

2種の Interleukin-8 (IL-8) の好中球 スーパーオキシドアニオン産生に及ぼす影 響に関する研究

飯 田 典 久

広島大学医学部小児科学教室 (主任: 上田一博教授)

受付 平成5年7月9日

受理 平成5年9月22日

ヒト好中球スーパーオキシドアニオン (O_2^-) 産生に及ぼす Interleukin-8 (IL-8) の影響を検討した。IL-8 には主に、72個のアミノ酸よりなる [IL-8]72 および77個のアミノ酸よりなる [IL-8]77 があり、両者の比較検討も行った。

[IL-8]72, [IL-8]77 共に 1×10^{-8} M 以上の濃度で好中球 O_2^- 産生を直接誘導した。しかしその活性は他の好中球走化因子である N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP) や C5a と比較して弱く、チトクロム C 還元能測定法では検出困難であり、高感度な O_2^- 測定法である 2-methyl-6-phenyl-3, 7-dihydroimidazo[1, 2-a]pyrazin-3-one (CLA) 依存性化学発光法で測定可能であった。[IL-8]72 あるいは [IL-8]77 による化学発光パターン (O_2^- 産生パターン) は FMLP, C5a によるそれに類似していたが、両 IL-8 の O_2^- 産生量は細胞外 Ca^{2+} , Mg^{2+} の有無に関係せず、FMLP, C5a とは異なっていた。両 IL-8 とも細胞内遊離 Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) を上昇させる作用を認めたが、その上昇は FMLP の場合に比べ少量、短時間であった。

O_2^- 産生誘導及び $[Ca^{2+}]_i$ の上昇作用では [IL-8]77 に比し [IL-8]72 のほうが活性が強かった。[IL-8]72 で充分刺激した後 [IL-8]77 で刺激しても新たな反応は見られなかった。しかし、[IL-8]77 で充分刺激した後 [IL-8]72 で刺激すると少量であるが新たな反応が見られた。これは両タイプIL-8の、好中球表面レセプター (IL-8 R) に対する親和性の差を示唆していると思われる。

好中球を 1×10^{-10} M 以上の濃度の IL-8 で $37^\circ C$, 10分間 preincubation すると、その後の FMLP あるいは C5a 刺激による O_2^- 産生量は増大された。両 IL-8 には FMLP や C5a 刺激による好中球酸素代謝に対しプライミング効果を持ち合わせていると思われる。この作用はこれまでの直接刺激作用と異なり、[IL-8]72, [IL-8]77 共にほぼ同程度であった。

以上より、[IL-8]72 及び [IL-8]77 は好中球に対し共に O_2^- 産生誘導及び $[Ca^{2+}]_i$ 上昇といった直接作用を呈しうるが、その生物学的活性は *in vitro* では [IL-8]72 がより強力であった。また、FMLP, C5a 刺激による好中球酸素代謝に対するプライミング作用も認められ、その作用は [IL-8]72, [IL-8]77 共に同程度の活性を示すことが確認された。

両 IL-8 は実際の炎症の場において、他の好中球走化因子と作用しあって、好中球機能を調節している可能性があると思われた。

Key words : IL-8, 好中球, スーパーオキシドアニオン (O_2^-), CLA依存性化学発光

インターロイキン-8 (IL-8) は好中球走化性因子をもつ新しい炎症性サイトカインとして近年精製された^{12,13,18,22}。IL-8 の全駆体は99個のアミノ酸残基よりなり、成熟型の IL-8 は N 末端のプロセッシングの違いより、主に77個および72個のアミノ酸からなる。また、その産生細胞の違いにより、単球由来の IL-8

は主に72個のアミノ酸よりなり ([IL-8]72)、血管内皮細胞由来の IL-8 は主に77個のアミノ酸よりなる ([IL-8]77)。これまでの検討で、IL-8 には好中球に対して走化活性以外に、脱顆粒促進^{12,17,18,20}、細胞内酵素放出¹⁷、血管内皮細胞への粘着促進²⁾ (interleukin-1 (IL-1) や tumor necrosis factor (TNF)

でプライミングされていない内皮細胞に対して) あるいは粘着抑制⁶⁾ (IL-1 や TNF でプライミングされた内皮細胞に対して), T-リンパ球に対し走化性亢進¹¹⁾ など多彩な作用が認められている。

IL-8 の生物活性は主に [IL-8]72 で検討されており, 一部 [IL-8]77 での検討および [IL-8]72 と [IL-8]77 の比較検討がなされている^{8,16)}。好中球走化因子として O_2^- 産生に関する検討はわずかしか行われておらず, 両者の比較検討に関しては一定の結論は得られていない^{3,16,20,23)}。

著者は, [IL-8]72 および [IL-8]77 の好中球 O_2^- 産生に対する直接作用および他の走化因子刺激による O_2^- 産生を低濃度で促進する作用 (=プライミング作用) について比較検討を行った。両 IL-8 は O_2^- 産生を直接誘導し, FMLP あるいは C5a 刺激での酸素代謝に対しプライミング作用も有することが明らかになった。

