

原 著

肺結核患者 CD4⁺ αβ T 細胞と単球による
IFN-γ, IL-12, IL-10 産生と糖尿病との関連の検討

塚口 勝彦・岡村 英生・生野 雅史
小林 厚・福岡 篤彦・竹中 英昭
山本 智生・徳山 猛・岡本 行功
夫 彰 啓・吉川 雅 則
米田 尚 弘・成田 亘 啓

奈良県立医科大学第二内科

THE RELATION BETWEEN DIABETES MELLITUS AND
IFN-γ, IL-12 AND IL-10 PRODUCTIONS BY CD4⁺ αβ T CELLS AND
MONOCYTES IN PATIENTS WITH PULMONARY TUBERCULOSIS

Katsuhiko TSUKAGUCHI*, Hideo OKAMURA, Masashi IKUNO,
Atsushi KOBAYASHI, Atsuhiko FUKUOKA, Hideaki TAKENAKA,
Chinaru YAMAMOTO, Takeshi TOKUYAMA, Yukinori OKAMOTO,
Akihiro FU, Masanori YOSHIKAWA, Takahiro YONEDA and
Nobuhiro NARITA

Diabetics are prone to bacterial infection in part, due to polymorphonuclear neutrophil dysfunction, but the precise mechanism is not yet fully explained. Of many complications, diabetes mellitus (DM) is one of the most common diseases, which causes pulmonary tuberculosis.

To elucidate the mechanism of susceptibility to tuberculosis infection in patients with diabetes mellitus, we measured IFN-γ, IL-12 and IL-10 productions by CD4⁺ αβ T cells and autologous monocytes stimulated with live BCG in patients with pulmonary tuberculosis complicated with DM (TB + DM) or without DM (TB) and healthy controls. The levels of IFN-γ and IL-12 production in TB patients were significantly lower than those in the control. These cytokine productions were also lower in TB + DM patients than in TB patients significantly. The level of IL-10 production in TB patients were highest among these three groups. The production of this cytokine in TB + DM patients was lowest. The level of IFN-γ production was significantly lower in TB + DM patients under poor DM control than in those patients under good DM control and showed a significant negative correlation to HbA_{1c}, an indicator of diabetic control. The period for negative conversion of culture finding in TB + DM patients under poor control was prolonged when compared with those in TB patients.

別刷り請求先:

塚口 勝彦
奈良県立医科大学第二内科
〒634 奈良県橿原市四条町840

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

(Received 10 Jul. 1997/Accepted 5 Sep. 1997)

These results demonstrated the difference in cytokines secretion profile between TB patients and TB + DM patients, and suggest that the immunological mechanism underlying pathogenesis of tuberculosis might work differently between these two patients groups.

Key words : Pulmonary tuberculosis, IFN- γ , IL-12, IL-10, Diabetes mellitus

キーワード : 肺結核, IFN- γ , IL-12, IL-10, 糖尿病

はじめに

糖尿病に易感染性を伴うことは従来からよく知られており、その機序に関しては、これまでブドウ球菌や大腸菌などの一般細菌に対する好中球貪食能、殺菌能などの抗菌能力低下という面から検討が加えられてきた¹⁾²⁾。

肺結核患者に糖尿病の存在する頻度も高率で³⁾、T細胞、マクロファージが構成する細胞性免疫が主体の結核免疫においても糖尿病が結核発症、進展に何らかの影響をおよぼしている可能性が推測される。糖尿病合併結核患者の細胞性免疫能を検討した報告は少ないが、以前にわれわれは、糖尿病合併肺結核患者の末梢血単球の TNF α 、IL-1 β 、IL-6 産生能が低下しており、これらのサイトカイン産生低下と患者病態との関連の可能性を指摘した⁴⁾。

今回、結核免疫で働く主要な T 細胞サブセットである CD4⁺ α β T 細胞 (CD4⁺ T 細胞) に注目し、糖尿病合併肺結核患者の IFN- γ 、IL-12、IL-10 産生と病態との関連を検討した。

対象および方法

A. 対象

対象は喀痰で排菌が確認された活動性肺結核患者で、糖尿病合併例10例 (平均年齢54.2 \pm 13.3歳, 以下 TB+DM群), 年齢を合致させ、%標準体重、血清アルブミン値で栄養状態も合致させた糖尿病非合併肺結核患者10例 (平均年齢57.5 \pm 11.8歳, 以下 TB群), コントロールとして年齢を合致させたツ反陽性健康者10例 (平均年齢51.9 \pm 17.8歳) である。

