

腎尿路系疾患における尿中インターロイキン6(IL-6)の動態と学校集団検尿における尿中IL-6測定の意義

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/2297/9174

腎尿路系疾患における尿中インターロイキン6 (IL-6) の動態と学校集団検尿における 尿中 IL-6 測定の意義

金沢大学医学部医学科小児科学講座 (主任: 谷口 昂教授)

瀬野晶子

日本における小児期腎尿路系疾患の予防事業として、学校集団検尿の果たしてきた役割は大きい。しかし開始から20年以上を経て、新たにいくつかの問題点が明らかになってきている。本研究では、メサンギウム増殖性糸球体腎炎や尿路感染症などの、腎尿路系における炎症の存在と程度を鋭敏に反映するとされる尿中インターロイキン6 (interleukin-6, IL-6) を各種腎尿路系疾患患者と無作為に抽出した学校検尿受診者を対象に、サンドイッチ ELISA 法にて測定した。ELISA 法による尿中 IL-6 濃度は、従来の生物活性法と良好な相関を示し、その方法は、簡便で迅速かつ鋭敏で非常に有用な検査方法であった。この ELISA 法による健康成人の尿中 IL-6 値は 4ng/g・クレアチニン (creatinine, Cr) 以下であった。各種腎尿路系疾患における尿中 IL-6 値は、活動性の炎症を有する症例は高値を示し、非増殖性糸球体疾患や非糸球体性疾患などの症例では、ほとんどが正常範囲内であり、また糸球体腎炎においてメサンギウム細胞の増殖の程度と良好な相関を示した。この結果より、尿中 IL-6 は腎尿路系における活動性の炎症のよい指標となると思われる。石川県における学校検尿では、尿中 IL-6 が高値を示した割合は、1次検尿受診者や2次検尿受診者より2次検尿陽性者(3次検査対象者)の方が有意に高かった。これらの尿中 IL-6 高値例において腎尿路系における活動性疾患がどのくらい存在するかは正確には言えないが、少なくとも前述の結果から、そのほとんどは腎尿路系に何らかの炎症過程が存在している可能性があるものと思われる。さらに2次検尿陽性者に対して受診状況を含めたアンケート調査を行った。石川県では、29.4% が医療機関を受診しておらず、そのうち尿中 IL-6 高値例が18.8% も含まれていた。さらに、医療機関で異常なし、無症候性血尿、無症候性蛋白尿、体位性蛋白尿と診断されていた例で腎尿路系になんらかの炎症の存在する可能性の強い尿中 IL-6 高値例が24.7% も存在していた。この結果より、小児期腎尿路系疾患の早期発見、早期治療のためには、異常者選別の方法と医療機関受診方法の両方の点で学校検尿のシステムを再検討する必要があると思われる。

Key words urinary screening of schoolchildren, urinary interleukin-6, renal disease, urinary tract disease

慢性の腎疾患、特に糸球体腎炎は無症状で長期間経過することが多く、末期腎不全に陥ると、透析や腎移植という治療法を必要とする。毎年7000人あまりの患者が新規に透析に導入されている現状¹⁾から、予防事業は極めて重要であると思われる。その代表的なものとして学校検尿がある。この学校検尿が開始されてから、すでに20年以上が経過し、そのシステムも徐々に確立し、小児期腎疾患を早期に発見し、適切な管理および早期治療に結び付け、また治療法の進歩にも大きな成果を上げてきている。しかし、近年では、予後の良好な疾患に対しても管理が過剰になる傾向を認め、当の子供達やその保護者達に必要な以上の不安や負担をかける傾向にある。半面、先天性泌尿器科的疾患や逆流性腎症などのように、軽微な尿所見のために発見が遅れ、早期に腎不全に至って発見される症例も散見される^{2)~5)}。これに対して3歳児検尿が施行されるようになり、さらに現行の尿蛋白と尿潜血反応のスクリーニングに超音波断層法⁶⁾や近位尿管由来糖蛋白分解酵素である尿中 N-アセチル-β-D-グル

コサミナーゼ (N-acetyl-β-D-glucosaminidase, NAG) や、尿中低分子蛋白の β₂-ミクログロブリンなどを取り入れるべきであるとの意見もみられるようになってきている⁷⁾。また、学校検尿が広く普及されたにもかかわらず、自覚症状が無いために医療機関を受診せず放置している症例や、何らかの医療機関を受診しているにもかかわらず、最終的に腎生検に至らないと正確な診断がなされないという疾患特異性もあってか、適切な管理がなされていない症例も依然かなりの割合で認められる。それらに対する対応などを含めたシステムの見直しが石川県の場合も必要になってきている。

近年、分子生物学的解析法の発達に伴い、種々のサイトカインがメサンギウム細胞増殖能やメサンギウム基質産生誘導能を有し、走化性因子や接着因子発現因子として糸球体への炎症細胞浸潤に関与するなど糸球体腎炎の進展に深く関わっていることが解明されつつある^{8)~11)}。なかでもインターロイキン6 (interleukin-6, IL-6) は、メサンギウム増殖性腎炎をはじめと

平成7年11月20日受付, 平成7年12月20日受理

Abbreviations: Cr, creatinine; IL-6, interleukin-6; MTT, 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide; NAG, N-acetyl-β-D-glucosaminidase; rIL-6, recombinant IL-6

し、腎尿路系に何らかの炎症があれば尿中に検出され、その尿中活性値は炎症の程度と相関を示すとされる¹²⁻¹⁴。特にメサンギウム増殖性糸球体腎炎では、その経時的測定は予後判定に有用であるとも報告されている¹⁵。

本研究では、まず各種腎尿路系疾患に対して、従来の生物活性法より少量の検体でより簡便に測定できるサンドイッチ ELISA 法にて尿中 IL-6 濃度を測定し、生物活性法より得られた結果と比較検討し、同時にその臨床的意義についても検討した。さらに学校検尿受診者の尿中 IL-6 濃度をこの ELISA 法で測定し、加えて精密検査必要者に対して受診状況についてのアンケート調査を行い、尿中 IL-6 測定を通じて石川県における学校検尿の見直しを検討してみた。