材料および方法

1. 試薬

リコンビナントヒト単球由来 IL-8 ([IL-8]72) は Endogen 社より, リコンビナントヒト内皮細胞由来 IL-8 ([IL-8]77) は Genzyme 社より入手し, それぞれ phosphate buffered saline (PBS) に溶解後 -20°C にて保存した。N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP) はペプチド研究所より, C5a, phorbol myristate acetate (PMA), bovine erythrocyte superoxide dismutase (SOD), および xanthine は Sigma 社よりそれぞれ入手した。Fura 2-acetoxymethyl ester (Fura2-AM) は和光純薬工業社より, Hanks' balanced salt solution (HBSS) は日水製薬社より, 2-methyl-6-phenyl-3, 7-dihydroimidazo [1, 2-a]pyrazin-3-one (CLA) は東京化生工業社より, xanthine oxidase (XO) はベーリンガーマンハイム山之内社よりそれぞれ入手した。

2. 好中球の分離

健康成人より得たヘパリン加静脈血を等量の 6% デキストランと混和, 静置し, その上清を Ficoll-sodium metrizoate 液 (Muto pure chemical 社, 比重: 1.077) に重層, 400 g, 30分間室温で遠沈後, 単核球層を含む上清を除去した。沈渣中の赤血球を除去するため, 蒸留水を添加混和後直ちに 2倍濃度 PBS を等量添加混和し 4°C で 250 g, 10分間遠沈した。沈渣を PBS で洗浄後, 5×10^6 /ml になるように HBSS に浮遊した。

3. O_2^- 産生能測定

O_2^- の測定には中野らの方法^{15,19)} を改変した CLA 依存性化学発光測定法を利用した。化学発光の測定には Aloka 社製ケミルミネッセンスリーダーを用いた。HBSS に 2×10^5 /ml の好中球を添加し (各チューブの総量は 0.5 ml とした。) 37°C で 1分間攪拌した後, $1 \mu\text{M}$ CLA を添加しさらに 1分間攪拌した後, 刺激物質を添加し化学発光を経時的に記録した。化学発光の測定検討はピーク時での 6秒間の発光積分値で行った。チトクロム C 還元能による O_2^- 測定法も利用した。100 μM チトクロム C を含む HBSS に 5×10^6 /ml の好中球と刺激物質を添加し二波長分光光度計 (Hitachi 557) で 550 nm と 540 nm の吸光度変化を 37°C で経時的に測定した。

4. 細胞内 Ca^{2+} の測定

$[Ca^{2+}]_i$ の測定は Fura2-AM を用いて Grynkiewicz らの方法⁷⁾ を改変して測定した。1 $\times 10^7$ 個の好中球を 1 ml の HEPES buffer (153 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM glucose, 20 mM HEPES, pH 7.2) に浮遊させ, 10 μM の Fura2-AM にて 37°C で 5分間インキュベーションし, さらに 9 ml HEPES buffer を添加し 37°C で 20分間インキュベーションすることで, 細胞を標識した。洗浄後 HEPES buffer で 5×10^6 /ml に再浮遊し, Fura2-AM の蛍光を Hitachi Model MPF-4 で測定した (励起波長 335 nm, 蛍光波長 500 nm)。 $[Ca^{2+}]_i$ の濃度は各実験で得られた蛍光強度 (F) と Fura2-AM で標識した好中球を TritonX-100 で溶解した後 2mM $CaCl_2$ あるいは 2 mM EGTA の存在下にその蛍光強度を測定しそれぞれ最大 (F_{MAX}) および最小 (F_{MIN}) とし, 以下の計算式により求めた。

$$[Ca^{2+}]_i = Kd \times \frac{F - F_{MIN}}{F_{MAX} - F} \quad (Kd = 224 \text{ nM})$$

統計処理は Student's t-test による。

結 果

1. IL-8 の好中球 O_2^- 産生に対する直接作用

Fig.1 に示すように, 好中球を 1×10^{-8} M 以上の濃度の [IL-8]72 あるいは [IL-8]77 で刺激すると直ちに CLA 依存性化学発光の増加を認めた。この増加パターンは FMLP や C5a で導かれる化学発光増加パターンに類似していたが, PMA 刺激による化学発光は増加を示し始めるまでにラグタイムを認め発光持続時間も長く両タイプの IL-8 のそれとは明らかに異なっていた。IL-8 刺激による化学発光は IL-8 の濃度依存性に増加を認めた (Fig.2)。この化学発光は SOD の添加により完全に阻害され, さらに慢性肉芽

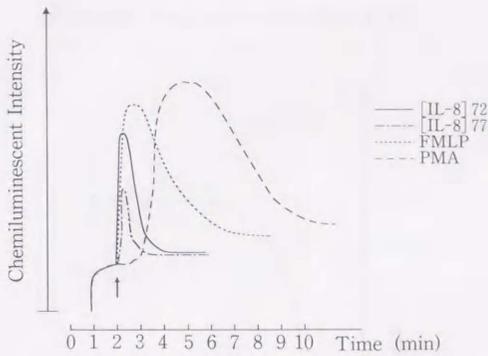


Fig. 1. Time-course of CLA-dependent chemiluminescence in human PMN stimulated by IL-8 (5×10^{-8} M), FMLP (5×10^{-8} M), or PMA (50 ng/ml).

Arrow indicates the addition of such stimulus.

