

2009年パンデミック H1N1 インフルエンザ脳症患者
における HMGB1 濃度について

**High mobility group box 1 in patients with 2009 pandemic H1N1
influenza-associated encephalopathy**

百中 宏

山口大学大学院医学系研究科
情報解析医学系専攻 小児科学分野

平成 27 年 6 月

目次

要約	3
1. 序文	3
2. 材料および方法	
2. 1. 患者および対照被験者	4
2. 2. HMGB1 濃度の測定	5
2. 3. 統計解析	5
3. 結果	5
4. 考察	5
利益相反	6
謝辞	7
参考文献	13

要約

背景：2009年パンデミックH1N1インフルエンザ脳症（pIE；2009 pandemic H1N1 influenza-associated encephalopathy）患者が日本で報告された。本病態で最も頻度が高い臨床症状は、高熱を伴う痙攣発作と進行性昏睡である。著者らは以前にpIEのサイトカインプロファイルに着目したが、結果はその病態において炎症性サイトカインが重要な役割を果たしていることを示唆していた。High mobility group box 1（HMGB1）蛋白は、炎症や敗血症の遅発性メディエーターである。しかし、pIE患者における血清および髄液中HMGB1濃度に関する報告はほとんどない。

方法：著者らは、死亡あるいは神経学的後遺症を残した予後不良のpIE患者、神経学的後遺症を残さなかった予後良好のpIE患者、pIEを伴わないインフルエンザ患者、対照被験者の血清および髄液中HMGB1濃度を測定した。

結果：血清HMGB1濃度は、予後不良のpIE患者では神経学的後遺症を伴わない予後良好の患者に比して、有意に高かった。対照的に、髄液HMGB1濃度は全てのグループ間で差が認められなかった。pIE患者に関しては、血清中のHMGB1濃度とinterleukin（IL）-6濃度に有意な正の相関を認めたが、髄液中では認められなかった。

結論：著者らの結果では、HMGB1蛋白がpIEの病態に関わっている可能性があり、髄液中ではなく血清中炎症性サイトカインの上昇がpIEの重症度に重要な役割を果たしていることを示唆している。

1. 序文

2009年4月以降、パンデミックH1N1インフルエンザウイルス感染症が日本中で急速に広まり、感染患者は主に呼吸器症状を呈している[1-3]。また、2009年パンデミックH1N1インフルエンザ脳症（pIE；2009 pandemic H1N1 influenza virus-associated encephalopathy）患者も報告された。季節性インフルエンザ脳症（sIE；seasonal influenza virus-associated encephalopathy）と同様に、インターロイキン（IL；interleukin）-6、および腫瘍壊死因子（TNF；tumor necrosis factor）などの炎症性サイトカインの上昇が、pIEの病態において重要な役割を担っていると報告されている[4-7]。

High mobility group box 1（HMGB1）は遍在する核蛋白で、炎症性サイトカイン産生を誘導し、敗血症の遅発性メディエーターとして作用する[8-10]。HMGB1は、核内因子 κ B（NF κ B；nuclear factor kappa B）シグナルの活性化をもたらす終

末糖化産物レセプター (RAGE ; receptor for advanced glycation endproducts) 、 Toll様受容体 (TLR ; toll like receptor) 2、TLR4などの細胞表面レセプターと結合し得ると報告されており[11]、敗血症、急性肺傷害、肝傷害、関節リウマチ、外傷、播種性血管内凝固を含む種々の病態の病因に次々と関係している[11-16]。以前の報告では、pIE患者において血清HMGB1濃度は上昇しないといわれていたが[17]、その詳細は不明である。