TB群と TB+DM群間では排菌量、日本結核病学会分類によるレントゲン上での病巣の拡がりについて有意差は認めなかった。TB+DM群ではグリコヘモグロビン (HbA_{1c}) 高値の糖尿病重症例で排菌量が多い傾向にあったが (Table), レントゲン上での病巣の拡がり と糖尿病の程度間には一定の傾向を認めなかった。

B. 方法

1) CD4⁺ T 細胞の増殖, 純化

結核治療前の患者、健康ドナーからヘパリン加採血、Ficoll-Hypaque 比重遠心法 (400g, 30分間) で PBMC

Table Characteristics of TB+DM group

Case	Gaffky	FBS(mg/dl)	HbA _{1c} (%)
1	VII	124	6.7
2	II	138	7.5
3	III	134	7.7
4	V	140	8.2
5	II	130	8.4
6	V	123	9.0
7	IV	151	9.8
8	III	210	10.6
9	VIII	222	11.3
10	VI	270	12.4

分離, 洗浄, 細胞数を調整後, 5 \times 10⁶ CFU/ml の BCG 生菌 (TOKYO 172株, 日本 BCG 製造株) とともに 1 週間培養した。増殖した CD4⁺ T 細胞サブセットの純化はモノクローナル抗体をコートしたマグネチックビーズ (Dynal 社) を用い、ネガティブセレクション法によった。最初に増殖細胞を $\gamma\delta$ TCR に対するマウス抗体, TCR- δ 1 (T Cell Science 社) で処理し、続いてヤギ抗マウス IgG, 抗 CD 8, 抗 CD 19, 抗 CD 14 コートビーズを添加し、それぞれ $\gamma\delta$ T 細胞, CD 8⁺ T 細胞, B 細胞, 単球画分を分離除去した。除去後の CD4⁺ T 細胞サブセットの純化度は FACScan (Becton Dickinson 社) で常にモニターし、平均純化度は 94.8 \pm 3.3% (CD 3⁺ 細胞中) であった。検討した全例で除去細胞群の混入率は 0.57 \pm 0.21%, NK 細胞のそれは 1.78 \pm 1.05% であり、その影響は無視しうるものと判断した。

2) 単球の分離

患者および健康ドナーから 1) と同様に PBMC を採取し、あらかじめ pooled human serum でコートしたプラスチックペトリディッシュに添加、付着細胞をセルスクラッパーで回収した。回収細胞の 90% 以上がペルオキシダーゼ陽性で、T 細胞の混入は 5% 以下であった。

3) IFN- γ , IL-12, IL-10 値の測定

純化した CD4⁺ T 細胞 (5 \times 10⁵) を自己単球 (5 \times 10⁵) と BCG 生菌 (5 \times 10⁶ CFU/ml) とともに 24 時間培養、上清をサイトカイン測定まで -80 $^{\circ}$ C で保存した。測定は

市販の ELISA kit, IFN- γ (MEDGENIX 社), IL-12, IL-10 (R&D 社) を用いた。

4) FBS (空腹時血糖), 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) 法によった。

5) 統計処理

有意差の検定は Student's t-test で行い, $p < 0.05$ を有意とした。

結 果

1) 各群のサイトカイン産生

(1) IFN- γ

健常群 3261 ± 801 pg/ml と比較し, TB 群 1694 ± 301 pg/ml と有意の低値を示した。TB+DM 群は 1060 ± 489 pg/ml で TB 群と比較しても有意の低値を示した (Fig. 1)。

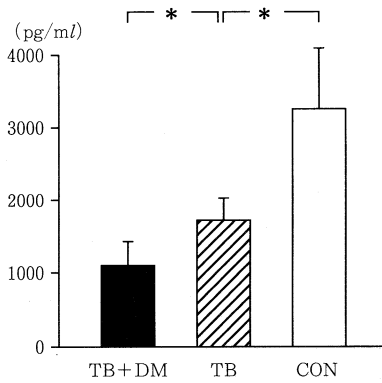


Fig. 1 IFN- γ production in pulmonary tuberculosis patients with or without diabetes mellitus (DM) and healthy controls.

