

原 著

## 糖尿病合併肺結核患者の末梢血白血球による BCG 食菌作用

原 敏 彦・岩 沢 要・新 海 明 彦

国立療養所中野病院

三 浦 馨

国立予防衛生研究所

受付 昭和 54 年 9 月 20 日

## Phagocytosis of BCG by Peripheral Blood Leucocytes of Tuberculous Patients Complicated with Diabetes Mellitus

Toshihiko HARA\*, Kaname IWASAWA, Akihiko SHINKAI  
and Kaoru MIURA

(Received for publication September 20, 1979)

The leucocyte phagocytosis of <sup>3</sup>H-BCG was determined *in vitro* using peripheral blood taken from patients of pulmonary tuberculosis both with and without complication of diabetes mellitus, and the results were analyzed in relation to humoral factors. The following results were obtained: 1) Hyperglycemia (glucose > 250 mg/dl) did not affect the phagocytic activity, but stimulated exocytosis of bacteria which took place immediately after the phagocytosis. 2) High serum concentration of free fatty acids (> 0.25 mM) reduced the phagocytic activity. 3) Anti-mycobacterial antibody, essential for opsonization of BCG bacilli, was found sufficiently in all diabetic patients.

In addition to the above clinical study, diabetic humoral abnormalities were reconstituted using normal blood, and a similar experiment was carried out. This gave the following findings: 1) High glucose concentration (500 mg/dl) stimulated exocytosis of bacilli, which was accompanied with leucocyte damage. 2) Saturated fatty acids (1mM) inhibited phagocytosis. 3) Ketone bodies and acidosis did not influence the phagocytic function. 4) Insulin had no direct effect on the phagocytosis.

The above observations seem to indicate that the humoral immunity is intact in diabetics but the serum abnormalities inherent to diabetes such as high blood glucose and high free fatty acids may interfere with the normal function of phagocytes which appears to be important in the effective defense against tuberculosis.

## 緒 言

近年生活様式の都会化および寿命の延長に伴い糖尿病の発生頻度は逐年増加しており、これに相応して肺結核の糖尿病合併頻度も増加しつつある<sup>1)</sup>。インスリン療法導入以前の糖尿病患者の主たる死因は感染症、なかんずく肺結核であったが、今日では抗結核剤治療法の進歩とあいまつて、糖尿病合併肺結核の予後は著しく改善され

ている<sup>2)</sup>。しかし糖尿病合併の早期発見と適切なコントロールが肺結核の早期治癒・難治化防止のために重要であることには依然変わりがなく<sup>3)</sup>。

糖尿病による易感染性の原因には多数の因子が考えられているが<sup>4)</sup>、不明のことが多い。1964年に Bybee と Rogers<sup>5)</sup> は糖尿病ケトアシドーシスでブドウ球菌に対する白血球食菌力が低下していることを報告し、続いて Bagdade ら<sup>6)</sup> は肺炎球菌を用いてケトアシドーシスを伴

\* From the National Nakano Chest Hospital, 3-14-20, Egota, Nakano-ku, Tokyo 165 Japan.

わなない高血糖状態での食菌力の低下、ならびにインスリン療法による食菌力の回復を観察した。更に彼らは糖尿病患者白血球が希釈血清中で食菌力を回復すること、ならびに正常多核白血球の食菌力が糖尿病患者血清またはブドウ糖添加正常血清中で低下することをも見出した。最近彼ら<sup>7)</sup>はブドウ球菌を用いた実験で、食菌後の殺菌作用も糖尿病患者で低下しており、糖尿病コントロールにより回復したと報告している。

結核病巣に現れる食細胞は主としてマクロファージであり、かつこれは細胞性免疫の脈絡の中で考えられることが一般的であるが、著者らは糖尿病合併肺結核症に関する免疫学的アプローチを企図し、その研究の第一歩として、糖尿病合併肺結核患者の末梢白血球の BCG に対する食菌の様態を調べ、それと種々の糖尿病性体液因子との関連を検討したので報告する。

## 方 法

<sup>3</sup>H-BCG の調製：基本的には Kunze ら<sup>8)</sup>の方法に従い、Dubos-Tween・アルブミン液体培地 60 ml に培養した BCG 菌液に <sup>3</sup>H-ウラシル (New England Nuclear) 3 mCi, 0.12  $\mu$  モルを添加し、更に 7 日間振盪培養して菌を <sup>3</sup>H で標識した。菌は染色鏡検で単孤菌のみとなるまで遠心濾過を繰り返し、比放射能 30  $\mu$ Ci/10<sup>6</sup> 個菌程度としたものを用いた。菌数は、菌液と血液 (EDTA+窒化ナトリウムを加えて 30 分間放置したもの) を混合したのち塗抹染色鏡検し、血小板算定と同じ要領で白血球数との比から求めた。菌標品は 0.05% Tween+0.25% ヒト血清アルブミン (HSA; Worthington Biochemicals) に浮遊し、分注凍結保存し、使用の都度遠心により菌沈渣を得た。

白血球食菌反応の測定：ヘパリン加末梢血 0.5 ml をブドウ糖加 (100 mg/dl) 生理食塩水 (4°C) で 2 回洗浄した血球と、血清 (採血後直ちに分離、脱フィブリンした) 0.5 ml に浮遊した菌液 (20~30 分, 4°C で opsonize した) を混合し、37° に加温振盪することにより食菌反応を行なわせた。反応停止は、4°C の 5% ウシ血清アルブミン+0.8% 食塩+0.1% 窒化ナトリウム (1.2 ml) に反応液 0.1 ml (場合によっては 0.2 ml) を注入することによつて行なつた。そして反応停止後の混液を 1,000 rpm  $\times$  3 分遠心した上清 1 ml の放射能から細胞外遊離菌数を求め、反応開始前のこの値 (全菌数) との比を残留率とした。放射能測定は液体シンチレーションカウンターで行なつた。なお実際に各症例で食菌反応を測定するときには、血液 0.5 ml 当りの白血球につき白血球数と菌数の比が 10 および 1 になるように菌を加え、10, 20 および 30 分後の残留率を測定した。また血球を浮遊する液として、1 つは自己血清、他の 1 つは自己血清を 5% HSA 加 Hanks 液で 5 倍希釈したもの、各 0.5 ml を用

