

肺結核患者におけるサイトカイン産生能に関する研究

第1報 末梢血血清中のサイトカイン濃度の検討

奈良県立医科大学第二内科学教室

仲谷宗裕

STUDY ON CYTOKINE PRODUCTION OF PATIENTS WITH PULMONARY TUBERCULOSIS

1. INVESTIGATION ON SERUM LEVELS OF CYTOKINES OF PATIENTS WITH PULMONARY TUBERCULOSIS

MUNEHIRO NAKAYA

The Second Department of Internal Medicine, Nara Medical University

Received October 21, 1996

Abstract: Concentrations of IL-8 and TNF- α in the serum of 16 patients with active pulmonary tuberculosis (patients group) were measured by ELISA before the initiation of antituberculous therapy, and were compared with those measured in 20 age and smoking habit-matched healthy controls.

The mean level of serum IL-8 in patients group was significantly higher than that of healthy controls ($P < 0.001$). The mean level of serum TNF- α in tuberculosis patients was also high, while TNF- α was not measurable in the serum of healthy controls.

The relationship between clinical pictures, defined mainly by radiographic findings, and the serum levels of IL-8 and TNF- α were examined. Serum IL-8 levels of 9 patients with cavity were significantly higher those that of 7 patients without cavity ($P < 0.05$).

Out of 9 patients with cavity, four patients with advanced lesions on chest rentogenogram had higher serum IL-8 levels than did the remaining 5 patients with moderate lesions ($P < 0.05$), but there was no correlation between TNF- α level and radiographic findings.

Those results suggest that IL-8 appears to be involved in the formation of tuberculous cavitory lesion.

Index terms

pulmonary tuberculosis, interleukin-8 (IL-8), tumor necrosis factor- α (TNF- α), tuberculous cavity

緒 言

interleukin-8 (以下, IL-8) は好中球走化活性をはじめ, 好中球細胞内酵素放出, 好中球スーパーオキシド産生誘導など好中球機能に強い影響を持つが^{1,2,3)}, 近年, T細胞走化活性亢進^{4,5)}など, リンパ球系への作用も指摘されている多彩な作用を持つサイトカインで, 種々の炎

症性疾患への関与が示唆されている^{6,7,8,9,10)}.

また近年 in vitro でのヒト単球による抗酸菌貧食実験で, 抗酸菌の細胞内殺菌で IL-8 の放出が報告され, 抗酸菌感染時の生体防御に IL-8 の関与が示唆されている¹¹⁾.

また proinflammatory cytokine の1つである tumor necrosis factor- α (以下, TNF- α) は, IL-8 産生を誘導し, 結核性肉芽腫形成¹²⁾や殺菌過程¹³⁾に重要な役割を

果たすことが報告されている。

今回著者は活動性肺結核症患者の IL-8, TNF- α の血中濃度を測定し, それぞれの胸部 X 線上空洞の有無, 病変の広がりなどの各種臨床所見との関連性を検討したので報告する。

対 象

1993 年 4 月から当科または関連病院に入院し, 喀痰から排菌が確認された活動性肺結核患者 16 例 (男 12 例, 女 4 例, 年齢 56.6 ± 16.6 歳) を患者群, 年齢, 喫煙歴を一致させた健康人 20 例 (男 10 例, 女 10 例, 年齢 52.4 ± 17.2 歳) を対照群とした。

方 法

患者血液は入院の直後, 抗結核薬投与開始前に採取し, 患者と対照群とから採取した血液は血清分離後測定まで -80°C で保存した。凍結保存血清を測定時に室温で融解し, 血清中 IL-8 濃度を IL-8 ELISA キット (トーレ・フジバイニクス, 東京, 最低検出感度 3.0 pg/ml), TNF- α 濃度を TNF- α ELISA キット) MEDGENIX, Belgium, 最低検出感度 1.9 pg/ml) を用いて測定した。

