

急性動脈閉塞症の虚血再灌流障害におけるプロテアーゼ インヒビター療法, 抗サイトカイン療法の実験的検討

五島 雅和

要 旨: ラット下肢急性動脈閉塞症の虚血再灌流障害モデルを作製し, 好中球エラスターゼ阻害剤 (ONO-5046・Na) と TNF- α , IL-1 β 産生阻害剤 (FR167653) 投与による再灌流障害の抑制効果について実験的検討をした。Wistar系雄性ラットの腎動脈下腹部大動脈と両側大腿動脈を6時間血行遮断した後, 再灌流を行った。再灌流直前にONO-5046・Naを10mg/kg, 30mg/kg経静脈的に投与したONO-10mg投与群 (n=4), ONO-30mg投与群 (n=4) と, FR167653を1mg/kg同様に投与したFR群 (n=4), 生理的食塩水のみを投与した対照群 (n=4) を作製し, 経時的にIL-8, CPKを測定して比較検討した。その結果ONO-10mg投与群, ONO-30mg投与群, FR群は対照群に比し有意にIL-8, CPKの上昇を抑制し, ONO-5046・Naは用量依存的に作用した。またFR群は再灌流3時間までの早期に, ONO-30mg投与群は再灌流6時間以降に効果的であった。

以上の結果から虚血再灌流障害の発生に炎症性サイトカイン, 好中球エラスターゼが深く関与し, ONO-5046・Na, FR167653の投与により虚血再灌流障害が軽減されるものと考えられた。両薬剤の投与はMNMSの発症抑制の一治療法として期待された。(日血外会誌 11 : 7-14, 2002)

索引用語: 急性動脈閉塞症, 虚血再灌流障害, MNMS, ONO-5046・Na, FR167653

はじめに

急性動脈閉塞症の虚血再灌流障害であるmyonephropathic metabolic syndrome (MNMS) は重篤な合併症であり, ひとたび本症を発症すれば致死率が高く²⁾, 有効な治療手段もないのが現状である。近年, この虚血再灌流障害の発生には高サイトカイン血症に引き続く好中球の活性化により産生される活性酸素³⁾や好中球エラスターゼ⁴⁾等の蛋白分解酵素が関与し組織障害を引き起こすとされ, その重要性が指摘されている。なかでも好中球エラスターゼ⁵⁾ (polymorphonuclear elastase: PMN-E)

は強力な蛋白分解酵素であり局所のみならず遠隔臓器においても組織障害, 機能不全を引き起こすことが知られている。また, TNF- α , IL-1 β は高サイトカイン血症の初期に中心的役割として虚血再灌流障害の発生に関与していることが指摘されている⁶⁾。

そこで今回, ラット下肢急性動脈閉塞症の虚血再灌流障害モデルを作製し, 好中球エラスターゼ阻害剤 (ONO-5046・Na) と TNF- α , IL-1 β 産生阻害剤 (FR167653) 投与によるその抑制効果について実験的検討を行った。

対象と方法

1. 実験モデルの作製

体重180~200gのWistar系雄性ラットを使用し, ペントバルビタール0.05mg/gの腹腔内投与による麻酔下に腹部正中切開による開腹と両大腿部縦切開を加え, 腎動

日本大学医学部外科講座外科2部門
(Tel: 03-3972-8111, ex: 2462)
〒173-8610 板橋区大谷口上町30-1
受付: 2001年9月7日
受理: 2001年10月19日

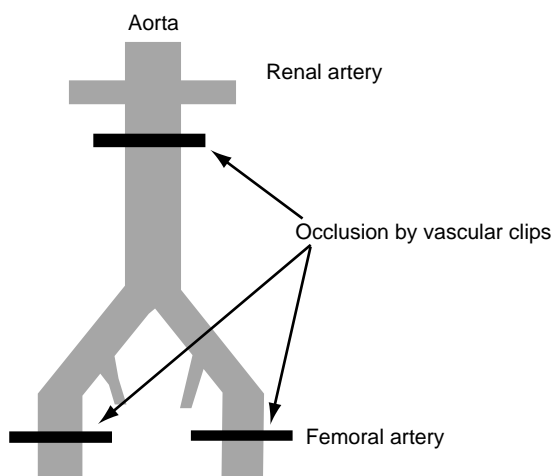


Fig. 1 Experimental model
In male Wistar rats, ischemia-reperfusion injury was induced by occluding the abdominal aorta under the renal artery and bilateral femoral arteries for 6 hours.