いた。したがつて 1 人の被検者について、(I) 白血球と菌の比が 10 で 100% 血清に浮遊させたもの、(II) 白血球と菌の比が 10 で 20% 血清に浮かべたもの、(III) 白血球と菌の比が 1 で 100% 血清に浮かべたもの、(IV) 白血球と菌の比が 1 で 20% 血清に浮かべたもの、の 4 つの組み合わせで測定を行なつたわけである。末梢白血球数はすべて 5,000/mm<sup>3</sup> と仮定した。なお Hanks 液 (pH 7.4) にはブドウ糖 100 mg/dl が含まれている。

被検者：治療中野病院入院中の中等度に進行した活動性肺結核患者によつた。結核に対してはすべて化学療法 (必ず RFP+INH を含む) が行なわれており、検査時までの化学療法継続期間は 3 カ月未満であつた。糖尿病を合併した肺結核患者の場合には、検査時すでに同上の化学療法が開始されており (1 カ月未満)、かつ糖尿病に対してはインスリン注射療法の未だ行なわれていない症例を用いた。年齢は糖尿病の好発年齢が 40 歳以上であることに鑑み 40~65 歳の症例に限り、糖尿病合併および非合併で年齢および性別の分布ができるだけ一致するような非合併群の症例を選んだ。静脈血採血は午前 10.30~11.00 の昼食前空腹時 (朝食 7.00) に行なつた。

血清中ブドウ糖、遊離脂肪酸の測定：ブドウ糖はグルコース・オキシダーゼ法により測定した。遊離脂肪酸は、銅錯塩の形で抽出したのち、その銅を 2-(2-チアゾリルアゾ)-p-クレゾール (栄研) 錯塩として発色定量した。吸光係数は脂肪酸の種類によらず一定であつた。

血清中結核抗体の測定：Middlebrook-Dubos のヒツジ赤血球凝集および溶血反応<sup>9)</sup>によつた。ヒツジ赤血球被覆には予製旧ツベルクリン液 (Lot No.14) を用いた。それぞれの反応の陽性を示す最大血清希釈倍数をもつて抗体価を表示した。被検血清は測定時まで (1 カ月以内) 凍結保存した。

さまざまな糖尿病性血清因子の健康者白血球食菌反応に及ぼす影響：糖尿病において現れる各種血清成分の量的異常が健康者白血球食菌反応に及ぼす影響の再構成血液による試験は、すべて 2 人のツ反陽性健康者の血液 (それらの Middlebrook-Dubos 反応は凝集価  $\times 5$  および  $\times 5$ , 溶血価  $\times 5$  および  $\times 10$  であつた) で行なつた。

食菌に対する高血糖の影響：0.5 ml 血液由来の血球を洗い、それをブドウ糖を加えて糖濃度 100, 300, 500 mg/dl とした血清 0.5 ml に浮遊して 10 分間 37° で振盪し、次いでこれを氷冷した。一方 <sup>3</sup>H-BCG を上記糖濃度の血清 0.5 ml に浮遊し、両液を混合して食菌を開始させた。

食菌に対する高濃度遊離脂肪酸の影響：0.5 ml 血液由来の血球を洗い、これを 0.5 ml の人工血清 (5% HSA-Hanks 液：血清=4:1, 更にこれに脂肪酸を 1 mM になるように添加したもの) に浮遊し、10 分間 37° で振盪したのち冷却。これと <sup>3</sup>H-BCG を浮遊した人工血清

0.5 ml を混合して食菌を開始させた。脂肪酸を溶かすために少量のアルコールを用いたので、対照にも同量のアルコールを加えた。

食菌に対する高濃度ケトン体の影響：方法は遊離脂肪酸の場合と同じ。反応液の pH は 7.4 に合わせた。

食菌に対するアソドシスの影響：ツ反陽性健康者血清で opsonize したのち洗浄した菌を用い、種々の pH (37°における) の 5% HSA-Hanks 液の中で食菌を行なわせた。

食菌に対するインスリン欠乏の影響：原理的には DeMeys ら<sup>10)</sup>の方法に従い、以下の方法で血球からインスリンを除去した。空腹時に採取した血液 0.5 ml の血球を洗い、これをブドウ糖加酸性緩衝液 (ブドウ糖 100 mg/dl, 0.15 M クエン酸-リン酸-ナトリウム, pH 6.5) 50 ml に希釈浮遊し、37°30分振盪してから遠心により血球を回収した後、この処置をもう一度繰り返した。この血球をブドウ糖 (100 mg/dl) 加 0.01 M リン酸ナトリウム-生食, pH 7.4 で 2 回洗い、最後に 5% HSA-Hanks 液 0.5 ml に浮遊した。DeMeys ら<sup>10)</sup>の方法により <sup>125</sup>I-インスリンを用いて確かめたところ、以上の処理により生理的に白血球に付着していたインスリンの95%が除去されたと判定された。インスリンの欠乏した系での食菌は、こうして作製した血球浮遊液に opsonize した <sup>3</sup>H-BCG を含む 5% HSA-Hanks 液 0.5 ml を混合することによって行なつた。この系に対するインスリン再添加の影響をみるためには、レギュラーインスリン (ノボ) を終濃度 400 μU/ml になるように反応液に加えた。この際血球液はインスリン添加後10分間 37°で振盪してから菌液と混合したので、対照となるインスリン無添加の系にも同じく振盪操作を加えた。

白血球のトリパンブルー染色：人工的に高血糖とした再構成血液を前述の方法で作し、白血球数：菌数=1：1の比で BCG を加え、30分間加温したのち反応液を氷冷した。このうちから 0.1 ml をとり、4℃で 50 μl の 2% トリパンブルー水溶液と混合<sup>11)</sup>したのち 5分間放置。続いてこれを 2 ml の生理食塩水で希釈して血算板に注入、鏡検し、青染した白血球を算定した。血液が氷冷されているかぎり 1時間内には青染される白血球数に目立つた変化はなかつた。この方法によれば赤血球および新鮮白血球は染まらず、EDTA を加えて4時間室温に放置した血液の白血球はすべて青く染まつた。青染した白血球に対する全白血球の数は Türk 液で染色して求めた。

