Assessment of IL-6 Production in the Peripheral Blood with an In Vitro Model System for Bacteremia

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8176

金沢大学十全医学会雑誌　第99巻　第1号　186－200（1990）

ヒト末梢血の IL-6 産生能

－菌血症モデルによる検討－

金沢大学医学部小児科学講座（主任：谷口　昂教授）

高　野　信　彦

（平成2年1月26日受付）

本研究では，細菌刺激によるインターロイキン6 (interleukin 6, IL-6) 産生のメカニズムを明らかにするために全血培養法を用いて，種々の刺激後の IL-6 産生能を測定した．分離単核球を培養した場合は，特定の刺激を加えることなしに著明な IL-6 産生が誘導されたが，これに対して，全血培養法を用いた場合には，非刺激下では IL-6 産生が認められなかった．lipopolysaccharide (LPS) や concanavalin A (Con A) で刺激した場合，IL-6 産生は培養開始後2時間と早期に誘導され，12時間でピークに達した．なお，免疫組織染色で検討すると全血培養における主たる IL-6 産生細胞は単球であると考えられた．肺炎球菌，リステリア菌，B群溶連菌などグラム陽性菌の生菌を使って全血培養法で培養した時，1×10^5/ml 以下の菌体濃度でも IL-6 産生が誘導された．これに対して，グラム陰性菌である大腸菌では，10^1/ml と極めて低濃度において IL-6 産生を誘導できた．ホルマリン処理をした死菌による刺激では生菌と同様な用量依存性で IL-6 産生が誘導された．補体処理ザイモザンまたはラテックス粒子等，貪食刺激のみによっても，有意な IL-6 産生が誘導された．しかしこれら粒子の貪食刺激による IL-6 産生の誘導には細菌刺激に比し，より多数の粒子が必要であった．新生児臍帯血における LPS, Con A 添加時の IL-6 産生の経時的変化，用量依存性やその産生量は，成人末梢血を用いた場合と同様であった．さらに，新生児臍帯血に様々な細菌を添加して培養を行なっても，成人末梢血に匹敵する IL-6 産生が誘導された．以上の結果より，単球/マクロファージによる IL-6 産生の誘導には貪食刺激だけではなく，殺菌や消化等を含む細胞内の処理機構及び細菌自体の抗原性が関与し，それを増強していることが示唆された．また単球/マクロファージ系による IL-6 産生能などの基本的機能は，胎生の極めて早期に完成し，生下時には成人レベルに成熟していると考えられた．本研究の成績により，全血培養法は，末梢循環における感染因子と白血球の相互作用を再現する菌血症の理想的な実験モデルであると考えられた．

Key words interleukin 6, monocyte, whole blood culture, bacteremia

サイトカインとしてのインターロイキン6 (interleukin 6, IL-6) は当初，T細胞によって産生され，B細胞の分化誘導に関与する生理活性因子として注目された[1,2]．しかし，その後数多くの研究によって，IL-6 がB細胞のみならず，生体内の種々の細胞に対して多様な生物活性を有するサイトカインであることが明らかとなってきた[3]．さらに，その産生細胞は多岐に及び[4]，血液中では主として単球/マクロファージにより産生され[5,6]，インターロイキン1 (interleukin 1, IL-1)，腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 等とともに生体における免疫反応や炎症反応においてモノカイン（単球由来液性因子）の一種として重要な役割を果たす

Abbreviations: Con A, concanavalin A; FBS, fetal bovine serum; GVB, gelatin veronal buffer; IL-1, interleukin 1; IL-6, interleukin 6; LPS, lipopolysaccharide; MTT, 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetorazolium bromide; PBS, phosphate-buffered saline; rIL-6, recombinant interleukin 6; TBS, Tris buffered saline; TNF, tumor necrosis factor

ことが知られるようになった．このような IL-6 の多様な生理作用のうち，特に肝細胞刺激因子としての作用は重要であり，肝細胞を刺激してC反応性蛋白，ハプトグロビン等種々の急性期蛋白の合成を誘導する[7][8]．Ueno ら[9]は川崎病や細菌感染症など急性期蛋白が著明に誘導される急性熱性疾患において血清中 IL-6 が高値を示すこと，またこのような IL-6 の変化が，一部の急性期蛋白の消長とよく相関することを示し，急性炎症の指標としての IL-6 の重要性を明らかにした．しかし，生体内における IL-6 産生とその制御に関しては種々の要素が関与することが予想され，具体的に生体内でどのような刺激が IL-6 産生を引き起こすかは明らかではない．

一方，新生児期は従来より感染に対する抵抗が弱く，重篤な感染症に罹患しやすいことが知られている．このような一種の免疫不全状態は，一般には特異的免疫能が未発達であることが原因であると考えられている．特にB細胞の分化能やT細胞の調節能の未熟性に関してはこれまでに繰り返し報告されている[10][11]．しかし，実際にはこれらの特異的な免疫能のみならず，発熱反応，急性期蛋白の誘導を初めとした炎症反応の発現が成人に比し弱いことが知られており[12]，この時期の易感染性との関連が示唆されている．IL-6 がB細胞分化誘導等の免疫能の調節に関与すること[1]，急性期蛋白の合成を誘導し[7][8]，さらに IL-1 等とともに中枢神経系に直接発熱因子として作用するなど[13]，免疫反応や炎症反応と深く関わることより，新生児期における IL-6 産生能とこの時期の免疫・炎症の特異性との関係が興味深い．本研究では新生児及び成人の IL-6 産生能を比較検討する目的で，全血培養下での各種刺激による IL-6 産生の誘導を試み，ことに菌血症の実験モデルとして IL-6 産生に及ぼす細菌添加による影響を見た．

対象および方法

Ⅰ．対　象

新生児臍帯血は，満期正常分娩児の胎盤側臍帯より，ヘパリン加採血した．成人末梢血は，25－35歳までの健康成人より，ヘパリン加静脈血を得た．

Ⅱ．培養条件の設定

1．全血培養法

ヘパリン加臍帯血ないし，成人末梢血をそれぞれ1 ml ずつポリプロピレン・チューブ (Falcon polypropylene, round-bottom tubes; Becton Dickinson & Co., Lincoln Park, NJ) に分注し，一定時間，炭酸ガス培養器にて37°C，5％ CO_2存在下で培養した．培養開始時に lipopolysaccharide (LPS, E. coli 026: B6; Difco Laboratories, Detroit, MI) 0.01-10μg/ml あるいは，concanavalin A (Con A, Difco) 0.08-50μg/ml を添加し，これら薬剤の IL-6 産生に及ぼす用量依存性を検討した．また，LPS 1μg/ml あるいは，Con A 10μg/ml を添加培養し，24時間までの IL-6 産生を経時的に検討した．

2．単核球分離培養法

ヘパリン加臍帯血ないし，成人末梢血より Ficoll-Hypaque Lymphoprep (Nycomed As, Oslo, Norway) を用いた比重遠心法により単核球を採取し，細胞数 $2X10^6$/ml に調節，ペニシリン 200U/ml，ゲンタマイシン 10μg/ml, 0.02M HEPES 緩衝液を含む RPMI1640 培養液 (Gibco Laboratories, Grand Island, NY) に浮遊した．これら分離単核球は10％非働化ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS), (三菱化成工業，東京あるいは，M. A. Bioproducts, Walkersville, MD) を添加，あるいは血清無添加で培養した．培養にはポリプロピレン・チューブを用い，全血培養と同様に LPS あるいは Con A を添加して IL-6 産生の誘導を検討した．なお，分離単核球培養に使用した FBS は，Limulus test により内毒素 (endotoxin) の検索で，いずれも検出感度以下であった (50pg/ml 以下)．

Ⅲ．IL-6 活性の測定

1．検体の処理

全血培養法では培養終了後，500G 10分間遠心，血漿部分を採取し，56°C30分間加熱により非働化処理を行った．さらに 500G 10分間遠心し，上清を採取，測定検体とした．分離培養法では，培養終了後，同様に遠心，上清を採取し，検体を得た．検体は測定時まで，－20°Cにて冷凍保存した．

2．IL-6 生物活性の測定

IL-6 の測定には，IL-6 依存性マウス・ハイブリドーマ・クローンである MH60. BSF2 (大阪大学細胞工学センター，平野俊夫，岸本忠三両博士より供与) に対する増殖促進効果[14]を指標として，以下のようなバイオ・アッセイを施行した．すなわち96穴平底プレート (Corning Glass Works, NY) に検体ないしレコンビナント IL-6 (recombinant IL-6, rIL-6，阪大細胞工学センター，平野，岸本博士より供与) の3倍希釈系列を作成した．MH60. BSF2 は継代3日目の対数増殖期にあるものを採取，洗浄し，IL-6 を含まない培養液中で6時間前培養した．培養終了後これらの細胞を洗浄，各穴に 1×10^4個ずつ分注した．プレートは炭酸ガス培養器にて48時間培養した．

