

## 原著

当院におけるパンデミックインフルエンザ A (H1N1)  
2009 感染のサイトカインマーカークの検討越 智 史 博<sup>1,2)</sup> 林 正 俊<sup>1)</sup>

**要旨** 2009 年 10 月～2010 年 2 月に当科に入院したパンデミックインフルエンザ A (H1N1) 2009 (H1N1pdm) 患児 39 例で臨床症状に対するサイトカインマーカークの変動について検討した。罹患早期の sIL-2R, 尿中  $\beta$ 2MG はインフルエンザ A 以外の下気道炎例より有意に高値であり, 特に sIL-2R は呼吸障害を有した症例で神経症状を有した症例よりも有意に高値であった ( $p < 0.05$ )。臨床的に高サイトカイン血症が推測される症例では sIL-2R や尿中  $\beta$ 2MG が早期から高値となった症例が多く, 抗サイトカイン療法の適応の有無を決定する有用なマーカークの一つである可能性が示唆された。

## I. 背 景

2009/2010 年に流行したパンデミックインフルエンザ A (H1N1pdm) による呼吸器症状の特徴として, 発熱後短時間で急速に呼吸障害を呈し, 喘息様症状を伴うことが報告されている<sup>1~5)</sup>。また発症早期から意識障害やけいれん, 異常言動・異常行動など神経症状も出現しやすいといわれている<sup>3)</sup>。このような急激な症状進行や重篤化にはインフルエンザ罹患早期のサイトカインストームの関与が示唆され<sup>6~8)</sup>, 血清サイトカインの把握が病勢の把握や治療方針の決定に重要である。しかし, 実際の臨床現場では, 血清サイトカインの直接測定は保険適用外で費用が高いだけでなく, 即時に測定できず結果が出るまでに時間がかかる点, 可溶性レセプターによる調節のため実効的な数値が得られない点, 臨床症状と対応しているか

どうか不明瞭な点といったさまざまな問題から容易な検査ではない。今回, われわれはコマーシャルベースで測定可能なバイオマーカークのうち, 高サイトカイン状態を反映すると考えられている可溶性 interleukin-2 receptor (sIL-2R), フェリチン, 尿中  $\beta$ 2-microglobulin (尿中  $\beta$ 2MG) に焦点を当て検討したので報告する。

## II. 対象と方法

2009 年 10 月 1 日～2010 年 2 月 28 日までに当科に入院した H1N1pdm 患者のうち, sIL-2R, フェリチン, 尿中  $\beta$ 2MG のいずれかを測定した 39 例 (全症例群) を対象とし, 後方視的に検討した。H1N1pdm は鼻腔拭い液を用いたインフルエンザ抗原迅速検査 (イムノエース Flu<sup>®</sup>) で陽性, または real time polymerase chain reaction (RT-PCR) で H1N1pdm RNA を検出することで診断し

**Key words** : インフルエンザ, サイトカイン, 呼吸障害, 可溶性 IL-2 受容体, 尿中  $\beta$ 2 ミクログロブリン

1) 愛媛県立中央病院小児科

〔〒790-0024 松山市春日町 83〕

2) 愛媛大学大学院医学系研究科小児医学

た。検査期間は圧倒的に H1N1pdm が流行しており、迅速診断検査でインフルエンザ A 陽性となったものは H1N1pdm と診断した。また、腎機能障害および貧血を有する症例は除外した。

本検討で対象とした H1N1pdm 症例は入院症例であり、肺炎が 31/39 例と多数を占めていることから、コントロール群 (C 群) として、発熱を主訴に受診し気管支炎または肺炎と診断した症例でフェリチン、sIL-2R、尿中  $\beta$ 2MG を測定した 26 例を対象とした。咽頭培養から、3 例で *Streptococcus pneumoniae*、5 例で *Haemophilus influenzae* を検出した。また、4 例で鼻汁中 RS ウイルス迅速検査陽性、7 例でペア血清でマイコプラズマ抗体価の 4 倍以上の上昇を認めた。インフルエンザ症例、貧血および腎機能障害を有する症例、川崎病や膠原病など非感染性発熱疾患は除外した。全症例群と C 群について各検査値について比較し検討した。

