

原 著

胸水中サイトカイン測定による
結核性胸膜炎の鑑別診断

小川和彦・古賀宏延・楊兵
 福田美穂・大野秀明・山本善裕
 柳原克紀・宮本潤子・朝野和典
 平潟洋一・田代隆良・河野茂

長崎大学医学部第二内科

受付 平成8年6月10日

受理 平成8年8月22日

DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF TUBERCULOUS PLEURISY
BY THE MEASUREMENT OF CYTOKINE CONCENTRATION
IN PLEURAL EFFUSION

Kazuhiko OGAWA*, Hironobu KOGA, Bing YANG
 Miho FUKUDA, Hideaki OHNO, Yoshihiro YAMAMOTO
 Katsunori YANAGIHARA, Junko MIYAMOTO, Kazunori TOMONO
 Youichi HIRAKATA, Takayoshi TASHIRO and Shigeru KOHNO

(Received 10 June 1996/Accepted 22 August 1996)

Pleural fluids obtained from 26 patients with tuberculous pleurisy (T-group), 11 with parapneumonic pleurisy (B-group) and 21 with malignant pleurisy (M-group) were tested for their biologic parameters and cytokine concentrations.

- 1) The average age of T-group was over 10 years lower than that of M-group with a statistically significant difference.
- 2) The average CRP value of B-group and the positivity on PPD skin test of T-group were higher than those of the other groups, respectively.
- 3) Yellowish pleural fluids were mainly observed in T- and B-group, while bloody pleural fluids were mostly seen in M-group with a statistically significant difference. The average total protein amount and adenosine deaminase value in pleural fluid significantly increased in T-group. The percentage of polymorphonuclear leukocytes showed a significant increase in B-group, while lymphocytes significantly increased in T-group with a statistically significant difference.
- 4) Although no significant difference in concentrations of IL-1 β , IL-2, IFN- γ and TNF- α in serum was noticed among the three groups, the average concentrations of IFN- γ and TNF- α in pleural fluid in T-group were significantly higher than those in the other groups.

* From the Second Department of Internal Medicine, Nagasaki University School of Medicine, 1-7-1 Sakamoto, Nagasaki 852 Japan.

5) TNF- α -mRNA of mononuclear cells in pleural fluid was strongly expressed in 3 out of 11 patients of T-group, while no expression was observed in 6 patients of M-group.

In conclusion, the measurement of concentrations of two kinds of cytokines in pleural fluid, IFN- γ and TNF- α , may be clinically useful for the differential diagnosis of tuberculous pleurisy from parapneumonic pleurisy and malignant pleurisy.

Key words : Tuberculous pleurisy, Pleural effusion, Cytokine

キーワードズ : 結核性胸膜炎, 胸水, サイトカイン

はじめに

結核性胸膜炎は現在でも地域によっては胸水貯留性疾患の約25%を占める重要な疾患である¹⁾。しかし、結核性胸膜炎の診断は容易ではなく、胸水の性状のみから他の胸水貯留性疾患と区別できるとは限らない。とくに癌性胸膜炎と鑑別するためには胸膜生検を必要とする症例も少なくない。

結核性胸膜炎の確定診断には胸水中の結核菌の証明や、胸膜生検による胸膜組織の病理学的診断が重要である。近年、結核菌の検出には polymerase chain reaction (PCR) 法が用いられるようになり、呼吸器系の臨床検体からの迅速診断も可能になった²⁾³⁾。しかし、結核性胸膜炎における胸水中の結核菌の塗抹あるいは培養陽性率は約50%と低く⁴⁾、PCRを用いても60~80%程度の陽性率である²⁾⁴⁾。また、結核菌の直接証明以外の特異的な補助的診断法として、胸水中の adenosine deaminase (ADA) やリゾチーム測定の有用性が報告されているが、その感度と特異性は報告者によりさまざまである^{5)~10)}。

一方、結核菌感染に対する宿主免疫応答の研究が進み、各種サイトカインが結核結節の形成を始めとする結核症の特徴的な病態生理に深く関与していることが次第に明らかになってきた^{11)~16)}。今回われわれは、結核性胸膜炎患者における血清および胸水中サイトカイン濃度を測定し、細菌性および癌性胸膜炎患者のそれと比較することにより、サイトカインによる結核性胸膜炎の間接的な診断が可能かどうかを検討したので報告する。