MH60. BSF2 の増殖は,3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetorazolium bromide, (MTT, Sigma Chemical Co., St Louis, MO) を用いた比色定量法により行った[15]. すなわち，培養終了4時間前に MTT を燐酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) にて 5mg/ml に調節し，各穴に20μl ずつ分注した．培養終了後，プレートを 200G 5分間遠心し，上清を捨て余分な染色液や培養液をペーパータオルにて除去した．各穴に酸性化イソプロピルアルコール (0.04N HCl isopropyl alcohol) を100μl ずつ添加した．完全に色素が溶出してから，20μl のデタージェント溶液 (3% sodium dodecylsulfate 水溶液) を加え，550nm における吸光度を酵素免疫測定装置 (ELISA Analyser EAR400; SLT-Labinstruments, Salzburg, Austria) により測定した (図1)．IL-6 活性は rIL-6 により得られた標準曲線をもとに算出した．rIL-6 の特異活性は IL-6 反応性 Epstein-Barr ウイルス感染細胞株である SKW6-CL-4 を用いた検討で 5×10^6U/mg とされている．

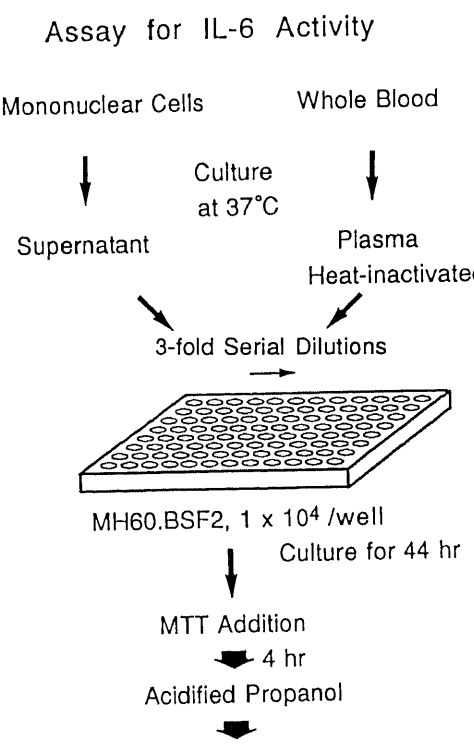

Fig. 1. Protocol for IL-6 colorimetric assay. Separated peripheral blood mononuclear cells (MNC) or heparinized whole blood were cultured at 37°C in polypropyrene tubes. Heat-inactivated plasma samples from whole blood cultures and supernatants from MNC cultures were studied for IL-6 activity. IL-6 dependent hybridoma clone, MH60. BSF2 cells (1×10^4/well) were cultured together with 3-fold dilutions of the samples for 48 hr. MTT dye was added for the final 4 hr and the optical density at 550 nm was measured by a spectrophotometer.

IV. 血清中 IL-6 活性の中和

培養上清中に認められる IL-6 活性の特異性を検討するために rIL-6 に対する家兎抗血清を使った中和実験を行なった．抗 rIL-6 家兎血清は阪大細胞工学センター，平野・岸本両博士より供与頂いた．被検検体を種々の濃度 (0-10μg/ml) の抗 rIL-6 家兎血清，あるいは非免疫対照家兎血清を添加して1時間37°Cにて培養した．これらの中和検体について前述のごとく IL-6 活性を測定した．

V. IL-6 産生細胞の免疫組織染色

家兎抗 rIL-6 抗血清 (May 博士より供与)[8]を用いた免疫組織染色により，IL-6 産生細胞を検討した[16]．全血培養後単核細胞を単離し，サイトスピン標本を作成した．標本を5%酢酸と95%エタノール混合液で，−20°C，30分間固定，0.05M トリス塩酸緩衝液 (Tris buffered saline, TBS) にて三回洗浄，TBS にて100倍に希釈した抗 IL-6 抗体により60分間染色した．さらに，アルカリフォスファターゼ標識ブタ抗家兎 IgG (Tago Inc., Burlingame, CA) にて二次染色後，アルカリフォスファターゼ標識ブタ抗ヤギ IgG (Tago) を用いて三次染色を行なった．最後に，AS-MX 及び Fast Red TR salt (Sigma) を含むアルカリフォスファターゼ基質により発色した[17]．さらに，カラッチヘマトキシリン染色液により核染色を行なった．

VI. 細菌刺激による IL-6 産生

1．各種細菌の調整

細菌は，大腸菌 (*Escherichia coli,* NIHJ JC-2) と臨床分離保存株であるリステリア菌 (*Listeria monocytogenes,* 髄液)，B群溶連菌 (Group B *Streptococcus,* 血液)，肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae,* 血液) を使用した (金沢大学医学部付属病院中央検査部，藤田信一先生より提供)．

各菌を平板培地より採取し，液体培地を使って増菌した．液体培地には，大腸菌，リステリア菌，B群溶連菌については L. broth 〔Tryptone (Difco) 5g, Yeast Extract (Difco) 2.5g, NaCl 5g を pH 7.4 に調節し，500ml の蒸留水に溶解したもの〕を使用し，肺炎球菌については brain heart infusion broth (Difco) を使用した．菌は，PBS で3回洗浄後再浮遊

して菌体濃度を調節した．菌数はマックファラントの硫酸バリウム基準液を用いた比濁法[18]により 1×10^8-1×10^9/ml に調節した．この方法は計算板法，あるいは吸光度計を用いた菌数定量法[19]とよく相関した．

2．死菌の調節

各種細菌を0.5%ホルマリン (0.5% formaldehyde in 0.15 M-NaCl) にて24時間固定し，PBS にて3回洗浄して，死菌を作成した[20]．処理後の各菌を平板培地に接種して，コロニーの形成の認められないことを確認した (生菌率 $1/10^6$ 以下)．

3．細菌添加による IL-6 産生の誘導

ヘパリン加全血に種々の濃度の生菌あるいはホルマリン処理死菌を添加12時間培養後血漿を得，検体を56°C，30分間加熱，非働化して，0.45μm 異物濾過フィルターマイクレス HA (日本ミリポアリミテッド，東京) にて濾過し，測定検体とした．

Ⅶ．補体処理ザイモザン，あるいはラテックス粒子による IL-6 産生の誘導

1．補体処理ザイモザンならびにラテックス粒子の調節

ザイモザン (Zymosan A, Sigma) は，PBS に浮遊し超音波処理 (Branson, B-220) により粒子を均一化した．この浮遊液を100°Cで1時間加熱し，ゼラチンベロナール緩衝液 (gelatin veronal buffer, GVB) で洗浄後，2×10^8/ml に調節し，さらに等量の GVB で5倍希釈した新鮮ヒト血清と混合，37°C30分間反応後，PBS で3回洗浄した[21]．ラテックス粒子 (Sigma, polystyrene, 直径1.091μm) は，PBS に浮遊し，ザイモザンと同様，超音波処理により粒子を均一化，100°C1時間加熱し，10^9/ml に調節した．

2．貪食刺激による IL-6 産生の誘導

ヘパリン加静脈血検体をポリプロピレン・チューブに分注し，種々の濃度 (10^1/ml-10^8/ml) に調節した補体処理ザイモザン，あるいはラテックス粒子を添加して培養した．培養開始12時間後に上清を採取，IL-6 活性を測定した．さらに添加した粒子濃度と貪食能との関連を検討するために，分離単核球を 2×10^6/ml に調節，補体処理ザイモザンあるいはラテックス粒子を加えて培養し，2時間後に細胞を洗浄，サイトスピン標本をスライドグラス上に作成した．標本はメイ・ギムザ染色を施行し，光学顕微鏡を用いて粒子を貪食している単球の比率を算定した．貪食能の検討には対照としてリステリア死菌を用いた．

成　　績

Ⅰ．全血培養法における IL-6 産生

1．全血培養法ならびに分離単核球培養法の比較 (表1)

全血培養法が IL-6 活性を測定する上で，有用な方法であるかを検討するために，成人末梢血を用い，従来から使用されてきた分離単核球培養法と比較し，以下の結果を得た．分離単核球を培養した場合には，特定の刺激を加えることなしに培養上清中に IL-6 活性が誘導された．このような IL-6 活性の誘導は FBS 添加培養において著明に増強された．特に，FBS I を含む培養液を用いた場合には LPS あるいは Con A の添加なしで，200U/ml 弱の IL-6 活性の誘導が観察された．これに対して FBS を使用しない場合には，非刺激下の IL-6 産生は 10U/ml 以下であった．このように，分離単核球培養法では非刺激下で有意な IL-6 活性が誘導され，さらに FBS の添加により増強されることが明らかとなった．

