

表2 Carvediliによる心行動態と心機能の変化

	反応良好群		反応不良群	
	Baseline	End	Baseline	End
左室拡張終期径(mm)	66±7	60±7	69±5	68±5†
左室収縮終期径(mm)	59±8	46±10*	61±4	59±5*
左室駆出率(%)	25±12	46±17‡	24±6	27±8†
収縮期血圧(mm Hg)	118±15	128±15	110±10	112±13†
拡張期血圧(mm Hg)	73±9	73±14	69±6	66±13

mean±SD

vs. 反応良好群 \*p&lt;0.01 †p&lt;0.05; vs. Baseline ‡p&lt;0.01 §p&lt;0.05

表3 Carvediliによる心電図諸指標の変化

	反応良好群		反応不良群	
	Baseline	End	Baseline	End
最大QT(sec)	0.444±0.046	0.443±0.042	0.447±0.029	0.453±0.046
最少QT(sec)	0.371±0.038	0.390±0.036	0.394±0.030	0.394±0.028
QT dispersion(sec)	0.073±0.022	0.053±0.024	0.053±0.017	0.059±0.025
最大QTc(sec)	0.479±0.026	0.455±0.038*	0.481±0.050	0.465±0.054
最少QTc(sec)	0.400±0.026	0.400±0.022	0.424±0.036	0.406±0.047
QTc dispersion(sec)	0.078±0.021	0.055±0.025*	0.058±0.023	0.059±0.023
RR間隔(sec)	0.866±0.145	0.954±0.149	0.883±0.177	0.969±0.197

\*p&lt;0.05 vs. baseline

mean±SD

同様の意義を有するJTc dispersionが、突然死や不整脈事故の独立した予測因子であったと報告している。

その一方で、Feiら<sup>8)</sup>やBrendorpら<sup>9)</sup>のように、QT dispersionはうっ血性心不全患者において、全死亡および心不整脈死亡を予測しえなかったとの報告もあり、心不全患者においてQT dispersionが突然死(生命予後)を予測しうるか否かは未だ明らかでない。

従来、QT dispersionと单相性活動電位の相関が良好であると報告され、QT dispersionは心臓表面の再分極時間の不均一性の指標になり得ると考えられていたが、最近、心電図誘導理論からQT dispersionの意義が再び問われている。しかし、QT dispersionは簡便で、安価な検査指標であることから、症例の臨床経過の追跡により評価法としての意義と限界について、さらに検討する必要があると考えられた。

### 【結論】

Carvedilol投与による左室収縮機能の改善は心筋の再分極過程の不均一性の改善を伴うことが示唆された。

### 【参考文献】

- 1) Packer M, Bristow MR, Cohn JN, Colucci WS, Fowler MB, Gilbert EM, Shusterman NH, for the U.S. Carvedilol Heart Failure Study Group: The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. *N Engl J Med* 1996; 334: 1349-1355
- 2) Fesmire SI, Marcoux LG, Lyyski DS, Sprague MK, Kennedy HL, Eichhorn EJ: Effect of selective versus nonselective beta blockade on QT dispersion in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1999; 84: 350-354
- 3) Peng D, Zhao S, Chen Y, Li X: Effect of bisoprolol on QT dispersion in patients with congestive heart failure - The etiology-dependent response. *Int J Cardiol* 2001; 77: 141-148
- 4) Cice G, Tagliamonte E, Ferrara L, Iacono A: Efficacy of carvedilol on complex ventricular arrhythmias in dilated

- cardiomyopathy: double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Eur Heart J* 2000; 21: 1259-1264
- 5) Okin PM, Devereux RB, Howard BV, Fabsitz RR, Lee ET, Welty TK: Assessment of QT interval and QT dispersion for prediction of all-cause and cardiovascular mortality in American Indians: The Strong Heart Study. *Circulation* 2000; 101: 61-66
- 6) Galinier M, Vialette JC, Fourcade J, Cabrol P, Dongay B, Massabuau P, Boveda S, Doazan JP, Fauvel JM, Bounhoure JP: QT interval dispersion as a predictor of arrhythmic events in congestive heart failure. Importance of aetiology. *Eur Heart J* 1998; 19: 1054-1062
- 7) Fu GS, Meissner A, Simon R: Repolarization dispersion and sudden cardiac death in patients with impaired left ventricular function. *Eur Heart J* 1997; 18: 281-289
- 8) Fei L, Goldman JH, Prasad K, Keeling PJ, Reardon K, Camm AJ, McKenna WJ: QT dispersion and RR variations on 12-lead ECGs in patients with congestive heart failure secondary to idiopathic dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 1996; 17: 258-263
- 9) Brendorp B, Elming H, Jun L, Kober L, Malik M, Jensen GB, Torp-Pedersen C, for the Diamond Study Group: QT dispersion has no prognostic information for patients with advanced congestive heart failure and reduced left ventricular systolic function. *Circulation* 2001; 103: 831-835

