

# Increase of Serum Interleukin 6 Activity in Kawasaki Disease and Other Acute Febrile Illness of Children

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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8088">http://hdl.handle.net/2297/8088</a>

## 川崎病ならびに急性小児発熱性疾患における血清 インターロイキン 6 (IL 6) 活性の動態と意義

金沢大学医学部小児科学講座 (主任: 谷口 昂教授)

上 野 康 尚

(平成 1 年 1 月 25 日 受付)

インターロイキン 6 (interleukin 6, IL 6) は様々な刺激に対する免疫反応や炎症反応に関する多彩な生物学的活性を有している。本研究では、川崎病で認められる血清免疫グロブリンの増加、リンパ球の活性化および全身の血管炎などの病態に IL 6 が関与している可能性について検討した。血清 IL 6 活性を IL 6 依存性マウスハイブリドーマ・クローン MH60. BSF2 (murine hybridoma clone, MH60. BSF2) を用いた高感度な細胞増殖比色定量法により測定した。一般的に健康人および発熱を認めない疾患を持つ者より得られた血清中の IL 6 活性は検出感度以下で極めて微量であると考えられた。本研究で用いた IL 6 活性アッセイ法の検出感度は 0.03 U/ml で、これはリコンビナントインターロイキン 6 (recombinant interleukin 6, rIL 6) の蛋白量で 6 pg/ml に相当する。健康人とは対照的に、川崎病急性期患児血清中の IL 6 活性は著明に上昇していたが、その後経過とともに徐々に低下し回復期には検出感度以下となった。しかし、血清 IL 6 活性の上昇は急性発熱性疾患の大部分でも認められ疾患特異性はなかった。この結果は血清中への IL 6 の出現は、発熱および炎症性疾患で広範に認められる現象である事を示した。また、細菌感染症ではウイルス感染症に比較して有意に高い活性を示した ( $p < 0.001$ )。IL 6 は肝細胞に作用して急性期蛋白の産生を誘導する事が報告されている。そこで、血清 IL 6 活性と血清中の急性期蛋白の濃度の相関性について検討した。血清 IL 6 活性は、C-反応性蛋白 (C-reactive protein)、ハプトグロビン (haptoglobin)、 $\alpha_1$ -アシッドグリコプロテイン ( $\alpha_1$ -acid glycoprotein) と良く相関していた。しかし、血清 IL 6 活性と  $\alpha_1$ -アンチトリプシン ( $\alpha_1$ -antitrypsin) との相関性は認められなかった。これらの結果は、IL 6 が急性期蛋白の産生調節において生体内で重要な役割を果たしている事を支持し、急性期蛋白の種類によりその産生誘導機序が異なる事を示唆するものと考えられた。IL 6 は多彩な細胞により産生される事が知られており、産生細胞や組織が異なることが病態と密接に関連している可能性が考えられる。今後この可能性を検討するために、各疾患において抗 IL 6 特異抗体による免疫組織化学的手法などを用いたさらに詳細な検討が必要となるであろう。

---

**Key words** interleukin 6, acute phase proteins, Kawasaki disease

---

生物の体内には内外の侵襲傷害に対して、これを防御する機構が存在する。急性炎症反応および免疫反応がその機構の大きな柱となっているが、単球はその両者にまたがり生体防御機構の中心的役割を果たしている。単球/マクロファージは微生物やそれらの産生

毒素などの刺激により様々な生物活性を有する蛋白を分泌する。これらの物質は、リンパ球に由来するリンホカインと対置してモノカインと総称され、モノカインとして今日よく知られているインターロイキン 1 (interleukin 1, IL 1) や腫瘍壊死因子 (tumor

---

Abbreviations: AG, acid glycoprotein; APPs, acute phase proteins; AT, antitrypsin; BSF-2, B cell stimulatory factor 2; CRP, C-reactive protein; HP, haptoglobin; HPGF, hybridoma/plasmacytoma growth factor; HSF, hepatocytestimulating factor;  $^3$ H-TdR,

necrosis factor, TNF) は微生物感染や外傷に伴う急性炎症反応において重要な役割を果たしていると考えられている<sup>12)</sup>。近年、新しいモノカインの一つとしてインターロイキン 6 (interleukin 6, IL 6) が注目されている。IL 6 は、ヒト B 細胞分化因子 (B cell stimulatory factor 2, BSF-2) として cDNA (complementary DNA) がクローニングされ、全構造が決定された<sup>3)</sup>。ヒト BSF-2 は 184 個のアミノ酸より構成される分子量 21,000 の蛋白で、B 細胞の抗体産生細胞への最終分化を誘導する<sup>4)</sup>。リウマチ様関節炎やシェーグレン症候群で IL 6 の異常産生が認められ、自己免疫疾患との関連も示唆されている<sup>5)</sup>。BSF-2 は cDNA クローニング後、従来より研究されていたインターフェロン  $\beta_2$  (interferon  $\beta_2$ , IFN  $\beta_2$ )<sup>6)</sup>、26kD 蛋白<sup>7)</sup>、ハイブリドマ・プラスマサイトーマ増殖因子 (hybridoma/plasmacytoma growth factor, HPGF)<sup>8)</sup>、および肝細胞刺激因子 (hepatocyte-stimulating factor, HSF)<sup>9)</sup> と同一分子であることが次々と明らかにされ、その多彩な生物活性より IL 6 と呼ばれるようになった<sup>10)11)</sup>。注目すべきは肝細胞に作用して急性期蛋白を誘導したり<sup>9)12)13)</sup>、家兎を用いた実験で熱産生を誘導したりする<sup>14)15)</sup> など B 細胞分化などの免疫反応にとどまらず炎症反応にも深く関与している点である。IL 6 の産生細胞はその生物活性と同様に多彩であるが、ヒト末梢血における主要産生細胞は単球であると考えられる<sup>16)18)</sup>。単球は *in vitro* でエンドトキシンやレクチンの刺激により培養上清中に IL 6 を分泌する。また線維芽細胞<sup>17)</sup>、血管内皮細胞<sup>19)</sup>、角化細胞<sup>20)</sup> などでも IL 6 産生が認められ、線維芽細胞による IL 6 産生は IL 1<sup>21)</sup>、TNF<sup>22)</sup> により増強されることが報告されている。このように IL 6 は他のモノカイン同様、感染や炎症あるいは組織破壊などの様々の刺激に対する生体防御反応において重要な役割を担っていると考えられる。

川崎病 (Kawasaki disease, KD) は乳幼児に好発する原因不明の急性熱性疾患で、5 日以上持続する発熱、硬性浮腫および膜様落屑などの四肢末端の変化、不定形発疹、眼球結膜の充血、口唇および口腔粘膜の発赤、非化膿性頸部リンパ球腫脹を特徴とする<sup>23)</sup>。病理組織学的には中小の動脈を主体とした全身の汎血管炎を主徴とし<sup>24)25)</sup>、特に冠動脈炎は時に動脈瘤や冠動脈血栓を伴い突然死の原因となる<sup>26)</sup>。加えて、T 及び

B リンパ球の活性化、血清免疫グロブリン値の増加、血清免疫複合体の増加などの免疫学的異常が川崎病急性期において報告されている<sup>27)28)</sup>。

今回、川崎病における血管炎や免疫異常などの病態と IL 6 との関連性を検討するために患児血清中の IL 6 活性の動態を検索した。

## 対象および方法

### I. 対 象

両親より承諾を得た 12 名の川崎病患児を対象とした。対象は男児 7 名、女児 5 名、年齢は生後 2 カ月から 5 歳 1 カ月までで平均年齢は 2 歳 3 カ月であった。川崎病の診断は、厚生省川崎病研究班の「川崎病診断の手引き」(1984 年 9 月改訂 4 版) に基づいた。本研究では川崎病の『急性期』を発病より治療開始までの有熱期間、『回復期』を臨床症状が消失し血清 C 反応性蛋白 (C-reactive protein, CRP) 値が陰性化した後の期間と定義した。また、対照として、臨床的に細菌性感染症と診断した患児 11 名、ウイルス感染症 11 名、その他の無熱性疾患 12 名を用いた。