結 果

A

健康者末梢血白血球の食菌反応：ツ反陽性健康者 (Middlebrook-Dubos 凝集・溶血価, それぞれ × 5) における食菌反応の典型的な時間経過は図1のようであつ

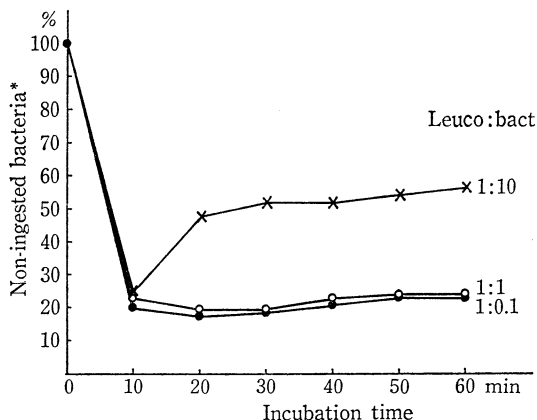


Fig. 1. Time Course of BCG phagocytosis by leucocytes from normal blood in various leucocytes-to-bacteria ratios.

\* The measured radioactivity of the 100% value was 4285 (●), 43697 (○) and 432, 246 (×) per 10 min, respectively.

Table 1. Microscopic Observation of the Phagocytic Ability of Polymorphnuclear (PMN) and Mononuclear Phagocytes from Normal Blood, after 10 min Incubation with an Equal Number of BCG to the Total Number of Leucocytes.

Number of phagocytosed BCG per phagocyte	BCG-containing PMN (% total PMNs)	BCG-containing monocyte (% total monocytes)
0	68.0	84.0
1~2	15.5	0
3~5	10.0	6.0
6~10	4.0	6.0
11~15	2.0	4.0
16~20	0.5	0
Average number of BCG per phagocyte	1.30	1.24

た。またこの図において菌数が白血球数の10倍であるときには、白血球に貪食されない菌数の上昇が10分以後に認められたが (ツ反陽性健康者 3 人について調べたところ、すべて同一傾向が認められた)、これは貪食した菌の再放出のためと考えられる。また白血球数：菌数=1：1の反応液の10分後の塗抹標本を Ziehl-Neelsen および Wright 重染色し鏡検すると多核球および単球による BCG 食菌の模様が直接に観察されたが (表 1)、食菌数に関して細胞間に大きなばらつきがあること、更に両細胞種の平均食菌数がほぼ等しいことが認められた。

B

糖尿病合併および非合併結核患者末梢血白血球の食菌反応：入院中の結核患者25例について調べた <sup>3</sup>H-BCG 食

Table 2. Phagocytic Activity in Tuberculous Patients with Reference to Other Clinical Data

Case	Glu	FFA	Phagocytosis				HA	HL	$I_{30}/I_{20}'$
			I	II	III	IV			
1	84	.18	41.0	16.1	30.2	15.6	×5	×320	.87
			28.6	17.2	11.8	13.4			
			24.9	15.6	16.6	11.5			
2	84	.51	36.7	21.1	40.9	20.4	×20	×40	.73
			17.7	14.0	17.9	13.6			
			13.0	10.6	14.8	11.7			
3	94	.08	11.5	8.8	15.8	12.2	×10	×160	.96
			10.5	10.7	13.6	11.9			
			9.5	11.6	11.5	13.2			
4	96	.06	21.5	17.5	17.9	12.6	×20	×80	.47
			23.0	12.8	13.6	14.5			
			10.9	14.6	11.7	14.8			
5	96	.07	22.6	13.6	19.3	10.7	×40	×40	1.30
			10.0	14.1	10.8	14.9			
			13.0	11.6	11.8	11.2			
6	100	.07	21.7	13.5	25.6	16.2	×20	×40	.71
			22.4	15.9	21.3	11.2			
			15.9	12.1	18.7	12.7			
7	108	.08	26.1	10.6	14.1	10.5	×20	×320	.88
			14.8	9.6	12.3	9.9			
			13.0	9.1	14.6	11.0			
8	110	.07	13.1	10.9	18.7	11.2	×10	×640	.86
			13.5	8.5	11.4	11.3			
			11.6	10.2	10.9	10.5			
9	112	.06	11.6	9.6	8.9	7.1	×40	×20	1.02
			9.7	10.0	10.8	7.9			
			9.9	12.1	14.3	9.4			
10	114	.07	10.0	10.7	11.6	10.1	×10	×80	.98
			9.7	10.7	14.0	11.2			
			9.5	10.2	11.4	11.9			
11	133	.00	12.1	8.7	12.7	12.6	×80	×640	.92
			13.7	10.1	14.5	12.8			
			12.6	9.6	13.7	13.2			
12	168	.08	20.3	23.3	22.9	28.2	×20	<×5	.96
			20.4	14.8	16.1	14.4			
			19.6	15.7	17.9	14.5			
13	215 (117)	.08	17.1	13.4	31.4	11.4	×40	×320	.72
			19.2	16.7	13.8	12.9			
			13.9	15.2	14.0	12.9			

Table. 2 (cont'd)