次に、全症例群を主症状に応じて、神経症状を有した群 (N 群)、呼吸器症状を有した群 (R 群)、神経症状と呼吸器症状の両方を有した群 (NR 群) の 3 群に分類した。神経症状は厚生労働省のインフルエンザ脳症ガイドラインに従い<sup>1,3)</sup>、意識障害、けいれん、異常行動、異常言動のいずれかを有する場合とし、呼吸器症状は多呼吸、努力呼吸、喘鳴、SpO<sub>2</sub>低下といった呼吸障害をきたし胸部画像検査で異常陰影を有する場合とした。3 群における年齢、性別、発熱から症状出現までの時間が 6 時間以内であった症例数、入院時に測定した sIL-2R 値、フェリチン値、尿中  $\beta$ 2MG 値、白血球 (WBC) 数、CRP 値を比較し検討した。

治療後のサイトカインマーカーの変動に関しては、診断時と解熱直後に各サイトカインマーカーを測定していた症例で検討した。全症例群 39 例のうち sIL-2R は 6 例、尿中  $\beta$ 2MG は 8 例、フェリチンは 4 例を対象とした。解熱は「腋窩温で 37.5°C 未満」、発熱は「腋窩温で 37.5°C 以上」と定義した。

統計処理方法として Mann-Whitney *U* test, Student's *t* test および Fisher's exact test を行い、 $p < 0.05$  を有意差ありと判断した。Fisher's exact test は性差の検定に使用した。また、サイトカイ

ンマーカー間での相関関係については、スピアマンの順位相関係数によって検討した。

### III. 結 果

#### 1. 対象症例の背景

各群の測定結果を表に示す。全症例群 39 例のうち、肺炎は 31 例、脳症は 4 例、熱性けいれんは 10 例であった。そのうち、フェリチンは 31 例、sIL-2R は 33 例、尿中  $\beta$ 2MG は 32 例で測定結果が得られた。

また、N 群は 8 例、R 群は 23 例、NR 群は 8 例であり、各群において性差は認めなかった。気管支喘息の既往がある症例は N 群では 0% (0 例)、R 群では 17% (4 例)、NR 群では 25% (2 例) であった。症状が発熱出現前または発熱後 6 時間以内に出現した症例は N 群が 12.5% (1 例/8 例) であったのに対し、R 群では 52% (12 例/23 例)、NR 群では 62.5% (5 例/8 例) と高い割合を占めた。

H1N1pdm 罹患早期の治療として、抗インフルエンザウイルス薬 (39 症例/39 症例, 100%)、ステロイド (22 症例/39 症例, 56%)、 $\gamma$ グロブリンの投与 (6 症例/39 症例, 15%) を症状出現後 24 時間以内に行い、全例、人工呼吸管理を要することなく治癒した。使用した抗インフルエンザ薬は、ザナミビルが 20 例、オセルタミビルが 19 例であった。ステロイドはデキサメサゾン (0.2 mg/kg/day  $\times$  1 day) が 4 例、メチルプレドニゾロン (1~3 mg/kg/day  $\times$  3~5 day) が 14 例であり、ステロイドパルス療法をインフルエンザ脳症の 4 例で施行した。 $\gamma$ グロブリンの投与量はインフルエンザ脳症の 4 例で 1 g/kg/day  $\times$  1 day、重症肺炎の 2 例で 100 mg/kg/day  $\times$  1 day であった。

#### 2. 年 齢

全症例群の平均年齢は 5.37  $\pm$  0.47 (0.16~12.67 歳)、C 群は 4.90  $\pm$  0.66 (0.50~11.5 歳) であり、両群間において有意差は認めなかった。また、N 群は 7.31  $\pm$  1.21 (1.92~12.67 歳)、R 群は 4.48  $\pm$  0.50 (0.16~10.56 歳)、NR 群は 5.95  $\pm$  0.85 (1.25~8.5 歳) であり、N 群より R 群が低年齢であった ( $p < 0.05$ )。

