

原 著

活動性肺結核患者における血中 interleukin-8 (IL-8),
tumor necrosis factor- α (TNF- α) 濃度の検討

仲谷宗裕・米田尚弘・吉川雅則
塚口勝彦・徳山猛・夫彰啓
岡本行功・福岡和也・山本智生
福岡篤彦・友田恒一・斧原康人
成田亘啓

奈良県立医科大学第二内科

島田 永和

島田病院

受付 平成7年3月6日

受理 平成7年5月17日

THE EVALUATION OF INTERLEUKIN-8 (IL-8) AND TUMOR NECROSIS
FACTOR- α (TNF- α) LEVEL IN PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS
WITH ACTIVE PULMONARY TUBERCULOSIS

Munehiro NAKAYA *, Takahiro YONEDA, Masanori YOSHIKAWA,
Katsuhiko TSUKAGUCHI, Takeshi TOKUYAMA, Akihiro FU,
Yukinori OKAMOTO, Kazuya FUKUOKA, Chinaru YAMAMOTO,
Atsuhiko FUKUOKA, Koichi TOMODA,
Yasuto ONOHARA, Nobuhiro NARITA
and Nagakazu SHIMADA

(Received 6 March 1995/Accepted 17 May 1995)

We investigated the serum level of IL-8 and TNF- α using ELISA in 16 patients with active pulmonary tuberculosis before administration of antituberculous drugs and in age-, smoking habit-matched 20 healthy controls.

The mean level of serum IL-8 in patients with active pulmonary tuberculosis was significantly higher than that in healthy controls ($P < 0.001$). The mean level of serum TNF- α in tuberculosis patients was also high, while TNF- α was not detectable in the sera of healthy controls.

We also examined the relationship between clinical pictures mainly defined by radiographic findings and the serum levels of IL-8 and TNF- α . The serum IL-8 level of 9

* From the Second Department of Internal Medicine, Nara Medical University, 840 Shijo-cho, Kashihara-shi, Nara 634 Japan.

patients with tuberculous cavity is significantly higher than that of 7 patients without cavity. ($P < 0.05$)

We classified the patients with cavities into two subgroups according to the radiographic classification of the Japanese Society of Tuberculosis. Four patients with advanced lesions on chest X-ray showed higher serum IL-8 level than 5 patients with moderate lesions ($P < 0.05$). On the other hand, there was no correlation between serum TNF- α level and radiographic findings.

These results suggest that IL-8 appears to be involved in the formation of tuberculous cavitory lesion.

Key words : Pulmonary tuberculosis, Interleukin-8 (IL-8), Tumor necrosis factor- α (TNF- α), Tuberculous cavity

キーワード : 肺結核, interleukin-8 (IL-8), Tumor necrosis factor- α (TNF- α), 結核性空洞

緒 言

interleukin-8 (以下, IL-8) は好中球走化活性をはじめとして, 好中球細胞内酵素の放出, 好中球のスーパーオキシド産生誘導など好中球機能に強い影響を持つが^{1)~3)}, 近年, T細胞走化活性の亢進⁴⁾⁵⁾ など, リンパ球系に対する作用も指摘されている多彩な作用を持つサイトカインで, 種々の炎症性疾患への関与が示唆されている^{6)~10)}。

また近年 *in vitro* で *Mycobacterium tuberculosis* (以下, *M. tuberculosis*) のヒト単球による貪食実験で, 抗酸菌の細胞内殺菌で IL-8 の放出が報告され, 抗酸菌感染時の生体防御に IL-8 の関与が示唆されている¹¹⁾。

また proinflammatory cytokine の一つである tumor necrosis factor- α (以下, TNF- α) は, IL-8 産生を誘導し, 結核性肉芽腫形成¹²⁾ や殺菌過程¹³⁾ に重要な役割を果たすことが報告されている。

今回われわれは, 活動性結核症患者の IL-8, TNF- α の血中濃度を測定し, それぞれについての胸部X線所見上の空洞の有無, 病変の広がりなどの各種臨床所見との関連性を検討したので報告する。