Table 1. IL-6 production in different culture condition

Stimulants	IL-6 Activity (U/ml)			
	Separated MNC			Whole blood
	None	FBS I	FBS II	
None	8.1(2.61)†	192.5(1.62)‡	62.3(1.46)‡	0.1(1.48)
LPS	107.1(1.62)	352.2(1.21)	298.7(1.03)	200.1(1.44)
Con A	222.8(1.10)‡	275.9(1.32)	304.2(1.50)†	63.0(1.07)

Mononuclear cells (MNC) isolated from adult peripheral blood were suspended in culture medium with or without FBS: results with two different FBS lots (FBS I or FBS II) are shown. Whole blood or MNC were cultured either in presence or absence of LPS (1 μg/ml) or Con A (10 μg/ml) for 12 hr and the supernatants from MNC cultures or plasma from whole blood cultures were examined for IL-6 activity. The results represent the geometric means ×/÷ geometric SEM of three separate experiments; statistical significance was determined by *t* test. The values were compared with the data from whole blood cultures.

一方，ヘパリン加全血を用いて培養する場合には非刺激下では IL-6 産生は，ほとんど誘導されなかった (0.1U/ml 以下)．しかし，LPS, Con A 等を添加して培養した場合には著明な IL-6 活性を認め，分離単核球を用いた場合に匹敵するレベルであった．よって，全血培養法は LPS 及び Con A により刺激して IL-6 活性を測定するための培養条件としては最適な方法であると考えられた．

2．抗 rIL-6 家兎血清を用いた IL-6 活性の中和

全血培養法により血漿中に誘導された MH60. BSF2 の増殖活性における IL-6 活性の特異性を検討するために抗 rIL-6 血清を用いた中和実験を施行した．rIL-6 の MH60. BSF2 増殖促進活性は，抗 rIL-6 血清により完全に抑制された (図 2 A)．さらに，被検血清 (LPS 刺激培養の上清) 中の IL-6 活性は抗 rIL-6 家兎血清による前処理により完全に消失した．これに対して，対照とした非免疫家兎血清を用いて処理した場合には全く抑制が認められなかった (図 2 B)．これらより，全血培養法において培養後血漿中に認められる IL-6 活性は，特異的に IL-6 によるものであることが明らかとなった．

3．LPS, Con A 刺激による IL-6 産生の用量依存性

種々の濃度の LPS あるいは Con A を用いて IL-6 産生における用量依存性を検討した．LPS 刺激では，きわめて低濃度 (10pg/ml) ですでに IL-6 産生の誘導が認められ，10ng/ml でほぼ最大量に達した (図 3 A)．Con A 刺激では，添加した Con A の用量に従い産生される IL-6 の量は増加した (図 3 B)．

4．免疫組織染色を用いた IL-6 産生細胞の同定

全血培養後に単核球を分離し，抗 rIL-6 抗体を用いた免疫組織染色により IL-6 産生細胞の同定を試みた．非刺激培養では細胞質内に IL-6 を示す染色は全く認

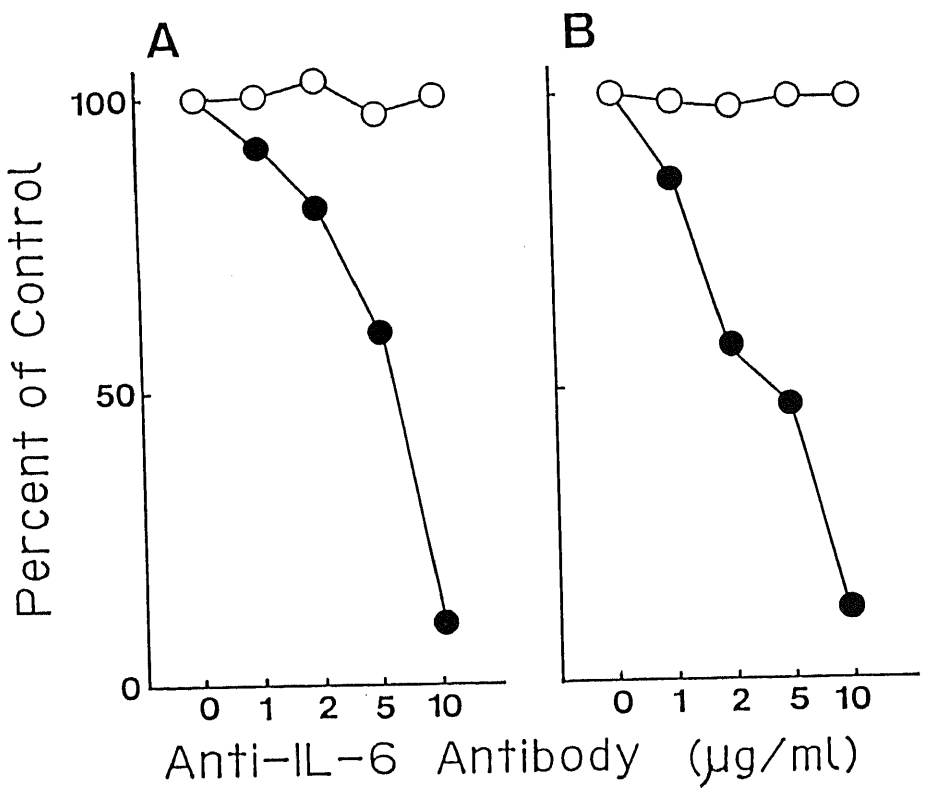

Fig. 2. Neutralization of IL-6 activity induced in the whole blood culture with anti-rIL-6 antiserum. Recombinant IL-6 (A) and plasma sample from adult peripheral blood culture (B) were incubated with various concentrations of rabbit anti-rIL-6 antiserum (●—●) or non-immune rabbit serum (○—○) at 37°C for 1 hr, and the residual IL-6 activity was assayed.

められなかった．これに対して，LPS，あるいは Con A により刺激した場合には細胞質内に顆粒状に染色される IL-6 の産生が明らかに認められた（図 4）．さらに，リンパ球様の形態を示す細胞には全く IL-6 産生は認められず，単球様細胞にのみこのような顆粒が認められた．図には成人末梢血を用いた標本を示すが，臍帯血を用いた場合も同様に染色された．以上，全血培養法では主として単球において著明な IL-6 産

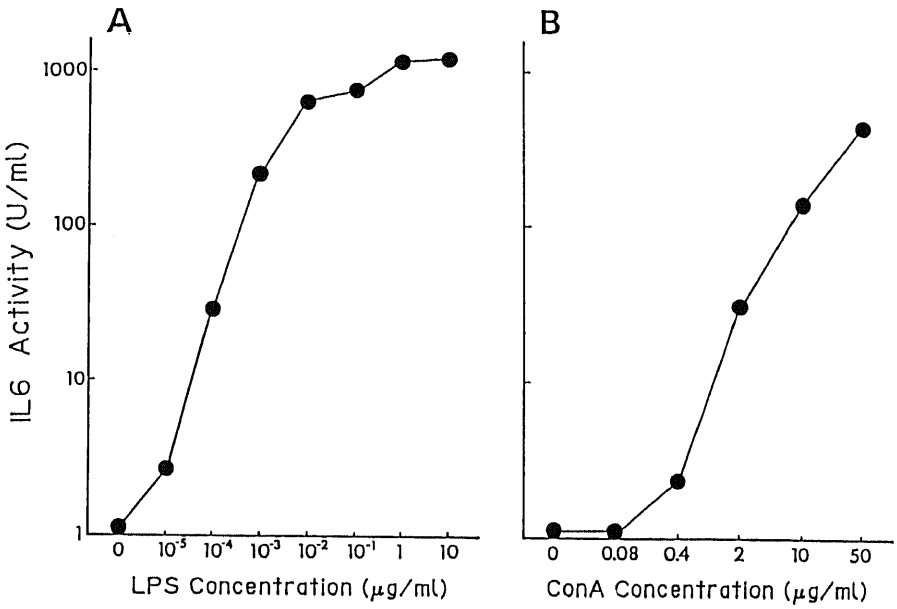

Fig. 3. Dose-response curves of IL-6 production induced by LPS or Con A. Heparinized adult peripheral blood was stimulated with indicated doses of LPS (A) or Con A (B) for 12 hr. The data represent the geometric means of 5 separate experiments.

