

## 糖尿病合併肺結核患者の IFN- $\gamma$ 産生能の経時的変化の検討

<sup>1</sup>塚口 勝彦   <sup>1</sup>岡村 英生   <sup>1</sup>松澤 邦明   <sup>1</sup>田村 猛夏  
<sup>1</sup>宮崎 隆治   <sup>2</sup>玉置 伸二   <sup>2</sup>木村 弘

**要旨：**糖尿病患者の肺結核合併率は高率である。その病理免疫学的機序を明らかにするために、IFN- $\gamma$  産生能を抗結核化学療法中、縦断的に追跡測定した。診断時、健常コントロール群、糖尿病のない結核患者群 (TB)、コントロール良好糖尿病合併結核患者群 (DM(g)TB)、コントロール不良糖尿病合併結核患者群 (DM(p)TB) の順に CD4<sup>+</sup>T 細胞による IFN- $\gamma$  産生能が有意に低下していた。標準療法 B 法で治療後、TB 群と DM(g)TB 群の IFN- $\gamma$  産生能は 6 カ月までにコントロールレベルまで回復していた。一方、DM(p)TB 群では IFN- $\gamma$  産生能の低下が持続していた。治療法による比較では、どの群においても、治療 6 カ月後の PBMC による IFN- $\gamma$  産生能に A 法と B 法間で有意差を認めなかった。A 法で 6 カ月治療後の DM(p)TB 群の IFN- $\gamma$  産生能は低値であった。これらの結果は DM(p)TB 群の IFN- $\gamma$  産生能の低下がコントロール不良糖尿病から生じる内因的欠陥による可能性を示唆している。特にこの群では残存菌再増殖による再発に注意する必要がある。

**キーワード：**肺結核, 糖尿病, IFN- $\gamma$ , 経時的検討, 治療法

### 緒 言

糖尿病患者の肺結核発症率は高率で、全肺結核中の糖尿病合併率は 10% を超えるとする報告もある<sup>1)</sup>。糖尿病の易感染性に関しては、これまで主としてブドウ球菌や大腸菌などの一般細菌に対する抗菌力という観点から特に好中球機能の面から検討が加えられてきた<sup>2)</sup>。

結核菌は細胞内寄生細菌であり、その抗菌活性にはマクロファージや T 細胞が関与する細胞性免疫が必要である。以前にわれわれは、マクロファージによる TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 産生能, CD4<sup>+</sup>T 細胞による IFN- $\gamma$  産生能が結核患者の中でも特に糖尿病合併例で著しく低下していることを報告し、患者病態とこれらのサイトカイン産生能低下との関連性の可能性を指摘した<sup>3)4)</sup>。

今回、抗結核治療開始後の IFN- $\gamma$  産生能の経時的推移を糖尿病合併の有無で比較することで、糖尿病と結核との関連をさらに詳細に検討した。また治療法による IFN- $\gamma$  産生能の差異についても同時に検討した。

### 対象と方法

#### (1) 対象

対象は文書で同意を得た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 20 例 (平均年齢 56.9 ± 10.3 歳), 年齢を合致させた糖尿病非合併例 14 例 (55.6 ± 12.4 歳, 以下 TB 群) である。コントロールとして健常人 10 例 (51.0 ± 14.7 歳, 以下 CON 群) も併せて検討した。糖尿病合併群は糖尿病の程度で高度糖尿病合併群 (平均 HbA<sub>1c</sub> 10.1 g/dl, 以下 DM(p)TB 群) と軽度糖尿病合併群 (平均 HbA<sub>1c</sub> 7.2 g/dl, 以下 DM(g)TB 群) の 2 群に分類した<sup>5)</sup>。入院後抗結核治療中の糖尿病のコントロール状態の推移は Table に示した。患者全例で治療開始後 6 カ月の時点では排菌は止まり、レントゲン所見も改善し、明らかに治療効果ありと判定した。

#### (2) 方法

##### ① CD4<sup>+</sup>T 細胞の増殖, 純化

文献 6 と同様に行った。簡単に述べると、患者、健常

<sup>1</sup>国立療養所西奈良病院内科, <sup>2</sup>奈良県立医科大学第二内科

連絡先: 塚口勝彦, 国立療養所西奈良病院内科, 〒630-8053 奈良県奈良市七条 2-789 (E-mail: katsuka@wnara.hosp.go.jp)  
(Received 9 Nov. 2001/Accepted 18 Feb. 2002)

