

原 著

糖尿病合併肺結核患者における末梢血単球の Interleukin-1 β (IL-1 β),
Tumor necrosis factor α (TNF α) および Interleukin-6 (IL-6)
産生能の検討

塚 口 勝 彦 ・ 米 田 尚 弘 ・ 吉 川 雅 則
徳 山 猛 ・ 夫 彰 啓 ・ 友 田 恒 一
成 田 亘 啓

奈良県立医科大学第2内科

榎 泰 義

同 生 理

塚 口 真理子 ・ 白 井 史 朗 ・ 北 村 曠
宮 崎 隆 治

国立療養所西奈良病院内科

受付 平成4年6月29日

CASE STUDY OF INTERLEUKIN-1 β , TUMOR NECROSIS FACTOR α AND
INTERLEUKIN-6 PRODUCTION PERIPHERAL BLOOD MONOCYTES
PATIENTS DIAGNOSED WITH DIABETES MELLITUS
COMPLICATED BY PULMONARY TUBERCULOSIS

Katsuhiko TSUKAGUCHI*, Takahiro YONEDA, Masanori YOSHIKAWA,
Takeshi TOKUYAMA, Akihiro FU, Koichi TOMODA, Nobuhiro NARITA,
Yasunori ENOKI, Mariko TSUKAGUCHI, Fumio SHIRAI,
Hiroshi KITAMURA and Ryuji MIYAZAKI

(Received for publication June 29, 1992)

Patients with diabetes mellitus (DM) show an increased susceptibility to bacterial infections due to the presence of neutrophil dysfunction. Susceptibility to tuberculosis has also been reported in such patients, however, the reason remains unclear.

This study measured the production of interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor α (TNF α) and interleukin-6 (IL-6) by the peripheral monocytes of patients diagnosed with pulmonary tuberculosis accompanied by DM (TB+DM) and patients without DM complications (TB) using age-matched, healthy control subjects for comparison. Also examined was the relationship between cytokine production and DM control. The results were as follows:

(1) The production of IL-1 β , TNF α and IL-6 in TB patients was significantly higher

* From the Second Department of Internal Medicine, Nara Medical University 840, Shijocho, Kashiharashi, Nara 634 Japan.

than that observed in the healthy control subjects.

(2) The production of IL-1 β , TNF α and IL-6 in TB+DM patients was significantly lower than that observed in the TB patients.

(3) The production of IL-1 β and TNF α in TB+DM patients with poor control was significantly lower than that observed in the patients with good control.

(4) The TNF α production had a significant inverse correlation to HbA_{1c} in the TB+DM patients.

This study demonstrated that the production of cytokines is impaired in TB+DM patients and suggests a close correlation between tuberculosis immunity and DM.

Key words : Pulmonary tuberculosis, Interleukin 1- β , Tumor necrosis factor, Interleukin 6, Diabetes mellitus

キーワード : 肺結核, Interleukin 1- β , 腫瘍壊死性因子, Interleukin 6, 糖尿病

はじめに

肺結核患者に糖尿病合併の頻度が高いことは以前から多く報告されており¹⁾²⁾, 実際, 日常診療上しばしば経験することである。糖尿病状態で感染防御能の低下を認めることは, これまで主に一般細菌に対する好中球機能の面から検討されてきたが³⁾, 糖尿病合併肺結核患者で細胞性免疫能を検討した報告は少ない。今回われわれは, 結核免疫の中心的役割を持つ単球~マクロファージ系に注目し, 糖尿病合併肺結核患者の末梢血単球によるサイトカイン産生能を測定することにより, 糖尿病が肺結核患者の免疫能に及ぼす影響を検討した。