脈下腹部大動脈と両側大腿動脈を確保した。おのおのをマイクロバスキュラークリップ(TKS-1, 協和時計工業社)で血行遮断し, 6時間後に下肢のチアノーゼ, 冷感を確認したのち同様の麻酔法で開創し, クリップを除去し再灌流を行いラット下肢急性動脈閉塞症の虚血再灌流障害モデルを作製した(Fig. 1)。

再灌流10分前に好中球エラストラーゼ阻害剤ONO-5046・Na(小野薬品工業より供与)10mg/kg, 30mg/kgを右内頸静脈より経静脈的に投与したものをそれぞれONO-10mg投与群(n=4), ONO-30mg投与群(n=4)とし, TNF- α , IL-1 β 産生阻害剤FR167653(藤沢薬品工業より供与)1mg/kgを同様に投与したものをFR群(n=4)とした。生理的食塩水のみを投与したものを対照群(n=4)とした。

2. 採血方法

再灌流1時間後, 3時間後, 6時間後, 12時間後に腹部大動脈より採血した。検体は採血後直ちに遠心分離(3,000rpm, 5分間)し, 血清を冷凍保存した(Fig. 2)。

3. 測定項目および測定方法

測定項目はラットIL-8(CINC)とCPKで, 両項目を各群で経時的に測定した, ラットIL-8(CINC)はIBL社のGRO-CINC1を用いELISA法で, CPKはクレアチンリン酸を用いUV(NAC)法で測定した。

4. 統計学的検討

測定結果はすべて平均値 \pm 標準偏差で表記した。各

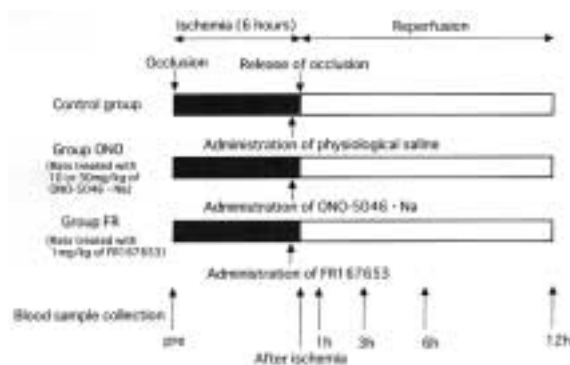


Fig. 2 Experimental protocol
Immediately before reperfusion, ONO-5046・Na(10 or 30mg/kg) and FR167653(1mg/kg) were administered intravenously, and levels of IL-8 and CPK were serially measured.

群の平均値の差の検定には一元配置分散分析法を, 多重比較検定にはFisher's PLSD法を用いた。危険率5%未満($p<0.05$)をもって有意差ありとした。

結 果

1. IL-8の推移

対照群とONO-5046・Na投与群(ONO-10mg投与群, ONO-30mg投与群)の比較(Fig. 3)では, IL-8は, 各群ともに再灌流3時間後に最高値を示しその後徐々に漸減した。各群の最高値は対照群で $23,200\pm 2,832.0$ pg/ml, ONO-10mg投与群で $16,300\pm 683.1$ pg/ml, ONO-30mg投与群で $13,475\pm 350$ pg/mlであった。ONO-5046・Na投与群は対照群に比べ再灌流3時間後と6時間後で有意にIL-8の産生を抑制した。またONO-10mg投与群, ONO-30mg投与群間で比較すると, 再灌流3時間後でONO-30mg投与群が有意にIL-8産生を抑制した。

対照群とONO-30mg投与群とFR群の比較(Fig. 4)では, IL-8はFR群でもやはり再灌流3時間後に最高値 $12,333.3\pm 611$ pg/mlを示しその後徐々に漸減した。FR群は対照群に比べ再灌流3時間後と6時間後で有意にIL-8の産生を抑制した。また再灌流3時間後でFR群は有意差はないもののONO-30mg投与群に比べIL-8は低値であった。再灌流6時間後ではONO-30mg投与群はFR群に比べ有意にIL-8の産生を抑制した。

