

ヒト増殖性糸球体疾患におけるインターロイキン6の 腎組織内分布

奈良県立医科大学第1内科学教室

松村典彦

DISTRIBUTION OF INTERLEUKIN-6 IN HUMAN PROLIFERATIVE GLOMERULONEPHRITIDES

NORHIKO MATSUMURA

The First Department of Internal Medicine, Nara Medical University

Received July 17, 1992

Summary: The present study was designed to clarify the relationship between the intrarenal distribution of interleukin-6 (IL-6), urinary IL-6 activity, clinical features and renal pathology in human proliferative glomerulonephritides.

Nine specimens of normal kidney tissue from surgically resected kidney and 59 renal biopsy specimens obtained from 43 patients with mesangial proliferative glomerulonephritis (mesPGN), including IgA nephropathy (IgA-GN) and non-IgA nephropathy (non-IgA-GN), and 16 cases of lupus nephritis (LN) were examined by indirect immunofluorescence microscopy using monoclonal antibody specific to human recombinant IL-6. In addition, urinary IL-6 activity was measured using an IL-6 dependent murine hybridoma clone, MH 60. BSF 2.

In both the normal kidney and the diseased kidney, IL-6 was observed in the mesangial area in a fine granular fashion and visible in cytoplasm of both visceral epithelial cells and Bowman's epithelial cells. IL-6 was also observed in vascular smooth muscle cells. However, IL-6 was decreased in intensity in sclerotic lesions. In diseased kidneys, IL-6 was found in atrophic tubules. The grade of mesangial IL-6 staining correlated significantly with the degree of mesangial proliferation. Moreover, the grade of mesangial IL-6 staining tended to show an inverse relationship with the positive number of visceral epithelial cells. Urinary IL-6 activity increased significantly in proportion to the degree of mesangial proliferation as well as the grade of mesangial IL-6 staining. In patients with mesPGN, urinary IL-6 activity showed a significant correlation with the severity of the tubulointerstitial lesion. Finally, in patients with IgA-GN, there appeared no obvious relationship between the distribution of IL-6 and that of IgA in the double immunofluorescence.

These results suggest that the grade of mesangial IL-6 staining and urinary IL-6 activity reflect the severity of mesangial proliferation, and that IL-6 may play an important role in human proliferative glomerulonephritides.

Index Terms

IL-6 staining of mesangial cells, mesangial proliferation, urinary IL-6 activity

緒 言

最近、免疫学の急速な進歩に伴い、糸球体腎炎の発症・進展に多数のサイトカインや成長因子の関与することが明らかにされてきた¹⁻⁴⁾。なかでも、インターロイキン1 (IL-1)⁵⁾、インターロイキン6 (IL-6)⁶⁾、インスリン様成長因子(IGF-1)⁷⁾や血小板由来成長因子(PDGF)⁸⁾などについてメサンギウム細胞増殖促進作用が指摘されている。教室のHorii, et al.⁹⁾はIL-6について、ラット培養メサンギウム細胞の自己分泌性増殖因子(autocrine growth factor)でもあることを明らかにした。またSuematsu, et al.⁹⁾は、IL-6トランスジェニックマウスを作製し、そのマウス血清中に高度のIL-6活性が認められたことと、腎に高度のメサンギウム増生が観察されたことを報告している。Horii, et al.⁹⁾は健康人の尿中には検出されないIL-6活性がメサンギウム増殖性糸球体腎炎(mesPGN)患者で認められていることを報告し、教室のDohi, et al.¹⁰⁾は尿中IL-6活性がIgA腎症(IgA-GN)患者の予後判定因子として有用であることを明らかにしている。教室の岩野¹¹⁾は、RT-PCR(reverse transcription-polymerase chain reaction)法を用いて、IgA-GN患者の糸球体内にIL-6 mRNAの発現が認め

られたと報告している。以上の成績は、いずれもヒトmesPGNの発症・進展にIL-6が関与していることを示唆したものであるが、メサンギウム増生を特徴とするループス腎炎(LN)においても尿中IL-6活性が経過観察の指標として有用であることが報告されている¹²⁾。しかし現在のところ、ヒトmesPGNにおけるIL-6の腎組織内分布について検討した報告はFukatsu, et al.¹³⁾以外に見当たらない。しかもIL-6の腎糸球体内分布と尿中IL-6活性、臨床所見および病理組織所見との関係について検討した研究はない。そこで著者は、mesPGNとLNの両者におけるIL-6の腎組織内分布を免疫組織学的に観察し、尿中IL-6活性、臨床所見および病理組織所見との関係を検討した。

対象と方法

1. 対象

対象は、奈良県立医科大学等1内科およびその関連病院において腎生検を実施したmesPGN 43例およびLN 16例の計59例である。(Table 1)。またmesPGNの内訳はIgA-GN 35例および非IgA腎症(non-IgA-GN) 8例である。

IgA-GN^{14,15)}は、蛍光抗体法によってメサンギウムに

Table 1. Clinical features in the subjects

Glomerular changes	No. of cases	Sex male /female	Age (average)	No. of cases with		Scr (mg/dl)	Ccr (ml/min)	UP (g/day)
				Hematuria	Hypertension			
mesPGN								
I	10(6) ^a	6/4	15~47 (25)	6(60%)	2(20%)	0.7±0.1	108.4±6.5	0.2±0.1
II	21(2) ^a	5/16	13~63 (35)	14(67%)	2(10%)	0.7±0.1	106.8±8.1	0.5±0.1
III	12(0) ^a	7/5	15~51 (31)	10(83%)	2(17%)	0.9±0.1	101.6±8.6	1.2±0.3
LN								
I	2	0/2	31~62 (47)	1(50%)	1(50%)	0.6±0.1	104.5±9.5	0.4±0.1
II	4	0/4	18~31 (24)	3(75%)	0(0%)	0.7±0.2	89.0±23.0	0.7±0.3
III	1	0/1	36	0(0%)	0(0%)	0.7	104.0	6.5
IV	9	2/7	15~67 (41)	6(67%)	2(22%)	1.0±0.1	77.0±11.3	6.0±3.3

()^a: Number of patients with non-IgA-GN in parenthesis.

Scr=Serum creatinine ; Ccr=Endogenous creatinine clearance ; UP=Urinary protein.

mesPGN I =minimal mesangial proliferation ; mes PGN II =mild mesangial proliferation ; mesPGNIII =moderate to severe mesangial proliferation ; LN I =minimal change lupus nephritis(WHO I) ; LNII =mesangial lupus nephritis (WHOII) ; LNIII =focal proliferative lupus nephritis (WHOIII) ; LNIV =diffuse proliferative lupus nephritis(WHO IV).

* : p<0.05, ** : p<0.01.

