

岩手医科大学  
審査学位論文  
(博士)

## 小児のがんと膠原病, 細菌感染症における 好中球 CD64 発現量の検討

田金星都<sup>1)</sup>, 遠藤幹也<sup>1)</sup>, 林 祐子<sup>2)</sup>,  
朝倉賀子<sup>1)</sup>, 三浦翔子<sup>1)</sup>, 千田勝一<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 岩手医科大学医学部, 小児科学講座

<sup>2)</sup> 岩手県立療育センター, 小児科

(Received on January 15, 2016 & Accepted on February 28, 2016)

### 要旨

本研究では, 小児のがん(血液腫瘍性疾患, 悪性固形腫瘍)と膠原病(関節型若年性特発性関節炎, 全身性エリテマトーデス), 細菌感染症, およびコントロールの白血球数, CRP 値, 好中球 cluster of differentiation 64 発現量(以下 nCD64 と略)を測定し, 細菌感染症との鑑別におけるこれらの検査の有用性を検討した. 対象(年齢範囲)は血液腫瘍性疾患 13 人(5 か月-15 歳), 悪性固形腫瘍 8 人(10 か月-17 歳), 若年性特発性関節炎 17 人(1 歳-19 歳), 全身性エリテマトーデス 6 人(9 歳-18 歳), 細菌感染症 25 人(1 日-19 歳), コントロール 223 人(8 日-19 歳)とした. 血液は各疾患の初発または再発・再燃の

有症状時に採取し, 白血球数, CRP 値を測定した後に nCD64 をフローサイトメーターで測定した. この結果, 白血球数と CRP 値は細菌感染症と各疾患群との間に一部を除いて有意差を認めなかった. 一方, nCD64 (中央値と四分位範囲, 単位 molecules/cell)は, 血液腫瘍性疾患 1848 (1530-2703), 悪性固形腫瘍 1398 (871-1534), 若年性特発性関節炎 1183 (863-3266), 全身性エリテマトーデス 1029 (647-1473), 細菌感染症 5904 (3757-9902), コントロール 1575 (1084-2044)であり, 細菌感染症が各疾患群よりも有意に高値であった. 以上から nCD64 測定は小児のがん・膠原病と細菌感染症との鑑別に有用であると考えられた.

*Key words* : cancer, collagen disease, bacterial infection, neutrophil CD64, children

### I. 緒 言

Cluster of differentiation (CD) 64 は IgG の高親和性 Fc レセプターの一つ (Fc  $\gamma$  receptor-I) であり, 単球やマクロファージでは恒常的に高発現している. 好中球における CD64 発現量(以下 nCD64 と略)は通常少ないが, 細菌感染症<sup>1)</sup>によって増加することが示されて以来, 成人<sup>2)</sup>と新生児<sup>3,4)</sup>の細菌感染症や敗血症の有用なマーカーとして報告されて

きた.

一方, 小児がんや膠原病は初発時や再発・再燃時に発熱をきたし, CRP 陽性となる. 発熱や CRP 陽性は細菌感染症でも認められることから, 原疾患と細菌感染症合併との鑑別には困難を伴う. 成人の一部のがん<sup>5,6)</sup>では nCD64 が増加し, 関節リウマチ(以下 RA と略)や全身性エリテマトーデス(以下 SLE と略)<sup>7-9)</sup>では, 細菌感染症の合併がない場合, nCD64 は増加しないことが報告されている. しかし, 小児のがんや膠原病において nCD64 を測定した報告はない.

Corresponding author: Seiya Tagane  
stagane@iwate-med.ac.jp

本研究では、小児のがんと膠原病、細菌感染症、およびコントロールの白血球数、CRP 値、nCD64 を測定し、細菌感染症との鑑別におけるこれらの検査の有用性を検討した。

## II. 研究材料及び方法

本研究は岩手医科大学倫理委員会の承認を受けて行った (H21-155)。

### 1. 対象

対象は2010年11月から2015年8月の間に当科と関連病院小児科を受診した小児がん [血液腫瘍性疾患13人 (年齢範囲, 5か月-15歳), 悪性固形腫瘍8人 (10か月-17歳)] と膠原病 [関節型若年性特発性関節炎 (以下 JIA と略) 17人 (1歳-19歳), SLE 6人 (9歳-18歳)], 細菌感染症25人 (1日-19歳), コントロール223人 (8日-19歳) とした。