表 各群の測定結果<sup>a,b</sup>

	全症例群 (n=39)	N 群 (n=8)	R 群 (n=23)	NR 群 (n=8)	C 群 (n=26)
男児：女児	27：12	6：2	14：9	7：1	15：11
年齢 (mean±SE)	0.16~12.67 5.37±0.47	1.92~12.67 7.31±1.21	0.16~10.56 4.48±0.50	1.25~8.50 5.95±0.85	0.50~11.5 4.90±0.66
症状出現が発熱出現 6時間以内の症例数	1+17 (46%)	1 (12.5%)	12 (52.1%)	0+5 (62.5%) <sup>c</sup>	—
WBC (mean±SE)	3,700~19,840 8,565.1±674.6	3,700~19,840 8,792.5±1,591.6	4,210~19,020 8,801.7±876.5	3,700~14,900 7,657.5±1,235.0	4,230~33,530 10,073.0±1,375.0
CRP (mean±SE)	0.05~9.81 1.88±0.33	0.12~4.87 1.38±0.50	0.05~7.44 1.67±0.36	0.28~9.81 2.95±1.04	0.10~8.8 1.87±0.48
フェリチン (mean±SE)	12.3~589.9 92.4±19.7	27.8~77.6 58.2±8.8	12.3~589.9 93.8±29.9	39.3~274.4 127.9±38.3	10.1~453.0 93.6±20.0
sIL-2R (mean±SE)	498~2,468**** 1,087.8±87.5	498~1,569 799.4±123.5	555~2,468*** 1,138.9±124.7	815~1,973*** 1,237.2±138.4	222~975 606.2±44.1
尿中β2MG (mean±SE)	72~20,360**** 3,641.8±834.5	861~12,040*** 4,208.5±1,676.5	72~14,800**** 2,713.1±790.8	805~20,360*** 6,170.8±2,798.7	21~576 143.4±22.8

<sup>a</sup>正常範囲は CRP 0.3 mg/dl 未満, WBC 7,000~15,000/μl, sIL-2R 122~496 U/ml (成人), フェリチン 4.3~113 ng/ml, 尿中β2MG 250 μg/l 未満とした。

<sup>b</sup>C 群に対する統計学的有意差を \* で示す. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001, \*\*\*\* $p$ <0.0001

<sup>c</sup>NR 群の発熱出現 6 時間以内に神経症状が出現した症例数は 0 例, 呼吸器症状が出現した症例は 5 例であった。

### 3. 全症例群と C 群の比較

全症例群と C 群において性別, 年齢, WBC 数, CRP 値, フェリチン値において有意差は認めなかったが, sIL-2R ( $p$ <0.0001), 尿中β2MG ( $p$ <0.0001) では全症例群で有意に高値を示した。

### 4. 3 群 (N, R, NR 群) と C 群との比較

3 群と C 群の各サイトカインマーカーの測定値の分布を示す (図 1)。sIL-2R は神経症状を有する N 群とは有意差はなかったが, 呼吸障害を有する R 群, NR 群で有意に上昇していた。また, 尿中β2MG は 3 群ともに有意に上昇していた。WBC 数, CRP 値, フェリチンでは有意差は認めなかった。

### 5. 3 群間の比較

N 群, R 群, NR 群の各群間では WBC 数, CRP, フェリチン, 尿中β2MG で有意差は認めなかった。sIL-2R は N 群と R 群, N 群と NR 群で有意差を認め, 呼吸器症状を有する症例で高い傾向を示した (図 1)。sIL-2R は年齢によって正常値が大きく異なるため<sup>9)</sup>, sIL-2R を年齢によって再検

討した (図 2)。その結果, 全症例群において 91% (30 例/33 例) の症例で正常値より高値となり, そのうち N 群では 85% (6 例/7 例), R 群では 89% (17 例/19 例), NR 群では 100% (7 例/7 例) の症例で高値であった。さらに +2 SD を超えていた症例は全体の 54% (18 例/33 例) を占めた。それに対して, C 群では 42% (11 例/26 例) が正常値より高値となったが, +2 SD を超えていた症例は全体の 3.8% (1 例/26 例) にとどまった。