対象および方法

A. 対 象

対象は, 平成2年4月から平成3年4月までに当科に入院した, 喀痰中結核菌の排菌が確認された抗結核治療開始前の活動性肺結核患者で, 糖尿病を合併している患者15例(年齢32~78歳で平均58.0 \pm 14.1歳, 以下TB+DM群), 年齢をマッチさせ, さらに栄養状態を合わせるために%標準体重と血清アルブミン値をマッチさせた糖尿病非合併肺結核患者15例(29~77歳, 平均59.3 \pm 17.1歳, 以下TB群), および健康人コントロールとして年齢をマッチさせた病院従事者15例を選んだ(23~69歳, 平均53.0 \pm 19.2歳)。

ツ反は全例陽性であったが, 大きさは38 \pm 26 mm (TB+DM群), 43 \pm 19 mm (TB群), 18 \pm 9 mm (コントロール群)と結核患者とコントロール群で有意差($p < 0.01$)を認めたが, 結核患者間では有意差を認めなかった。結核患者には以前に明らかな治療歴は認めず, TB+DM群とTB群間には排菌の程度, 日本結核病学会分類によるレントゲン上の拡がり有意差を認め

なかった。TB+DM群では空腹時血糖(FBS), グリコヘモグロビン(HbA_{1c})と排菌の程度は相関する傾向を認めたが, 拡がりとの関連では一定の傾向は存在しなかった(Table)。症例15以外は糖尿病治療中であったが, 治療法と結核の程度間には有意な関係は認めなかった。

B. 方 法

1) IL-1 β , TNF α , IL-6産生能の測定

(1) 単球の分離および培養上清の回収

患者および健康人からヘパリン化採血し, Ficoll-Hypaque比重遠心法(400 g, 30分間)にて単核球画分採取, 3回洗浄後10% Fetal calf serum (FCS) (Sigma社)加RPMI培養液(GIBCO社)に浮遊, あら

Table Subjects of TB+DM Group

Case	Gaffky	Extent	FBS (mg/dl)	HbA _{1c} (%)
①	IV	b II ₂	112	5.6
②	II	b III ₁	120	5.3
③	II	l III ₁	124	6.0
④	III	b III ₁	127	5.2
⑤	VI	r II ₂	133	6.1
⑥	III	b III ₁	138	6.1
⑦	V	l II ₂	148	7.2
⑧	VIII	b III ₂	160	7.4
⑨	VI	b III ₃	189	7.8
⑩	VII	b I ₁	192	8.4
⑪	VI	b III ₂	195	8.2
⑫	VIII	l III ₁	195	8.4
⑬	VI	b I ₃	203	8.7
⑭	V	l III ₁	206	7.9
⑮	IV	b III ₁	288	9.2

はじめ FCS にてコーティングしたプラスチックペトリディッシュ (CORNING 社 25020) に添加し 37°C, 5% CO₂ 下で 1 時間孵置した。孵置後上清を除き洗浄, 非付着細胞を除去した。0.2% EDTA, 5% FCS 加リン酸緩衝生理食塩水を加え 4°C, 15 分間孵置, ピペティング操作にて付着細胞を回収, 単球として使用した。回収細胞の 97% 以上がペルオキシダーゼ染色陽性細胞であった。5 × 10⁵/ml に調整した単球 100 μl を 96 穴平底プレート (CORNING 社 24860) に分注, 10 μg/ml の Lipopolysaccharide (W.E. Coli 0127 : B8 DIFCO 社) を添加, 37°C, 5% CO₂ 下で 24 時間培養, 上清を回収, -80°C で測定まで保存した。この上清に含まれる IL-1β, TNFα, IL-6 活性を単球のそれぞれの産生能とした。

(2) IL-1β, TNFα, IL-6 活性の測定

市販されているキット (メドジェニック社, エンドゲン社) を使用し, Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) によった。原理を簡単に述べると⁴⁾⁻⁶⁾ 各サイトカインに対するモノクローナル抗体をプレートに固定, サンプル, スタンダードを注入後 2 次抗体を添加, その後 Horseradish Peroxidase 結合抗 IgG (3 次抗体) を添加, さらに基質 (o-phenylenediamine) を添加し発色を比色計にて測定, 標準曲線から各サイトカイン活性を算定した。

