

原 著

肺結核患者血清中の可溶性 TNF レセプター
濃度の検討

河 口 治 彦 ・ 伊 奈 康 孝 ・ 伊 藤 伸 介
佐 藤 滋 樹 ・ 杉 浦 芳 樹
富 田 博 司 ・ 荻 須 信 夫

名古屋市立大学第二内科

高 田 勝 利

名古屋市立大学病院臨床検査部

山 本 正 彦

名古屋簡易保険総合検診センター

森 下 宗 彦

愛知医科大学第二内科

吉 川 公 章

大同病院呼吸器科

受付 平成7年 7月31日

受理 平成7年 11月13日

SERUM LEVELS OF SOLUBLE TUMOR NECROSIS FACTOR (TNF)
RECEPTORS IN PATIENTS WITH PULMONARY
TUBERCULOSIS

Haruhiko KAWAGUCHI*, Yasutaka INA, Shinsuke ITO, Shigeki SATO,
Yoshiki SUGIURA, Hiroshi TOMITA, Nobuo OGISU, Katsutoshi TAKADA,
Masahiko YAMAMOTO, Munehiko MORISHITA
and Kosyo YOSHIKAWA

(Received 31 July 1995/Accepted 13 November 1995)

Tumor necrosis factor α (TNF- α) is released from cells of monocyte/macrophage

* From the Second Department of Internal Medicine, Nagoya City University, 1, Kawasumi,
Mizuho-ku, Nagoya 467 Japan.

linage and mediates the development of a variety of clinical and pathomorphological features in various infectious diseases, autoimmune diseases and cancer. In the case of tuberculosis, it is suggested that the release of TNF- α in the affected regions and into the circulation could account for the pathological and clinical features such as the development of necrotic lesions and fever and weight loss in TB patients.

In the present study, the levels of soluble TNF receptor type I (sTNFR type I) and type II (sTNFR type II) and TNF- α in the sera of patients with pulmonary TB were assayed, and we tried to know whether these levels have clinical significance in determining the disease activity in TB patients.

The serum levels of both sTNFR types I and II were significantly higher in TB patients (n=22) who were previously untreated than in the healthy control (n=14) : for sTNFR type I, 2.82 ± 1.37 ng/ml vs. 1.40 ± 0.33 ng/ml ($p < 0.0001$), and for sTNFR type II, 3.83 ± 1.76 ng/ml vs. 1.62 ± 0.45 ng/ml ($p < 0.0001$).

The serum levels of sTNFR types I and II in TB patients showed significant correlations with their serum levels of CRP. The serum levels of TNF- α in these TB patients was 2.21 ± 1.72 pg/ml, whereas TNF- α was not detectable in the sera of 9 healthy control. The serum levels of sTNFR type I and II were significantly higher in cavitory TB (n=17) than in non-cavitory TB (n=5). When TB patients were treated with antituberculosis drugs and clinical improvements were achieved, the elevated levels of sTNFR type I and TNF- α in the sera of same 5 patients measured before starting treatment showed significant decline and the serum levels of sTNFR type II showed also declined, however, the decline was statistically not significant.

From all the results obtained in this study, we conclude that the assay of the serum levels of sTNFR in TB patients is useful in the evaluation of the disease activity of TB.

Key words : Pulmonary tuberculosis, TNF- α , TNF receptor, Disease activity of tuberculosis

キーワード : 肺結核, TNF- α , TNF レセプター, 疾患活動性

はじめに

Tumor necrosis factor (TNF)- α は主として単球/マクロファージが放出するサイトカインの1つであり、その生物活性は、腫瘍細胞に対する細胞致死活性をはじめ、マクロファージや好中球の活性化、線維芽細胞増殖の増強、血管内皮表層抗原の誘導など多種多様にわたっており¹⁾、結核症においても従来から IL-1 や IL-6 とともに熱発や体重減少等の臨床症状²⁾、病巣部における壊死や PPD における皮膚反応³⁾ などに関与するという報告がある。