腫症 (X-linked type) 患児の好中球ではまったく増加を認めなかった。一方、チトクロム C 還元能測定法では両タイプの IL-8 特に [IL-8]77 刺激により産生される O_2^- は、検出不可能であった。CLA 依存性化学発光法にて検出可能なものがチトクロム C 還元能測定法で検出不可能であった相違は、測定法の感度の問題と思われたため、両者の感度の差を xanthine-XO による O_2^- 産生系で比較した。CLA-依存性化学発光法はチトクロム C 還元能測定法にくらべ、約50倍高感度であった (Fig.3)。以上より、[IL-8]72, [IL-8]77 共に、好中球 O_2^- 産生を直接誘導する作用が認められた。また、[IL-8]72 の好中球 O_2^- 産生誘導能は、[IL-8]77 のその2~3倍であり、両者の活性度には有意な差が認められた (Fig.2)。

2. IL-8 刺激による好中球 O_2^- 産生における細胞外 Ca^{2+} , Mg^{2+} の影響

IL-8 刺激による好中球 O_2^- 産生において細胞外 Ca^{2+} , Mg^{2+} の影響を探るため、 Ca^{2+} あるいは Mg^{2+} を含まない HBSS に再浮遊した好中球を使って化学発光の差を検討した。Table 1 に示すように Ca^{2+} を含まない HBSS, Mg^{2+} を含まない HBSS, あるいは Ca^{2+} , Mg^{2+} 共に含まない HBSS に再浮遊した好中球による化学発光はすべて、 Ca^{2+} , Mg^{2+} ともに含む HBSS に浮遊した好中球の化学発光と有意な差を認めなかった。一方、FMLP (1×10^{-7} M) 刺激の場合、細胞外 Mg^{2+} の影響は見られなかったが、細胞外 Ca^{2+} の存在によりその化学発光量は約2倍に増幅した。また、C5a 刺激にても FMLP と同様の傾

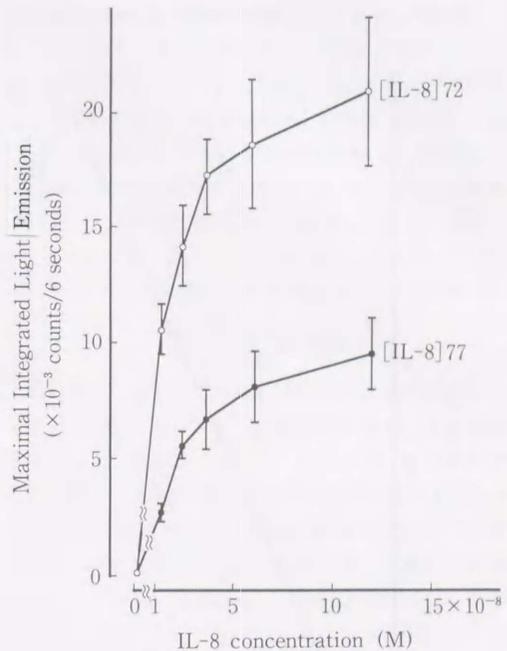


Fig. 2. Effect of [IL-8]72 and [IL-8]77 on O_2^- release by PMN. The data are expressed as mean \pm SD of four experiments.

向が見られた (データ呈示せず)。この様に細胞外 Ca^{2+} の O_2^- 産生に対する影響は IL-8 は FMLP, C5a といった他の走化因子とは異なっていた。

3. IL-8 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ の動態

[IL-8]72, [IL-8]77 とも、添加と共に直ちに $[Ca^{2+}]_i$ の増加を促した (Fig.4)。IL-8 による $[Ca^{2+}]_i$ 増加はきわめて短時間であり 1~2 分で非刺激時のレベルへ戻った。また、 1×10^{-7} M のそれぞれの IL-8 にて刺激した場合の $[Ca^{2+}]_i$ 濃度は [IL-8]72 の場合 1197 ± 166 nM, [IL-8]77 の場合 639 ± 65 nM であり ($n=4$)、[IL-8]72 の方が $[Ca^{2+}]_i$ 増加作用にても有意に強力であった。

4. [IL-8]72 および [IL-8]77 による好中球脱感作

好中球 O_2^- 産生および $[Ca^{2+}]_i$ の動態における各 IL-8 による脱感作作用を検討した (Fig.4 & 5)。好中球を十分な濃度の [IL-8]72 (1×10^{-7} M) で刺激した後、同濃度の [IL-8]72 あるいは [IL-8]77 で刺激しても新たな反応は認められなかった。逆に、[IL-8]77 で充分先行刺激した後さらに [IL-8]77 にて刺激を加えても新たな反応は見られなかったが、[IL-8]72 にて追加刺激すると、わずかだが反応が認