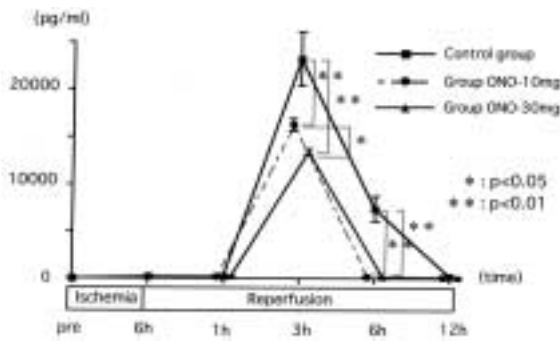


Fig. 3 IL-8 levels in the control and ONO groups
The IL-8 level reached a peak 3 hours after reperfusion in all groups. The IL-8 production was significantly lower 3 and 6 hours after reperfusion in the ONO groups than in the control group. Inhibition of the IL-8 production was significantly higher in the ONO 30mg group than in the ONO 10mg group.

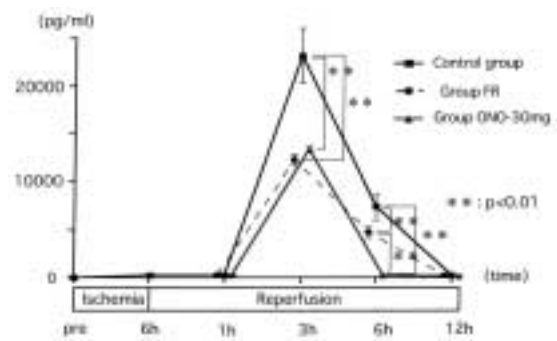


Fig. 4 IL-8 levels in the control, ONO, and FR groups
The IL-8 production was significantly lower 3 and 6 hours after reperfusion in the FR group than in the control group. Inhibition of the IL-8 production was significantly higher in the ONO 30 mg group than in the FR group.

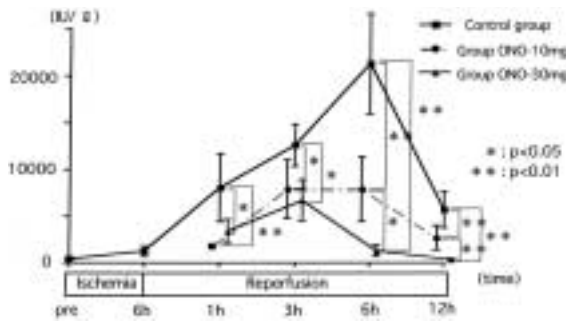


Fig. 5 CPK levels in the control and ONO groups
The CPK level reached a peak 6 hours after reperfusion in the control group and 3 hours after reperfusion in the ONO group. Elevation of the CPK level was significantly lower 1 ~ 12 hours after reperfusion in the ONO groups than in the control group. The increase in the CPK level was significantly lower 6 and 12 hours after reperfusion in the ONO 30 mg group than in the ONO 10 mg group.

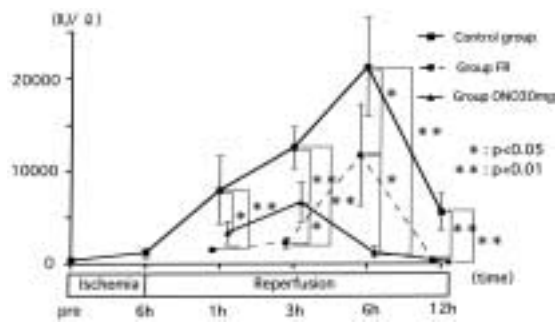


Fig. 6 CPK levels in the control, ONO, and FR groups
The CPK level reached a peak 6 hours after reperfusion in the FR group, and the increase was significantly lower 1 ~ 12 hours after reperfusion than in the control group. The IL-8 production was significantly reduced 3 hours and 6 hours after reperfusion in the FR and ONO 30 mg groups, respectively. The peak CPK level was the lowest in the ONO 30 mg group.