血液腫瘍性疾患の診断には WHO 分類第4版 (2008年)<sup>10)</sup> を用い、悪性固形腫瘍の診断は病理組織生検の結果に従った。JIA の診断は若年性特発性関節炎初期診療の手引き (2007年)<sup>11)</sup> に、SLE の診断は厚生省研究班 (1986年) の診断基準<sup>12)</sup> に従った。細菌感染症は37.5℃以上の発熱があり、病原体が迅速検査や培養で証明されたものとした。コントロールは20歳未満で感染症候がなく、白血球数と白血球分画が年齢別基準範囲内かつCRPが陰性であるものとした。

### 2. 採血時期、検体の処理と保存法

採血時期は、小児がんでは初発時または再発時の治療開始前とし、膠原病では初発時の治療開始前または再燃時 (維持療法中) とした。細菌感染症の採血時期は抗菌薬による治療開始前とした。検体は外来や病棟で採取した末梢血を用い、白血球数やCRP 値を測定した後に、EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) で抗凝固処理した血液の残りで nCD64 を測定した。nCD64 は温度や保存期間によって影響を受ける<sup>13)</sup> ため、4℃の冷蔵庫に保管し、48時間

以内に測定した。

### 3. 好中球 CD64 発現量の定量

全血 50  $\mu$ l を QuantiBRITE CD64 PE (phycoerythrin) /CD45 PerCP (peridinin chlorophyll protein) (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA, 以下 BD 社) 20  $\mu$ l に加えて攪拌し、暗所室温で30分静置した。次に、赤血球を溶血させるため、蒸留水で10倍希釈した FACS lysing solution (BD 社) 2 ml を添加して攪拌し、暗所室温で10分静置した。溶血後の検体を FACS Calibur flow cytometer (BD 社) にかけて、CD45 PerCP/side scatter の2つのパラメータ表示されたサイトグラムにより顆粒球集団をゲートし、好中球 10000 events における平均 PE 蛍光強度を測定した。なお、QuantiBRITE CD64 PE/CD45 PerCP は、CD64-PE 抗体1つに蛍光標識である PE 分子が1つ結合するように設計されており、検量線を用いることで細胞1個当たりのCD64分子量を定量的に測定することが可能である。

検量線の作成には QuantiBRITE phycoerythrin fluorescence quantitation kit (BD 社) を用いた。これは PE 分子が既知数の4種類の beads を含んでおり、これを phosphate-buffered saline (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA) 500  $\mu$ l で溶解し、フローサイトメーターで4種類の平均蛍光強度を測定して検量線を作成した。検量線から好中球1細胞当たりのCD64発現量を算出した。

### 4. 統計学的検定

2群間の比較は Mann-Whitney 検定で、3群間以上の比較は Kruskal-Wallis 検定 (Steel-Dwass 補正) で行った。これらの結果は、特に断りがない限り中央値 (四分位範囲) で表した。統計解析にはエクセル統計 2015 (社会情報サービス, 東京) を使用し、有意水準を  $p < 0.05$  とした。

表 1. 各疾患群の内訳

血液腫瘍性疾患 (13)	悪性固形腫瘍 (8)	膠原病 (23)	細菌感染症 (25)
急性リンパ性白血病 (5)	神経芽腫 (3)	若年性特発性関節炎 (17)	溶血性レンサ球菌 (10)
ランゲルハンス細胞組織球症 (3)	網膜芽細胞腫 (2)	全身性エリテマトーデス (6)	大腸菌 (4)
急性骨髄性白血病 (2)	Ewing 肉腫 (1)		百日咳菌 (3)
悪性リンパ腫 (2)	横紋筋肉腫 (1)		インフルエンザ桿菌 (2)
若年性骨髄単核球性白血病 (1)	血管肉腫 (1)		クレブシエラ・ニューモニエ (2)
			黄色ブドウ球菌 (1)
			メチシリン耐性ブドウ球菌 (1)
			サルモネラ菌 (1)
			マイコプラズマ (1)