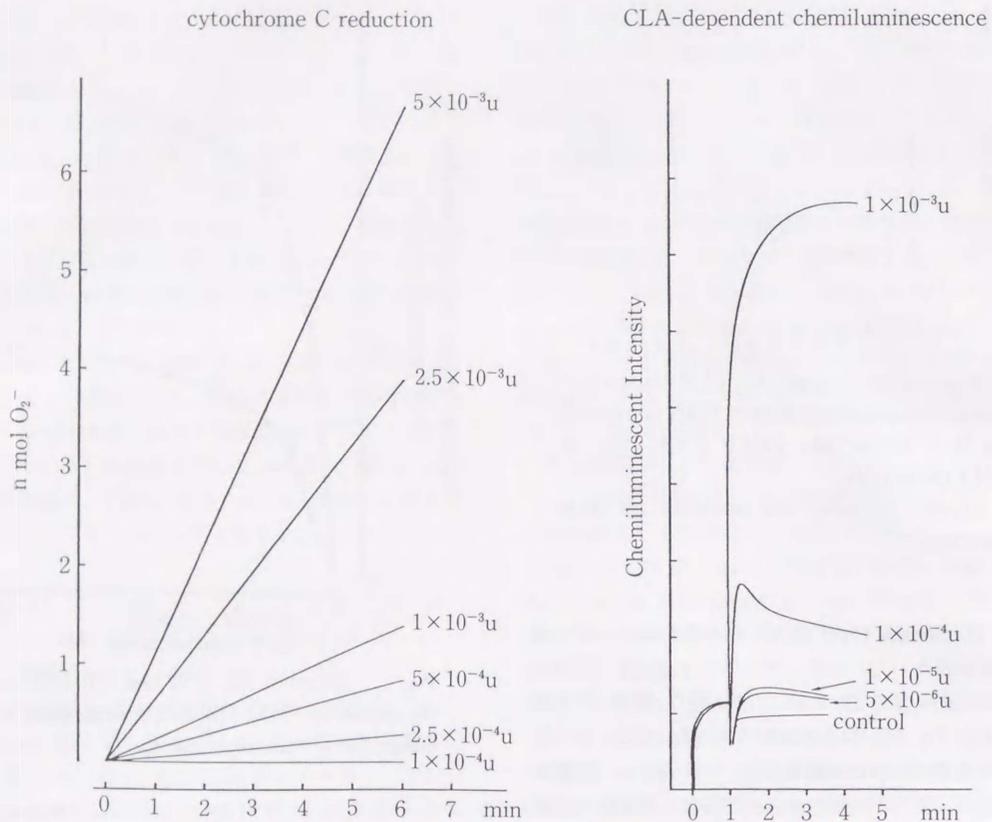


Fig. 3. Comparison of CLA-dependent chemiluminescence with cytochrome C reduction for the measurement of O_2^- produced by xanthine-xanthine oxidase.

Table 1. Effect of extracellular Ca^{2+} and Mg^{2+} on O_2^- release by PMN stimulated with [IL-8]72, [IL-8]77 or FMLP

HBSS	Integrated light emission for 6 seconds at the peak (counts)			
	Ca^{2+} (-) Mg^{2+} (-)	Ca^{2+} (+) Mg^{2+} (-)	Ca^{2+} (-) Mg^{2+} (+)	Ca^{2+} (+) Mg^{2+} (+)
[IL-8]72:	11655±989	11212±2460	10859±1335	11182±2155
[IL-8]77:	4920±966	4344±1341	4967±1285	4688±1698
FMLP:	14578±5243	28092±7480*	12565±4568	24670±4734*

PMN were suspended in each HBSS and stimulated by IL-8 (5×10^{-8} M) or FMLP (1×10^{-7} M). The data are expressed as mean±SD of four experiments.

*Significantly increased as compared with Ca^{2+} (-) - HBSS ($p < 0.01$).

められた。

5. IL-8 の好中球に対するプライミング作用

好中球を[IL-8]72あるいは[IL-8]77で37°C, 10分間 preincubationすることにより FMLP あるいは C5a 刺激による O_2^- 産生能は増強された。両タイプ

の IL-8 は好中球酸素代謝に対しプライミング作用を持っているものと思われる。このプライミング作用は 1×10^{-10} M 以上の濃度依存性に認められ 1×10^{-8} M にてほぼ最大の効果が認められた。また preincubation の時間にも依存しており 10~20 分間の短時間の

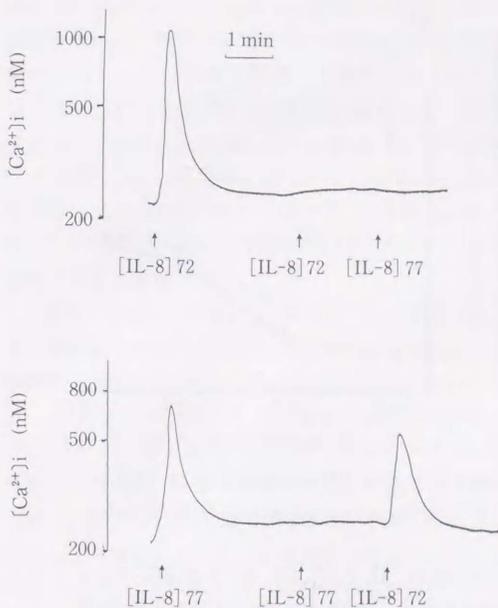


Fig. 4. Desensitization of [IL-8]72 and [IL-8]77-induced increase in $[Ca^{2+}]_i$ in PMN. High dose of IL-8 (1×10^{-7} M) was added initially and then the same dose of IL-8 was added. Thereafter, the same dose of another IL-8 was added as indicated.

preincubation にて充分の効果が見られた (Fig.6)。しかし、このプライミング作用は PMA で刺激した場合には認められなかった (Table 2)。また、好中球を [IL-8]72 と共に preincubation した場合とそれと同濃度の [IL-8]77 と共に preincubation した場合とでは、後に FMLP 刺激で産生される O_2^- の量は同程度であった。この現象は C5a で刺激した場合も同様であった。プライミング作用に関しては [IL-8]72, [IL-8]77 共にその効力は同程度であった (Table 2)。

考 察

本実験で、高感度の CLA 依存性化学発光法により [IL-8]72, [IL-8]77 とともに直接好中球 O_2^- 産生を誘導することを確認した。しかし、両 IL-8 特に [IL-8]77 の刺激で好中球より産生される O_2^- 量は FMLP など他の走化因子刺激の場合と比較して少量であり、チトクロム C 還元能測定法では検出不可能であった。以前より IL-8 が、好中球 O_2^- 産生を誘導するかどうか意見の一致が見られなかった原因は、その測定法の感度にあると思われた。CLA 依存性化学発光測定法は、xanthine-XO 系により産生される O_2^- 測定にてもチトクロム C 還元法に比べ約50倍高感度であった。これは中野ら¹⁰⁾ の報告と同様であり、CLA 依存性化学発光測定法は O_2^- 検出に特異的でありしかも微量な O_2^- の検出あるいは極少量の検体で