Case	Glu	FFA	Phagocytosis				HA	HL	I <sub>30</sub> '/I <sub>20</sub> '
			I	II	III	IV			
14	276 (279)	.08	23.1	15.4	22.5	23.7	×5	×40	1.27
			12.2	9.9	10.6	12.8			
			15.5	12.2	12.3	13.3			
15	280 (233)	.25	29.9	21.0	13.8	12.8	×40	×160	1.03
			20.6	14.5	12.6	13.6			
			21.2	17.5	14.5	12.5			
16	288 (253)	.18	29.8	19.5	25.6	18.3	×20	×80	1.11
			21.3	19.8	20.6	20.7			
			23.7	27.0	22.2	24.6			
17	323 (292)	.25	33.8	11.4	19.5	12.1	×5	×10	.55
			15.3	8.6	12.9	13.7			
			8.4	10.5	16.8	13.9			
18	332 (232)	.21	9.5	2.5	12.2	8.8	×20	×10	1.00
			11.9	4.7	10.9	11.9			
			11.9	4.8	12.4	14.9			
19	340 (230)	.06	11.4	10.1	9.8	10.3	×20	×20	1.11
			13.2	10.9	11.2	11.5			
			14.7	13.4	13.1	11.7			
20	344 (290)	.09	22.6	19.6	23.8	21.6	×20	×20	1.09
			21.1	20.6	26.0	20.4			
			23.0	23.8	24.2	23.8			
21	360 (219)	.16	15.6	9.8	15.2	15.1	×20	×160	1.15
			11.6	15.0	17.3	15.4			
			13.3	18.7	29.5	15.7			
22	368 (299)	.26	35.1	13.2	39.2	23.7	<×5	×20	1.06
			16.4	12.1	13.1	12.1			
			17.4	15.8	14.3	18.8			
23	392 (333)	.84	26.6	17.2	30.3	21.5	×40	×20	.89
			17.4	9.9	18.4	10.4			
			15.4	10.3	17.5	11.0			
24	416 (232)	.13	11.7	11.0	10.1	9.0	×10	×20	1.03
			12.2	12.4	11.3	11.6			
			12.6	12.9	13.1	13.3			
25	448 (288)	.09	14.8	10.7	14.3	9.8	×20	×320	1.31
			13.7	14.8	14.7	11.9			
			17.9	12.1	15.7	12.6			

Glu, serum glucose (mg/dl), the values in parentheses indicate fasting serum glucose; FFA, serum free fatty acids (mM); HA and HL, Middlebrook-Dubos hemagglutination and hemolysis tests, respectively.

Phagocytosis denotes, from the top to downward in each column, the rates of non-ingested extracellular bacteria (%) at 10, 20 and 30 minutes of incubation. I and II, leucocytes : bacteria = 1 : 0.1; III and IV, leucocytes : bacteria = 1 : 1; I and III, with 100% serum; II and IV, with 20% diluted serum. I<sub>30</sub>'/I<sub>20</sub>', ratio of extracellular bacteria at 30 min/extracellular bacteria at 20 min determined by the experimental condition I. The radioactivity of the 100% value was around 4.5×10<sup>3</sup> (I and II) and 4.5×10<sup>4</sup> (III and IV) counts per 10 min, respectively.

菌作用、および同時に調べた血糖値と血清遊離脂肪酸値(FFA)、そして Middlebrook-Dubos 反応によつて測つた抗結核菌抗体価を、測定時血糖値の低かつた症例から順に表2に示した。カッコ内の血糖値は早朝空腹時血糖値である。食菌の測定条件 I, II, III, IV は「方法」に述べたように菌数および血清希釈の違いによる4種の組み合わせを示している。食菌反応の各測定値は食菌をまぬがれた菌の総菌数に対する率(残菌率, %)を意味し、上段から10分, 20分, 30分値である。 $I_{30}'/I_{20}'$  は測定条件 I における残菌率の30分値と20分値の比である。

食菌反応に及ぼす菌数の影響: 菌数を白血球数に比して  $1/10(I)$  および  $1(III)$  としたときの残菌率の経時変化はほぼ同一傾向を示すことが多かつた。

食菌反応に及ぼす患者血清希釈の影響: 表2の I, III のサンプルは血清濃度が100%であるが, II, IV は血清濃度が20%に希釈されている。この血清希釈の効果は大きかつた。ほとんどすべての症例で, II, IV の希釈血清群における10分値の方が I, III の100%血清群におけるそれよりも低くなつていた(希釈血清中の方が食菌が速かつた)。更に II, IV では、一たん食菌された菌が再び白血球から吐き出される現象(菌再放出)の明確に

見られる例も多かつた。

高血糖と食菌反応: 条件 I によつて測定した残菌率の10分値( $I_{10}'$ )と血糖値との関係を図2に示した。明らかに糖尿病の範疇に入れることのできる血糖値 250 mg/dl 以上の症例は(●)で、それ未満の症例は(○)で表した(以下の各図表でも、血糖値によつて同様に丸を色分けした)。血糖値と食菌速度との間に相関は認められなかつた。

高濃度遊離脂肪酸濃度と食菌反応: 血清中遊離脂肪酸濃度と  $I_{10}'$  の関係を図3に示した。全体として両者間に相関はなかつたが、遊離脂肪酸濃度が 0.25 mM を越える少数例では、必ず  $I_{10}'$  が高かつた(食菌が悪かつた)。

結核抗体価と食菌反応:  $I_{10}'$  と Middlebrook-Dubos 反応による抗体価との関係を、赤血球凝集反応と溶血反応に分けて図示した(図4 A, B)。いずれの反応においても全体として食菌速度との相関はなかつた。

高血糖と食菌後の菌再放出: 食菌反応を2つの相でみて、初期速度(10分値)と後期の菌再放出傾向に分けることができる。図1に示したように菌数が多い場合には反応開始20分後に菌再放出がみられるのであるが、菌数が比較的少ない場合には、20~30分の間にわずかにこれが見られる。ちなみにツ反陽性健康者14人での時間経過

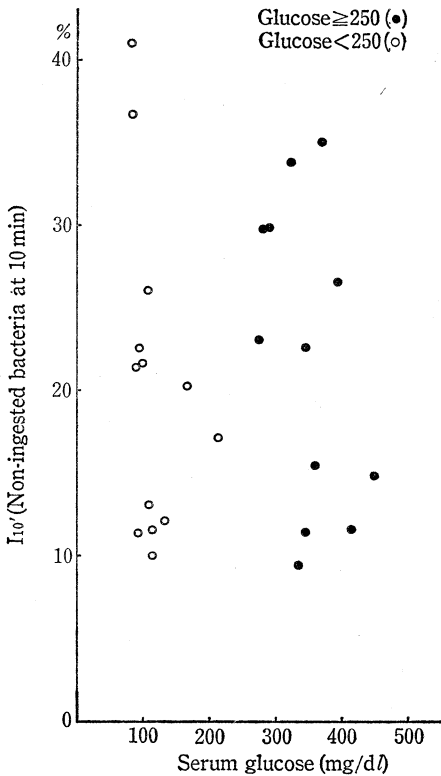


Fig. 2. Relation between  $I_{10}'$  (initial velocity of phagocytosis expressed by non-ingested extracellular bacteria at 10 min under Condition I) and serum glucose.

