

第76回総会会長講演

難治性結核に対するBRM療法の試み

斎藤 厚

琉球大学医学部第一内科

The 76th Annual Meeting President Lecture

A PUTATIVE IMMUNOTHERAPY WITH BIOLOGICAL RESPONSE MODIFIERS
(BRM) AGAINST INTRACTABLE PULMONARY TUBERCULOSIS

*Atsushi SAITO

*First Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of the Ryukyus

The problem of tuberculosis is emerging again with increase in the population of aged people and immunocompromised patients in Japan. It has been well documented that cell-mediated immunity play a central role in host resistance to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. Many recent studies have provided evidences suggesting that the Th1-Th2 cytokine balance may determine the outcome of some diseases: predominant production of Th1 cytokines may prevent the occurrence of infectious diseases caused by intracellularly growing pathogens and Th2 cytokines may be involved in the exacerbation of allergic diseases. On the other hand, IL-12 plays an essential role in the differentiation of Th1 cells from naive T cells, and IL-18 potentiates this effect although it does not show such effect by itself. In previous investigations using gene-disrupted mice, the essential roles for IFN- γ , IL-12 and IL-18 have been demonstrated.

There are several host factors which determines the outcome of mycobacterial infection. Among them, steroid treatment and AIDS are important factors. In this lecture, I addressed the effect of these pathological conditions on Th1-Th2 cytokine balance and outcome of mycobacterial infection using murine models. In both conditions, the exacerbated infection was well correlated with the reduced production of IFN- γ . Furthermore, I also talked about the relationship between other host factors and balance in the production of Th1 and Th2 cytokines.

Using a murine model of fatal infection with *M. tuberculosis*, we demonstrated the therapeutic effect of Th1-type cytokines against this infection and suggested that immunotherapy with these cytokines may be clinically effective in the intractable infection. We tried a combined therapy with anti-tuberculous agents and IFN- γ in intractable pulmonary tuberculosis caused by multidrug-resistant pathogen in a patient with insulin-

*〒903-0215 沖縄県中頭郡西原町上原 207

* 207, Uehara, Nishihara-cho, Nakagami-gun, Okinawa
903-0215 Japan.
(Received 3 Oct. 2001)

dependent diabetes mellitus. Although no report showing the clinical use of IL-12 in infectious diseases has been seen, clinical trials already commenced for the therapy of malignant neoplastic diseases. It may not be in far future that this cytokine is clinically used for the treatment of infectious diseases. IL-18 has not yet been under the clinical trials.

Key words: Anti-tuberculous immunity, Th1 cytokines, Intractable tuberculosis, BRM therapy

キーワード: 結核免疫, Th1 サイトカイン, 難治性結核, BRM 療法

はじめに

結核は強力な化学療法の開発によってわが国でも1955年頃を境に患者数, 死亡者数を順調に減少させてきたが, 1980年代に至るとその減少速度が鈍化し, 遂には1997年から新規登録患者数が前年を上回る状態になった。

最近のわが国における特徴としては, 高齢者人口の増加, 癌化学療法, ステロイド長期投与, 臓器移植後の免疫抑制剤投与, 糖尿病患者の増加, エイズの流行などにとともに, 感染抵抗力の低下したコンプロマイズドホストに発症する結核が増えている。このような患者では, 種々の程度に結核免疫が低下しており, 潜伏感染している結核菌の再活性化や, 新たに体内に侵入してきた結核菌の増殖を制御できないために, 容易に発症したり増悪する。

このように, 近年における結核の病態は宿主の免疫状態と密接に関わっていることから, その感染制御機構を明らかにすることは重要な研究課題となってきた。また, そのような研究を通して, 化学療法のみでは治療が困難な患者において, 結核免疫能の制御にもとづいた新たな治療法の開発へと結びつく可能性が期待される。

本講演では, 結核感染制御における免疫応答機構について自験データを紹介しながら概説するとともに, 多剤耐性難治性肺結核症例における IFN- γ を用いた免疫療法について自験例を呈示しつつ考察する。