## combined therapy の慢性心不全に対する効果

清水 紀宏 岡本 洋 賈 楠  
 菅原 武 松井 裕 千葉 知  
 熊本 秀樹 秋野 正敏 北 畠 顕

北海道大学循環病態内科

### 【背景】

最近、アンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬 (ARB) が使用されるようになり、レニン・アンジオテンシン系をより強力に block できる薬剤として期待されている。現に ELLITE II trial<sup>1)</sup> や Val-Heft trial<sup>2)</sup> では ARB は ACEI と同等の効果のあることが報告されている。しかし、当初の期待とうらはらに ACEI を越える効果は報告されていない。そこで我々は、ACEI にも ARB にもレニン・アンジオテンシン系を阻害する効果以外にそれぞれブラディキニンやアンジオテンシンⅡ受容体 type II への作用などの additive な効果があるため、両薬剤を併用することで相加的な効果が得られるものと考えた。

### 【目的】

ACEI と ARB の併用療法の慢性心不全に対する有用性を明らかにし、その機序を検討する。

### 【方法】

ACEI は enalapril を、ARB は valsartan を使用した。model 動物は、Cardiomyopathic hamster (BIO TO2) を使用した。6 週令から薬剤の投与を開始した。当初、薬剤の用量別の効果を明らかにするため、併用療法間での効果の検討を行ったところ、Fig. 1 に示すように valsartan の用量が多い群ほど予後の延長効果が認められた。そこで、併用群としては enalapril (30mg/kg/day) + valsartan (500mg/kg/day) (以下 EV 群) を用い以下の検討を行った。比較対照は enalapril (30mg/kg/day) (以下 E 群)、plasebo (以下 C 群) とした。生命予後は Kaplan-Meier 法で検定した。心機能の指標として、1.4-French microtip catheter

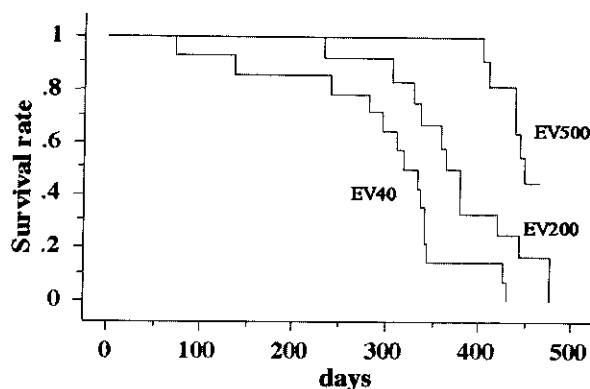


Fig. 1

(SPR-677, Millar) を用いた心臓カテーテル法で +dP/dt, -dP/dt, 13MHz の linear scanner (Hitachi EUB565A) を用いた心エコー図法で left ventricular end-diastolic dimension (LVDd), percent fractional shortening (%FS), E/A, deceleration time (DT) を計測した。組織学的検討としてアザン染色, ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、線維化率、心筋細胞核密度を算出した。統計は one way ANOVA を用いた。

### 【結果】

各群間で体重、肝機能、腎機能に有意差を認めなかった。心拍数も各群で有意差なく、左室収縮期圧は C 群  $77.3 \pm 5.815$  mmHg に対して E 群  $62.78 \pm 5.817$  mmHg, EV 群  $56.8 \pm 4.116$  mmHg と薬剤投与群で有意に低下していた ( $p < 0.01$ ) が、E 群と EV 群とでは有意差を認めなかった。Fig. 2 に Kaplan-Meier 曲線を示す。E 群は C 群より、EV 群は E 群より有意に予後を改善した。血行動態指標を Table 1 に示す。+dP/dt, -dP/dt のいずれも EV 群は E 群より有意に悪化を抑制していた。心エコー図の各指