これらの患児より採取した新鮮血より血清を分離した。分離血清は、56°C、30 分の熱処理によって非動化した後、リン酸緩衝液 (Phosphate buffered saline, PBS) (pH 7.4) で 24 時間、2 回、RPMI 1640 培養液 (Gibco laboratories, Grand Island, N. Y.) で 24 時間、1 回、透析後、0.45  $\mu$ m 異物濾過フィルターマイレクス HA (日本ミリポアリミテッド、東京) にて濾過し測定まで -20°C で凍結保存した。

### II. 血清中 IL 6 活性の測定

IL 6 活性の測定は、大阪大学細胞工学センター、平野俊夫博士より供与されたマウスハイブリドマ・クローン MH60. BSF2 (murine hybridoma clone, MH60. BSF2)<sup>30)</sup> を用いた細胞増殖反応により施行した。MH60. BSF2 は同じく平野博士より供与されたリコンビナント IL 6 (recombinant interleukin 6, rIL 6) 含有 (2U/ml) 培養液にて継代培養した。培養液は、ペニシリン (200U/ml)、ゲンタマイシン (10  $\mu$ g/ml) タイロシン (Tylocine, 60  $\mu$ g/ml)、Hepes 緩衝液 (25mM, GIBCO)、10% 非動化ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) (GIBCO) を含む RPMI1640 を用いた。継代培養後 3 日目の細胞を培養液にて 3 回洗浄したのち、IL 6 を含まない培養液で 6 時間、前培養

tritiated thymidine; IFN, interferon; IL, interleukin; KD, Kawasaki disease; MTT, 3 (4, 5-dimethylthiazoyl-2-yl) 2, 5-diphenyltetrazolium bromide; O. D., optical density; PBS, phosphate buffered saline; rIL, recombinant interleukin; TNF, tumor necrosis factor

し細胞に結合した IL 6 を除去した。前培養後、細胞を遠心し培養液にて  $1 \times 10^5$ /ml の濃度に再浮遊した。被検血清は 2 倍希釈系列を作成し、96 穴平底マイクロプレート No. 25860 (Corning Glass Works, Corning, NY) に  $100 \mu\text{l}$  ずつ分注した。各ウェルに用意した細胞を  $100 \mu\text{l}$  ずつ分注し炭酸ガス培養器 ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) 内にて 48 時間培養した。

### III. MTT 比色定量法

MH60. BSF2 の細胞増殖は、3-(4,5-dimethylthiazoyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma, St Louis, MO) を用いた比色定量法<sup>30)</sup>により評価した。培養終了 4 時間前に PBS にて 5 mg/ml に調整した MTT 色素を各ウェルに  $20 \mu\text{l}$  ずつ分注した。MTT 色素は生細胞ミトコンドリア内の脱水素酵素により MTT formazan となり紫色に発色する (図 1)。培養終了後、マイクロプレートを 1000 回転、5 分間遠心し、上清を捨て余分の色素や培養液をペーパータオルにて拭き取った。各ウェルに酸性化イソプロピルアルコール (0.04N HCl isopropanol) を  $100 \mu\text{l}$  ずつ分注し 20 分間室温に放置後、プレートミキサーを用いて緩徐に内容を混和した。アルコールに

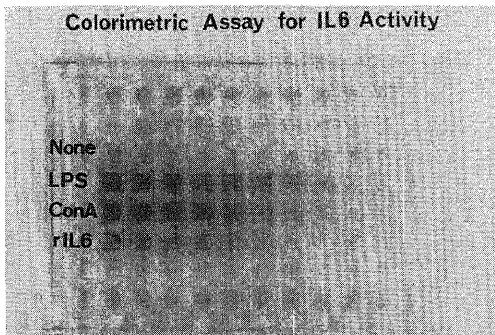


Fig. 1. Colorimetric assay for IL 6 activity. The heparinized whole blood samples were cultured for 12 hours in the polypropylene tubes either medium alone or with lipopolysaccharide ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ , LPS) or concanavalin A ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ , ConA). Plasma samples from the whole blood culture were heat-inactivated and assessed for IL 6 activity. MH60. BSF2 cells ( $1 \times 10^4$ ) were cultured for 2 days with serial dilutions of the plasma samples or the culture medium containing 4U/ml of rIL 6. After 44 hours of culture, MTT dye was added to each well ( $0.5 \text{mg}/\text{ml}$ ). Four hours later, the cells were spun down and the supernatants were discarded. Then,  $100 \mu\text{l}$  of acidified isopropylalcohol was added to each well. It was noted that wells containing IL 6 molecule made the colored MTT formazan to become purple.

より生じた蛋白沈降物が吸光度に影響を与えるのを防ぐため、 $20 \mu\text{l}$  のデタージェント溶液 (3% W/V sodium dodecyl sulfate in  $\text{H}_2\text{O}$ ) を加えた。MTT formazan の 550nm における吸光度 (optical density, O. D.) をオートマチックマイクロプレートスペクトロフォトメーター Easy Reader EAR400SF (SLT-LABINSTRUMENTS, Austria) により測定した。すべてのアッセイで、rIL 6 含有培養液 (4U/ml) を標準検体として測定を行ない、以下の方法で血清検体の IL 6 活性を算定した。グラフの横軸に希釈係数を対数表示で縦軸に相対的吸光度をとり IL 6 活性曲線を得た。曲線より各検体で最大吸光度の 50% の吸光度が得られる希釈係数を比較し、標準検体を基準とし IL 6 活性を算定した。相対的吸光度 (% O. D.) は (検体の吸光度 - 最低吸光度) / (最大吸光度 - 最低吸光度)  $\times 100$  (%) により得た。最低吸光度は検体を含まない培養液で培養を行なった場合の吸光度、最大吸光度は標準検体で得られる最大吸光度とした。平野博士より供与された rIL 6 の特異活性は IL 6 反応性 Epstein-Barr virus (Epstein-Barr virus) 感染細胞株である SKW6-CL-4 を用いたアッセイ法で  $5 \times 10^6 \text{U}/\text{mg}$  と定められている。

一部の検体は、従来のトリチウム標識チミジン (tritiated thymidine,  $^3\text{H-TdR}$ ) (New England Nuclear, Boston, MA) 取り込み法を用いて細胞増殖を判定し、MTT 比色定量法と比較した。培養終了 6 時間前に  $^3\text{H-TdR}$  を各ウェルに  $0.5 \mu\text{Ci}$  添加し、液体シンチレーションカウンター LPS-700 (アロカ、東京) にてその取り込みを測定した。

### IV. 血清 IL 6 活性の中和

血清中に含まれる IL 6 活性の特異性を検討するために抗 rIL 6 家兔血清<sup>9)</sup>を用いて中和実験を行なった。抗 rIL 6 家兔血清は平野博士より供与された。被検血清に抗 rIL 6 家兔血清あるいは非免疫コントロール家兔血清を種々の濃度添加して IL 6 活性を測定した。IL 6 活性の測定は、上述の MH60. BSF2 を用いた細胞増殖反応により施行した。

### V. 急性期蛋白の測定

IL 6 活性と同時に血清中の急性期蛋白である CRP、ハプトグロビン (Haptoglobin, Hp),  $\alpha_1$ -アンチトリプシン ( $\alpha_1$ -antitrypsin,  $\alpha_1$ -AT),  $\alpha_1$ -アシッドグリコプロテイン ( $\alpha_1$ -acid glycoprotein,  $\alpha_1$ -AG) を測定した。Hp,  $\alpha_1$ -AT,  $\alpha_1$ -AG は一元放射状免疫拡散法<sup>30)</sup>を原理としたパルチゲンプレート (Partigen) (Behringwerke AG, Marburg, W. Germany) を用いて測定した。CRP の測定は、抗

CRP 抗体を吸着した一定粒径のポリスチレンラテックスと検体中の CRP の凝集反応を濁度変化として測定する、いわゆる免疫比濁法を用いた。この方法は一元放射状免疫拡散法と極めて良好な相関性を示す事が報告されている<sup>30)</sup>。

#### VI. 統計学的処理

血清中の IL 6 活性値を自然対数に変換して、急性期蛋白濃度との Pearson の積率相関係数および回帰直線を算出した。相関係数および2群間の平均値の差の有意性の検定には *t* test を用い、 $p < 0.05$  を有意とした。

### 成 績

#### I. IL 6 に対する MH60, BSF2 増殖の特異性

最初に種々のサイトカインを用いて IL 6 に対する MH60, BSF2 増殖の特異性について検討した。図2に示すように対照として用いた rIL 6, または IL 6 を含むと考えられる線維芽細胞培養上清添加培養液では  $^3\text{H-TdR}$  の取り込みが認められるのに対し、IL 6 以外のサイトカインを添加した培養液では  $^3\text{H-TdR}$  の取