II. 結核感染防御と Th1 免疫応答

結核菌は, 貪食細胞の殺菌機構に対して種々の回避機構を有しており, 食胞内での旺盛な増殖を可能にしている¹⁾。従って, 好中球や補体, 特異抗体のみの防御機構では感染の拡大を制御することはできない。結核免疫は主として細胞性免疫によって担われており, その成立には IFN- γ を代表とする Th1 サイトカインが重要である¹⁾²⁾。また Flynn らは, 結核性肉芽腫の構築に TNF-

α が必須であると報告している³⁾。一方, Th1 細胞の分化誘導には IL-12 が中心的な役割を担っているが⁴⁾。最近発見された IL-18 は単独では Th1 細胞の分化を誘導できないが, IL-12 の作用を増強することで Th1 細胞分化誘導を著明に増強することが知られている⁵⁾。従って, 結核免疫におけるこれらサイトカインの重要性は容易に想像でき, 実際にこのことは各サイトカインの遺伝子欠損動物を用いて明らかにされてきている^{6)~9)}。Fig.1 に結核感染防御と Th1 反応との関係をまとめて示す。

最近, Th1 型サイトカインとしてオステオポンチン (OPN) が注目されている。OPN は, 骨基質の非コラーゲン性蛋白であり, 癌の転移や悪性細胞への形質転換に関与することも知られている。結核やサルコイドーシスの肉芽腫に高発現していることから肉芽腫形成と関わるサイトカインと考えられていたが, 最近その具体的な機序として IL-12 産生に深く関わっていることが明らかにされてきた¹⁰⁾。すなわち, OPN 遺伝子を欠損したマウスでは IL-12 産生の低下により, Th1 反応が減弱す

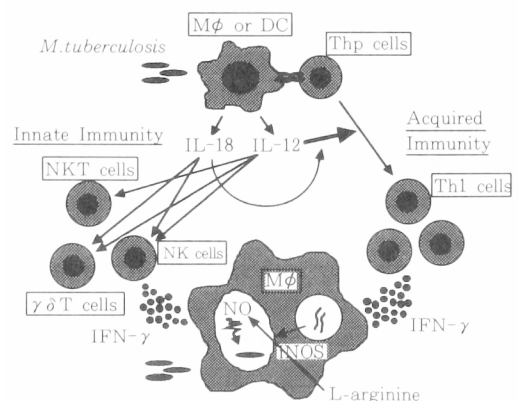


Fig.1 Host defense to mycobacterial infection and Th1 cytokines

るとともに、リステリア感染防御に異常をきたすことが報告されている¹¹⁾。最近われわれは、真菌によるヒト末梢血単球からのIL-12産生にOPNが重要な役割をしていることを明らかにしている¹²⁾。

結核感染防御におけるOPNの役割については未だ不明であるが、OPN遺伝子欠損マウスを用いた研究では、BCG感染防御にOPNが必須であることが明らかになっている¹³⁾。われわれは、結核患者の末梢血中でもOPNが上昇していることを、NTA分類によりその進行度を分類すると重症なほどOPN値が高いことを示した。これらの結果からOPNが結核感染制御に重要な役割をしていることが推察でき、今後さらに詳細な解析が必要になると考えられる。

Ⅲ. 結核感染の発症・増悪要因

結核感染に影響を及ぼす宿主要因についてTable 1にまとめた。その主なものについて、結核菌に対する感染抵抗性を損なう要因となっているものをTh1-Th2サイトカインバランスの観点から考えてみたい。

(1) 糖尿病

古くから結核に糖尿病を合併している患者の多いことが指摘されており、このような患者では結核が悪化したり再発しやすいことが報告されていた。高血糖状態で好中球の遊走能、貪食能、殺菌能が低下することはこれまで詳細に検討されている。しかし、糖尿病患者で細胞性免疫能にどのような影響が及ぶのかについてはまだ十分には理解されていない。初期の研究で露口らは、実験的糖尿病モデルを用いて結核菌に対する細胞性免疫が低下することを報告している¹⁴⁾。一方、Mencacciらは同様なモデルを用いて、高血糖状態ではTh1-Th2サイト