IgA 優位の沈着を認めた症例の中から、臨床的に紫斑病性腎炎、SLE や肝硬変などの二次性腎疾患を除外した症例とし、SLE はアメリカリウマチ協会の 1982 年改訂 SLE 診断基準¹⁶⁾を満たしている症例とした。

対照群には、腎細胞癌 8 例および褐色細胞腫 1 例の摘出腎の正常部分を用いた。その対照正常腎組織については、光顕および蛍光抗体法(IgG, IgA, IgM, Clq, C3 および Fibrinogen)によって異常のないことを確認した。なお、尿中 IL-6 活性の判定に供した正常対照は 24~38 歳(平均 29 歳)の健常者とした。

2. 臨床所見の検討

臨床所見については、腎生検時の血清クレアチニン値(Scr), 内因性クレアチニンクリアランス(Ccr), 1 日尿蛋白量(UP), 高血圧および顕微鏡的血尿の有無を検討した。高血圧は、WHO の判定基準¹⁷⁾に準じて収縮期血圧 160 mmHg 以上、拡張期血圧 95 mmHg 以上の両者あるいはいずれかを示すものとし、顕微鏡的血尿は尿沈渣に強拡大 1 視野に 5 個以上の赤血球を認めるものとした。

3. 尿中 IL-6 活性の検討

(1) 検体の採取

検体は、腎生検前日の 24 時間蓄尿の一部を 0.01 M リン酸緩衝生理食塩水(PBS; 日本製薬社製)で 2 時間、2 回透析し、さらに RPMI 1640(日本製薬社製)で 2 時間、透析してから 0.45 μ m のフィルターを通した。

(2) 尿中 IL-6 活性の測定

尿中 IL-6 活性の測定は、IL-6 依存性細胞株 MH 60. BSF 2 細胞を用いる生物活性法によった¹⁸⁾。10%ウシ胎児血清(FCS; GIBCO 社製)を加えた MH 60. BSF 2 細胞を RPMI 1640 で 3 回洗浄した後、 5×10^4 個/ml の細胞数になるように調整して培養液に浮遊させた。使用した培養液は、RPMI 1640 に 10%FCS, 100 μ g/ml ストレプトマイシン(明治製薬社製), 100 IU/ml ペニシリン G(明治製薬社製)および 5×10^{-5} mol/l 2-メルカプトエタノール(ナカライテスク社製)を加えて調整した。200 pg/ml の濃度から倍々希釈したリコンビナント IL-6 (rIL-6)と検体をそれぞれ MH 60. BSF 2 細胞とともに 96 ウェル平底プレート(200 μ l/ウェル)に加え、5% CO₂, 37°C の条件下で 48 時間培養した。培養終了 6 時間前に各ウェルに 1 μ Ci の ³H-thymidine (Amersham 社製)を加え、培養終了後、セルハーベスター(Lab Mash 社製)を用いてフィルター(Lab Mash 社製)上に細胞を回収した。乾燥させたフィルターの放射活性を液体シンチレーションカウンター(LS 7500, Beckman 社製)で測定し、既知濃度の rIL-6 から作成した標準曲線を用いて検体の IL-6 活性を求めた¹⁹⁾。この標準曲線によると、尿中

の IL-6 活性が 5 ng/日以上の場合に検量が可能であった。

(3) 尿中 IL-6 活性陽性の判定

上述の方法で測定した尿中 IL-6 活性は 5 ng/日以上を陽性と判定した。なお、正常対照の尿中 IL-6 活性についてはすべてこの測定感度以下であった。

4. 病理組織学的検討

(1) 光顕的観察

ヒト増殖性糸球体疾患の腎生検組織および対照正常組織を 10%ホルマリン液で固定後、パラフィンに包埋した。4 μ m に薄切後、hematoxylin-eosin (HE), periodic acid-Schiff (PAS)および periodic acid-silver methenamine (PAM)の各染色を実施し、以下の糸球体病変および尿細管・間質病変を観察した。

1) 糸球体病変

mesPGN を PAS 染色標本からメサンギウム増生の程度によって次の 3 群に分類した。

I 群(軽微メサンギウム増生):メサンギウム細胞の増殖とメサンギウム基質の増加は軽微にとどまっており、メサンギウム増生の明らかでない糸球体も混在している。係蹄腔は狭細化を示さない。

II 群(軽度メサンギウム増生):大部分の糸球体は係蹄腔の狭細化を呈さない程度のメサンギウム増生を示す。

III 群(中等度~高度メサンギウム増生):大半の糸球体はメサンギウム細胞の増殖と基質の増加によって係蹄腔の狭細化を示す。

さらに光顕的に観察された全糸球体について、硝子化糸球体および半月体形成の出現する糸球体数を調べ、硝子化糸球体および半月体形成の出現頻度を求めた。

LN は、WHO 分類²⁰⁾にしたがって、I 型(微小変化型)、II 型(メサンギウム増殖型)、III 型(葉状増殖型)および IV 型(びまん性増殖型)の 4 型に分類した。

2) 尿細管・間質病変

光顕標本に含まれる尿細管・間質病変(尿細管の萎縮、間質の細胞浸潤および線維化)の範囲を下記のように半定量的に 0 から 2+ の 3 段階に分けた²¹⁾。

0:尿細管・間質病変のみられないもの。

1+:尿細管・間質病変の範囲が腎生検組織面積の 30%未満であるもの。

2+:尿細管・間質病変の範囲が 30%以上であるもの。

(2) 蛍光抗体法による観察

1) 蛍光抗体間接法

IL-6 の腎組織内分布については、ヒトの rIL-6 に対するマウス単クローン抗体 IgM クラス(大阪大学バイオメディカル教育研究センターの平野俊夫博士から供与を

受けた)を用いた蛍光抗体間接法で検討した. 本抗体の特異性は Western blot 法によって確認されている¹⁸⁾.

腎生検組織および摘出腎の正常組織を OCT コンパウンド (Miles 社製) に包埋して液体窒素で急速凍結した. クリオスタットで 4 μm に薄切後, 卵白アルブミンで処理したスライドガラスに貼付し, 室温で 30 分間風乾した. ついでアセトン液で固定し, PBS で洗浄後, 正常ヤギ血清と室温で 30 分間反応させて非特異反応を阻止した. その後, 抗 IL-6 抗体と室温で 2 時間反応させた. PBS で洗浄後, FITC 標識ヤギ抗マウス IgM 抗体 (Cappel 社製) と室温で 2 時間反応させた. PBS で洗浄後 ρ-phenylenediamine (和光純薬社製) を含むグリセリン溶液²²⁾ で封入し, 落射型蛍光顕微鏡 BH 2-RFL (オリンパス社製) で観察した. なお, 陰性対照には, 正常マウス腹水を用いた.

2) 蛍光抗体二重染色法

IgA-GN 患者の腎糸球体内における IL-6 と IgA の両者の局在を検討するため, 蛍光抗体二重染色を施行した. まず前述のように IL-6 の蛍光抗体間接法を実施し, ついで PBS で洗浄後にローダミン標識ヤギ抗 IgA 抗体

(Tago 社製) と室温で 45 分間反応させた. IL-6 と IgA の両者の分布を蛍光顕微鏡下で L 435 nm の吸収フィルターを用いて観察し, 次に G 520 nm の吸収フィルターを用いてローダミンの蛍光を吸収した.

3) メサンギウム域の IL-6 蛍光の程度

メサンギウム域の IL-6 蛍光の程度は, 通常の蛍光顕微鏡所見に準じて半定量的に以下の 4 段階に分類した (Fig. 1).

0: IL-6 の蛍光が認められないもの.

1+: IL-6 の蛍光がメサンギウム域に弱く認められるもの.

2+: 1+ と 3+ の中間のもの.

3+: IL-6 の蛍光が拡大したメサンギウム域にびまん性に強く認められるもの.