また, 各サイトカインマーカー間での相関関係について検討したところ, それぞれの相関係数 ( $r_s$ ) は, フェリチンと尿中β2MG は  $r=0.377$ , フェリチンと sIL-2R は  $r=0.136$ , sIL-2R と尿中β2MG は  $r=-0.141$  と一定の相関関係は認めなかった。

### 6. 診断時と解熱直後のサイトカインマーカーの推移

インフルエンザ A と診断したときと解熱直後の sIL-2R, 尿中β2MG, フェリチンの推移を比較した。フェリチンは診断時  $62.5 \pm 10.5$  ng/ml から

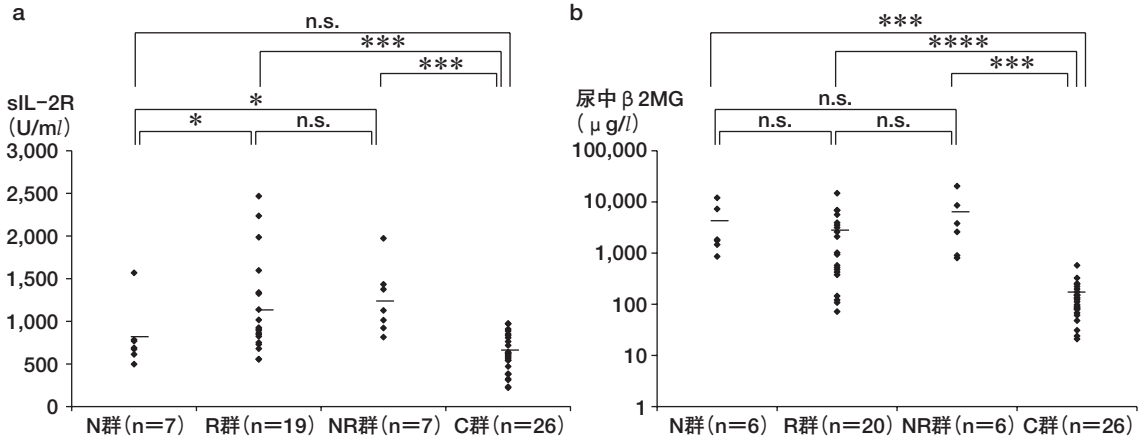


図 1 各サイトカインマーカーの測定結果の分布

a : sIL-2R b : 尿中β2MG.

図中の—は平均値を示す。統計学的有意差を\*で示す。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$

n. s. : no significant

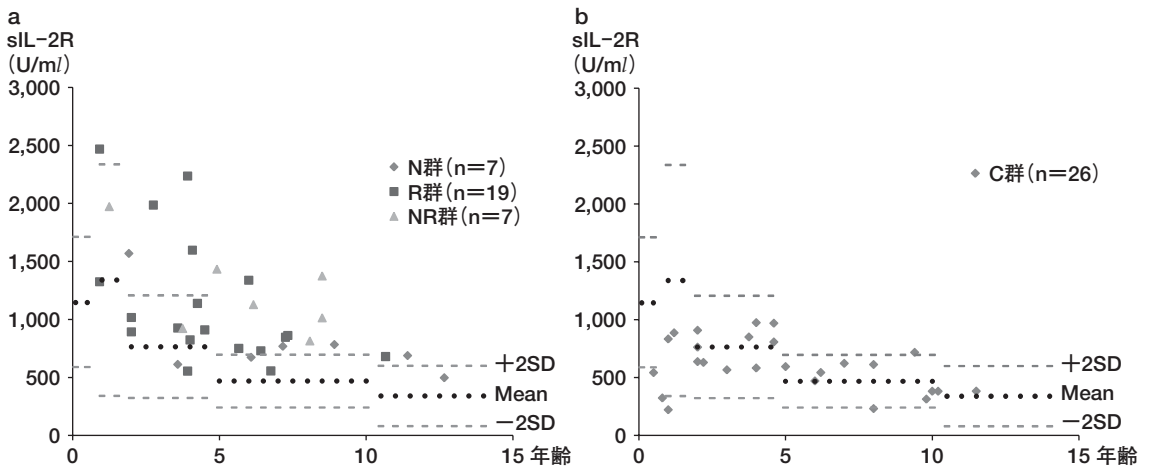


図 2 年齢における sIL-2R の分布

A 群 (N 群, R 群, NR 群) (a), C 群 (b) における年齢に対する sIL-2R 値の分布を示す。図中の●は年齢における正常平均値を示し、±2SD の範囲を—で示す。(文献 9) より引用)