IL-8, TNF- α と臨床病態, 免疫能, 栄養状態との関連性を検討するために患者群の白血球 ($/\mu\text{l}$), 赤血球 ($/\mu\text{l}$), ヘマトクリット (%), ヘモグロビン (g/dl) などの末梢血検査, 血清総蛋白 (g/dl), 血清アルブミン (g/dl), 血清コリンエステラーゼ (IU/l) などの生化学的検査, 各種免疫グロブリン (mg/dl), CRP (mg/ml), C3 (mg/dl), C4 (mg/dl), CH 50 などの炎症性マーカー, および Purified protein derivative (以下, PPD) と 2,4-dinitrochlorbenzene (以下, DNCB) とによる遅延型皮膚反応の陽性率, phytohemagglutinin (以下, PHA), concanavarin A (ConA) によるリンパ球幼若化反応などの細胞性免疫能の指標との関連を検討した。

本研究の統計学的検討には Student の t 検定を用い, 危険率両側 5% を有意とし, 測定値は平均値 \pm 標準偏差 (SD) で記載した。

結 果

1. 対照群と患者群との IL-8, TNF- α の血清濃度

血清 IL-8 濃度は対照群は $2.5 \pm 4.4 \text{ pg/ml}$ と低値であるが, 患者群では $28.2 \pm 26.4 \text{ pg/ml}$ と有意に高値を示した ($P < 0.0001$) (Fig. 1)。

血清 TNF- α 濃度は対照群は全例最低検出感度未満であったが患者群では $10.0 \pm 13.3 \text{ pg/ml}$ であった (Fig. 2)。

2. 各種臨床検査所見との比較

今回の検討では, 血清 IL-8 濃度や血清 TNF- α 濃度と臨床検査所見のいずれの間にも有意な相関を示さな

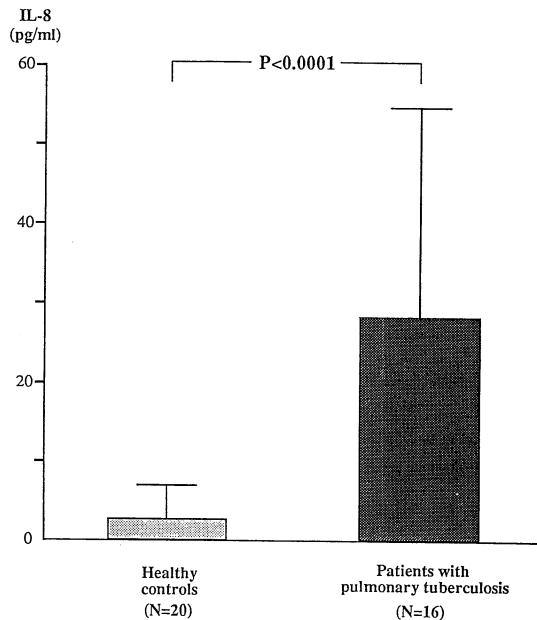


Fig. 1. Comparison of serum levels of IL-8 in patients with pulmonary tuberculosis and healthy controls.

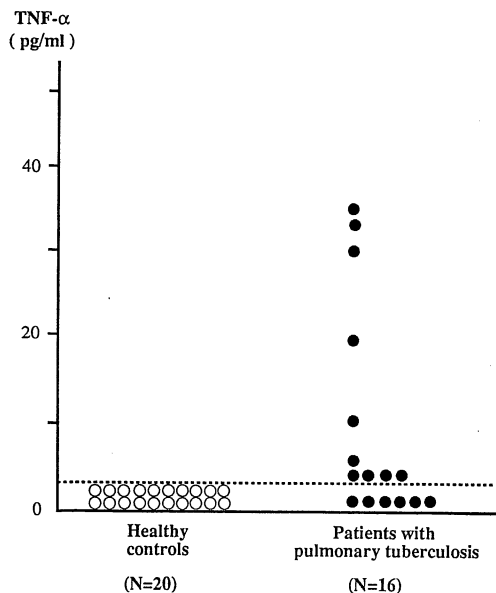


Fig. 2. Comparison of serum levels of TNF- α in patients with pulmonary tuberculosis and healthy controls.