対 象

平成5年4月から当科または関連病院に入院し, 喀痰から排菌が確認された活動性肺結核患者16例(男12例, 女4例, 年齢56.6 \pm 16.6歳)および対照群として年齢, 喫煙歴を一致させた健康人20例(男10例, 女10例, 年齢52.4 \pm 17.2歳)を対象とした。

方 法

患者と対照群から血液を採血し, 血清分離後測定まで -80°C で保存した。患者血清は入院の直後, 抗結核薬投与開始前に採取した。凍結保存した血清を測定時に室温で融解し, 血清中の IL-8 濃度を IL-8 ELISA キット(トーレ・フジバイオニクス社製, 最低検出感度3.0 pg/ml), TNF- α ELISA キット(MEDGENIX社製, 最低検出感度1.9 pg/ml)を用いて測定した。

本研究の統計学的検討には Student の *t* 検定を用い, 測定値は平均値 \pm 標準偏差(SD)で記載した。

結 果

1. 対照群と肺結核患者群との IL-8, TNF- α の血清濃度

血清 IL-8 濃度は対照群では 2.5 ± 4.4 pg/ml と低値であるが, 患者群では 28.2 ± 26.4 pg/ml と有意に高値を示した ($P < 0.0001$) (Fig. 1)。

血清 TNF- α 濃度は, 対照群では全例で最低検出感度未満であったが患者群では 10.0 ± 13.3 pg/ml であった (Fig. 2)。

2. 各種臨床検査所見との比較

IL-8, TNF- α と臨床病態, 免疫能, 栄養状態との関連性を検討するために患者群の白血球 ($/\mu\text{l}$), 赤血球 ($/\mu\text{l}$), ヘマトクリット (%), ヘモグロビン (g/dl) などの末梢血検査, 血清総蛋白 (g/dl), 血清アルブミン (g/dl), 血清コリンエステラーゼ (IU/l) などの生化学的検査, 各種免疫グロブリン (mg/dl), CRP (mg/ml), C3 (mg/dl), C4 (mg/dl), CH50 の血清補体価などの液性免疫能, および PPD と 2, 4-dinitrochlorobenzene (DNCB) とによる遅延型皮膚反応の

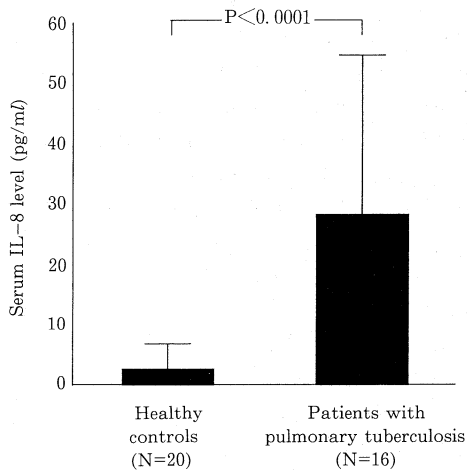


Fig. 1 Comparison of serum levels of IL-8 in patients with pulmonary tuberculosis and healthy controls.

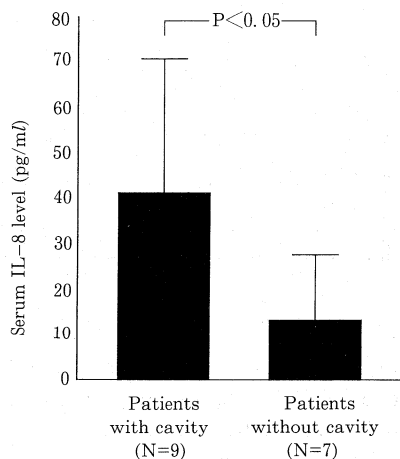


Fig. 3 Comparison of serum IL-8 levels in patients with pulmonary tuberculosis with cavity and those without cavity.

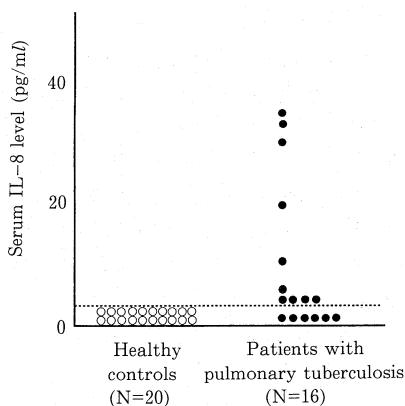


Fig. 2 Comparison of serum levels of TNF- α in patients with pulmonary tuberculosis and healthy controls.