Each value represents mean \pm SD. $n=10$, * $p < 0.01$

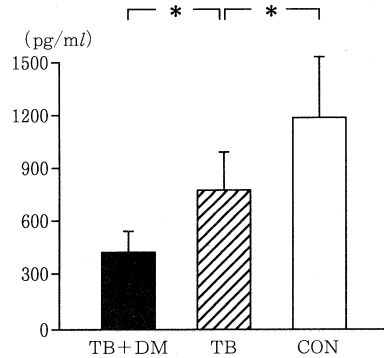


Fig. 2 IL-12 production in pulmonary tuberculosis patients with or without diabetes mellitus (DM) and healthy controls.

Each value represents mean \pm SD. $n=10$, * $p < 0.01$

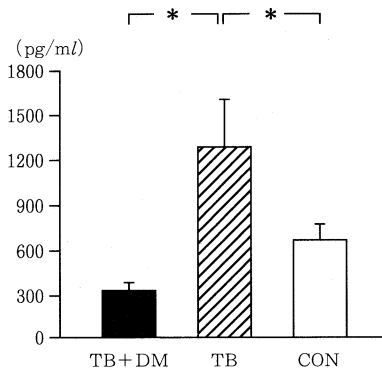


Fig. 3 IL-10 production in pulmonary tuberculosis patients with or without diabetes mellitus (DM) and healthy controls.

Each value represents mean \pm SD. $n=10$, * $p < 0.01$

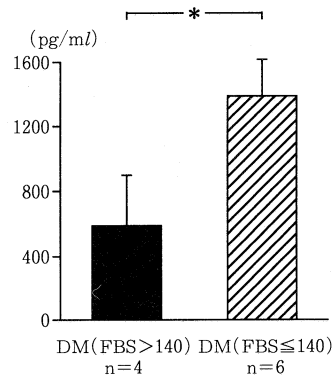


Fig. 4 Comparison of IFN- γ production between tuberculosis patients with severe DM (FBS > 140) and slight DM (FBS \leq 140)

Each value represents mean \pm SD. * $p < 0.01$

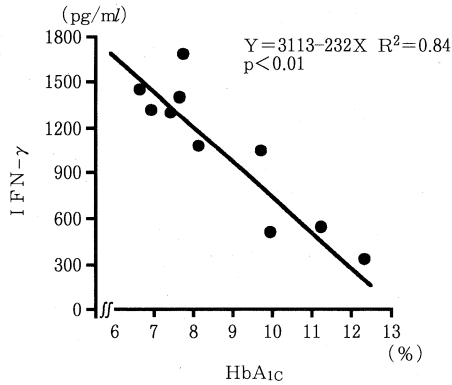


Fig. 5 Correlation between IFN- γ production and HbA_{1c} in tuberculosis patients with DM

(2) IL-12

健常群 1183 ± 326 pg/ml, TB群 764 ± 221 pg/ml, TB + DM群 433 ± 222 pg/mlで, IFN- γ と同様にTB群は健常群と比較し, TB+DM群はTB群と比較し, ともに有意の低値であった (Fig. 2)。

(3) IL-10

IFN- γ , IL-12の傾向とは異なり, TB群 1278 ± 333 pg/ml, 健常群 663 ± 101 pg/ml, TB+DM群 259 ± 71 pg/mlでTB群が最も高値で健常群と有意差が存在したが, TB+DM群はIFN- γ , IL-12と同様に最も低値であった (Fig. 3)。

2) IFN- γ 産生と糖尿病との関連

(1) 糖尿病のコントロール状態 (FBS>140; 不良 (severe DM), FBS \leq 140; 良好 (slight DM)⁵⁾) とIFN- γ 産生との関連

コントロール不良群のIFN- γ 産生は 570 ± 319 pg/mlで, 良好群 1388 ± 222 pg/mlと比較し有意に低値であった (Fig. 4)。

(2) IFN- γ 産生とHbA_{1c}との関連

糖尿病合併肺結核患者ではIFN- γ 産生とHbA_{1c}間に有意の負の相関を認めた (Fig. 5)。

3) 各患者群における排菌陰性化までの期間

コントロール不良の糖尿病合併群は合併のない患者群と比較し, 排菌陰性化までの期間が有意に延長していた。コントロール良好糖尿病合併群と糖尿病合併のない患者群とは陰性化期間に有意差を認めなかった (Fig. 6)。

考 察

糖尿病患者の易感染性は従来から認められてきた事実

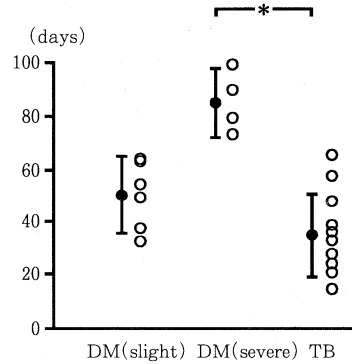


Fig. 6 The requisite periods for negative conversion for culture finding classified by patient groups