4) IL-6 蛍光陽性係蹄上皮細胞数

メサンギウム域の IL-6 蛍光の程度と IL-6 蛍光陽性係蹄上皮細胞数との関係を検討する目的で, 凍結切片に含まれる 1~6 個 (平均 2 個) の糸球体内の IL-6 蛍光陽性係蹄上皮細胞を数えた. 平均 IL-6 蛍光陽性係蹄上皮細胞数を算出し, 4 個以下を 1+, 5 から 8 個を 2+, 9

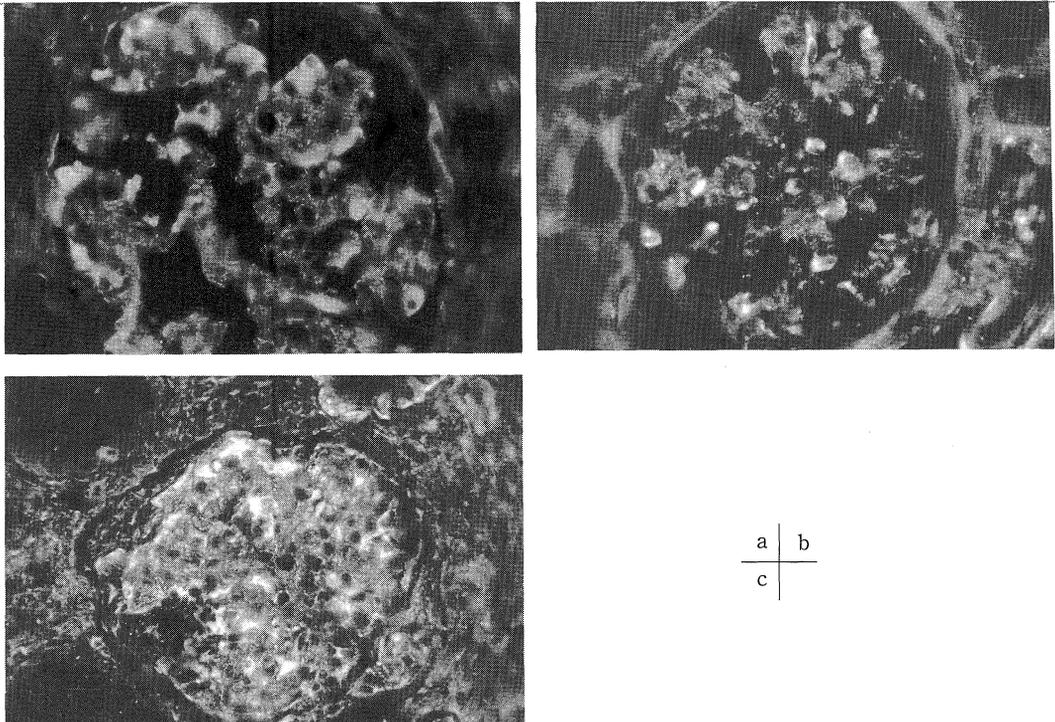


Fig. 1. Distribution of IL-6 in kidneys. IL-6 is observed in the mesangial area in a fine granular fashion and visible in cytoplasm of both visceral epithelial cells and Bowman's epithelial cells. IL-6 staining in the mesangial area was graded from 1+ to 3+. a; 1+, normal tissue from surgically resected kidney, b; 2+, IgA-GN and c; 3+, LN ($\times 100$).

個以上を3+の3段階に分類した。

(3) 酵素抗体法による観察

前述の蛍光抗体法と同様に糸球体内 IL-6 の分布を酵素抗体間接法で検討した。新鮮凍結切片をアセトン液で固定した後、正常ヤギ血清と反応させ、非特異反応を阻止した。抗 IL-6 抗体と室温で2時間反応させた後、0.3% H₂O₂を加えた無水エタノールで内因性ペルオキシダーゼの反応を阻止した。つぎにペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgM 抗体(Cappel 社製)と室温で20分間反応させてから PBS で洗浄し、0.03% H₂O₂を含む 0.05% 3,3'-diaminobenzidine (DAB)基質溶液と2~3分間反応させた。後染色として hematoxylin 染色を実施した。

5. 推計学的処理

推計学的処理には、 χ^2 検定, Mann-Whitney 検定, 相関係数および Spearman 順位相関係数を用いた。なお,本文中における測定値は, 平均値±標準誤差で表した。

成 績

1. 臨床所見

対象の臨床所見では血尿の出現頻度, 高血圧合併頻度, Scr および Ccr は mesPGN と LN 両者のいずれの群間においても有意差を示さなかった。しかし mesPGN III 群の尿蛋白量は, 1.2±0.3 g/日であり, I 群の 0.2±0.1 g/日および II 群の 0.5±0.1 g/日に比して有意に多かった(それぞれ p<0.01, p<0.05)(Table 1)。

2. IL-6 の腎組織内分布

各凍結切片には1~6個(平均2個)の糸球体が含まれており, 今回の検討はこれら全糸球体について詳細に観察した。

(1) 対照群

IL-6 の蛍光は, 症例によって強弱に差があるが, すべ

ての糸球体のメサンギウム域にびまん性微細顆粒状に認められた(Fig. 1)。さらに IL-6 の蛍光は, 係蹄上皮細胞および Bowman 嚢上皮細胞の細胞質にも均質に観察された。酵素抗体間接法では IL-6 は係蹄上皮細胞の細胞

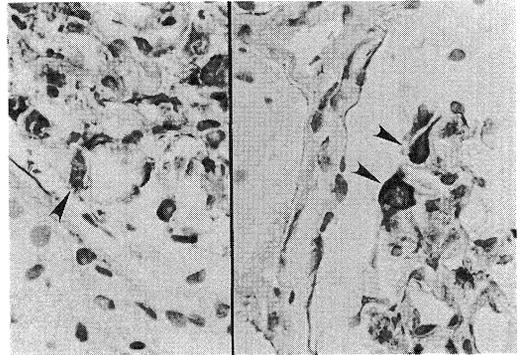


Fig. 2. Immunoperoxidase staining of renal biopsy specimens from patients with IgA-GN. IL-6 is observed in visceral epithelial cells (arrow-head)(×200).

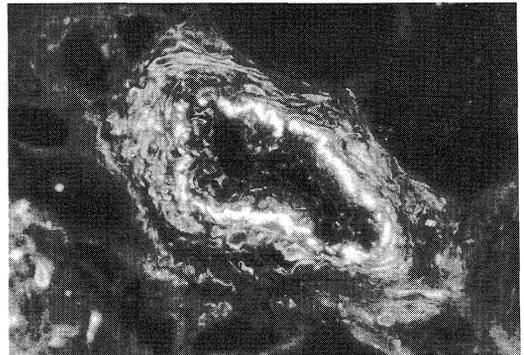


Fig. 3. IL-6 staining in the arterial wall. IL-6 is visible in endothelial cells as well as smooth muscle cells (×100).

Table 2. Correlation between grade of mesangial proliferation and grade of mesangial IL-6 staining

Grade of mesangial IL-6 staining	Control	mesPGN			LN			
		I	II	III	I	II	III	IV
1+	8	8(6)	8	1	1	0	0	2
2+	1	2	8(1)	6	1	2	1	2
3+	0	0	5(1)	5	0	2	0	5
Total	9	10	21	12	2	4	1	9

(): Number of patients with non-IgA-GN in parenthesis.

* : p<0.05, ** : p<0.01.

*** : Correlation coefficient, r=0.59 (p<0.001).

質に局在していた(Fig. 2). 糸球体以外では血管壁, 特に細動脈・小動脈の中膜平滑筋細胞および血管内皮細胞の細胞質にIL-6の蛍光が均質に観察された(Fig. 3). 尿管にはIL-6の蛍光は認められなかった.