対象症例と方法

1) 対象症例

1993年4月より96年4月までに当科および関連施設を受診した胸水貯留患者のうち、最終的に結核性胸膜炎、細菌性胸膜炎および癌性胸膜炎の診断が得られた58症例を対象とした。各疾患の診断根拠については、結核性胸膜炎(T群)は胸水中または喀痰中に結核菌が証明された症例(14例)、胸膜生検にて病理学的診断が得られた症

例(6例)、臨床所見や胸水の性状、治療経過より結核性と診断された症例(9例)とした。細菌性胸膜炎(B群)は胸水中より起炎菌が証明されるか(2例)、あるいは臨床所見より本疾患が疑われ抗菌薬の投与により軽快した症例(9例)とした。癌性胸膜炎(M群)は胸水中あるいは胸膜より悪性細胞が証明された症例(21例)とした。

2) 血液・生化学・皮内反応検査

末梢静脈血を採取し、以下の検査を施行した。白血球数、白血球分画(好中球、好酸球、好塩基球、単球、リンパ球)、CRP、赤沈値。また、PPD皮内反応検査を施行した。

3) 胸水検査

胸水を採取し、以下の検査を施行した。肉眼的観察による胸水の性状(黄色、血性の別)、比重、リバルタ反応、蛋白量、LDH、ADA、CEA、細胞分画(好中球、好酸球、組織球、リンパ球)。

4) 細菌学的検査

喀痰および胸水の塗抹標本を作成し、グラム染色とチールネルセン染色にて一般細菌および抗酸菌の有無を検討した。また同時に、培養検査を施行し、陽性の場合には菌種を同定した。胸水では結核菌の遺伝子診断として、Protein antigen b (Pab) 遺伝子を標的とした結核菌PCR²⁾も併せて施行した。

5) 血清中および胸水中のサイトカイン濃度測定

サイトカイン測定用の Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) キット(トーレ・フジバイオニクス株式会社)を用い、血清中および胸水中の interleukin-1 β (IL-1 β)、IL-2、interferon gamma (IFN- γ)、tumor necrosis factor alpha (TNF- α) を測定した。方法の概略は、各サイトカインに対する抗サイトカインマウスモノクローナル抗体がコーティングされた96穴の microtiter plate を用い、6段階の標準液、陽性コントロール血清、および臨床検体を各50 μ l ずつ duplicate で分注し、同時に酵素(HRP)標識抗ヒトサイトカイン抗体を50 μ l 加え、室温で2時間、microplate mixer (Micromixer MX-4, 三光純薬)

にて700rpmで振盪培養した。その後、20%のTween 20洗浄液400 μ lで3回洗浄した後、Tetramethylbenzidineを含む基質液200 μ lを加え、さらに室温で15分間、700rpmで振盪培養した。培養後、反応停止液(1.8N硫酸)50 μ lを加え、吸光度計(Microplate Reader MR600, Dynatech Laboratories)にて450nmの吸光度を測定した。測定結果はすべてduplicateの平均値として算出し、標準液の測定結果より作成した標準曲線から各検体中のサイトカイン濃度を決定した。サイトカインの測定限界値は、それぞれIL-1 β が6.3pg/ml、IL-2が0.2IU/ml、IFN- γ が0.1IU/ml、TNF- α が1.9pg/mlであった。

6) Reverse transcriptase (RT)-PCR法によるサイトカイン発現の検討

a) 末梢血および胸水中の単核球分離

患者の末梢血10mlおよび胸水50mlをヘパリン加採取し、Ficoll-Paque法¹⁹⁾²⁰⁾にて単核球系の細胞を分離した。なお、この細胞中には95%以上の単核球系細胞が含まれ、viabilityも95%以上であることをトリパンブルー染色にて確認した。

b) RNAの抽出

得られた単核球系細胞からacid guanidinium-phenol-chloroform (AGPC)法²¹⁾にてRNAを抽出した。その概略は、細胞をguanidine含有溶液で溶解後、phenolとchloroformにてRNAを抽出し、isopropanol沈殿と洗浄後に滅菌蒸留水に再浮遊させ、一部は希釈してRNAの濃度を260nmの吸光度で測定した。