今回、われわれは、初回未治療結核症患者において、血清中の可溶性 TNF レセプター (以下 sTNF-R) および TNF- α の濃度を測定し、それらと臨床像との関連につき検討したので報告する。

対象および方法

平成5年1月から平成6年10月までに当大学病院もしくは当科関連施設である大同病院に入院した初回未治療肺結核症患者22例(男性18名,女性4名),平均年齢 45.9 ± 18.4 歳 (mean \pm S.D.) と、対照として健康成人14例(男性7名,女性7名),平均年齢 42.2 ± 23.3 歳を対象とした (Table 1)。これら肺結核症患者22例の喀痰検査では塗抹陽性例が18例であり塗抹陰性・培養陽性例が4例であった。また、ツベルクリン反応では陰性2例,陽性10例,強陽性10例であり、一般的な炎症所見の指標である CRP は平均 6.21 ± 5.81 mg/dl であった。なお、上記結核症患者のうち5例に関しては治療前血清と INH, RFP, SM または EB の3剤併用にて治療後3カ月以上経た時点での血清に関して比較検討した。

血清 sTNF-R および TNF- α の測定はそれぞれ市

Table Characteristics of the Subjects

	Tuberculosis	Normal Control
Number of cases	22	14
Age (y/o)	45.9±18.4*	42.2±23.3
Male : Female	18 : 4	7 : 7
Gaffky	0=4	
Gaffky	>1=18	

* mean±S.D.

販キット (sTNF-R type I は sTNF-R ELISA kit, Bender Medsystem 社製, 測定感度 >80 pg/ml, sTNF-R type II は Quantikine Human sTNF-R type II Immunoassay, R & D 社製, 測定感度 >1.2 pg/ml, TNF-α は Quantikine HS Human TNF-α Immunoassay, R & D 社製, 測定感度 >0.17 pg/ml) により ELISA 法にて行った。

すなわち, sTNF-R type I の測定では, マウス抗ヒト sTNF-R type I 単クローン抗体を 96 穴マイクロプレートに分注, コートし, 次に検体および標準 sTNF-R type I 溶液を各ウェルに注入後, ペルオキシダーゼ標識マウス抗ヒト sTNF-R type I 単クローン抗体を添加し室温にて 1 時間インキュベートした。その後基質液を加えて 20 分間室温に放置後, 反応を停止させ吸光度計にて 450 nm の吸光度を測定し, 標準 sTNF-R type I による標準曲線から検体中の sTNF-R type I の濃度を算出した。

sTNF-R type II および TNF-α では一次抗体としておのおののマウス抗ヒト sTNF-R type II 単クローン抗体, マウス抗ヒト TNF-α 単クローン抗体を用い, 二次抗体としておのおののペルオキシダーゼ標識マウス抗ヒト sTNF-R type II 多クローン抗体, ペルオキシダーゼ標識マウス抗ヒト TNF-α 多クローン抗体を使用し, 前述と同様の方法で 450 nm の吸光度を測定し標準曲線より検体中のそれぞれの濃度を求めた。なお, 被検血清は 10 倍希釈で測定した。また, 本研究の統計学的検討は Student's t 検定を用い, 測定値は平均±標準偏差 (mean±S.D.) で記載した。

結 果

1. 未治療肺結核症患者の血清中 sTNF-R, TNF-α 濃度と正常健康人のそれらとの比較検討 (Fig. 1)

血清 sTNF-R type I に関しては, 肺結核症群は 2.82 ± 1.37 ng/ml, 対照健康成人群は 1.40 ± 0.33 ng/ml であり, 血清 sTNF-R type II では肺結核症群は 3.83 ± 1.76 ng/ml, 対照健康成人群は 1.62 ± 0.45 ng/ml であり, 血清 sTNF-R type I および type II はいずれも