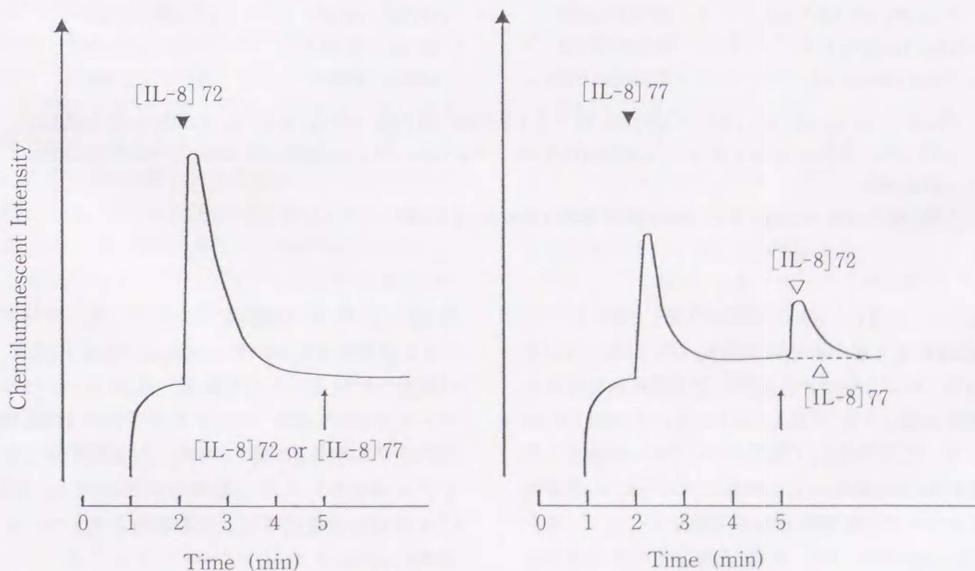


Fig. 5. Desensitization of [IL-8]72 and [IL-8]77-stimulated oxygen metabolism of PMN. Black arrowhead indicates the first addition of IL-8 (1×10^{-7} M) and arrow indicates the subsequent addition of IL-8 (1×10^{-7} M).

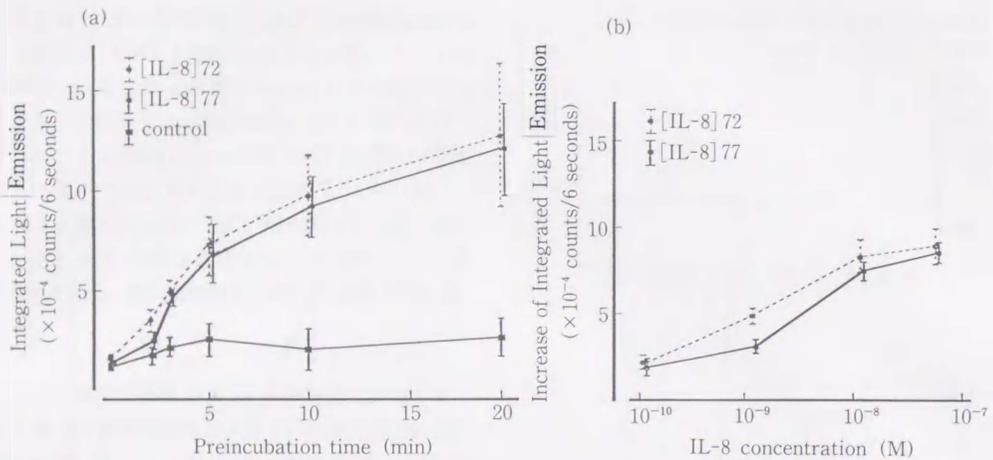


Fig. 6. Effects of [IL-8]72 and [IL-8]77 on O_2^- release in human PMN stimulated by FMLP. (a) PMN were incubated with or without IL-8 (1.2×10^{-8} M) for indicated periods at 37°C before FMLP (5×10^{-8} M) was added. (b) PMN were preincubated with indicated concentrations of [IL-8]72, [IL-8]77 or HBSS (for control) for 10 min at 37°C before FMLP (5×10^{-8} M) was added. The data represent the difference of chemiluminescence (CL): {CL stimulated with IL-8} - {CL of control}. The data are expressed as mean \pm SD of four experiments.

Table 2. Priming effect of [IL-8]72 and [IL-8]77 on O_2^- release by PMN stimulated with other stimuli

	Integrated light emission for 6 seconds at the peak (counts)		
	control	[IL-8]72	[IL-8]77
FMLP (5×10^{-8} M)	28763 \pm 7839	115775 \pm 19940*	103329 \pm 19546*
C5a (10 ng/ml)	17639 \pm 5146	98165 \pm 13362*	90856 \pm 11682*
PMA (50 ng/ml)	82515 \pm 10981	90989 \pm 17585	89717 \pm 10094

PMN were incubated with or without IL-8 (1.2×10^{-8} M) for 10 min at 37°C and then stimulated with other stimulus as indicated concentrations. The data are expressed as mean \pm SD of four experiments.

*Significantly increased as compared with control ($p < 0.01$).

