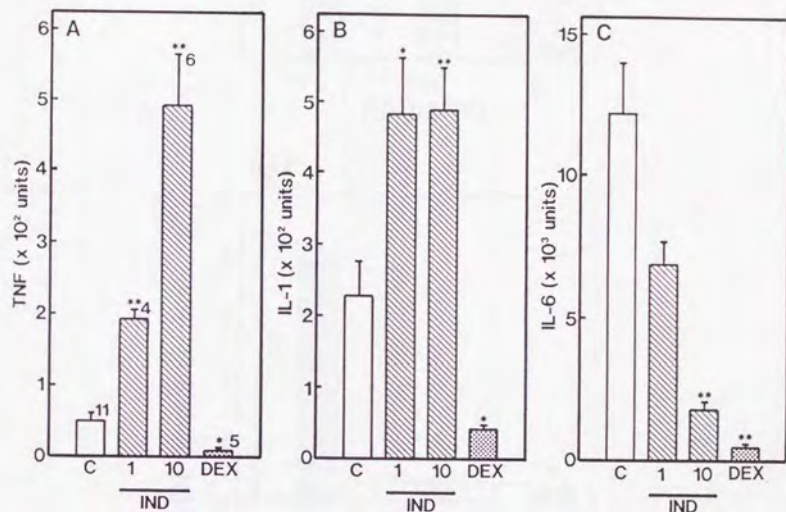


Fig. 22 Effects of indomethacin and dexamethasone on TNF (A), IL-1 (B) and IL-6 (C) levels in the exudate of rats with carrageenin-induced pleurisy at 3 h. The same samples as in Fig. 21 were assayed. Cytokine levels were expressed as total units in the exudate. Figures on the columns in (A) indicate number of rats used in each group, and the numbers are the same in corresponding groups in (B) and (C). Marks in the figure are the same as those in Fig. 21.

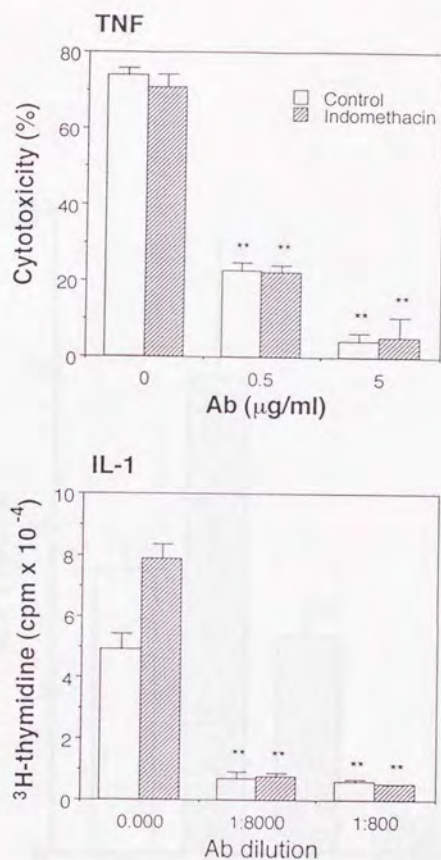


Fig. 23 Inhibitory effects of anti-TNF antibody (TN3-19.12) on TNF activity and antiserum to IL-1 α on IL-1 activity in rat pleural fluid in carrageenin-induced pleurisy at 3 h. The data are means with SE of TNF activities in terms of percent toxicity (upper panel) and of IL-1 activities in terms of [³H]thymidine uptake (cpm) after subtraction of the value without IL-1 (2175 cpm) (lower panel). Both assays were performed after 1 h incubation of the mixture of an antibody and the diluted pleural fluids of control or indomethacin (10 mg/kg)-treated rats. $n=3-4$. **Statistically significant difference at $P<0.01$ from the value without antibody addition.