り込みが僅かで MH60, BSF2 は細胞増殖反応を示さなかった。

#### II. MTT 比色定量法と $^3\text{H-TdR}$ 取り込み法の比較

本研究では MH60, BSF2 の細胞増殖の評価に MTT 比色定量法を用いたので一般的に用いられている  $^3\text{H-TdR}$  取り込み法と比較した(図3)。培養液に rIL 6 を 4 U/ml となるように添加し方法の項で述べたように MH60, BSF2 を培養し両方法により増殖を評価した。ただしこの実験は検体の3倍希釈系列を作成し施行した。図3に示すように両方法の検量線はよく一致した。

#### III. 非働化および透析処理の必要性とその影響

健康成人より得られた血清に rIL 6 を添加して MH60, BSF2 の増殖反応を検討した(図4)。血清を無処理で用いると MH60, BSF2 の増殖の抑制が認められ、その抑制は検体の希釈が少ない部分でより顕著であった。さらに56°C30分間の加熱による非働化のみを行なった検体でも希釈の少ない部分での増殖抑制は顕著であった。加熱による非働化および透析を行なうと rIL 6 濃度に依存した MH60, BSF2 の細胞増殖反

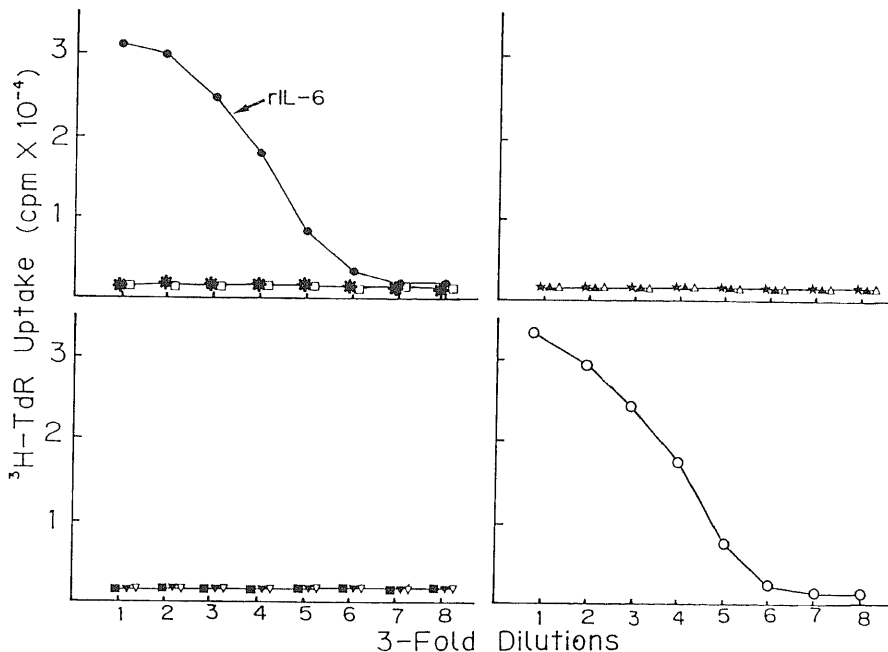


Fig. 2. Effect of IL 6 or other biological factors on the growth of MH60, BSF2. The growth activity for murine IL 6-dependent hybridoma MH60, BSF2 cells was assessed for rIL 6 or other biological factors. MH60, BSF2 cells ( $1 \times 10^4$ ) were cultured with 1ng/ml of rIL 6 (●) or 10ng/ml of either rIL 1 $\beta$  (\*), rIL 2 (□), rIL 3 (▲), rIL 4 (△) or rTNF $\alpha$  (★). The effect of rIFN- $\alpha$  (100U/ml, ■), rIFN- $\beta$  (100U/ml), (▼), rIFN- $\gamma$  (100U/ml, ▽) or fibroblast culture supernatant (10% v/v, ○) was also examined.

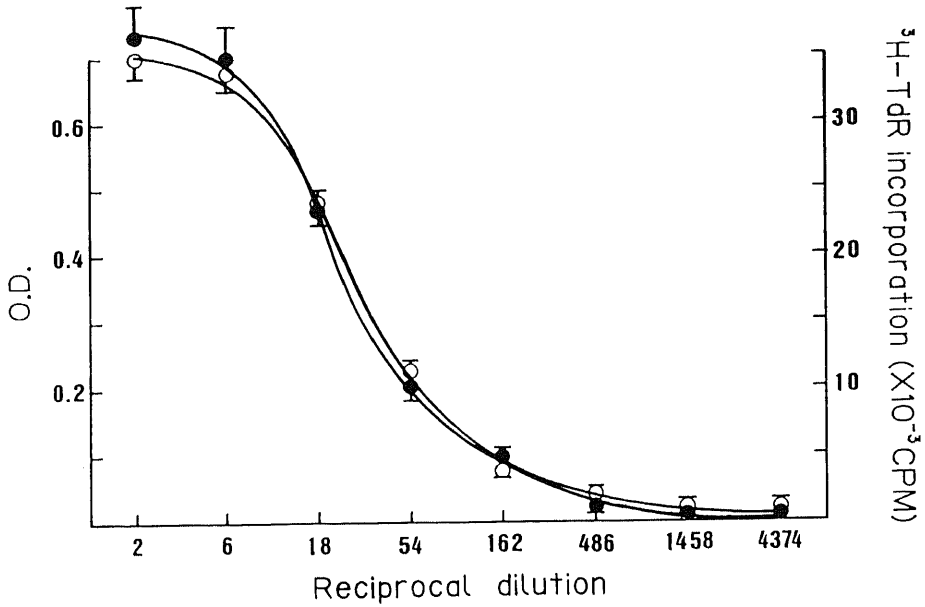


Fig. 3. Comparison of IL 6 assay between  $^3\text{H}$ -TdR incorporation and MTT colorimetric method. MH60. BSF2 cells ( $1 \times 10^4$ ) were cultured for 2 days with serial dilutions of the culture medium containing rIL 6 (4U/ml), and the cellular proliferation of MH60. BSF2 was assessed by the  $^3\text{H}$ -TdR incorporation (○) or the colorimetric method using MTT dye (●).

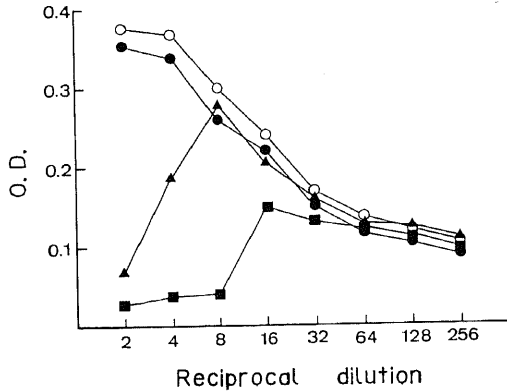


Fig. 4. Effect of heat-inactivation and dialysis of serum on MH60. BSF2 growth activity. rIL 6 was added (4U/ml) to the serum from healthy donor before heat-inactivation and dialysis. The growth activity for MH60. BSF2 were assessed for untreated (■), heat-inactivated (▲), or heat-inactivated and dialyzed (●) serum. MH60. BSF2 cells ( $1 \times 10^4$ ) were cultured with serial dilutions of the serum samples, and the cellular proliferation was measured. The serum sample to which rIL 6 was added (4U/ml) after heat-inactivation and dialysis was also assessed (○).

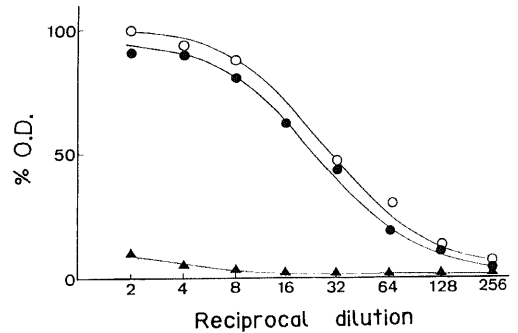


Fig. 5. Effect of serum on IL 6 bioassay. The growth activity for MH60. BSF2 cells was assessed for the serum from a healthy adult donor with (●) or without (▲) 4U/ml of rIL 6 and the culture medium with the same amount of rIL 6 (○). MH60. BSF2 cells ( $1 \times 10^4$ ) were cultured for two days together with serial dilutions of the samples, and the cellular proliferation was measured by the MTT colorimetric method. The data indicate the percentage of maximal proliferation of hybridoma cells.