の測定により適していると思われる。両タイプのIL-8刺激により導かれる化学発光パターンはFMLPやC5aといった、他の走化因子により導かれるパターンと類似していたがPMAによるそれとは明らかに異なっていた。FMLP, C5aはレセプターと結合しその刺激がG蛋白質を介してホスホリパーゼCさらにイノシトールリン脂質の代謝を活性化させる。一方、PMAはレセプターを介さずに直接プロテインキナーゼCを活性化する。この様にFMLP, C5aとPMAでは細胞内刺激伝達系に大きな差がみられ、それが化学発光のパターンの違いをもたらしている可能性が推

測される。IL-8の刺激伝達系は未だ充分解明されていないが化学発光のパターンからいえばFMLP, C5aに類似していると考えられる。事実IL-8のレセプターとFMLP, C5aのレセプターでは特に細胞膜貫通部分での相同性が高く、おそらく細胞内刺激伝達パターンが等しいことが推測され、IL-8はFMLP, C5aの様な走化因子としての特徴を有しているものと考えられる。

しかし、[IL-8]72あるいは[IL-8]77の刺激により好中球より産生される O_2^- 量は細胞外 Ca^{2+} , Mg^{2+} の有無により変化を受けなかった。一方、FMLPや

C5a はこれまでの報告のように細胞外 Mg^{2+} の影響は受けないが、細胞外 Ca^{2+} の存在により O_2^- 産生量は倍増した。これまで検討してきた [IL-8]72 及び [IL-8]77 の生理機能は FMLP や C5a と比較してその性質はほとんど類似していたが、 O_2^- 産生における細胞外 Ca^{2+} の影響に関してはこの様に異なる性質を示した。このために $[Ca^{2+}]_i$ 上昇作用にて、IL-8 が FMLP, C5a との活性度に差を生じている可能性があると推測される。

一般に、FMLP 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ の変動では、まず短時間の細胞内プール（小胞体）より動員がみられ続いて細胞外 Ca^{2+} の流入がみられるとされている²¹⁾。すなわち FMLP の添加に続いて急激な $[Ca^{2+}]_i$ の上昇がみられその後しばらくプラトーな時期が見られる。一方、両タイプ IL-8 刺激により好中球 $[Ca^{2+}]_i$ の増加は認められたが、FMLP に比べそのピークは低く、上昇持続時間も短かった。このように $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が少量、短時間でしかないことが [IL-8]72 および [IL-8]77 により誘導される O_2^- 産生量が FMLP, C5a に比べ微量である一因と思われる。

[IL-8]72 の O_2^- 産生誘導作用は [IL-8]77 のそれに比べ 2～3 倍強力であった。[IL-8]72 は [IL-8]77 に比し、IL-1 でプライミングされた血管内皮細胞への粘着阻害作用あるいはサイトカリン B で処理された好中球の脱顆粒調節作用において、より強力であると報告されている⁸⁾。また、著者の実験では好中球 $[Ca^{2+}]_i$ 動態、好中球遊走能（データ呈示せず）においても [IL-8]72 の作用がより強力でありこれは今までの報告¹⁶⁾ と一致する。以上を考え合わせると [IL-8]72 および [IL-8]77 はともに他の走化因子同様に好中球生理機能を直接誘導する作用をもっているが、*in vitro* でのその活性は [IL-8]72 のほうが [IL-8]77 に比べより強力と思われた。

[IL-8]72 および [IL-8]77 による好中球脱感作の検討より、[IL-8]72 で好中球を充分刺激した後、[IL-8]77 で刺激を加えても新たな O_2^- の産生は見られなかった。しかし、[IL-8]77 で充分刺激した後に [IL-8]72 にて刺激を加えると、少量ではあるが、新たな O_2^- の産生が見られた。同様な現象は $[Ca^{2+}]_i$ の動態においても観察された。IL-8 も他の走化因子同様、レセプター (IL-8 R) を介して作用するが、

[IL-8]72 は [IL-8]77 に比べ IL-8 R との binding 活性は約 10 倍強く、[IL-8]72 のほうが IL-8 R との親和性がより高いとする報告がある¹⁶⁾。著者の脱感作の実験は両 IL-8 の IL-8 R への親和性の差を反映し

ているものと思われ、[IL-8]72 は [IL-8]77 に比べより多くの IL-8 R と結合すると考えられる。最近好中球表面上の IL-8 R がクローニングされ、親和性の異なった IL-8 R が二種類同定された^{9,14)}。上記を考え合わせると Nourshargh ら¹⁶⁾ も述べているように、[IL-8]72 は二種類の両 IL-8 R に結合し、[IL-8]77 は一方の IL-8 R にもみ結合しておりしかもその親和性は低い可能性があると思われる。 O_2^- 産生や $[Ca^{2+}]_i$ の動態において [IL-8]72 がより誘導力が強力なのは、これらレセプターへの親和性の差に起因している可能性があると思われる。

in vitro で活性度が異なる IL-8 が二種類存在する理由はいまだ不明である。しかし Nourshargh らによると *in vivo* の実験にて [IL-8]72 あるいは [IL-8]77 をウサギの皮下に投与した場合同程度の好中球集積を認めたことより、生体内では [IL-8]77 はより活性の高い [IL-8]72 に切断され、両 IL-8 共に同程度の活性を示す可能性があると思われている¹⁶⁾。すなわち *in vivo* では、[IL-8]77 は [IL-8]72 に変換されて、あるいは *in vitro* の活性とは異なりそれ自体で [IL-8]72 と同程度の生物活性を示す可能性もあると思われる。