(2) mesPGN と LN

IL-6の蛍光は, mesPGN と LN のいずれにおいても対照正常腎組織と同様にメサンギウム域, 係蹄上皮細胞およびBowman 嚢上皮細胞に認められた(Fig. 1). しかしmesPGN と LN におけるメサンギウム域のIL-6蛍光の程度は, 対照腎組織に比して有意に高度であった.(それぞれ $p < 0.05$, $p < 0.01$)(Table 2). IL-6の蛍光は, 細胞性半月体やBowman 嚢との癒着部位に観察された. また一部の症例では, 巣状分節状の硬化性病変を有する糸球体が含まれており, 同病変部では蛍光の減弱あるいは消失している場合が多かった(Fig. 4). 間質でのIL-6の蛍光は, 萎縮した尿管上皮細胞の細胞質に均質に認められた(Fig. 5).

(3) IL-6 と IgA の二重染色

IgA-GN 患者6例の腎生検組織を用いてIL-6 と IgA の蛍光抗体二重染色を実施した(Fig. 6). IgA は大部分のメサンギウム域に粗大顆粒状に沈着しているが, 一部のメサンギウム域ではIgA 沈着が陰性であった. 一方, IL-6の蛍光は, メサンギウム全域にわたり, びまん性微細顆粒状に認められた.

3. メサンギウム域のIL-6 蛍光

(1) 顕顕所見との関係

メサンギウム域のIL-6 蛍光の程度とメサンギウム増生の程度との関係では対照群の大半の症例がメサンギウム域のIL-6 蛍光1+にとどまり, 2+以上を示した症例は9例中1例(11%)にすぎなかった.

mesPGN においてメサンギウム域のIL-6 蛍光が2+以上を示す症例は, I群では10例中2例(20%), II群では21例中13例(62%), III群では12例中11例(92%)で

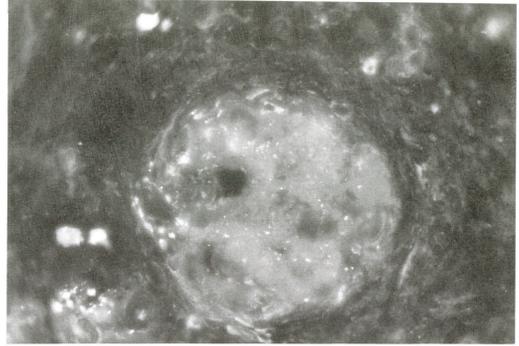


Fig. 4. IL-6 is scarcely observed in a hyalinized glomerulus ($\times 100$).

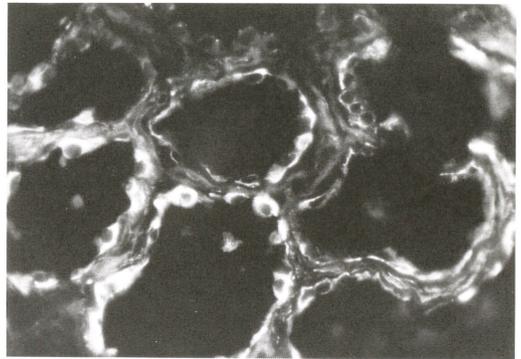


Fig. 5. IL-6 staining in atrophic tubules. IL-6 is seen in cytoplasm of tubular epithelial cells ($\times 100$).

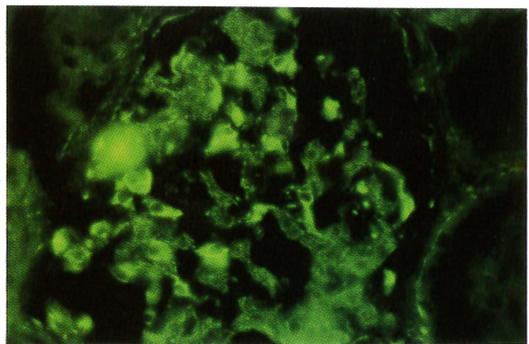
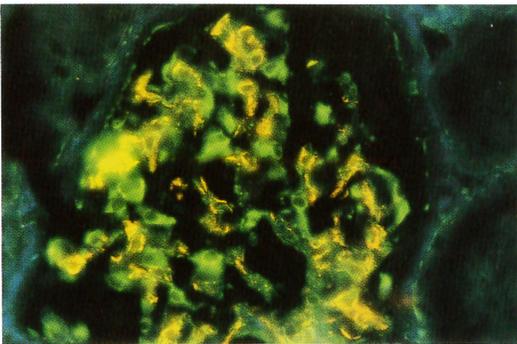


Fig. 6. Double immunofluorescence of IL-6 (FITC-labeled) and IgA (Rhodamine-labeled) in a patient with IgA-GN.

a | b
a; distribution of both IL-6 and IgA, b; distribution of IL-6 only in the same preparation ($\times 100$).

あった。さらに3+を示す症例は、I群では1例もなく、II群で21例中6例(29%)、III群で12例中5例(42%)であった。つまり、メサンギウム増生が高度になるとともに、強いメサンギウム域のIL-6蛍光を示す症例の頻度が有意に増加したといえる($r=0.59, p<0.001$)。

一方、LNにおいては、メサンギウム域のIL-6蛍光が2+以上を示す症例は、I型で2例中1例(50%)、II型で4例全例(100%)、III型で1例(100%)、IV型で9例中7例(78%)であり、3+の症例はI群およびIII群では1例もみられず、II群で4例中2例(50%)、IV群で9例中5例(56%)であった。つまり、LNの症例の大半は、高度のメサンギウム域のIL-6蛍光を示しており、メサンギウム増生が高度になるとともにメサンギウム域のIL-6蛍光の強い症例の頻度が増加したといえる(Table 2)。

なおmesPGNにおいて、メサンギウム域のIL-6蛍光の程度は、硝子化糸球体および半月体の出現頻度とは相関を示さなかったが、尿細管・間質病変の程度と有意の正相関を示した($r=0.54, p<0.001$)(Table 3)。

(2) IL-6 蛍光陽性係蹄上皮細胞数との関係

メサンギウム域のIL-6蛍光の程度とIL-6蛍光陽性係蹄上皮細胞数の関係をTable 4に示す。IL-6蛍光陽性係蹄上皮細胞数は、メサンギウム域のIL-6蛍光の程度が強くなるとともに、少なくなる傾向を示したにすぎない。

(3) 臨床所見との関係

メサンギウム域のIL-6蛍光の程度は、mesPGNとLNのいずれにおいても高血圧の合併および顕微鏡的血尿の出現頻度、さらに1日尿蛋白量と有意の相関を示さなかった。しかしmesPGNにおいて、3+のメサンギウム域IL-6蛍光を示す症例のCcrは、 78.9 ± 7.7 ml/分であり、1+の症例の 114.6 ± 6.7 ml/分および2+の症例の 114.2 ± 8.0 ml/分に比して有意に減少していた(いずれも $p<0.01$)。また、3+のメサンギウム域IL-6

蛍光を示す症例のScrは、 0.9 ± 0.1 mg/dlであり、1+の症例の 0.7 ± 0.1 mg/dlに比して有意に高値であった($p<0.05$)。さらにLNにおいて、3+のメサンギウム域IL-6蛍光を示す症例のScrは、 1.0 ± 0.1 mg/dlであり、2+の症例の 0.6 ± 0.1 mg/dlに比して有意に高値であった($p<0.05$)(Table 5)。

4. 尿中IL-6活性

(1) 光顕所見との関係

対照群の尿中IL-6活性は検出感度以下であった。mesPGNにおける尿中IL-6活性陽性例は、I群では7例中0例(0%)、II群では16例中5例(31%)、III群では8例中6例(75%)にみられた。つまり尿中IL-6活性陽性

Table 3. Relationship between grade of mesangial IL-6 staining and grade of tubulointerstitial lesion in patients with mesPGN