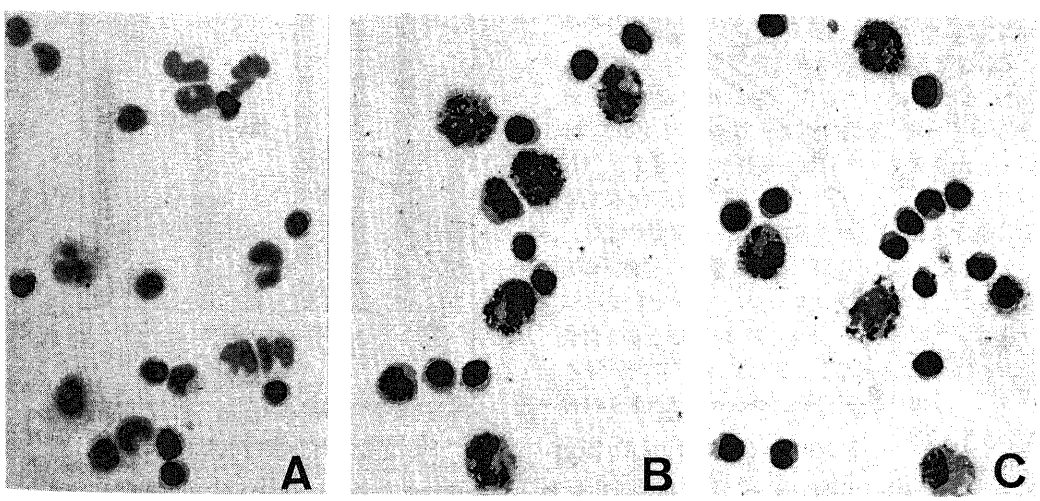

Fig. 4. Immunocytochemical identification of IL-6-producing cells in whole blood cultures. MNC from whole blood cultures, incubated either without LPS (A) or with LPS (B) or Con A (C) for 12 hr were stained for intracellular IL-6 protein using enzyme-labelled antibody.

生が誘導されることが明らかとなった．

II．新生児臍帯血の LPS および Con A 刺激による IL-6 産生

1．IL-6 産生の経時的変化

新生児臍帯血を用いて，LPS あるいは Con A 刺激による IL-6 産生を成人末梢血と比較検討した．まずこれらの刺激による IL-6 産生の経時的変化を見た．いずれの刺激においても，培養開始後2時間ですでに血漿中に IL-6 産生の誘導を認めた．IL-6 活性はこの後急速に増加，12時間でプラトーに達し，24時間後の IL-6 活性はほとんど変化を認めなかった．また，経時的変化において，新生児臍帯血と成人末梢血はほとんど同様であった（図5）．したがって，以下の実験では12時間全血培養後の血漿を採取，測定検体とした．

2．LPS ならびに Con A 刺激による IL-6 産生誘導の比較

新生児臍帯血と成人末梢血いずれにおいても非刺激培養では IL-6 産生の誘導は全く認められなかった．これに対して LPS (1 μg/ml) あるいは Con A (10 μg/ml) を添加して培養した場合には著明な IL-6 産生が認められ，産生された IL-6 量には有意差は認められなかった（表2）．これにより，レクチンあるいは LPS 刺激などによる IL-6 産生は新生児期には成人レベルに達していると考えられた．

III．細菌刺激による IL-6 産生

先の実験で用いた LPS 及び Con A は精製され，抽出された非特異的な刺激物質であり，実際の細菌感染症においてはさらに複雑な要素が関係してくると考えられ，新生児の感染時の IL-6 産生能をこれだけでは評価できない．そこで，新生児期に罹患しやすい大腸菌，リステリア菌，B群溶連菌，及び対照として肺炎球菌の生菌あるいは死菌を用いて，IL-6 産生の誘導を検討した．

1．新生児臍帯血と成人末梢血における生菌刺激による IL-6 誘導

Table 2. Induction of IL-6 production in neonatal cord blood and adult peripheral blood on stimulation

	IL-6 Activity (U/ml)	
Stimulants	Neonate (n=7)	Adult (n=6)
None	<0.1	<0.1
LPS (1 μg/ml)	1,193 (1.17)	1,419 (1.23)
Con A (10 μg/ml)	217 (1.18)	176 (1.49)

Neonatal cord blood and adult peripheral blood were cultured for 12 hr in the presence of LPS or Con A. The results represent the geometric means ×÷ geometric SEM.

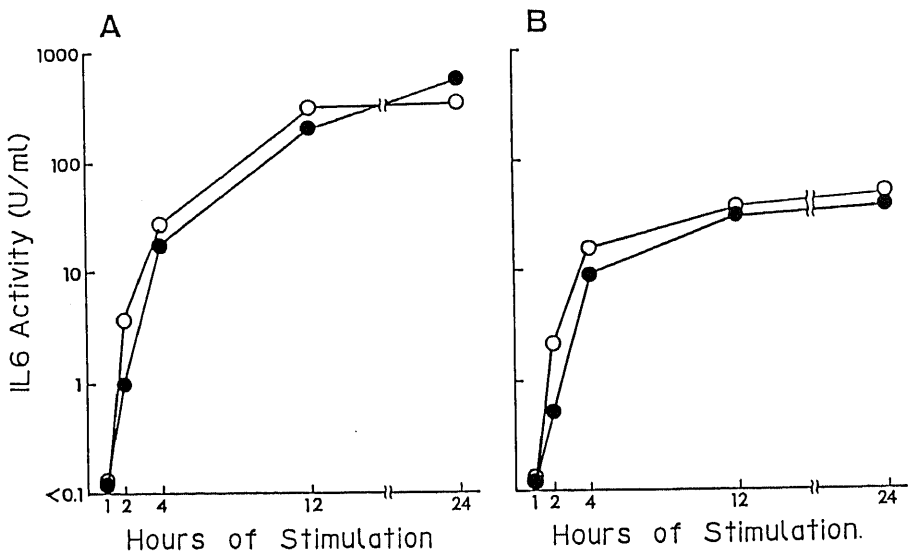

Fig. 5. Kinetics of IL-6 production in whole blood culture. Heparinized adult peripheral blood (●—●) or cord blood (○—○) was stimulated with 1 μg/ml of LPS (A) or 10 μg/ml of Con A (B). The data represent the geometric means of 3 separate experiments.

新生児臍帯血と成人末梢血に各生菌を 10^2/ml 並びに 10^6/ml の濃度で添加12時間培養し，IL-6 産生を比較した．いずれも菌濃度 10^6/ml においては高い IL-6 産生を認め，菌種による差をほとんど認めなかった．10^2/ml においては，リステリア菌，肺炎球菌ではほとんど IL-6 産生を認めなかったが，大腸菌ではまだかなり高い IL-6 産生を示した．新生児臍帯血と成人末梢血の比較では同様な傾向または新生児臍帯血の方がやや高い傾向を示した．菌体濃度 10^2/ml, 10^6/ml いずれを用いた場合も同様であった (図 6)．

2．細菌刺激における IL-6 産生のメカニズムの解明

生菌を使い，新生児臍帯血と成人末梢血の IL-6 産生について検討したが，生菌では培養中に増加した菌数による影響，産生された毒素，菌の貪食，菌体成分そのものによる影響など様々な因子が IL-6 産生に働いていると考えられる．これらの効果が IL-6 にどのように影響するかを検討した．

1）死菌刺激による IL-6 産生

ホルマリン処理により死菌を作成し，死菌と生菌による IL-6 産生の用量依存性を比較検討した．死菌を用いた場合には肺炎球菌，B群溶連菌，リステリア菌でほぼ一様な用量依存性曲線を示した．すなわち，10^4/ml 以下ではほとんど IL-6 産生の誘導が認められず，10^5/ml 以上の濃度で用量依存性に IL-6 産生は増加した．産生量は生菌を使用した場合と死菌を用いた場合でほとんど差を認めず，また菌の種類による差も認めなかった．これに対して，大腸菌では生菌を用いた場合と同様，極めて低濃度から著明な IL-6 産生の誘導が観察され，産生量も他の菌に比し，高値を示した (図 7)．

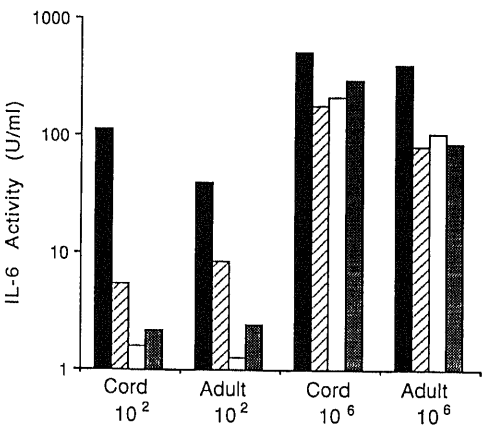

Fig. 6. IL-6 production by cord blood and adult peripheral blood in response to bacteria. Heparinized whole blood was cultured with different bacterial preparations. Two different doses (10^2/ml and 10^6/ml) were used for each bacterial strain. The bacterial strains used were E. coli (■), GBS (▨) Str. pneumoniae (□) and L. monocytogenes (▩).