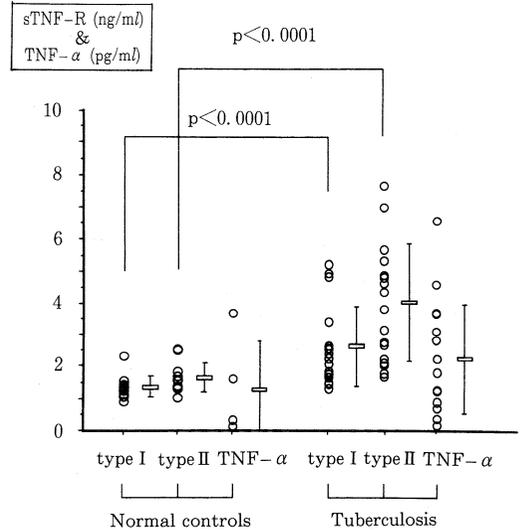


Fig. 1 Serum levels of sTNF-R type I, type II and TNF-α in patients with tuberculosis and healthy subjects. The levels of both sTNF-R type I and type II were significantly higher in the patients with tuberculosis than in healthy subjects. TNF-α was not detectable in 9 among 14 healthy subjects.

肺結核症群において対照健康成人群に比べ有意 (p < 0.0001) に高値を示した。

また, 血清 TNF-α に関しては, 肺結核症群では全例測定感度以上で平均 2.21 ± 1.72 pg/ml であったが, 健康成人では 14 例中 5 例のみが測定可能であり残り 9 例は今回使用したキットでは測定感度以下であった。

2. 肺結核症患者の血清中 sTNF-R, TNF-α 濃度と血清 CRP 値との相関関係 (Fig. 2-a, -b)

次に肺結核症患者の血清中 sTNF-R 濃度と, 炎症所見の一般的な指標としての血清 CRP 値との関係に関して検討を加えた。血清 CRP 値と血清 sTNF-R type I との相関は r = 0.73 であり, また, 血清 CRP 値と血清 sTNF-R type II との相関は r = 0.57 であり両 TNF レセプターとも CRP と有意 (p < 0.001, p < 0.005) な正の相関関係を認めた。また, 図には示さなかったが血清 CRP と血清 TNF-α 濃度との相関でも r = 0.67 の有意な相関関係 (p < 0.001) を認めた。なお, 他の臨床検査所見 (ツベルクリン反応, 末梢血白血球数およびリンパ球数) との相関に関する検討では有意な統計学的所見は認めなかった。

3. 胸部レ線所見上の空洞病変の有無と血清中 sTNF-R, TNF-α 濃度 (Fig. 3)

肺結核症群 22 例中胸部単純レ線上空洞有りは 17 例,

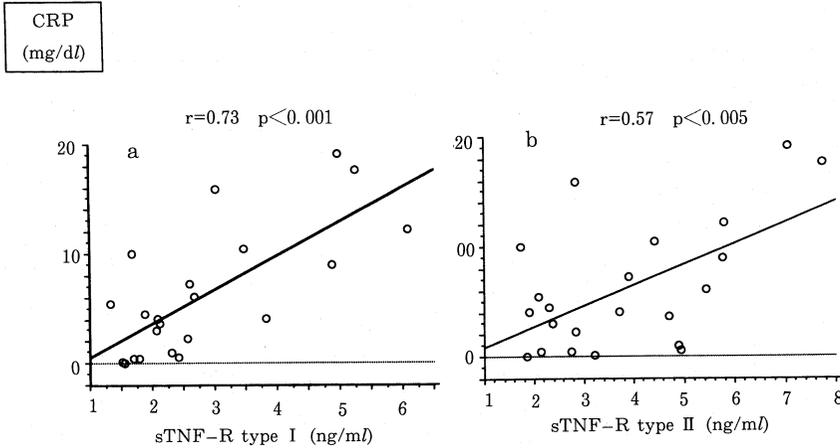


Fig. 2 Correlation between serum level of sTNF-R (panel a, type I ; panel b, type II) and serum level of CRP in patients with tuberculosis. The levels of sTNF-R type I and type II significantly correlated with the level of CRP.