Grade of mesangial IL-6 staining	Grade of tubulointerstitial lesion		
	0	1+	2+
1+	8	9	0
2+	5	9	2
3+	1	4	5
Total	14	22	7

*** : Correlation coefficient, $r=0.54$ ($p<0.001$).

Table 4. Relationship between grade of mesangial IL-6 staining and grade of epithelial IL-6 staining

Grade of mesangial IL-6 staining	Grade of epithelial IL-6 staining		
	1+	2+	3+
1+	7	14	7
2+	8	10	5
3+	13	4	0
Total	28	28	12

Table 5. Correlation between grade of mesangial IL-6 staining and clinical features

Grade of mesangial IL-6 staining	Frequency(%) of		Scr (mg/dl)	Ccr (ml/min)	UP (g/day)
	Hematuria	Hypertension			
MesPGN					
1+	12/17(71)	2/17(12)	0.7 ± 0.1	114.6 ± 6.7	0.4 ± 0.1
2+	11/16(69)	3/16(19)	0.8 ± 0.1 *	114.2 ± 8.0 ***	0.9 ± 0.3
3+	7/10(70)	1/10(10)	0.9 ± 0.1	78.9 ± 7.7 ***	0.8 ± 0.2
LN					
1+	2/3(67)	1/3(33)	0.9 ± 0.2	77.0 ± 21.7	10.4 ± 9.8
2+	4/6(67)	1/6(17)	0.6 ± 0.1 *	101.8 ± 2.3	1.9 ± 1.0
3+	4/7(57)	1/7(14)	1.0 ± 0.1	79.7 ± 13.6	3.1 ± 1.7

* : $p<0.05$, ** $p<0.01$.

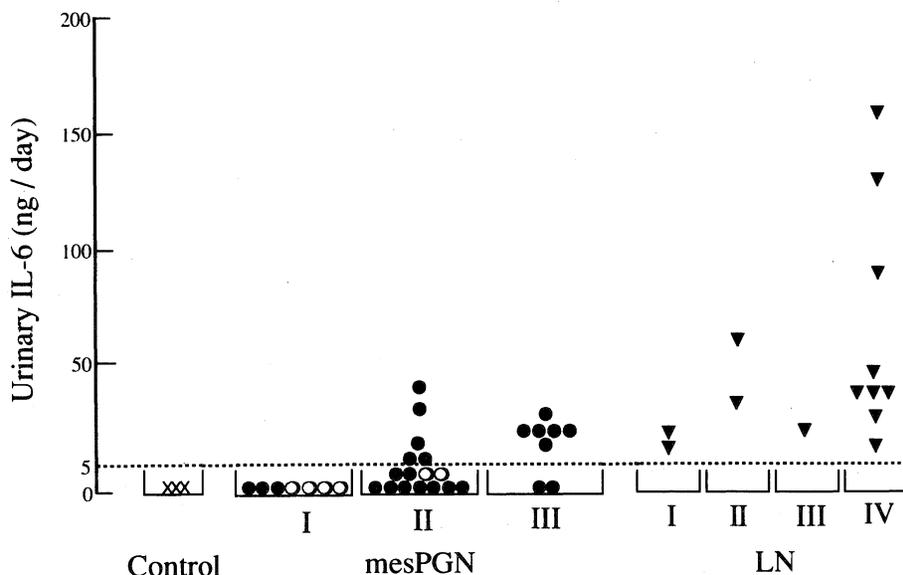


Fig. 7. Correlation between grade of mesangial proliferation and urinary IL-6 level. The horizontal dotted bar indicates the threshold (5ng/day) of the assay. (●) : IgA-GN, (○) : non-IgA-GN.

Table 6. Relationships between urinary IL-6 (uIL-6) and histological parameters

Group	uIL-6 vs Global obsolescence (%)	uIL-6 vs Crescent formation (%)	uIL-6 vs Grade of tubulointerstitial lesion
	mesPGN	NS	NS
LN	NS	NS	NS

NS : not significant.

例の出現頻度は、メサンギウム増生が高度になるとともに有意に増加したといえる($r=0.64$, $p<0.001$)。LNの14例は全例が尿中IL-6活性陽性を示した。しかし、LNの尿中IL-6活性は、メサンギウム増生が高度になるとともに増加する傾向を示したにすぎない(Fig 7)。

mesPGNにおける尿中IL-6活性は、硝子化糸球体および半月体の出現頻度とは相関を示さなかったが、尿細管・間質病変の程度と有意の正相関を示した($r=0.60$, $p<0.01$)(Table 6)。

(2) メサンギウム域のIL-6蛍光との関係

mesPGNにおける尿中IL-6活性陽性例は、メサンギウム域のIL-6蛍光1+群では13例中2例(15%)、2+群では9例中3例(33%)、3+群では9例中6例(75%)であった。つまり、尿中IL-6活性陽性例の出現頻度は、メサンギウム域のIL-6蛍光の程度が増強するのに比例

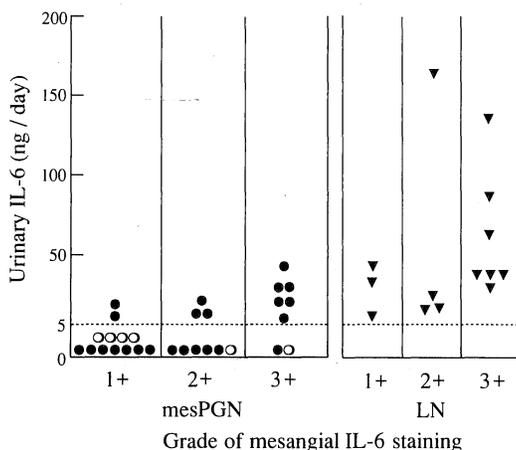


Fig. 8. Correlation between grade of mesangial IL-6 staining and urinary IL-6 level. The horizontal dotted bar indicates the threshold (5ng/day) of the assay. (●) : IgA-GN, (○) : non-IgA-GN.

して有意に増加したといえる($r=0.63$, $p<0.001$)。一方、LNの尿中IL-6活性は、メサンギウム域のIL-6蛍光の増強に伴って上昇する傾向を示したにすぎない(Fig 8)。

(3) IL-6蛍光陽性係蹄上皮細胞数との関係

IL-6蛍光陽性係蹄上皮細胞数はmesPGNとLNのいずれにおいても尿中IL-6活性と有意の相関を示さな

かった。

考 察

IL-6 は、1986年にB細胞の抗体産生細胞への最終分化を誘導する因子として、そのcDNAがクローニングされた物質である²³⁾。その後の研究から、IL-6は、B細胞やT細胞などの免疫系細胞の分化・増殖を誘導する²⁴⁾ばかりでなく、造血系幹細胞の多分化能コロニー形成細胞への誘導²⁵⁾、ラット褐色細胞腫PC12細胞の神経細胞への分化誘導²⁶⁾などの作用を有し、肝細胞に対して急性期反応性蛋白の合成を促進させる²⁷⁾などの機能を有するサイトカインであることが判明している^{28,29)}。IL-6の腎ことにメサンギウム細胞に対する作用については、前述のとおりである。さらに最近では、実験的糸球体腎炎モデルにおいてもIL-6の関与が分子生物学的手法によって検討されている。教室のIwano, et al.³⁰⁾は、増殖性腎炎モデルであるマウス免疫複合型腎炎や自然発症ループス腎炎モデルであるMRL/lprマウスにおいて単離糸球体内IL-6 mRNAの発現をNorthern blot法で認めたという。さらに彼らは、RT-PCR法を用いてIgA-GN患者の単離糸球体におけるIL-6 mRNAの発現を確認し、ヒトの糸球体内にもIL-6が産生されているとしている³¹⁾。

