

原 著

糖尿病を合併した肺結核患者における
細胞性免疫能の検討

大西和子・藤原 寛
亀田和彦・露口 泉夫

大阪府立羽曳野病院

受付 昭和 58 年 1 月 27 日

CELL MEDIATED IMMUNITY IN PULMONARY TUBERCULOSIS PATIENTS
WITH DIABETES MELLITUS

Kazuko ONISHI*, Hiroshi FUJIWARA, Kazuhiko KAMEDA and Izuo TSUYUGUCHI

(Received for publication January 27, 1983)

Cell mediated immune responsiveness was studied in tuberculosis patients with diabetes mellitus. Peripheral blood lymphocytes (PBL) were examined for their *in vitro* proliferative response stimulated with purified protein derivative of tuberculin (PPD) or nonspecifically with PHA or Con A. PBL was also examined for PPD-induced mitogenic factor (MF) production and/or their responsiveness to MF stimulation. The results obtained were:

- 1) PBL from tuberculosis patients with ($P < 0.01$) or without ($P < 0.02$) diabetes mellitus gave lower proliferative response to Con A stimulation than PBL from healthy, tuberculin-positive individuals.
- 2) PBL from tuberculosis patients with diabetes mellitus showed decreased proliferative response to PPD stimulation compared with PBL from either patients without diabetes mellitus or healthy donors.
- 3) No significant differences were observed between patients with and without diabetes mellitus or between patients and healthy donors in their ability of PPD-stimulated production of MF or response to MF which was elaborated by BCG stimulation of pleural fluid lymphocytes, although PBL from tuberculosis patients responded slightly less than PBL from healthy donors to MF stimulation.

Decreased response to PPD stimulation observed with lymphocytes of patients with diabetes mellitus suggests depressed cell mediated immunity to tuberculosis in these patients.

Keywords: diabetes mellitus, pulmonary tuber- キーワーズ：糖尿病，肺結核，細胞性免疫
culosis, cell mediated immunity

* From the Osaka Prefectural Habikino Hospital 3-7-1, Habikino-shi, Osaka 583 Japan.

緒 言

糖尿病患者における免疫能の低下および易感染性については既に多くの研究^{1)~3)}がなされ、とりわけインシュリン依存性糖尿病におけるもの^{1)4)~6)}が多くみられる。しかし、糖尿病を合併した肺結核に関する免疫学的研究は比較的少ない。そこで我々は、当院入院患者より糖尿病合併肺結核患者を選び、細胞性免疫能の細胞レベルでの解析を試みた。患者末梢血リンパ球の *in vitro* における反応を非特異的T細胞マイトジェン Con A, PHA 且つ特異抗原 purified protein derivative of tuberculin (PPD) によるリンパ球幼若化反応、およびBCG刺激によるMitogenic factor (MF) に対するリンパ球の反応性、更にPPD刺激によるMF産生能について検討した。

対象および方法

1. 対象：当院入院肺結核患者の中で、糖尿病を合併している症例（以下、合併患者群と略す）35例を選び、合併のない肺結核患者（以下、非合併患者群と略す）26例およびツ反陽性健常人20例との比較を行なった。

2. リンパ球の分離：患者および健常人より10~15 ml採血し、Ficoll-Conray 比重遠沈法⁷⁾により末梢血リンパ球を採取した。

3. T細胞, B細胞, T細胞サブセット：T細胞は、Eロゼット形成法, B細胞は、EACロゼット形成法により算定し、T細胞サブセットは、モノクローナル抗体OKT シリーズを用いた間接蛍光抗体法により、helper機能を持つとされるOKT 4⁺細胞, suppressor機能を持つとされるOKT 8⁺細胞の算定を行なった。

4. 培養液, マイトジェン, PPD：培養液は、10% ヒトAB型血清を含むRPMI 1640を用いた。Con A (Sigma), PHA-P (GIBCO) は市販のものを使用した。PPDは、阪大微研藤井博士より恵与されたものを使用した。

5. リンパ球幼若化反応：リンパ球は、培養液にて $1 \times 10^6/ml$ に調整し、その0.2mlを microculture plate (Falcon # 3040) の各wellに注入し、stimulatorは濃度を調整し10~20 μl ずつ添加した。Con A, PHA-Pは、最終濃度各20 $\mu g/ml$, 5 $\mu g/ml$ にて3日間培養、PPDは、最終濃度50 $\mu g/ml$ にて6日間培養を行ない、培養最終18時間の³H-チミジンの取り込みを液体シンチレーションカウンターにて測定した。