2）補体処理ザイモザン，あるいはラテックス粒子貪食による IL-6 産生の誘導

最初に分離単核球を用いて，単球による貪食の粒子濃度による変化を検討した．分離単核球浮遊液に，種々の濃度の補体処理ザイモザンあるいはラテックス粒子を添加し2時間培養，スライドグラス上に塗抹標本を作成し染色，単球中のこれら粒子を貪食している比率，並びに細胞あたりの貪食粒子数を求めた．リステリア菌は貪食された後も比較的長く胞体内に残存することから，これを死菌処理し，貪食の対照とした (図 8)．貪食単球の比率と添加粒子濃度の関係を検討すると，いずれを用いた場合も 10^5/ml では単球による貪食はほとんど認められなかった．10^6/ml より貪食が観察されはじめ，10^8/ml ではほとんどの単球が粒子を貪食していた．また，図には示さないが，補体処理ザイモザン及びラテックス粒子を用いて細胞あたりの貪食粒子数の分布を検討すると，貪食単球の比率のみならず，単球一個あたりの平均貪食粒子数も粒子濃度依存性に増加することが示された．

次にこれら貪食刺激による IL-6 産生を全血培養法で検討した．補体処理ザイモザン，あるいはラテックス粒子による刺激では，貪食が観察される粒子濃度 (10^6/ml) において初めて IL-6 産生が誘導され，それ以上では用量依存性の IL-6 産生が認められた．これに対して，リステリア菌，肺炎球菌及びB群溶連菌の死菌では貪食刺激に対して 10^3-10^4 倍，大腸菌では 10^6-10^7倍の効率で IL-6 産生の誘導が観察された (図 9 A)．なお新生児臍帯血においても成人末梢血と同様な結果を示した (図 9 B)．

以上の結果から，細菌刺激による IL-6 産生においては培養中の増菌の影響，産生された毒素による影響は少ないと考えられた．また菌の貪食による刺激効果だけではその IL-6 産生のすべてを説明することができず，それ以外に抗原としての菌体成分そのものの影響が大きいと考えられた．

考　　察

単球/マクロファージは感染や炎症の際に活性化され，貪食，殺菌，異物の処理などの作用の他に，炎症反応を修飾する様々の生理活性物質を産生する．これ

らの物質の中には，インターロイキン 1 (interleukin 1, IL-1) や腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor, TNF) などが知られている．IL-6 は生体内の多種の細胞に対して，多様の生理活性を有するサイトカインとして知られ，末梢血液中では主として，単球/マクロファージにより産生され[5][6]，IL-1, TNF 等と共に炎症反応に関与するモノカインであることが明らかにされつつある．

単球はプラスチック面に付着したり，培養上清中の異物の刺激により容易に活性化されること[22][23]，またごく微量のエンドトキシン (LPS) の存在が単球を活性化し，IL-1, TNF 等のモノカイン産生を誘導することが知られている[24]．さらに，IL-6 産生も単球/マイクロファージ，あるいは線維芽細胞や内皮細胞を微量の LPS で刺激することにより容易に誘導される[25][26]．特定の刺激により誘導される生理活性物質の産生を正し

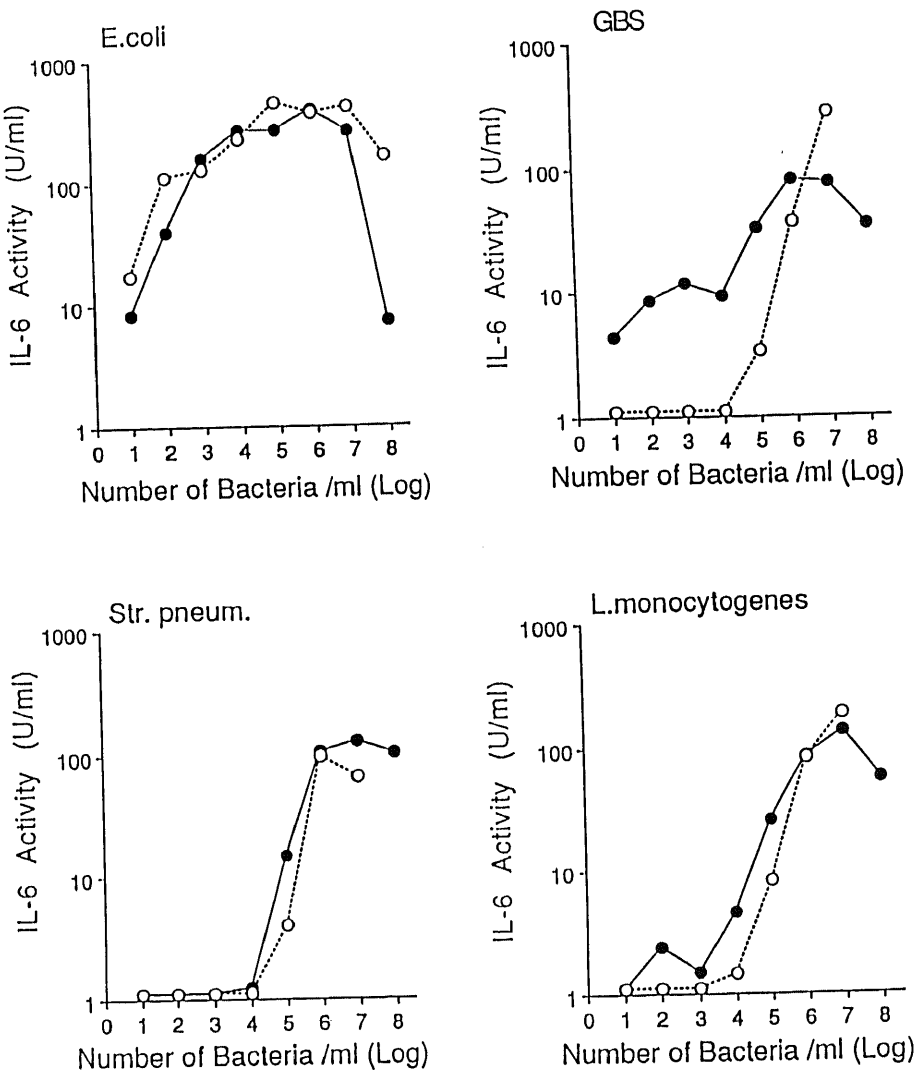

Fig. 7. IL-6 production in response to live and killed bacteria. Heparinized adult peripheral blood was cultured in the presence of different bacterial preparations, Str. pneumoniae, E. coli, L. monocytogenes and GBS. Each bacteria were used either as live (●—●) or killed (○—○) preparations Plasma samples were heat-inactivated and filtered through 0.45 μ m membrane filters and assayed for IL-6 activity. Representative data are shown in the figure.

く評価するためには，非刺激下でこれら蛋白の産生が極めて低値であることが望ましいが，細胞培養においては痕跡程度の LPS の混入や，細胞分離操作，培養プラスチック容器への細胞の付着など種々の要因により非特異的刺激が加わりやすい．今回の単核球分離培養法においても，LPS や Con A による刺激を加えることなしにすでに著明な IL-6 産生を認めており，特に培養液中に FBS が含まれている場合には顕著となった．FBS を用いない場合にも IL-6 産生が認められたこと，また Limulus test による検索では FBS 中に混入する LPS の量は極めて低値であった (50pg/ml 以下) ことなどより，非刺激培養で観察される IL-6 産生は単核細胞分離操作による物理的刺激，培養チューブへの単球の付着，培養液中に含まれる FBS 等の異種蛋白による刺激等，種々の要因が関係していると考えられた．一方，全血培養法を用いた場合には，非刺激下では IL-6 産生はほとんど認められず，LPS あるいは Con A 刺激による IL-6 産生の誘導も，分離単核球を用いた場合に匹敵した．また全血培養法は生体での単球，リンパ球等の免疫担当細胞の免疫応答を知る上で生体により近い実験系として有用と考えられる．

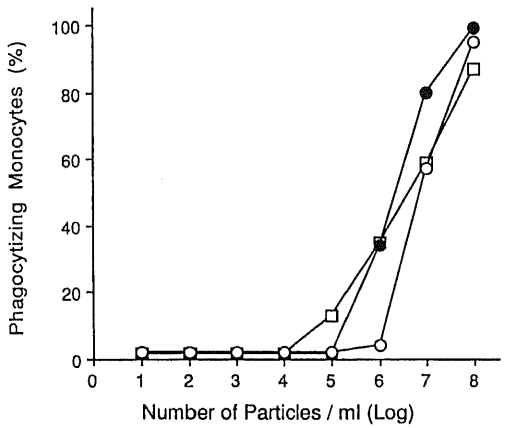

Fig. 8. Relation between particle concentrations in the culture and the degree of phagocytosis. Separated mononuclear cells were incubated with various numbers of opsonized zymosan (●), latex (○) or killed L. monocytogenes (□) for 2 hr. Cytospin preparations were stained and examined for the phagocytizing monocytes. Representative data are shown in the figure.