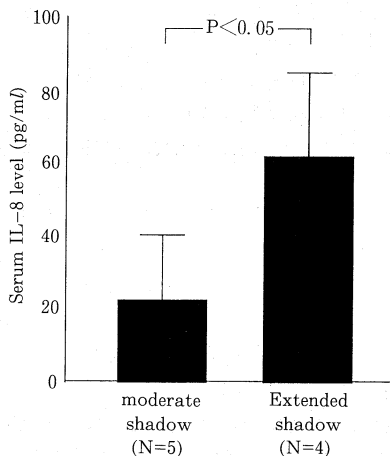


Fig. 4 Serum IL-8 levels in patients with cavity. Comparison of IL-8 level in patients with moderate shadows and those with extended shadows defined by chest X-ray.

陽性率, PHA, ConA によるリンパ球幼若化反応などの細胞性免疫能の指標との関連について検討した。今回の検討では、血清 IL-8 濃度および血清 TNF- α 濃度にはいずれの項目の間にも有意な相関は認められなかった。

3. 胸部X線所見との比較

1) 空洞の有無との関連

単純・断層胸部X線所見で空洞の有無を検討し、患者群を空洞あり群(9例)と空洞なし群(7例)とに分け、両群での血清 IL-8 濃度および血清 TNF- α 濃度を比較した。

血清 IL-8 濃度は、空洞あり群は 40.0 ± 28.4 pg/ml、空洞なし群では 13.0 ± 13.8 pg/ml で、空洞あり群で有意に高値を示した ($P < 0.05$) (Fig. 3)。

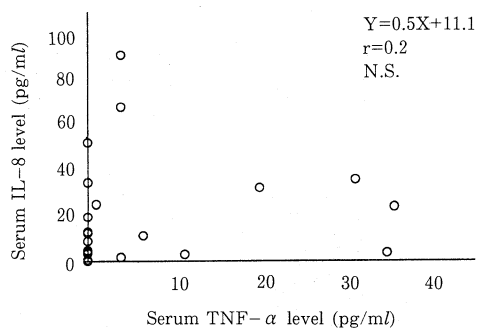


Fig. 5 Correlation between serum IL-8 levels and TNF- α levels in patients with pulmonary tuberculosis.

血清 TNF- α 濃度は、空洞あり群は 5.6 ± 10.5 pg/ml, 空洞なし群では 15.1 ± 15.2 pg/ml で両群間に有意差はみられなかった。

2) 病変の広がりとの関連

患者群 (16 例) を、日本結核病学会分類に従い、肺病巣の広がりによって広がり 1 (5 例), 広がり 2 (10 例), 広がり 3 (1 例) に分類した。広がり 2 と 3 とを合わせたものを広範囲群 (11 例) とし、広がり 1 の小範囲群とについて両群の IL-8 濃度, TNF- α 濃度をそれぞれ比較した。

血清 IL-8 濃度は広範囲群 (11 例) では 30.9 ± 29.8 pg/ml, 小範囲群 (5 例) では 22.4 ± 18.1 pg/ml で、また血清 TNF- α 濃度は、広範囲群 (11 例) は 13.1 ± 14.4 pg/ml, 小範囲群 (5 例) では 1.6 ± 3.2 pg/ml と、IL-8, TNF- α とも広範囲群で高値であったが、両群間に有意差はみられなかった。

患者群のうち、空洞あり群 (9 例) で同様の検討を行ったところ、血清 IL-8 濃度は広範囲群 (4 例) では 62.0 ± 23.2 pg/ml, 小範囲群 (5 例) では 22.4 ± 18.1 pg/ml で、広範囲群において有意に高値であった ($P < 0.05$) (Fig. 4)。