応が観察された。これは、本アッセイ法に対して非特異的に細胞傷害性を発揮する透析可能な物質が血清中に含まれているためであると考えられたが、その抑制物質の詳細については明らかでない。

また非働化および透析処理の前後に rIL 6 を添加して MH60. BSF2 の増殖活性を比較した。処理の前後で増殖活性に有意な差は認められなかった。この結果より加熱および透析処理が血清中 IL 6 活性に与える影響は少ないと考えられた。

#### IV. 健康成人血清中の IL 6 活性

健康成人25名の血清 IL 6 活性を測定したが、いずれも検出感度 (0.03U/ml) 以下であった。非働化および透析済みの被検血清が IL 6 活性測定に及ぼす影響を検討するために IL 6 活性が認められなかった血清に rIL 6 を 4 U/ml となるように添加して MH60. BSF2 の増殖反応を測定し、培養液に同濃度の rIL 6 を添加した場合と比較した (図5)。血清に rIL 6 を添加した場合でも培養液に添加した場合とほぼ同様の増

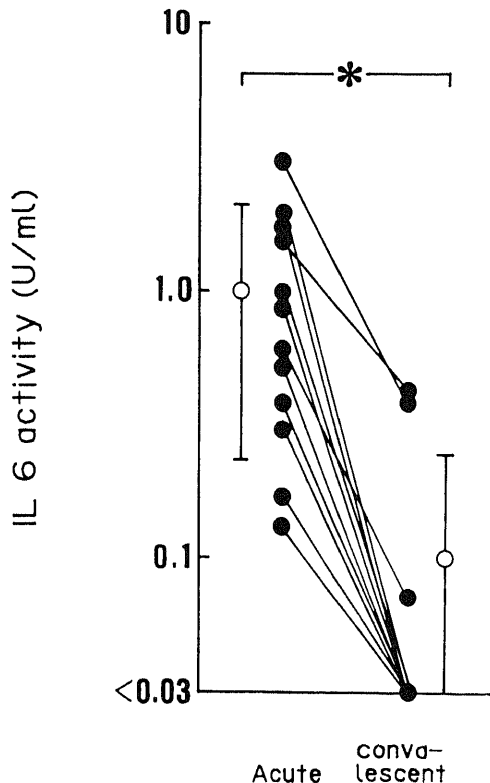


Fig. 6. IL 6 activity in serum of 12 patients with KD at the acute and convalescent phase. The mean values  $\pm$  standard deviation were indicated by open circles with vertical bars. \*,  $p < 0.001$  by  $t$  test.

殖反応が認められた。この結果より、健康成人血清で MH60. BSF2 の増殖促進活性が認められなかったのは血清中に含まれるインヒビターなどの影響ではなく、IL 6 分子含有量が極めて微量である事を直接的に反映しているものと考えられた。

#### V. 川崎病患児血清中の IL 6 活性

川崎病患児12名の血清 IL 6 活性を急性期および回復期に測定した (図6)。健康成人とは対照的に川崎病急性期患児の血清 IL 6 活性は最低 0.17U/ml, 最高 2.94U/ml と顕著に増加していた。また図に示すように IL 6 活性は、回復期には低下ないし検出感度以下となり、急性期と比較して有意の減少が認められた ( $p < 0.001$ )。これら川崎病急性期血清中に認められた MH60. BSF2 細胞増殖活性の IL 6 特異性を検討するために抗 rIL 6 家兎血清を用いて中和実験を行なった (図7)。被検血清および rIL 6 含有培養液を MH60. BSF2 の増殖度が最大増殖の70%の値が得られるように調整した後、種々の濃度の抗 rIL 6 家兎血清あるいは非免疫コントロール家兎血清を添加して残存する IL 6 活性を測定した。図に示すように川崎病急性期患児血清中の IL 6 活性はコントロール家兎血清ではほとんど影響を受けなかったのに対し、抗 rIL 6 家兎血清ではほぼ完全に中和された。これにより川崎病患児血清中に認められた MH60. BSF2 増殖活性は IL 6 特異的な活性と考えられた。

川崎病の症例で継時的に血清 IL 6 活性を測定し、川崎病の経過に伴う血清 IL 6 活性の変化を検討した。図8にその典型例を示す。本例では、診断時 IL 6 活性は 1.68U/ml と高値を示したが、解熱後徐々に低下し21病日には検出感度以下となった。血清 CRP 値も入院時 19.5mg/dl と高値であったが以後漸減し正常化した。図でみられるように血清 IL 6 活性の推移は CRP 値の変化とよく対応しているように思われた。

#### VI. 川崎病以外の発熱性疾患における血清 IL 6 活性

川崎病で認められた血清 IL 6 活性の上昇が疾患特異的であるかどうかを検討するために川崎病以外の発熱性疾患について血清 IL 6 活性を測定した (図9)。細菌感染症やウイルス感染症の症例でも血清 IL 6 活性は高値を示したが、ウイルス感染症に比して細菌感染症では有意に高く ( $p < 0.001$ )、川崎病では平均値で両者の中間の値を示した。データは提示しないが若年性リウマチ様関節炎急性期、灯油誤飲による化学性肺炎などの感染症以外の症例でも高値を示すものが認められた。このように血清 IL 6 活性の上昇は川崎病特異的な現象ではなく種々の発熱性疾患で広く認められ

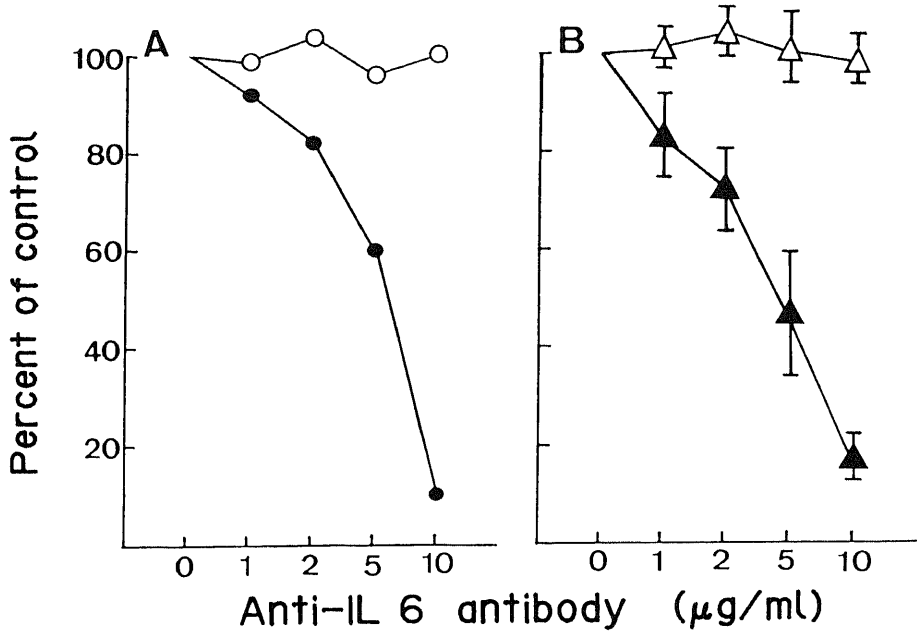


Fig. 7. Effect of anti-IL 6 antibody on the growth activity of sera from patients with acute KD for MH60. BSF2 cells. 0.2U/ml of rIL 6 (A) or sera from three patients with acute KD (B) were mixed with various concentrations of rabbit anti-IL 6 serum (closed), or nonimmune rabbit serum (open) and then tested for the residual IL 6 activity. The results represent the percentages of proliferation of MH60. BSF2 cells. Vertical bars indicate standard deviation.