分離単核細胞中には単球の他にリンパ球が多く含まれており，これまでにT細胞が IL-6 産生に関わるとする報告がある[27]．しかし，培養単核細胞中の IL-6 産生細胞に関しては，家兎抗 rIL-6 抗血清を用いた免疫組織染色にて，LPS あるいは Con A で刺激した場合に IL-6 がリンパ球様細胞には染色されず，単球様細胞のみに染色されたことより，単球が IL-6 産生細胞であることが示された．また Kato ら[5]は免疫蛍光染色と *in situ* ハイブリダイゼーション法を併用して，単球が主たる IL-6 産生細胞であることを証明してお

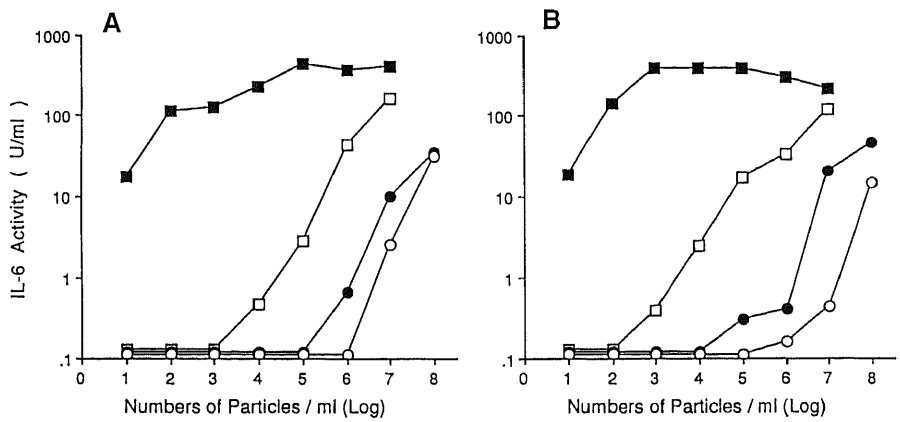

Fig. 9. IL-6 production induced by various particles. Heparinized adult peripheral blood (A) or cord blood (B) was stimulated with various concentrations of E. coli (■), killed bacteria (L. monocytogenes, GBS and Str. pneumoniae) (□), opsonized zymosan (●) or latex (○) and the IL-6 production induced in the cultures were assayed. Results represent the geometric means of three separate experiments.

り，少なくとも培養開始早期においては，主要なIL-6産生細胞は単球/マクロファージであると考えられた．さらに，全血培養法の場合には，好中球を初めとした多核白血球によるIL-6産生の可能性も考慮しなければならない．予備実験では，ヘパリン加全血より分離された好中球によるIL-6産生はほとんど認められなかった(0.2U/ml以下)．これらの結果より，全血培養法は特定の刺激により誘導される単球のIL-6産生能を評価するためには，極めて優れた方法であると考えられた．

LPSおよびCon Aを用いてIL-6産生の経時的変化を検討すると，培養開始後極めて早期にIL-6産生が誘導されることが明らかとなった．一般にモノカイン産生は培養を開始して数時間で認められることが知られており[24]，今回の結果と一致した．さらに，Katoら[5]は刺激培養後のIL-6 mRNA発現の経時的変化について検討し，IL-6 mRNAの発現が培養開始約1時間後に明らかとなり，4時間後には最大値に達すると報告しており，血漿中のIL-6活性の経時的変化と符合する．

急性炎症や感染症において単球/マクロファージ，あるいはそれにより産生される種々の蛋白が重要な役割を果たすことは知られているが，Uenoら[9]は種々の細菌感染症で血清中にIL-6活性が検出されること，細菌性髄膜炎における髄液中など炎症の局所においてIL-6が極めて高い値を示し，さらにHelfgottら[28]も急性細菌感染症において，血清や体液中で高いIL-6産生を認めたと報告しており，細菌感染症の際にIL-6産生の強い誘導が起こる可能性を示した．今回用いた全血培養法は，このような細菌感染症，特に敗血症のモデルとなり，比較的生体内に類似した培養条件でIL-6産生を評価することが可能であると考えられた．

新生児期は種々の細菌感染に対する抵抗が弱く，かつ重症化しやすいこと，またこの時期は大腸菌，リステリア菌，B群溶連菌など比較的限られた種類の菌に対して感受性が高い[29]ことが知られている．本研究では，全血培養系にこれらの細菌ならびに肺炎球菌を添加して，IL-6産生を検討した．細菌刺激によるIL-6産生の誘導には，単球へのこれら細菌の付着，貪食，殺菌あるいは消化など多種の要素が関与している[30][31]と考えられる．生菌を用いた場合には大腸菌を除いた他の菌ではほぼ同様に10^6/mlで最大のIL-6活性が誘導された．一方，大腸菌を用いた場合には極めて低い菌体濃度でもIL-6産生が認められ，菌体あるいは浮遊液中に含まれるLPSの影響が大きいと考えられた．LPSを用いた場合には単球に発現されるLPS受容体を介した結合の他に，急性期蛋白の一つとされるLPS結合蛋白(lipopolysaccharide binding protein)の存在[32]も知られており，これらにより単球へのLPS結合が強化され，IL-6産生はさらに増強されると考えられる．一方，B群溶連菌を添加した場合には比較的低濃度でもIL-6産生が観察されることより，今回用いた全血培養系では培養中にB群溶連菌の増菌が起こっている可能性が考えられた．事実，死菌を用いた場合には大腸菌以外のリステリア死菌，肺炎球菌死菌などと同様の用量依存性を示しており，これらのグラム陽性菌に関しては添加した菌体量と，誘導されるIL-6活性はほぼ一定の関係にあると推察された．しかし，大腸菌の死菌を用いた場合はそのIL-6産生誘導における用量依存性は生菌を用いた場合と変化がなく，低濃度の菌量におけるIL-6産生は菌体数の増加によるものではなく，むしろ混在するLPSの効果と考えられた．

単球はプラスチック面への付着，あるいは粒子を貪食することにより活性化され，種々の生理活性物質を産生することが知られている[20][21]．グラム陽性各菌によるIL-6産生の誘導には細菌の単球への付着，さらには単球による貪食の他に，殺菌あるいは消化にいたる一連の過程が関連していると考えられる．このうち，付着，貪食のモデルとして補体処理ザイモザンおよびラテックス粒子を用いてIL-6産生の誘導を検討した[33]．粒子を貪食する単球の比率は多少の差は認めるが，補体処理ザイモザン，ラテックス粒子，あるいはリステリア死菌を用いた場合でほぼ同様の用量依存性を示した．すなわち，10^6/mlで初めて貪食が観察され，10^8/mlではほぼすべての単球に貪食が観察された．このことは，粒子の種類に関わらず，粒子数/細胞数比により貪食率がほぼ決定されることを示す．さらに，補体処理ザイモザンならびにラテックス粒子を用いた検討では，添加する粒子数の増加に伴い，貪食細胞の比率のみならず，単球一個あたりの平均貪食数も増加することが示された．

これらの貪食刺激によるIL-6産生の誘導をこれまでと同様に全血培養法により検討した．補体処理ザイモザンあるいはラテックス粒子を用いた場合には貪食細胞の観察される粒子濃度，すなわち10^6/mlで初めてIL-6産生が認められ，10^8/mlで最大に達した．また，貪食が全く認められない10^5/ml以下の粒子濃度では，IL-6産生は認められなかった．すなわち，これら貪食刺激を用いた場合には，粒子と細胞との直接接触の後に起こる付着や貪食が直接の刺激となって，そ