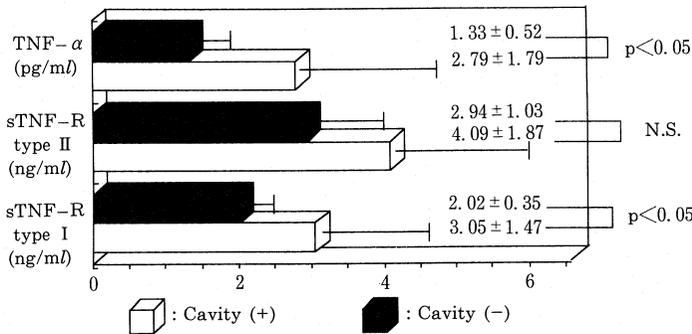


Fig. 3 Relation between serum levels of sTNF-R and TNF- α and chest X-ray findings. Serum levels of sTNF-R type I and TNF- α were significantly higher in patients showing tuberculous cavity on chest roentgenographs than in those who showed no cavity.

空洞なしは5例であった。この両群について血清中のsTNF-R type I, type II, TNF- α 濃度の各々に関して検討を加えた。空洞あり群ではそれぞれ3.05 \pm 1.47 ng/ml, 4.09 \pm 1.87 ng/ml, 2.79 \pm 1.79 pg/mlであり、空洞なし群では2.02 \pm 0.35 ng/ml, 2.94 \pm 1.03 ng/ml, 1.33 \pm 0.52 pg/mlであり、空洞有り群で、血清中sTNF-R type I, TNF- α は有意 ($p < 0.05$) に高値を示し、また血清中sTNF-R type IIも高値の傾向を示した。なお、胸部単純線線の病変の拡がりについての検討では、有意な統計学的所見は認められなかった。

4. 結核症患者の治療前と治療後の血清中sTNF-R, TNF- α 濃度 (Fig. 4)

上記肺結核症群のうち5例に関して治療前 (Before) と、INH, RFP, SMあるいはEBの3剤併用にて治療し、少なくとも3カ月以上経過し臨床所見の改善を認めた時点 (After) において、血清sTNF-R type I, type II, TNF- α 濃度を測定し、比較検討を行った。治療前の濃度は各々3.42 \pm 1.67 ng/ml, 3.32 \pm 1.53 ng/ml, 3.32 \pm 1.46 pg/mlであったが、治療開始後3カ月以上たった時点での血清濃度は2.27 \pm 0.84 ng/ml, 2.44 \pm 0.86 ng/ml, 1.62 \pm 0.84 pg/mlであり、治療により血清中sTNF-R type I, TNF- α は、有意 ($p < 0.05$) に低下し、血清中sTNF-R type IIも低下する傾向を認めた。

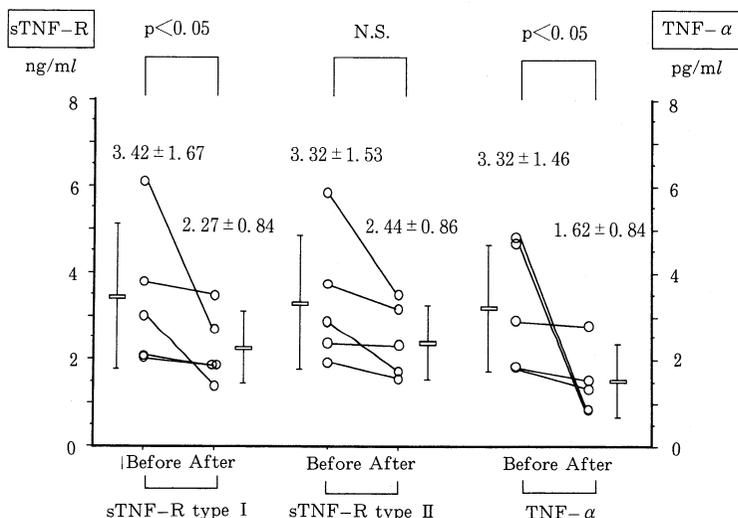


Fig. 4 Serum levels of sTNF-R and TNF- α in patients with tuberculosis before and after antituberculosis chemotherapy. Serum levels of sTNF-R type I and TNF- α of the patients were decreased significantly after receiving antituberculosis chemotherapy, and this was accompanied by clinical improvement of the patients. Before, before antituberculosis chemotherapy; after, at least 3 months after starting antituberculosis chemotherapy.