c) RT-PCRとcompetitive PCRによるTNF- α -mRNAの半定量

Barnesらの方法に従い、抽出したRNAからcDNAを合成し¹⁵⁾、competitive PCRにてTNF- α -mRNA発現の有無を半定量した。具体的にはmRNA 5 μ gからRNaseH reverse transcriptase (SuperscriptTM, GibcoBRL)によりcDNAを合成し、その最終濃度が0.1 μ g/ μ lになるように調整して、5本のmicrotubeに10 μ lずつ分注した(各々1 μ gのcDNAを含有)。それぞれにヒトTNF- α に対するcompetitor (TNF- α PCR Mimic, Clontech Laboratories, Inc.)を最終濃度が1, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ attomole (amol)/tubeとなるように加え、添付のprimer (Human TNF- α amplicon set, Clontech Laboratories, Inc.)とともにPCRを施行した。

PCRの条件はdenaturationが94 $^{\circ}$ Cで45秒間、annealingが60 $^{\circ}$ Cで45秒間、extensionが72 $^{\circ}$ Cで2分間で、これを35サイクル行い、最後に72 $^{\circ}$ Cで7分間のextensionを施行した。PCR産物の検出には3%アガ

ロースゲル内電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色にて観察した。mRNAの発現の強さは、検体およびcompetitorからのPCR産物(それぞれ444bpと617bp)のバンドの濃さを比較し、ほぼ同等であった検体中のcompetitorの濃度とほぼ等量であると仮定した。

7) 統計学的処理

計数データであるPPD皮内反応陽性率、胸水の性状、リバルタ反応陽性率については各群間で分割表を作成し、 χ^2 検定を行った。その他のADAやTNF- α 等の測定値の計量データについては分散分析を用いて3群間の比較検討を行った。

結 果

1) 症例背景

58症例の内訳は男性34名、女性24名で、年齢は23歳から90歳、平均年齢は62.6歳であった。疾患別の症例数はT群が26例(男性17例、女性9例、平均年齢56.2歳)、B群が11例(男性8例、女性3例、平均年齢63.8歳)、M群が21例(男性9例、女性12例、平均年齢69.9歳)であった。各疾患群の性別に有意差はみられなかったが、年齢ではT群の平均年齢がM群よりも有意差をもって10歳以上低かった。

2) 血液・生化学・皮内反応検査(表1)

各群における末梢白血球数、白血球分画、CRP、赤沈値の各平均値と標準偏差、およびPPD皮内反応の陽性率を表1に示した。白血球数の平均値はM群およびB群で増加し、T群では正常範囲内であったが、統計学的な有意差はみられなかった。CRPはB群の平均

表1 血液・生化学・皮内反応検査

	T群	B群	M群
白血球数(/ μ l)	6890 \pm 2912 ^a (26) ^b	9958 \pm 3805 (11)	12437 \pm 18908 (21)
分画(%)			
好中球	70.7 \pm 11.7	79.1 \pm 10.9	72.9 \pm 9.1
好酸球	2.8 \pm 3.5	1.8 \pm 1.2	2.6 \pm 3.3
好塩基球	0.7 \pm 0.8	0.5 \pm 0.6	0.7 \pm 0.6
単球	7.9 \pm 4.5	6.6 \pm 3.4	6.8 \pm 3.4
リンパ球	17.8 \pm 7.9	12.0 \pm 6.3	17.6 \pm 7.3
CRP(mg/dl)	5.4 \pm 4.6 (26)	12.9 \pm 8.9 (9)	5.5 \pm 5.8 (20)
		**	**
赤沈(mm/hr)	62 \pm 35 (24)	74 \pm 39 (9)	68 \pm 40 (18)
PPD皮内反応陽性率(%)	80.0 (20/25)	50.0 (4/8)	36.4 (4/11)
		*	**

a: 平均値 \pm 標準偏差

b: 症例数

* p < 0.05

** p < 0.01

表2 胸水検査成績

	T群	B群	M群
性状(%) 黄色	81 (21/26) ^a	100 (11/11)	29 (6/21)