かった。

3. 胸部X線所見との比較

1) 空洞の有無との関連

単純・断層胸部X線で空洞の有無を検討し、患者群を空洞形成群（9例）と空洞非形成群（7例）に分け、両群の血清IL-8濃度と血清TNF-α濃度とを比較した。

血清IL-8濃度は、空洞形成群は40.0±28.4 pg/ml、空洞非形成群では13.0±13.8 pg/mlと、空洞形成群で有意に高値を示した（P<0.05）（Fig. 3）。

血清TNF-α濃度は、空洞形成群は5.6±10.5 pg/ml、空洞非形成群では15.1±15.2 pg/mlと両群において有意差はみられなかった。

2) 病変の広がりとの関連

患者群を日本結核病学会分類に従い、肺病巣の広がりから広がり1（5例）、広がり2（10例）、広がり3（1例）に分類した。広がり2と3を広範囲群（11例）とし、広がり1の小範囲群との間で血清IL-8濃度、TNF-α濃度を比較した。

血清IL-8濃度は広範囲群は30.9±29.8 pg/ml、小範囲群では22.4±18.1 pg/mlで、また血清TNF-α濃度は、広範囲群は13.1±14.4 pg/ml、小範囲群では1.6±

3.2 pg/mlと、IL-8、TNF-αとも広範囲群で高値であったが、有意差はみられなかった。

患者群の空洞形成群で同様の検討を行ったところ、血清IL-8濃度は広範囲群は62.0±23.2 pg/ml、小範囲群では22.4±18.1 pg/mlと、広範囲群で有意に高値であった（P<0.05）（Fig. 4）。

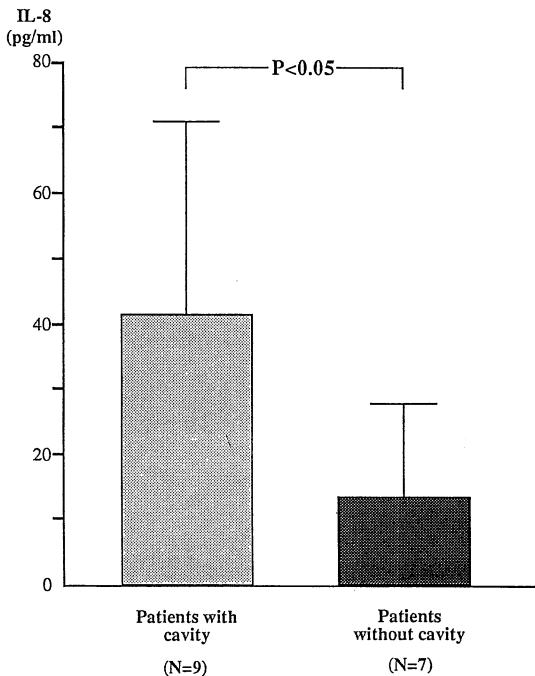


Fig. 3. Comparison of serum IL-8 levels in patients with pulmonary tuberculosis with cavity and without cavity.

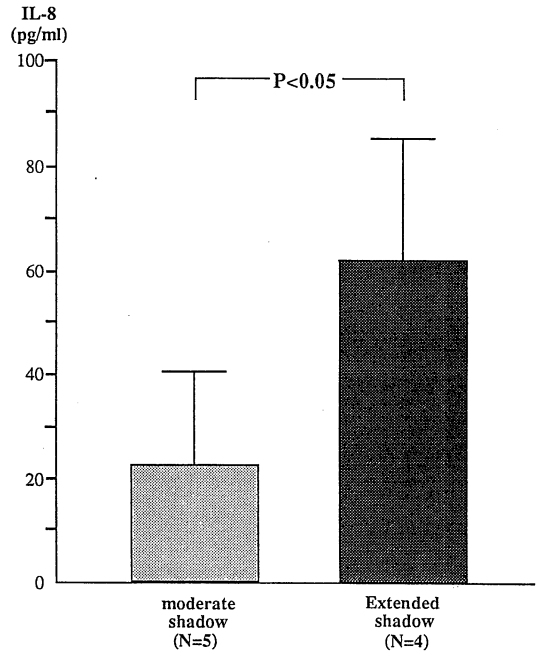


Fig. 4. Serum IL-8 levels in patients with cavity. Comparison of IL-8 level in patient with moderate shadows and those with extended shadows defined by chest X-ray.