対象および方法

I. 対 象

1. 各種腎尿路系疾患における検討

対象は、金沢大学医学部附属病院小児科および関連施設に通院あるいは入院中の患者で、その総数は241名である。年齢は0ヶ月から72歳(平均19.8歳)で、性別は男子104名、女子137名(男女比1:1.3)であった。疾患別では、IgA 腎症をはじめとする糸球体疾患130名、尿路感染症39名(腎盂腎炎35名、出血性膀胱炎3名、腎膿瘍1名)、血尿のみで腎生検は未施行であるが円柱の存在や尿中赤血球形態などにより軽度の慢性糸球体腎炎が疑われている症例(微少血尿)30例、非糸球体性血尿7名(Nutcracker 現象2名、高カルシウム尿症2名、原因不明の片腎性腎出血3名)、体位性蛋白尿7名、川崎病22名、熱性蛋白尿3名、急性腎不全3名(エルシニア感染による急性間質性腎炎

2名、クレゾール中毒1名)、更に対照として健康成人40名を用いた。尿検体は、外来尿もしくは入院患者の場合は起床第2尿を1,500回転、5分間遠心分離した上清を測定検体とした(表1)。

2. メサンギウム増殖の程度における検討

腎生検を施行し、IgA 腎症、非 IgA 腎症、紫斑病性腎炎などのメサンギウム増殖性糸球体腎炎と診断された26名を対象とした。その組織所見をメサンギウム細胞の増殖の程度により、“軽度”(mild)、“中等度”(moderate)、“高度”(severe)の3群に分け、腎生検当日の起床第2尿を同様に遠心分離し測定検体とした。

3. 学校検尿における検討

石川県では、学校検尿の78.3%を石川県予防医学協会が施行しており¹⁶、原則として学童および生徒全員が1次検尿を受け、試験紙法にて蛋白、潜血のいずれかが(±)以上を陽性と判定し2次検尿対象者としている。さらに2次検尿では、蛋白がズルホサリチル酸法で(+)以上かまたは(±)で尿沈渣に異常を認めた場合と、潜血反応が(+)以上かまたは(±)で尿沈渣に異常を認めた場合を2次検尿陽性者すなわち3次検査対象者として何らかの医療機関を受診するよう勧めている。この石川県予防医学協会が行った学校検尿のうち、無作為に抽出した1次検尿受診者222名、2次検尿受診者281名、2次検尿陽性の3次検査対象者(要精密検査)109名が対象である。年齢は、1次検尿受診者は7~15歳、2次検尿受診者は6~15歳、3次検査対象者は6~18歳であり明らかな差は認めなかった。性別は、1次検尿受診者、2次検尿受診者、3次検査対象者共に男女比に明らかな差は認めなかった。予防医学協会に集められた早朝尿を

Table 1. Clinical diagnosis of enrolled patients

Diagnosis	Number of patients
Glomerular disease	
Mes-PGN (IgA nephropathy)	68
(non-IgA nephropathy)	17
Purpura nephritis	13
Lupus nephritis	8
Membranoproliferative glomerulonephritis	4
Poststreptococcal-AGN	7
Nephrotic syndrome (minimal change)	8
Membranous nephropathy	4
Focal segmental sclerosis	1
Urinary tract infection	
Pyelonephritis	35
Hemorrhagic cystitis	3
Renal abscess	1
Microscopic hematuria	30
Non-glomerular bleeding	
Nutcracker phenomenon	2
Hypercalciuria	2
Essential renal bleeding	3
Orthostatic proteinuria	7
Kawasaki disease	22
Febrile proteinuria	3
Acute renal failure	
Yersinia infection	2
Cresol intoxication	1

Mes-PGN, mesangial proliferative glomerulonephritis; AGN, acute glomerulonephritis.

同様に遠心分離し測定検体とした(表2)。

II. 方法

1. ELISA 法および生物活性法による IL-6 の測定

尿中 IL-6 の測定には、2ステップサンドイッチ ELISA 法による IL-6 測定キット(富士レビオ, 東京)を用いた。本キットは IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-8, 腫瘍壊死因子, 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子などの他のサイトカインと交叉反応性は認められず, 標準 IL-6 を用いた検討では, その測定感度はおよそ 3pg/ml と推定された。1回の測定に必要な検体量は 50 μ l である。なお尿中 IL-6 濃度は, 尿中クレアチニン(creatinine, Cr)で補正した値 (ng/g·Cr) を用いた。尿中クレアチニン測定には, クレアチニン測定キット(クレアチニンテストパック[®], Jaffé 法, 和光純薬, 大阪)を用いた。生物活性測定は, IL-6 依存性マウスハイブリドーマ・クローンである, MH60·BSF2 (大阪大学医学部バイオメディカル教育研究センター腫瘍医学部門平野俊夫教授, 同第3内科岸本忠三教授より供受)に対する増殖促進効果¹⁷⁾を指標としたバイオアッセイ法により測定した。すなわち96穴プレート(Corning Glass Works, New York, U. S. A.)に, 検体ないしレコンビナント IL-6 (recombinant IL-6, rIL-6) (同上平野俊夫教授, 岸本忠三教授より供受)の2倍希釈系列を作成した。そこで, MH60·BSF2 継代3日目の対数増殖期にあるものを採取し, IL-6 を含まない RPMI1640 培養液(Gibco laboratories, Grand Island, New York, U. S. A.)中で6時間培養して細胞と結合した IL-6 を除去した後, 再びこれらの細胞を洗浄し上記プレートの各穴に 1×10^4 個ずつ分注し37°Cで48時間培養した。

MH60·BSF2 の増殖は, 3-(4,5-ジメチルサイアズール-2-yl)-2,5-ジフェニールテトラゾールプロマイド (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT) (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, U. S. A.) を用いた比色定量法により行った¹⁸⁾。すなわち, 培養終了4時間前に pH7.4 のリン酸緩衝生理食塩水にて 5mg/ml に調整した MTT を各穴に 20 μ l 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, その後各穴に 0.04N 酸性化イソプロピルアルコールを 100 μ l ずつ添加した。完全に色素が溶出してから, 20 μ l のデタージェント溶液(3% SDS 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-Lab Instruments, Salzburg, Austria)により測定した。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 5×10^6 U/mg とされている。