血清 TNF- α 濃度は、広範囲群 (4 例) は 9.9 ± 13.4 pg/ml, 小範囲群 (5 例) では 10.3 ± 14.5 pg/ml と、両群の間に有意差はみられなかった。

4. IL-8 濃度と TNF- α 濃度との関連

患者群の血清 IL-8 濃度, および血清 TNF- α 濃度の相関を検討したが、両者の間に有意な相関は見られなかった。(Fig. 5)

考 案

近年、マクロファージの抗結核作用への種々のサイトカインの関与が注目されている^{14)~16)}。Flesch ら¹⁴⁾ は

in vitro でのマウス骨髄由来マクロファージによる *Mycobacterium bovis* 貪食実験で、TNF が少量で IFN- γ の殺菌能賦活活性を著明に増強することを、また Yoneda ら¹⁶⁾ はヒト単球による *M. tuberculosis* の細胞内殺菌実験で、TNF- α , interleukin-2 (以下、IL-2), granulocyte-macrophage colony stimulating factor (以下、GM-CSF) はヒト単球の細胞内殺菌能を増強することを指摘している。Roach¹⁷⁾ らは結核菌細胞壁の主要成分である lipoarabinomannan (以下、LAM) によって単球を刺激し、非病原株由来の LAM は単球の TNF- α 産生能を誘導するが病原株由来の LAM は TNF- α を誘導しないことを報告しており、抗酸菌感染症におけるサイトカインの関与が明らかにされつつある。

IL-8 は interleukin-1 (以下、IL-1), TNF, lypopolysaccharide (以下、LPS) などの刺激により単球やマクロファージ¹⁸⁾¹⁹⁾, 線維芽細胞¹⁹⁾, 血管内皮細胞¹²⁾²¹⁾, 肝細胞¹⁾ などにより産生され、好中球走化活性, 好中球細胞内酵素の放出, 好中球のスーパーオキシド産生誘導など, 好中球に対する作用を中心とした急性炎症に深く関与するサイトカインで、近年、好中球機能に対する活性のみならず、Tリンパ球にも走化活性を示すことが指摘されている⁴⁾⁵⁾。また肺線維症, サルコイドーシスにおける気管支肺胞洗浄液⁷⁾ 中に高濃度に認められ、また慢性関節リウマチにおける関節液²²⁾, 羊絨毛膜炎の胎盤血¹⁰⁾ についても検討され、これらの報告では IL-8 濃度と病勢との相関も指摘されている。また末梢血での検討では急性肺炎⁶⁾, 成人呼吸促進症候群 (以下、ARDS), 重症肺炎²³⁾ などにおいて高い血中濃度を示すことが報告されている。

本検討で得られた肺結核患者の血清中 IL-8 濃度は、ARDS²³⁾²⁴⁾, 急性肺炎⁶⁾, 重症肺炎²³⁾ などの急性炎症性疾患患者の血中濃度に比べると低値であったが、これらの報告でみられた健常者の血中濃度に比べると高値であった。また Antong ら⁸⁾ は各種疾患に伴う胸水中の IL-8 濃度を検討し、結核性胸水中には、漏出性胸水に比べ高濃度の IL-8 が認められるが、膿胸, 肺炎に伴う胸水および悪性胸水に比べ低値であったと報告しており、これらの所見は結核症の生体防御に対し、好中球を中心とした非特異的炎症細胞も関与している可能性を示すものと考えられる。

今回われわれが検索し得た範囲では、血中 IL-8 濃度と結核感染症との関連を臨床的に検討した報告はみられなかったが、Friedland ら¹¹⁾ はヒト単球の cell line に、*M. tuberculosis* (H37Rv, H37Ra), LPS, zymosan を *in vitro* で貪食させ、それぞれの培養上清中の TNF と IL-8 濃度とを検討し、結核菌貪食時の

TNF濃度はLPS, zymosan 食食時の濃度と差は見られないが、IL-8濃度はLPS, zymosan 食食時に比べ、結核菌食食時に著増することを指摘している。また抗TNF抗体で上清中のTNF活性を中和しても、IL-8は培養上清中に高濃度に出現することを指摘し、結核感染により、TNFの刺激を介さない、直接的なIL-8産生が生じる可能性を報告した。