2. CPKの推移

CPKの推移は(Fig. 5), 対照群で再灌流 6 時間後に 21,243.3±5,294.4IU/lと最高値を呈したのに対して, ONO-5046・Na投与群は再灌流 3 時間後にONO-10mg投与群で7,881.0±3,151.2IU/l, ONO-30mg投与群で6,692.0±2,185.8IU/lと最高値を示し以後速やかに低下した. 対照群とONO-5046・Na投与群では再灌流 1 時間後から12時間後まで有意にCPK値の上昇を抑制した. またONO-10mg投与群とONO-30mg投与群では再灌流 6 時間後と12時間後でONO-30mg投与群が有意にCPK値を抑

制した.

対照群とONO-30mg投与群とFR群の比較(Fig. 6)では, FR群は再灌流 6 時間後に11,803.3±5,479.7IU/lと最高値を示し, 再灌流 1 時間後から12時間後まで対照群に比べ有意にCPK値の上昇を抑制した. FR群とONO-30mg投与群の比較では再灌流 3 時間後ではFR群が, 再灌流 6 時間後ではONO-30mg投与群が有意にCPK値の上昇を抑制した. CPKのピーク値はONO-30mg投与群が最も低値であった.

考 察

一時的に血行が遮断され虚血に陥った臓器に血流が再開されると、より大きな障害が発症することが知られており、これは虚血再灌流障害⁷⁾といわれ、臓器移植や肝切除における血行遮断において臨床上重要な問題となっている⁸⁾。

下肢急性動脈閉塞症の重篤な再灌流障害であるMNMS¹において、その病態はrhabdomyolysisによる代謝性アシドーシス、高K血症、高ミオグロビン血症が原因であるとされてきた。しかしSIRS⁹⁾の概念が提唱されたから、生体に虚血、再灌流という侵襲が加わり高サイトカイン血症が誘導され、その遷延により好中球の活性化、各組織・臓器への浸潤、そして活性酸素や好中球エラスターゼをはじめとする各種蛋白分解酵素などの放出により遠隔臓器にも組織障害を引き起こすということが解明されてきた。このことは急性動脈閉塞という虚血侵襲をファーストアタックとし血行再建という再灌流をセカンドアタックと想定すると、Ogawaらの提唱したsecond attack theory¹⁰⁾と合致するものである。

当教室においてもこれまで本症におけるサイトカイン(IL-8, IL-10)や、接着分子(ICAM-1)、好中球の関与について報告してきた^{11,12)}。また治療として白血球除去フィルター¹²⁾やプラズマフィルトレーションの応用¹³⁾、フリーラジカルに対するラジカルスカベンジャーの投与¹⁴⁾等でその有効性を証明してきた。

好中球エラスターゼ⁵⁾は1968年にJanoffらによってその存在が報告された極めて強力な蛋白分解酵素であり、虚血再灌流障害において活性酸素とともにその関与が指摘されている。分子量33,000のセリンプロテアーゼの一つであり本来の作用は細菌や異物の蛋白分解であるが、基質特異性が低く、血漿蛋白、凝固因子、補体、エラスチン、プロテオグリカン、コラーゲン等を容易に分解し正常細胞も傷害する¹⁵⁾。

好中球エラスターゼは体液中に豊富に存在する α_1 -protease inhibitor(α_1 -PI)等の内因性プロテアーゼ阻害物質に活性を調節されており¹⁶⁾、通常は生体を傷害する可能性は低い。しかしながら炎症部位では α_1 -PI等の内因性プロテアーゼ阻害物質は好中球エラスターゼを十分に制御できないことが示唆されている。このことが生体内に多量にプロテアーゼ阻害物質が存在するにもかかわらず好中球エラスターゼが組織を傷害しうる原

因と考えられている。その機序として第一に内因性プロテアーゼ阻害物質は分子量が大きいため立体的制約により炎症部位である好中球と組織の間隙に到達できないこと、第二に好中球の放出する活性酸素により失活することなどが考えられている¹⁷⁾。

好中球エラスターゼ阻害剤(ONO-5046・Na)は分子式 $C_{20}H_{21}N_2NaO_7SNa \cdot 4H_2O$ で、分子量は528.51と非常に小さく、生体に存在する活性阻害物質に比べ極めて低分子であり容易に炎症部位に到達でき、活性酸素などによって不活化されずに特異的に好中球エラスターゼを阻害する¹⁸⁾。これまでにヒトでSIRSの状態における肺障害で有効性が示されており¹⁹⁾、その他動物実験でも肝、肺などで虚血再灌流障害の抑制効果が認められている^{20, 21)}。