( ) 内は人数を示す。

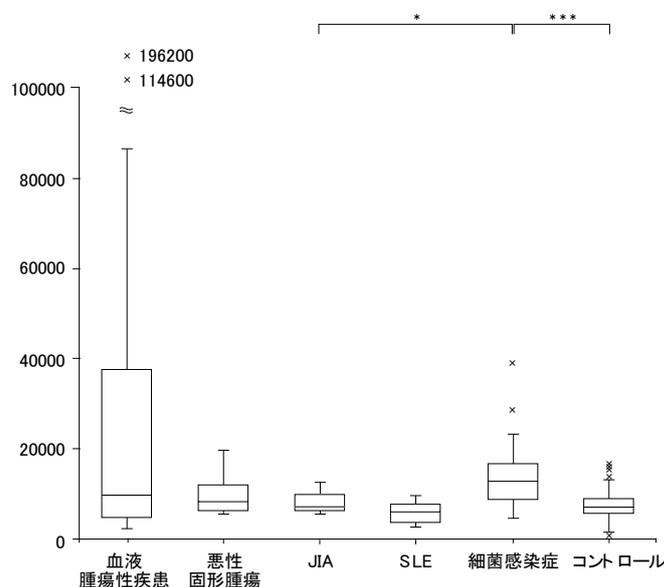


図 1. 各疾患群の白血球数

箱ひげ図の中の横線は中央値，下端は 25 パーセントイル値 (Q1)，上端は 75 パーセントイル値 (Q3)，縦線は箱の高さ (Q3 - Q1) の 1.5 倍を超えない範囲での最大値と最小値を表す。×は外れ値を示す。

JIA, 若年性特発性関節炎；SLE, 全身性エリテマトーデス。

\*  $p < 0.05$ ；\*\*\*  $p < 0.001$

### III. 結 果

各疾患群の内訳を表 1 に示す。血液腫瘍性疾患と悪性固形腫瘍，膠原病の初発は，急性リンパ性白血病 4 人，悪性リンパ腫 2 人，若年性骨髄単核球性白血病 1 人，悪性固形腫瘍 8 人，JIA 7 人，SLE 2 人で，残りは再発・再燃であった。細菌感染症の病原体ごとの病名は，溶血性レンサ球菌が急性扁桃腺炎 6 人，敗血症 2 人，髄膜炎 2 人，大腸菌が尿路感染症 2 人，溶血性

尿毒症症候群 2 人，百日咳菌が百日咳 3 人，インフルエンザ桿菌が急性肺炎 2 人，クレブシエラ・ニューモニエが尿路感染症 2 人，以下 1 人ずつで黄色ブドウ球菌が急性気管支炎，メチシリン耐性ブドウ球菌が敗血症，サルモネラ菌が髄膜炎，マイコプラズマが急性肺炎であった。

#### 1. 白血球数の比較

各疾患群の白血球数を図 1 に示す。各疾患群 (単位  $/\mu\text{l}$ ) の比較では，細菌感染症 [12700

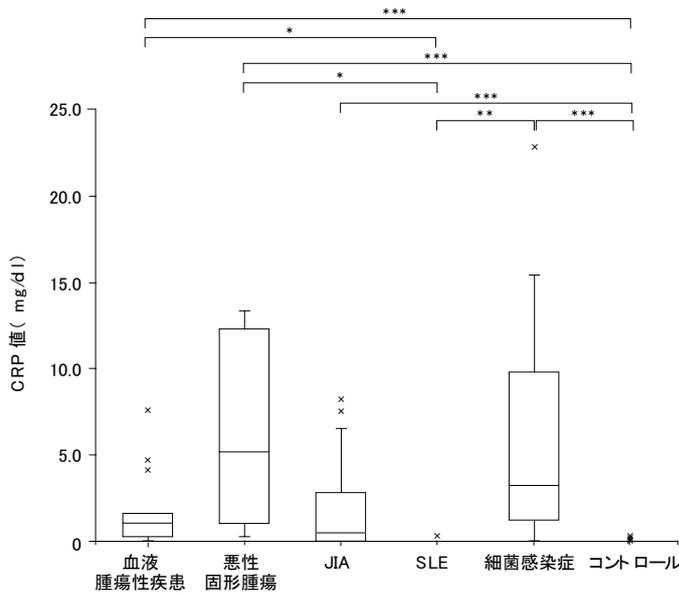


図2. 各疾患群のCRP 値  
箱ひげ図と略語の説明は図1と同じ.  
\* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001