ドナーから末梢血単核球 (PBMC) を分離, 細胞数を調整後,  $5 \times 10^6$  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 T 細胞はマグネテックビーズ (Dynal 社) を用い, ネガティブセレクション法で CD4<sup>+</sup>T 細胞に純化した。最初に増殖細胞を  $\gamma \delta$  TCR に対するマウス抗体, TCR- $\delta$  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, CD8<sup>+</sup>T 細胞, B 細胞, 単球分画を分離除去した。除去後の CD4<sup>+</sup>T 細胞サブセットの純化度は FACScan (Becton Dickinson 社) で常に 95% 以上であることをモニターした。除去細胞群の混入率は 1% 以下, NK 細胞のそれは 2.5% 以下であり, その影響は

無視しうるものと判断した。

### ② IFN- $\gamma$ 産生能の測定

純化した CD4<sup>+</sup>T 細胞とプラスチックペトリディッシュ付着法で得た自己単球とを BCG 生菌とともに 48 時間培養, 上清中の IFN- $\gamma$  量を市販の ELISA kit (R & D 社) にて測定した。一部の実験では PBMC に BCG を添加して培養, その上清中の IFN- $\gamma$  を測定した。IFN- $\gamma$  値測定は抗結核治療前, 治療 30 日後, 6 カ月後の 3 回行った。

### ③ 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) IFN- $\gamma$ 産生能の経時的推移

標準療法 B 法 (HRE or HRS) で治療した症例について糖尿病合併の有無, 程度で分類し, CD4<sup>+</sup>T 細胞による IFN- $\gamma$  産生能を経時的に測定した。

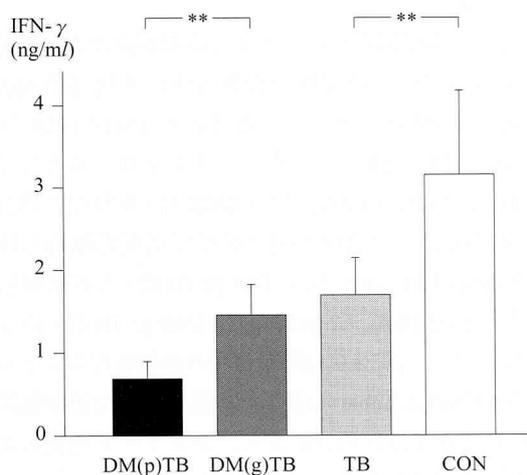
Fig. 1 に示すように, 抗結核治療前の IFN- $\gamma$  産生能は糖尿病の合併の有無にかかわらず結核患者群では CON 群と比較して有意の低値を示した。TB 群は DM(g)TB 群と有意差を認めないが, DM(p)TB 群は他群と比較し有意に最も低値であった。抗結核治療後 30 日後の IFN- $\gamma$  産生能は DM(g)TB 群, TB 群で治療前と比較してその平均値が上昇したが, 各群間の比較では同様の傾向を示し, DM(p)TB 群が最も低値であった (Fig. 2)。

治療後 6 カ月の時点では DM(g)TB 群, TB 群の IFN-

**Table** DM control of tuberculous patients

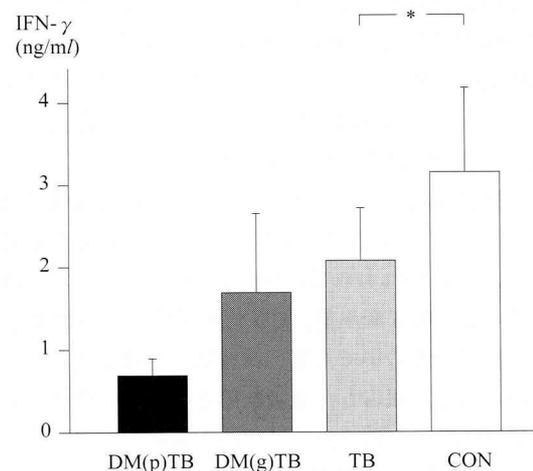
	DM(g)TB		DM(p)TB	
	FBS	HbA <sub>1c</sub>	FBS	HbA <sub>1c</sub>
0	127	7.2	204*	10.1*
3 months	109	6.3	127	7.9*
6 months	113	6.2	118	6.5

DM control at the times of diagnosis of tuberculosis, 3 and 6 months following initiation of antituberculous therapy.  
FBS: Fasting blood sugar  
DM(p)TB: Tuberculous patients with poorly controlled DM  
DM(g)TB: Tuberculous patients with good controlled DM  
\* $p < 0.05$  compared with DM(g)TB