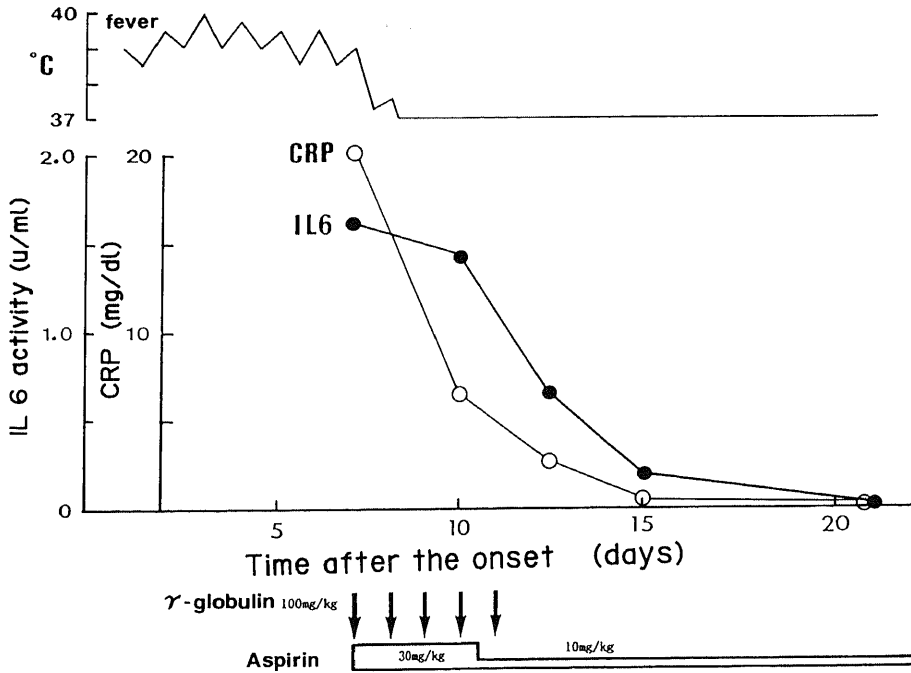


Fig. 8. Serial serum levels of IL 6 activity in a patient with KD. A typical result of serial serum levels of IL 6 activity seen in a case of KD is represented.



た。以上より、IL 6 が種々の疾患の炎症反応の際に生理的活性因子として広範に作用している事が示唆された。

#### VII. 血清 IL 6 活性と急性期蛋白との相関性

IL 1, TNF は肝細胞に作用して急性期蛋白の産生を誘導するが、単球培養上清中には、それらとは異なる物質で急性期蛋白誘導作用を有する分子が存在し肝細胞刺激因子と呼ばれていた<sup>34)</sup>。IL 6 のクローニング後、肝細胞刺激因子が IL 6 と同一分子である事が明らかとなり、IL 6 が *in vitro* および *in vivo* で急性期蛋白を誘導する事が確認された<sup>9)12)13)</sup>。そこで、川崎病や感染症疾患を含む発熱性疾患で血清 IL 6 活性と血清中の急性期蛋白量との相関性について検討した (図 10)。CRP, Hp,  $\alpha_1$ -AT,  $\alpha_1$ -AG の 4 種の急性期蛋白について検討したが、CRP ( $r=0.68$ ,  $p<0.001$ ), Hp ( $r=0.43$ ,  $p<0.01$ ),  $\alpha_1$ -AG ( $r=0.38$ ,  $p<0.01$ ) との有意の相関関係を認めこのうち CRP と最も強い相関性を認めた。血清 IL 6 活性と  $\alpha_1$ -AT との間には相関性は認められなかった。

#### 考 察

単球/マクロファージおよびその産生する IL 1,

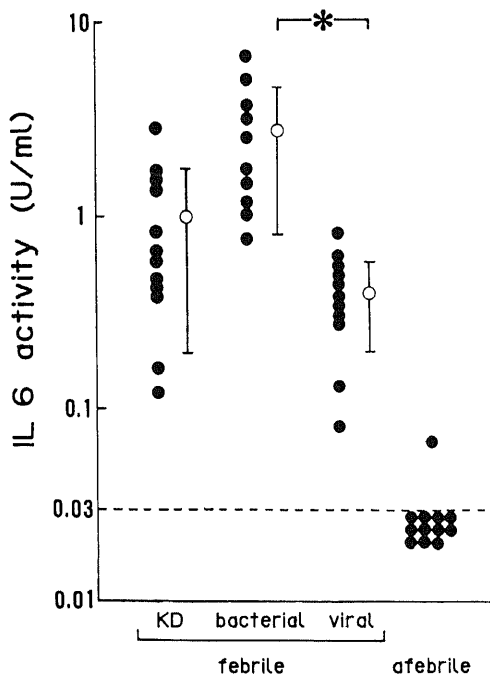


Fig. 9. Serum IL 6 activity in various febrile illness. The mean values  $\pm$  standard deviation were indicated by open circles with vertical bars. \*,  $p<0.001$  by *t* test.

TNF は微生物感染や外傷に伴う急性炎症に重要な役割を果たしている。細菌成分などの刺激により単球/マクロファージより分泌された IL 1, TNF は脳視床下部の温度中枢でのプロスタグランジン  $E_2$  (prostaglandin  $E_2$ ) の産生を亢進させ発熱を起こす。また急性炎症に伴って起こる共通の生体反応の一つは急性期蛋白と称される血漿蛋白の急速な増加である<sup>35)36)</sup>。最も大幅な増加を示すのは CRP や血清アミロイド A (serum amyloid A) 蛋白で、その他フィブリノーゲン, Hp,  $\alpha_1$ -AG,  $\alpha_1$ -AT, 補体成分などは軽度増加し、アルブミン, トランスフェリンなどは逆に減少する。従来 IL 1, TNF が肝細胞に作用しこれらの蛋白を誘導する中心的役割を果たしていると考えられてきた<sup>37)</sup>。

血管内皮細胞は炎症細胞の集積や血栓形成など局所炎症の成立に極めて積極的に関与している。IL 1 はヒト血管内皮細胞に作用してリンパ球, 好中球, 単球の内皮細胞への接着を亢進させる<sup>32)</sup>。また内皮細胞膜上にプロコアグラント活性 (procoagulant activity) を誘導したり、プラスミノゲン・アクチベーター (plasminogen activator) に対するインヒビターを産生する事により血管凝固活性を亢進させる。さらに血管内皮細胞自身もエンドトキシン<sup>37)</sup> や TNF<sup>38)</sup> の刺激により IL 1 を産生し、種々の炎症に伴う凝固異常症 (coagulopathy) に関与していると考えられている。

川崎病の血管炎の成立については未だその本態は解明されていないが、種々の免疫学的異常が報告され病態との関連が議論されている。末梢血では急性期に T リンパ球および B リンパ球の活性化, ポリクローナルな血清免疫グロブリンの増加, 血清免疫複合体の増加が認められる。また、末梢単核球に占める単球の割合が増加しており<sup>39)</sup>、それらの単球では異常に高いレベルの IL 1 の産生が認められる<sup>40)</sup>。さらに患児血清中に TNF の増加が観察されている<sup>39)</sup>。急性期の血管病変にはマクロファージ, 活性化 T リンパ球の浸潤が認められる<sup>39)</sup>。

川崎病では通常自己免疫疾患にみられる抗核抗体, 抗 DNA 抗体のような自己抗体は検出されていない<sup>41)</sup>。Leung ら<sup>42)</sup> は川崎病急性期の患児血清中に IFN- $\gamma$  で処理した血管内皮細胞に対して細胞傷害性に作用する IgM を抗体を見出した。さらに IL 1 および TNF によって血管内皮細胞に新しい表面抗原が誘導され、患児血清中のこの抗原と反応し細胞傷害性に作用する IgG および IgM 抗体が存在する事を報告している。

このように川崎病では単球/マクロファージが関与

する免疫学的異常が多く認められる。IL 1 や TNF は組織傷害の際に血管内皮細胞への炎症細胞の付着を促進し、血管凝固活性を亢進させ、内皮細胞の増殖を促進するなど血管内皮細胞の変化を誘導する。この事は川崎病で見られる冠動脈血栓と少なからず関連していると考えられるが、Leung らの実験は単球/マクロファージが産生する IL 1 や TNF などのモノカインが川崎病における血管傷害に直接的な関連を有する事を示唆するものとして興味深い。