しかしこれまでのところ、腎糸球体に局在するIL-6の定量化についてはまだ確立されていない。そこで著者は、免疫蛍光抗体法によって糸球体内IL-6の半定量化を行い、その程度と尿中IL-6活性、臨床所見および腎生検病理組織所見との関係について検討した。

1. 腎組織におけるIL-6の分布

(1) 糸球体

Fukatsu, et al.¹³⁾は、著者の用いた抗IL-6抗体と同一の抗体で各種糸球体腎炎の間接蛍光抗体法所見を報告している。対照正常腎組織の糸球体ではIL-6の蛍光がメサンギウム域のみに認められたのに対し、疾患腎の糸球体では、メサンギウム域におけるIL-6の蛍光染色パターンがその強度と拡がりによってdiffuse, expanded mesangial, normal mesangialおよびdecreased reactivityの4型に分けられたとしている。そのパターンに疾患特異性はなかったという。また彼らによると、細胞性半月体あるいはBowman嚢との癒着を示す糸球体ではBowman嚢上皮細胞にIL-6の蛍光がみられたという。著者の観察では、IL-6の蛍光は対照正常組織、mesPGNおよびLNのいずれにおいても糸球体メサンギウム域、係蹄上皮細胞およびBowman嚢上皮細胞に認められ、対照群で有意に軽度であった。細胞性半月体

およびBowman嚢との癒着部位にもIL-6蛍光が認められた。なお一部の症例では巣状分節状の硬化性病変が含まれていたが、その部位ではIL-6蛍光が減弱ないし消失していた。

糸球体内IL-6の局在に関する著者の成績は、上述のFukatsu, et al.¹³⁾の報告に近いが、彼らは著者と抗体が同一であったにもかかわらず、正常腎組織および糸球体腎炎の係蹄上皮細胞にはIL-6を認めていない。そこで著者は、係蹄上皮細胞におけるIL-6の局在を確認するため、さらに酵素抗体間接法を実施して今回の知見、つまりメサンギウム域、係蹄上皮細胞、Bowman嚢上皮細胞、細胞性半月体およびBowman嚢との癒着部位にIL-6の存在することを明らかにしたといえる。

(2) 尿細管・間質

尿細管・間質におけるIL-6の蛍光は、対照正常腎組織では認められなかったが、mesPGNおよびLNの両疾患では萎縮した尿細管上皮細胞に存在した。Fukatsu, et al.¹³⁾も疾患腎の萎縮尿細管上皮細胞にIL-6の蛍光を認め、さらに、尿細管に分布するIL-6の拡がりには尿細管萎縮病変の程度と相関すると述べている¹³⁾。著者もFukatsu, et al.¹³⁾と同様に、尿細管に分布するIL-6の拡がりには尿細管・間質病変の程度と相関することを認めた。しかし腎生検凍結切片に含まれる尿細管・間質の量は、尿細管に分布するIL-6の拡がりや評価するには過少であるから、この成績についてはなお検討の余地が残されている。

(3) IL-6とIgAの局在

IgA免疫複合物の沈着がIL-6の分布に及ぼす影響を検討するため、IgA-GN患者の腎生検組織を用いてIL-6とIgAの蛍光抗体二重染色を実施した。IgAは大部分のメサンギウム域に粗大顆粒状に沈着しているが、IgA沈着を欠くメサンギウム域もみられた。一方、IL-6の蛍光は、メサンギウム全域にわたりびまん性微細顆粒状に認められた。つまり、IL-6とIgAの沈着部位は一致していないことになる。従来、IgA-GNの予後と糸球体内IgA沈着について多くの報告があるが、予後はIgA沈着の程度と全く関係がないという意見が大勢を占めている³¹⁻³³⁾。今回の二重染色の成績は、沈着した糸球体内IgAがIL-6産生に影響を及ぼしていないと推測され、IgA沈着の程度が予後と相関しないとする上記の報告³¹⁻³³⁾を支持しているものといえる。

2. メサンギウム域のIL-6蛍光

(1) 光顕所見および尿中IL-6活性との関係

メサンギウム域のIL-6蛍光は、mesPGNとLNのいずれにおいても対照組織に比して有意に高度であるが、

その程度は症例によって異なり、メサンギウム増生の程度と有意の正相関を示した。Fukatsu, et al.¹³⁾が種々の糸球体腎炎について、メサンギウム増生の程度に相関してIL-6の分布が拡大する傾向を示すとした成績と一致している。また尿中IL-6活性とも有意の正相関を示した。さらにmesPGNにおける尿中IL-6活性は、メサンギウム増生の程度と有意の正相関を示した。つまりこれら著者の成績は、メサンギウム域のIL-6蛍光の程度、尿中IL-6活性およびメサンギウム増生の程度の三者が密に関連していることを示しており、培養メサンギウム細胞がIL-6を産生するという成績³⁰⁾と考え合わせると、メサンギウム域のIL-6蛍光の程度はメサンギウム増生が高度になるとともに強くなり、尿中IL-6活性の増加を伴うことを明らかにしたものと見える。メサンギウム細胞におけるIL-6の産生は、メサンギウムの増生とともに亢進すると推測される。

(2) 臨床所見との関係

メサンギウム域のIL-6蛍光の程度は、1日尿蛋白量とは有意の相関を示さなかったが、Scrと有意の正相関、Ccrと有意の負相関を示した。この知見は、メサンギウム域のIL-6蛍光の程度が腎機能障害の程度と相関することを示したものであり、メサンギウム域のIL-6蛍光の程度が尿中IL-6活性と相関したという前述の結果を考え合わせると、尿中IL-6活性はIgA-GNの予後判定因子として有用であり、腎疾患患者の治療においてきわめて重要な指標となり得る。

3. 尿中IL-6の由来

尿中に検出されるIL-6は、その活性が血清IL-6活性と相関しないこと³⁴⁾、健常人では検出されずに糸球体腎炎患者の尿中で認められること^{6,34)}から、腎局所に由来すると考えられている。IL-6の産生については、マクロファージやリンパ球などの浸潤炎症細胞³⁵⁾、血管内皮細胞³⁶⁻³⁸⁾および血管平滑筋細胞³⁹⁾など様々な細胞での産生が指摘されている。一方、IL-6の標的細胞への作用の機構については、IL-6のシグナルが標的細胞表面に存在する特異的なレセプター系によって細胞内へ伝達されるといわれている⁴⁰⁾。IL-6レセプター系は、2つの細胞表面レセプター、すなわちIL-6と結合するレセプター分子(IL-6R)⁴¹⁾と、IL-6とは結合せずにIL-6のシグナルのみを伝達するレセプター分子(gp130)⁴²⁾から成る。前記の2つのレセプターの細胞外領域は、IL-6がIL-6R分子と結合してから会合する。その会合により、IL-6シグナルはgp130分子を介して細胞内に伝達される。したがって、IL-6は直接細胞内に取り込まれないと思われる。今回の検討でメサンギウム域に認められたIL-6は、

メサンギウム細胞表面のレセプターに結合したのか、メサンギウム細胞自身が産生した細胞質内IL-6か、あるいはその両者であるのかが不明であるが、IL-6が細胞膜に結合しているとすれば、IL-6は均質に認められるはずである。培養メサンギウム細胞がIL-6を産生していることと、実験腎炎モデルおよびIgA-GN患者の腎糸球体においてIL-6 mRNAの発現が確認されている^{11,30)}ことから、メサンギウム域に認められたIL-6はメサンギウム細胞自身が産生したIL-6であり、細胞質内に存在すると考えてよいと思われる。さらにメサンギウム増生が高度になるとともに、メサンギウム域のIL-6蛍光の程度が強くなり、尿中IL-6活性が増加するという今回の成績から、mesPGNにおける主たるIL-6産生細胞はメサンギウム細胞と考えるべきであろう。