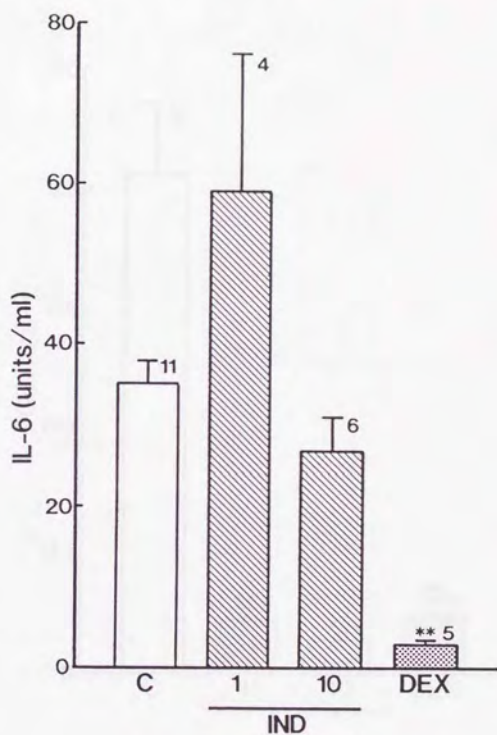


Fig. 24 Effects of indomethacin and dexamethasone on IL-6 levels in the plasma of carrageenin-induced pleurisy at 3 h. IL-6 activity was expressed as units/ml of plasma. Marks in the figure are the same as those in Fig. 21.

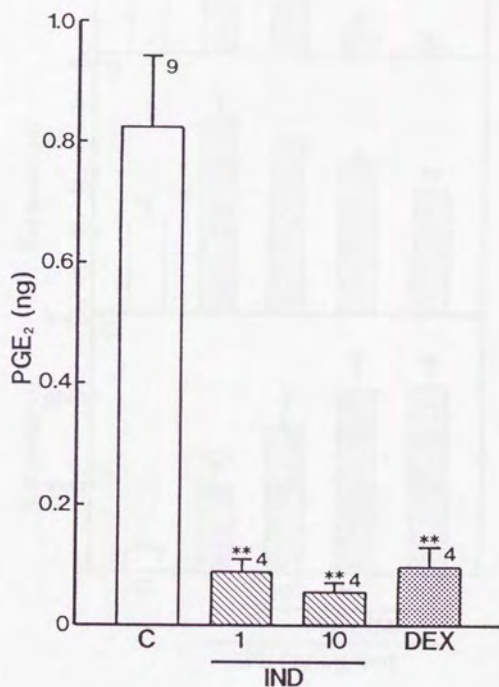


Fig. 25 Effects of indomethacin and dexamethasone on PGE₂ levels in the exudate of carrageenin-induced pleurisy at 3 h. PGE₂ levels were measured by enzyme immunoassay after the extraction of pleural fluids. Marks in the figure are the same as those in Fig. 21.

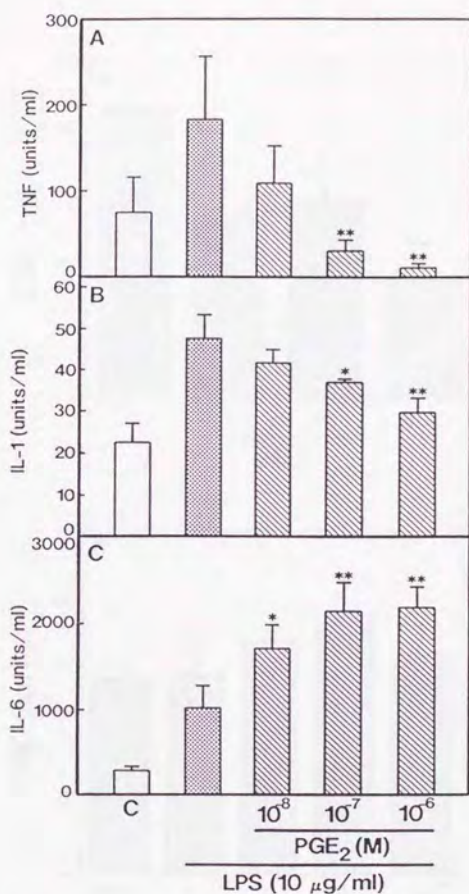


Fig. 26 Effect of PGE₂ on the production of TNF (A), IL-1 (B) and IL-6 (C) by resident pleural cells. Cells (1×10^6 cells/ml) were cultured with LPS ($10 \mu\text{g/ml}$) and the concentrations of PGE₂ indicated for 20 h, after which cytokine levels in the supernatant were measured. The values are expressed as means of 5 experiments with SE as vertical bars. *, **Significant difference at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively, when compared with the value for treatment with LPS alone.