IL 6 は T 細胞由来の B 細胞分化因子として cDNA がクローニングされたが、免疫・炎症・造血などをつ

かさどる多彩な生物学的活性を持ち、末梢血での主要産生細胞は単球である事が明らかとなった<sup>17-19</sup>。川崎病で B 細胞の活性化が認められ、IL 1, TNF で誘導される血管内皮細胞膜抗原と反応する抗体が産生されている可能性がある事、全身性炎症に伴い CRP をはじめとする急性期蛋白の増加が認められ事、血管炎の成立に単球の関与が示唆される事などから川崎病の病因・病態に IL 6 が密接に関連している可能性が考えられた。そこでこの可能性を検証するために IL 6 依存性マウスハイブリドーマ・クローン MH60. BSF2 を用いた高感度アッセイ法により川崎病患者血清中の

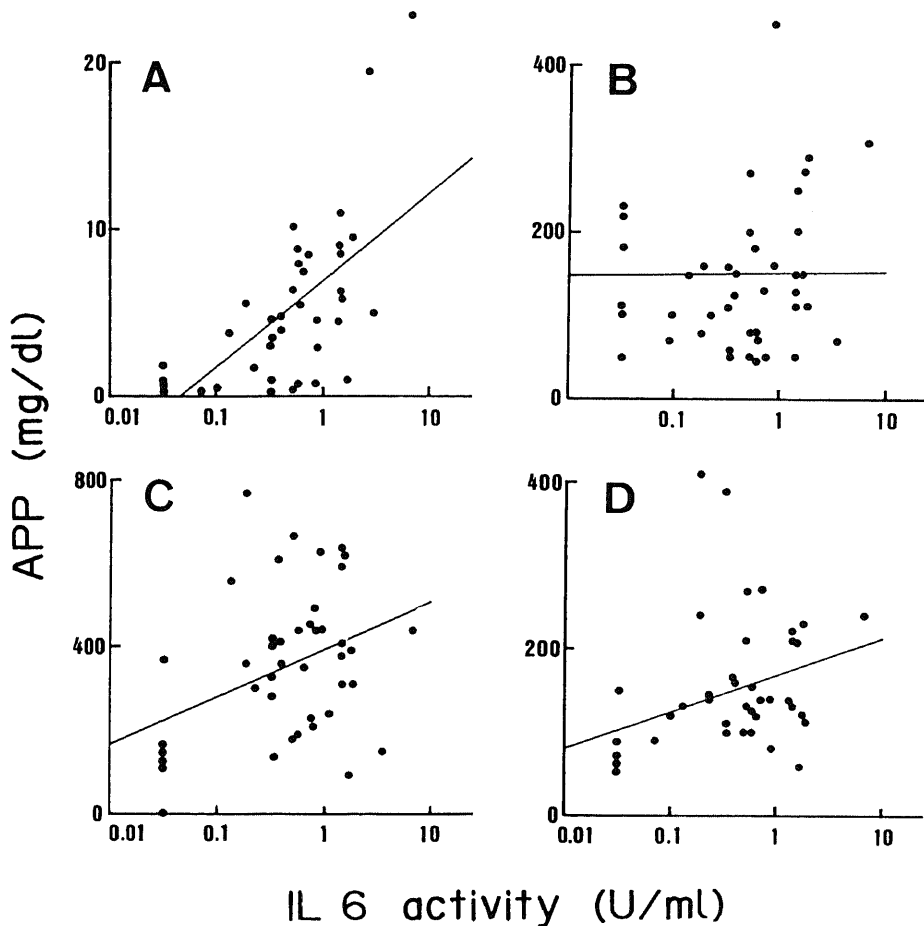


Fig.10. Correlation between serum levels of IL 6 activity and acute phase proteins (A, CRP; B,  $\alpha_1$ -antitrypsin; C, haptoglobin; D,  $\alpha_1$ -acid glycoprotein). IL 6 activity was translated into the logarithmic scale and Pearson's correlation coefficients and regression lines were obtained. Student's *t* test was used to determine the significance of the correlation coefficient and regression line: A,  $r=0.68$  ( $p<0.001$ ),  $Y=8.1+6.1X$ ; B,  $r=0.01$  (not significant),  $Y=151+1.4X$ ; C,  $r=0.43$  ( $p<0.01$ ),  $Y=400+117X$ ; D,  $r=0.38$  ( $p<0.01$ ),  $Y=170+45X$ .

IL 6 活性を測定し、その動態を検索した。

本研究では MH60. BSF2 の細胞増殖を MTT 比色定量法により評価したが、細胞増殖の判定として一般的に用いられているトリチウム標識チミジン取り込み法とよく相関した。この方法は、操作が簡便で、放射性物質を使用しないために特別の施設を必要とせず、また一度に多くの検体を処理できる利点があり臨床検査として応用可能であると思われる。

今回用いたアッセイ法の検出感度は 0.03U/ml で rIL 6 の蛋白量で 6 pg/ml と比較的微量の IL 6 も検出できると考えられるが、健康成人血清中に認められる IL 6 活性は検出感度以下で極めて微量であると考えられた。これとは対照的に川崎病急性期患児血清中では相当量の IL 6 活性が認められた。急性期以後、臨床症状の改善とともに次第に減少し、検出感度以下となった。また抗 rIL 6 家兎血清を用いた中和実験で患児血清中に認められる MH60. BSF2 増殖活性が IL 6 に特異的な活性である事を確認した。

Furukawa ら<sup>39)</sup>は川崎病血清中の TNF を測定し TNF の高い例で冠動脈病変の合併が多い事を報告している。血清 IL 6 活性も川崎病の重症度、特に冠動脈病変の合併と相関性がある可能性が考えられるが今回は冠動脈病変合併症例が少なく検討できなかった。

川崎病で認められた血清 IL 6 活性の上昇が川崎病に特異的であるのかどうかを検討する事は川崎病の病態生理を考える上で重要である。発熱を有さない非感染症の疾患では、ほとんどの例で血清中に IL 6 活性を検出できなかった。川崎病以外の発熱性疾患について血清 IL 6 活性を測定したところ細菌およびウイルス性感染症で川崎病と同程度あるいはそれ以上の IL 6 活性を認めた。若年性リウマチ様関節炎やクローン病の急性期あるいは増悪期、灯油誤飲による化学性肺炎などの感染症以外の症例でも血清 IL 6 活性は高値を示した。文献的には腎移植後の患者で特に拒絶反応が起こった場合<sup>42)</sup>や重症熱傷の患者<sup>15)</sup>で血清 IL 6 活性の上昇が報告されている。筆者の成績およびこれらの報告より循環血液中に IL 6 分子が出現する現象はその原因によらず炎症反応一般に普遍的である可能性が示唆される。IL 6 が単球、線維芽細胞、角化細胞、血管内皮細胞など多彩な細胞で産生される事はよく知られている<sup>19)~20)</sup>。IL 6 産生が他のモノカインにより増強される事も既に報告されている<sup>21)22)</sup>。例えば、川崎病においては血管炎の部位で単球、血管内皮細胞、線維芽細胞などが相互に関わりあって IL 6 が多量に産生され血液中に遊離している可能性が考えられる。また、Houssiau ら<sup>43)</sup>は細菌性およびウイルス性髄膜炎の脳

脊髄液中に高レベルの IL 6 活性を認めている。筆者もインフルエンザ菌による化膿性髄膜炎の脳脊髄液中に 4000U/ml の IL 6 活性が認められた症例を経験している。このように疾患により IL 6 の産生細胞あるいは産生部位に違いがあり、その事が病態と密接に関連している可能性が存在する。今後 IL 6 特異抗体による免疫組織化学的手法などを用いて、川崎病をはじめとする各疾患における IL 6 の主要な産生細胞/部位を確定する事により病態のより詳細な理解が期待される。