カインバランスがTh2側に偏るために*Candida albicans*に対して易感染性になることを示している¹⁵⁾。このように動物モデルから、糖尿病において好中球だけでなく細胞性免疫能が障害されることで結核菌に対する感染抵抗力が損なわれる可能性が考えられるが、その機序については現在まだほとんど明らかにされていない。

(2) 低栄養状態(低蛋白血症)

栄養と結核の関連性は、肺結核患者にいわゆる「やせ」型の体格が多いという漠然とした経験則から捉えられていたが、その後の疫学的、実験的研究によってこのことは確かめられてきた。近年にいたり、栄養障害を免疫能との関連で捉えるようになり、特に細胞性免疫が栄養障害時に損なわれることが明らかになってきた。実験的には、Chanらが低蛋白食で飼育したマウスはコントロールマウスに比べ結核菌感染に対して感受性になることを明快に証明した¹⁶⁾。このとき、Th1サイトカインであるIFN- γ の産生が低下しており、Th1-Th2バランスのTh2側への偏りが予想された。このことは、血清中のアルブミン濃度が肺結核の臨床経過とよく相関するという米田の報告と一致する¹⁷⁾。

(3) ステロイド長期投与

現在ステロイドは、種々の疾患に使われており、その投与が大量かつ長期にわたることも少なくない。ステロイドを長期に使用することでさまざまな副作用のおこることが知られている。その中には、感染抵抗力の低下のために発症する日和見感染も含まれる。ステロイドが好中球の遊走、貪食、殺菌能を抑制することはよく知られているが、細胞性免疫に対しても強力な抑制作用を示す。最近では、ステロイドがTh1サイトカインを特異的に抑制することでTh1-Th2バランスをTh2側に偏位さ

Table 1 Major exacerbating factors of tuberculosis

1. General
1) Sex, 2) Age, 3) Races, 4) Malnutrition, 5) Alcoholism
2. Diseases
1) Diabetes mellitus
2) Chronic renal failure (hemodialysis)
3) Hematological malignancies: adult T cell leukemia, leukemia, malignant lymphoma
4) Malignant diseases (solid tumors)
5) Congenital immunodeficiency syndrome
6) Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)
3. Iatrogenic
1) Steroid therapy
2) Immunosuppressive agents after organ transplantation
3) Anti-cancer chemotherapy
4) Irradiation

せることが報告されている^{18) 19)}。

われわれの結核感染マウスモデルを用いた実験でも、ステロイドを投与することで非投与マウスと比べ有意な肺内菌数の増加が観察された。同時に測定した血清中のIFN- γ 濃度もステロイド投与マウスにおいて有意に低下していた。

(4) エイズ

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染によってCD4+T細胞数が減少するためにおこる後天性免疫不全症候群であり細胞性免疫能が著明に障害される。したがってエイズは強力な結核増悪要因となる。Clericiらは、HIV感染の病期が進むにつれてTh1-Th2バランスがTh2側に偏ることを報告しており²⁰⁾、CD4+T細胞の数の減少のみならず、各サブセットの質的な変化も増悪要因の1つと考えられる。

一方、PeakmanらはHIV感染の病期が進行するにつれて血清中の可溶性CD4 (sCD4)が増加することを報告しており²¹⁾。われわれも同様な結果を得ている。われわれは、増加したsCD4が結核感染防御にどのような影響を及ぼすか検討するために、膜結合型CD4欠損突然変異マウス (CD4Lマウス)を用いて検討した。こ

のマウスは、CD4の膜結合部分の遺伝子異常により細胞膜上にCD4分子が発現できず可溶性CD4が体液中に大量に分泌される。CD4LマウスまたはコントロールとしてWTマウスに結核菌を感染させ2, 4週後に肺、肝、脾臓内生菌数を比較したところ、CD4Lマウスにおいて生菌数の有意な増加が観察された。このとき、Th1サイトカインの低下によるTh1-Th2バランスの偏位も認められた。

