無菌性髄膜炎における髄液中のインターロイキン-6の上昇

福島啓太郎・石黒 精^{*1)}、中村岳征^{*2)}、鈴木洋子^{*3)}、永山章一郎・
阿部雅章・梅沢哲郎^{*1)}、中畑龍俊・小宮山淳^{*4)}、新保敏和^{*1)}

Elevated levels of interleukin 6 in the cerebrospinal fluid in childhood aseptic meningitis

We have studied levels of interleukin 6 (IL-6) in the cerebrospinal fluid (CSF) from children with aseptic meningitis, using an enzyme-linked immunosorbent assay. We have also studied whether cells in the CSF can produce IL-6 *in vitro*. The patients' CSF contained significantly higher levels of IL-6 than those of the controls, during the first two days of the illness. However, after the first two days, the IL-6 titer rapidly decreased, even in patients who had clinical symptoms of meningitis. Furthermore, when CSF mononuclear cells in the acute phase were cultivated for 24 hours, the culture supernatant contained IL-6. But we did not detect IL-6 in the patients' sera at the initial stage of the disease. IL-6 levels in the CSF correlated with both the number of cells in the CSF and the highest body temperature within the first two days of the illness.

These observations demonstrate that the IL-6 concentration of the CSF increases at the initial stage of aseptic meningitis, and that the IL-6 is derived, at least in part, from the CSF mononuclear cells.

Keitaro Fukushima・Akira Ishiguro^{*1)},
Takeyuki Nakamura^{*2)}, Yohko Suzuki^{*3)},
Shoichiro Nagayama・Masaaki Abe・
Tetsurow Umezawa^{*1)}, Tatsutoshi Nakahata・
Atsushi Komiyama^{*4)}, Toshikazu Shimbo^{*1)}

key words: aseptic meningitis, interleukin 6, cerebrospinal fluid

インターロイキン (IL)-6 は、活性化 B 細胞の抗体産生細胞への分化を促進するサイトカインとして発見された^{1,2)}。その後、T 細胞の活性化や分化の誘導^{3,4)}、肝細胞による急性蛋白産生の誘導^{5,6)}、神経成長因子様活性⁷⁾、IL-3 との共同による多能性造血幹細胞の増殖刺激⁸⁾などの、多彩な作用を有することが報告された。すなわち、IL-6 は免疫、造血、炎症などの急性期反応に際

し、重要な役割を担っているといえる^{9,10)}。その産生は T 細胞¹¹⁾のほか、単球¹¹⁾、線維芽細胞¹²⁾、血管内皮細胞¹³⁾やメサングウム細胞などからもみられることが明らかにされた¹⁴⁾。近年、種々の炎症性疾患における体液中の IL-6 が検討され、メサングウム増殖性腎炎の尿¹⁵⁾や慢性関節リウマチの関節液¹⁶⁾などで高値を示すことが報告された。

無菌性髄膜炎の髄液中には、T 細胞を主体とするリンパ球の増加がみられる。なかでも活性化 T 細胞の比率が高い¹⁷⁾。そして、その回復期には“oligoclonal band”とよばれる IgG 抗体が髄液中にあらわれる。これら T および B 細胞の活性化という所見は、本症の病態に IL-6 が関与している可能性を推測させる。

今回、IL-6 の生物学的意義や臨床的有用性を捉えることを目的として、無菌性髄膜炎における髄液中の IL-6 の動態について調べ、臨床的指標との相関や髄液細胞の IL-6 産生能について検討したので報告する。

対象と方法

(1) 対象

対象は無菌性髄膜炎児15名であり、これを患児群とした。無菌性髄膜炎の診断基準は、発熱、頭痛、嘔吐、項部強直の症候が存在し、髄液細胞数が 35/ μ l 以上で、しかも髄液の細菌検査が陰性であることとした。患児はエコー30型ウイルスの流行時のものであり、血清抗体価(中和反応)をペアで検討した8例中5例で同ウイルスの抗体価が上昇していた。したがって、患児群はウイルス性髄膜炎が主体と考えられる。