2) FBS, HbA_{1c} の測定

FBS は酵素法, HbA_{1c} は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法にて測定した。

結 果

1) 各群のサイトカイン産生能

(1) IL-1β 産生能 (ng/ml)

TB+DM 群, 4.92 ± 1.44, TB 群, 8.92 ± 3.06, 健常群, 5.51 ± 1.31 で TB+DM 群は TB 群に比し有意の (p < 0.01) 低値を示し, TB は健常群に比し有意の (p < 0.01) 高値を示した (Fig. 1)。

(2) TNFα 産生能 (ng/ml)

TB+DM 群, 1.12 ± 0.34, TB 群, 2.19 ± 0.95, 健常群, 1.44 ± 0.39 で同様に TB+DM 群は TB 群に比し有意の (p < 0.01) 低値を示し, TB 群は健常群に比し有意の (p < 0.01) 高値を示した (Fig. 2)。

(3) IL-6 産生能 (ng/ml)

TB+DM 群, 12.9 ± 2.61, TB 群, 25.4 ± 14.3, 健常群, 14.5 ± 2.50 で IL-1β, TNFα 産生能と同様の有意差 (p < 0.01) を認めた (Fig. 3)。

2) サイトカイン産生能と糖尿病との関連

(1) 糖尿病コントロール状態 (FBS > 140 : 不良, FBS ≤ 140 : 良好)⁷⁾ で分類した IL-1β 産生能。

不良群, 4.40 ± 1.41, 良好群, 5.72 ± 1.03 で不良群

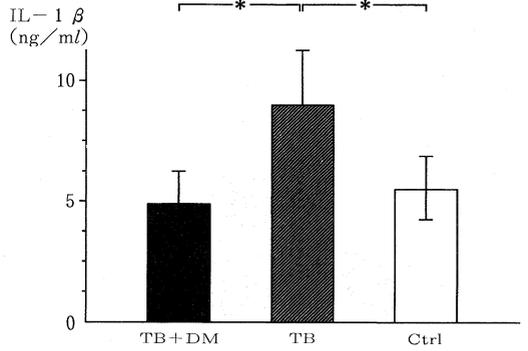


Fig. 1 Production of IL-1β in Patients with Pulmonary Tuberculosis with DM (TB+DM) or without DM (TB) and in Healthy Controls (Ctrl)

Data are represented mean ± SE
N=15 *p<0.01

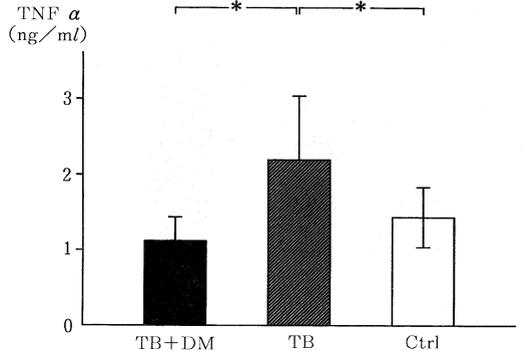


Fig. 2 Production of TNFα in Patients with Pulmonary Tuberculosis with DM (TB+DM) or without DM (TB) and in Healthy Controls (Ctrl)