Mean \pm SD. * $p < 0.05$ DM (slight); tuberculosis patients with slight DM (FBS \leq 140), DM (severe); tuberculosis patients with severe DM (FBS>140), TB; tuberculosis patients without DM

であるが, その原因に関しては多くの推測があるものの明らかでない。微小循環障害, 脱水, 栄養障害が好中球の遊走能, 貪食殺菌能を障害し, 感染を惹起する⁶⁾⁷⁾。また, 高血糖は好中球内のある種の酵素活性上昇を誘導し, スーパーオキシド活性低下を引き起こす⁸⁾⁹⁾。この実験結果は糖尿病患者の高血糖自体が好中球の殺菌能低下から易感染性をもたらす可能性を示している。好中球以外の免疫担当細胞機能では糖尿病ラットで単球, 肺胞マクロファージによるスーパーオキシド産生低下を認める¹⁰⁾, リンパ球に関しては, 糖尿病患者でリンパ球数, 分画に異常があり¹¹⁾, ブドウ球菌抗原に対する反応性が低下している¹²⁾などの報告がある。以上の動物実験, 糖尿病患者での検討はすべてブドウ球菌や大腸菌などの一般細菌に対する反応性を検討したもので, 結核菌などの細胞内寄生細菌に対する抗菌作用について糖尿病の影響を検討した報告は少ない。

従来から結核抗菌免疫ではCD4⁺T細胞により活性化されたマクロファージの殺菌作用が重要視されてきたが, これらの活性化作用には多種のサイトカインが関与している。IFN- γ はマクロファージ活性化作用を持つ代表的なサイトカインであり, 従来から動物実験で抗菌作用が示されてきたが, 最近IFN- γ receptor変異を持つ個体が抗酸菌感染症を来しやすいことが報告され¹³⁾, ヒトでもこのサイトカインの結核抗菌免疫での重要性が示されている。また, IL-12もNK細胞, CD4⁺T細胞の活性化によりIFN- γ 産生を刺激し¹⁴⁾¹⁵⁾,

間接的にマクロファージによる抗菌作用に関与していると推測される。これに対して、IL-10はこれらのサイトカインと拮抗的に働き、マクロファージによる抗菌作用を抑制する可能性がある¹⁶⁾。

今回、糖尿病の存在しない肺結核患者でIFN- γ とIL-12産生低下、IL-10産生亢進を認めた結果は、これらの患者での結核発症、進展が、ただ単に抗菌促進作用を持つと考えられるサイトカイン、IFN- γ 、IL-12産生の低下によるだけでなく、抑制性機能を持つサイトカイン、IL-10産生亢進によって、もたらされている可能性を示唆している。これに対して、糖尿病合併肺結核患者ではこれらのすべてのサイトカイン産生が低下し、しかもその程度は糖尿病非合併患者と比較さらに有意に低下していた。特にコントロール不良の重症糖尿病合併例はIFN- γ 産生が著明に低下しており、HbA_{1c}がIFN- γ と逆相関を示した。HbA_{1c}は単球のスーパーオキシド活性と逆相関するという報告があり¹⁷⁾、持続的高血糖が、特に重症糖尿病合併例ではIFN- γ 産生低下をとおして、マクロファージの殺菌能低下から結核易感染発病につながっている可能性が推測される。

排菌陰性化期間が治療開始前、入院時の糖尿病コントロール状態に関連していたという結果は、今回の検討ではコントロール不良群は入院後も短期間ではコントロールが改善しなかった症例が多く、このことを考慮すると、結核治療期間中のコントロール状態が排菌陰性化期間に影響を与えていた可能性が考えられ、入院時の血糖コントロール状態によって排菌陰性化期間を予想しうる場合もあると思われる。