対照群には髄液細胞数が 5/ μ l 以下の12例を選んだが、その内訳は、高熱精査のため髄液検査を施行した急性上気道炎6例、痙攣重積のてんかん3例と熱性痙攣3例であった。患児群と対照群はそれぞれ、男女比 11:4 と 6:6、年齢 7.0 $\pm$ 4.5 歳(平均 $\pm$ 標準偏差)と 5.9 $\pm$ 6.8 歳、髄液蛋白 28

^{*1)} Department of Pediatrics, ^{*2)} Department of Pharmacy, ^{*3)} Research Center, Mizonokuchi Hospital, Teikyo University School of Medicine ^{*4)} 帝京大学医学部附属溝口病院小児科, ^{*2)} 同 薬剤部, ^{*3)} 同 中央実験室 ^{*4)} Department of Pediatrics, Shinshu University School of Medicine 信州大学医学部小児科学教室

図1 髄液中の IL-6 濃度
図中の横線は各群の平均値を示す。

± 22 mg/ml と 23 ± 12 mg/ml, 髄液糖 62 ± 15 mg/ml と 64 ± 16 mg/ml であった。これらの項目において、患児群と対照群との間に有意差は認められなかった。

(2) 髄液と血清の採取

髄液は親の同意を得てから、腰椎穿刺を行い採取した。髄液を 150 g で10分間遠心後、その上清を集め、 -30°C で凍結保存した。また髄液と同時に血液も採取し、血清を凍結保存した。

(3) 髄液細胞の培養

患児の髄液から、Ficoll-Conray (比重 1.077) による比重遠心法にて髄液単核細胞を分離した。その単核細胞 1×10^6 個を 10% 熱非動化胎児ウシ血清(Gibco)と 25 mM HEPES (同仁化学)を含む 1 ml の RPMI 1640培養液(日水製薬)に浮遊した。 37°C , 5% CO_2 下で24時間培養後、その上清を凍結保存した。

(4) 免疫酵素抗体法(ELISA)による IL-6 の測定

IL-6 の測定にはヒト IL-6 ELISA キット(トーレ・フジバイオニクス)¹⁸⁾を用いた。測定法の概略は以下のとおりである。まず、抗ヒト IL-6 モノクローナル抗体を結合させたマイクロプレートに検体 $100 \mu\text{l}$ を添加し、室温下で2時間反応させた。洗浄後、ビオチン標識抗ヒト IL-6 モノクローナル抗体を添加し、室温下で1時間反応させた。再び洗浄後、アビジン-ペルオキシダーゼ複合体を添加し、室温下で30分間反応させた。再

図2 髄液 IL-6 濃度の経時的変化

●：第2病日以内、▲：第3病日以降で臨床症状を有する症例、○：臨床症状消失後

度洗浄後、オルトフェニレンジアミン加 0.015% 過酸化水素水 $100 \mu\text{l}$ を添加して、室温下で1時間発色反応を行った。

最後に、2N 硫酸 $100 \mu\text{l}$ を加えて反応を停止し、マイクロプレート吸光度計(SLT-Lab Instruments SLT-210)にて 490 nm の吸光度を測定した。標準ヒト天然型 IL-6 の吸光度より作成した検量線を用いて検体中の IL-6 濃度を求めた。最小検出濃度は 25 pg/ml であった。なお、髄液細胞の培養に用いた培養液中のヒト IL-6 濃度は 25 pg/ml 未満であった。

(5) 統計学的検定

2群間の差の検定には Mann-Whitney U-検定を、相関性の検定には Pearson の相関係数を用いた。なお、最小検出濃度未満は 24 pg/ml として計算したが、この値は 0~24 pg/ml のいずれの値を用いても結果に影響しなかった。