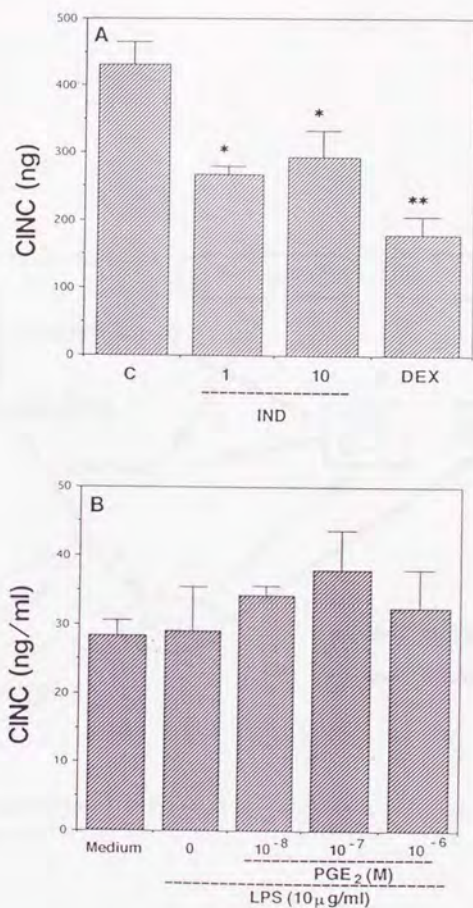


Fig. 27 Effect of indomethacin and dexamethasone on CINC levels in the exudate of carrageenin-induced pleurisy at 3 h (A) and of PGE₂ on the production of CINC by resident pleural cells (B). CINC levels were measured by enzyme immunoassay. Marks in the figure are the same as those in Fig. 21 for (A) and Fig. 26 for (B).

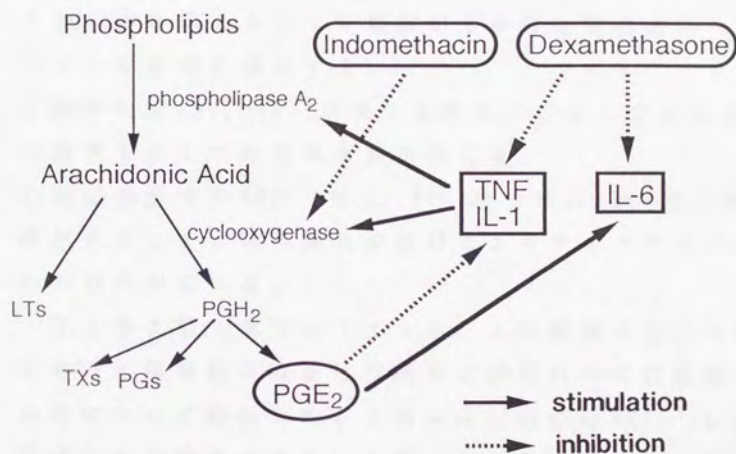


Fig. 28 The mechanism of regulation of cytokine production by indomethacin and dexamethasone.

総括

本研究で明らかとなったことは以下の通りである。

1. ラット・カラゲニン胸膜炎においては炎症刺激によりまず胸腔内でTNFとIL-1が産生され、それらが末梢血中のIL-6の誘導を介して肝細胞からの急性期蛋白T-キニンゲンの合成を促進する。
2. 胸腔内でTNF, IL-1が産生されると、そこでCINC(IL-8)の誘導を介して好中球浸潤が起こる。
3. 炎症局所でのTNF, IL-1, IL-6産生にはPGE₂による制御がある。また抗炎症薬の種類によりサイトカイン産生への効果が異なる。

第1章と第2章ではサイトカインの機能すなわち肝臓での急性期蛋白合成促進作用および局所への白血球遊走作用について解析した。これらは以前にはTNF, IL-1の作用として考えられていたが、その後の研究によりそれぞれの直接作用はIL-6, IL-8が担っていることが明らかとなった。つまりTNFとIL-1はIL-6, IL-8を含めた2次的なメディエーターを誘導することによって*in vivo*ではその作用を発揮しているのである。本研究のラットの胸膜炎はこのようなサイトカインの反応を解析する上で格好の炎症モデルであり、TNF, IL-1が2次的なサイトカインIL-6, IL-8を誘導して生物活性を発現する姿が明らかに観察される。

それではサイトカインは自分が誘導したメディエータ

ーからはどのような影響を受けるのだろうか。第3章では炎症局所でのサイトカイン産生の調節という観点からPGE₂による制御を解析した。TNF, IL-1がPGを誘導することはよく知られているが、PGによるサイトカイン産生の調節をin vivoで明らかにしたのは本研究が初めてである。サイトカインが登場する以前には炎症反応のメディエーターとして脚光を浴びていたのはこれらアラキドン酸代謝物であったが、TNF, IL-1がこれらの産生に関与する種々の酵素の発現を調節することが明らかとなった現在、炎症反応におけるサイトカインの役割はますます重要と見なされるであろう。今回の結果よりこれらのメディエーターの産生される時間帯がほぼ重なることからin vivoにおける炎症の発症にどのようなメディエーターがサイトカインと相互作用するのかを解明する上でも本研究は大きく貢献するものと考えられる。