Data are represented mean ± SE
N=15 *p<0.01

は良好群に比し有意の (p < 0.05) 低値を示した (Fig. 4)。

(2) 糖尿病コントロール状態で分類した TNFα 産生能

不良群, 0.94 ± 0.24, 良好群, 1.44 ± 0.24 で同様に不良群は良好群に比し有意の (p < 0.01) 低値を示した (Fig. 5)。

(3) TNFα 産生能と HbA_{1c} との関係

TNFα と HbA_{1c} 間には有意の (p < 0.01) 負の相関を認めた (Fig. 6)。

考 察

糖尿病患者は感染を合併しやすく経過も遷延すること

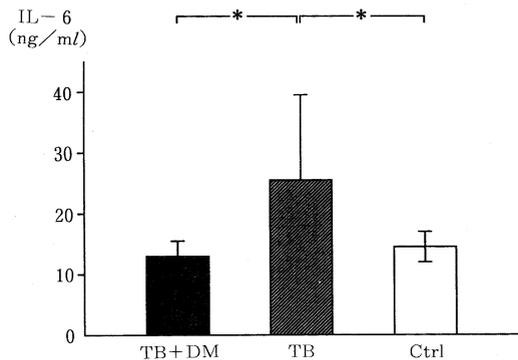


Fig. 3 Production of IL-6 in Patients with Pulmonary Tuberculosis with DM(TB+DM) or without DM(TB) and in Healthy Controls (Ctrl)
Data are represented mean±SE
N=15 * p<0.01

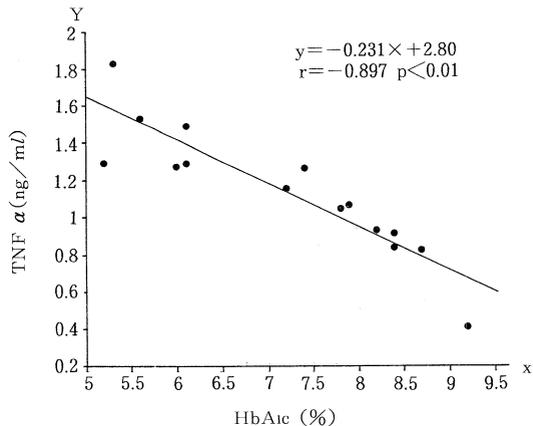


Fig. 6 Correlation between TNF α and HbA1c in Patients (TB+DM)

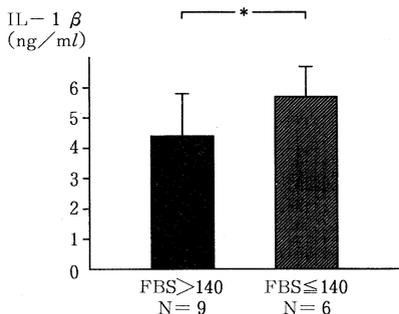


Fig. 4 Production of IL-1 β in TB+DM Patients Classified by Fasting Blood Sugar(FBS)
Data are represented mean±SE * p<0.05

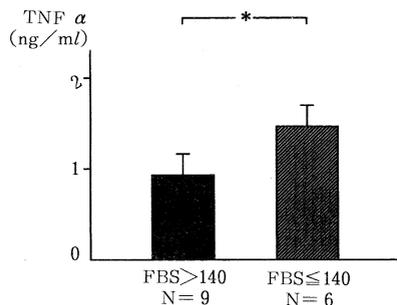


Fig. 5 Production of TNF α in TB+DM Patients Classified by Fasting Blood Sugar (FBS)
Data are represented mean±SE
* p<0.01

が多い⁸⁾。この易感染性の機序は以前から多く推測されてきた。脱水、栄養障害、微小血管障害、末梢神経障害などの非特異的原因⁹⁾¹⁰⁾の他、好中球¹¹⁾¹²⁾、リンパ球¹³⁾¹⁴⁾、単球¹⁵⁾などの免疫担当細胞の機能異常の面でも検討が加えられてきた。これらの機能異常の報告は主にブドウ球菌などの一般細菌に対するもので、好中球機能では遊走能、付着能、貪食能、殺菌能それぞれの段階で機能低下を認めるという報告が多い^{16)~18)}。