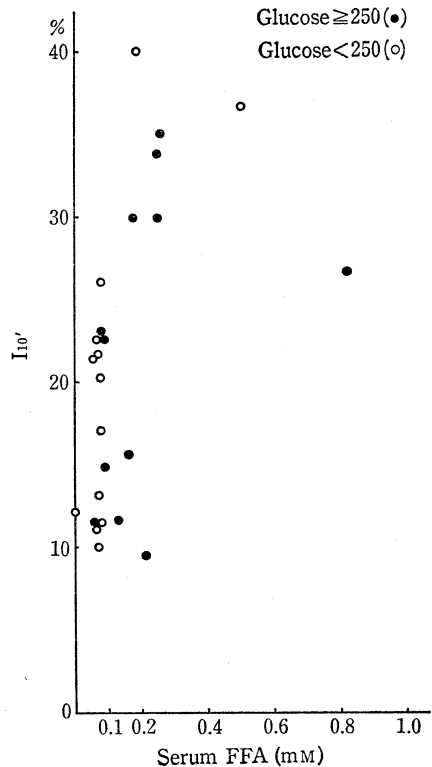


Fig. 3. Relation between  $I_{10}'$  and serum free fatty acids.

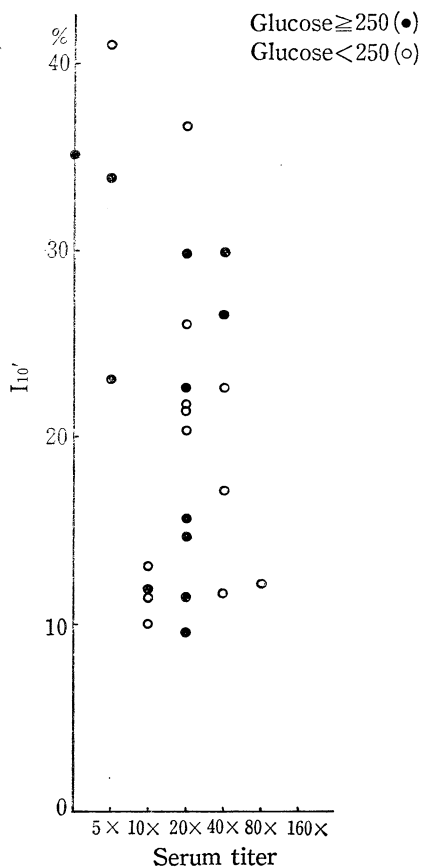


Fig. 4A. Relation between  $I_{10}'$  and Middlebrook-Dubos hemagglutination reaction.

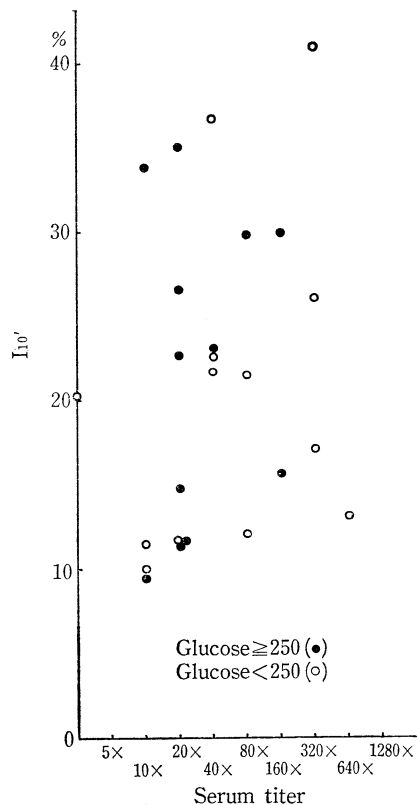


Fig. 4B. Relation between  $I_{10}'$  and Middlebrook-Dubos hemolysis reaction.

は、菌数が白血球数と同数のときには10分値  $23.2 \pm 5.9$  (S.D.)%, 20分値  $20.2 \pm 3.4$ %, 30分値  $21.9 \pm 3.1$ % であり、菌数が白血球数の1/10であるときには、それぞれ  $24.0 \pm 6.4$ ,  $22.3 \pm 2.4$ ,  $23.3 \pm 2.3$ % であつた。このことから、菌数が比較的少ない場合の菌再放出傾向は20~30分間の变化でみるのが適当ではないかと考え、これをIの条件で測定した値 ( $I_{30}'/I_{20}'$ ) で表し、これと血糖値との関係を検討した(図5)。血糖値 250 mg/dl 以上の群の  $I_{30}'/I_{20}'$  (平均値 1.05) は血糖値がそれ未満の群の  $I_{30}'/I_{20}'$  (平均値 0.85) よりも有意に大きく (t-検定,  $p < 0.05$ )、菌再放出傾向が大きかつた。しかし個体差も大きいため、血糖値が増すにつれて  $I_{30}'/I_{20}'$  も漸増するといふほどの関係ではなかつた (相関係数=0.41)。更にIとIIIの結果を総合しても同様の結論を得た。例えば、IであれIIIであれ再放出傾向の現れたものにスコア 0.5、それのないものにスコア 0 を付けて比較すると、血糖値 250 以上の高血糖群ではスコアの平均は 9.5/12、それ未満の群では 4/13 であつて、両者間に有意の差があつた (t-検定,  $p < 0.01$ )。

C

In vitro で糖尿病性要素を付加した血清中における健康者白血球食菌反応：これまでの試験はすべて患者血液から得た血清と血球で行なつたのであるが、糖尿病患者にみられる血清成分の異常を in vitro で人為的に付加した健康者血清で健康者血球について同様の観察を行なつた。

再構成血液の血糖値と食菌作用：血糖値を 100, 300 および 500 mg/dl とした際の食菌の経過を表3に示した。高血糖は初期食菌速度に対しては一貫した影響を与えなかつたが、血糖値が 500 mg/dl になると菌再放出の傾向が明らかとなつた。