結 果

(1) 髄液 IL-6 濃度の経時的変化

発熱、頭痛、嘔吐のいずれかの症状があらわれた日を第1病日とした。第2病日以内の髄液 IL-6 濃度は 514 ± 525 pg/ml (平均 $\pm$ 標準偏差)であり、最高 1,743 pg/ml, 最低 50 pg/ml であった(図1)。これは対照群の 25 ± 3 pg/ml にくらべて有意に高値であった($P < 0.01$)。しかし、第3病日以

表 1 髄液と血清中の IL-6 濃度の比較

	IL-6 濃度(pg/ml)		
	第2病日以内	第3病日以降 症状あり	症状消失後
髄液	514±525* ¹⁾ (N=13)	38±23(N=5)	31 (N=1) 感度以下(N=7)
血清	35* ²⁾ (N=1) 感度以下(N=6)	35* ²⁾ (N=1) 感度以下(N=2)	27* ²⁾ (N=1) 感度以下(N=5)

*¹⁾ 血清中 IL-6 に比し有意に高値(P<0.01).

*²⁾ 同一症例

表 2 髄液単核細胞培養上清中の IL-6 濃度

症* 例	病 日	培養上清中 IL-6 濃度 (pg/ml)	採取した髄液の所見		
			細胞数 (/μl)	単核細胞数 (/μl)	IL-6 濃度 (pg/ml)
1	2	127	145	121	416
2	2	88	112	107	343
3	6	45	66	66	<25
4	5	32	64	60	<25
5	3	<25	61	58	31

* 培養上清中 IL-6 濃度の高い順で症例をならべた.

降になると、IL-6 濃度は急速に低下した(図2). 臨床症状を有していても第3病日以降の症例(図2の▲印)では、IL-6 濃度は 38±23 pg/ml と、第2病日以内(図2の●印)にくらべ有意に低値であった(P<0.01). なお、発熱、頭痛、嘔吐、項部強直のすべてが消失した回復期(図2の○印)の IL-6 濃度は1例を除き感度以下であり、症状を有する時期にくらべ有意に低値であった(P<0.01).

(2) 血清 IL-6 濃度の検討

第2病日以内では、髄液 IL-6 濃度は同時に採取した血清濃度にくらべ全例で高値を示した(表1, 第2病日以内 P<0.01). 一方、血清 IL-6 濃度は経過中変化を示さず、症状消失後も 27 pg/ml を示した1例を除けば、全例で感度以下であった.

(3) 髄液細胞の培養上清中 IL-6 の検討

培養上清中の IL-6 濃度を病日、採取した髄液所見との関係で表2に示した. 髄液単核細胞を培養すると、5例中4例で IL-6 の産生が認められた. 検討できた症例はまだ少数ではあるが、第2病日に採取した髄液単核細胞はそれ以降に採取した細胞にくらべ、より多くの IL-6 を産生していた. また、髄液中の単核細胞数が多い症例ほど、

図3 髄液細胞数と髄液 IL-6 濃度

第2病日以内で正の相関が認められた. $r=0.734$, $P<0.01$.

●: 第2病日以内, ▲: 第3病日以降で臨床症状を有する症例, ○: 臨床症状消失後

IL-6 産生能が高い傾向にあった.

(4) 髄液 IL-6 濃度と臨床的指標との相関性

まず、髄液 IL-6 濃度と髄液細胞数との関係を図3に示した. 第2病日以内では、髄液 IL-6 濃度と細胞数との間に有意な正の相関関係($r=0.734$, $P<0.01$)が得られた. しかし、第3病日以降では症状の有無にかかわらず、IL-6 濃度には髄液細胞数との間に一定の関係は認められなかった.

さらに、症状を有する時期で髄液 IL-6 濃度と当日の最高体温との関係を検討すると、正の相関関係($r=0.840$, $P<0.001$)が認められた(図4). しかし、その発熱持続期間との間には一定の傾向は得られなかった(成績省略).