以上の結果から、エイズの場合にはCD4+T細胞数の減少のみならず、増加したsCD4が病態を修飾している可能性も示唆された。

IV. IFN- γ による結核の新規治療法の試み

マウスモデルにおけるIFN- γ の治療的有効性から、同サイトカインのヒト結核症治療への応用が期待される。現時点で対象になるのは、何らかの原因によって感染抵抗力が低下し、ほとんどすべての抗結核化学療法に対して抵抗性となった難治化症例である。これまで種々の基礎疾患を持った播種性非結核性抗酸菌症に対してIFN- γ 治療が試みられた報告は諸外国に散見される^{22) 23)}。Table 2にその代表的なものをまとめた。多く

Table 2 Cytokine therapy with IFN- γ in non-tuberculous mycobacteriosis

Age/Sex	Extent of disease	Associated conditions	Organism	Clinical response	Adverse events
1. 5/M	Blood, nodes, gut, sinuses	Agenesis of the corpus callosum and the right kidney	MAC	effective	none
2. 29/M	Skin, bone	None	MAC	effective	none
3. 46/M	Blood, lung, skin	Congenital deafness, NIDDM, milliary TB at age of 28	MAC	effective	malaise
4. 42/M	Blood, liver peritoneum	Idiopathic CD4+T lymphocytopenia recurrent bacterial pneumonia	MAC	effective	none
5. 41/F	Blood, skin, lung, pleural fluid, urine	Idiopathic CD4+T lymphocytopenia BOOP, orbital schwannoma	MAC	effective	malaise
6. 49/F	Skin, bone	Idiopathic CD4+T lymphocytopenia recurrent deep venous thromboses	MAC	effective	none
7. 53/F	Skin, lung, pleural fluid, mediastinum, pericardium	Peripheral and central demyelinating process	<i>M. kansasii</i>	effective	none

(Holland et al. 1994²³⁾)

の場合、IFN- γ 投与によって臨床的、細菌学的な改善が認められており、副作用も発熱や全身倦怠感程度の軽いものであったと報告されている。また、他の報告では、肺結核症例に対してIFN- γ の吸入療法が試みられ概ね有効であった²⁴⁾。

われわれは、インシュリン依存型糖尿病を基礎疾患に持つ多剤耐性結核菌による難治性肺結核症患者に対してIFN- γ と活性型ビタミンD3の併用によるサイトカイン療法を試みた。活性型ビタミンD3はIFN- γ によるマクロファージの活性化を増強することが知られている²⁵⁾。

症例は34歳、男性。インシュリン依存型糖尿病発症の2年後に肺結核を発症した。喀痰から検出された結核菌はINH, RFPをはじめとしてEB, SMにも完全耐性を示す多剤耐性菌であり、これらの抗結核薬による治療にもかかわらず肺陰影の増大が認められた。その後、感受性のある他の抗結核薬を併用しながら治療を継続したが改善がみられず、進行性に病勢が悪化するため、十分なインフォームドコンセントの後、化学療法とIFN- γ 、活性型ビタミンD3による併用療法を試みた。また、本症例では血清および末梢血リンパ球のPPD刺激培養上清中のIFN- γ 濃度が、健常群あるいは肺結核治療反応群に比べて低下していた。

Fig. 2に臨床経過を示す。同治療を6カ月にわたって実施したが、臨床症状、炎症所見、細菌学的検査および胸部X線上明らかな改善は認められず、むしろ両側肺尖部にみられた空洞病変の拡大傾向がみられた。また、IFN- γ の全身投与中糖尿病の悪化がみられたため吸入療法に変更したが、治療開始6カ月後に左側気胸を発症し吸入継続困難となったため同治療は中止せざるを得ない状態となった。

今回難治性肺結核症患者に試みたIFN- γ 療法は結果的には臨床的有効性は得られなかったが、治療経過中に実施した免疫学的パラメーターの解析では末梢血NK活性の増強、血清および末梢血リンパ球のPPD刺激培養上清中のIFN- γ 、IL-1, IL-2およびIL-6濃度の増加が観察された。この点ではIFN- γ 投与の効果があったことが確認できた。しかしながら、今回の症例は以下の点で問題を残した。IFN- γ 投与により全身あるいは局所的に炎症性サイトカインの過剰な産生が誘導され、またNK活性が過剰に活性化されたために、逆に組織障害など生体にとって不都合な反応を引き起こしてしまった可能性を拭いきれない点である。