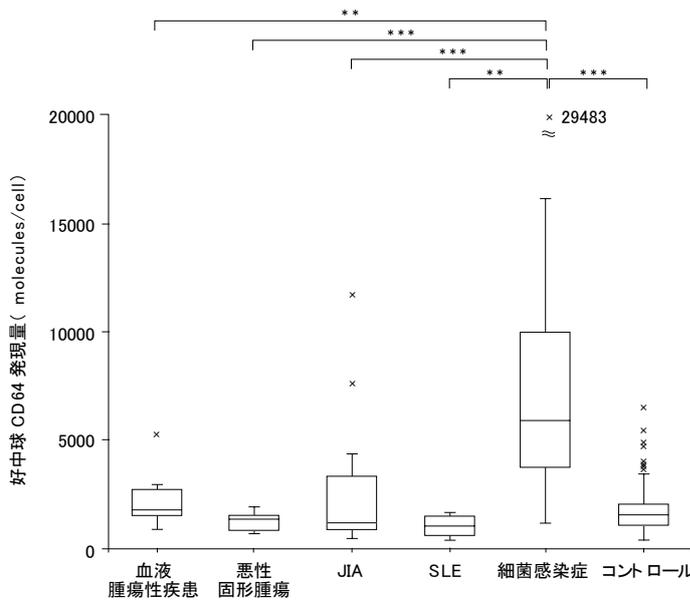


図3. 各疾患群の好中球 CD64 発現量  
箱ひげ図と略語の説明は図1と同じ.  
\*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001

(9030-16710)] は JIA [7420 (6350-9820)] ( $p < 0.05$ ) とコントロール [7010 (5680-8885)] ( $p < 0.001$ ) よりも有意に高値であった. 他の群間比較では有意差を認めなかった.

### 2. CRP 値の比較

各疾患群の CRP 値を図2に示す. 各疾患群 (単位 mg/dl) の比較では, 血液腫瘍性疾患 [1.1 (0.3-1.6)] と悪性固形腫瘍 [5.2 (1.1-12.3)] は SLE [0.0 (0.0-0.0)] ( $p < 0.05$ ) とコントロール [0.0 (0.0-0.0)] ( $p < 0.001$ ) よりも有意に高

値を示した. また, JIA [0.4 (0.0-2.7)] はコントロール [0.0 (0.0-0.0)] ( $p < 0.001$ ) よりも有意に高値を示し, 細菌感染症 [3.2 (1.3-9.8)] は SLE [0.0 (0.0-0.0)] ( $p < 0.01$ ) とコントロール [0.0 (0.0-0.0)] ( $p < 0.001$ ) よりも有意に高値であった. 他の群間比較では有意差を認めなかった.

### 3. 好中球 CD64 発現量の比較

各疾患群の nCD64 を図3に示す (単位 molecules/cell). 細菌感染症 [5904 (3757-9902)]

は血液腫瘍性疾患 [1848 (1530-2703)] ( $p < 0.01$ ), 悪性固形腫瘍 [1398 (871-1534)] ( $p < 0.001$ ), JIA [1183 (863-3266)] ( $p < 0.001$ ), SLE [1029 (647-1473)] ( $p < 0.01$ ), コントロール [1575 (1084-2044)] ( $p < 0.001$ ) よりも有意に高値であった。他の群間比較では有意差を認めなかった。

nCD64 を疾患群の病型別 (3 例以上, 単位 molecules/cell) にみると, 血液腫瘍性疾患では急性リンパ性白血病 ( $n=5$ ) 1530 (1292-1617), ランゲルハンス細胞組織球症 ( $n=3$ ) 1862 (1737-2282) であった。また, 悪性固形腫瘍では神経芽腫 ( $n=3$ ) 1515 (1182-1733) であった。これらの各疾患間では nCD64 に一定の傾向を認めなかった。

nCD64 を疾患群の年齢層別 (3 例以上, 単位 molecules/cell) にみると, 血液腫瘍性疾患では 1-5 歳 ( $n=3$ ) 1613 (1381-1738), 11-15 歳 ( $n=6$ ) 1574 (1351-2084), 悪性固形腫瘍では 1-5 歳 ( $n=5$ ) 878 (849-1495), JIA では 6-10 歳 ( $n=4$ ) 918 (757-1411), 11-15 歳 ( $n=6$ ) 1134 (863-2976), 16-19 歳 ( $n=6$ ) 1324 (1011-2805), SLE では 11-15 歳 ( $n=4$ ) 1029 (784-1269) であった。これらの各年齢層間では nCD64 に一定の傾向は認められなかった。

#### IV. 考 察

nCD64 は interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )<sup>14)</sup> や granulocyte colony-stimulating factor<sup>14,15)</sup>, lipopolysaccharide<sup>16)</sup> の投与で発現量が増加し, また, INF- $\gamma$  や tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-6 (IL-6) と相関する<sup>17)</sup> ことから, 感染症マーカーとして成人や新生児で用いられている。しかし, 小児で測定した報告はなかった。我々は nCD64 を小児の感染症と川崎病で測定し, その診断における有用性を報告した<sup>18)</sup>。本研究ではさらに, 臨床的に鑑別が困難な小児のがん・膠原病と細菌感染症の検査に nCD64 が有用であることが示された。