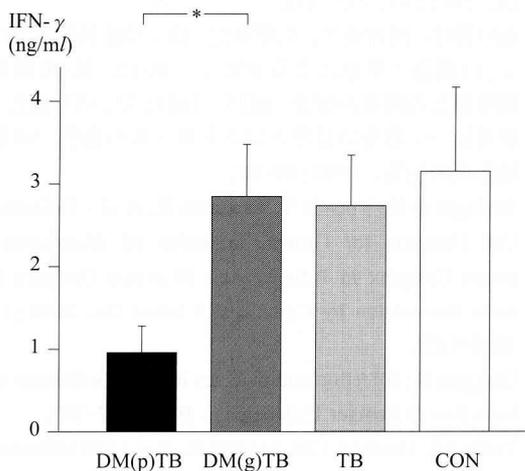
**Fig. 1** IFN- $\gamma$  production at the time of diagnosis

CD4<sup>+</sup>T cells were cocultured with autologous monocytes and BCG for 48 h. Supernatants were harvested for measurement of IFN- $\gamma$  by ELISA.  
DM(p)TB: Tuberculous patients with poorly controlled DM (n=5)  
DM(g)TB: Tuberculous patients with good controlled DM (n=7)  
TB: Tuberculous patients without DM (n=9)  
CON: Healthy controls (n=10) \*\* $p < 0.01$



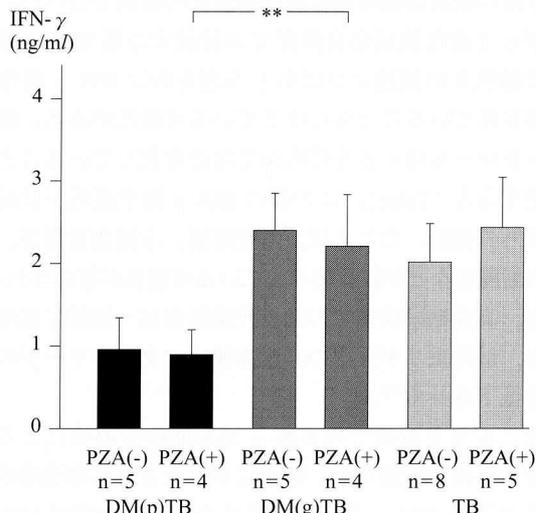
**Fig. 2** IFN- $\gamma$  production at 30 days following initiation of antituberculous therapy

CD4<sup>+</sup>T cells were cocultured with autologous monocytes and BCG for 48 h. Supernatants were harvested for measurement of IFN- $\gamma$  by ELISA.  
DM(p)TB: Tuberculous patients with poorly controlled DM (n=4)  
DM(g)TB: Tuberculous patients with good controlled DM (n=4)  
TB: Tuberculous patients without DM (n=9)  
CON: Healthy controls (n=10) \* $p < 0.05$



**Fig. 3** IFN- $\gamma$  production at 6 months following initiation of antituberculous therapy

CD4<sup>+</sup>T cells were cocultured with autologous monocytes and BCG for 48 h. Supernatants were harvested for measurement of IFN- $\gamma$  by ELISA.  
 DM(p)TB: Tuberculous patients with poorly controlled DM (n=5)  
 DM(g)TB: Tuberculous patients with good controlled DM (n=7)  
 TB: Tuberculous patients without DM (n=9)  
 CON: Healthy controls (n=10) \*p<0.05



**Fig. 4** Antituberculous chemotherapy and IFN- $\gamma$  production at the time of 6 months

PBMC were cocultured with autologous monocytes and BCG for 48 h. Supernatants were harvested for measurement of IFN- $\gamma$  by ELISA.  
 PZA(-): HRE or HRS therapy  
 PZA(+): HREZ therapy \*\*p<0.01

$\gamma$  産生は著明に上昇し、CON 群と有意差を認めなかった。この結果と好対照に DM(p)TB 群の IFN- $\gamma$  産生能は有意に低値であり、この値は抗結核治療前と同レベルであった (Fig. 3)。

(2) 治療法による比較

PZA を加えた療法 (標準療法 A 法, HREZ) で治療後と加えない療法 (標準療法 B 法, HRE or HRS) で治療後の PBMC による IFN- $\gamma$  産生能の比較を各群間および各群内で行った。