すなわち、今回みられた糖尿病の悪化、空洞病変の拡大、吸入療法中に出現した気胸については、IFN- γ との直接的な因果関係は不明であるものの生体の過剰反応

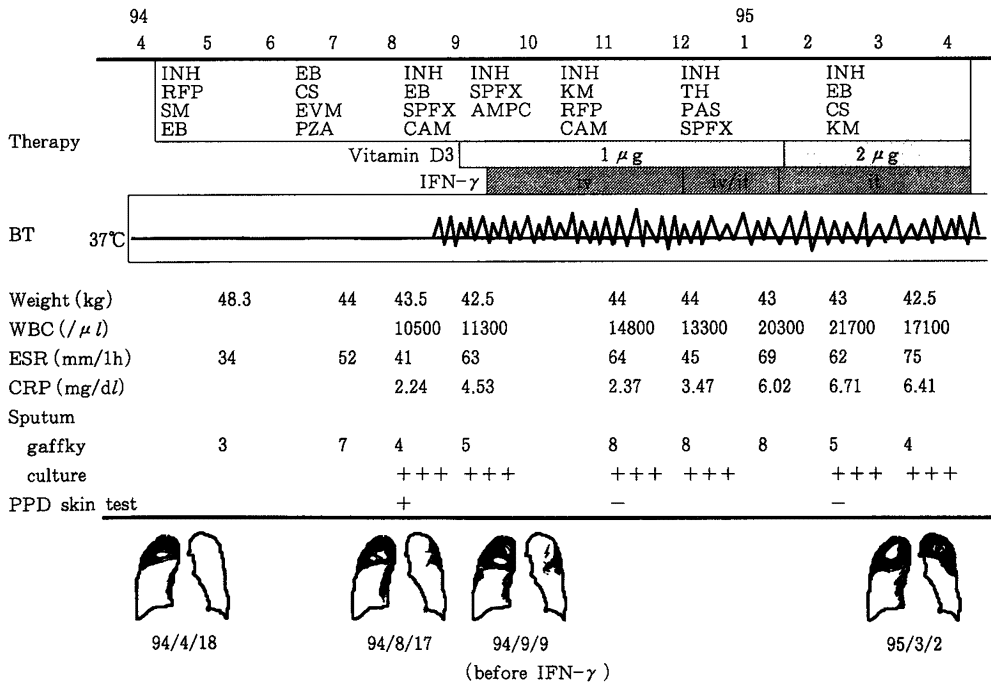


Fig. 2 IFN- γ therapy against intractable pulmonary tuberculosis

であった可能性は否定できない。

V おわりに

結核の発症・増悪要因と考えられる疾患・状態の多くに Th1-Th2 バランスの偏位が予想された。このインバランスが結核免疫の低下をもたらし、結果的に結核の増悪につながるものと考えられた。今後臨床的に Th1-Th2 バランスを評価し偏ったバランスを是正できるようにすれば、さまざまな基礎疾患の上に発症した結核をそれぞれの増悪要因に応じてより効率的に治療できるようになる可能性が期待できる。この領域でのさらなる研究が望まれるところである。

共同研究者：川上和義，高口善信，金城雄樹，屋良さとみ，上江洲香織，宮里明子，Mahboob H. Qureshi，Tiantuo Zhang，照屋勝治，當山雅樹，久手堅憲史，大山泰一，新里 敬，比嘉 太，健山正男（琉球大学医学部第一内科），金森修三，大湾勤子，久場睦夫，源河圭一郎（国立療養所沖縄病院），審良静男（大阪大学微生物病研究所癌抑制遺伝子研究分野），岡村春樹（兵庫医科大学先端医学研究施設生体防御分野），栗本雅司（林原生物化学研究所），岩倉洋一郎（東京大学医科学研究所ヒト疾患モデル研究センター），上出利光（北海道大学遺伝子病制御研究所分子免疫分野），今 重之（免疫生物研究所）