再構成血液の遊離脂肪酸と食菌作用：血清中に存在する遊離脂肪酸の主成分4種について個別にその影響を調べたところ(表4)、不飽和脂肪酸(リノール酸, オレイン酸)は食菌に何らの影響を与えないのに、飽和脂肪酸(パルミチン酸, ステアリン酸)は初期食菌速度を低下させることがわかつた。

再構成血液のケトン体と食菌作用：pH 7.4 ではアセト酢酸,  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸, アセトンのいずれのケトン体も食菌作用に影響を与えなかつた(表5)。

再構成血液のpHと食菌作用：初期食菌速度はpH 7.2,

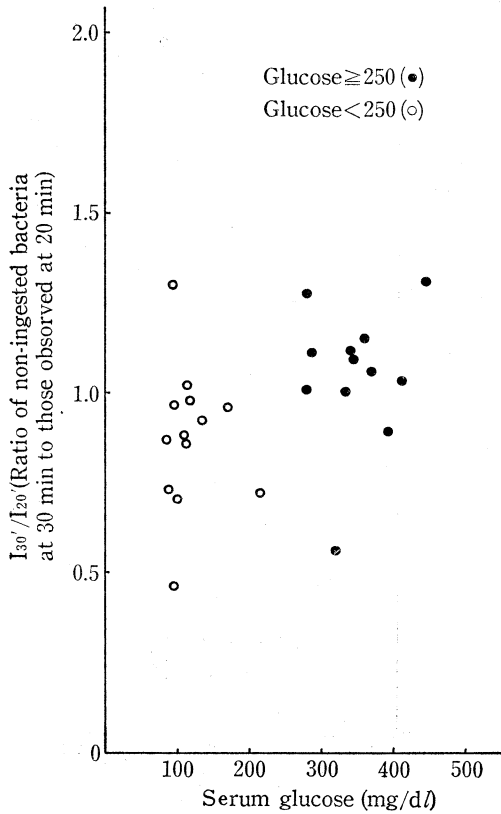


Fig. 5. Relation between  $I_{30}'/I_{20}'$  (bacterial discharge following phagocytosis) and serum glucose.

Table 3. Effect of Glucose Concentration on the Phagocytic Activity in Reconstituted Blood

Glucose (mg/dl)	Leuco: bact	Non-ingested bacteria (%)*		
		10'	20'	30'
100	1 : 0.1	20.8	18.4	21.7
	1 : 1	18.8	24.5	23.2
300	1 : 0.1	18.6	19.4	21.1
	1 : 1	19.0	25.2	24.3
500	1 : 0.1	24.4	20.5	26.5
	1 : 1	21.8	26.0	29.3

\* The measured count of the 100% value was around  $6.0 \times 10^4$  (1 : 0.1) or  $6.0 \times 10^5$  (1 : 1).

7.4 ではほとんど変わらず, pH 7.0, 6.8 でむしろ高まった。また pH の酸性側への偏りは菌の再放出に関して特に異常をもたらさなかつた (表6)。

再構成血液におけるインスリンと食菌作用: 血球および血清からインスリンを除去した系とこれにインスリンを再添加した系で食菌を比べても, インスリンの効果はみられなかつた (表7)。

再構成血液における高血糖中の食菌による白血球の損

Table 4. Effect of Free Fatty Acids on the Phagocytic Activity in Reconstituted Blood

FFA (1mM)	Leuco: bact	Non-ingested bacteria (%)*		
		10'	20'	30'
None	1 : 0.1	20.1	18.9	19.5
	1 : 1	23.2	21.9	21.1
Linoleic acid	1 : 0.1	23.7	21.7	24.2
	1 : 1	18.8	21.7	21.6
Oleic acid	1 : 0.1	24.2	17.9	18.7
	1 : 1	18.6	20.7	24.8
Palmitic acid	1 : 0.1	20.3	22.4	22.0
	1 : 1	31.4	31.6	22.8
Stearic acid	1 : 0.1	33.2	24.6	22.9
	1 : 1	35.1	32.8	28.0

\* The measured count of the 100% value was around  $6.0 \times 10^4$  (1 : 0.1) or  $6.0 \times 10^5$  (1 : 1).

Table 5. Effect of Ketone Bodies on the Phagocytic Activity in Reconstituted Blood

Ketone body (1mM)	Leuco: bact	Non-ingested bacteria (%)*		
		10'	20'	30'
None	1 : 0.1	20.2	24.7	29.0
	1 : 1	24.4	32.9	33.4
Acetoacetate	1 : 0.1	21.6	27.5	28.9
	1 : 1	24.5	31.8	34.5
$\beta$ -Hydroxybutyrate	1 : 0.1	22.7	27.4	29.9
	1 : 1	27.1	30.8	35.5
Acetone	1 : 0.1	22.7	23.3	26.4
	1 : 1	22.2	27.3	33.4

\* The measured count of the 100% value was around  $6.0 \times 10^4$  (1 : 0.1) or  $6.0 \times 10^5$  (1 : 1).

Table 6. Effect of pH on the Phagocytic Activity in Reconstituted Blood

pH	Leuco: bact	Non-ingested bacteria (%)*		
		10'	20'	30'
6.8	1 : 0.1	15.3	14.5	19.1
	1 : 1	22.0	24.3	33.5
7.0	1 : 0.1	16.2	14.4	21.4
	1 : 1	19.0	25.6	25.4
7.2	1 : 0.1	21.8	14.9	21.4
	1 : 1	27.3	24.7	29.2
7.4	1 : 0.1	21.4	16.3	20.2
	1 : 1	28.2	30.2	33.4
7.6	1 : 0.1	18.8	15.1	25.1
	1 : 1	21.5	27.4	37.4

\* The measured count of the 100% value was around  $9.0 \times 10^4$  (1 : 0.1) or  $9.0 \times 10^5$  (1 : 1).