Fig. 4 に示すように治療 6 カ月後の各群内の治療方法による IFN- $\gamma$  産生能に有意差は認めず、DM(p)TB 群の IFN- $\gamma$  産生能は PZA 使用の有無にかかわらず DM(g)TB 群、TB 群と比較して有意に低値であった。

考 察

糖尿病が感染症のハイリスクファクターであることは周知の事実であるが、その原因については必ずしも明確ではない。高血糖が好中球の遊走能、貪食能、さらにスーパーオキシド活性を低下させ殺菌能低下につながる<sup>7)8)</sup>。この結果ブドウ球菌や大腸菌などの一般細菌に対する抵抗性が減弱する。他の免疫担当細胞に関しては、動物実験で糖尿病ラットの肺胞マクロファージの呼吸爆発が低下する<sup>9)</sup>。ヒトでは糖尿病患者の肺胞マクロファージの走化能が低下する<sup>10)</sup>。T 細胞に関しては糖尿病ラットでアポトーシスが亢進しているという報告がある<sup>11)</sup>。

結核菌は細胞内寄生菌であり、宿主が菌の増殖をコン

トロールし、抵抗性を獲得するためには T 細胞とマクロファージが協調する細胞性免疫が有効に働く必要がある。糖尿病と結核免疫に関する報告は少ないが、われわれは以前に糖尿病合併肺結核患者の治療前の IFN- $\gamma$  産生能が非合併肺結核患者と比較して有意に低下していることを報告した<sup>4)</sup>。IFN- $\gamma$  は動物実験では結核菌に対する抗菌促進作用が示され、ヒトでも macrophage colony stimulating factor と協調し *M. avium* に対する抗菌活性を示す<sup>6)</sup>。糖尿病合併群で特に IFN- $\gamma$  産生能が低値をとることは、この群でマクロファージ、T 細胞機能低下が著しいことを示している。

今回の検討では IFN- $\gamma$  産生能の経時的推移を治療の進行による臨床的所見の軽快とともに調べた。排菌が止まり、レントゲン所見も改善したほぼ臨床的治療状態とみなしてよい治療開始後 6 カ月の時点での IFN- $\gamma$  産生能は軽度の糖尿病合併あるいは非合併肺結核患者群ではコントロール値近くまで回復し、病勢と相関する可能性が示された。これは Hirsch らの報告<sup>12)</sup>と一致しており、IFN- $\gamma$  が密接に結核免疫と関連し、また軽度であれば糖尿病合併は有意にハイリスクファクターたり得ない可能性を示唆している。

一方、対照的に高度糖尿病合併群では治療開始前のみならず、肺結核が改善している治療開始後 6 カ月の時点でも IFN- $\gamma$  産生能が低値であった。結核重症度 (排菌量やレントゲン上の活動性病変の拡がり) により IFN- $\gamma$  産生能が影響を受ける可能性をできるかぎり除外するため

に今回の検討は結核重症度が同程度の症例で行った。したがって高度糖尿病合併群での持続する低 IFN- $\gamma$  産生能は結核との関連よりはむしろ固有的に IFN- $\gamma$  産生が障害されていることから生じている可能性がある。血糖コントロールは6カ月の時点では正常化していることを考慮すると (Table), この群の IFN- $\gamma$  産生能低下は高血糖以外の要素, たとえば, 栄養障害, 末梢血管障害, 脂質代謝障害などが強く関与している可能性が推測される。実際, 高度糖尿病患者の脂質代謝障害は一般的に高度であり, 低比重リポ蛋白の異常高値はマクロファージの機能を低下させる<sup>13)</sup>。

次に6カ月時点での IFN- $\gamma$  産生能の治療法による差異を各群内で検討した。結果に示したように標準療法 A 法も B 法も IFN- $\gamma$  産生能に差はなく, 治療法は IFN- $\gamma$  産生能に影響を与えない可能性が示唆された。高度糖尿病合併群ではいずれの治療法でも IFN- $\gamma$  産生能は低下した状態が持続していた。IFN- $\gamma$  は他のサイトカインと協調して抗菌活性を示すが, 特に高度糖尿病合併群では治療法によらず, 残存している菌が再増殖して再発する可能性を十分念頭に置く必要があると思われる。