解熱時  $72.9 \pm 12.0 \text{ ng/ml}$  (mean  $\pm$  SE,  $n=4$ ), sIL-2R は診断時  $1,140.7 \pm 193.2 \text{ U/ml}$  から解熱時  $961.5 \pm 112.6 \text{ U/ml}$  (mean  $\pm$  SE,  $n=6$ ) と有意な変化は認めなかった。一方、尿中β2MG は診断時  $7,095.8 \pm 2,970.0 \mu\text{g/l}$  から  $373.5 \pm 189.5 \mu\text{g/l}$  (mean  $\pm$  SE,  $n=8$ ) に有意に低下した ( $p < 0.05$ )。

#### IV. 考 察

H1N1pdm ウイルスが I 型, II 型肺胞上皮細胞

に感染すると、さまざまな炎症性サイトカインやケモカインの発現が誘導され<sup>6)</sup>, H1N1pdm に罹患した患者から IFN- $\gamma$  や Th2 系サイトカインである IL-4, IL-5 が検出されている<sup>7,8)</sup>。本検討では H1N1pdm 罹患早期の sIL-2R, 尿中β2MG 値は下気道炎の症例 (C 群) の sIL-2R, 尿中β2MG 値より有意に高値となったことから、通常の下気道炎よりもサイトカインが変動したことが推察される。各種サイトカインマーカーとサイトカインの

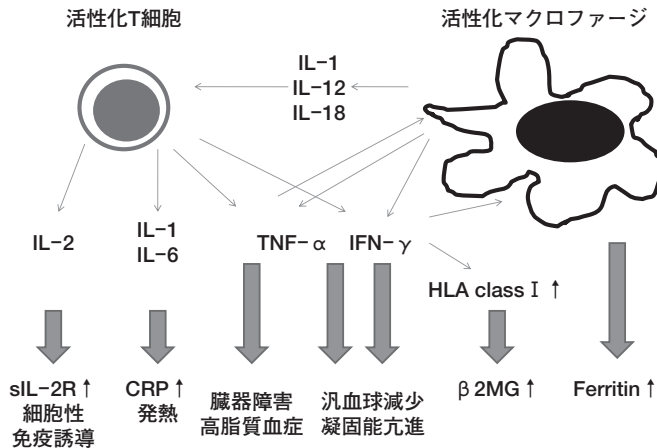


図3 活性化T細胞と活性化マクロファージに関するサイトカイン (文献10) より引用, 一部改変)

関連について図3に示す<sup>10)</sup>。生体での感染防御において獲得免疫機構の主な細胞であるTh1細胞からIL-2が産生され、sIL-2Rを介したシグナル伝達によってCD8<sup>+</sup>T細胞の増殖を促すことが知られている<sup>9~11)</sup>。特に、H1N1pdmにおいて肺障害が強い一因として、CD8<sup>+</sup>T細胞による組織障害があげられ<sup>6,7)</sup>、呼吸障害の急速な進行と重篤化にTh2細胞と同様にTh1細胞も関与している可能性が示唆された。Nakajimaらによる成人のH1N1pdmによる重症肺炎の剖検例の検討では血清、肺組織の両方でIL-2Rが上昇し、肺組織でIFN-γの増加を認めたと報告されており<sup>12)</sup>、本検討におけるsIL-2R、尿中β2MGの有意な上昇を裏付ける結果と考えられる。