好中球を IL-8 で前処置することにより FMLP あるいは C5a 刺激にて産生される O_2^- 量は 2～5 倍増加した。IL-8 には FMLP や C5a といった他の走化因子刺激による O_2^- 産生に対してプライミング作用も持ち合わせていると思われる。*in vitro* での IL-8 の好中球への様々な直接作用はいずれも [IL-8]77 に比べ [IL-8]72 のほうが 2～10 倍にわたりより強力であったのに対し、このプライミング作用は [IL-8]72, [IL-8]77 共にほぼ同等であった。このプライミング作用も IL-8 R と結合することにより発揮されるのであれば、両タイプの IL-8 共通の IL-8 R を経由するものと推測される。

両タイプの IL-8 ともプライミング作用を示す濃度は、 O_2^- 産生を直接誘導する場合に比べ、より低値であった。最近の報告では^{1,4,5)}、幾つかの病態における生体内での IL-8 が測定されておりその多くは 10^{-10} M オーダーといった低濃度の IL-8 が検出されている。*in vitro* では、この濃度では好中球 O_2^- 産生を直接刺激する作用はみられないが、好中球酸素代謝に対するプライミング作用は充分認められた。これらを考え合わせると湯尾ら²³⁾ も述べているように、生体内における炎症の場での IL-8 の好中球酸素代謝に対しての主な作用はプライミング効果にあり、他の走化因子と絡み合ってその効果を発揮していると考えられ

る。さらにその場合 [IL-8]72, [IL-8]77 共に同程度の活性を示しうる事が示唆された。

本実験にて [IL-8]72, [IL-8]77 の好中球 O_2^- 産生に対する直接作用及びプライミング作用が判明した。今後さらに、両タイプ IL-8 の好中球内刺激伝達機構ならびに両者の生体内での詳細な意義が明らかにされていくものと思われる。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、御指導及び御校閲を賜りました広島大学医学部小児科学教室の上田一博教授に深謝致します。さらに、本研究を行うにあたり、直接御指導頂きました小林正夫先生に衷心より感謝の意を表します。また、本研究に関し、種々の御協力・御援助をいただきました小児科学教室の皆様へ深謝致します。

本研究の要旨は、第23回日本小児感染症学会（平成3年10月）、第34回日本小児血液学会（平成4年9月）において発表した。

参 考 文 献

- Brennan, F. M., Zachariae, C. O. C., Chantry, D., Larsen, C. G., Turner, M., Maini, R. N., Matsushima, K. and Feldmann, M. 1990. Detection of interleukin 8 biological activity in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and production of interleukin 8 mRNA by isolated synovial cells. *Eur. J. Immunol.* 20 : 2141-2144.
- Carveth, H. J., Bohnsack, J. F., McIntyre, T. M., Baggiolini, M., Prescott, S. M. and Zimmerman, G. A. 1989. Neutrophil activating factor (NAF) induces polymorphonuclear leukocyte adherence to endothelial cells and to subendothelial matrix proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162 : 387-393.
- Djeu, Y. J., Matsushima, K., Oppenheim, J. J., Shiotsuki, K. and Blanchard, D. K. 1990. Functional activation of human neutrophils by recombinant monocyte-derived neutrophil chemotactic factor/ IL-8. *J. Immunol.* 144 : 2205-2210.
- Donnelly, S. C., Strieter, R. M., Kunkel, S. L., Walz, A., Robertson, C. R., Carter, D. C., Grant, I. S., Pollok, A. J. and Haslett, C. 1993. Interleukin-8 and development of adult respiratory distress syndrome in at-risk patient groups. *Lancet* 341 : 643-647.
- Endo, H., Akahoshi, T., Takagishi, K., Kashiwazaki, S. and Matsushima, K. 1991. Elevation of interleukin-8 (IL-8) levels in joint fluids of patients with rheumatoid arthritis and the induction by IL-8 of leukocyte infiltration and synovitis in rabbit joints. *Lymphokine and cytokine research* 10 : 245-252.
- Gimbrone, M. A. Jr., Obin, M. S. and Brock, A. F. 1989. Endothelial interleukin-8: a novel inhibitor of leukocyte-endothelial interactions. *Science* 246 : 1601-1603.
- Gryniewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R. Y. 1985. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260 : 3440-3450.
- Hebert, C. A., Luscinskas, F. W., Kiely, J. M., Luis, E. A., Darbonne, W. C., Bennett, G. L., Liu, C. C., Obin, M. S., Gimbrone, M. A. and Baker, J. B. 1990. Endothelial and leukocyte forms of IL-8: conversion by thrombin and interactions with neutrophils. *J. Immunol.* 145 : 3033-3040.
- Holmes, W. E., Lee, J., Kuang, W. J., Rice, G. C. and Wood, W. I. 1991. Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *Science* 253 : 1278-1280.
- Kimura, H. and Nakano, M. 1988. Highly sensitive and reliable chemiluminescence method for the assay of superoxide dismutase in human erythrocytes. *FEBS. Letters* 239 : 347-350.
- Larsen, C. G., Anderson, A. O., Appella, E., Oppenheim, J. J., and Matsushima, K. 1989. The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for lymphocytes. *Science* 243 : 1464-1466.
- Lindley, I., Ashauer, H., Seifert, J. M., Lam, C., Brunowsky, W., Kownatzki, E., Thelen, M., Peveri, P., Dewald, B., von Tscherner, V., Walz, A. and Baggiolini, M. 1988. Synthesis and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding monocyte-derived neutrophil-activating factors: Biological equivalence between natural and recombinant neutrophil-activating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85 : 9199-9203.
- Matsushima, K., Morishita, K., Yoshimura, T., Lavu, S., Kobayashi, Y., Lew, W., Appella, E., Kung, H. F., Leonard, E. J. and Oppenheim, J. J. 1988. Molecular cloning of human monocyte-derived neutrophil chemotactic factors (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by in-