本研究では、死亡あるいは神経学的後遺症を伴う予後不良のpIE患者と伴わない予後良好のpIE患者の急性期に、血清および髄液中HMGB1濃度について検討した。

2. 材料および方法

2.1. 患者および対照被験者

本研究に登録された患者の両親にインフォームドコンセントを得た。髄液および血清検体は、著者らの病院、および本研究に参加した12病院に入院したpIE患者20名から採取した(表1)。pIEの診断基準は以下の通りとした：(1)急性脳炎/脳症に合致する臨床徴候および症状の存在、すなわち意識変容を伴う熱性疾患、急性発症後24時間以上持続する脳波上の徐波活性、髄液中に細菌および真菌が存在せず、他の全ての神経性、血管性、代謝性、内分泌性、中毒性、薬剤性疾患がないこと、および(2)ポリメラーゼ連鎖反応(PCR ; polymerase chain reaction)、または迅速検査、且つ/または赤血球凝集抑制試験で4倍の抗体価上昇によって、咽頭または鼻腔ぬぐい液から2009年パンデミックH1N1インフルエンザウイルスが検出されたこと[4]。検体は採取した後、直ちに-80℃で保存した。凍結融解することなく、全検体を同時に測定した。

pIE患者を2つのグループに分類した：死亡または神経学的後遺症を残した予後不良の患者群(グループA ; 年齢中央値 7.9歳、年齢幅 4~30歳、男 : 女 3 : 3)、および神経学的後遺症を残さなかった予後良好の患者群(グループB ; 年齢中央値 6.3歳、年齢幅 1~14歳、男 : 女 6 : 8)。血清および髄液検体は、中央値1病日(1~6日)に採取した。グループCは、脳症(IE ; influenza virus-associated encephalopathy)を伴わないインフルエンザ感染小児23名である(年齢中央値 6.3歳、年齢幅 1か月~15歳、男 : 女 15 : 8)(表1)。血清HMGB1濃度の対照グループは、33名の健常小児(年齢中央値 6.2歳、年齢幅 5か月~15歳、男 : 女 17 : 16)から成り、一方、髄液HMGB1濃度の対照グループは、17名の無熱性および無感染の神経学的障害児(男 : 女 9 : 8、年齢幅 1~13歳、年齢中央値 6.3歳)から成る。対照グループの髄液検体は、ルーチン検査の際に採取し、全て正常

な髄液細胞数だった。

2.2. HMGB1濃度の測定

HMGB1蛋白濃度は、製造仕様書に従ってHMGB1 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay, 検出限界1.0 ng/mL) キットII (株式会社シノテスト、東京、日本) を用いて測定した。

2.3. 統計解析

グループ間の差はMann-Whitney U検定を用いて解析し、0.05未満のp値を統計学的に有意とみなした。相関は、Spearmanの順位相関係数検定を用いた。解析および計算は、SPSS 11.0版 (SPSS Inc.、シカゴ、イリノイ州、米国) を用いて行った。値は平均値±標準誤差で表す。

3. 結果

図1および表2は、pIE患者の血清HMGB1濃度を表す。グループA患者 (中央値 17.4 ng/mL) の血清HMGB1濃度は、グループB患者 (中央値 6.8 ng/mL)、グループC患者 (中央値 6.1 ng/mL)、対照グループ (中央値 5.5 ng/mL) (それぞれ、 $p<0.05$ 、 $p<0.01$ 、 $p<0.001$ [グループAに対して]) に比して、有意に高値であった。血清HMGB1濃度は、グループB、グループC、および対照グループ間で、それぞれ有意な差はなかった。一方、髄液HMGB1濃度はグループAの患者群 (中央値 <1.0 ng/mL)、グループBの患者群 (中央値 <1.0 ng/mL)、グループCの患者群 (中央値 <1.0 ng/mL)、および対照グループ (中央値 <1.0 ng/mL) 間で差はなかった。結果を図2および表2に示す。グループAの患者1の血清HMGB1濃度が非常に高値であったため、この患者を除いて結果を再解析したが、血清HMGB1濃度においてグループAとグループBの間に有意差 ($p=0.034$) を認めた。

表3は一般検査結果、そして血清および髄液中のIL-6濃度 (参考文献7から転載) とHMGB1濃度を示す。pIE患者に関して、血清HMGB1濃度およびIL-6に有意 ($p<0.05$) な正の相関を認めたが、髄液では認められなかった ($p=0.966$)。