血性	19 (5/26)	0	71 (15/21)

比重	1.031±0.006 ^b (22)	1.027±0.010 (11)	1.027±0.008 (19)
リバルタ反応陽性率(%)	80 (16/20)	73 (8/11)	67 (12/18)
LDH(U/dl)	1114±1784 (23)	636±518 (7)	828±721 (18)
蛋白量(g/dl)	4.8±1.0 (26)	3.6±1.5 (11)	4.0±0.7 (19)
	**		*
ADA(U/L)	67±26 (24)	33±17 (8)	15±9 (17)

CEA(ng/ml)	2.6±2.2 (19)	13.4±24.7 (8)	27776±116556 (18)

細胞分画(%)			
好中球	30.2±25.2 (24)	51.9±27.1 (10)	
		*	
好酸球	4.9±5.4	0	7.5±7.5
組織球	16.3±14.6	23.0±19.9	29.1±23.7
リンパ球	65.2±28.5	31.9±23.8	59.8±27.7
	*		

a: 症例数
b: 平均値±標準偏差
* p < 0.05
** p < 0.01
*** p < 0.001

値が12.9と高く、他の2群との間に有意差がみられた。赤沈値は3群間で差はみられなかったが、PPD皮内反応の陽性率はT群で80%と高く、他の2群と有意差がみられた。

3) 胸水検査 (表2)

胸水の性状はT群およびB群では黄色胸水が多く、M群では血性胸水が多くみられ、統計学的に有意差がみられた。胸水の比重、リバルタ反応陽性率、LDHは3群間で有意差はなかったが、蛋白量およびADAはT群の平均値がそれぞれ4.8g/dl、67U/Lと高値を示し、他群との間に有意差がみられた。CEAはM群で5ng/ml以上の高値を示した症例が66.7% (12/18)にみられたものの、3群間で有意差はなかった。細胞分画では、好中球の比率がB群で高く(約52%)、M群との間に有意差がみられた。リンパ球はT群(約65%)およびM群(約60%)で高い傾向がみられ、T群とB群間で有意差がみられた。組織球および好酸球の比率に差はみられなかった。

4) 細菌学的検査

T群の胸水で抗酸菌の塗抹陽性例はみられなかったが、培養で20% (5/25)、PCRで20% (3/15)に結核菌が検出された。また、喀痰からは塗抹で13.6% (3/22)、培養で31.8% (7/22)が結核菌陽性であった。一方、B群の胸水では*P.aeruginosa*と*α-streptococci*が各1例から分離され、M群の胸水からは有意な微生物は検出されなかった。

5) 血清中および胸水中のサイトカイン濃度 (図1, 2)

血清中のサイトカイン濃度測定では、IL-1β、IL-2、IFN-γ、TNF-αのすべてにおいて有意差はみられなかった。一方、胸水中のサイトカインでは、IL-1βおよびIL-2は3群間で差はみられなかったものの、IFN-γ