Table 2. Randomly selected subjects in urinary screening

Subject group	Number of cases			Age (year)	
	Total	Male	Female	Range	Mean
Primary screening	222	89	133	7-15	13.6
Secondary screening	281	105	176	6-15	11.9
Abnormality of Secondary screening	109	36	73	6-18	14.6

2. 腎組織学的検討

腎生検を施行したメサンギウム増殖性糸球体腎炎の組織所見を, メサンギウムの増殖の程度により, “軽度”(mild), “中等度”(moderate), “高度”(severe)の3群に分け, 増殖の程度と尿中 IL-6 濃度との比較検討を行った。増殖の程度は, 末梢のメサンギウム領域に4個以上のメサンギウム細胞の増殖を認めるが, 比較的軽度で糸球体毛細血管内腔がよく開大している症例を“軽度”(mild), メサンギウム細胞の増殖のため糸球体毛細血管内腔の狭小化が顕著な症例を“高度”(severe)とし, その中間の症例を“中等度”(moderate)とした。

3. 3次検査対象者に対するアンケート調査

2次検査異常者(3次検査対象者)109名に対し, 医療機関を受診し終わったと思われる時期に, 受診状況についてアンケート調査を行った。調査は各学校の学校長及び養護教諭宛に郵送し, 両親あるいは養護教諭に記載してもらった。調査項目は“医療機関受診の有無”, “受診医療機関の名称”, “診断名”, “医療機関未受診者にはその理由”の4項目についてである。

4. 統計学的検討

各検査値は平均±標準偏差($\bar{x} \pm S.D.$)で表し, 比較検定には Mann-Whitney の U 検定を用い, $p < 0.01$ にて有意の差とした。

成 績

I. ELISA 法および生物活性法による尿中 IL-6 測定の比較検討

従来施行されていた生物活性法の検出感度は 0.03U/ml 以上 (≥ 6 pg/ml) であり, 今回使用した ELISA 法による検出感度は 3pg/ml 以上であった。また, この生物活性法と ELISA 法との相関を, 40名の腎炎, 尿路感染症の患者より得られた尿について比較検討したところ, 図1のように比較的良好的な相関 ($r=0.883$, $p < 0.01$) を認めた。

II. 尿中 IL-6 濃度の正常値

健康成人40名より ELISA 法にて得られた尿中 IL-6 濃度は, 1.1 ± 1.5 ng/g·Cr であり正常値は 4ng/g·Cr 以下と考えられた。なお後述の1次検尿受診者のうち尿所見正常例は正常小児と考えられるが, その尿中 IL-6 濃度は, 0.8 ± 1.5 ng/g·Cr であり,

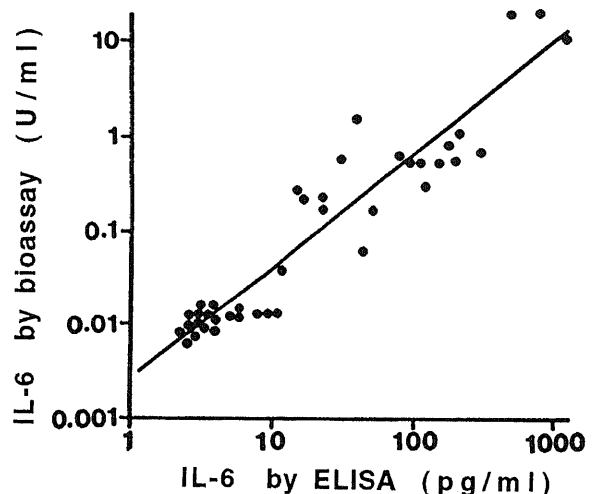


Fig. 1. Correlation of urinary IL-6 levels between bioassay and two-step sandwich ELISA method. Solid line shows regression line ($r=0.883$, $p < 0.01$).

これより推定した正常値も 4ng/g·Cr 以下で、前述の成人40名による正常値とはほぼ合致しており、小児と成人のあいだに差は認めなかった。

Ⅲ. 各種腎尿路系疾患における尿中 IL-6 濃度の検討

メサンギウムの増殖が主病変である IgA 腎症、非 IgA 腎症、紫斑病性腎炎では、尿中 IL-6 濃度は正常範囲内から高値を示す症例まで種々であった。ループス腎炎の症例は WHO 分類の I-b (正常糸球体) 1例、II-a (軽度のメサンギウム増殖のみ) 1例、V-a (膜性糸球体腎炎) 2例の計 4例では正常で、II-b、III-a (中等度のメサンギウム増殖を呈する) 2例、V-a (膜性糸球体腎炎) 1例では正常上限をわずかに越し、IV-a (瀰漫性増殖性糸球体腎炎) の 1例では高値を示した。典型的な膜性増殖性糸球体腎炎の 3例は高値を示したが、低補体血症と微少血尿のみを呈し組織学的変化の少ない、いわゆる巣状膜性増殖性糸球体腎炎では低値であった。巣状糸球体硬化症の 1例は軽度高値を認めた。微少変化型ネフローゼ症候群では 3例が、膜性腎症では 1例が軽度高値を示したが、それ以外の大部分は低値であった。溶連菌感染後急性糸球体腎炎、川崎病、急性腎不全、尿路感染症では、全例高値を示し、回復期に全例正常化していた。微少血尿では、数例に軽度上昇を認めたが、非糸球体性血尿や体位性蛋白尿では大部分が正常範囲内であった

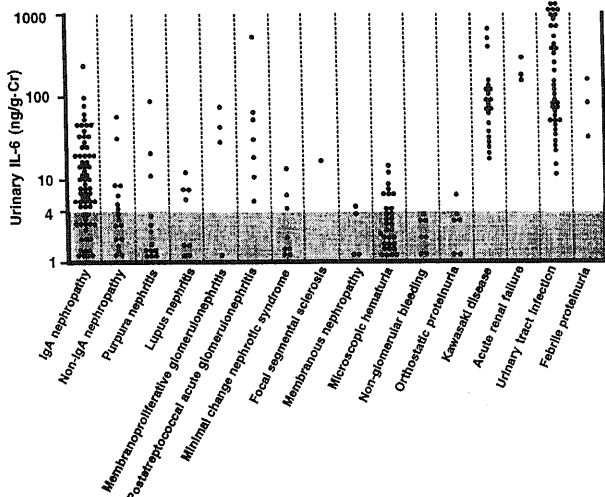


Fig. 2. Urinary IL-6 levels in various disease conditions. Urinary IL-6 levels by ELISA in patients with each disease were indicated by closed circles. [shaded box], normal range (≤4 ng/g·Cr).