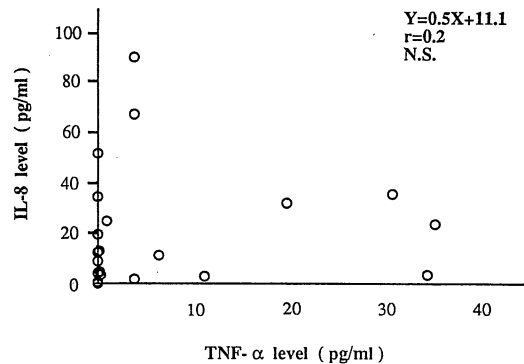


Fig. 5. Correlation between serum IL-8 levels and TNF-α levels in patients with pulmonary tuberculosis.

血清 TNF- α 濃度は、広範囲群は 9.9 ± 13.4 pg/ml, 小範囲群では 10.3 ± 14.5 pg/ml と、有意差はみられなかった。

4. IL-8 濃度と TNF- α 濃度との関連

患者群の血清 IL-8 濃度と血清 TNF- α 濃度との相関を検討したが、両者間に有意な相関はみられなかった (Fig. 5)。

考 案

近年、マクロファージの結核菌殺菌作用における種々のサイトカインの関与が注目されている^{14,15,16}。Flesch ら¹⁴)は *in vitro* でのマウス骨髄由来マクロファージの *Mycobacterium bovis* 貧食実験で、TNF が少量で IFN- γ の殺菌能賦活活性を著明に増強すること、Yoneda ら¹⁵)はヒト単球の結核菌細胞内殺菌実験で、TNF- α 、interleukin-2 (以下、IL-2)、granulocyte-macrophage colony stimulating factor (以下、GM-CSF) がヒト単球細胞内殺菌能を増強することを指摘している。Roach ら¹⁷)は結核菌細胞壁主要成分の lipoarabinomannan (以下、LAM) で単球を刺激し、非病原株由来の LAM は単球の TNF- α 産生能を誘導するが病原株由来の LAM は TNF- α を誘導しないと報告しており、抗酸菌感染症でのサイトカインの関与が明らかにされつつある。

IL-8 は interleukin-1 (以下、IL-1)、TNF、lypopolysaccharide (以下、LPS) などの刺激で単球やマクロファージ^{18,19}、線維芽細胞¹⁹、血管内皮細胞^{1,21}、肝細胞¹⁹などで産生され、好中球走化活性、好中球細胞内酵素放出、好中球スーパーオキシド産生誘導など、好中球に対する作用を中心とした急性炎症に深く関与するサイトカインである。近年、好中球機能活性化のみならず、Tリンパ球にも走化活性を示すことが指摘されている^{4,5}。また肺線維症、サルコイドーシスの気管支肺胞洗浄液⁷中に高濃度に認められ、慢性関節リウマチの関節液²²、羊絨毛膜炎の胎盤血¹⁰の IL-8 濃度と病勢との相関も指摘されている。末梢血での検討では急性肺炎⁶、成人呼吸促迫症候群 (以下、adult respiratory distress syndrome: ARDS)、重症肺炎²³などで血中濃度が高いと報告されている。

本検討の肺結核患者の血清中 IL-8 濃度は ARDS^{23,24} 急性肺炎⁶、重症肺炎²³などの急性炎症性疾患患者の血中濃度より低値だが、これらの報告に記載された健常者の血中濃度より高値であった。Antong ら⁸)は各種疾患胸水中 IL-8 濃度を検討し、膿胸、肺炎に伴う胸水および悪性胸水より低値ではあるが結核性胸水は、漏出性胸水より高濃度の IL-8 が認められると報告している。これらの