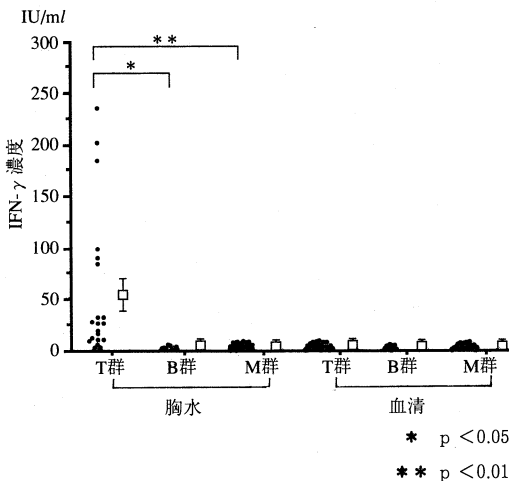


図1 各疾患群における胸水中IFN-γの濃度

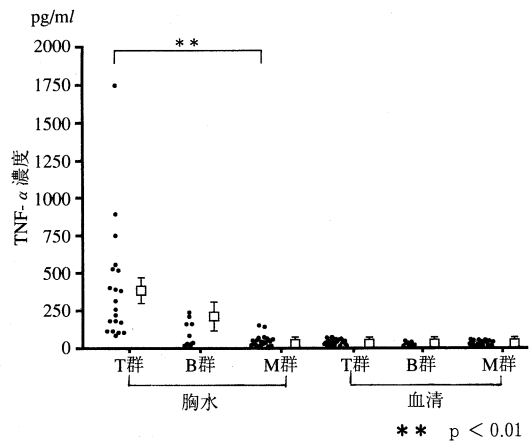


図2 各疾患群における胸水中TNF-αの濃度

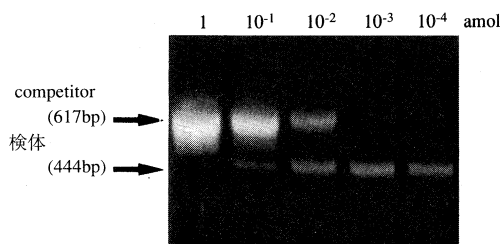


図3 competitive PCRによる
TNF- α -mRNAの半定量例

はT群で他の2群よりも有意に高く(図1), TNF- α もT群で高値を示し, M群との間に有意差がみられた(図2)。

6) TNF- α -mRNAの発現(図3)

T群の胸水11例のうち3例にTNF- α -mRNAの発現が認められた。発現の強さはRNA 1 μ gに対してそれぞれ 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} amolが各1例であった。図3には 10^{-2} amolと定量されたcompetitive PCRの例を示した。一方, M群の6例ではいずれもTNF- α -mRNAの発現は認められなかった。

考 察

胸水の原因疾患としては, 結核症, 悪性腫瘍, うっ血性心不全などの頻度が高いが, これらの疾患を鑑別することは困難な場合も少なくない。年間5万人の結核新規罹患患者数があるわが国では, やはり結核性胸膜炎を抜きにして胸水の鑑別診断を進めることはできない。結核性胸膜炎の診断には, 胸水中の結核菌の証明が第一であるが, 陰性ならばコープ針や胸腔鏡下の胸膜生検により病理学的に診断する。しかし, 患者侵襲の面から, 容易に採取できる胸水から特異的に補助的診断ができれば好都合である。

今回のわれわれの検討では, 第1に, 従来からの指摘のように結核性胸水の性状は黄色が多く, 血性胸水が多かった癌性胸水とは明らかに差がみられた。しかし, 結核性胸膜炎の経過中に胸水がしだいに血性になる例もしばしば経験されることであり注意が必要である。また, 胸水中の蛋白量, ADA, リンパ球数は結核性で有意に高値を示し, 従来との報告とよく一致した^{9)~10)}。しかし, ADAの参考値としては33~47U/L以上(血清比では1.1~1.5以上)^{9)~9)}がよく用いられるが, われわれの症例で33U/L以上のものは, T群で24例中21例(87.5%), M群で17例中1例(5.9%), およびB群で8例中4例(50%)であった。つまりT群の約12%の症例はADAが正常で, B群の50%は高値であったことから, ADA

が必ずしも結核性胸膜炎の鑑別に有用な症例ばかりではないことが示唆された。

第2に, 今回の目的である胸水中のサイトカインの検討では, 血清中のサイトカイン濃度に有意差はなかったものの, 胸水ではIFN- γ とTNF- α がT群で有意に高く, 明らかに診断的意義があるものと思われた。すでに, IFN- γ ^{9)~11)~13)~15)~17)}, TNF^{12)~15)~18)}, IL-1¹³⁾, IL-2^{12)~13)~15)}, IL-6¹⁴⁾, IL-10^{12)~15)}, IL-12¹⁶⁾に関する報告がみられ, いずれのサイトカインも結核性胸水で増加している。われわれの成績ではIL-1 β とIL-2の増加はみられなかったが, IL-1 β は膿胸で高く, 結核性胸水では低いとする報告²²⁾や, 結核性胸水中の単核球IL-2-mRNAの発現は増強しているにもかかわらず, IL-2濃度は血清中と同等であったとの報告¹⁵⁾もあり, 測定法の感度や症例の病期による影響なども今後考慮する必要があると思われる。