本実験モデルでは急性動脈閉塞症での血栓塞栓除去術等の外科的治療を想定して、血行遮断解除による再灌流直前に薬剤投与を行うことで臨床に準じるものとした。対照群でIL-8の上昇に続いてCPKが上昇しているが、これは高サイトカイン血症、SIRSの状態から好中球の活性化が惹起され臓器障害が発症して逸脱酵素であるCPKが遅れて上昇した過程を示しているものと考えられた。好中球エラスターゼ阻害剤(ONO-5046・Na)の投与により全身の組織障害としてのCPKの産生が対照群に比べ有意に抑制されたことは、活性化した好中球から放出された好中球エラスターゼが下肢の虚血再灌流障害において深く関与しているということを示唆するものであった。これまでに当教室では、急性動脈閉塞症の虚血再灌流障害モデルの実験において、組織所見として肺水腫、肺毛細血管内の好中球の集積を認めることや、CPKが高値を呈するほど心、肺の組織障害が著明であること、遠隔臓器におけるICAM-1の発現の亢進などについて報告し、組織学的に下肢虚血再灌流障害の発症原因として好中球、および好中球の放出する好中球エラスターゼ、活性酸素の関与を指摘している¹¹⁾。

好中球エラスターゼは直接組織障害を起こすだけでなく、マクロファージなどの免疫担当細胞を刺激しIL-8を産生するといった一種のサイトカインとしての作用があるといわれ、好中球が再び集積し活性化するという自己増幅回路の存在が報告されている²²⁾。本実験でIL-8がONO-5046・Naの投与により有意に抑えられたのは、好中球エラスターゼ阻害剤がこの増幅回路も阻害

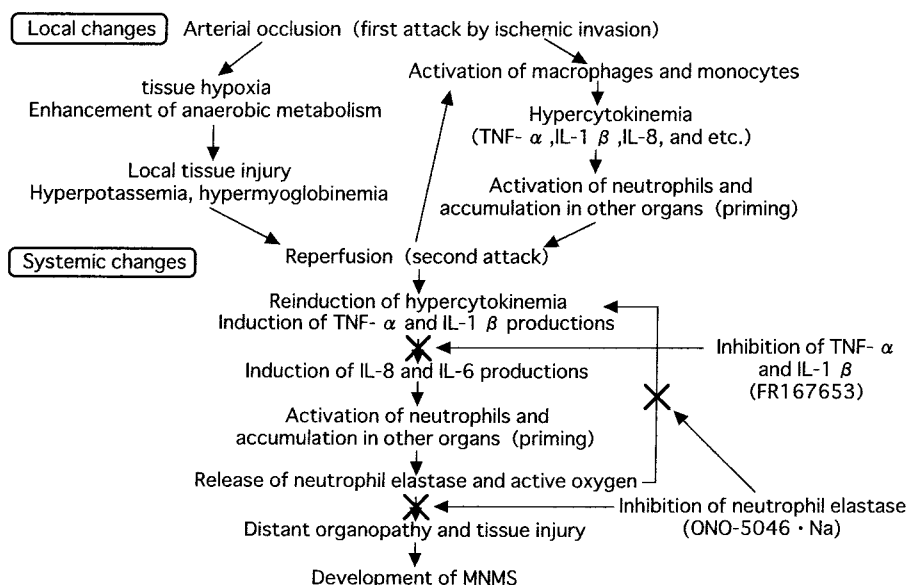


Fig. 7 Mechanisms of the development of MNMS

A hypothesis of the mechanism of MNMS development from ischemia-reperfusion injury of the lower extremities is presented. FR167653 may inhibit the production of IL-1 β and TNF- α early after reperfusion, while ONO-5046·Na may reduce ischemia-reperfusion injury by reducing neutrophil elastase during the late period after reperfusion.