4. 考察

本研究では脳症合併あるいは非合併の2009年パンデミックH1N1インフルエンザ患者における血清および髄液中HMGB1濃度を測定し、対照被験者と比較し

た。pIE患者を神経学的予後により、2つのグループに分けた。以前に著者らは、炎症性サイトカインおよび末梢血単球/マクロファージの活性化が、sIEおよびpIEの病態において重要な役割を果たすことを報告した[4,7]。本研究において、死亡あるいは神経学的後遺症を残した予後不良のpIE患者で血清HMGB1濃度が、神経学的後遺症を伴わないpIE患者、pIEを伴わない2009年パンデミックH1N1インフルエンザ患者、対照被験者と比して有意に高値であることを証明した。患者1の血清HMGB1濃度は非常に高値であったが、胸部単純X線撮影で急性呼吸窮迫症候群や肺炎などのいかなる異常もみられなかった。さらに血清中のHMGB1濃度とIL-6濃度の間に有意な正の相関があった。これらの結果は、HMGB1濃度の上昇がpIE患者の不良な予後に関係している可能性があることを示している。pIEの合併にかかわらず肺炎を患った2009年パンデミックH1N1インフルエンザ患者は、合併症を伴わない患者およびpIEのみ合併の患者に比して、血清HMGB1濃度が高値であると以前に報告されている[17]。それらの先行する研究と著者らの結果の間には幾つかの相違点がある。本研究ではpIE死亡患者3名が含まれている。著者らは以前に、予後良好なIE患者および対照被験者に比して、予後不良なIE患者の血清中炎症性サイトカイン濃度が上昇していると報告したが[4,7]、著者らの知見とは対照的に他の研究で、pIE患者においてIL-6などの炎症性サイトカインが有意に低値であると報告している[4,7,17]。著者らはこれらの相違が、pIEの重症度に起因する可能性があるかと推測する。

本研究では、予後不良のpIE患者と他の全てのグループとの間で、血清HMGB1濃度に有意差があったが、髄液HMGB1濃度ではみられなかった。さらに、血清中のHMGB1とIL-6濃度の間には有意な正の相関があったが、髄液ではみられなかった。著者らは以前に予後不良のpIE患者では髄液中IL-6濃度が有意に上昇した一方で、IL-10、インターフェロン (IFN ; interferon) - γ 、可溶性TNFレセプター1 (sTNFR1 ; soluble TNF receptor 1) は上昇しなかったことを報告した。IL-6が炎症過程を促進すると多くの研究で報告されている一方で、各種の損傷から神経を保護しているという報告もみられる[18,19]。本研究において髄液HMGB1濃度が影響を受けなかったことを考えると、IL-6などの炎症性サイトカインの血清濃度の上昇が、pIEの病態において重要な役割を果たしていることを示唆している。さらに、pIEによって生じた損傷から神経を保護するために、髄液IL-6濃度が上昇している可能性がある[20]。

結論として、本研究の結果はHMGB1がpIEの病態に関係し、炎症性サイトカイン濃度が、髄液ではなく、血清中で高値であることがpIEの重症度に重要な役割を果たしていることを示唆している。

利益相反

著者らは開示する利益相反がない。

謝辞

本研究にご協力いただいた、堀田剛先生（京都市立病院）、永瀬裕朗先生、藤田杏子先生、丸山あずさ先生（兵庫県立こども病院）、吉川真紀子先生、宮田憲二先生（市立豊中病院）、山本敬一先生、井出義顕先生、一色史枝先生（伊勢原協同病院）、塩見正司先生、前木孝洋先生（大阪市立総合医療センター）、近田祐介先生（仙台市立病院）、種市尋宙先生（富山大学）、西田智子先生（香川大学）、中川夏季先生（大阪警察病院）、早坂清先生、加藤光広先生、菊池貴洋先生（山形大学）、元木崇裕先生、大森啓充先生（愛媛県立中央病院）、親里嘉展先生（加古川市民病院）に深謝いたします。