結果的に今回の検討で明らかにされた要点は, IFN- γ とTNF- α の最低2種類のサイトカインを測定することにより, 3つの主要な浸出性胸水をきたす疾患の鑑別が可能となったことである。つまり, IFN- γ とTNF- α がいずれも高値を示す場合は結核性胸水, TNF- α のみが高値の場合は細菌性胸水, いずれも低値の場合は癌性胸水であると推測することができた。

TNF- α は感染性の胸水, とくに膿胸で高値となることが報告されており²³⁾さらにIL-8を強力に誘導して好中球を動員することが知られている。われわれの症例のB群においても有意差はなかったが高値を示したことから, TNF- α の上昇は感染症を一般的に反映するものと考えられる。一方, IFN- γ は結核性胸水に特異的であったことから, この2つのサイトカインの濃度測定が大まかな胸水の鑑別に有用であろうと思われた。

第3に, 胸水中の単核球系細胞を採取し, TNF- α 産生細胞が感染局所に集積していることを, TNF- α -mRNAに対するRT-PCRで明らかにしようとした結果, TNF- α -mRNAの発現はT群の11例中3例(27.3%)で強く認められ, M群ではみられなかった。IFN- γ -mRNAの発現が増強していたとする報告はすでに胸膜組織¹²⁾や胸水中の単核球系細胞¹⁵⁾でみられるが, TNF- α -mRNAの発現増強を実際に胸水中の単核球で証明した報告はない。

今回の検討では陽性例が認められたものの, 頻度は30%以下と低値であった。その理由としては, TNF- α はTh1細胞や活性化マクロファージから産生されるため, これらの細胞が胸水中に少数しか存在しない場合には, これを効率良く採取し, RT-PCRでmessageの発現まで確かめることは容易ではないことが示唆された。われわれの成績は一応の評価はできるものの, 今後は

competitive PCR法よりさらに高感度の方法を検討する必要があると思われた。

結核症における宿主免疫の主体は細胞性免疫である。とくに Th1 リンパ球やマクロファージから産生された IFN- γ や TNF- α は autocrine, あるいは paracrine にマクロファージを活性化し, 結核菌に対する貪食殺菌能を高める。しかし一方では, TNF- α の発熱, 倦怠感, 体重減少, 胸水貯留作用など, 宿主にとっては不利益な作用も知られている。今回の検討の目的のように, 結核性胸膜炎に特異的なサイトカインの動態を診断のために用いるとともに, 今後はそのコントロールに関しても研究が必要であると思われる。

結 語

結核性胸膜炎 (T) 群26例, 細菌性胸膜炎 (B) 群11例, 癌性胸膜炎 (M) 群21例における胸水を検討し, 以下の結果を得た。

1) T 群の平均年齢は M 群よりも有意に10歳以上低かった。

2) CRP は B 群で高く, PPD 皮内反応の陽性率は T 群で高く, いずれも他の2群との間に有意差がみられた。

3) 胸水の性状は T 群および B 群では黄色胸水が多く, M 群では有意に血性胸水が多くみられた。蛋白量および ADA は T 群で有意に高値を示した。細胞分画では, 好中球の比率は B 群で, リンパ球は T 群で高く, それぞれ M 群と B 群との間に有意差がみられた。

4) 血清中の IL-1 β , IL-2, IFN- γ , TNF- α の濃度に有意差はなかったが, 胸水中の IFN- γ と TNF- α は T 群で高く, それぞれ他の2群, および M 群との間に有意差がみられた。