し虚血再灌流障害を抑制しているのではないかということが示唆された。

また好中球エラスターゼ阻害剤は用量依存的に作用することが知られており¹⁸⁾、本実験においても10mg投与群に比し30mg投与群でIL-8、CPKの産生が有意に抑制された。

TNF- α 、IL-1 β などのサイトカインの虚血再灌流障害における関与は以前より報告されており⁶⁾、その阻害剤であるFR167653の投与によるDICの改善²³⁾や肺の虚血再灌流障害軽減²⁴⁾の報告も散見される。

虚血再灌流が起こると、まずはじめにTNF- α 、IL-1 β がサイトカインネットワークの中心として単球、マクロファージなどから誘導される。そして他の炎症性サイトカインの産生を誘導し、好中球の活性化、組織障害を引き起こす²⁵⁾。TNF- α 、IL-1 β 産生阻害剤であるFR167653^{23, 24)}は、pyrazolotriazine誘導体で単球からのTNF- α 、IL-1 β 産生を阻害し虚血再灌流障害を軽減する。分子式はC₂₄H₁₈FN₅O₂·H₂SO₄·H₂Oで、分子量543.53とONO-5046·Na同様低分子の薬剤である。

本実験において、FR群は対照群に比しIL-8、CPKの上昇を有意に抑えることができた。これは虚血再灌流

障害の初期に誘導されるTNF- α 、IL-1 β の産生を阻害することで次に誘導される2次性サイトカインのIL-8を抑え、さらにそれに引き続く組織障害の指標としてのCPKを抑えることができたものと考えられた。

ONO-30mg投与群とFR群を比較すると、再灌流3時間後ではIL-8、CPKはともにFR群で低値であった。再灌流6時間後、再灌流12時間後ではONO-30mg投与群で低値であった。これはFR167653が再灌流の初期に誘導されるTNF- α 、IL-1 β を抑制するのと、ONO-5046·Naが再灌流の後期に組織障害の主体となる好中球エラスターゼを阻害するという作用時期の違いによるものと考えられた(Fig.7)。

好中球エラスターゼ阻害剤(ONO-5046·Na)とTNF- α 、IL-1 β 産生阻害剤(FR167653)を比較した場合に、CPKのピーク値はONO-5046·Na投与群が低値であり、再灌流による組織障害の軽減に対し効果的であると考えられた。FR167653は再灌流早期のCPK上昇を抑制しており、早期の組織障害軽減に効果的と考えられた。しかし、どちらが有効かは薬剤の投与方法、投与期間、投与量等に依存するため、本実験結果からだけでは結論できなかった。

これまで抗サイトカイン療法として抗TNF抗体²⁶や抗IL-1受容体拮抗物質(IL-1ra)²⁷などの臨床治験が行われたがいずれも有意な効果は得られなかった。抗IL-8抗体²⁸は動物実験では有効性が示されているものの臨床応用は現在開発段階である。これらはいずれも複雑なサイトカインネットワークのなかの一つを阻害するにすぎないため、明らかな効果が認められなかったと考えられている。

FR167653は再灌流障害の早期に複数の炎症性サイトカイン, TNF- α , IL-1 β の産生を抑え効果を認め, ONO-5046・Naはサイトカインネットワークの最終段階で組織障害を直接引き起こす好中球エラスターゼを阻害して効果を認めた。FR167653とONO-5046・Naはその作用機序も異なることから, 今後は両者の併用や他剤との併用による抗サイトカイン療法, プロテアーゼインヒビター療法で, 従来施行されてきた血液浄化法²⁹や局所灌流法³⁰などのサイトカイン除去療法と同等の効果が得られれば, 手術の際の再灌流直前の静脈投与という簡便さからもMNMSの発症予防の一治療として期待された。

結 語

1. ラット下肢急性動脈閉塞症の虚血再灌流障害において好中球エラスターゼ阻害剤, TNF- α , IL-1 β 産生阻害剤の投与はIL-8(CINC), CPKの産生を有意に抑制し, その効果は好中球エラスターゼ阻害剤では用量依存的であった。
2. 好中球エラスターゼ阻害剤, TNF- α , IL-1 β 産生阻害剤投与によりIL-8(CINC), CPKの産生が抑制されたことは, 本症の発生に炎症性サイトカイン, 好中球エラスターゼが深く関与しているものと考えられた。

稿を終えるに臨み, ご指導, ご校閲を賜りました根岸七雄教授に深く謝意を表するとともに, 終始ご指導, ご助言をいただいた教室の諸兄に心から感謝の意を表します。

文 献

- 1) Haimovici, H.: Muscular, renal, and metabolic complications of acute arterial occlusions. *Surgery*, 85: 461-468, 1979.