これまでの結果より発熱性疾患において IL 6 が広く炎症反応のメディエーターとして生体反応に関与している可能性が示唆された。これに関して IL 6 は肝細胞刺激因子として急性期蛋白を誘導する事が rIL 6 を用いた *in vitro* および *in vivo* の実験系で報告されている<sup>31)32)</sup>。血清中の IL 6 活性と急性期蛋白量の相関性を検討したところ、IL 6 活性は CRP, Hp,  $\alpha_1$ -AG と相関関係を示したが  $\alpha_1$ -AT との相関性は認められなかった。Darlington ら<sup>44)</sup>は、リポポリサッカライド (lipopolysaccharide) で刺激した単球の培養上清をヒト肝細胞癌継代細胞に作用させて急性期蛋白の産生を観察している。それによると急性期蛋白の種類により単球培養上清に対する反応性に違いがみられ CRP, Hp,  $\alpha_1$ -AG, フィブリノーゲン、補体第 3 成分は明らかに産生の誘導が認められたが  $\alpha_1$ -AT の産生は変化がなかった。この *in vitro* の実験で観察される急性期蛋白誘導は、単球培養上清に含まれる IL 6 をはじめとするモノカインよると考えられるが、急性期蛋白の種類による反応性の違いは本研究で示した血清中の IL 6 活性と急性期蛋白の相関性によく対応している。従来 IL 1, TNF が急性期蛋白を誘導する中心的役割を果たしていると考えられていた。しかし、CRP の誘導に関しては IL 1, TNF は肝細胞に対して直接的な誘導作用を持たず、むしろ二次的なメディエーターを誘導してそれにより急性期蛋白産生を調節する事が示唆されていた<sup>44)~46)</sup>。一方、rIL 6 をヒト肝細胞癌継代細胞あるいはヒト肝細胞に作用させると CRP が顕著に誘導され、IL 6 は直接的な誘導作用を有している事が報告されており、また本研究でも血清 IL 6 活性と CRP は最も強い相関性を示した。これらの結果から CRP の誘導に関する限り、IL 6 が他のモノカインと比較して、より主導的な役割を果たしている事が示唆された。また急性期蛋白の種類により産生調節の機構が異なる事が予想され、その複雑性が示唆された。

以上の結果より発熱性疾患をはじめとする各種炎症

反応では IL 6 は発熱、急性期蛋白誘導などのメディエーターとして広範に生体防御における重要な役割を果たしていると考えられた。また、IL 6 が産生される細胞や組織の違いにより病態に対する影響が異なる可能性もあり、各種疾患で IL 6 の動態をさらに詳細に検討する事は生体の急性炎症反応および免疫反応を理解する上で重要であると考えられた。

### 結 論

IL 6 依存性マウスハイブリドーマ・クローン MH60. BSF2 の増殖反応により川崎病および急性小児発熱性疾患における血清 IL 6 活性の動態を検討し以下の結論を得た。

1. 健康成人血清中の IL 6 活性は本研究で用いたアッセイ法の検出感度以下で極めて低いと考えられた。
2. 川崎病急性期には血清 IL 6 活性は高値を示し、回復期には低下した。
3. 細菌感染症やウイルス感染症など川崎病以外の急性小児発熱性疾患でも血清 IL 6 活性は高値を示し、疾患特異性は認められなかった。
4. 血清 IL 6 活性と急性期蛋白の相関性を検討したところ CRP, Hp,  $\alpha_1$ -AG と相関性を認め、このうち CRP と最も強い相関性を認めた。 $\alpha_1$ -AT との相関性は認めなかった。この結果は IL 6 が *in vivo* で急性期蛋白の産生を調節している事を間接的ながら支持し、急性期蛋白の種類により産生誘導機序が異なる事を示唆するものと考えられた。
5. 以上の結果より IL 6 は川崎病を含む発熱性疾患の炎症反応で生理的活性因子として広範に作用し、発熱、急性期蛋白誘導などのメディエーターとして生体防御における重要な役割を果たしていると考えられた。

### 謝 辞

稿を終るにあたり、御指導と御校閲を賜りました恩師谷口 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に感謝致します。

さらに MH60. BSF2, rIL 6, 抗 rIL 6 家兔血清を供与して頂きました大阪大学細胞工学センター、平野俊夫博士に深く御礼申し上げます。

なお、本論文の要旨は、第18回日本免疫学会総会 (1988) において発表した。

### 文 献

- 1) Dinarello, C. A.: Interleukin-1. Rev. Infect.

Dis., 6, 51-95 (1984).

- 2) Le, J. & Vilcek, J.: Biology of disease. Tumor necrosis factor and interleukin 1: Cytokines with multiple overlapping biological activities. Lab. Invest., 56, 234-248 (1987).

- 3) Hirano, T., Yasukawa, K., Harada, H., Taga, T., Watanabe, Y., Matsuda, T., Kishiwamura, 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).

- 4) Muraguchi, A., Hirano, T., Tang, B., Matsuda, T., Horii, Y., Nakajima, K. & Kishimoto, T.: The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL 6) for the terminal differentiation of B cells. J. Exp. Med., 167, 332-344 (1988).

- 5) Hirano, T., Taga, T., Yasukawa, K., Nakajima, K., Nakano, N., Takatsuki, F., Shimizu, M., Murashima, A., Tsunasawa, S., Sakiyama, F. & Kishimoto, T.: Human B-cell differentiation factor defined by an antipeptide antibody and its possible role in autoantibody production. Proc. Natl. Acad. Sci., 84, 228-231 (1987).

- 6) Sehgal, P. B., May, L. T., Tamm, I. & Vilcek, J.: Human interferon and B-cell differentiation factor BSF-2 are identical. Science, 235, 731-732 (1987).

- 7) Haegeman, G., Content, J., Volckaert, G., Derynck, R., Tavernier, J. & Fiers, W.: Structural analysis of the sequence coding for an inducible 26-kDa protein in human fibroblasts. Eur. J. Biochem., 159, 625-632 (1986).

- 8) Van Damme, J., Opendakker, G., Simpson, R. J., Rubira, M. R., Cayphas, S., Vink, A., Billiau, A. & Van Snick, J.: Identification of the human 26-kD protein, interferon  $\beta_2$  (IFN- $\beta_2$ ), as a B cell hybridoma/plasmacytoma growth factor induced by interleukin 1 and tumor necrosis factor. J. Exp. Med., 165, 914-919 (1987).

- 9) Gauldie, J., Richards, C., Harnish, D., Lansdorp, P. & Baumann, H.: Interferon  $\beta_2$  / B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein

- response in liver cells. Proc. Natl. Acad. Sci., 84, 7251-7255 (1987).
- 10) **Poupart, P., Vandenabeele, P., Cayphas, S., Van Snick, J., Haegemann, G., Krays, V., Fiers, W. & Content, J.**: B cell growth modulating and differentiating activity of recombinant human 26-kd protein (BSF-2, HuINF- $\beta_2$ , HPGF). EMBO J., 6, 1219-1224 (1987).
- 11) **Kishimoto, T. & Toshio, H.**: Molecular regulation of B lymphocyte response. Ann. Rev. Immunol., 6, 485-512 (1988).
- 12) **Castell, J. V., Gomez-Lechon, M. J., David, M., Hirano, T., Kishimoto, T. & Heinrich, P. C.**: Recombinant human interleukin-6 (IL 6/BSF-2/HSF) regulate the synthesis of acute phase proteins in human hepatocytes. FEBS Lett., 232, 347-350 (1988).
- 13) **Geiger, T., Andus, T., Klapproth, J., Hirano, T., Kishimoto, T. & Heinrich, P. C.**: Induction of rat acute-phase proteins by interleukin 6 *in vivo*. Eur. J. Immunol., 18, 717-721 (1988).
- 14) **Wong, G. G. & Clark, S. C.**: Multiple actions of interleukin 6 within a cytokine network. Immunol. today, 9, 137-139 (1988).
- 15) **Nijsten, M. W. N., De Groot, E. R., Ten Duis, H. J., Klasen, H. J., Hack, C. E. & Aarden, L. A.**: Serum levels of interleukin-6 and acute phase responses. Lancet, ii, 921 (1987).
- 16) **Aarden, L. A., De Groot, E. R., Schaap, O. L. & Lansdorp, P. M.**: Production of hybridoma growth factor by human monocytes. Eur. J. Immunol., 17, 1411-1416 (1987).
- 17) **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  $\beta_2$ -interferon/B-cell differentiation factor/hepatocyte-stimulating factor by human fibroblasts and monocytes. J. Biol. Chem., 263, 7760-7766 (1988).
- 18) **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).
- 19) **Astaldi, G. C. B., Janssen, M. C., Lansdorp, P., Willems, C., Zeijlemaker, W. P. & Oosterhof, F.**: Human endothelial culture supernatant (HECS): A growth factor for hybridomas. J. Immunol., 125, 1411-1420 (1980).
- 20) **Baumann, H., Jahreis, G. P., Sauder, D. N. & Koj, A.**: Human keratinocytes and monocytes release factors which regulate the synthesis of major acute phase plasma proteins in hepatic cells from man, rat, and mouse. J. Biol. Chem., 259, 7331-7342 (1984).
- 21) **Content, J., De Wit, L., Poupart, P., Opdenakker, G., Van Damme, J. & Billiau, A.**: Induction of a 26-kDa-protein mRNA in human cells treated with an interleukin-1-related, leukocyte-derived factor. Eur. J. Biochem., 152, 253-257 (1985).
- 22) **Kohase, M., Henriksen-DeStefano, D., May, L. T., Vilcek, J. & Sehgal, P. B.**: Induction of  $\beta_2$ -interferon by tumor necrosis factor: A homeostatic mechanism in the control of cell proliferation. Cell, 45, 659-666 (1986).
- 23) **川崎富作**: 指趾の特異的落屑を伴う小児の急性熱性皮膚粘膜淋巴结候群 (自験例50例の臨床的観察). アレルギー, 16, 178-222 (1967).
- 24) **Landing, B. H. & Larson, E. J.**: Are infantile periarteritis nodosa with coronary artery involvement and fatal mucocutaneous lymph node syndrome the same? Comparison of 20 patients from North America with patients from Hawaii and Japan. Pediatrics, 59, 651-662 (1977).
- 25) **Hirose, S. & Hamashima, Y.**: Morphological observations on the vasculitis in the mucocutaneous lymph node syndrome. Eur. J. Pediatr., 129, 17-27 (1978).
- 26) **Kato, H., Koike, S., Yamamoto, M., Ito, Y. & Yano, E.**: Coronary aneurysms in infants and young children with acute febrile mucocutaneous lymph node syndrome. J. Pediatr., 86, 892-898 (1975).
- 27) **Leung, D. Y. M., Siegel, R. L., Grady, S., Krensky, A., Meade, R., Reinherz, E. L. & Geha, R. S.**: Immunoregulatory abnormalities in mucocutaneous lymph node syndrome. Clin. Immunol. Immunopathol., 23, 100-112 (1982).
- 28) **Leung, D. Y. M., Chu, E. T., Wood, N.,**