(図 2).

腎生検を施行したメサンギウム増殖性糸球体腎炎患者26名におけるメサンギウム細胞の増殖の程度と尿中 IL-6 濃度の比較では、“軽度”群における尿中 IL-6 濃度は 3.3±3.0ng/g·Cr, “中等度”群で 15.8±11.9ng/g·Cr, “高度”群で 46.2±25.6 ng/g·Cr であり、増殖性変化が強いほど尿中 IL-6 濃度は高かった (図 3).

このように腎尿路系にメサンギウム増殖、炎症性細胞浸潤などの何らかの炎症があれば尿中 IL-6 濃度は上昇し、かつその炎症の程度を反映していた。

Ⅳ. 学校検尿における尿中 IL-6 濃度の検討

2次検尿異常者(3次検査対象者)の尿中 IL-6 濃度は、1次検尿受診者や2次検尿受診者と比較して有意に高かった。また増殖性糸球体腎炎など腎尿路系における炎症性変化の存在が示唆される尿中 IL-6 高値例 (>4ng/g·Cr) は、1次検尿受診者で 222名中10名、2次検尿受診者で281名中20名、そして3次検査対象者で109名中18名と検査が進むにつれて増加していった (表 3).

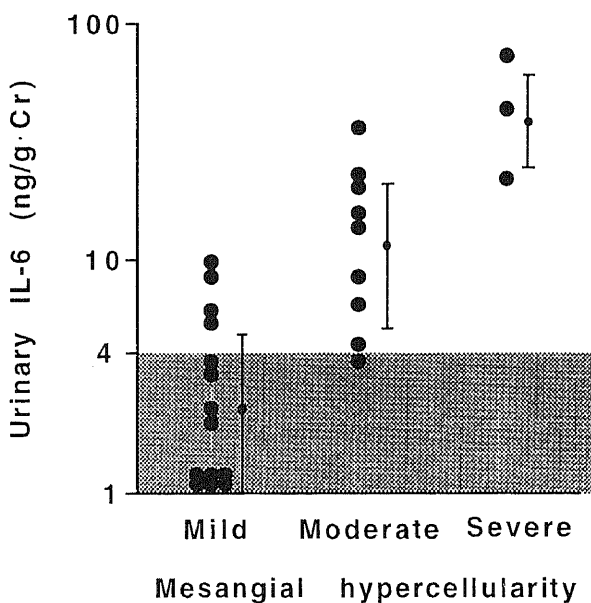


Fig. 3. Urinary IL-6 levels in various degree of mesangial hypercellularity. The mean values ± a standard deviation were indicated by closed circles with vertical bars. [shaded box], normal range (≤4 ng/g·Cr).

Table 3. IL-6 concentration in urinary screening

Subject group	Number of cases	Urinary IL-6 (ng/g·Cr)	Number (%) of cases with high concentration ^{a)}
Primary screening	222	1.0±1.8	10 (4.5)
Secondary screening	281	1.5±4.4	20 (7.1)
Abnormality of secondary screening	109	3.5±10.1**	18 (16.5)

* P<0.01 vs primary screening. ** P<0.01 vs secondary screening.

^{a)} Concentration of urinary IL-6, >4ng/g·Cr

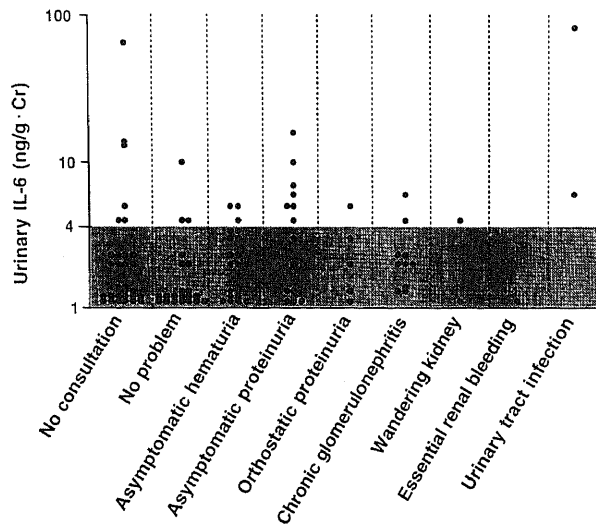


Fig. 4. Urinary IL-6 levels in cases with urinary abnormalities of secondary screening. Urinary IL-6 levels were indicated by closed circles. \blacksquare , normal range (≤ 4 ng/g·Cr).