その他の臨床的指標、すなわち、頭痛、嘔吐、項部強直の程度や持続期間、髄液の糖や蛋白濃度、末梢血の白血球数や CRP 値と髄液 IL-6 濃度との間に有意な相関性は認められなかった(成績省略).

考 察

無菌性髄膜炎で髄液 IL-6 濃度が増加することは、Houssiau ら¹⁹⁾や Frei ら²⁰⁾がすでに報告している. しかし、髄液 IL-6 濃度の経時的变化については下記の松蘭ら²¹⁾の報告があるにすぎない. すなわち、髄液 IL-6 濃度は入院時には高値を示

図4 最高体温と髄液 IL-6 濃度

臨床症状を有する時期に髄液を採取した18例について当日の体温の最高値と髄液 IL-6 濃度との関係を示す。 $r=0.840$, $P<0.001$

●: 第2病日以内, ▲: 第3病日以降で臨床症状を有する症例

したが、入院5日目以降では測定感度以下になったという。

われわれは髄液 IL-6 濃度の時間的推移に注目し、その変動と臨床経過との関連性について検討を加えた。われわれの観察結果では、第2病日以内の発病初期に髄液 IL-6 濃度は全例で 50 pg/ml 以上の高値を示した。しかし、第3病日以降になると、頭痛、嘔吐、項部強直などの髄膜刺激症状の有無にかかわらず、IL-6 濃度は急速に低下した。以上の結果より、髄液中の IL-6 は無菌性髄膜炎の急性期に上昇するが、局所の炎症の終焉とともに消失していくのではなく、炎症の初期にのみ上昇しうると考えられた。

発病初期における髄液 IL-6 の経時的变化について以下の動物実験での報告がある。マウスの lymphocytic choriomeningitis virus による髄膜炎²²⁾では、髄液細胞の増加は感染後7日目から始まるが、髄液 IL-6 濃度は5日目から急速に上昇し、7日目にはピーク値となり、その後低下するという。この成績から、ウイルス性髄膜炎での髄液 IL-6 濃度の増加は髄液細胞数の増加より早くから始まることが予想される。

ヒトでは発症前後の詳細な検討は行いえないが、われわれの観察結果でも少数例において、実

験動物での観察と同様、髄液 IL-6 濃度のピークが髄液細胞数のピークより早い症例も認められた。

つぎに、無菌性髄膜炎の発病初期において髄液 IL-6 が増加する生物学的意義について考えてみる。これまでの報告から、髄液 IL-6 は、①抗体産生の誘導、②活性化T細胞の増殖、③神経組織の修復に係わっていることが考えられる。以下順を追って検討していくと、① IL-6 はB細胞の抗体産生細胞への分化を誘導²⁾する。無菌性髄膜炎の回復期には oligoclonal band とよばれる IgG 抗体があらわれることが知られており、髄液 IL-6 の上昇がこの抗体産生に関与している可能性が考えられる。② IL-6 にはT細胞の活性化や分化を誘導する活性^{3,4)}があり、無菌性髄膜炎でみられる髄液中の活性化T細胞の増加¹⁷⁾に関連している可能性もある。特に、髄液 IL-6 が発病初期にのみ増加することは、①や②のリンパ球の増殖や活性化に作用する可能性を支持する。③ IL-6 は星状膠細胞からの神経成長因子(NGF)の産生を誘導するとの報告²³⁾があることから、障害された神経の修復に NGF を介して作用する可能性もあげられる。

今回、われわれは髄液中の IL-6 の由来についても検討した。第2病日以内の急性期では、髄液 IL-6 濃度が同時に採取した血清濃度より著明に高かった。しかも、血清 IL-6 濃度は経過中ほとんど変動を示さなかった。このことから、無菌性髄膜炎児の髄液中に増加する IL-6 は血液中からの移行と考えるよりは、局所で産生されたものと思われた。局所での IL-6 の産生を証明するため、髄液単核細胞を培養したところ、その培養上清中に IL-6 が検出された。中枢神経系における IL-6 産生については、これまでに星状膠細胞による産生^{23,24)}が報告されている。