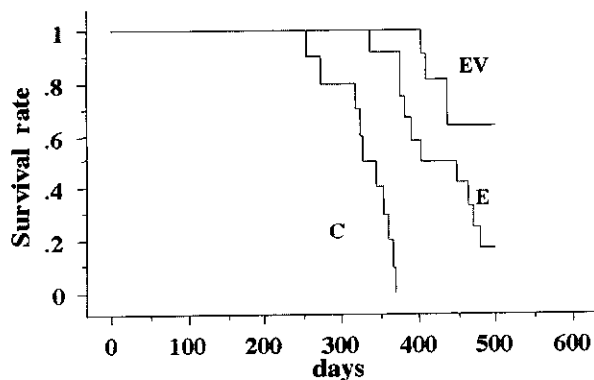


Fig. 2

Table 1 Hemodynamic parameters in Bio TO2 and F1b hamsters

	positive dP/dT max	negative dP/dT min
control (n=5)	2532.22 ± 421.926	-1924.22 ± 237.386
enalapril (n=5)	2404.46 ± 391.764	-1748.42 ± 204.664
combination (n=5)	3064.860 ± 452.394 <sup>(a)</sup>	-2253.82 ± 276.076 <sup>(a)</sup>

values are means ± S.D.; control, untreated Bio TO2; enalapril, Bio TO2 treated with enalapril; combination, Bio TO2 treated with enalapril and valsartan; positive dP/dT max, maximum rate of rise of ventricular pressure; negative dP/dT min, peak rate of fall of ventricular pressure.

a) p < 0.05 vs. enalapril

Table 2 Echocardiographic parameters in Bio TO2 and F1b hamsters

	LVDD (mm)	%FS (%)	E/A	DcT (msec)
control (n=5)	74.6 ± 6.465	10.618 ± 3.555	4.94 ± 1.047	45.95 ± 8.211
enalapril (n=5)	65.8 ± 5.263 <sup>(b)</sup>	17.06 ± 2.124	3.03 ± 0.839 <sup>(b)</sup>	50.85 ± 8.248
combination (n=4)	55.5 ± 4.796 <sup>(a)(c)</sup>	26.45 ± 7.911 <sup>(a)(c)</sup>	1.738 ± 0.344 <sup>(a)</sup>	62.469 ± 5.386 <sup>(b)</sup>

values are means ± S.D.; control, untreated Bio TO2; enalapril, Bio TO2 treated with enalapril; combination, Bio TO2 treated with enalapril and valsartan; LVDD, left ventricular diastolic dimension; %FS, percent fractional shortening; AoD, aorta dimension; DcT, deceleration time; E/A, early filling velocity/atrial filling velocity

a) p < 0.01 vs. control

b) p < 0.05 vs. control

c) p < 0.05 vs. enalapril

標を Table 2 に示す。E 群は C 群より、EV 群は E 群より有意に LVDD の拡大を抑制した。

また、EV 群は C 群、E 群より有意に %FS の低下を抑制した。経僧帽弁血流波形では C 群は restrictive pattern を示し、E 波の極端な増高、A 波の消失を認めた。しかし、薬剤を投与する事で E 波が低下、A 波が増高し、deceleration time の延長を認め、restrictive pattern の改善を認めた。組織学的指標を Table 3 にしめす。心筋細胞横径には各群で有意差を認めないものの、心筋細胞核密度は EV 群で有意に保持されていた。また E 群は C 群より、EV 群は E 群より有意に線維化の抑制を認めた。

### 【考 察】

慢性心不全に対する ACEI の有効性は明らかであるが、その機序としてレニン・アンジオテンシン系の block とブラディキニンの分解抑制の 2 点が大きな役割を果たしていると考えられている。しかし、人ではキマーゼの関与により ACEI のレニン・アンジオテンシン系の阻害は不十分であると認識されている。そこでより強力にレニン・アンジオテンシン系を阻害できる ARB は心不全に対して ACEI を越える効果が期待された。しかし、ELLITE II や Val-Heft trial の結果では、生命予後に関して ACEI を越える効果は認められなかった。その理由は明らかではないが我々は投与の期間と心