炎症マーカーとしてルーチン検査となっている CRP は, IL-6 の刺激により肝臓で産生され, 細菌感染症以外にも腫瘍や膠原病で増加する。Castleman 腫瘍や RA の治療薬として開発されたトシリズマブは, 可溶性 IL-6 受容体に作用して IL-6 の活性を阻害する。このため, トシリズマブ投与時には細菌感染症に罹患しても発熱がなく, CRP も増加しない。しかし, nCD64 は増加するため, トシリズマブ投与時でも nCD64 は細菌感染症の指標となり得ることが報告されている<sup>19)</sup>。

nCD64 を小児のがんや膠原病で測定した報告はない。成人では nCD64 が methotrexate 関連リンパ腫<sup>5)</sup> や進行がん (乳がん, 大腸・直腸がん, 肺がん)<sup>6)</sup> で高かったという報告がある。本研究の対象には methotrexate 関連リンパ腫はなく, また, 悪性固形腫瘍の種類も進行度も異なっていた。さらに, 本研究の血液腫瘍性疾患の病型別 nCD64 と, 悪性固形腫瘍の種類別 nCD64, および年齢層別 nCD64 に一定の傾向は認められなかった。しかし, 症例数が少ないため, 今後, 症例数を増やして病型・種類・年齢層別に nCD64 の違いの有無を検討する必要がある。一方, 成人の RA や SLE では nCD64 により細菌感染症との鑑別が有用と報告されている<sup>7-9)</sup>。本研究では, 小児の JIA と SLE でも nCD64 の測定が細菌感染症との鑑別に有用であると考えられた。

nCD64 測定における注意点として, 信頼性のある値を得るためには好中球 10000 events をカウントする必要がある。好中球数が 500/ $\mu$ l 以下の患者では, フローサイトメーターの細胞数カウントが好中球 10000 events に達しないことがある。本研究では血液腫瘍性疾患 5 人 (急性リンパ性白血病の初発時 4 人, 再発時 1 人) と細菌感染症 2 人 (溶血性レンサ球菌 1 人, 緑膿菌 1 人) が好中球 10000 events に達しないため, これらを除外した。

nCD64 の定量解析は, フローサイトメー

ターを有する施設であれば約1時間で施行可能であり, 受託臨床検査会社でも行っている。このため, nCD64は小児のがん・膠原病と細菌感染症とを鑑別する迅速・簡便なマーカーとして有望と考えられた。