このように炎症反応におけるサイトカインの役割がin vivoで一部は明らかとなったが、炎症反応全体を通じてどの段階のどの反応にどのサイトカインがどの程度関与しているかまだ不明な点も多い。

例えば初めに述べた局所での反応として白血球浸潤と並んで重要である血管透過性亢進にサイトカインはどの程度関与しているであろうか。本研究ではTNF, IL-1, IL-8, CINCをラットの胸腔内に投与したが、いずれの場合も滲出液の貯溜は全く認められなかった。Buckleyら

はウサギの皮内反応を用いてIL-1単独では血管透過性亢進は起きないがPGE₂やブラジキニンと共に投与すると相乗作用がみられることを報告している [59]。TNFやIL-8についても同様の作用が認められ [60, 61]、またラットの腹膜炎の滲出液量が抗TNF抗体によって減少することも報告された [62]。TNFとIL-1はPGの他にもヒスタミンや補体などの血管透過性亢進作用を持つメディエーターを誘導する可能性もあるので、TNFやIL-1が間接的に滲出液の貯溜に関与することは考えられる。したがって今後ラット胸腔内へのTNF, IL-1とPGE₂の同時投与による血管透過性の亢進について検討する余地はある。しかしながらTNFとIL-1はそれ自身でもPGE₂を誘導するはずである。産生されるPGE₂の量にも問題があるのかも知れないが、同時投与する場合にだけ現れる相乗効果の機序については不明である。またTNFとIL-1による血管透過性亢進作用は皮内反応でようやく検出される程度であり、他のメディエーターに比べ弱いといえる。最近癌細胞由来の血管透過性亢進作用を持つサイトカインVascular Permeability Factorが発見されたが [63] 炎症局所での実証はない。以上を総合するとサイトカインは血管透過性にはあまり関与していないと考えられる。

炎症時の全身の他の代表的な反応としては発熱が挙げられる。IL-1はもともと内因性発熱物質として検索されたものであり、種々の動物でその発熱作用が確認されている [2]。TNFも同様でありまた近年IL-6についてもそ

の活性が報告された [20]。これらはみな PGE_2 の産生を介してその作用を発揮するのに対し、最近 Chemokine のうちのいくつかに発熱作用がありこれには PGE_2 が関与しないことが報告された [4]。本研究では示さなかったが当教室でもウサギを用いてサイトカインによる発熱と脳脊髄液中の PGE_2 の増加を確認している。

このように炎症時に誘導されるサイトカインはさらに他のメディエーターの誘導や相互作用により *in vivo* では複雑なネットワークを形成して反応が展開される。最近では血管内皮細胞と白血球との接着が炎症の成立に重要であるという実験成績が蓄積されつつあるが、サイトカインがこれにも関与することはまちがいないであろう。

一方サイトカインの産生も他の多くのメディエーターの調節を受けている。第3章で PGE_2 の例を示したが、 IL-6 、 IL-8 と PGE_2 の関係については今後も他のモデルでの追試が必要である。またヒスタミン、ブラジキニン、PAF、補体などとの相互の産生調節についても今後の課題である。未知のサイトカインも含めてそれぞれのサイトカインが *in vivo* での炎症反応においてどの程度の役割を担っているか今後このラットの胸膜炎を用いてさらに解明されることが期待される。

文献

1. Movat, H. Z. The Inflammatory Reaction. Elsevier, Amsterdam, 1985.
2. Le, J. and Vilček, J. Tumor necrosis factor and interleukin 1: cytokines with multiple overlapping biological activities. Lab. Invest. 56, 234-248, 1987.
3. Hirano, T. and Kishimoto, T. Interleukin-6, in: Handbook of Experimental Pharmacology: Peptide Growth Factors and Their Receptors. eds. Sporn, M. B. and Roberts, A. B. Springer-Verlag, Heidelberg, 95, 633-665, 1990.
4. Oppenheim, J. J., Zachariae, C. O. C., Mukaida, N. and Matsushima, K. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. Annu. Rev. Immunol. 9, 617-648, 1991.
5. Hirano, T., Taga, T., Nakano, N., Yasukawa, K., Kashiwamura, S., Shimizu, K., Nakajima, K., Pyun, K. H. and Kishimoto, T. Purification to homogeneity and characterization of human B cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 5490-5494, 1985.
6. Yoshimura, T., Matsushima, K., Tanaka, S.,