- Grady, S., Meade, R. & Geha, R. S.: Immuno-regulatory T cell abnormalities in mucocutaneous lymph node syndrome. *J. Immunol.*, **130**, 2002-2004 (1983).
- 29) Mason, W. H., Jordan, S. C., Sakai, R., Takahashi, M. & Berstein, B.: Circulating immune complexes in Kawasaki syndrome. *Pediatr. Infect. Dis.*, **4**, 48-51 (1985).
- 30) 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-IL 6 monoclonal antibodies. *Eur. J. Immunol.*, **18**, 951-956 (1988).
- 31) Green, L. M., Reade, J. L. & Ware, 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).
- 32) Mancini, G., Carbonara, A. O. & Heremans, J. F.: Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochem.*, **2**, 235-254 (1965).
- 33) 廣瀬哲人, 平井妙子, 中尾スミ, 前田次郎: LA-SYSTEM による CRP 測定の検討. 最新検査, **1**, 23-28 (1983).
- 34) Ritchie, D. G. & Fuller, G. M.: Hepatocyte-stimulating factor: A monocyte-derived acute-phase regulatory protein. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **408**, 490-500 (1983).
- 35) 右田俊介: 急性期蛋白質. 生物物理化学, **30**, 17-24 (1986).
- 36) Kushner, I. & Mackiewicz, A.: Acute phase proteins as disease markers. *Dis. Markers.*, **5**, 1-11 (1987).
- 37) Stern, D. M., Bank, I., Nawroth, P. P., Cassimeris, J., Kisiel, W., Fenton II, J. W., Dinarello, C., Chess, L. & Jaffe, E. A.: Self-regulation of procoagulant events on the endothelial cell surface. *J. Exp. Med.*, **162**, 1223-1235 (1985).
- 38) Nawroth, P. P., Bank, I., Handley, D., Cassimeris, J., Chess, L. & Stern, D.: Tumor necrosis factor/cachectin interacts with endothelial cell receptors to induce release of interleukin 1. *J. Exp. Med.*, **163**, 1363-1375 (1986).
- 39) Furukawa, S., Matubara, T., Jujoh, K., Yone, K., Sugawara, T., Sasai, K., Kato, H. & Yabuta, K.: Peripheral blood monocyte/macrophages and serum tumor necrosis factor in Kawasaki disease. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **48**, 247-251 (1988).
- 40) Leung, D. Y. M., Geha, R. S., Newburger, J. W., Burns, J. C., Fiers, W., Lapierre, L. A. & Pober, J. S.: Two monokines, interleukin 1 and tumor necrosis factor, render cultured vascular endothelial cells susceptible to lysis by antibodies circulating during Kawasaki syndrome. *J. Exp. Med.*, **164**, 1958-1972 (1986).
- 41) Lee, L. A., Burns, J., Glode, M., Harmon, C. & Weston, W. L.: No antibodies to nuclear antigens in the Kawasaki syndrome. *N. Engl. J. Med.*, **308**, 1034 (1983).
- 42) Van Oers, M. H. J., Van Der Heyden, A. A. P. A. M. & Aarden, L. A.: Interleukin 6 (IL 6) in serum and urine of renal transplant recipients. *Clin. Exp. Immunol.*, **71**, 314-319 (1988).
- 43) Houssiau, F. A., Bukasa, K., Sindic, C. J. M., Van Damme, J. & Van Snick, J.: Elevated levels of the 26K human hybridoma growth factor (interleukin 6) in cerebrospinal fluid of patients with acute infection of the central nervous system. *Clin. Exp. Immunol.*, **71**, 320-323 (1988).
- 44) 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).
- 45) Bauman, H., Richards, C. & Gauldie, J.: Interaction among hepatocyte-stimulating factors, interleukin 1, and glucocorticoids for regulation of acute phase plasma proteins in human hepatoma (HepG2) cells. *J. Immunol.*, **139**, 4122-4128 (1987).
- 46) Ganapathi, M. K., Schultz, D., Mackiewicz, A., Samols, D., Hu, S., Brabence, A., Macintyre, S. S. & Kushner, I.: Heterogenous nature of the acute phase response. Differential regulation of human serum amyloid A, C-reactive protein, and other acute phase proteins by cytokines in Hep 3B cells. *J. Immunol.*, **141**, 564-569 (1988).

**Increase of Serum Interleukin 6 Activity in Kawasaki Disease and Other Acute Febrile Illness of Children** Yasuhisa Ueno, Department of Pediatrics School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., 98, 74—87 (1989)

**Key words** interleukin 6, acute phase proteins, Kawasaki disease

#### **Abstract**

Interleukin 6 (IL 6) has manifold biological functions involved in the immune or inflammatory responses of the host to various stimuli. The present study was undertaken to examine whether IL 6 is responsible for clinical manifestations of Kawasaki disease (KD), such as immunoglobulin hypersecretion, lymphocyte activation and systemic vasculitis. IL 6 activity in the serum was determined by a sensitive colorimetric modification of the bioassay using an IL 6-dependent murine hybridoma clone, MH60.BSF2. Usually, sera from healthy or afebrile donors contained undetectable levels of IL 6 activity with this method. The detection threshold of IL 6 activity in this study was 0.03 U/ml, that corresponds to 6 pg/ml of recombinant IL 6. It was found that serum IL 6 activity was markedly elevated in all patients with acute KD. Serum levels of IL 6 activity gradually diminished with the improvement of manifestations and became hardly detectable at the convalescent phase of the disease. However, elevation of serum IL 6 activity was also observed in almost all the acute febrile diseases, indicating that the appearance of IL 6 in the serum is a rather general phenomenon in febrile and inflammatory disease conditions. In addition, serum levels of IL 6 were usually higher in bacterial infections than viral infections ( $p < 0.001$ ). It has been shown that IL 6 has biological activity to mediate the induction of acute phase proteins (APPs). Serum level of IL 6 activity was well correlated to serum concentrations of many acute phase proteins, such as C-reactive protein, haptoglobin and  $\alpha_1$ -acid glycoprotein. However, no significant correlation was observed between serum IL 6 activity and  $\alpha_1$ -antitrypsin levels. This result implied that IL 6 plays a key role for modulating induction of APPs *in vivo*, and that some different mechanisms might be involved in the induction of each of various human APPs. IL 6 is well known to be secreted by a variety of cell types. Therefore, it should be elucidated by further studies including immunohistochemical analysis whether the source of serum IL 6 in various disease conditions is different in the types of IL 6-producing cells or in the major sites of the production.