3次検査対象者に対するアンケートの回収率は、100% (109名)であった。この結果から、医療機関を受診した人は、77名 (70.6%)と低く、医療機関を受診しなかった人は32名 (29.4%)にもおよび問題であった。受診しなかった理由としては“元気がなくて異常と思わなかった”が14名と最も多く、他に“学校検尿時に生理だったため異常ないと思った”8名、“面倒だった”6名、“忘れていた”2名、“昨年受診して異常がなかったため”1名などであった。また、3次検査の医療機関で受けた診断名は、異常なし21名、無症候性血尿または微量血尿21名、無症候性蛋白尿15名、体位性蛋白尿5名、慢性糸球体腎炎10名、遊走腎2名、特発性腎出血1名、尿路感染症2名であった。

医療機関を受診しなかった群で、腎尿路系に何らかの炎症性変化の存在が示唆される尿中 IL-6 高値例が、32名中6名 (18.8%)も存在し、特に65ng/g·Crと異常高値を示した例もいた。また、臨床診断名別の尿中 IL-6 濃度の検討では、尿中 IL-6 高値例が全77名中19名 (24.7%)存在していた。そのうち慢性糸球体腎炎、尿路感染症と診断された例以外で、前述の結果Ⅲから、本来尿中 IL-6 は低値であるはずの、無症候性血尿、無症候性蛋白尿、体位性蛋白尿、異常なしの群にて尿中 IL-6 高値例が多数存在していた。なかでも無症候蛋白尿と診断された群では、尿中 IL-6 異常例が15名中7名 (46.7%)にも及んでいた (図4)。

考 察

疾病予防の観点から開始された検診事業の一つである学校検尿は、昭和49年より施行され、小児期腎疾患を早期に発見し、適切な治療、管理を行い、予後を改善するという点で多大な功績をあげている。しかし、その半面いくつかの問題点、検討を必要とする点が明らかにされているのも事実である。その一つはシステムそのものの再検討である。学校検尿は、学童や生徒全員が検尿検査 (1次検尿)を受け、尿所見陽性者がさらに検尿検査 (2次検尿)を受ける。この時点で検尿にて異常が指摘された者は3次検査の対象者となるわけだが、その方式には、一定の

検査機関で3次検査を行い3次検査後の総合判定や管理区分を決定するA方式と、3次検査のため医療機関を受診を勧めるだけで終わる、つまり特に指定医療機関など無く、医師の診察をとにかく受ければ良しとするB方式とがある¹⁹。どちらにも利点、問題点があるが石川県が採用しているB方式は、結果の判定や管理区分に多くの医師の主観が入り、受診した医師によって暫定診断や管理区分が異なることが問題点としてあげられる。また、現行の学校検尿では、実際に腎尿路系疾患を有すると思われる学童や生徒の5~10倍の尿異常者を拾い上げているとも言われており²⁰、腎疾患を有している可能性の高いものとして振り分ける3次検査のシステム化がその後の管理を統一していく上で重要である。しかし、3次検査を公費負担としている地域は一部に限られており石川県でも過去の3次検査の受診率は63%¹⁹で今回の調査でも70.6%と低く、学校検尿の本来の目的を十分果たしていないという実情がある。本研究では、各種腎尿路系疾患においてELISA法にて尿中 IL-6 を測定しその臨床的意味を検討し、さらに学校検尿の3次検査における尿中 IL-6 の測定を通じて、現在の石川県における学校検尿の在り方についての見直しを検討してみた。

IL-6 は、当初B細胞分化誘導因子としてクローニングされたサイトカインであるが²¹、免疫応答、急性期反応や、造血系、神経細胞の増殖分化に関与し生体防御にとって中心的な役割を果たしている。この多機能性を有することから、IL-6 の発現の異常が自己免疫疾患や種々の炎症性疾患の発症に関与することが示唆されている²²⁻²⁴。糸球体腎炎においては、IL-6 はメサンギウム細胞などの糸球体固有細胞の増殖、好中球、リンパ球、単球/マクロファージの糸球体内への浸潤ならびに細胞外基質成分の増生に関与していると考えられている。また、メサンギウム増殖を示した単離糸球体に IL-6 mRNA の発現を認めたという報告²⁵以外にも、蛍光抗体法で各種糸球体腎炎や間質性腎炎において尿細管にも IL-6 が局在しているという報告²⁶や、IgA 患者末梢血単核球においても IL-6 mRNA の発現を認めたという報告²⁷もあり、糸球体のみならず種々の細胞由来の IL-6 が腎炎の進展に関与していることが示唆されている²⁸。臨床面での尿中 IL-6 の検討では、メサンギウム増殖性糸球体腎炎患者の尿中に IL-6 活性を認め、その活性の程度はメサンギウム増殖の程度と良く相関²⁹⁻³¹し、また、IgA 腎症やループス腎炎などの増殖性糸球体腎炎患者の経時的尿中 IL-6 の測定は、疾患活動性判定因子ともなりうるということが示唆されている^{29,30}。さらに尿路感染症^{32,33}、川崎病³²などでも尿中に IL-6 活性を認め、同様に炎症の程度を良く反映すると報告されている。なお、好中球走化性因子として発見されたインターロイキン8 (IL-8)も腎尿路系における炎症過程の存在とその程度を反映しているとの報告³³もあるが、今回は、IL-6 を尿において測定することで本研究を進めた。

尿中 IL-6 測定のために用いた ELISA 法は、生物活性法と比較して、簡便で長時間を必要としなかった。また、血中 IL-6 濃度を測定した谷内江ら³⁴がすでに報告しているように血清を検体とした場合の両測定法の間には非常に良好な相関が得られているが、尿中 IL-6 濃度においても両者の測定結果は比較的良好な相関関係を認め、臨床的に非常に有用な検査法であると思われた。

この ELISA 法による各種腎尿路系疾患における尿中 IL-6 濃度の検討では、Ohta ら¹⁹による生物活性法での測定結果と同様

の結果を示した。すなわち、IgA 腎症、非 IgA 腎症、紫斑病性腎炎、ループス腎炎、膜性増殖性糸球体腎炎などの増殖性糸球体腎炎では、過去の生物活性法の報告と同様に尿中 IL-6 濃度は、増殖性変化およびその活動性を良く反映していた。また、本結果から慢性糸球体腎炎が疑われている微少血尿の症例は、尿中 IL-6 濃度は一部に軽度上昇を示す症例はあったがほとんどは正常範囲内でありその増殖性変化は正常～軽度であることが推定された。一方、膜性腎症、微少変化型ネフローゼ症候群のような非増殖性糸球体疾患や、非糸球体性血尿、体位性蛋白尿ではほとんどが低値でありこのような疾患との鑑別にも有用であると思われた。溶連菌感染後急性糸球体腎炎(毛細血管内皮細胞の増殖が主体³⁵⁾、川崎病(間質への炎症性細胞浸潤、いわゆる間質性腎炎³⁶⁾、間質性腎炎による急性腎不全、尿路感染症(腎内間質や膀胱粘膜の炎症性細胞浸潤³⁷⁾)においても尿中 IL-6 は高値を示しており、その回復期には正常化していた。これらの疾患での尿中 IL-6 の上昇は、メサンギウム細胞増殖以外の腎尿路系の炎症の存在とその程度をも反映していると考えられた。さらにこれらの疾患の組織学的特徴より尿中 IL-6 の産生細胞は、これまでの報告^{38,39)}にもあるように、リンパ球、単球/マクロファージ、線維芽細胞、血管内皮細胞、尿細管細胞など多岐にわたるものと推定された。