所見は結核症の生体防御に好中球を中心とする非特異的炎症細胞も関与している可能性を示すものと考えられる。

今回著者が検索し得た範囲では血中 IL-8 濃度と結核感染症との関連の臨床的検討報告はみられなかったが、Friedland ら¹¹)はヒト単球の cell line に、結核菌 (H 37 Rv, H 37 Ra)、LPS、zymosan を貧食させ、それぞれの培養上清中の TNF と IL-8 濃度とを検討し、結核菌貧食時の TNF 濃度は LPS、zymosan 貧食時の濃度と差はみられないが、IL-8 濃度は LPS、zymosan 貧食時と比べ、著増することを指摘している。また抗 TNF 抗体で上清中 TNF 活性を中和しても、IL-8 は培養上清中に高濃度に出現することを指摘し、結核感染で TNF の刺激を介さず直接 IL-8 が産生される可能性を報告している。今回の検討は血清サイトカイン濃度の検討で、血清サイトカイン濃度が結核病巣局所のサイトカイン濃度を反映しているか否かは検討の余地はあるが、Chollet ら²⁵)は重症肺炎患者気管支肺胞洗浄液と血清中との IL-8 濃度を検討し、重症肺炎患者の血清 IL-8 濃度は、気管支肺胞洗浄液 IL-8 濃度より低値だが、健常者と比べ著明な高値を示したと報告している。この成績は血清 IL-8 濃度は、炎症局所の IL-8 濃度がある程度反映することを支持すると考えられ、本検討で得られた知見は血清 TNF- α と比べて IL-8 濃度は結核病巣の存在とその大きさをよく反映している可能性を示すと考えられる。また TNF- α とは独立して、IL-8 が結核患者の病巣形成に関与しているという Friedland ら¹¹)の成績を反映している可能性も否定できない。

本検討のもう一つの新知見は、胸部 X 線空洞形成例では空洞非形成例と比べて血清 IL-8 濃度が有意に高値であった点である。結核空洞は乾酪巣内にマクロファージやリンパ球とともに好中球の浸潤が著明に見られる場合、あるいは何らかの誘因で乾酪化した病巣内で好中球が持つ蛋白融解酵素が阻害物質量を上回って多量に放出された場合、乾酪壊死巣の蛋白分解、軟化および融解が始まり、軟化した壊死物質は誘導気管支を介して排除され、物質欠損部として生じるとされている²⁵。この様に空洞形成部では好中球の浸潤が著明であると考えられ、空洞形成例でみられた血清 IL-8 濃度の高値は、空洞形成部局所での IL-8 濃度の上昇反映する可能性が推測される。

結 語

- 1) 活動性結核患者と健常成人との血清 IL-8 濃度、血清 TNF- α 濃度を測定した。患者群では IL-8 濃度は著明な高値を示し ($P < 0.0001$)、TNF- α 濃度も

比較的高値を示した。

- 2) 患者群で臨床所見, 特に画像所見と血清 IL-8 濃度, 血清 TNF- α 濃度とをそれぞれ比較した。
- a) 血清 IL-8 濃度: 空洞形成群は空洞非形成群に比べ, また空洞形成群で広範囲病巣群は小範囲病巣群に比べそれぞれ有意に高値を示した ($P < 0.05$, $P < 0.05$).
- b) 血清 TNF- α 濃度: 空洞形成群と空洞非形成群, 広範囲病巣群と小範囲病巣群とのいずれの間にも有意差は認められなかった。

今回の検討で血清 IL-8 濃度が血清 TNF- α 濃度とともに高値を示した知見は, 肺結核症の病巣形成, 特に空洞の成立に IL-8 が関与している可能性を示唆していると考える新しい知見をえた。

なお, 本論文の要旨の一部は第 69 回日本結核病学会総会 (1994 年 4 月長崎), 1995 年度アメリカ胸部疾患学会 (1995 年 5 月シアトル) で発表した。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 御指導, 御校閲を賜りました奈良県立医科大学第二内科学教室成田亘啓教授に深甚なる謝意を捧げるとともに御校閲, 御助言を賜りました奈良県立医科大学細菌学教室喜多英二教授, 奈良県立医科大学第三内科福井博教授に深謝申し上げます。さらに研究の遂行について終始御指導を頂いた米田尚弘博士に深謝致します。