その機能低下の一因として、これらの機能発現に必要なエネルギーの不足状態が糖尿病で生じることが挙げられている。解糖系においてインスリン依存性解糖系の酵素である phosphofructokinase や pyruvate kinase がインスリン作用不全によりその活性が低下し、この活性低下がエネルギー産生低下につながり機能発現にエネルギーの必要な好中球機能に影響を来すという機序が想定されている¹⁹⁾²⁰⁾。リンパ球に関してはその数、分画に異常を来し²¹⁾、ブドウ球菌抗原に対する反応性が低下するなどの報告がある²²⁾。また、糖尿病では好中球、単球殺菌能を反映するスーパーオキシド産生能が低下し²³⁾²⁴⁾、別の好中球殺菌系である myeloperoxidase (MPO)-H₂O₂-Cl⁻系の MPO 活性の低下と併せ²⁵⁾、これらの機能低下が糖尿病におけ易感染性の一因になっている可能性が指摘されている。

以上のように糖尿病状態での易感染性に関しては多くの原因が推察されているが、これらの検討は主に対一般細菌に関しての検討であり、糖尿病での結核高頻度合併にもかかわらず対結核菌で糖尿病の影響を検討した報告は少ない。動物実験では、糖尿病ラットの結核菌増殖率が高値で、病巣内の結核菌消失遅延を認める²⁶⁾。臨床的検討では糖尿病合併肺結核患者で、PPD に対するリンパ球幼若化反応が低下している²⁷⁾、末梢白血球による BCG 食菌能が低下している²⁸⁾などの報告が存在

するのみである。

結核抗菌作用においてはマクロファージによる結核菌の食菌、活性化後の殺菌というプロセスが重要で、このマクロファージ活性化には各種サイトカイン²⁹⁾や他の因子³⁰⁾の関与が必要である。サイトカインによるマクロファージ結核菌殺菌誘導作用に関してはアッセイシステムの確立の困難さから必ずしも一定の見解が得られているわけではないが、マウスではIFN- γ 、IL-4、TNF α ³¹⁾が、ヒトではTNF α ²⁹⁾³²⁾、IL-2、GM-CSF³²⁾がそれぞれ殺菌能を促進させるという報告がある。糖尿病患者での検討が今後必要である。

今回、われわれが検討した対象においては、糖尿病合併肺結核患者で単球による3種類のサイトカインの産生能が非合併患者に比し低下しており、健常コントロールと同レベルであるという結果が得られた。この結果は糖尿病合併肺結核患者のサイトカイン産生能は非侵襲、非炎症状態の健康人レベルであり、結核菌侵入、増殖時に十分なマクロファージ殺菌能を誘導(少なくともTNF α による)できず、これが一般的に糖尿病患者の結核易罹性につながっている可能性を示唆するものと考えられた。

従来から、糖尿病のコントロール状態と易感染性の関連性が報告されてきた³³⁾。その理由として、持続する高血糖との関連²⁵⁾³⁴⁾が挙げられている。結核に関してはレントゲン上の病巣の広がり³⁵⁾、排菌量³⁶⁾、治療の反応性³⁷⁾が糖尿病コントロールと関連があるという報告があるが、本報告でも糖尿病コントロールと排菌量は相関する傾向を認めた。

本研究では糖尿病のコントロール状態とサイトカイン産生能との関連を検討した。空腹時血糖の不良群は良好群に比しIL-1 β 、TNF α 、IL-6産生能が有意の低値を示し、また、TNF α 産生能は平均血糖値を反映するHbA_{1c}と有意の負の相関を示した。

この結果は、持続的高血糖がサイトカイン産生能に影響を与え、さらに排菌量にも影響を及ぼす可能性を示しており、糖尿病のコントロール状態がサイトカイン産生能を介して結核抗菌免疫と関連していることを示すものと思われた。HbA_{1c}は好中球での殺菌にも必要なスーパーオキシド産生能と逆相関する²³⁾²⁴⁾。今回、TNF α とHbA_{1c}との密接な関連を示す成績から、結核抗菌免疫ではTNF α と活性酸素系の殺菌系がHbA_{1c}に関して同じ傾向を示し、糖尿病状態においてTNF α 産生能の低下と活性酸素系の殺菌能の低下が何らかの関連性を有する可能性が示唆された。