以上をふまえ学校検尿を対象とした尿中 IL-6 濃度の測定結果を検討した。2次検尿陽性者(3次検査対象者)における尿中 IL-6 濃度は、 $3.5 \pm 10.1 \text{ ng/g} \cdot \text{Cr}$ と高値を示し、さらに腎尿路系に何らかの炎症過程の存在が示唆される尿中 IL-6 高値例の割合は 16.5% で 1次検尿、2次検尿受診者と比較して有意に高かった。このように尿中 IL-6 の測定結果からは、3次検査対象者のうち、腎尿路系に何らかの炎症性変化がある症例が約 1/6 に存在すると思われた。

アンケート結果と尿中 IL-6 濃度を比較検討すると、学校検尿の事後管理の面でいくつかの問題点が浮き彫りとなってくる。1つは、精密検査を必要とするにもかかわらず、医療機関を受診しなかった例についてである。今回のアンケート結果では、3次検査対象者の医療機関受診率は 70.6% であり、石川県における過去の調査での受診率(尿蛋白陽性者 63%、尿潜血陽性者 64%¹⁰⁾) とほぼ同様で、これは、A方式を採用し、集団で3次検査を施行している東京都などの受診率(約 90%) に比べかなり低かった。さらに、医療機関未受診者 32名(29.4%)のうち、活動性の高い腎尿路系疾患を有すると思われる尿中 IL-6 高値例が 6名(18.8%)もいた。このうち蛋白尿(2+)尿潜血(3+)、尿中 IL-6 濃度が $65 \text{ ng/g} \cdot \text{Cr}$ とかなり強い炎症性変化の存在が示唆される症例もあった。この例は「生理の終わり頃だったので尿所見が異常だったのだろう」と自己判断し受診しなかったわけだが、大きな問題であると思われた。今後、3次検査受診率をもっと向上させるように指導を強化することも大切ではあるが、3次検査対象者の尿中 IL-6 値を測定し、その結果から、積極的に対応をしてゆくことも可能ではないかと思われる。

さらにもう1点は、受診機関における事後措置についてである。本来尿中 IL-6 値が低いはずである、異常なし、無症候性血尿、無症候性蛋白尿、体位性蛋白尿と診断された群において、尿中 IL-6 高値例がかなり存在しており、なかでも無症候性蛋白尿では 7名(46.7%)に尿中 IL-6 高値例がいた。この中にはかなりの割合で慢性糸球体腎炎などの何らかの腎尿路系疾患が存

在する可能性があると考えられた。診断名の違いにより、腎生検の適応も含めたその後の事後措置も変わってくるので、このような症例を少しでも減らす工夫が必要である。尿中 IL-6 値から増殖性糸球体腎炎など、腎尿路系に強い炎症性変化が存在している症例を選別してゆくことが可能であり、3次検査に尿中 IL-6 測定を導入することを一つの対策案として推奨したい。ただ尿中 IL-6 の測定には、尿を検体としているので、受診者の負担が少なく非常に有用であると考えられ、3次検査対象者全員を測定することは経済的側面からみて不利益な面もある。そこで尿中 IL-6 測定対象者をもう少し絞り込むようなシステムも考える必要があると思われた。

以上、石川県における現在の学校検尿システムでは、いくつかの問題が残っており、現在のシステムで見逃されてしまう腎尿路系疾患の子供たちを、より有効に選別できるようなシステムの確立が望まれる。そのためには、3次検査を東京都や横浜市のような A方式にし、さらに尿中 IL-6 測定の導入や管理区分の統一など、再検討が必要と思われる。

結 論

各種腎尿路系疾患に対して、サンドイッチ ELISA 法により尿中 IL-6 濃度を測定し、生物活性値と比較検討するとともに、その臨床的意義について検討した。さらに学校検尿受診者の尿中 IL-6 濃度を測定し、同時に3次検査対象者の医療機関受診状況についてアンケート調査も行い、学校検尿における尿中 IL-6 測定の有用性ならびに現在の石川県の学校検尿の見直しを行った。

1. サンドイッチ ELISA 法による尿中 IL-6 濃度の測定は、生物学的 IL-6 活性値と良好な相関を示した。また腎尿路系疾患における炎症の程度をよく反映し、非糸球体性疾患との鑑別も可能であり、検体量や、測定法の簡便さの点でも非常に有用と思われた。

2. 学校検尿において、尿中 IL-6 高値例の占める割合は3次検査対象者では、1次検尿、2次検尿受診者よりも有意に高く、また3次検査対象者のうち医療機関で異常なし、無症候性血尿、無症候性蛋白尿体位性蛋白尿と診断されていた症例や、全く受診していなかった症例のなかに少なからず IL-6 高値例が認められた。学校検尿に尿中 IL-6 測定を加えることにより、3次検査対象者のうち、腎尿路系に炎症性病変を有する可能性のある症例を選別することができると思われた。

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 昂教授に深謝いたします。また、直接御指導いただきました小児科腎臓グループの太田和秀先生、同免疫グループの谷内江昭宏講師を始め、終始研究に御協力いただきました当教室員の諸兄に感謝いたします。さらに、MH60-BSF2, rIL-6, モノクローナル抗ヒト IL-6 抗体を供受していただきました大阪大学医学部バイオメディカル教育研究センター腫瘍医学部門平野俊夫教授、同第三内科岸本忠三教授、IL-6 測定 ELISA キットを提供していただいた富士レビオ株式会社、貴重な学校検尿の検体の収集にご協力いただいた石川県予防医学協会の皆様にも深謝いたします。

なお、本論文の要旨の一部は第35回日本腎臓学会総会(1992、横浜)において発表した。

文 献

- 1) 財団法人厚生統計協会編:腎不全対策.国民衛生の動向・厚生指針, 42, 176-179 (1995).