6. リンパ球のMF産生能：MF産生には、culture tube (Falcon # 2054)を用い、リンパ球 ($5 \times 10^6/ml$) と PPD (50 $\mu g/ml$) を培養液中で24時間培養し (P培養) その培養上清を得た。対照としては、PPDを入れずに培養したリンパ球に培養終了後、PPDを加え (R培養) その培養上清を得た。これら培養上清中のMF

活性測定には、indicator cellとしてBUdR処理後光照射によりPPD反応性細胞を除去した健常人末梢血リンパ球を用いた。方法は、 $10^{-4}M$ 2-mercapto ethanolを含む培養液を用い、健常人末梢血リンパ球 ($2 \times 10^6/ml$) を PPD (50 $\mu g/ml$) およびBUdR (2 $\mu g/ml$) とともに4日間、遮光培養後2時間光照射を行なった。4回洗浄した後、このリンパ球を $2 \times 10^6/ml$ に調整し、micro culture plate (Falcon # 3040) の各wellに0.1 mlずつ注入した。次にPおよびR培養上清を0.1mlずつ添加し、6日間培養後、最終18時間の³H-ケミジンの取り込みを測定した。MF活性は、P培養上清添加時のカウントからR培養上清添加時のカウントを差し引いた値とした。

7. MFに対するリンパ球の反応性：結核性胸膜炎患者の胸水リンパ球を1%FCSを含むRPMI 1640で *in vitro* においてBCG (10 $\mu g/ml$) とともに48時間培養した後、培養上清をミリポアフィルター (ポアサイズ: 0.45 μ) で濾過しMFとして用いた。この実験を通して同一ロットのMFを用い、患者および健常人末梢血リンパ球の反応性を検討した。リンパ球は、 $2 \times 10^6/ml$ に調整し、その0.1mlをmicro culture plateの各wellに注入し、MF 0.1mlを添加して6日間培養後、最終18時間の³H-チミジンの取り込みを測定した。対照としては、新鮮培養液のみでリンパ球を培養した時の取り込みを測定し、その値を差し引いた。またこのMFは、70°C, 20分の熱処理により、90%以上活性が低下したことから、BCGの抗原成分の混入は無視できた。

成 績

1. T細胞, B細胞, T細胞サブセット

末梢血リンパ球中のT細胞, B細胞の比率については、合併患者群, 非合併患者群, 健常人群の3群に差はみられなかった。OKT 4⁺細胞において、合併患者群は健常人群に比し、低い傾向を示した。(Table 1)

2. リンパ球のMF産生能：患者リンパ球の *in vitro* PPD刺激によるMF産生能を健常人のものと比較したところ、合併患者群, 非合併患者群の3群に差はみられなかった。(Fig. 1)

3. MFに対するリンパ球の反応性：合併患者群と非合併患者群の間に差はみられなかったが、両群とも健常人群に比較し、低い反応性を示した。(Fig. 2)

4. リンパ球幼若化反応：Con Aによるリンパ球幼若化反応では、合併患者群と非合併患者群との間に差はみられなかったが、合併患者群 ($P < 0.01$), 非合併患者群 ($P < 0.02$) とともに、健常人群に比し、有意の低下を示した。PHA刺激による反応では、3群の間に差はみられなかった。特異抗原ツベルクリンPPD刺激によるリンパ球幼若化反応をみた場合、合併患者群は、非合併患者群および健常人群に比較し、やや低い値を

Table 1. Distribution of T and B Cells and T Cell Subsets in Tuberculosis Patients with and without Diabetes Mellitus

	TB+DM	TB	Healthy
T cells	75.6±4.5 (n=8)	76.1±5.4 (n=13)	74.7±6.0 (n=9)
B cells	12.8±4.8 (n=8)	12.4±2.2 (n=13)	13.3±3.3 (n=9)
OKT 4	39.4±3.3 (n=11)	39.5±9.9 (n=10)	42.7±4.9 (n=10)
OKT 8	28.4±9.0 (n=11)	20.9±5.8 (n=10)	32.1±5.3 (n=10)

Each figure represents percent of total lymphocytes.

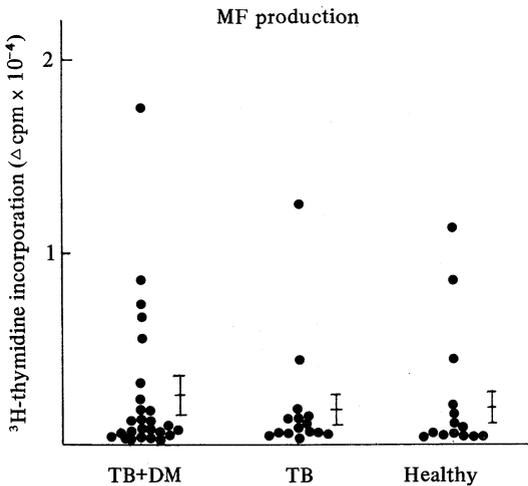


Fig. 1. PPD-induced production of mitogenic factor by peripheral blood lymphocytes. PBL from tuberculosis patients with (TB+DM), without (TB) or healthy donors were cultured with PPD for 24 hours *in vitro*. Culture supernatants were assessed for mitogenic activity using of PPD-nonreactive lymphocytes.