- Robinson, E. A., Appella, E., Oppenheim, J. J. and Leonard, E. J. Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that shares sequence homology with other host defense cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 9233-9237, 1987.
7. Sekido, N., Mukaida, N., Harada, N., Nakanishi, I., Watanabe, Y. and Matsushima, K. Prevention of lung reperfusion injury in rabbits by a monoclonal antibody against interleukin-8. *Nature* 365, 654-657, 1993.
8. Oh-ishi, S., Hayashi, I., Hayashi, M., Yamaki, K., Yamasu, A., Nakano, T., Utsunomiya, I. and Nagashima, Y. Evidence for a role of the plasma kallikrein-kinin system in acute inflammation: reduced exudation during carrageenin- and kaolin-pleurisy in kininogen-deficient rats. *Agents Actions* 18, 450-454, 1986.
9. Dozen, M., Yamaki, K. and Oh-ishi, S. Captopril uncovers kinin-dependent release of arachidonic acid metabolites in carrageenin-induced rat pleurisy. *Jpn. J. Pharmacol.* 51, 101-105, 1989.
10. Oh-ishi, S., Tsuji, N. and Hayashi, I. Experimental approach to a role of the increased T-

- kininogen level in carrageenin-induced pleurisy of rats. *Jpn. J. Pharmacol.* 50, 11-18, 1989.
11. Gauldie, J., Richards, C., Harnish, D., Lansdorp, P and Baumann H. Interferon β_2 /B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7251-7255, 1987.
12. Okamoto, H. and Greenbaum, L. M. Isolation and structure of T-kinin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 112, 701-708, 1983.
13. Kasahara, T., Mukaida, N., Hatake, K., Motoyoshi, K., Kawai, T. and Shiori-Nakano, K. Interleukin 1 (IL-1)-dependent lymphokine production by human leukemic T cell line HSB.2 subclones. *J. Immunol.* 134, 1682-1689, 1985.
14. Matsuda, T., Hirano, T. and Kishimoto, T. Establishment of an interleukin 6 (IL 6)/B cell stimulatory factor 2-dependent cell line and preparation of anti-IL 6 monoclonal antibodies. *Eur. J. Immunol.* 18, 951-956, 1988.
15. Ikawa, M. and Shozen, Y. Quantification of acute phase proteins in rat serum and in the supernatants of a cultured rat hepatoma cell

- line and cultured primary hepatocytes by an enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Immunol. Methods* 134, 101-106, 1990.
16. Mizel, S. B., Oppenheim, J. J. and Rosenstreich, D. Characterization of lymphocyte-activating factor (LAF) produced by the macrophage cell line, P388D₁. I. Enhancement of LAF production by activated T lymphocytes. *J. Immunol.* 120, 1497-1503, 1978.
17. Wang, A. M., Creasey, A. A., Laduer, M. B., Lin, L. S., Strickler, J., Van Arsdell, J. N., Yamamoto, R. and Mark, D. F. Molecular cloning of the complementary DNA for human tumor necrosis factor. *Science* 228, 149-154, 1985.
18. Oh-ishi, S., Hayashi, I., Utsunomiya, I., Hayashi, M., Yamaki, K., Yamasu, A. and Nakano, T. Evidence that T-kinin does not mediate paw swelling induced by carrageenin: studies with plasma high molecular weight kininogen and low molecular weight kininogen deficient rats. *Chem. Pharm. Bull.* 35, 1315-1318, 1987.
19. Hayashi, I., Oh-ishi, S., Enryoji, K., Kato, H. and Iwanaga, S. A radioimmunoassay for rat T-kininogen as an acute phase reactant. *Chem. Pharm. Bull.* 34, 3502-3505, 1986.

20. Helle, M., Brakenhoff, J. P. J., De Groot E. R. and Aarden, L. A. Interleukin 6 is involved in interleukin 1-induced activities. *Eur. J. Immunol.* 18, 957-959, 1988.
21. Lloyd, A. R. and Oppenheim, J. J. Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. *Immunology Today* 13, 169-172, 1992.
22. Waage, A., Halstensen, A., Shalaby, R., Brandtzaeg, P., Kierulf, P and Espevik, T. Local production of tumor necrosis factor- α , interleukin 1, and interleukin 6 in meningococcal meningitis: relation to the inflammatory response. *J. Exp. Med.* 170, 1859-1867, 1989.
23. Goto, K., Nakamura, S., Goto, F. and Yoshinaga, F. Generation of an interleukin-1-like lymphocyte-stimulating factor at inflammatory sites: correlation with the infiltration of polymorphonuclear leukocytes. *Br. J. Exp. Pathol.* 65, 521-532, 1984.
24. Hannum, C. H., Wilcox, C. J., Arend, W. P., Joslin, F. G., Dripps, D. J., Heimdal, P. L., Armes, L. G., Sommer, A., Eisenberg, S. P. and Thompson, R. C. Interleukin-1 receptor antag-