Table 7. Effect of Removal and Addition of Insulin on the Phagocytic Activity in Reconstituted Blood

Insulin	Leuco: bact	Non-ingested bacteria (%) <sup>*</sup>		
		10'	20'	30'
Removed	1:0.1	17.8	17.3	21.8
	1:1	78.7	78.4	83.1
Added (400 $\mu$ U/ml)	1:0.1	18.0	18.3	20.2
	1:1	79.0	75.8	81.4

<sup>\*</sup> The measured count of the 100% value was around  $6.0 \times 10^7$  (1:0.1) or  $6.0 \times 10^4$  (1:1).

Table 8. Effect of Glucose Concentration on the Counts of Damaged Leucocytes after 30 min Incubation of Reconstituted Blood without and with Addition of BCG (Leuco: bact=1:1)

Glucose (mg/dl)	Trypan-blue stained (damaged), %	
	Control	+BCG
100	4.0 $\pm$ 1.8 <sup>*</sup>	12.9 $\pm$ 4.8
300	7.6 $\pm$ 1.2	15.6 $\pm$ 4.5
500	14.6 $\pm$ 5.0	29.7 $\pm$ 7.4

<sup>\*</sup> Mean  $\pm$  S.D. (n=4)

傷：トリパンブルー染色性は細胞の損傷を知る手段として用いられるのであるが<sup>11)</sup>、白血球に対する高血糖の影響、ならびにこれに加うる食菌の影響を、30分間加温後の血液で調べた(表8)。高血糖中に置かれるだけで白血球はトリパンブルー染色性を増したが、ここで同時に食菌を行なわせると染色される白血球数が著明に増加した。このことから、高血糖中での食菌は白血球に強度の損傷を与えるものと考えられた。

### 考 案

Bagdadeら<sup>6)</sup>は、糖尿病患者血清中で患者白血球ならびに健康者白血球の肺炎球菌食菌作用がともに阻害されること、更にその原因が高血糖であるらしいことを示したのであるが、本研究ではBCGを用いて糖尿病性血清因子が食菌に及ぼす影響を調べた。振盪加温下では末梢白血球のBCG食菌は速やかに起こるが、患者血液においてもブドウ糖を添加した健康者血液においても食菌の初速度に関しては高血糖の影響は現れなかつた。ブドウ球菌を用いた場合には食菌反応はほぼ一次反応的に進み、時間の進行とともに菌はほとんど食い尽くされてしまうのであるが<sup>12)</sup>、われわれのBCGを用いた系では食菌は完全には進まず、初期の急速な食菌のあと菌の再放出があつて、やがて一定水準の定常状態に達する。この菌の再放出は、菌数が多いとき(図1)や、ヘパリン(20u/ml)

の存在により、あるいは opsonize した菌を血清の含まれない溶液中で食菌させた場合に顕著になる傾向があつた。そして糖尿病患者血清中で患者白血球を用いた場合(血糖値 250 mg/dl 以上)や、ブドウ糖を添加した健康者血液(血糖値 500 mg/dl)でもこの現象が現れたわけである。結核菌の食細胞からの再放出の現象は古くより知られており、これと菌の virulence との関連が想定されたこともあるが<sup>13)</sup>、一般細菌ではこの現象は普通には顕著に現れず、菌が大過剰に存在するときのみ食細胞が溶解して菌再放出現象が現れ、これが食菌速度のわずかの減少として認められるにすぎない<sup>12)</sup>。一般細菌が食細胞内で容易に死滅するのに対して、BCG菌が死滅しにくいことの反映として、おそらくこの再放出現象が特にBCGで現れたものと考えられ、また表8に示したトリパンブルーを用いた実験結果から、この菌再放出は白血球の破壊に起因する、あるいは随伴しているものと推測される。更に白血球が高血糖中で食菌を行なうと、この細胞破壊が増大することも示されたのであるが、このことは糖尿病合併肺結核の病態の特徴を幾分なりとも説明するかも知れない。なぜなら、結核肉芽腫が一たん成立した後は、病巣の乾酪化・融解・空洞形成の主要要因は食細胞の壊死であり<sup>14)</sup>、糖尿病がこれら一連の病変をひき起こしやすいことが古くより認められている<sup>15)2)</sup>からである。そしてこれに加えて Mowat と Baum<sup>16)</sup>が見出した糖尿病患者における白血球 chemotaxis の低下、および Mahmoud ら<sup>17)</sup>が糖尿病動物で例示した肉芽腫形成不全等の事実は、糖尿病による結核防御能の阻害機転を考察するうえで参考になると思われる。なおブドウ糖が食菌速度に関しては影響を与えなかつたのと対照的に、血清遊離脂肪酸の極端に高い少数例では必ず食菌速度が低く、また健康者血液に対しても飽和(動物性)脂肪酸すなわちパルミチン酸、ステアリン酸は1ミリモル濃度で食菌速度を低下させた。この程度の濃度は糖尿病がケトアシドーシスに移行する場合に容易に実現する濃度であつて、コントロール不良の重症糖尿病では問題になると考えられる。ケトン体そのものは食菌に悪影響を及ぼさず、またアシドーシスであること自体は、食菌反応に限つて言えば、何の障害ももたらさなかつた。ケトアシドーシスの状態では血糖および遊離脂肪酸も当然高値であるから、ケトアシドーシスを伴つた糖尿病で食菌が著明に低下する<sup>5)</sup>という現象は、高血糖および高遊離脂肪酸に原因を帰することができるように思われる。

糖尿病の第一病因はインスリンの欠乏であり、しかも多核球、単球ともにそれらの細胞表面にインスリン受容体を持つているから<sup>18)10)</sup>、糖尿病患者における血液中インスリン不足が白血球の食菌反応に何らかの影響を与えることは考えうることである。しかしわれわれの実験では食菌反応に関するインスリンの直接作用は認められた

かつた。

最後に結核菌抗体価と食菌反応との関連について述べる。BCGが食菌されるためには、相手が多核球であれ単球であれあらかじめ菌が opsonize される必要があるが (HSA-Hanks 液の中では opsonize されていない菌はほとんど全く食菌されない)、BCG 食菌に必要な充分な抗体価は、われわれが健康者で調べた結果によれば、Middlebrook-Dubos 反応で凝集価×5、溶血価×5であった。本研究の症例では糖尿病合併、非合併の如何を問わずほとんど必ず抗体価は高値を示しており、またこれの必然的結果であろうが、抗体価と初期食菌速度との間には相関がなかつた。したがって抗体価の低下が原因となつて結核防御機転に障害が生ずるといふ事例は一般にはまれであろうと考えられる。ただし糖尿病患者で結核抗体価が低下する傾向にあるとも報じられているから<sup>19)</sup>、抗体価の問題を全く無視することはできない。なお補体は抗体と共存したときに BCG 食菌を著しく促進するが (未発表)、糖尿病によつては血清中補体量の低下は起こらないとされているので<sup>20)</sup>、補体量の不足が BCG 食菌を制限することは普通にはないことであろうと考えられる。