- 2) Haimovici, H.: Metabolic complications of acute arterial occlusions. *J. Cardiovasc. Surg.*, 20: 349-357, 1979.
- 3) Tate, R. M., Vanbenthuyzen, K. M., Shasby, D. M., et al.: Oxygen-radical-mediated permeability edema and vasoconstriction in isolated perfused rabbit lungs. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 126: 802-806, 1982.
- 4) Weiss, S. J., Curnutte, J. T., and Regiani, S.: Neutrophil-mediated solubilization of the subendothelial matrix: Oxidative and nonoxidative mechanisms of proteolysis used by normal and chronic granulomatous disease phagocytes. *J. Immunol.*, 136: 636-641, 1986.
- 5) Janoff, A., and Zeligs, J. D.: Vascular injury and lysis of basement membrane *in vitro* by neutral protease of human leukocytes. *Science*, 161: 702-705, 1968.
- 6) Seekamp, A., Warren, J. S., Remick, D. G., et al.: Requirements for tumor necrosis factor- α and interleukin-1 in limb ischemia/reperfusion injury and associated lung injury. *Am. J. Pathol.*, 143: 453-463, 1993.
- 7) Nayler, W. G., and Elz, J. S.: Reperfusion injury: Laboratory artifact or clinical dilemma? *Circulation*, 74: 215-221, 1986.
- 8) Thurman, R. G., Marzi, I., Seitz, G., et al.: Hepatic reperfusion injury following orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplantation*, 46: 502-506, 1988.
- 9) Members of the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference Committee: American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit. Care Med.*, 20: 864-874, 1992.
- 10) Ogawa, M.: Mechanisms of the development of organ failure following surgical insult: the "second attack" theory. *Clin. Intensive Care*, 7: 34-38, 1996.
- 11) 知久信明: 急性動脈閉塞症の再灌流障害におけるICAM-1, IL-8の関与に対する実験的検討. *日心外会誌*, 26: 217-223, 1997.
- 12) 梅澤久輝: 急性動脈閉塞症の再灌流障害における白血球の関与 - 急性動脈閉塞症の実験的検討 -. *日心外会誌*, 26: 141-149, 1997.
- 13) 一和多雅雄: Myonephropatic metabolic syndromeに対する新しい予防と治療法 - プラズマフィルトレーションの応用 -. *日外会誌*, 89: 1114-1121, 1988.
- 14) 渡井健男: MNMSに対するoxygen radical scavengerの効果に関する研究 - とくにSOD活性と組織逸脱酵素に対する実験的検討 -. *日心外会誌*, 20: 5-10, 1990.