- onist activity of a human interleukin-1 inhibitor. *Nature* 343, 336-340, 1990.
25. Goto, F., Goto, K., Miyata, T., Ohkawara, S., Takao, T., Mori, S., Furukawa, S., Maeda, T., Iwanaga, S., Shimonishi, Y. and Yoshinaga, M. Interleukin-1 receptor antagonist in inflammatory exudate cells of rabbits. Production, purification and determination of primary structure. *Immunology* 77, 235-244, 1992.
26. Baumann, H. and Gauldie, J. The acute phase protein. *Immunology Today* 15, 74-80, 1994.
27. Klapproth, J., Castell, J., Geiger, T., Andus, T. and Heinrich, P. C. Fate and biological action of human recombinant interleukin 1β in the rat in vivo. *Eur. J. Immunol.* 19, 1485-1490, 1989.
28. Mrowiets, U., Schroder, J.-M. and Christophers, E. Recombinant human tumor necrosis factor α lacks chemotactic activity for human peripheral blood neutrophils and monocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153, 1223-1228, 1988.
29. Yoshimura, T., Matsushima, K., Oppenheim, J. J. and Leonard, E. J. Neutrophil chemotactic factor produced by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human blood mononuclear leukocytes:

- partial characterization and separation from interleukin 1 (IL-1). *J. Immunol.* 139, 788-793, 1987.
30. Cybulsky, M. I., McComb, D. J. and Movat, H. Z. Protein synthesis dependent and independent mechanisms of neutrophil emigration: different mechanisms of inflammation in rabbits induced by interleukin-1, tumor necrosis factor alpha or endotoxin versus leukocyte chemoattractants. *Am. J. Pathol.* 135, 227-237, 1989.
31. Matsushima, K., Morishita, K., Yoshimura, T., Lavu, S., Kobayashi, Y., Lew, W., Appella, E., Kung, H. F., Leonard, E. J. and 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.
32. Derynck, R., Balentien, E., Han, J. H., Thomas, H. G., Wen, D., Samantha, A. K., Zachariae, C. O., Griffin, P. R., Brachmann, R., Wong, W. L., Matsushima, K. and Richmond, A. Recombinant expression, biochemical characterization, and biological activities of the human MGSA/gro protein. *Biochemistry* 29, 10225-10233, 1990.

33. Watanabe, K., Konishi, K., Fujioka, M., Kinoshita, S. and Nakagawa, H. The neutrophil chemoattractant produced by the rat kidney epithelioid cell line NRK-52E is a protein related to the KC/gro protein. *J. Biol. Chem.* 264, 19559-19563, 1989.
34. Wu, X., Wittwer, A. J., Carr, L. S., Crippes, B. A., De Larco, J. E. and Lefkowitz, J. B. Cytokine-induced neutrophil chemoattractant mediates neutrophil influx in immune complex glomerulonephritis in rat. *J. Clin. Invest.* 94, 337-344, 1994.
35. Watanabe, K., Iida, M., Takaishi, K., Suzuki, T., Hamada, Y., Iizuka, Y. and Tsurufuji, S. Chemoattractants for neutrophils in lipopolysaccharide-induced inflammatory exudate from rats are not interleukin-8 counterparts but gro-gene-product/melanoma-growth-stimulating-activity-related factors. *Eur. J. Biochem.* 214, 267-270, 1993.
36. Larsen, C. G., Anderson, A. O., Appella, E., Oppenheim, J. J. and Matsushima, K. The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes. *Science* 243, 1464-1466, 1989.