つぎに係蹄上皮細胞のIL-6について考えてみたい。今回の検討で著者はIL-6に係蹄上皮細胞にも局在することを明らかにした。係蹄上皮細胞に認められたIL-6は、係蹄上皮細胞の表面レセプターに結合したもので、係蹄上皮細胞自身が産生した細胞質内IL-6、あるいはその両者のいずれかであろうか。IL-6が均質に観察され、核に相当する部分には存在しなかったことから、著者は細胞膜と細胞質の両者に存在するものと推測しているが、糸球体内IL-6蛍光陽性係蹄上皮細胞数が尿中IL-6活性と相関を示さなかった点で、係蹄上皮細胞での産生については可能性が低いと考える。

またIL-6の蛍光は、萎縮した尿細管上皮細胞にも認められた。尿中IL-6活性は、硝子化糸球体および半月体の出現頻度とは有意の相関を示さず、尿細管・間質病変の程度と有意の正相関を示した。現在までにIL-6は腸管上皮細胞⁴³⁾、甲状腺上皮細胞⁴⁴⁾および皮膚の角化上皮細胞⁴⁵⁾からも産生されることが報告されている。尿細管由来の腎細胞癌もIL-6を産生する⁴⁶⁾ことが明らかにされている。これらの報告と今回の成績を考え合わせると、障害された尿細管上皮細胞もIL-6を産生する可能性があり、尿中IL-6の一部は、尿細管に由来すると考えてよいであろう。

結 語

ヒト増殖性糸球体疾患における腎組織内IL-6の分布と、尿中IL-6活性、臨床所見および病理組織所見との関係を検討し、以下の成績を得た。

1. IL-6の蛍光は、対照正常腎組織においてメサンギウム域、係蹄上皮細胞およびBowman嚢上皮細胞で軽度で観察された。
2. メサンギウム増殖性糸球体腎炎(mesPGN)およ

びループス腎炎(LN)におけるIL-6蛍光の局在は対照群と同様であるが、その程度が有意に高度であった。

3. IL-6の蛍光は細胞性半月体やBowman嚢との癒着部位にも観察されたが、糸球体硬化部では減弱ないし消失していた。さらにIL-6の蛍光は、細動脈・小動脈の中膜平滑筋細胞と萎縮した尿細管上皮細胞にも認められた。

4. mesPGNにおけるメサンギウム域のIL-6蛍光の程度は、メサンギウム増生の程度、尿細管・間質病変の程度、尿中IL-6活性および腎機能と有意の正相関を示し、IL-6蛍光陽性係蹄上皮細胞数とは負相関を示すにとどまった。

5. IgA腎症患者の腎生検組織を用いたIgAとIL-6の蛍光抗体二重染色では、IL-6とIgAの沈着部位は一致しなかった。

以上、腎組織内のIL-6がヒト増殖性糸球体疾患の進展と密接に関係することを免疫組織学的に証明した。

稿を終わるにあたり、御指導、御校閲を賜りました石川兵衛教授に深甚なる謝意を捧げるとともに、御校閲と御助言を賜りました病理学第2講座日浅義雄教授、摘出腎の正常組織をご提供していただき、また御校閲と御助言を賜りました泌尿器科学講座岡島英五郎教授に感謝いたします。さらに、直接御指導、御教示いただきました土肥和紘講師、御協力いただいた第1内科学腎研究班の諸兄に感謝の意を表します。

なおrIL-6に対するマウス単クローン抗体を提供していただいた大阪大学バイオメディカル教育研究センター平野俊夫教授に深く感謝いたします。

本論文の要旨は、第34回日本腎臓学会総会(1991年11月、岡山)および第9回アジア腎臓コロキウム(1992年5月、ソウル)において発表した。

文 献

- 1) Striker, G. E., Lange, M. A., Mackay, K., Bernstein, K. and Striker, L. J.: Glomerular cells in vitro. *Adv. Nephrol.* **16**: 169, 1987.
- 2) Striker, L. J., Doi, T., Elliot, S. and Striker, G. E.: The contribution of glomerular mesangial cells to progressive glomerulosclerosis. *Semin. Nephrol.* **9**: 318, 1989.
- 3) Hawkins, N. J., Wakefield, D. and Charlesworth, J. A.: The role of mesangial cells in glomerular pathology. *Pathol.* **22**: 24, 1990.
- 4) Wardle, E. N.: Cytokine growth factors and glomerulonephritis. *Nephron* **57**: 257, 1991.
- 5) Lovett, D. H., Ryan, J. L. and Sterzel, R. B.: Stimulation of rat mesangial cell proliferation by macrophage interleukin 1. *J. Immunol.* **131**: 2830, 1983.
- 6) Horii, Y., Muraguchi, A., Iwano, M., Matsuda, T., Hirayama, T., Yamada, H., Fujii, Y., Dohi, K., Ishikawa, H., Ohmoto, Y., Yoshizaki, K., Hirano, T. and Kishimoto, T.: Involvement of IL-6 in mesangial proliferative glomerulonephritis. *J. Immunol.* **143**: 3949, 1989.
- 7) Doi, T., Striker, L. J., Elliot, S. J., Conti, F. G. and Striker, G. E.: Insulinlike growth factor-1 is a progression factor for human mesangial cells. *Am. J. Pathol.* **134**: 395, 1989.
- 8) Gesualdo, L., Pinzani, M., Floriano, J. J., Hassan, M. O., Nagy, N. U., Schena, F. P., Emancipator, S. N. and Abboud, H. E.: Platelet-derived growth factor expression in mesangial proliferative glomerulonephritis. *Lab. Invest.* **65**: 160, 1991.
- 9) Suematsu, S., Matsuda, T., Aozasa, K., Akira, S., Nakano, N., Ohno, S., Miyazaki, J., Yamamura, K., Hirano, T. and Kishimoto, T.: IgG1 plasmacytosis in interleukin 6 transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 7547, 1989.
- 10) Dohi, K., Iwano, M., Muraguchi, A., Horii, Y., Hirayama, T., Ogawa, S., Shiiki, H., Hirano, T., Kishimoto, T. and Ishikawa, H.: The prognostic significance of urinary interleukin 6 in IgA nephropathy. *Clin. Nephrol.* **35**: 1, 1991.
- 11) 岩野正之, 堀井康弘, 土肥和紘, 石川兵衛, 土肥祥子, 森山忠重: Competitive PCR法を用いたメサンギウム細胞内IL-6 mRNAの定量. 第34回日本腎臓学会総会予稿集 p286, 1991.
- 12) 加藤和美, 岩野正之, 平田英二, 松村典彦, 堀井康弘, 平山俊英, 小川修二, 椎木英夫, 土肥和紘, 石川兵衛: ループス腎炎の発症・進展におけるIL-6の関与. 第34回日本腎臓学会総会予稿集 p381, 1991.
- 13) Fukatsu, A., Matsuo, S., Tamai, H., Sakamoto, N., Matsuda, T. and Hirano, T.: Distribution of interleukin-6 in normal and diseased human kidney. *Lab. Invest.* **65**: 61, 1991.
- 14) Berger, J.: IgA glomerular deposits in renal