今回のわれわれの検討は血清中のサイトカイン濃度の検討であり、血清中のサイトカイン濃度が結核病巣局所のサイトカイン濃度を反映しているか否かは検討の余地があるが、Cholletら²³⁾の重症肺炎患者の気管支肺胞洗浄液中および血清中のIL-8濃度を検討し、重症肺炎患者の血清IL-8濃度は、気管支肺胞洗浄液中のIL-8濃度に比べると低値であるが、健常者に比べ著明な高値を示したと報告しており、この成績は血清IL-8濃度は、炎症局所のIL-8濃度をある程度反映することを支持するものと考えられ、本検討で得られた末梢血清中の知見は、血清IL-8濃度がTNF- α に比べ結核病巣の存在とその大きさをよく反映している可能性を示すものと考えられる。またTNF- α とは独立して、IL-8が結核患者の病巣形成に関与しているというFriedlandらの成績を反映している可能性も否定できない。

また本検討のもう一つの新知見は、IL-8濃度は胸部X線上空洞形成例では空洞非形成例と比べて有意に高値であった点である。結核空洞は乾酪巣内にマクロファージやリンパ球とともに好中球の浸潤も著明に見られる場合、あるいは何らかの誘因で乾酪化した病巣に好中球が持つ蛋白融解酵素が多量に加わった場合、酵素と阻害物質とのバランスが酵素過剰に傾き、乾酪壊死巣の蛋白分解、軟化および融解が始まり、軟化した壊死物質は誘導気管支を介して排除され、物質欠損部として生じるとされている²⁵⁾。このように空洞形成部では好中球の浸潤が著明であると考えられ、空洞形成例でみられた血清IL-8濃度の高値は、空洞形成部局所でのIL-8濃度の上昇を反映する可能性が推測された。

結 語

1) 活動性結核患者と健常成人の血清IL-8濃度、血清TNF- α 濃度を測定した。患者群ではIL-8濃度は著明な高値を示し(P<0.0001)、血清TNF- α 濃度も比較的高値を示した。

2) 患者群で臨床所見、特に画像所見と血清IL-8濃度、血清TNF- α 濃度とをそれぞれ比較した。

a) 血清IL-8濃度:

空洞あり群は空洞なし群に比べ有意に高値を示した(P<0.05)。

空洞あり群で広範囲病巣群は小範囲病巣群に比べ有

意に高値を示した(P<0.05)。

b) 血清TNF- α 濃度:

空洞あり群と空洞なし群との間、広範囲病巣群と小範囲病巣群との間のいずれにも有意差は認められなかった。

今回の検討でTNF- α とともに血清IL-8濃度が高値を示した知見は、肺結核症の病巣形成、特に空洞の成立にIL-8が関与している可能性を示唆していると考えられた。

なお、本論文の要旨の一部は第69回日本結核病学会総会(1994年4月、長崎)で発表した。

文 献

- 1) Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL: Neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8, novel cytokine, that activate neutrophils. *J Clin Invest.* 1989; 84: 1045-1049.
- 2) 堀口兵剛, 松島綱治: インターロイキン8—その性状と疾患との関連—。「別冊・医学のあゆみ, サイトカイン—基礎から臨床応用まで」, 第1版, 今西二郎, 淀井淳司編集, 医歯薬出版, 東京, 1992, 40-42.
- 3) 松島綱治, 石川雄治: IL-8と炎症. 感染・炎症・免疫. 1994; 24: 9-17.
- 4) Larsen CG, Anderson AO, Appella E, et al.: The neutrophil activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocyte. *Science.* 1989; 243: 1464-1466.
- 5) Wilkinson PC, Newman I: Identification IL-8 as a locomotor attractant for activated human lymphocytes in mononuclear cell culture with anti-CD3 or purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 1992; 149: 2689-2694.
- 6) Gross V, Andreesen R, Leser HG, et al.: Interleukin-8 and neutrophil activation in acute pancreatitis. *Eur J Clin Invest.* 1992; 22: 200-203.
- 7) Bruce DC, Federica M, Maurizio L, et al.: Elevated IL-8 and MCP-1 in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994; 149: 655-659.
- 8) Antong VB, Godbey SW, Kunkel SL, et al.: Recruitment of inflammatory cells to the