本論文での検討から、髄液中に増加する単核細胞にも IL-6 産生能があることが確かめられた。無菌性髄膜炎の髄液細胞はT細胞が主体であり¹⁷⁾、それらのT細胞から IL-6 が産生されている可能性が高いと思われた。しかし、今回は採取細胞数の関係から IL-6 産生細胞の性状については十分に検討できなかった。今後検討を加えていくつもりである。

最後に、急性期にみられる臨床的指標との関係で、髄液 IL-6 濃度は最高体温との間に正の相関

を示した。これまでに IL-1 が体温を上昇²⁵⁾させることは知られているが、IL-6 については解明されていない。IL-6 を家兎に静注すると発熱するとの報告²⁶⁾もあり、今後の検討が必要であろう。また、第2病日以内では髄液 IL-6 濃度と髄液細胞数との間に正の相関関係が認められた。このことから、IL-6 の測定法がさらに簡便化できれば、発病初期の指標として臨床的にも有用なものとなりうるであろう。

結 語

無菌性髄膜炎では第2病日以内という発病初期に髄液中の IL-6 が増加していたが、その後は急速に低下した。しかも初期の増加は髄液細胞数、当日の最高体温との間に正の相関関係を示した。さらに一部の実験で髄液単核細胞から IL-6 が産生されていることがうかがわれた。今後、髄液 IL-6 濃度が無菌性髄膜炎の発病初期の1指標として利用できる可能性が示唆された。

本論文の要旨は、第13回日本炎症学会(平成4年6月、京都)において発表した。

文 献

- 1) Yoshizaki, K., Nakagawa, T., Kaieda, T., Muraguchi, A., Yamamura, Y., Kishimoto, T.: Induction of proliferation and Ig production in human B leukemic cells by anti-immunoglobulins and T cell factors. *J. Immunol.* 128: 1296-1301, 1982.
- 2) 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.
- 3) Lotz, M., Jirik, F., Kabouridis, P., Tsoukas, C., Hirano, T., Kishimoto, T., Carson, D.A.: B cell stimulating factor 2/interleukin 6 is a costimulant for human thymocytes and T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 167: 1253-1258, 1988.
- 4) Takai, Y., Wong, G.G., Clark, S.C., Burakoff, S.J., Herrmann, S.H.: B cell stimulatory factor-2 is involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.* 140: 508-512, 1988.
- 5) Gauldie, J., Richards, C., Harnish, D., Lansdorp, P., Baumann, H.: Interferon β_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. USA* 84: 7251-7255, 1987.
- 6) Andus, T., Geiger, T., Hirano, T., Northoff, H., Ganter, U., Bauer, J., Kishimoto, T., Heinrich, P.C.: Recombinant human B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IFN- β_2) regulates β -fibrinogen and albumin mRNA levels in Fao-9 cells. *FEBS Lett.* 221: 18-22, 1987.
- 7) Satoh, T., Nakamura, S., Taga, T., Matsuda, T., Hirano, T., Kishimoto, T., Kazi, Y.: Induction of neuronal differentiation in PC12 cells by B-cell stimulatory factor 2/interleukin 6. *Mol. Cell Biol.* 8: 3546-3549, 1988.
- 8) Koike, K., Nakahata, T., Takagi, M., Kobayashi, T., Ishiguro, A., Tsuji, K., Naganuma, K., Okano, A., Akiyama, Y., Akabane, T.: Synergism of BSF-2/interleukin 6 and interleukin 3 on development of multipotential hemopoietic progenitors in serum-free culture. *J. Exp. Med.* 168: 879-890, 1988.
- 9) Kishimoto, T.: The biology of interleukin-6. *Blood* 74: 1-10, 1989.
- 10) Hirano, T.: Interleukin-6. The cytokine handbook (ed. Thomson, A.W.) Academic Press, London, 1991, p 169-190.
- 11) 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.
- 12) Helgott, D.C., May, L.T., Sthoeger, Z., Tamm, L., Sehgal, P.B.: Bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) enhances expression and secretion of β_2 interferon by human fibroblasts. *J. Exp. Med.* 166: 1300-1309, 1987.
- 13) Jirik, F.R., Podor, T.J., Hirano, T., Kishimoto, T., Loskutoff, 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.
- 14) Hirano, T., Kishimoto, T.: Interleukin-6. Peptide growth factors and their receptors, Handbook of experimental pharmacology (ed. Sporn, M.B., Roberts, A.B.), Springer-Verlag, Berlin, 1990, 95, p 633-665.
- 15) Horii, Y., Muraguchi, A., Iwano, M., Matsuda, T., Hirayama, T., Yamada, H., Fujii, Y., Dohi, K., Ishikawa, H., Ohmoto, Y., Yoshizaki, K., Hirano, T., Kishimoto, T.: Involvement of IL-6 in mesangial proliferative glomerulonephritis. *J. Immunol.* 143: 3949-3955, 1989.
- 16) Hirano, T., Matsuda, T., Turner, M., Miyasaka, N., Buchan, G., Tang, B., Sato, K., Shimizu, M., Maini, R., Feldmann, M., Kishimoto, T.: Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.* 18: 1797-1801, 1988.