- 2) 森本雄次, 久保雅宏, 大内 徹, 市岡隆男, 川上浩一郎, 岡田 要: 学校検尿で発見できなかった Oligomeganephronia の1例. 小児科臨床, 43, 1423-1426 (1990).
- 3) 中村郁哉, 浅井 寿, 野村一史, 三ノ輪 茂, 伊藤重光: 学校検尿にて発見された慢性腎不全の2例. 小児科診療, 54, 1605-1608 (1991).
- 4) 今立明宏, 望月 弘, 臼井信男, 波多野孝史, 後藤博一, 秦基洪, 小野塚輝夫, 石橋康弘: 学校検尿で発見された巨大水腎症の1女兒例. 小児科診療, 58, 240-244 (1995).
- 5) 坂本 修, 菊田芳克, 斎藤龍彦, 山本良継: 学校検尿で発見され, すでに慢性腎不全の状態で腎移植を行ったネフローゼ症候群の1例. 小児科診療, 58, 216-220 (1995).
- 6) 玉那覇栄一, 大山朝弘, 松川正男: 学校健診における腎尿路奇形の超音波スクリーニングについて. 小児科診療, 58, 254-258 (1995).
- 7) 三原聖子, 伊藤雄平: 新生児および乳幼児(3歳以下)の検尿. 腎と透析, 32, 945-949 (1992).
- 8) Mene, P., Simonson, M. S. & Dun, M. J.: Physiology of the mesangial cell. *Physiol. Rev.*, 69, 1347-1424 (1989).
- 9) 富野康日己, 鈴木祐介: サイトカインと病態, 腎炎. 臨床免疫, 27 (suppl. 16), 448-456 (1995).
- 10) 小出 輝: 腎炎とサイトカイン. 日腎誌, 36, 183-193 (1994).
- 11) Sterzel, R. B., Schulze-Lohoff, E. & Marx, M.: Cytokines and mesangial cells. *Kidney Int.*, 43, S26-S31 (1993).
- 12) Horii, Y., Muraguti, A., Iwano, M., Matuda, T., Hirayama, T., Yamada, H., Fuzii, Y., Dohi, K., Ishikawa, H., Ohmoto, Y., Yoshizaki, K. & Kishimoto, T.: Involvement of IL-6 in mesangial proliferative glomerulonephritis. *J. Immunol.*, 143, 3949-3955 (1989).
- 13) Hirata, E., Iwano, M., Hirayama, T., Horii, Y., Kitamura, T., Hanatani, M. & Dohi, K.: Rapid measurement of urinary IL-6 by ELISA: urinary IL-6 as a marker of mesangial proliferation. *Jpn. J. Nephrol.*, 36, 33-37 (1994).
- 14) Tomino, Y., Funabiki, K., Ohmuro, H., Shimizu, M., Yokoyama, K., Shirato, I., Shirai, T., Takahashi, M. & Koide, H.: Urinary levels of interleukin-6 and disease activity in patients with IgA nephropathy. *Am. J. Nephrol.*, 11, 459-464 (1991).
- 15) Ohta, K., Takano, N., Seno, A., Yachie, A., Miyawaki, T., Yokoyama, H., Tomosugi, N., Kato, E. & Taniguti, N.: Detection and clinical usefulness of urinary interleukin 6 in the diseases of the kidney and the urinary tract. *Clin. Nephrol.*, 38, 185-189 (1992).
- 16) 石川県小児腎疾患研究班: 児童, 生徒の腎臓健診に関する調査報告. 1-16 頁, 石川県予防医学協会, 金沢, 1988.
- 17) Matuda, T., Hirano, T. & 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).
- 18) Green, L. M., Reade, J. L. & Wars, C. F.: Rapid colorimetric assay for cell viability: Application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *J. Immunol. Methods.*, 70, 257-268 (1984).
- 19) 安保和俊, 土屋正己, 山本博章, 村上睦美: 腎臓健診における血尿, 蛋白尿異常者の実態. *New Mook 小児科*, 3, 1-11 (1994).
- 20) Murakami, M., Yamamoto, H., Ueda, Y., Murakami, K. & Yamauchi, K.: Urinary screening of elementary and junior high-school children over a 13-year period in Tokyo. *Pediatr. Nephrol.*, 5, 50-53 (1991).
- 21) Hirano, T., Yasukawa, K., Harada, H., Taga, T., Watanabe, Y., Matsuda, T., Kashiwamura, S., Nakajima, K., Koyama, K., Iwamatsu, A., Tsunasawa, S., Sakiyama, F., Matsui, H., Takahara, Y., Taniguchi, T. & Kishimoto, T.: Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature*, 324, 73-76 (1986).
- 22) Hirano, T. & Kishimoto, T.: Interleukin-6. *In* M. B. Sporn & A. B. Roberts (eds.), *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 95/I, p633-665, Springer-Verlag Press, Berlin, 1990.
- 23) Van Snick, J.: Interleukin-6: An overview. *Ann. Rev. Immunol.*, 8, 253-278 (1990).
- 24) Hirano, T.: Interleukin-6 and its relation to inflammation and disease. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 62, S60-S65 (1992).
- 25) 土肥和紘, 岩野正之, 堀井康弘: インターロイキン 6 (IL-6). *日本臨床*, 50, 2916-2920 (1992).
- 26) Fukatsu, A., Matsuo, S., Yuzawa, Y., Miyai, H., Futenma, A. & Kato, K.: Expression of interleukin 6 and major histocompatibility complex molecules in tubular epithelial cells of human kidneys. *Lab. Invest.*, 69, 58-67 (1993).
- 27) Nakamura, T., Ebihara, I., Takahashi, T., Yamamoto, M., Tomino, Y. & Koide, H.: Increased interleukin 6 mRNA expression by peripheral blood T cells from patients with IgA nephropathy. *Autoimmunity*, 15, 171-179 (1993).
- 28) Takamura, T., Yoshioka, K., Murakami, K., Akano, N., Okada, M., Aya, N. & Maki, S.: Cellular localization of inflammatory cytokines in human glomerulonephritis. *Virchows Archiv.* 424, 459-464 (1994).
- 29) Horii, Y., Iwano, M., Hirata, E., Shiiki, H., Fujii, Y., Dohi, K. & Ishikawa, H.: Role of interleukin-6 in the progression of mesangial proliferative glomerulonephritis. *Kidney Int.*, 443, S71-S75 (1993).
- 30) Iwano, M., Hirata, E., Kurumatani, N., Horii, Y., Shiiki, H., Fukatsu, A., Matsuda, T., Hirano, T., Kishimoto, T. & Ishikawa, H.: Urinary levels of IL-6 in patients with active lupus nephritis. *Clin. Nephrol.*, 40, 16-21 (1993).
- 31) Benson, M., Jodal, U., Andresson, A., Karlsson, A., Rydberg, J. & Svanborg, C.: Interleukin 6 response to urinary tract infection in childhood. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 13, 612-616 (1994).
- 32) Ohta, K., Seno, A., Shintani, N., Kato, E., Yachie,