本研究は、厚生労働省科学研究費補助金の支援を受けている（H21-新興-一般-010）。

表 1

患者および対照の臨床的特徴

	年齢 (中央値)	性別 (男:女)	診断	転帰
グループ A (n=6)	4~30 歳 (7.9 歳)	3 : 3	HSES : 2 ANE : 1 AESD : 1 MERS : 1 不明 : 1	死亡 : 3 MeR : 2 MeR+四肢麻痺 : 1
グループ B (n=14)	1~14 歳 (6.3 歳)	6 : 8	MERS : 3 NHLE : 2 AESD : 1 軽度脳症 : 8	後遺症なし
グループ C (n=23)	1 か月~15 歳 (6.3 歳)	15 : 8	-	-
対照 (血清) (n=33)	5 か月~15 歳 (6.2 歳)	17 : 16	-	-
対照 (髄液) (n=17)	1~13 歳 (6.3 歳)	9 : 8	-	-

グループ A : 予後不良の2009年パンデミックインフルエンザ脳症 (pIE)

グループ B : 神経学的後遺症を伴わないpIE

グループ C : IEを伴わないインフルエンザ感染

HSES : 出血性ショック脳症症候群

ANE : 急性壊死性脳症

AESD : 二相性痙攣及び遅発性拡散能低下を呈する急性脳症

NHLE : 非ヘルペス性辺縁系脳炎

MERS : 可逆性脳梁膨大部病変を有する軽症脳炎・脳症

MeR : 精神遅滞

表 2

2009 年パンデミック H1N1 インフルエンザ脳症患者における血清および髄液中 HMGB1 濃度

グループ	患者	年齢 (歳) / 性	診断	転帰	検体採取日 血清/髄液	血清	髄液
						HMGB1 (ng/ml)	HMGB1 (ng/ml)
A	1	8/女	HSES	死亡	1/-	76.3	NT
	2	30/女	HSES	死亡	1/-	13.6	NT
	3	8/女	ANE	死亡	1/1	10.4	<1.0
	4	5/男	MERS	MeR	1/1	21.1	<1.0
	5	4/男	AESD	MeR, 四肢 麻痺	2/1	6.4	<1.0
	6	6/男	不明	MeR	3/6	21.8	<1.0
B	1	5/男	MERS	後遺症なし	1/3	3.6	2.1
	2	12/男	MERS	後遺症なし	2/2	6.8	<1.0
	3	2/女	MERS	後遺症なし	-/2	NT	<1.0
	4	14/男	NHLE	後遺症なし	4/4	3.0	<1.0
	5	13/女	軽度脳症	後遺症なし	1/1	11.8	<1.0
	6	10/女	軽度脳症	後遺症なし	-/1	NT	<1.0
	7	9/女	軽度脳症	後遺症なし	1/1	9.9	<1.0
	8	4/男	軽度脳症	後遺症なし	1/1	8.4	<1.0
	9	8/男	軽度脳症	後遺症なし	9/9	18.3	<1.0
	10	12/女	NHLE	後遺症なし	2/2	6.5	<1.0
	11	1/女	AESD	後遺症なし	6/6	4.5	<1.0
	12	3/女	軽度脳症	後遺症なし	1/1	4.6	<1.0
	13	2/男	軽度脳症	後遺症なし	1/1	4.7	<1.0
	14	5/女	軽度脳症	後遺症なし	1/1	8.6	<1.0

HSES : 出血性ショック脳症症候群、ANE : 急性壊死性脳症、MERS : 可逆性脳梁膨大部病変を有する軽症脳炎・脳症、AESD : 二相性痙攣及び遅発性拡散能低下を呈する急性脳症、NHLE : 非ヘルペス性辺縁系脳炎、MeR : 精神遅滞、NT : 未検査