- 17) Uchihara, T., Ikeda, M., Takahashi, H., Yoshida, S., Tsukagoshi, H.: CSF lymphocyte subsets in aseptic meningitis: dual-labelling analysis with flow cytometry. *Acta Neurol. Scand.* 81: 468-470, 1990.
- 18) Ida, N., Sakurai, S., Hosaka, T., Hosoi, K., Kunitomo, T., Matsuura, Y., Kohase, M.: An enzyme-linked immunosorbent assay for the measurement of human interleukin-6. *J. Immunol. Methods* 133: 279-284, 1990.
- 19) 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.
- 20) Frei, K., Nadal, D., Fontana, A.: Intracerebral synthesis of tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in infectious meningitis. *Ann. NY Acad. Sci.* 594: 326-335, 1990.
- 21) 松岡嘉裕, 富樫武弘, 成田光生, 柴田睦郎, 鮑津泰史: 感染症罹患時の髄液中 Interleukin-6 濃度—ELISA 法による測定—. *日児誌* 96: 1723-1728, 1992.
- 22) Frei, K., Leist, T.P., Meager, A., Gallo, P., Leppert, D., Zinkernagel, R.M., Fontana, A.: Production of B cell stimulatory factor-2 and interferon γ in the central nervous system during viral meningitis and encephalitis: evaluation in a murine model infection and in patients. *J. Exp. Med.* 168: 449-453, 1988.
- 23) Frei, K., Malipiero, U.V., Leist, T.P., Zinkernagel, R.M., Schwab, M.E., Fontana, A.: On the cellular source and function of interleukin 6 produced in the central nervous system in viral diseases. *Eur. J. Immunol.* 19: 689-694, 1989.
- 24) Lieberman, A.P., Pitha, P.M., Shin, H.S., Shin, M.L.: Production of tumor necrosis factor and other cytokines by astrocytes stimulated with lipopolysaccharide or a neurotropic virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6348-6352, 1989.
- 25) Dinarello, C.A.: Interleukin-1. The cytokine handbook (ed. Thomson, A.W.), Academic Press, London, 1991, p 47-82.
- 26) Helle, M., Brakenhoff, J.P.J., de Groot, E.R., Aarden, L.A.: Interleukin 6 is involved in interleukin 1-induced activities. *Eur. J. Immunol.* 18: 957-959, 1988.