IFN- γ 産生はT細胞、IL-12産生は主にマクロファージ、IL-10は両者によって産生されるが、今回の実験系ではどちらの細胞の機能低下が主であるかは明らかでない。糖尿病合併例で測定したすべてのサイトカイン産生が低下していたという結果はT細胞、マクロファージ、あるいは両者の機能低下がこれらの患者で生じている可能性を示唆している。糖尿病非合併例ではCD4⁺T細胞あるいはマクロファージの病的機能亢進がIL-10産生増加、IFN- γ 産生低下を惹起している可能性など、結核発症、進展に抑制性因子の関与が大きいと推測されるが、糖尿病合併例では全般的な免疫機能低下状態がその背景にあり、結核病態との関連という点で、糖尿病合併の有無で異なる免疫学的機序を考慮する必要があると思われる。今回、マクロファージに非特異的の反応を起こす可能性のある生菌を刺激に用いたが、今後、PPDや菌体蛋白、リポ多糖などによる抗原特異的の反応、また、他のT細胞サブセットの関与、T細胞による結核菌貪食マクロファージに対する傷害能、NK細胞機能等を比較検討する必要があると考えられる。

結 語

糖尿病合併肺結核患者10例、非合併肺結核患者10例、および、コントロールとして健常者10例についてBCG刺激CD4⁺T細胞と単球による、IFN- γ 、IL-12、IL-10産生を測定、比較検討した。

1) IFN- γ 、IL-12産生はTB群がコントロール群と比較し、さらにTB+DM群がTB群と比較し有意に低下していた。

2) IL-10産生はTB群が最も高値で、TB+DM群が最も低値であった。

3) コントロール不良糖尿病合併群のIFN- γ 産生は良好群と比較し有意に低下していた。またHbA_{1c}とIFN- γ 産生は逆相関した。

4) コントロール不良糖尿病合併群の排菌陰性化期間は有意に延長していた。

以上から糖尿病合併例と非合併例では結核病態に関連する免疫学的機序が異なる可能性が考えられた。

文 献

- 1) 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.
- 2) 横尾彰文, 熊木悦明, 広瀬崇興: 好中球機能障害を起こした糖尿病マウスにおける尿路感染局所免疫応答 大腸菌性尿路感染症における検討. *感染症学雑誌*. 1994; 68: 861-871.
- 3) 三浦順之助, 内湯安子, 大森安恵: 糖尿病と結核. *臨床と研究*. 1996; 73: 1773-1776.
- 4) 塚口勝彦, 米田尚弘, 吉川雅則, 他: 糖尿病合併肺結核患者における末梢血単球のInterleukin-1 β , Tumor necrosis factor α およびInterleukin-6産生能の検討. *結核*. 1992; 67: 755-760.
- 5) 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.
- 6) Cooppan R: Infection and diabetes in Joslin's diabetes mellitus. *Lea & Febiger Philadelphia*. 1985; 737-747.
- 7) 佐藤則之, 清水弘行, 森 昌朋: 糖尿病における易感染性の原因 好中球殺菌能を中心として. *糖尿病*. 1994; 37: 321-325.
- 8) Tebbs SE, Lumbwe CM, Tesfaye S, et al.: The influence of aldose reductase on the oxidative burst in diabetic neutrophils. *Diabetes Res Clin Pract*. 1992; 15: 121-129.

- 9) Wierusz WB, Wykretowicz A, Byks H, et al. : Polymorphonuclear neutrophils adherence, superoxide anion (O_2^-) production and HbA_{1c} level in diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract.* 1993 ; 21 : 109-114.
- 10) Mohsenin V, Latifpour J : Respiratory burst in alveolar macrophage of diabetic rats. *J Appl Physiol.* 1990 ; 68 : 2384-2390.
- 11) Resegotti L : Immunological changes in diabetes mellitus, A study of lymphocytes populations. *Arch Sci Med.* 1979 ; 136 : 256-262.
- 12) Casey JI, Heeter BJ, Klishevich KA : Impaired response of lymphocytes of diabetic subjects to antigen of staphylococcus aureus. *J Infect Dis.* 1977 ; 136 : 495-501.
- 13) Newport MJ, Huxley CM, Huston S, et al. : A mutation in the interferon- γ -receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N Engl J Med.* 1996 ; 335 : 1941-1949.
- 14) Gazzinelli RT, Hieny S, Wynn TA, et al. : Interleukin 12 is required for the T lymphocyte independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induce resistance in T-cell deficient hosts. *Proc Natl Acad Sci.* 1993 ; 90 : 6115-6119.
- 15) Kubin M, Kamoun M, Trinchieri G : Interleukin 12 synergizes with B7/CD28 interaction in inducing efficient proliferation and cytokine production of human T cells. *J Exp Med.* 1994 ; 180 : 211-222.
- 16) Murray PJ, Wang L, Onufryk C, et al. : T cell derived IL-10 antagonizes macrophage function in mycobacterial infection. *J Immunol.* 1997 ; 158 : 315-321.
- 17) 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.