37. Rot, A. Chemotactic potency of recombinant human neutrophil attractant/activation protein-1 (interleukin-8) for polymorphonuclear leukocytes of different species. *Cytokine* 3, 21-27, 1991.
38. Watanabe, K., Koizumi, F., Kurashige, Y., Tsurufuji, S. and Nakagawa, H. Rat CINC, a member of the interleukin-8 family, is a neutrophil-specific chemoattractant in vivo. *Exp. Mol. Pathol.* 55, 30-37, 1991.
39. Hirasawa, N., Watanabe, M., Mue, S., Watanabe, K., Tsurufuji, S. and Ohuchi, K. Induction of neutrophil infiltration by rat chemotactic cytokine (CINC) and its inhibition by dexamethasone in rats. *Inflammation* 16, 187-196, 1992.
40. Mukaida, N., Gussella, G. L., Kasahara, T., Ko, Y., Zachariae, C. O. C., Kawai, T. and Matsushima, K. Molecular analysis of the inhibition of interleukin-8 production by dexamethasone in a human fibrosarcoma cell line. *Immunology* 75, 674-679, 1992.
41. Mulligan, M. S., Jones, M. L., Bolanowski, M. A., Baganoff, M. P., Deppeler, C. L., Meyers, D. M., Ryan, U. S. and Ward, P. A. Inhibi-

- tion of lung inflammatory reactions in rats by an anti-human IL-8 antibody. *J. Immunol.* 150, 5585-5595, 1993.
42. Okusawa, S., Gelfand, J. A., Ikejima, T., Connolly, R. J. and Dinarello, C. A. Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. *J. Clin. Invest.* 81, 1162-1172, 1988.
43. Springer, T. A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76, 301-304, 1994.
44. Watanabe, K. and Nakagawa, H. Cytokines enhance the production of a chemotactic factor for polymorphonuclear leukocytes by rat renal glomerular epithelioid cells. *Nephron* 54, 169-175, 1990.
45. Ray, A., Forge, K. S. L. and Sehgal, P. B. On the mechanism for efficient repression of the interleukin-6 promotor by glucocorticoids: enhancer, TATA box, and RNA start site (Inr motif) occlusion. *Mol. Cell. Biol.* 10, 5736-5746, 1990.
46. Sheehan, K. C. F., Ruddie, N. H. and Schreiber, R. D. Generation and characterization of

- hamster monoclonal antibodies that neutralize murine tumor necrosis factors. *J. Immunol.* 142, 3884-3893, 1989.
47. Nishida, T., Nishino, N., Takano, M., Sekiguchi, Y., Kawai, K., Mizuno, K., Nakai, S., Masui, Y. and Hirai, Y. Molecular cloning and expression of rat interleukin-1 α cDNA. *J. Biochem.* 105, 351-357, 1989.
48. Kiyomiya, K. and Oh-ishi, S. Involvement of arachidonic acid metabolites in acute inflammation: detection of 6-keto-PGF $_{1\alpha}$, thromboxaneB $_2$ and PGD $_2$ in rat pleurisy by phorbol myristate acetate. *Jpn. J. Pharmacol.* 39, 201-206, 1985.
49. Hamberg, M. and Samuelsson, B. Prostaglandin endoperoxides. Novel transformations of arachidonic acid in human platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 3400-3404, 1974.
50. Kunkel, S. L., Wiggins, R. C., Chensue, S. W. and Larrick, J. Regulation of macrophage tumor necrosis factor production by prostaglandin E $_2$. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 137, 404-410, 1986.
51. Kunkel, S. L. and Chensue, S. W. Arachidonic acid metabolites regulate interleukin-1 produc-

- tion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128, 892-897, 1985.
52. Bunning, R. A. D., Russell, R. G. G. and Van Damme, J. Independent induction of interleukin 6 and prostaglandin E₂ by interleukin 1 in human articular chondrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 166, 1163-1170, 1990.
53. Haynes, D. R., Whitehouse, M. W. and Vernon-Roberts, B. The prostaglandin E₁ analog, Misoprostol, regulates inflammatory cytokines and immune functions in vitro like the natural prostaglandins E₁, E₂ and E₃. *Immunology* 76, 251-257, 1992.
54. Wertheim, W. A., Kunkel, S. L., Standiford, T. J., Burdick, M. D., Becker, F. S., Wilke, C. A., Gilbert, A. R. and Strieter, R. M. Regulation of neutrophil-derived IL-8: the role of prostaglandin E₂, dexamethasone, and IL-4. *J. Immunol.* 151, 2166-2175, 1993.
55. Tsurufuji, S., Sugio, K. and Takemasa, F. The role of glucocorticoid receptor and gene expression in the anti-inflammatory action of dexamethasone. *Nature* 280, 408-410, 1979.
56. Cirino, G., Peers, S. H., Flower, R. J., Browning, J. L. and Pepinsky, R. B. Human