の程度に比例して IL-6 産生が誘導されると考えられた．これに対して，リステリア死菌を初めとするグラム陽性菌を使用した場合には約1/100の濃度で同様の IL-6 産生が誘導されており，これら細菌を用いた場合には貪食以降の殺菌，消化などの細胞内処理機構[32]及び抗原としての菌体そのものの刺激がモノカイン産生能の増幅に関与している可能性が示唆された．また先に示したように，大腸菌はこれらグラム陽性菌に比し，さらに低濃度で IL-6 産生を誘導し，その比活性はザイモザン，ラテックスの百万倍以上に達した．

新生児期における易感染性の原因としては，個体がまだ外来抗原にさらされておらず，B細胞分化能やT細胞による調節能など，特異免疫能が未発達であることがその原因の一つとして考えられている[10][11]．また一般には，単球/マクロファージの機能はほぼ正常であるとされているが，その遊走能が成人に比し劣るとの報告もある[33]．さらに，新生児では急性期蛋白の合成や，発熱反応など，炎症反応が乏しいとされており[12]，この時期における重症感染症の診断を困難にしている．IL-6 はB細胞分化やT細胞機能の調節など特異免疫能を調節すること[2][3]，急性期蛋白の誘導など急性炎症反応に関与していることなど[7][8]生体の防御機構の調節に重要な役割を果たしていると考えられている．従って，新生児期における IL-6 産生能を検討することは，この時期における免疫能の特徴を知る上で興味深いと考えられた．

今回の研究では LPS あるいは Con A による刺激のみならず，種々の細菌による刺激でも新生児臍帯血による IL-6 産生は成人末梢血と差を認めなかった．Speer ら[35]は新生児単球における貪食能を種々の観点から検索し，付着能，遊走能，殺菌能，活性酸素産生能，貪食能，化学発光などすべての単球機能が成人に匹敵しており，単球機能の未熟性により新生児期の易感染性を説明できないとしている．さらに，English ら[36]は新生児単核球によるリンホトキシンあるいは TNF の産生を検討し，新生児において TNF の産生がやや低いものの著明ではなく，それにより新生児期の易感染性を説明できるものではないとしている．今回の研究でも IL-6 産生能は刺激の種類によらず，成人に匹敵するレベルに達しており，これらの単球機能は生下時にはほぼ成熟していると考えられた．しかし，Weatherstone ら[37]は，未熟児において TNF 産生が有意に低いとする報告をしており，胎生の極めて早期においては他のモノカイン産生も低下している可能性がある．筆者が検索した胎生35週前後の未熟児数例では IL-6 産生は正常に認められたが，29週の一例では IL-6 産生は極めて低値であった．これらの事実より，特異免疫能の発達に比し，単球による IL-6 産生能は胎生早期に完成し，生下時にはほぼ成熟している可能性が強く示唆された．しかし，この点を明らかにするためには胎生30週未満の未熟児症例についてさらに検討を重ねる必要がある．

結　　論

全血培養法を用いて，成人末梢血及び新生児臍帯血の IL-6 産生能を検討し，以下の結論を得た．

1．全血培養法は，非刺激下でほとんど IL-6 産生が誘導されず，特定の刺激による IL-6 産生の誘導を評価するには有用な方法であることが示された．

2．LPS, Con A 刺激による IL-6 産生の経時的変化及び用量依存性について検討し，LPS 1μg/ml あるいは，Con A 10μg/ml 添加で，12時間培養により，十分な IL-6 産生が認められた．

3．大腸菌，リステリア菌，B群溶連菌，肺炎球菌の生菌あるいは死菌を使い，全血培養法にて，IL-6 産生を検討した．大腸菌は低濃度で IL-6 産生を誘導し，LPS による効果が大であると考えられた．他の3菌においては，菌体量と IL-6 産生量に一定の関係があると推察された．

4．補体処理ザイモザン及びラテックス粒子を用いた場合には，貪食率においては死菌とほとんど差を認めなかったが，IL-6 産生は死菌の方がより低い粒子濃度で IL-6 産生を誘導した．従って，細菌における IL-6 産生の誘導に貪食以外の因子が関与している可能性が示唆された．

5．臍帯血は LPS, Con A のみならず種々の細菌刺激においても成人末梢血と同様な IL-6 産生を認めた．従って，IL-6 産生能は新生児期にすでに成人レベルに達していると考えられた．

謝　　辞

稿を終えるにあたり，御指導と御校閲を賜りました恩師谷口昻教授に深謝致します．また直接御指導頂きました宮脇利男講師，横井透助手，谷内江昭宏助手をはじめ，終始研究に御協力頂きました小児科免疫グループの諸兄ならびに教室員の皆様方に感謝致します．大腸菌，リステリア菌，B群溶連菌，肺炎球菌を供与して頂き，また適切な助言もして頂きました本院中央検査部，藤田信一先生と中央検査室の皆様方に深く御礼申し上げます．さらに快く新生児臍帯血を御提供下さいました金沢聖霊病院産科，大下陸郎先生に深謝致します．最後に MH60. BSF2, rIL-6, 抗 rIL6 抗血清を供与して頂きました大阪大学細胞工学センター，平野俊夫博士，岸本忠三博士に深く御礼申し上げます．

なお，本研究の一部は文部省科学研究費，厚生省特定疾患免疫不全症候群調査研究費，上原記念生命科学財団研究助成

金によったことを付記する．本論文の一部は第18回日本免疫学会総会 (1988)，第92回日本小児科学会学術集会 (1989) において発表した．

文 献

1) **Kishimoto, T. & Hirano, T.:** Molecular regulation of B lymphocyte response. Ann. Rev. Immunol., **6,** 485-512 (1988).

2) **寺西 強:** B細胞の分化・増殖に関与するサイトカイン．臨床免疫，**20,** 1-10 (1988).

3) **Hirano, T. & Kishimoto, T.:** Interleukin-6 (IL-6). *In* M. B. Sporn & A. B. Roberts (eds.), Handbook of Experimental Pharmacology "Peptide Growth Factors and Their Receptors". Springer-Verlag, Berlin, in press.

4) **審良静男:** IL-6 産生細胞と遺伝子発現．実験医学，**7,** 21-26 (1989).

5) **Kato, K., Yokoi, T., Takano, N., Kanegane, H., Yachie, A., Miyawaki, T. & Taniguchi, N.:** Detection by *in situ* hybridization and phenotypic characterization of cells expressing IL-6 mRNA in human stimulated blood. J. Immunol., in press.

6) **Bauer, J., Ganter, U., Geiger, T., Jacobshagen, U., Hirano, T., Matsuda, T., Kishimoto, T., Andus, T., Acs, G., Gerok, W. & Ciliberto, G.:** Regulation of Interleukin-6 expression in cultured human blood monocytes and monocyte-derived macrophages. Blood, **72,** 1134-1140 (1988).

7) **Darlington, G. J., Wilson, D. R. & Lachman, L. B.:** Monocyte-conditioned medium, interleukin-1 and tumor necrosis factor stimulate the acute phase response in human hepatoma cells *in vitro*. J. Cell Biol., **103,** 787-793 (1986).

8) **May, L. T., Ghrayeb, J., Santhanam, U., Tatter, S. B., Sthoeger, Z., Helfgott, D. C., Chiorazzi, N., Grieninger, G. & Sehgal, P. B.:** Synthesis and secretion of multiple forms of β_2-interferon/B-cell differentiation factor 2/hepatocyte-stimulating factor by human fibroblasts and monocytes. J. Biol. Chem., **263,** 7760-7766 (1988).

9) **Ueno, Y., Takano, N., Kanegane, H., Yokoi, T., Yachie, A., Miyawaki, T. & Taniguchi, N.:** The acute phase nature of interleukin 6; studies in Kawasaki disease and other febrile illnesses. Clin. Exp. Immunol., **76,** 337-342 (1989).

10) **Yachie, A., Miyawaki, T., Nagaoki, T., Yokoi, T., Mukai, M., Uwadana, N. & Taniguchi, N.:** Regulation of B Cell differentiation by T cell subsets defined with monoclonal OKT4 and OKT8 antibodies in human cord blood. J. Immunol., **127,** 1314-1317 (1981).

11) **Miyawaki, T., Moriya, N., Nagaoki, T. & Taniguchi, N.:** Maturation of B-cell differentiation ability and T-cell regulatory function in infancy and childhood. Immunol. Rev., **57,** 61-87 (1981).

12) **Bellanti, J. A., Boner, A. L. & Valletta, E.:** Immunology of fetus and newborn. *In* G. B. Avery (ed.), Neonatology, 3rd ed. p850-873, J. B. Lippincott Co, Philadelphia, 1987.