- terleukin 1 and tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* 167 : 1883-1893.
14. **Murphy, P. M. and Tiffany, H. L.** 1991. Cloning of complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor. *Science* 253 : 1280-1283.
 15. **Nakano, M., Sugioka, K., Ushijima, Y. and Goto, T.** 1989. Chemiluminescence probe with Cypridinaluciferin analog, 2-methyl-6-phenyl-3, 7-dihydroimidazo[1, 2-a] pyrazin-3-one, for estimating the ability of human granulocytes to generate O_2^- . *Analytical biochemistry* 159 : 363-369.
 16. **Nourshargh, S., Perkins, J. A., Showell, H. J., Matsushima, K., Williams, T. J. and Collins, P. D.** 1992. A comparative study of the neutrophil stimulatory activity in vitro and proinflammatory properties in vivo of 72 amino acid and 77 amino acid IL-8. *J. Immunol.* 148 : 106-111.
 17. **Peveri, P., Walz, A., Dewald, B. and Baggiolini, M.** 1988. A novel neutrophil-activating factor produced by human mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.* 167 : 1547-1559.
 18. **Schroeder, J. M., Mrowietz, U., Morita, E. and Christophers, E.** 1987. Purification and partial biochemical characterization of a human monocyte-derived neutrophil-activating peptide that lacks interleukin 1 activity. *J. Immunol.* 139 : 3473-3483.
 19. **Sugioka, K., Nakano, M., Kurashige, S., Akuzawa, Y. and Goto, T.** 1986. A chemiluminescent probe with a Cypridina luciferin analog, 2-methyl-6-phenyl-3, 7-dihydroimidazo [1, 2-a] pyrazin-3-one, specific and sensitive for O_2^- production in phagocytizing macrophages. *FEBS Letters* 197 : 27-30.
 20. **Thelen, M., Peveri, P., Kernen, P., von Tscharnar, V., Walz, A. and Baggiolini, M.** 1988. Mechanism of neutrophil activation by NAF, a novel monocyte-derived peptide agonist. *FASEB J.* 2 : 2702-2706.
 21. **von Tscharnar, V., Prod'hom, B., Baggiolini, M. and Reuter, H.** 1986. Ion channels in human neutrophils activated by a rise in free cytosolic calcium concentration. *Nature* 324 : 369-372.
 22. **Yoshimura, T., Matsushima, K., Tanaka, S., Robinson, E. A., Appela, E., Oppenheim, J. J. and Leonard, E. J.** 1987. Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84 : 9233-9237.
 23. **Yuo, A., Kitagawa, S., Kasahara, T., Matsushima, K., Saito, M. and Takaku, F.** 1991. Stimulation and priming of human neutrophils by interleukin-8 : Cooperation with tumor necrosis factor and colony-stimulating factors. *Blood* 78 : 2708-2714.

The Effects of Interleukin-8 on the Oxygen Metabolism of Human Polymorphonuclear Leukocytes

Norihisa IIDA

Department of Pediatrics, Hiroshima University School of Medicine
(Director: Prof. Kazuhiro UEDA)

There are two predominant forms of interleukin-8 (IL-8), 72 amino acid type produced by monocytes ([IL-8]72) and 77 amino acid type produced by endothelial cells ([IL-8]77). Both forms of IL-8, potent chemotactic factors for human polymorphonuclear leukocytes (PMN), were investigated for the ability to stimulate or prime the oxygen metabolism of PMN. Both forms of IL-8 can trigger O_2^- release and an increase in cytoplasmic-free Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) of PMN. These O_2^- release could be detected with 2-methyl-6-phenyl-3, 7-dihydroimidazo[1, 2-a]pyrazin-3-one (CLA)-dependent chemiluminescence (CL) but not with cytochrome C reduction. These different observations were due to the difference in the sensitivity to detect O_2^- between CLA-dependent CL and cytochrome C reduction. The potency for both forms of IL-8 to trigger O_2^- release was weak as compared with that induced by other chemotactic peptide, N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP) or C5a. [IL-8]72 was more potent than [IL-8]77 to trigger O_2^- release and an increase in $[Ca^{2+}]_i$.

With respect to trigger O_2^- release and an increase in $[Ca^{2+}]_i$, PMN stimulated with [IL-8]72 failed to respond to subsequent stimulation with either [IL-8]72 or [IL-8]77. However, PMN fully desensitized to [IL-8]77 could partially respond to following stimulation with [IL-8]72.

Both forms of IL-8 could prime the oxygen metabolism of PMN followed by FMLP or C5a stimulation in the low concentrations. Both forms of IL-8 were almost equipotent to prime PMN.

These results suggest that [IL-8]72 is more potent than [IL-8]77 to stimulate human PMN directly, whereas [IL-8]77 is potentially similar to [IL-8]72 to prime human PMN followed with FMLP or C5a stimulation, raising the possibility that the interaction of the chemotactic peptides might modulate the function of PMN at the inflammatory sites.