Table 3 Histologic parameters in Bio TO2 and F1b hamsters

	nuclear density of cardiomyocytes (No./mm <sup>2</sup> )	%fibrosis (%)
control (n=5)	39.100 ± 7.015	6.502 ± 1.065
enalapril (n=5)	34.300 ± 3.144	5.002 ± 0.727 <sup>(b)</sup>
combination (n=4)	54.5 ± 13.5 <sup>(c)</sup>	3.708 ± 0.812 <sup>(a)(c)</sup>

values are means ± S.D.; control, untreated Bio TO2; enalapril, Bio TO2 treated with enalapril; combination, Bio TO2 treated with enalapril and valsartan;

a) p < 0.01 vs. control

b) p < 0.05 vs. control

c) p < 0.05 vs. enalapril

不全の重症度にあると考え、心不全モデルハムスター BIO TO2 に対して、薬剤をできるだけ早期から終生にいたるまで投与を行った。

心不全モデルハムスター BIO TO2 はサルコグリカンが欠損している<sup>3)</sup>。またサルコグリカンの knock out mouse が心不全を呈する<sup>4)</sup>ことから、サルコグリカンの欠損が心機能に強く影響を与えていると考えられているものの、その心不全を発症する機序に関しては明らかではなく、心機能は進行性に低下し、13週では左室短縮率で10～15%、20週では7～10%となる。また自然予後では約30～40週で心不全死するとされており、重症心不全モデルと考えることができる。

本研究の結果、ACE 阻害薬と ARB の併用投与群では ACE 単独投与群よりも予後の改善効果を認め、収縮能、拡張能ともに有意な改善を認めた。

#### 【結語】

拡張型心筋症による慢性心不全モデルに combined therapy を投与した場合、ACEI 単独投与に比較し、予後、収縮能、拡張能いずれも改善を認めた。その機序は心筋細胞保持効果、線維化抑制効果によると考えられた。

#### 【参考文献】

1) Pitt B, Poole-Wilson PA, Segal R, et al.

Effect of losartan compared with captopril on mortality in patients with symptomatic heart failure: randomised trial—the Losartan Heart Failure Survival Study ELITE II. *Lancet*. 2000; 355(9215): 1582–1587

2) The Val-HeFT Investigators. Effect of the angiotensin receptor blocker valsartan on morbidity and mortality in heart failure: the Valsartan Heart Failure Trial (Val-HeFT). *Circulation*. 2000; 102: 2672–b.

3) Sakamoto A, Ono K, Abe M, et al. Both hypertrophic and dilated cardiomyopathies are caused by mutation of the same gene,  $\delta$ -sarcoglycan, in hamster: an animal model of disrupted dystrophin-associated glycoprotein complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94: 13873–13878

4) Ramon C, Ronald D, Steven A, et al. Disruption of the sarcoglycan-sarcospan complex in vascular smooth muscle: A novel mechanism for Cardiomyopathy and muscular dystrophy. *Cell*. 1999; 98: 465–474

## T細胞活性化補助シグナルの遮断による 実験的自己免疫性心筋炎の治療効果の検討

松井 裕 上出 利光

北海道大学遺伝子病制御研究所分子免疫分野

清水 紀宏 千葉 知岡 本 洋

北 嶋 顕

北海道大学大学院医学研究科循環器病態内科学

### 【研究要旨】

抗原特異的なT細胞活性化にはT細胞レセプターを介した抗原認識シグナルと、第二シグナル(costimulatory signal)が必要であるが、CTLA4IgはB7と結合してCD28との結合を阻害し、細胞性免疫を抑制させることが知らされている。一方、ラット実験的自己免疫性心筋炎(EAM)は、T細胞依存性の自己免疫性疾患であることが報告されている。今回、CTLA4Igを組み込んだアデノウイルスベクター(AdexCTLA4Ig)を用いて、T細胞活性化補助シグナルの遮断のEAMにおける治療効果を検討した。ブタ心筋ミオシンと完全フロイントアジュバントを混和したものを7週齢のルイスラットに皮下注してEAMを作成した。治療群では免疫後0day(CTLA0群)または14day(CTLA14群)にAdexCTLA4Igを静脈内投与した。免疫後21dayに犠牲死させ肉眼的検討、心体重比測定、組織学的検討を行った。心筋炎の重症度は、心体重比および炎症細胞浸潤面積比で評価した。心筋炎群では肉眼的には心臓の腫大と心臓表面の変色、組織学的には多数の炎症性細胞浸潤を伴う広範な心筋壊死像が観察された。CTLA4Ig治療群では、CTLA0群ではほぼ完全に発症抑制が認められ、CTLA14群では完全ではないが部分的に治療効果が認められた。EAMにおいてAdexCTLA4IgによるT細胞活性化補助シグナル遮断の治療効果が示された。