- pleural space. *J Immunol.* 1993 ; 151 : 7216-7223.
- 9) Cohen AB, MacArthur J, Idell S, et al. : A peptide from alveolar macrophages that releases neutrophil enzymes into the lungs in patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis.* 1988 ; 137 : 1151-1158.
 - 10) Shimoya K, Matsuzaki N, Taniguchi T, et al. : Interleukin-8 in cord sera : A sensitive and specific marker for the detection of preterm chorioamnionitis. *J Infect Dis.* 1992 ; 165 : 957-960.
 - 11) Friedland JS, Remick DG : Secretion of human monocyte cell lines. *Eur J Immunol.* 1992 ; 22 : 1373-1378.
 - 12) Kindler V, Sappino AP, Grau GE, et al. : The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell.* 1989 ; 56 : 731-740.
 - 13) Denis M : Killing of *Mycobacterium tuberculosis* within human monocytes : activation by cytokines and calcitriol. *Clin Exp Immunol.* 1991 ; 84 : 200-206.
 - 14) Flesch IEA, Kaufmann SHE : Activation of tuberculostatic macrophage function by gamma interferon, interleukin-4, and tumor necrosis factor. *Infect Immun.* 1990 ; 58 : 2675-2677.
 - 15) Flesch IEA, Kaufmann SHE : Stimulation of antibacterial macrophage activities by B-cell stimulatory factor 2 (Interleukin-6). *Infect Immun.* 1990 ; 58 : 269-271.
 - 16) Yoneda T, Tossii Z, Ellner JJ, et al. : Effect of a panel of cytokines on intracellular killing of *Mycobacterium tuberculosis* within human monocytes. *Am J Resp Crit Care Med.* 1994 ; 149 : A873.
 - 17) Roach TIA, Barton CH, Chatterjee D, et al. : Macrophage activation : Lipoarabino-mannan from avirulent and virulent strains of *Mycobacterium tuberculosis* differentially induces the early genes c-fos, KC, JE, and tumor necrosis factor- α . *J Immunol.* 1993 ; 150 : 1886-1896.
 - 18) Peveri P, Walz A, Dewald B, et al. : A neutrophil-activating factor produced by human mononuclear phagocytes. *J Exp Med.* 1988 ; 167 : 1547-1559.
 - 19) Yoshimura T, Matsushima K, Oppenheim JJ, et al. : Neutrophil chemotactic factor produced by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human blood mononuclear leukocytes : partial characterization and separation from interleukin 1 (IL-1). *J Immunol.* 1987 ; 139 : 788-793.
 - 20) Strieter RM, Phan SH, Showell HJ, et al. : Monokine-induced neutrophil chemotactic factor gene expression in human fibroblast. *J Biol Chem.* 1989 ; 264 : 10621-10626.
 - 21) Strieter RM, Kunkel SL, Showell HJ : Monokine-induced gene expression of a human endothelial cell-derived neutrophil chemotactic factor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988 ; 156 : 1340-1345.
 - 22) Peichl P, Ceska M, Effenberger F, et al. : Presence of NAP-1/IL-8 in synovial fluids indicates a possible pathogenic role in rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol.* 1991 ; 34 : 333-339.
 - 23) Chollet MS, Montravers P, Gibert C, et al. : High levels of interleukin-8 in the blood and alveolar spaces of patients with pneumonia and adult respiratory distress syndrome. *Infect Immun.* 1993 ; 61 : 4553-4559.
 - 24) Miller EJ, Cohen AB, Nagao S, et al. : Elevated levels of NAP-1/interleukin-8 are present in the airspaces of patients with the adult respiratory distress syndrome and are associated with increased mortality. *Am Rev Respir Dis.* 1992 ; 146 : 427-432.
 - 25) 岩井和郎 : 結核の病理。『結核』, 第2版 久世文幸, 泉孝英編集, 医学書院, 東京, 1992, 27-33.