文 献

- 1) Flynn JL, Chan J: Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* 2001; 19: 93-129.
- 2) Orme I: The immune response to tuberculosis. *Immunity to mycobacteria*. R. G. Landes Co., Austin, Texas, 1995, 27-87.
- 3) Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, et al.: Tumor necrosis factor- α is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity.* 1995; 2: 561-572.
- 4) Trinchieri C: Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity. *Adv Immunol.* 1998; 70: 83-243.
- 5) Robinson D, Shibuya K, Mui A, et al.: IGIF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon- γ production and activates IRAK and NF κ B. *Immunity.* 1997; 7: 571-581.
- 6) Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, et al.: Disseminated tuberculosis in interferon γ gene-disrupted mice. *J Exp Med.* 1993; 178: 2243-2247.
- 7) Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, et al.: An essential role for interferon γ in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med.* 1993; 178: 2249-2254.
- 8) Flynn JL, Goldstein MM, Triebold KJ, et al.: IL-12 increases resistance of BALB/c mice to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol.* 1995; 155: 2515-2524.
- 9) Cooper AM, Magram J, Ferrante J, et al.: Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med.* 1997; 186: 39-45.
- 10) Chiba S, Rashid MM, Okamoto H, et al.: The role of osteopontin in the development of granulomatous lesions in lung. *Microbiol Immunol.* 2000; 44: 319-332.
- 11) Ashkar S, Weber GF, Panoutsakopoulou V, et al.: Eta-1 (osteopontin): An early component of type-1 (cell-mediated) Immunity. *Science.* 2000; 287: 860-864.
- 12) Koguchi Y, Kawakami K, Kon S, et al.: *Penicillium marneffe* causes osteopontin-mediated production of interleukin-12 by peripheral blood mononuclear cells. *Infect Immun.* 2002; in press.
- 13) Nau GJ, Liaw L, Chupp GL, et al.: Attenuated host resistance against *Mycobacterium bovis* BCG infection in mice lacking osteopontin. *Infect Immun.* 1999; 67: 4223-4230.
- 14) Saiki O, Negoro S, Tsuyuguchi I, et al.: Depressed immunological defense mechanisms in mice with experimentally induced diabetes. *Infect Immun.* 1980; 28: 127-131.
- 15) Mencacci A, Romani L, Mosci P, et al.: Low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice. II. Susceptibility to *Candida albicans* infection correlates with the induction of a biased Th2-like antifungal response. *Cell Immunol.* 1993; 150: 36-44.
- 16) Chan J, Tian Y, Tanaka KE, et al.: Effects of protein calorie malnutrition on tuberculosis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93: 14857-14861.
- 17) 米田尚弘：肺結核での栄養障害と細胞性免疫。結核。

- 1989; 64: 633-640.
- 18) Ramierz F, Fowell DJ, Puklavec M, et al.: Glucocorticoids promote a Th2 cytokine response by CD4+T cells *in vitro*. *J Immunol*. 1996; 156: 2406-2412.
- 19) Visser J, van Boxel-Dezaire A, Methorst D, et al.: Differential regulation of interleukin-10 (IL-10) and IL-12 by glucocorticoids *in vitro*. *Blood*. 1998; 91: 4255-4264.
- 20) Clerici M, Shearer GM: A Th1 → Th2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol Today*. 1993; 14: 107-111.
- 21) Peakman M, Senaldi G, Foote N, et al.: Naturally occurring soluble CD4 in patients with human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis*. 1992; 165: 799-804.
- 22) Squires KE, Murphy WF, Madoff, et al.: Interferon- γ and *Mycobacterium avium-intracellulare* infection. *J Infect Dis*. 1989; 159: 599-600.
- 23) Holland SM, Einstein EM, Kuhns DB, et al.: Treatment of refractory disseminated non-tuberculous mycobacterial infection with interferon gamma: a preliminary report. *New Engl J Med*. 1994; 330: 1348-1355.
- 24) Condos R, Rom WN, Schluger NW: Treatment of multidrug-resistant pulmonary tuberculosis with interferon- γ via aerosol. *The Lancet*. 1997; 349: 1513-1515.
- 25) 川上和義, 照屋勝治, 當山雅樹, 他: 実験的マウス結核症モデルを用いたガンマインターフェロン療法の試み. *結核*. 1994; 69: 607-613.