### 【研究目的】

抗原特異的なT細胞活性化にはT細胞レセプ

ターを介した第一シグナルと、補助刺激シグナルである第二シグナルが必要だが、CTLA4IgはB7と結合してCD28との結合を阻害し、抗原特異的な抗原抗体反応を抑制すること、また種々の自己免疫疾患や移植モデルなどで有効であることが既に報告されている。一方、Lewisラットを心筋ミオシンで感作すると、重症な心筋炎を発症し、その機序はT細胞依存性の自己免疫疾患であることが報告されている。ラット自己免疫性心筋炎は急性期に心臓に多数の単核球の浸潤と特徴的な巨細胞の出現を認め、また重症の心不全を発症し、一部は心不全死をきたし、ヒト巨細胞性心筋炎のモデルとも考えられている。今回われわれは、CTLA4Igを発現するアデノウイルスベクター AdexCTLA4Igを用いて、EAMにおける治療効果を検討した。

### 【研究方法】

(1)ブタ心筋ミオシンとCFAを混和したものを7週齢のルイスラットに皮下注してEAMを作成した。

(2)治療方法 免疫後0日または14日後に、コントロール群ではAdexLacZを、治療群ではAdexCTLA4Igを、 $1.0 \times 10^9$  PFU 静脈内投与した。

(3)治療効果の検討 免疫後21日後に犠牲死させ肉眼的検討、心体重比測定、組織学的検討(HE染色)を行った。組織学的検討では、炎症細胞浸潤面積比を求めた。

(4)血清 CTLA4Ig 濃度の測定 血清中のCTLA4Ig濃度をELISA法で測定した。

Table 1 Summary of Results

	Myocarditis, diseased/total	HW/BW (g/kg)	Macroscopic scores	% Affected area ratios
Normal (n=8)	0/8	2.7±0.4**	0±0**	0±0**
AdexLacZ day 0 (n=12) <sup>f</sup>	12/12	6.7±0.5	3.9±0.1	42.3±3.7
AdexCTLA4Ig day 0 (n=7)	0/7	3.1±0.1**	0±0**	0±0**
AdexCTLA4Ig day 14 (n=9)	9/9	3.9±0.3*	1.9±0.2**	12.3±4.1*

Table 1 Results

<sup>f</sup> In AdexLacZ day 0, three of twelve rats died of heart failure during the experimental period. BW indicate body weight; HW, heart weight, Values are mean±S.E.

\* p<0.05; \*\* p<0.0001, AdexLacZ day 0 vs.

(5)心組織中サイトカイン測定 凍結保存した左室心筋をホモジネート後, その上清中の IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 を ELISA 法で測定した.

### 【結果】

各群における, 重症度評価のまとめを示す (Table 1). 心体重比測定の結果, CTLA0 群ではほぼノーマルコントロールと同等のレベルであり, CTLA14 群では増加はあるが, 心筋炎群と比較すると有意に心体重比の減少を認めた. また, 肉眼的スコア評価においても同様の結果であった. 次に組織学的検討を行った. 心臓は, 短軸最大径のレベルで病理切片をとり, HE 染色を行い, 定量的に組織学的所見を評価するために, 心臓の短軸最大径のレベルの断面積と, 炎症性細胞浸潤面積を NIH image で計測し, 炎症細胞浸潤面積比を求めた. 心筋炎群では, 炎症細胞浸潤面積比の増加を認め, CTLA0 群ではほぼ完全に抑制されており, CTLA14 群では不完全であるが抑制されていた. これらの結果を総合すると, 重症群での心筋炎の発症は CTLA0 群ではほぼ完全に抑制され, CTLA14 群では不完全であるが抑制されているといえる.  $1.0 \times 10^9$  PFU の AdexCTLA4Ig を静注投与した後の血中濃度を ELISA 法で測定した (Fig. 1). 投与 3 日後から血中濃度は上昇し, 21 日後でも十分高い濃度が維持されていた. 代表的な心臓組織光顕像を示す (Fig. 2). 心筋炎群では, 著明な炎症細胞浸潤が認められるが, CTLA0 群では, ほぼ完全にその浸潤は抑制され, CTLA14 群では, 不完全ではあるが, 明らかにその面積は減少し