示したが、有意差はなかった。(Table. 2)

5. PPD刺激によるリンパ球反応性の検討：合併患者群においてPPD刺激による幼若化反応に低反応性を示すものが多くみられた為、PPD刺激による幼若化反応の健常人における平均値を境にして、合併患者群をPPD刺激により高反応性を示す群と低反応性を示す群の2群に分けた。それぞれのグループで、MF産生能およびMFに対するリンパ球の反応性を比較したところ、低反応性群は、非合併患者群に比較し、MF産生能において低い傾向を示したが、MFに対するリンパ球の反応性については差はみられなかった (Table 3)。PPD刺激によるリンパ球の反応性と血糖値、排菌の有無、病型の間には関連性はみられなかった。

考 察

糖尿病患者において免疫能の低下がみられるという報告は既に多くなされ、末梢血リンパ球のPHAまたはCon Aに対する反応性の低下¹⁾²⁾、T細胞数の減少²⁾³⁾

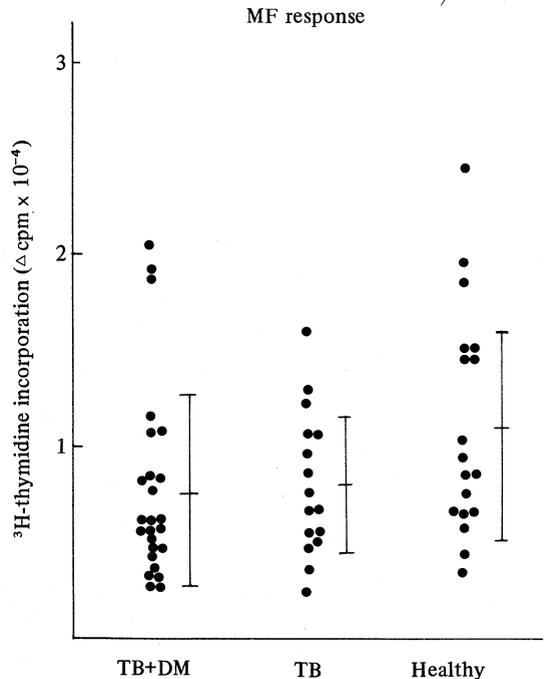


Fig. 2. Proliferative response of lymphocytes to mitogenic factor. PBL were cultured *in vitro* in the presence of mitogenic factor for 6 days. Proliferative response was examined by assessing the 3H-TdR incorporated into the cells during the last 18 hours of culture period.

などがあげられている。糖尿病に関する研究の中でもとりわけインシュリン依存性糖尿病に関するものが多く、末梢血リンパ球のPHA, Con Aに対する反応性の低下¹⁾⁴⁾、MIF活性の低下⁵⁾、OKT 4⁺細胞数の減少⁶⁾などがあげられている。これらの中で糖尿病を合併した肺結核に関する研究は数少なく、糖尿病合併肺結核患者は、非合併患者に比し、MIF活性が低下しているという報告⁸⁾、糖尿病合併肺結核患者の末梢血白血球によるBCG食菌作用が、糖尿病特有の代謝異常に基づく体液性要因、即ち高血糖、高遊離脂肪酸の状態により損われているという報告⁹⁾などをみる程度である。実験動物を扱ったものでは、streptozotocin誘起糖尿病

Table 2. Proliferative Response of PBL from Pulmonary Tuberculosis Patients with or without Diabetes Mellitus

Stimulants	Subjects	³ H-TdR incorporation (cpm)
Con A	TB+DM (n=34)	20,173±7,602 *
	TB (n=25)	22,705±7,302 **
	healthy (n=18)	28,171±7,270
PHA	TB+DM (n=33)	31,538±11,621
	TB (n=26)	29,942±8,273
	healthy (n=16)	34,320±8,778
PPD	TB+DM (n=25)	17,125±10,474
	TB (n=20)	21,103±10,404
	healthy (n=19)	21,047±6,974

Lymphocytes were cultured in the presence of Con A (20 µg/ml) or PHA (5 µg/ml) for 3 days or in the presence of PPD (50 µg/ml) for 6 days. ³H-thymidine incorporated during the last eighteen hours was counted.