尿中β2MGはサイトカイン誘導蛋白であり、Th1細胞から放出されたIFN-γの増加によって上昇する。IFN-γによりHLA class I分子が過剰発現しH鎖とL鎖が増加するが、H鎖と会合できなかったL鎖(=β2MG)が尿中に漏出する。本検討では乳幼児での入院時採血量増加、当院での測定結果の早さを考慮し血清β2MG値ではなく、尿中β2MG値を測定した。診断時に高値であったsIL-2R値は解熱直後にはまだ高値であった症例(33%, 2症例/6症例)がみられたのに対し、尿中β2MG値は全例で解熱直後に速やかに低下した。インフルエンザ急性期にはIFN-α >

IFN-γ > TNF-α > IL-6 > IL-1αの頻度で上昇する点を踏まえると、IFN-γを反映する尿中β2MGの経時的変化を把握することが病勢把握に有用となり得ると考えられる<sup>13)</sup>。

フェリチンも尿中β2MGと同様にサイトカイン誘導蛋白として知られており、TNF-αによって活性化マクロファージをはじめとする網内系からの産生が促進される。今回の検討ではフェリチンの上昇は認めなかったことから、H1N1pdmにおける急速な病態の変化において活性化マクロファージの関与は薄いと考えられる。しかし、KimらはH1N2インフルエンザウイルスに感染したブタの肺におけるTNF-αの発現量は感染第1日目にピークを迎え、段階的に低下したと報告している<sup>14)</sup>。ヒトにおけるH1N1インフルエンザウイルス感染でも同様のメカニズムが起こっているのであれば、フェリチン単独でインフルエンザ罹患早期のTNF-αの変動を把握することは困難であることが示唆された。

H1N1pdmでは若年齢層において呼吸障害を急速にきたした症例を多く経験した。乳幼児では免疫調節機構の未熟性から容易にサイトカインストームに至り、急速に重篤な臓器障害に陥る<sup>15)</sup>。その点からも気管支や肺での強い炎症反応(サイトカインストーム)を早期に軽減させる目的でステロイドを使用することは重要な治療戦略となり



得る。さらにステロイドの肺サーファクタント分泌促進作用、好酸球性炎症の抑制も肺胞障害が強い H1N1pdm において有用な治療効果と考えられる<sup>6,7)</sup>。本検討では入院時の sIL-2R や尿中  $\beta$ 2MG が高値であったことから、高サイトカイン血症とそれに伴う急激な臨床症状の悪化を懸念し、罹患早期からステロイド投与を行った。その結果、呼吸障害を有した群において人工呼吸管理やステロイドパルス療法の追加が必要となった症例や plastic bronchitis をきたした症例はなかった。高サイトカイン血症が疑われる症例においてはインフルエンザ罹患早期から積極的に抗サイトカイン療法を行い、サイトカインストームへの進展を予防することが重要であると考えられる。

本検討は 2009 年 10 月～2010 年の 2 月までの一施設の症例による後方視的検討であり、症例数も限られている。入院加療を要する重症症例と外来加療が可能な軽症症例との比較、H1N1pdm 以外の季節性インフルエンザとの比較、IL-2 や IFN- $\gamma$  の実測値との比較といった点について今後、さらなる検討が必要である。

## V. 結 論

H1N1pdm において、sIL-2R 値は呼吸障害を有する小児で高い傾向にあった。高サイトカイン血症を示唆する sIL-2R や尿中  $\beta$ 2MG が高値の症例における治療戦略として、罹患早期からの抗サイトカイン療法が有用な武器となる可能性がある。