また日々御協力頂いた奈良県立医科大学第二内科教室諸兄姉に深謝致します。

文 献

- 1) Baggiolini, M., Walz, A. and Kunkel S.L. : *J. Clin. Invest.* 84 : 1045-1049, 1989.
- 2) 堀口兵剛, 松島綱治: インターロイキン 8—その性状と疾患との関連—「別冊・医学のあゆみ, サイトカイン—基礎から臨床応用まで」第 1 版, 今西二郎, 淀井淳司編集, 医歯薬出版, 東京, 40-42, 1992.
- 3) 松島綱治, 石川雄治: 感染・炎症・免疫 24 : 9-17, 1994.
- 4) Larsen, C. G., Anderson, A. O., Appella, E., Oppenheim, J. J. and Matsushima, K. : *Science* 243 : 1464-1466, 1989.
- 5) Wilkinson, P. C. and Newman, I. : *J. Immunol.* 149 : 2689-2694, 1992.
- 6) Gross, V., Andresen, R., Leser, H. G., Ceska, M., Liehl, E., Lausen, M., Farthmann, E. H. and Scholmerich, J. : *Eur. J. Clin. Invest.* 22 : 200-203, 1992.
- 7) Car B. D., Meloni, F., Luisetti, M., Semenzato, G., Gialdroni-Grassi G. and Walz, A. : *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 149 : 655-659, 1994.
- 8) Antong, V. B., Godbey, S. W. and Kunkel, S. L. : *J. Immunol.* 151 : 7216-7233, 1993.
- 9) Cohen, A. B., MacArthur, J., Idell, S., Maunder, R., Martin, T., Dinarello, C. A., Griffith, D. and McLarty, J. : *Am. Rev. Respir. Dis.* 137 : 1151-1158, 1988.
- 10) Shimoya, K., Matsuzaki, N., Taniguchi, T., Jo, T., Saji, F., Kitajima, H., Fujimura, M., Nakayama, M. and Tanizawa, O. : *J. Infect. Dis.* 165 : 957-960, 1992.
- 11) Friedland, J. S. and Remick, D. G. : *Eur. J. Immunol.* 22 : 1373-1378, 1992.
- 12) Kindler, V., Sappino, A. P. and Grau, G. E. : *Cell.* 56 : 731-740, 1989.
- 13) Denis, M. : *Clin. Exp. Immunol.* 84 : 200-206, 1991.
- 14) Flesch, I. E. A. and Kaufmann, S. H. E. : *Infect. Immun.* 58 : 2675-2677, 1990.
- 15) Flesch, I. E. A. and Kaufmann, S. H. E. : *Infect. Immun.* 58 : 269-271, 1990.
- 16) Yoneda, T., Tossii, Z., Ellner, J. J., Yoshikawa, M., Tomoda, K., Tsukaguchi, K., Tokuyama, T., Fu, A., Fukuoka, A., Nakaya, M. and Narita, N. : *Am. J. Resp. Crit. Care, Med.* 149 : A 873, 1994.
- 17) Roach, T. I. A., Barton, C. H., Chatterjee, D. and Blackwell, J. M. : *J. Immunol.* 150 : 1886-1896, 1993.
- 18) Peveri, P., Walz, A., Dewald, B. and Baggiolini, M. : *J. Exp. Med.* 167 : 1547-1559, 1988.
- 19) Yoshimura, T., Matsushima, K., Oppenheim, J. J. and Leonard E. J. : *J. Immunol.* 139 : 788-793, 1987.
- 20) Strieter, R. M., Phan, S. H., Showell, H. J., Remick, D. G., Lynch, J. P., Genord, M., Reiford, C., Eskandari, M., Marks, R. M. and Kunkel, S. L. : *J. Biol. Chem.* 264 : 10621-10626, 1989.
- 21) Strieter, R. M., Kunkel, S. L. and Showell H. J. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 156 : 1340-

- 1345, 1988.
- 22) Peichl, P., Ceska, M., Effenberger, F., Haberhauer, G., Broell, H. and Lindley, I. J. D. : Scand. J. Immunol. **34** : 333-339, 1991.
- 23) Chollet-Martin, S., Montravers, P., Gibert, C., Elbim, C., Desmonts, J. M., Fagon, J. Y. and Gougerot-Pocidal, M. A. : Infect. Immun. **61** : 4553-4559, 1993.
- 24) Miller, E. J., Cohen, A. B., Nagao, S., Griffith, D., Maunder, R. J., Martin, T. R., Weiner-Kronish, J. P., Sticherling, M., Christophers, E. and Matthay, M. A. : Am. Rev. Respir. Dis. **146** : 427-432, 1992.
- 25) 岩井和郎 : 結核の病理. 「結核」, 第2版, 久世文幸, 泉孝英編集, 医学書院, 東京, 27-33, 1992.