表 3

2009 年パンデミック H1N1 インフルエンザ脳症患者における HMGB1 および IL-6 濃度

グループ	患者	年齢 (歳) / 性	診断	血中WBC (/μl) /CRP (mg/ml)	髄液細胞数 (/μl) /糖 (mg/ml) /蛋白 (mg/ml)	血清/髄液 HMGB1 (ng/ml)	*血清/髄液 IL-6 (pg/ml)
A	1	8/女	HSES	11,200/1.12	NT	76.3/NT	16601.1/NT
	2	30/女	HSES	18,800/3.32	NT	13.6/NT	4581.4/NT
	3	8/女	ANE	12,200/0.94	2/82/不明	10.4/< 1.0	1135.0/1198.4
	4	5/男	MERS	12300/0.85	不明	21.1/< 1.0	15354.1/67.1
	5	4/男	AESD	不明	不明	6.4/< 1.0	<2.5/6.5
	6	6/男	不明	10,500/0.4	5/74/15	21.8/< 1.0	3.2/3.7
B	1	5/男	MERS	6,900/0.73	116/53/23	3.6/2.1	<2.5/94.3
	2	12/男	MERS	3,400/1.65	2/71/14	6.8/< 1.0	10.9/7.0
	3	2/女	MERS	NT	不明	NT/< 1.0	NT/3.0
	4	14/男	NHLE	4,200/0.03	2/61/19	3.0/< 1.0	4.8/4.5
	5	13/女	軽度脳症	6,080/0.04	1/63/27	11.8/< 1.0	3.1/2.8
	6	10/女	軽度脳症	NT	不明	NT/< 1.0	NT/18.6
	7	9/女	軽度脳症	5,900/0.09	4/141/15	9.9/< 1.0	29.0/4.0
	8	4/男	軽度脳症	5,700/0.04	4/65/30	8.4/< 1.0	7.6/4.6
	9	8/男	軽度脳症	不明	不明	18.3/< 1.0	138.8/21.4
	10	12/女	NHLE	3,240/0.16	1/58/22	6.5/< 1.0	39.9/9.6
	11	1/女	AESD	8,760/0.11	3/56/21	4.5/< 1.0	5.2/NT
	12	3/女	軽度脳症	12,600/1.83	5/113/不明	4.6	21.6/188.0
	13	2/男	軽度脳症	6,100/0.07	6/72/22	4.7/< 1.0	14.0/16.5
	14	5/女	軽度脳症	不明	不明	8.6	6.7/162.7

HSES：出血性ショック脳症症候群、ANE：急性壊死性脳症、MERS：可逆性脳梁膨大部病変を有する軽症脳炎・脳症、AESD：二相性痙攣及び遅発性拡散能低下を呈する急性脳症、NHLE：非ヘルペス性辺縁系脳炎、NT：未検査