本論文の要旨は第 82 回日本小児科学会愛媛地方会 (2010 年 11 月, 松山) にて発表した。

## 文 献

- 1) 植田育也, 他: 小児インフルエンザ重症肺炎・ARDS の診療戦略 2009 年 9 月 30 日版, 日児誌 113 : 1501-1508, 2009
- 2) 市川和志, 他: パンデミックインフルエンザ A (H1N1)2009 の感染により呼吸障害を呈した小児の 8 例, 日児誌 114 : 78-81, 2010
- 3) 厚生労働省インフルエンザ脳症研究班: インフルエンザ脳症ガイドライン 2009 年 9 月改訂版, 小児科臨床 62 : 2483-2528, 2009
- 4) Sullivan SJ, et al : 2009 H1N1 influenza. Mayo Clin Proc 85 : 64-76, 2010
- 5) Halasa NB : Update on the 2009 pandemic influenza A H1N1 in children. Curr Opin Pediatr 22 : 83-87, 2010
- 6) Thais M, et al : Lung pathology in fatal novel human influenza A (H1N1) infection. Am J Respir Crit Care Med 181 : 72-79, 2010
- 7) 郷司 彩, 他: パンデミックインフルエンザ A/H1N1 2009 における無気肺 8 例の検討, 日児誌 115 : 83-88, 2011
- 8) Itoh Y, et al : *In vitro* and *in vivo* characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses. Nature 460 : 1021-1025, 2009
- 9) Komp DM, et al : Souble interleukin-2 receptor in childhood non-Hodgkin's lymphoma. Blood 71 : 1172-1174, 1988
- 10) 十河 剛, 他: 小児科とサイトカイン—プライマリケアから高次医療まで—Ⅲ, サイトカインと小児疾患 ウイルス関連血球貪食症候群, 小児科診療 12 : 2147-2154, 2008
- 11) 柴田健輔, 他: 小児科とサイトカイン—プライマリケアから高次医療まで—Ⅱ, サイトカインの基礎 感染防御におけるサイトカインの役割, 小児科診療 12 : 2121-2128, 2008
- 12) Nakajima N, et al : The first autopsy case of pandemic influenza (A/H1N1pdm) virus infection in Japan : detection of a high copy number of the virus in type II alveolar epithelial cells by pathological and virological examination. Jpn J Infect Dis 63 : 67-71, 2010
- 13) 矢島昭彦, 他: インフルエンザの超急性期における血清中サイトカインの検討—中枢神経合併症との関連について, 季刊病態生理 35 : 7-12, 2001
- 14) Kim B, et al : Association of tumor necrosis factor-alpha with fever and pulmonary lesion score in pigs experimentally infected with swine influenza virus subtype H1N2. J Vet Med Sci 71 : 611-616, 2009
- 15) 横田俊平: インフルエンザウイルス感染とインターフェロン, サイトカイン—感染症における Toll-like receptor および細胞内センサーの役割, インフルエンザ 9 : 111-117, 2008

---

## Evaluation of cytokine markers in pandemic influenza A (H1N1) 2009

Fumihiro OCHI<sup>1,2)</sup>, Masatoshi HAYASHI<sup>1)</sup>

1) *Department of Pediatrics, Ehime Prefectural Central Hospital*

2) *Department of Pediatrics, Ehime University Graduate School of Medicine*

**Objective** : We studied the changes in cytokine markers and their association with clinical symptoms in patients with pandemic influenza A (H1N1) 2009.

**Methods** : Thirty nine patients with pandemic influenza A (H1N1) admitted to our hospital from October 2009 to February 2010 were enrolled in this study. The patients were examined for at least one of the following cytokine markers : sIL-2R, ferritin, and urine  $\beta$ 2MG. They were classified into three groups (respiratory, neurological, and mixed) and tested for these cytokine markers.

**Results** : The age at the disease onset was lower in the respiratory group than in the neurological group ( $p < 0.05$ ). The neurological group included eight children (21%), the respiratory group included 23 children (59%), and the mixed group included eight children (21%). In all three groups, sIL-2R and urine  $\beta$ 2-MG levels in the early phase of H1N1 were significantly higher than those in the control group having lower respiratory tract infection ( $p < 0.01$ ). Moreover, sIL-2R levels in the respiratory group were significantly higher than those in the neurological group ( $p < 0.05$ ). Urine  $\beta$ 2-MG levels rapidly decreased in children with H1N1 when their body temperatures returned to normal.

**Conclusion** : The high levels of sIL-2R and urine  $\beta$ 2-MG indicate hypercytokinemia in patients with H1N1, and suggest that anti-cytokine therapies would be a useful treatment strategy for H1N1.

(受付 : 2011 年 3 月 29 日, 受理 : 2011 年 6 月 24 日)

\* \* \*