利益相反: 著者には開示すべき利益相反はない。

## References

- 1) **Guyre PM, Campbell AS, Kniffin WD, et al.:** Monocytes and polymorphonuclear neutrophils of patients with streptococcal pharyngitis express increased numbers of type I IgG Fc receptors. *J Clin Invest* **86**, 1892-1896, 1990.
- 2) **Leino L, Sorvajärvi K, Katajisto J, et al.:** Febrile infection changes the expression of IgG Fc receptors and complement receptors in human neutrophils *in vivo*. *Clin Exp Immunol* **107**, 37-43, 1997.
- 3) **Fjaertoft G, Håkansson L, Ewald U, et al.:** Neutrophils from term and preterm newborn infants express the high affinity Fc $\gamma$ -receptor I (CD64) during bacterial infections. *Pediatr Res* **45**, 871-876, 1999.
- 4) **Ng PC, Li K, Wong RPO, et al.:** Neutrophil CD64 expression: a sensitive diagnostic marker for late-onset nosocomial infection in very low birthweight infants. *Pediatr Res* **51**, 296-303, 2002.
- 5) **Komiya A, Matsui T, Horie K, et al.:** Neutrophil CD64 is upregulated in RA patients with lymphoma but not in other solid cancers. *Mod Rheumatol* **26**, 216-223, 2016.
- 6) **Comolli G, Torchio M, Lenta E, et al.:** Neutrophil CD64 expression: a reliable diagnostic marker of infection in advanced cancer patient? *New Microbiol* **38**, 427-430, 2015.
- 7) **Allen E, Bakke AC, Purtzer MZ, et al.:** Neutrophil CD64 expression: distinguishing acute inflammatory autoimmune disease from systemic infections. *Ann Rheum Dis* **61**, 522-525, 2002.
- 8) **Matsui T, Ohsumi K, Ozawa N, et al.:** CD64 on neutrophils is a sensitive and specific marker for detection of infection in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* **33**, 2416-2424, 2006.
- 9) **Nishino J, Tanaka S, Kadono Y, et al.:** The usefulness of neutrophil CD64 expression in the diagnosis of local infection in patients with rheumatoid arthritis in daily practice. *J Orthop Sci* **15**, 547-552, 2010.
- 10) **Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al.:** WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues, 4th ed, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 2008.
- 11) **横田俊平, 森 雅亮, 今川智之, 他:** 若年性特発性関節炎初期診療の手引き (2007年). *日小児会誌* **111**, 1103-1112, 2007.
- 12) **渡辺言夫:** 小児膠原病の診断・治療に関する研究. 厚生省心身障害研究. 小児慢性疾患の診断・治療・管理に関する研究班. 昭和60年度研究報告書 (主任研究者, 植田 穰), pp.9-12, 1986.
- 13) **松下翔子, 稲垣賀子, 中辻幸恵, 他:** 好中球 CD64 発現量の小児基準値の検討. *岩手医誌* **64**, 269-275, 2012.
- 14) **Buckle AM and Hogg N:** The effect of IFN- $\gamma$  and colony-stimulating factors on the expression of neutrophil cell membrane receptors. *J Immunol* **143**, 2295-2301, 1989.
- 15) **Repp R, Valerius T, Sendler A, et al.:** Neutrophils express the high affinity receptor for IgG (Fc $\gamma$  RI, CD64) after *in vivo* application of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* **78**, 885-889, 1991.
- 16) **Wagner C, Deppisch R, Deneffle B, et al.:** Expression patterns of the lipopolysaccharide receptor CD14, and the Fc $\gamma$  receptors CD16 and CD64 on polymorphonuclear neutrophils: data from patients with severe bacterial infections and lipopolysaccharide-exposed cells. *Shock* **19**, 5-12, 2003.
- 17) **van der Meer W, Pickkers P, Scott CS, et al.:** Hematological indices, inflammatory markers and neutrophil CD64 expression: comparative trends during experimental human endotoxemia. *J Endotoxin Res* **13**, 94-100, 2007.
- 18) **朝倉賀子, 林 祐子, 松下翔子, 他:** 小児の感染症と川崎病における好中球 CD64 発現量の検討. *岩手医誌* **65**, 285-292, 2013.
- 19) **Matsui T, Komiya A, Shimada K, et al.:** Neutrophil CD64 as a marker of infection in patients treated with tocilizumab. *Mod Rheumatol* **19**, 696-697, 2009.

## Expression of neutrophil CD64 antigen in children with cancer, collagen disease and bacterial infection

Seiya Tagane<sup>1)</sup>, Mikiya Endo<sup>1)</sup>, Yuko Hayashi<sup>2)</sup>,  
Yoshiko Asakura<sup>1)</sup>, Shoko Miura<sup>1)</sup> and Shoichi Chida<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Pediatrics, School of Medicine,  
Iwate Medical University, Morioka, Japan

<sup>2)</sup>Department of Pediatrics, Iwate Prefectural Rehabilitation and  
Nursery Center for Disabled Children, Morioka, Japan

*(Received on January 15, 2016 & Accepted on February 28, 2016)*

---

### Abstract

We analyzed the number of white blood cells (WBC), C-reactive protein (CRP) levels, and neutrophil CD64 expressions (nCD64) in children with cancer [hematological malignancies (n=13) and malignant solid tumors (n=8)] and collagen diseases [juvenile idiopathic arthritis (JIA, n=17) and systemic lupus erythematosus (SLE, n=6)] and conducted comparisons with children with bacterial infections (n=25) and controls (n=223). We used blood samples of each disease obtained at onset or relapse/recurrence. In all but a few intergroup comparisons, WBC and CRP were not significantly

different. However, nCD64 was significantly higher in patients with bacterial infections than in patients with hematological malignancies, malignant solid tumors, JIA, SLE, and controls because median (interquartile range, molecules/cell) nCD64 levels were 1848 (1530–2703) in hematological malignancies, 1398 (871–1534) in malignant solid tumors, 1183 (863–3266) in JIA, 1029 (647–1473) in SLE, 5904 (3757–9902) in bacterial infections, and 1575 (1084–2044) in controls. We thus considered nCD64 to be a useful marker for differentiating cancer and collagen diseases from bacterial infections in children.

---