*IL-6濃度は参考文献7から転載

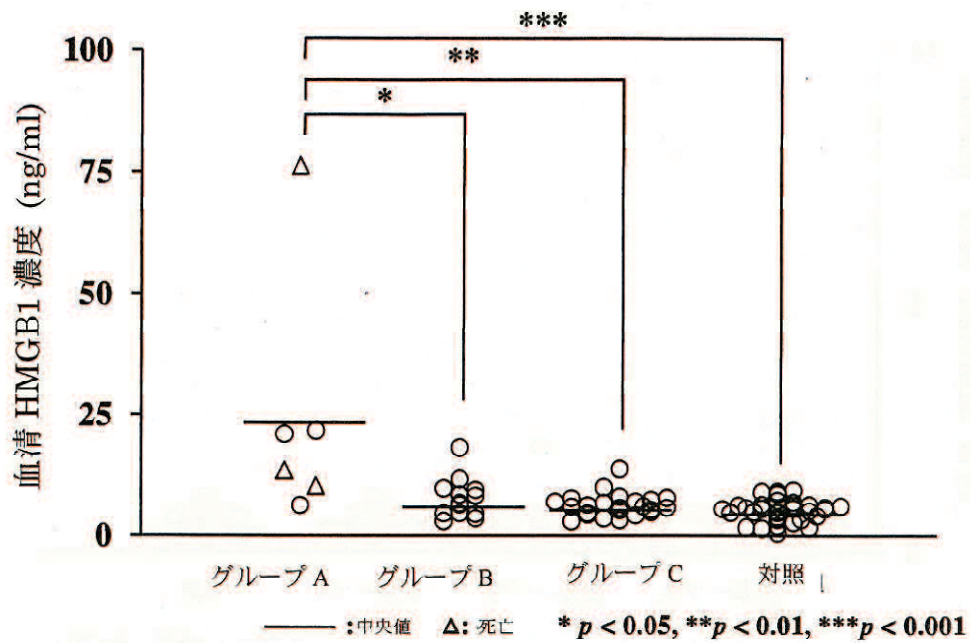


図 1. 神経学的後遺症を伴う pIE 患者（グループ A）、神経学的後遺症を伴わない pIE 患者（グループ B）、pIE を伴わない 2009 年パンデミック H1N1 インフルエンザウイルス感染患者（グループ C）、および対照被験者の血清 HMGB1 濃度。水平線は中央値を示す。

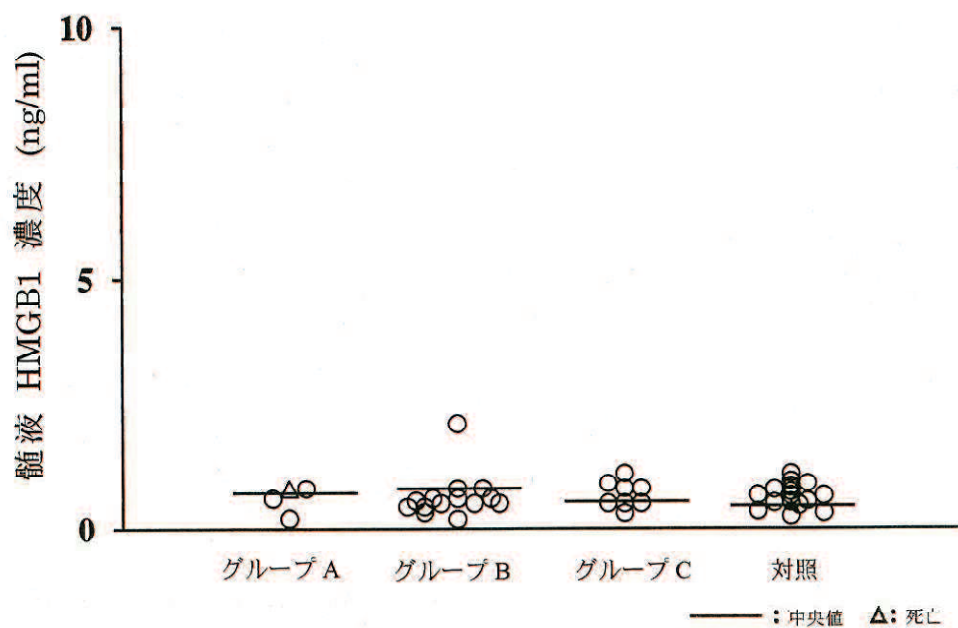


図2. 神経学的後遺症を伴う pIE 患者（グループ A）、神経学的後遺症を伴わない pIE 患者（グループ B）、pIE を伴わない 2009 年パンデミック H1N1 インフルエンザウイルス感染患者（グループ C）、および対照被験者の髄液 HMGB1 濃度。