考 案

結核症において、TNF- α 、IFN- γ 、IL-2、IL-10 など多数の cytokine は autocrine または paracrine にマクロファージやリンパ球に作用し複雑な cytokine network を構成し、その病態形成に関与していると考えられている。その中で、TNF- α は結核菌自体、特にその細胞壁成分である lipoarabinomannan の刺激によってマクロファージより放出され⁴⁾⁵⁾ その生物活性は多岐にわたっている。

たとえば、マクロファージは細胞表面の CR 1 (補体レセプター 1、マウスにおいては肺胞マクロファージでは CR 4)、CR 3 を介して結核菌を細胞内に貪食し⁶⁾ その後、マウスでは NO-synthase の活性化、RNI (reactive nitrogen intermediates) の産生を通じて菌の細胞内発育を阻害する⁷⁾⁸⁾、これらマクロファージの活性化に関して TNF- α は IFN- γ と協同的に作用してより効果的に抗結核菌作用を発揮させる⁹⁾。また、実験的肉芽腫形成より解るように TNF- α は単球/マクロファージに作用して肉芽腫を誘導¹⁰⁾¹¹⁾ し物理的に病変部を隔絶する作用もある。

このように TNF- α は抗酸菌に対する生体の免疫防御機構において重要な役割を果たしていると思われるが、

その生物活性は細胞表面に存在する 2 種類の異なるレセプター (分子量 55 kDa の type I レセプターおよび分子量 75 kDa の type II レセプター) に結合することによって発現される。そしてこれら 2 種類の膜型レセプターが cleave された可溶性レセプター (sTNF-R) がヒトの血清中および尿中に同定¹²⁾¹³⁾ されて以来、さまざまな病態においてその意義が検討されている。

Barrera ら¹⁴⁾ は慢性関節リウマチ患者血清において、Aderka ら¹⁵⁾ は SLE 患者血清においてそれぞれ sTNF-R を測定し、疾患活動性のパラメーターとしての有用性を指摘している。また、敗血症¹⁶⁾、髄膜炎菌血症¹⁷⁾ などの疾患においては sTNF-R が TNF の内在性阻害因子として作用するがゆえにその血清値が疾患の予後に影響を与える可能性も示唆されている。

今回のわれわれの検討で、血清 sTNF-R type I および type II は肺結核症において対照健康人より高値を示し、一般的な炎症所見の指標とされる CRP と正の相関関係を示した。そして、未治療診断時と抗結核療法開始後 3 カ月以上たった時点での比較検討でも、CRP を含めた臨床所見の改善とともに血清 sTNF-R type I は有意に低下し、type II でも低下する傾向が認められた。したがって、結核症においても血清 sTNF-R は疾患活動性の指標となりうると思われた。

さらに胸部レ線上空洞を認めた群では認めない群に比べ血清 sTNF-R type I が TNF- α とともに有意に高値を示したことから、細胞致死活性を有する TNF- α が肺組織崩壊による空洞形成に関与している可能性が考えられた。

また、本文には示さなかったが、いずれの sTNF-R も血清 TNF- α と正の相関関係 (type I とは $r=0.73$, $p<0.001$, type II とは $r=0.57$, $p<0.005$) を認めており、TNF- α 自体が膜型 TNF レセプターの cleavage を誘導している可能性が考えられ、TNF- α の生物活性を down regulate し、結核症の病態形成に関与している可能性が示唆された。

抑制性のサイトカインとしては IL-10 が有名であり、結核症においても IFN- γ の antagonist として作用し、前述した IFN- γ -TNF- α によるマクロファージの抗結核作用を阻害する¹⁸⁾ と言われている。この IL-10 がまた sTNF-R の分泌を刺激する¹⁹⁾ との報告もあり、今後さらに検討が必要であると思われる。