- A., Seki, H., Miyawaki, T. & Taniguti, N.: Increased levels of urinary interleukin-6 in Kawasaki disease. *Eur. J. Pediatr.*, **152**, 647-649 (1993).
- 33) Wada, T., Yokoyama, H., Tomosugi, N., Hisada, Y., Ohta, S., Naito, T., Kobayashi, K., Mukaida, N. & Matsushima, K.: Detection of urinary interleukin-8 in glomerular diseases. *Kidney Int.*, **46**, 455-460 (1994).
- 34) 谷内江昭宏, 太田和秀, 上野康尚, 大木徹郎, 干場 勉, 矢吹朗彦, 宮脇利男, 谷口 昂: 急性炎症反応の指標としての小児血中 IL-6 濃度の定量: ELISA 法を用いた検討. *日児誌*, **96**, 110-114 (1992).
- 35) Boineau, F. G. & Lewy, J. E.: Glomerulonephritis associated with infection. A) Poststreptococcal glomerulonephritis, *In* S. G. Massay, & R. J. Glassock, (eds), *Textbook of Nephrology*, 2nd ed., p611-619, Williams & Wilkins Press, Baltimore, 1989.
- 36) 浅見 直: MCLS における腎障害: 尿中 NAG 活性動態よりの検討. *小児科診療*, **45**, 1376-1380 (1982).
- 37) Feigin, R. D. & Cherry, J. D.: *Textbook of Pediatric Infectious Diseases*, 2nd ed., p517-621, W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1987.
- 38) Yoshioka, K., Takemura, T., Murakami, K., Okada, M., Yagi, K., Miyazato, H., Matsushima, K. & Maki, S.: In situ expression of cytokines in IgA nephritis. *Kidney Int.*, **44**, 825-833 (1993).
- 39) Chin, W. P. & Lin, C. Y.: Augmented expression of interleukin-6 and interleukin-1 genes in the mesangium of IgM mesangial nephropathy. *Nephron*, **68**, 10-19 (1994).

Urinary Excretion of IL-6 Measured by ELISA in Various Kidney and Urinary Tract Disorders of Children and its Application to Mass Screening Program for Urine Abnormalities in Schoolchildren Akiko Seno, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 - J. Juzen Med Soc., **104**, 742 - 749 (1995)

Key words urinary screening of schoolchildren, urinary interleukin-6, renal disease, urinary tract disease

Abstract

Although the urinary mass screening program in Japanese schoolchildren over 20 years has played an important role in preventing unrecognized progression in renal diseases, some problems concerning better screening and diagnosing procedures remain to be solved. Concentrations of urinary interleukin-6 (IL-6) seemed to be a sensitive indicator for the existence of any inflammatory processes in the urinary system, such as mesangial proliferative glomerulonephritis or urinary tract infections. In this study, urinary concentration of IL-6 was estimated by a two-step sandwich ELISA method in the urine samples from patients with various disorders of the urinary system, from unselected applicants for the urinary screening program in schools. Measurement of IL-6 with ELISA was simple, rapid, and more sensitive compared with the bioassay system. Urinary concentrations of IL-6 in healthy subjects seemed to be less than 4 ng/g. Cr. Urinary IL-6 concentrations were high in patients with active inflammatory process in the kidney and/or urinary tracts, while non-proliferative glomerular diseases and non-glomerular diseases appeared almost normal. In addition, the histological grades of mesangial hypercellularity in glomerulonephritis were well correlated with the urinary concentrations of IL-6. These results imply that high concentrations of urinary IL-6 may serve as a sensitive indicator for the possible existence of active inflammatory processes in the urinary system. The analysis of mass screening data in schoolchildren of Ishikawa Prefecture indicated that relative rates of high concentration of urinary IL-6 in children showing urinary abnormalities in the secondary screening were higher than those of unselected subjects in primary screening and secondary screening. Though the exact prevalence of active disorders of the urinary system in these high urinary IL-6-excretion groups remains uncertain, most of them had been later proved to have some active inflammatory processes in the urinary system. The questionnaires, including recommendation for medical consultation, were mailed to all cases with urinary abnormalities detected in the secondary screening. Regrettably, in Ishikawa Prefecture, 29.4% of them did not consult doctors for further medical assessment. High urinary excretions of IL-6 were observed in 18.8% of these non-consulted cases. In addition, 24.7% of cases who were considered by consulted doctors to be unaffected by asymptomatic hematuria, asymptomatic proteinuria or orthostatic proteinuria, showed an abnormally high urinary IL-6 excretion, potentially suggestive of the possible or unrecognized existence of some inflammatory processes in the urinary system. These results suggest that, for early detection and prevention of unrecognized progression of renal diseases in children, it is necessary to re-evaluate the urinary screening program in both abnormality detecting and doctor consulting systems.