- 15) Janoff, A.: Elastase in tissue injury. *Ann. Rev. Med.*, 36: 207-216, 1985.
- 16) Travis, J., and Salvesen, GS.: Human protease inhibitors. *Ann. Rev. Biochem.*, 52: 655-709, 1983.
- 17) Weiss, S. J.: Tissue destruction by neutrophils. *N. Engl. J. Med.*, 320(6): 365-376, 1989.
- 18) Kawabata, K., Suzuki, M., Sugitani, M., et al.: ONO-5046, a novel inhibitor of human neutrophil elastase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 177: 814-820, 1991.
- 19) 遠藤重厚：好中球エラスターゼ阻害剤；ONO-5046・Naの全身性炎症反応症候群に伴う肺障害に対する有効性と安全性の検討 - 第III相一般臨床試験 - . *臨床医薬*, 14: 363-377, 1998.
- 20) Yamaguchi, Y., Akizuki, E., Ichiguchi, O., et al.: Neutrophil elastase inhibitor reduces neutrophil chemoattractant production after ischemia-reperfusion in rat liver. *Gastroenterology*, 112: 551-560, 1997.
- 21) Tomizawa, N., Ohwada, S., Ohya, T., et al.: The effect of a neutrophil elastase inhibitor(ONO-5046・Na)and neutrophil depletion using a granulotrap(G-1)column on lung reperfusion injury in dogs. *J. Haet. and Lung Transplantation*, 18: 637-645, 1999.
- 22) Wang, F. S., Yamaguchi, Y., Akizuki, E., et al.: Neutrophil elastase inhibitor(ONO-5046・Na)decrease cytokine-induced neutrophil chemoattractant after reperfusion of pancreatoduodenal transplantation in rats. *Transplantation*, 61: 1103-1107, 1996.
- 23) Yamamoto, N., Sasaki, E., Yamazaki, H., et al.: Effect of FR167653, a cytokine suppressive agent, on endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation. *Eur. J. Pharmacol.*, 314: 137-142, 1996.
- 24) Kamoshita, N., Takeyoshi, I., Ohwada, S., et al.: The effect of FR167653 on pulmonary ischemia-reperfusion injury. *J. Heart Lung Transplant.*, 16: 1062-1072, 1997.
- 25) Guirao, X. and Lowry, SF.: Biologic control on injury and inflammation: Much more than too little or too late. *World J. Surg.*, 20: 437-446, 1996.
- 26) Dhainaut, J. F., Vincent, J. L., Richard, C., et al.: CPD571, a humanized antibody to human tumor necrosis factor- α : safety, pharmacokinetics, immune response, and influence of the antibody on cytokine concentrations in patients with septic shock. CPD571 Sepsis Study Group. *Crit. Care Med.*, 23: 1461-1469, 1995.
- 27) Opal, S. M., Fisher, C. J. Jr., Dhainaut, J. F., et al.: Confirmatory interleukin-1 receptor antagonist trial in severe sepsis: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. The Interleukin-1 Receptor Antagonist Sepsis Investigator Group. *Crit. Care Med.*, 25: 1115-1124, 1997.
- 28) Sekido, N., Mukaida, N., Harada, A., et al.: Prevention of lung injury in rabbits by a monoclonal antibody against interleukin-8. *Nature*, 365: 654-657, 1993.
- 29) 松田兼一, 平澤博之, 志賀英敏: CHDFによるSIRSの制御. *集中治療*, 10: 863-872, 1998.
- 30) 市原利彦, 石田秀樹, 朝倉貞二, 他: 急性下肢動脈閉塞症に対する下肢局所灌流法 2 症例の経験. *閉塞後長時間経過症例に対して*. *日集中医誌*, 5: 401-405, 1998.

Effects of a Neutrophil Elastase Inhibitor and a Dual Inhibitor of Interleukin-1 β and Tumor Necrosis Factor- α on Limb Ischemia-Reperfusion Injury in Rats

Masakazu Goshima

The Second Department of Surgery, Nihon University School of Medicine

Key words: Acute arterial occlusion, Ischemia-reperfusion injury, MNMS, ONO-5046·Na, FR157653

An animal model of ischemia-reperfusion injury was prepared by acutely occluding the arteries in lower rat limbs to evaluate whether ONO-5046·Na (a neutrophil elastase inhibitor) and FR167653 (a dual inhibitor of TNF- α and IL-1 β productions) were useful for inhibiting ischemia-reperfusion injury. In male Wistar rats, ischemia-reperfusion injury was induced by occluding the abdominal aorta under the renal artery and bilateral femoral arteries for 6 hours. Immediately before reperfusion, ONO-5046·Na (10 or 30 mg/kg) was administered intravenously, and levels of IL-8 and CPK were serially measured in the following 4 groups: Group A consisting of rats treated with 10mg/kg of ONO-5046·Na (n=4) Group B consisting of rats treated with 30mg/kg of ONO-5046·Na (n=4) Group FR consisting of rats treated with 1mg/kg of FR167653 (n=4) and the control group consisting of rats treated with physiological saline alone (n=4). Increases in IL-8 and CPK levels were significantly lower in Groups A, B, and FR than in the control group. In particular, ONO-5046·Na dose-dependently reduced the increases in IL-8 and CPK levels. In addition, inhibitory effects were observed in Group FR during the first 3 hours after reperfusion, and in Group B from 6 hours after reperfusion.

These findings suggest that inflammatory cytokines and neutrophil elastase are closely involved in the development of ischemia-reperfusion injury. Therefore, the administration of these agents is expected to prevent the development of MNMS. (Jpn. J. Vasc. Surg., 11: 7-14, 2002)