5) T 群の胸水11例のうち3例で胸水中単核球系細胞の TNF- α -mRNA の発現が強く認められた。一方, M 群の6例では全例発現はみられなかった。

文 献

- 1) Valdes L, Alvarez D, Valle JM, et al.: The etiology of pleural effusions in an area with high incidence of tuberculosis. *Chest*. 1996; 109: 158-162.
- 2) Miyazaki Y, Koga H, Kohno S, et al.: Nested polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *J Clin Microbiol*. 1993; 31: 2228-2232.
- 3) Kolk AHJ, Schuitema ARJ, Kuijper S, et al.: Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by using polymerase chain reaction and a nonradioactive detection system. *J Clin Microbiol*. 1992; 30: 2567-2575.
- 4) de Wit D, Maartens G, Steyn L: A comparative study of the polymerase chain reaction and conventional procedures for the diagnosis of tuberculous pleural effusion. *Tuber Lung Dis*. 1992; 73: 262-267.
- 5) van Keimpema ARJ, Slaats EH, Wagenaar JPM: Adenosine deaminase activity, not diagnostic for tuberculous pleurisy. *Eur J Respir Dis*. 1987; 71: 15-18.
- 6) Bueso JF, Hernando HV, Garcia-Buela JP, et al.: Diagnostic value of simultaneous determination of pleural adenosine deaminase and pleural lysozyme/serum lysozyme ratio in pleural effusions. *Chest*. 1988; 93: 303-307.
- 7) Moriwaki Y, Kohjiro N, Itoh M, et al.: Discrimination of tuberculous from carcinomatous pleural effusion by biochemical markers: Adenosine deaminase, lysozyme, fibronectin and carcinoembryonic antigen. *Jpn J Med*. 1989; 28: 478-484.
- 8) 井上祐一, 三浦直樹, 渡辺 尚, 他: 悪性および良性胸膜炎における胸膜生検の有用性の検討. *日胸疾会誌*. 1991; 29: 332-337.
- 9) Valdes L, San Jose E, Alvarez D, et al.: Diagnosis of tuberculous pleurisy using the biologic parameters adenosine deaminase, lysozyme, and interferon gamma. *Chest*. 1993; 103: 458-465.
- 10) Ungerer JPJ, Oosthuizen HM, Retief JH, et al.: Significance of adenosine deaminase activity and its isoenzymes in tuberculous effusions. *Chest*. 1994; 106: 33-37.
- 11) Ribera E, Ocana I, Martinez-Vazquez JM, et al.: High level of interferon gamma in tuberculous pleural effusion. *Chest*. 1988; 93: 308-311.
- 12) Barnes PF, Fong S, Brennan PJ, et al.: Local production of tumor necrosis factor and IFN- γ in tuberculous pleuritis. *J Immunol*. 1990; 145: 149-154.
- 13) Shimokata K, Saka H, Murate T, et al.: Cytokine content in pleural effusion. Com-

- parison between tuberculous and carcinomatous pleurisy. *Chest*. 1991; 99: 1103-1107.
- 14) Yokoyama A, Maruyama M, Ito M, et al.: Interleukin 6 activity in pleural effusion. Its diagnostic value and thrombopoietic activity. *Chest*. 1992; 102: 1055-1059.
 - 15) Barnes PF, Lu S, Abrams JS, et al.: Cytokine production at the site of disease in human tuberculosis. *Infect Immun*. 1993; 61: 3482-3489.
 - 16) Zhang M, Gately MK, Wang E, et al.: Interleukin 12 at the site of disease in tuberculosis. *J Clin Invest*. 1994; 93: 1733-1739.
 - 17) Aoki Y, Katoh O, Nakanishi Y, et al.: A comparison study of IFN- γ , ADA, and CA125 as the diagnostic parameters in tuberculous pleuritis. *Respir Med*. 1994; 88: 139-143.
 - 18) Gursel G, Gokcora N, Elbeg S, et al.: Tumor necrosis factor- α (TNF- α) in pleural fluids. *Tuber Lung Dis*. 1995; 76: 370-371.
 - 19) Perper RJ, Zee TW, Mickelson MM: Purification of lymphocytes and platelets by gradient centrifugation. *J Lab & Clin Med*. 1968; 72: 842-848.
 - 20) Fotino M, Merson EJ, Allen FH jr: Instant lymphocytes. *Vox Sang*. 1971; 21: 469-470.
 - 21) Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Bio-chem*. 1987; 162: 156-159.
 - 22) Silva-Mejias C, Gamboa-Antinolo F, Lopez-Cortes LF, et al.: Interleukin-1 beta in pleural fluids of different etiologies. Its role as inflammatory mediator in empyema. *Chest*. 1995; 108: 942-945.
 - 23) Broaddus VC, Hebert CA, Vitangcol RV, et al.: Interleukin-8 is a major neutrophil chemotactic factor in pleural liquid of patients with empyema. *Am Rev Respir Dis*. 1992; 146: 825-830.