* P<0.01 compared with healthy controls.

** P<0.02 compared with healthy controls.

Table 3. Responsiveness to and PPD-Induced Production of Mitogenic Factor in Tuberculosis Patients with and without Diabetes Mellitus

Subjects	PPD-induced proliferation	Production of mitogenic factor	Response to mitogenic factor
TB+DM			
low responder (n=13)	10,025±1,159	1,194±328	6,645±1,296
high responder (n=7)	30,932±2,591	4,855±2,173	7,645±1,937
TB (n=13)	21,883±2,647	1,830±867	7,312±1,014
Healthy (n=12)	22,655±1,896	2,644±1,048	10,757±1,558

Tuberculosis patients with diabetes mellitus (TB+DM) were classified into two groups according to their proliferative responsiveness to PPD stimulation. Each figure represents mean cpm±SE.

マウスにおいてB細胞機能は障されませんが、T細胞、macrophage機能の低下がある¹⁰⁾、一方、alloxan誘起糖尿病マウスにおいては、脾細胞のCon Aに対する反応性、macrophage機能、MIF、MAF活性など正常マウスと差がみられない¹¹⁾。

今回、我々は糖尿病合併患者群、非合併患者群、健常人群の末梢血リンパ球を用いて、非特異的T細胞マイトジェンCon A、PHAの反応性、あるいは特異抗原PPDに対する幼若化反応、リンパ球と特異抗原との反応により産生されるfactorの1種であるMF産生能、このMFに対するリンパ球の反応性を検討した。この中でCon Aに対する反応性およびリンパ球のMFに対する反応性は、糖尿病の合併、非合併を問わず、肺結核患者として健常人群に比較して低下を示した。しかしながら対象患者は、抗結核薬の投与を受けており、薬剤の影響による低下も否定できない。

PPD刺激による幼若化反応では、糖尿病合併患者群

の末梢血リンパ球は、非合併患者群、健常人群に比し、低い傾向を示した。合併患者の中でもPPDに低反応性を示した患者の末梢血リンパ球は、T細胞から産生されるfactorの1種であるMF産生能が低いにもかかわらず、その末梢血リンパ球(おそらくT細胞)の反応性は、非合併患者と差がなかった。このことは、糖尿病合併患者では、T細胞サブセットのレベルで何らかの機能異常が存在する可能性をうかがわせる。今後T細胞サブセットの機能面の検討が必要と思われる。

結 語

糖尿病合併肺結核患者の細胞性免疫能を非合併患者、健常人と比較したところ、PPD刺激によるリンパ球幼若化反応において低い傾向を示した。またCon Aに対する反応性、リンパ球のMFに対する反応性においては、糖尿病の合併、非合併を問わず肺結核患者群として健常人群に比し、低下を示した。

文 献

- 1) Plouffe, J. F. et al.: Cell-mediated immunity in diabetes mellitus, *Infect Immun*, 21: 426, 1978.
- 2) Eliashiv, A. et al.: Depression of cell-mediated immunity in diabetes, *Arch Surg*, 113: 1180, 1978.
- 3) Resegotti, L. et al.: Immunological changes in diabetes mellitus, A study of lymphocyte populations, *Arch Sci Med*, 136: 265, 1979.
- 4) Buschard, K. et al.: Depressed suppressor cell activity in patients with newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus, *Clin exp Immunol*, 41: 25, 1980.
- 5) Nagaoka, K. et al.: The leucocyte migration inhibition test and subpopulations of peripheral lymphocytes in insulin-dependent diabetes, *Endocrinol Japan*, 26: 89, 1979.
- 6) Mascart-Lemone, F. et al.: Characterization of immunoregulatory T lymphocytes in insulin-dependent diabetic children by means of monoclonal antibodies, *Clin exp Immunol*, 47: 296, 1982.
- 7) Büyüm, A.: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1g, *Scand J Clin Lab Invest*, 21 (Suppl. 97): 77, 1968.
- 8) Keleberda, K. Y. and Tudos, T. P.: Immunological reactivity of patients with pulmonary tuberculosis accompanied by sugar diabetes, *Ter Arkh*, 48: 104, 1976.
- 9) 原 敏彦他: 糖尿病合併肺結核患者の末梢白血球によるBCG食菌作用, *結核*, 55: 31, 1980.
- 10) Saiki, O. et al.: Depressed immunological defense mechanisms in mice with experimentally induced diabetes, *Infect Immun*, 28: 127, 1980.
- 11) Pasko, K. L. et al.: Mechanisms in the *in vivo* release of lymphokines (V. Responses in alloxan-treated and genetically diabetic mice), *Cellular Immunology*, 62: 205, 1981.