## 文 献

- 1) 山岸文雄, 鈴木公典, 佐々木結花, 他: 肺結核患者における糖尿病合併頻度の検討. 結核. 1996; 71: 569-572.
- 2) 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.
- 3) 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  $\beta$ , Tumor necrosis factor  $\alpha$  および Interleukin-6 産生能の検討. 結核. 1992; 67: 755-760.
- 4) 塚口勝彦, 岡村英生, 生野雅史, 他: 肺結核患者 CD 4<sup>+</sup>  $\alpha$   $\beta$  T細胞と単球による IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-10 産生と糖尿病との関連の検討. 結核. 1997; 72: 617-622.
- 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) Tsukaguchi K, Yoneda T, Okamura H, et al.: Defective T Cell Function for Growth Inhibition of *Mycobacterium avium* Complex in Patients with *M. avium* Complex Disease: Restoration by Cytokines. J Infect Dis. 2000; 182: 1664-1671.
- 7) Cooppan R: Infection and diabetes in Joslin's diabetes mellitus. Lea & Febiger Philadelphia. 1985; 737-747.
- 8) Tebbis 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) Mohsenin V and Latifpour J: Respiratory burst in alveolar macrophages of diabetes rats. A Appl Physiol. 1990; 68: 2384-2390.
- 10) 佐藤篤彦: 難治性糖尿病と感染症. 総合臨床. 1991; 40: 252.
- 11) Jung CG, Kamiyama T, Agui T: Elevated apoptosis of peripheral T lymphocytes in diabetic BB rats. Immunology. 1999; 98: 590-594.
- 12) Hirsch CS, Toossi Z, Othieno C, et al.: Depressed T-Cell interferon- $\gamma$  responses in pulmonary tuberculosis analysis of underlying mechanisms and modulation with therapy. J Infect Dis. 1999; 180: 2069-2073.
- 13) Thai SF, Lewis JG, Williams RB, et al.: Effects of oxidized LDL on mononuclear phagocytes: inhibition of induction of four inflammatory cytokine gene RNAs, release of NO, and cytolysis of tumor cells. J Leukoc Biol. 1995; 57: 427-433.

## Original Article

LONGITUDINAL ASSESSMENT OF IFN- $\gamma$  PRODUCTION IN PATIENTS WITH PULMONARY TUBERCULOSIS COMPLICATED WITH DIABETES MELLITUS

<sup>1</sup>Katsuhiko TSUKAGUCHI, <sup>1</sup>Hideo OKAMURA, <sup>1</sup>Kuniaki MATSUZAWA, <sup>1</sup>Mouka TAMURA,  
<sup>1</sup>Ryuji MIYAZAKI, <sup>2</sup>Shinji TAMAKI, and <sup>2</sup>Hiroshi KIMURA

**Abstract** Patients with diabetes mellitus (DM) are more susceptible to bacterial infection including pulmonary tuberculosis. To define the immunopathologic mechanisms underlying pulmonary tuberculosis in patients with DM, the production of IFN- $\gamma$  by CD 4<sup>+</sup>T cells or PBMC were followed up longitudinally during antituberculous chemotherapy. At the time of diagnosis, IFN- $\gamma$  production by CD 4<sup>+</sup>T cells in either tuberculosis patients without DM (TB) or with DM was significantly lower than that in the healthy control. CD 4<sup>+</sup>T cells in tuberculosis patients with DM under poor control (DM(p)TB) produced significantly less IFN- $\gamma$  than did patients with DM under good control (DM(g)TB). In longitudinal studies, IFN- $\gamma$  production in both TB and DM(g)TB patients returned to the control level by 6 months, whereas the production in DM(p)TB patients remained depressed. There was no significant relation between regimens of antituberculous chemotherapy and the production of IFN- $\gamma$  by PBMC in all subject groups. IFN- $\gamma$  production was

depressed in DM(p)TB patients treated with HREZ for 6 months. These results indicate that depressed production of IFN- $\gamma$  in DM(p)TB patients is prolonged not due to tuberculous infection but intrinsic defect presumably induced by poorly controlled DM.

**Key words:** Pulmonary tuberculosis, Diabetes mellitus, IFN- $\gamma$ , Longitudinal study, Regimens for chemotherapy

<sup>1</sup>Department of Internal Medicine, National Nishinara Hospital, <sup>2</sup>Second Department of Internal Medicine, Nara Medical University

Correspondence to: Katsuhiko Tsukaguchi, Department of Internal Medicine, National Nishinara Hospital, 2-789, Shichijo, Nara-shi, Nara 630-8053 Japan. (E-mail: katsuka@wnara.hosp.go.jp)