また、血清中に sTNF-R のような TNF に対する拮抗物質が存在するという事は、病巣で産生されて体内循環中に放出された TNF を失活させ、その生物活性を局所に限定させる可能性も考えられ、病原体を隔離するという意味で肉芽腫が形成されるということとともに、結核症における菌と宿主の関係を考える上で興味深いと思われた。

文 献

- 1) 米原 伸 : TNF レセプター. Med. Immunol. 1989 ; 18 : 229-235.
- 2) 塚口勝彦 : 活動性肺結核患者の末梢血単球の IL-1 β , TNF- α , および IL-6 産生能と栄養障害との相互関連性の検討. 奈良医誌. 1992 ; 43 : 475-488.
- 3) Rook GAW, Attiyah RAL : Cytokines and the Koch phenomenon. Tubercule. 1991 ; 72 : 13-20.
- 4) Moreno CJ, Taverne J, Mehlert A, et al. : Lipoarabinomannan from *Mycobacterium tuberculosis* induces the production of TNF from human and murine macrophage. Clin Exp Immunol. 1989 ; 76 : 240-245.
- 5) Ogawa T, Uchida H, Kusumoto Y, et al. : Increase in TNF- α and IL-6-secreting cells in peripheral blood mononuclear cells from patients with *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun. 1991 ; 59 : 3021-3025.
- 6) Christina SH, Jerrold JE, David GR, et al. : Complement receptor-mediated uptake and

- TNF- α -mediated growth inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* by human alveolar macrophages. J Immunol. 1994 ; 152 : 743-751.
- 7) Chan J, Xing Y, Magliozzo RS, et al. : Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. J Exp Med. 1992 ; 175 : 1111-1122.
- 8) Denis M : Interferon- γ treated murine macrophages inhibit growth of tubercle bacilli via reactive nitrogen intermediates. Cell Immunol. 1991 ; 132 : 150-157.
- 9) Flesch IEA, Kaufmann SHE : Activation of tuberculostatic macrophage function by interferon- γ , interleukin-4 and tumor necrosis factor. Infect Immun. 1990 ; 58 : 2675-2677.
- 10) Kasahara K, Kobayashi K, Shikama Y, et al. : The role of monokines in granuloma formation in mice : the ability of IL-1 and TNF- α to induce lung granulomas. Clin Immunol. 1989 ; 51 : 419-425.
- 11) 伊奈康孝, Fukuyama Y, Epstein William WL : 肉芽腫とサイトカイン. 最新医学. 1992 ; 48 : 147-151.
- 12) Engelmann H, Novick D, Wallach D. : TNF-binding proteins purified from human urine. Evidence for immunological cross-reactivity with cell surface TNF receptors. J Biol Chem. 1990 ; 265 : 1531-1538.
- 13) Engelmann H, Holtmann H, Brakebusch C. : Antibodies to a soluble form of TNF receptor have TNF-like activity. J Biol Chem. 1990 ; 265 : 14451-14497.
- 14) Barrera P, Boerbooms AM, Janssen EM, et al. : Circulating soluble TNF receptors, IL-2 receptors, TNF- α and IL-6 levels in rheumatoid arthritis. Arth Rheum. 1993 ; 36 : 1070-1075.
- 15) Aderka D, Wysenbeek A, Engelmann H, et al. : Correlation between serum levels of soluble TNF receptor and disease activity in systemic lupus erythematosus. Arth Rheum. 1993 ; 36 : 1111-1116.
- 16) Charles AD : The proinflammatory cytokines IL-1 and TNF and treatment of the septic shock syndrome. J Infec Dis. 1991 ;

- 163 : 1177-1180.
- 17) Girardin E, Suter P, Gallati H, et al. : Imbalance between TNF- α and soluble TNF receptor concentrations in severe meningococemia. *Immunology*. 1992 ; 76 : 20-25.
- 18) Flesh IEA, Kaufmann SHE : Role of cytokines in tuberculosis. *Immunobiology*. 1993 ; 189 : 316-339.
- 19) Leeuwenberg JFM, Jeunhomme TMAA, Burman WA : Slow release of soluble TNF receptors by monocytes *in vitro*. *J Immunol*. 1994 ; 152 : 4036-4040.