結 語

糖尿病合併肺結核患者15例、非合併肺結核患者15例、

および健常コントロール15例について末梢血単球のIL-1 β 、TNF α 、IL-6産生能を測定、比較し検討した。また同時に、糖尿病の程度との関連も検討した。

1) TB群のIL-1 β 、TNF α 、IL-6産生能は健常群に比し有意の高値を示した。

2) TB+DM群のIL-1 β 、TNF α 、IL-6産生能はTB群に比し有意の低値を示した。

3) TB+DM群での検討では糖尿病コントロール不良群は良好群に比しIL-1 β 、TNF α 産生能が有意の低値を示した。

4) TB+DM群ではTNF α 産生能とHbA_{1c}間に有意の負の相関を認めた。

以上より、糖尿病合併肺結核患者ではサイトカイン産生能低下を認め、結核抗菌免疫能低下の存在が推測された。糖尿病の程度はサイトカイン産生能の程度と密接に関係し、結核免疫に影響を及ぼしている可能性が考えられた。

文 献

- 1) 楠木繁男：肺結核と糖尿病，医療。1967；21：335-339。
- 2) 福島和文：糖尿病を合併した肺結核症例の臨床的検討，結核。1980；55：26-32。
- 3) Morteza N, Raymond P, Smith AL, et al. The effect of diabetes mellitus on chemotactic and bactericidal activity of human polymorphonuclear leukocytes. Diabetes Res Clin Practice. 1987；4：27-35。
- 4) Tanaka K, Ishikawa E, Ohmoto Y, et al. Sandwich enzyme immunoassay for human interleukin-1 α produced *in vitro* by peripheral blood mononuclear cells. Clinica Chimica Acta. 1987；170：97-103。
- 5) Ferrua B, Becker P, Schaffar L, et al. Detection of human IL-1 α and IL-1 β at the subpicomolar level by colorimetric sandwich enzyme immunoassay. J Immunol Method. 1988；114：41-48。
- 6) Gaffney EW, Chu CW, Lingenfelter SE, et al. Enzyme linked immunoassay with monoclonal antibody for human interleukin-1 β . Biotechniques. 1987；5：652-656。
- 7) 中川昌一：治療の目標とコントロールの基準，90年代糖尿病の治療，1990，59-68。
- 8) 松岡健平，渥美義仁：糖尿病患者の感染，最新医学。1987；42：1216-1221。
- 9) Cooppan R. Infection and diabetes in Joslin's diabetes mellitus. Lea & Febiger Phi-