以上の研究の通り、in vitro の実験系において、糖尿病状態が結核菌と食細胞の相互作用のうえて生体側に不利に働くであろうと推論させるいささかの根拠を得たのであるが、これが糖尿病による感染防御力低下をどこまで説明することになるかは不明であると言わざるをえない。なぜなら結核免疫の最終過程を生体内における菌の死滅ないし減量であると見なすならば<sup>21)</sup>、昔の Hanks ら<sup>22)</sup>の実験以来、この過程を in vitro で実現する方法が未だ見出されていないからである。この方向を目指したもののなかでは、培養マクロファージが感作リンパ球の助けを受けて食菌された結核菌の増殖を阻止することを示した Youmans ら<sup>23)24)</sup>の実験法が目立つのであるが、これとて真に bactericidal な効果とは言えない点で終局の目的を達成していない。したがって in vitro の系で結核免疫に対する糖尿病の影響を明らかにするためには、このような実験系を確立することが今後の課題になると思われる。

## 結 語

<sup>3</sup>H-標識 BCG を用いて糖尿病合併および非合併結核患者の末梢白血球食菌機能を比較し、更に体液因子との関連を検討することにより、糖尿病合併による結核症悪化の原因をさぐろうと試みた。そこで明らかになつたのは次の諸点である。

- 1) 高血糖状態 (>250 mg/dl) では食菌後菌再放出の傾向が大きかつた。
- 2) 血清中遊離脂肪酸が高値 (>0.25 mM) であると

きには食菌速度が低下していた。

3) すべての糖尿病合併結核患者は opsonization のために充分な抗結核菌抗体を保持していた。

更に健康者血液を使つて、人為的に糖尿病性血清因子を付加しその影響を調べたところ、次のことが観察された。

- 1) 高血糖は食菌後の菌再放出を促し、同時にこれは食細胞の損傷をも促した。
- 2) 飽和脂肪酸は食菌を阻害した。
- 3) ケトン体、アシドーシスは食菌に影響を与えなかつた。
- 4) 食菌に関してインスリンの直接作用は認められなかつた。

以上の観察から推量して、糖尿病患者では抗結核体液性免疫は障害されず、糖尿病固有の代謝異常に基づく体液性要因すなわち高血糖、高遊離脂肪酸が、食細胞の働きを損つていであろうと考えられた。細胞性免疫との関係は今後の課題である。

## 文 献

- 1) 楠木繁男：結核，50：605，1975。
- 2) Marble, A., White, P., Bradley, R. F. and Krall, L. P.: Joslin's Diabetes Mellitus, 11th Ed., Lea & Febiger, Philadelphia, p. 628, 1971.
- 3) 弘雍正：結核，48：343，1973。
- 4) Müller-Wieland, K.: Dtsch. Med. Wschr., 85：1650, 1960.
- 5) Bybee, J. D. and Rogers, D. E.: J. Lab. Clin. Med., 64：1, 1964.
- 6) Bagdade, J. D., Root, R. K. and Bulger, R. J.: Diabetes, 23：9, 1974.
- 7) Nolan, C.M., Beaty, H. N. and Bagdade, J. D.: Diabetes, 27：889, 1978.
- 8) Kunze, M., de Isele, T. S. and Vogt, A.: Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 239：87, 1977.
- 9) 三浦馨，橋本達一郎：アレルギー，15：780, 1966.
- 10) DeMeyts, P., Bianco, A. R. and Roth, J.: J. Biol. Chem., 251：1877, 1976.
- 11) Girardi, A. J., McMichael, H., Jr. and Henle, W.: Virology, 2：532, 1956.
- 12) Van Furth, R., van Zwet, T. L. and Leijh, P. C. J.: Handbook of Experimental Immunology, Vol. 2, Cellular Immunology, 3rd Ed., ed. Weir, D.M., Blackwell Scientific Publications, Oxford, p. 32.1, 1978.
- 13) 染谷四郎：病原微生物学細菌編 (福見秀雄 他 編)，医学書院，p. 618, 1959.
- 14) Huebschmann, P.: Die pathogenetischen und pathologisch-anatomischen Grundlagen der menschlichen Tuberkulose, Hippokrates Verlag, Stuttgart, p. 120, 1956.
- 15) Pagel, W., Simmonds, F. A. H. and MacDonald, N.: Pulmonary Tuberculosis, 3rd Ed., Oxford University Press, London, pp. 47, 235, 1953.
- 16) Mowat, A. G. and Baum, J.: N. Engl. J. Med.,

- 284 : 621, 1971.
- 17) Mahmoud, A. A. F., Rodman, H. M., Mandel, M. A. and Warren, K. S.: J. Clin. Invest., 57 : 362, 1976.
- 18) Fussganger, R. D., Kahn, C. R., Roth, J. and DeMeyts, P.: J. Biol. Chem., 251 : 2761, 1976.
- 19) Keleberda, K. Ya., Averbakh, M. M. and Tudos, T. P.: Probl. Tuberk., 53(2) : 35, 1975.
- 20) Marble, A. et al.: *ibid.*, p. 623.
- 21) Armstrong, J. A. and D'Arcy Hart, P.: J. Exp. Med., 142 : 1, 1975.
- 22) Hanks, J. H. and Brockenbrough, E.: Am. Rev. Tuberc. Pulm. Dis., 41 : 605, 1940.
- 23) Patterson, R. J. and Youmans, G. P.: Infect. Immun., 1 : 600, 1970.
- 24) Klun, C. L. and Youmans, G. P.: J. Reticulo-endothel. Soc., 13 : 263, 1973.