13) **Wong, G. G. & Clark, S. C.:** Multiple actions of interleukin 6 within a cytokine network. Immunol. Today, **9,** 137-139 (1988).

14) **Matsuda, T., Hirano, T. & Kishimoto, T.:** Establishment of an interleukin 6 (IL-6)/B cell stimulatory factor 2-dependent cell line and preparation of anti-IL6 monoclonal antibodies. Eur. J. Immunol., **18,** 951-956 (1988).

15) **Green, L. M., Reade, J. L. & Ware, C. F.:** Rapid colormetric assay for cell viability; Application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. J. Immunol. Method, **70,** 257-268 (1984).

16) **Yachie, A., Takano, N., Yokoi, T., Kato, K., Kasahara, Y., Miyawaki, T. & Taniguchi, N.:** The capability of neonatal leukocytes to produce IL-6 on stimulation assessed by whole blood culture. Pediatr. Res., in press.

17) **Cordell, J. L., Falini, B., Erber, W. N., Ghosh, A. K., Abdulaziz, Z., MacDonald, S., Pulford, K. A. F., Stein, H. & Mason, D. Y.:** Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). J. Histochem. Cytochem., **32,** 219-229 (1984).

18) **東大医科研学友会:** 細菌学実習提要，第2版，334頁，丸善，東京，1958.

19) **Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J.:** Propagation and Maintenance of Bacterial

Strains and Viruses. Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 1st ed. p55-73, Cold Spring Harbor, NY, USA, 1982.

20) **Stewart, J., Glass, E. J., Weir, D. M. & Daha, M. R.:** Macrophage membrane receptors. *In* D. M. Weir (ed.), Handbook of Experimental Immunology Vol. 2 Cellular Immunology, 4th ed. p1-p17, the Alden Press, Oxford, 1986.

21) **坂本晴彦:** ヒツジ赤血球およびザイモザン C3 複合物によるマイクロプレート上での T, B 細胞, 単球の同時定量. 免疫実験操作法Ⅷ, 1984年増補版 (右田俊介, 橘 武彦, 松橋 直, 村松 繁, 浜岡利之編), 2523-2526 頁, 日本免疫学会, 金沢, 1984.

22) **Haskill, S., Johnson, C., Eierman, D., Becker, S. & Warren, K.:** Adherence induces selective mRNA expression of monocyte mediators and proto-oncogenes. J. Immunol., **140,** 1690-1694 (1988).

23) **Thorens, B., Mermod, J. J. & Vassalli, P.:** Phagocytosis and inflammatory stimuli induce GM-CSF mRNA in macrophages through posttranscriptional regulation. Cell, **48,** 671-679 (1987).

24) **Burchett, S. K., Weaver, W. M., Westall, J. A., Larsen, A., Kronheim, S. & Wilson, C. B.:** Regulation of tumor necrosis factor/cachectin and IL-1 secrtion in human mononuclear phagocytes. J. Immunol., **140,** 3473-3481 (1988).

25) **Helfgott, D. C., May, L, T., Sthoeger, Z., Tamm, I. & Sehgal, P. B.:** Bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) enhances expression and secretion of β_2 interferon by human fibroblasts. J. Exp. Med., **166,** 1300-1309 (1987).

26) **Jirik, F. R., Podor, T. J., Hirano, T., Kishimoto, T., Lokskutoff, D. J., Carson. D. A. & Lotz, M.:** Bacterial lipopolysaccharide and inflammatory mediators augment IL-6 secretion by human endothelial cells. J. Immunol., **142,** 144-147 (1989).

27) **Horii, Y., Muraguchi, A., Suematsu, S., Matsuda, T., Yoshizaki, K., Hirano, T. & Kishimoto, T.:** Regulation of BSF-2/IL-6 production by human mononuclear cells (Macrophage-dependent synthesis of BSF-2/IL-6 by T cells). J. Immunol., **141,** 1529-1535 (1988).

28) **Helfgott, D. C., Tatter, S. B., Santhanam, U., Clarick, R. H., Bhardwaj, N., May, L. T. & Sehgal, P. B.:** Multiple forms of IFN-β_2/IL-6 in serum and body fluids during acute bacterial infection. J. Immunol., **142,** 948-953 (1989).

29) **Mclntosh, K.:** Bacterial infections of the newborn. *In* M. E. Avery & H. W. Taeusch (eds.), Schaffer's Diseases of the Newborn, 5th ed. p729-747, W. B. Saunders Co., Philadelphia, 1984.

30) **Leijh, P. C. J., Van Furth, R. & Van Zwet, T. L.:** *In vitro* determination of phagocytosis and intracellular killing by polymorphonuclear and mononuclear phagocytes. *In* Weir, (ed.), Handbook of Experimental Immunology Vol. 2 Cellular Immunology, 4th ed. p1-17, the Alden Press, Oxford, 1986.

31) **光山正雄:** 食細胞の機能. 戸田新細菌学 (森 良一, 天児和暢), 第29版, 265-270 頁, 南山堂, 東京, 1988.

32) **Wright, S. D., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J. & Ramos, R. A.:** Lipopolysaccharide (LPS) binding protein opsonizes LPS-bearing particles for recognition by a novel receptor on macrophages. J. Exp. Med., **170,** 1231-1241 (1989).

33) **Badwey, J. A., Robinson, J. M., Karnovsky, M. J. & Karnovsky, M. L.:** Reduction and excitation of oxygen by phagocytic leucocytes; biochemical and Cytochemical Techniques. *In* Weir (ed.), Handbook of Experimental Immunology Vol. 2, Cellular Immunology, 4th ed. p1-17, the Alden Press, Oxford, 1986.

34) **Weston, W. L., Carson, B. S., Barkin, R. M., Slater, G. D., Dustin, R. D. & Hecht, S. K.:** Monocyte-macrophage function in the newborn. Am. J. Dis. Child, **131,** 1241-1242 (1977).

35) **Speer, Ch. P., Wieland, M., Ulbrich, R. & Gahr, M.:** Phagocytic activities in neonatal monocytes. Eur. J. Pediatr., **145,** 418-421 (1986).

36) **English, B. K., Burchett, S. K., English, J. D., Ammann, A. J., Wara, D. W. & Wilson, C. B.:** Production of lymphotoxin and tumor necrosis factor by human neonatal mononuclear cells. Pediatr. Res., **24,** 717-721 (1988).

37) **Weatherstone, K. B. & Rich, E. A.:** Tumor necrosis factor/cachectin and interleukin-1 secretion by cord blood monocytes from premature and term neonates. Pediatr. Res., **25,** 342-346 (1989).

Assessment of IL-6 Production in the Peripheral Blood with an *In Vitro* Model System for Bacteremia Nobuhiko Takano, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., 99, 186—200 (1990)

Key words interleukin 6, monocyte, whole blood culture, bacteremia

Abstract

In the present study, IL-6 production in the whole blood culture system was assayed to elucidate the mechanism of IL-6 production in response to bacterial stimulation. When separated mononuclear cells were used for the culture, significant IL-6 production was induced without exogenous stimuli, whereas this background IL-6 activity was undetectable when whole blood culture was used instead. IL-6 production in whole blood was induced by LPS or Con A after only 2 hours of culture and reached peak values at around 12 hours. Immunohistochemical staining revealed that the major IL-6-producing cells in whole blood culture are monocytes. Live gram-positive bacteria, such as Str. pneumoniae, Listeria and GBS, induced IL-6 production in the whole blood culture at concentrations less than 1×10^5/ml. In the same culture system, E. coli, one of the gram-negative bacteria, worked at as low as 10^1/ml. Formalin-fixed, or killed bacteria showed essentially similar dose-response patterns as live preparations. Phagocytosis of opsonized zymosan or latex particles by cultured cells, also resulted in appreciable IL-6 production. In comparison to bacterial stimulation, many more particles were required for minimum IL-6 induction by these stimulants. The kinetics, the dose response curves and levels of IL-6 production by cord blood leukocytes, in response to LPS or Con A, were similar to those seen in adult peripheral blood. In addition, various bacterial preparations added to cord blood culture induced IL-6 production at comparable levels to adult blood. These results indicated that the phagocytic triggering of monocyte/macrophages alone can induce IL-6 production by these cells and the intracellular processes, including killing and digestion of phagocytized particles, augmented IL-6 production when bacterial stimulation was used. The IL-6 production as a fundamental function of the monocyte/macrophage system seems to develop very early in fetal life and reach mature adult level at birth. From the present work, the whole blood culture system, seems to serve as an ideal model for bacteremia, in the sense that many aspects of the interactions between infections agents and leukocytes in the peripheral circulation, could be reproduced in vitro.