- Philadelphia, 1985, 737-747.
- 10) 齊藤 厚, 他 : 糖尿病性合併症—各種感染症, 日本臨床. 1986 ; 44 : 727-733.
 - 11) Alastair G, Mowat MB and John B. Chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes from patients with diabetes mellitus. *New Engl J Med.* 1971 ; 284 : 621-627.
 - 12) Bagdade JD, Root RK and Bulger RJ. Impaired leukocyte function in patients with poorly controlled diabetes. *Diabetes.* 1974 ; 23 : 9-15.
 - 13) Hann S, Kaye R and Falkner B. Subpopulations of peripheral lymphocytes in juvenile diabetes. *Diabetes.* 1976 ; 25 : 101-103.
 - 14) Gupta S. : Lymphocyte response in diabetes mellitus, *Immunology of clinical and experimental diabetes.* Plenum medical book company, New York. 1984, 329-349.
 - 15) Geisler C, Almdal T, Bennedsen J, et al. Monocyte functions in diabetes mellitus. *Acta Path Microbiol Immunol Scand Sect.* 1982 ; 90 : 33-37.
 - 16) 堺 秀人 : 糖尿病における白血球の機能異常と感染症, 糖尿病. 1980 ; 23 : 1019-1022.
 - 17) Valerius NH, Hansen NE, Eff C, et al. Neutrophil and lymphocyte function in patients with diabetes mellitus. *Acta Med Scand.* 1982 ; 211 : 463-467.
 - 18) Pereira MAA, Sannomia P and Leme JG. Inhibition of leukocyte chemotaxis by factor in alloxan-induced diabetes rat plasma. *Diabetes.* 1987 ; 36 : 1307-1314.
 - 19) Bagdade JD. Phagocytic and microbicidal function in diabetes mellitus. *Acta Endocrinol.* 1976 ; 83 : 27-34.
 - 20) Esmann V. The polymorphonuclear leukocyte in diabetes mellitus. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1983 ; 21 : 561-567.
 - 21) Resegotti L. Immunological changes in diabetes mellitus, A study of lymphocyte populations. *Arch Sci Med.* 1979 ; 136 : 256-262.
 - 22) Casey JI, Heeter BJ and Klishevich KA. Impaired response of lymphocytes of diabetic subjects to antigen of staphylococcus aureus. *J Infect Dis.* 1977 ; 136 : 495-501.
 - 23) 佐野 清 : 糖尿病における白血球の機能に関する研究, 第1編, 好中球スーパーオキシド産生能, 岡山医誌. 1979 ; 91 : 713-722.
 - 24) 三島康男 : 単球スーパーオキシド産生能に関する研究, 第2編, 糖尿病における単球スーパーオキシド産生能に関する研究, 岡山医誌. 1988 ; 100 : 895-902.
 - 25) 佐藤則之, 諏訪邦彦, 下村洋之助, 他 : 血糖コントロール不良糖尿病患者における好中球ミクロペルオキシダーゼ活性およびスーパーオキシドアニオン生成能について, 糖尿病. 1988 ; 31 : 585-590.
 - 26) 鈴木富士夫 : 糖尿病における肺感染症に関する臨床的ならびに実験的研究—とくに肺結核を中心として—, 結核. 1970 ; 45 : 273-281.
 - 27) 大西和子, 藤原 寛, 亀田和彦, 他 : 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, 結核. 1983 ; 58 : 421-425.
 - 28) 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. 1980 ; 55 : 31.
 - 29) Denis M, Gregg EO and Ghandirian E. Cytokine modulation of *mycobacterium tuberculosis* growth in human macrophage, *Int J Immunopharm.* 1990 ; 12 : 721-727.
 - 30) Denis M. Killing of *mycobacterium tuberculosis* within human monocytes : activation by cytokines and calcitriol, *Clin exp Immunol.* 1991 ; 84 : 200-206.
 - 31) Flesch IEA and Kaufmann SHE. Activation of tuberculostatic macrophage function by gamma interferon, interleukin-4, and tumor necrosis factor, *Infect and Immun.* 1990 ; 58 : 2675-2677.
 - 32) Yoneda T, Ellner JJ, Toossi Z. Effect of a panel of cytokines on intracellular killing by human monocytes, *Infect and Immun (in press)*
 - 33) Rayfield EJ, Ault MJ, Keusch GT, et al. Infection and diabetes : the case for glucose control. *Am J Med.* 1982 ; 72 : 439-450.
 - 34) Gilbert HS, Rayfield EJ, Smith H, et al. Effect of acute endotoxemia and glucose administration on circulating leukocytes populations in normal and diabetic subjects, *Metabolism.* 1978 ; 27 : 889-900.
 - 35) 長岡研二 : 肺結核と糖尿病, 医療. 1970 ; 24 : 29-35.
 - 36) 斎藤圭二, 米田尚弘, 塚口勝彦, 他 : 糖尿病合併肺結核の臨床的検討, 結核. 1990 ; 65 : 187.
 - 37) 弘 雍正 : 肺結核と糖尿病—国療化研第29次B研究報告—, 結核. 1989 ; 64 : 699-705.