参考文献

- [1] Munster VJ, de Wit E, van den Brand JM, Herfst S, Schrauwen EJ, Bestebroer TM, et al. Pathogenesis and transmission of swineorigin 2009 A (H1N1) influenza virus in ferrets. *Science* 2009;325:481–3.
- [2] O’Riordan S, Barton M, Yau Y, Read SE, Allen U, Tran D. Risk factors and outcomes among children admitted to hospital with pandemic H1N1 influenza. *Can Med Assoc J* 2010;182:39–44.
- [3] Bautista E, Chotpitayasunondh T, Gao Z, Harper SA, Shaw M, et al. Writing committee of the who consultation on clinical aspects of pandemic (H1N1) 2009 influenza, clinical aspects of pandemic 2009 influenza A (H1N1) virus infection. *N Engl J Med* 2010;362:1708–19.
- [4] Ichiyama T, Morishima T, Isumi H, Matsufuji H, Matsubara T, Furukawa S. Analysis of cytokine levels and NF- κ B activation in peripheral blood mononuclear cells in influenza virus-associated encephalopathy. *Cytokine* 2004;27:31–7.
- [5] Ichiyama T, Nishikawa M, Yoshitomi T, Hayashi T, Furukawa S. Tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β and interleukin-6 in cerebrospinal fluid from children with prolonged febrile seizures. Comparison with acute encephalitis/encephalopathy. *Neurology* 1998;50:407–11.
- [6] Aiba H, Mochizuki M, Kimura M, Hojo H. Predictive value of serum interleukin-6 level in influenza virus-associated encephalopathy. *Neurology* 2001;57:295–9.
- [7] Hasegawa S, Matsushige T, Inoue H, Shirabe K, Fukano R, Ichiyama T. Serum and cerebrospinal fluid cytokine profile of patients with 2009 pandemic H1N1 influenza virus-associated encephalopathy. *Cytokine* 2011;54:167–72.
- [8] Yamada S, Maruyama I. HMGB1, a novel inflammatory cytokine. *Clin Chim Acta* 2007;375:36–42.
- [9] Wang H, Ward MF, Sama AE. Novel HMGB1-inhibiting therapeutic agents for experimental sepsis. *Shock* 2009;32:348–57.
- [10] Yanai H, Ban T, Wang Z, Choi MK, Kawamura T, Negishi H, et al. HMGB proteins function as universal sentinels for nucleic-acid-mediated innate immune responses.

Nature 2009;462:99–103.

[11] Yang H, Wang H, Czura CJ, Tracey KJ. The cytokine activity of HMGB1. *J Leukoc Biol* 2005;78:1–8.

[12] Ueno H, Matsuda T, Hashimoto S, Amaya F, Kitamura Y, Tanaka M, et al. Contributions of high mobility group box protein in experimental and clinical acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:1310–6.

[13] Tsung A, Sahai R, Tanaka H, Nakao A, Fink MP, Lotze MT, et al. The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion. *J Exp Med* 2005;201:1135–43.

[14] Levy RM, Mollen KP, Prince JM, Kaczorowski DJ, Vallabhaneni R, Liu S, et al. Systemic inflammation and remote organ injury following trauma require HMGB1. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007;293:R1538–44.

[15] Andersson U, Harris HE. The role of HMGB1 in the pathogenesis of rheumatic disease. *Biochim Biophys Acta* 2010;1799:141–8.

[16] Hatada T, Wada H, Nobori T, Okabayashi K, Maruyama K, Abe Y, et al. Plasma concentrations and importance of high mobility group box protein in the prognosis of organ failure in patients with disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost* 2005;94:975–9.

[17] Ito Y, Torii Y, Ohta R, Imai M, Hara S, Kawano Y, et al. Increased levels of cytokines and high-mobility group box 1 are associated with the development of severe pneumonia, but not acute encephalopathy, in 2009 H1N1 influenza-infected children. *Cytokine* 2011;56:180–7.

[18] Ali C, Nicole O, Docagne F, Lesne S, MacKenzie ET, Nouvelot A, et al. Ischemia-induced interleukin-6 as a potential endogenous neuroprotective cytokine against NMDA receptor-mediated excitotoxicity in the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000;20:956–66.

[19] Yamashita T, Sawamoto K, Suzuki S, Suzuki N, Adachi K, Kawase T, et al. Blockade of interleukin-6 signaling aggravates ischemic cerebral damage in mice: possible involvement of Stat3 activation in the protection of neurons. *J Neurochem*

2005;94:459–68.

[20] Ichiyama T, Suenaga N, Kajimoto M, Tohyama J, Isumi H, Kubota M, et al. Serum and CSF levels of cytokines in acute encephalopathy following prolonged febrile seizures. *Brain Dev* 2008;30:47–52.