- recombinant lipocortin 1 has acute local anti-inflammatory properties in the rat paw edema test. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 3428-3432, 1989.
57. Beutler, B., Krochin, N., Milsark, I. W., Lhedke, C. and Cerami, A. Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis: mechanism of endotoxin resistance. Science 232, 977-980, 1986.
58. Lee, S. W., Tsou, A.-P., Chan, H., Thomas, J., Retrie, K., Eugui, E. M. and Allison, A. C. Glucocorticoids selectively inhibit the transcription of the interleukin 1 β gene and decrease the stability of interleukin 1 β mRNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 1204-1208, 1988.
59. Buckley, T. L., Brain, S. D., Collins, P. D. and Williams, T. J. Inflammatory edema induced by interactions between IL-1 and the neuropeptide calcitonin gene-related peptide. J. Immunol. 146, 3424-3430, 1991.
60. Abe, Y., Sekiya, S., Yamasita, T. and Sendo, F. Vascular hyperpermeability induced by tumor necrosis factor and its augmentation by IL-1 and IFN- γ is inhibited by selective depletion of neutrophils with a monoclonal antibody. J.

Immunol. 145, 2902-2907, 1990.

61. Rampert, M., Van Damme, J., Zonnekeyn, L. and Herman, A. G. Granulocyte chemotactic protein/interleukin-8 induces plasma leakage and neutrophil accumulation in rabbit skin. Am. J. Pathol. 135, 21-25, 1989.
62. Karalis, K., Sano, H., Redwine, J., Listwak, S., Wilder, R. L. and Chrousos, G. P. Autocrine and paracrine inflammatory actions of corticotropin-releasing hormone in vivo. Science 254, 421-423, 1991.
63. Connolly, D. T., Olander, J. V., Heuvelman, D., Nelson, R., Monsell, R., Siegel, N., Haymore, B. L., Leimgruber, R. and Feder, J. Human vascular permeability factor. Isolation from U937 cells. J. Biol. Chem. 264, 20017-10024, 1989.

掲載雑誌目録

本論文は、以下の発表されたまたは発表予定の論文を基に作成した。

1. Utsunomiya, I., Oh-ishi, S., Hayashi, I., Maruhashi, J., Tsuji, N., Yamamoto, N. and Yamashina, S. Monoclonal antibodies against rat T-kininogen: application to radioimmunoassay and immunohistochemistry. *J. Biochem.* 103, 225-230, 1988.
2. Utsunomiya, I., Nagai, S. and Oh-ishi, S. Sequential appearance of IL-1 and IL-6 activities in rat carrageenin-induced pleurisy. *J. Immunol.* 147, 1803-1809, 1991.
3. Utsunomiya, I., Nagai, S. and Oh-ishi, S. Differential effects of indomethacin and dexamethasone on cytokine production in carrageenin-induced rat pleurisy. *Eur. J. Pharmacol.* 252, 213-218, 1994.
4. Utsunomiya, I., Ito, M., Watanabe, K., Tsurufuji, S., Matsushima, K. and Oh-ishi, S. Neutrophil infiltration into rat pleural cavity induced by proinflammatory cytokines.
(in submission)

謝 辞

本論文を作成するに当たり、終始懇切な御指導御鞭撻を賜りました東京大学薬学部入村達郎教授ならびに辻勉助教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究を通じて、多大な御指導御鞭撻を賜りました北里大学薬学部大石幸子教授に深く感謝致します。

本研究に対し、有益な御批判と様々な御助力を賜りました東京大学薬学部大沢利昭名誉教授（現ヤクルト中央研究所所長）、東京大学薬学部今井康之助手、金沢大学がん研究所松島綱治教授、サイトシグナル研究所鶴藤丞所長ならびに渡辺一義博士、自治医科大学笠原忠助教授、北里大学医学部赤星透講師、北里研究所丁宗鐵博士、大日本製薬㈱中村秀雄博士に深謝致します。

本研究に御協力いただいた永井晋修士、井手上圭一修士、伊藤美砂修士および北里大学薬学部薬理学教室の現・旧職員の皆様に深謝致します。

本研究に際し、ミエローマ細胞を供与していただいた国立がんセンター関根輝彬博士、ラットT-キニノーゲンを供与していただいた国立循環器病センター研究所加藤久雄、円城寺慶一両博士ならびに九州大学岩永貞昭教授、IL-6、抗IL-6抗体およびMH60.BSF2細胞を供与していただいた大阪大学平野俊夫教授、L929細胞を供与していただいた自治医科大学松浦基博助教授、抗TNFモノクローナル抗体を供与していただいたワシントン医科大学Robert

D. Schreiber教授、抗ラットIL-1抗体を供与していただいたエーザイ㈱、PGE₂を供与していただいた小野薬品工業㈱に深謝致します。