- disease. *Transplant. Proc.* **1** : 939, 1969.
- 15) **Clarkson, A. R., Seymour, A. E., Thompson, A. J., Haynes, W. D. G., Chan, Y-L. and Jackson, B.** : IgA nephropathy : a syndrome of uniform morphology, diverse clinical features and uncertain prognosis. *Clin. Nephrol.* **8** : 459, 1977.
- 16) **Tan, E. M., Cohen, A. S., Fries, J. F., Masi, A. T., McShane, D. J., Rothfield, N. F., Schaller, J. G., Talal, N. and Winchester, R. J.** : The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **25** : 1271, 1982.
- 17) **WHO** : Arterial hypertension. Report of a WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series, Geneva, pl, 1978.
- 18) **Matsuda, T., Hirano, T. and 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, 1988.
- 19) 岩野正之, 松田 正, 堀井康弘, 平野俊夫 : IL-6 とその臨床的側面. *Medical Immunology* **18** : 568, 1989.
- 20) **Churg, J. and Sobin, L. H.** : Renal disease : Classification and Atlas of Glomerular Diseases. 1st. ed., Igaku Shoin, Tokyo • New York, p127, 1982.
- 21) 真井久夫, 土肥和紘, 椎木英夫, 花谷正和, 山中富美男, 石川兵衛 : IgA 腎炎における間質病変の臨床病理学的研究—生検標本による検討. *奈医誌.* **38** : 933, 1987.
- 22) **Platt, J. L. and Michael, A. F.** : Retardation of fading and enhancement of intensity of immunofluorescence by ρ -phenylenediamine. *J. Histochem. Cytochem.* **31** : 840, 1983.
- 23) **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. and Kishimoto, T.** : Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* **324** : 73, 1986.
- 24) **Muraguchi, A., Hirano, T., Tang, B., Matsuda, T., Horii, Y., Nakajima, K. and 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, 1988.
- 25) **Ikebuchi, K., Wong G. G., Clark, S. C., Ihle, J. N., Hirai, Y. and Ogawa, M.** : Interleukin 6 enhancement of interleukin 3-dependent proliferation of multipotential hemopoietic progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84** : 9035, 1987.
- 26) **Satoh, T., Nakamura, S., Taga, T., Matsuda, T., Hirano, T., Kishimoto, T. and Kaziro, Y.** : Induction of neuronal differentiation in PC12 cells by B-cell stimulatory factor 2/interleukin 6. *Mol. Cell. Biol.* **8** : 3546, 1988.
- 27) **Gauldie, J., Richards, C., Harnish, D., Lansdorp, P. and 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, 1987.
- 28) **Le, J. and Vilček, J.** : Biology of disease : interleukin 6 : a multifunctional cytokine regulating immune reactions and the acute phase protein response. *Lab. Invest.* **61** : 588, 1989.
- 29) **Hirano, T. and Kishimoto, T.** : Interleukin-6. *in Handbook of Experimental Pharmacology* (Sporn, M. B. and Roberts, A. B., eds). Vol. 95, Springer-Verlauf, Berlin, p633, 1990.
- 30) **Iwano, M., Dohi, K., Hirata, E., Horii, Y., Shiiki, H. and Ishikawa, H.** : Induction of interleukin 6 synthesis in mouse glomeruli and cultured mesangial cells. *Nephron* **62** : 58, 1992.
- 31) **Katafuchi, R., Takebayashi, S. and Taguchi, T.** : Hypertension-related aggravation of IgA nephropathy : a statistical approach. *Clin. Nephrol.* **30** : 261, 1988.
- 32) **Kusumoto, Y., Takebayashi, S., Taguchi, T., Harada, T. and Naito, S.** : Long-term prognosis and prognostic indices of IgA nephropathy in juvenile and in adult Japanese. *Clin. Nephrol.* **28** : 118, 1987.
- 33) 竹林茂夫, 田口 尚, 福島克彦, 山方勇次, 堀田覚, 藤松真一郎, 緒方弘文, 原田孝司, 田浦幸一, 新里 健, 船越衛一 : 慢性に経過する腎炎の形態と予後—増悪因子の検討. *腎と透析* **6** : 543, 1979.

- 34) 平田英二, 岩野正之, 平山俊英, 堀井康弘, 小川修二, 山口 透, 北村嘉三, 土肥和紘, 石川兵衛: 一般臨床の場における尿中 IL-6 活性測定法の確立. 第 34 回日本腎臓学会総会予稿集. p329, 1991.
- 35) Horii, Y., Muraguchi, A., Suematsu, S., Matsuda, T., Yoshizaki, K., Hirano, T. and 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, 1988.
- 36) Jirik, F. R., Podor, T. J., Hirano, T., Kishimoto, T., Loskutoff, D. J., Carson, D. A. and Lotz, M.: Bacterial lipopolysaccharide and inflammatory mediators augment IL-6 secretion by human endothelial cells. *J. Immunol.* **142**: 144, 1989.
- 37) Norioka, K., Hara, M., Harigai, M., Kitani, A., Hirose, T., Suzuki, K., Kawakami, M., Tabata, H., Kawagoe, M. and Nakamura, H.: Production of B cell stimulatory factor-2/interleukin-6 activity by human endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **153**: 1045, 1988.
- 38) Sironi, M., Breviario, F., Proserpio, P., Biondi, A., Vecchi, A., Van Damme, J., Dejana, E. and Mantovani, A.: IL-1 stimulates IL-6 production in endothelial cells. *J. Immunol.* **142**: 549, 1989.
- 39) Schrader, J. W., Moyer, C., Ziltener, H. J. and Reinisch, C. L.: Release of the cytokines colony-stimulating factor-1, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and IL-6 by cloned murine vascular smooth muscle cells. *J. Immunol.* **146**: 3799, 1991.
- 40) 八幡英夫: IL-6 レセプター系を構成する分子の構造と機能. *臨床免疫* **23**: 1399, 1991.
- 41) Yamasaki, K., Taga, T., Hirata, Y., Yawata, H., Kawanishi, Y., Seed, B., Taniguchi, T., Hirano, T. and Kishimoto, T.: Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN β 2) receptor. *Science* **241**: 825, 1988.
- 42) Taga, T., Hibi, M., Hirata, Y., Yamasaki, K., Yasukawa, K., Matsuda, T., Hirano, T. and Kishimoto, T.: Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell* **58**: 573, 1989.
- 43) Shiota, K., LeDuy, L., Yuan, S. and Jothy, S.: Interleukin-6 and its receptor are expressed in human intestinal epithelial cells. *Virchows Arch. [Cell Pathol.]* **58**: 303, 1990.
- 44) Zheng, R. Q. H., Abney, E., Chu, C. Q., Field, M., Grubeck-Loebenstein, B., Maini, R. N. and Feldmann, M.: Detection of interleukin-6 and interleukin-1 production in human thyroid epithelial cells by non-radioactive *in situ* hybridization and immunohistochemical methods. *Clin. Exp. Immunol.* **83**: 314, 1991.
- 45) Grossman, R. M., Krueger, J., Yourish, D., Granelli-Piperno, A., Murphy, D. P., May, L. T., Kupper, T. S., Sehgal, P. B. and Gottlieb, A. B.: Interleukin-6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 6367, 1989.
- 46) Miki, S., Iwano, M., Miki, Y., Yamamoto, M., Tang, B., Yokokawa, K., Sonoda, T., Hirano, T. and Kishimoto, T.: Interleukin-6 (IL-6) functions as an *in vitro* autocrine growth factor in renal cell carcinomas. *FEBS Lett.* **250**: 607, 1989.