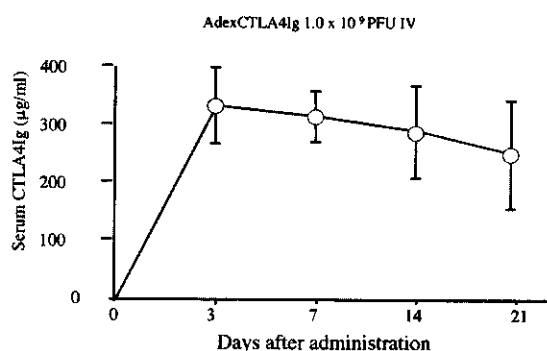


Fig. 1. Serum concentrations of CTLA4Ig after gene transfer. Sera from animals which were treated with AdexCTLA4Ig day 0 (n=8) were harvested at the indicated time points and analyzed by ELISA.

Fig. 1 Serum concentrations of CTLA4Ig after gene transfer

ていた. 次に, コントロール, 心筋炎群, CTLA0 群において, 心組織中のサイトカインを ELISA 法で測定した (Fig. 3). サイトカインについては, Th1 タイプの IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , 炎症性サイトカインである IL-6 を測定した. 心組織中 IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  は, CTLA0 群では心筋炎群と比較して有意にその産生が抑制されていた. IL-6 も, CTLA0 群では心筋炎群と比較して, 有意ではないが抑制されていた.

### 【考察】

抗原特異的な T 細胞活性化には T 細胞レセプターを介した第一シグナルと, 補助刺激シグナルである第二シグナルが必要だが, 第二シグナルの中でも T 細胞上の CD28 と APC 上の B7 とのインターアクションが特に重要であることが知られている. 可溶性キメラ蛋白である CTLA4Ig は, より高い親和性で B7 と結合して CD28 との結合を阻害し, in vitro や in vivo の種々のモデルにおいて, 抗原特異的な



Fig. 2. Representative histology of heart from control rats treated with AdexLacZ on day 0 (A), AdexCTLA4Ig on day 0 (B), and AdexCTLA4Ig on day 14(C).

Fig. 2 Representative histology of heart

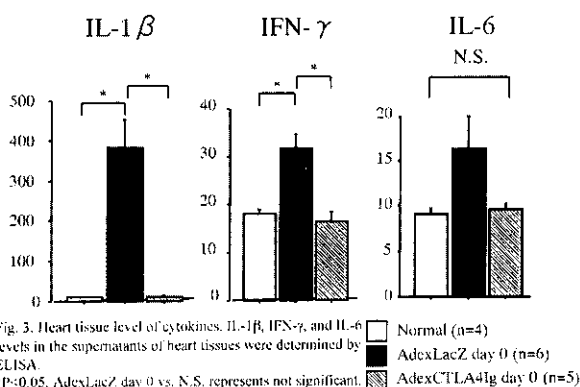


Fig. 3. Heart tissue level of cytokines. IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , and IL-6 levels in the supernatants of heart tissues were determined by ELISA. \*P<0.05, AdexLacZ day 0 vs. N.S. represents not significant.

Fig. 3 Heart tissue level of cytokines (pg/mg protein)

抗原抗体反応を抑制し、免疫寛容状態を誘導することが報告されている。また種々の自己免疫疾患や移植モデルなどにおいてもその有効性が既に報告されている。通常、CTLA4Igを投与する際には、その短い半減期の為に、頻回の投与が必要とされるが、以前、われわれは、CTLA4Igをアデノウイルスベクターに組みこんだ AdexCTLA4Igを開発し、その静注投与における肝臓での発現が長期間にわたり高発現を維持できること、またそのメカニズムCTLA4Igがアデノウイルス自身に対する免疫反応を抑制し抗アデノウイルス抗体の産生を阻害することに起因することを報告した<sup>1)</sup>。一方、Lewis ラットを心筋ミオシンで感作すると、重症な心筋炎を発症し、その機序はT細胞依存性の自己免疫疾患であることが報告されている。

ラット自己免疫性心筋炎(EAM)は急性期に心臓に多数の単核球の浸潤と特徴的な巨細胞の出現を認め、また重症の心不全を発症しその一部は心不全死をきたし、ヒト巨細胞性心筋炎のモデルと考えられている<sup>2)</sup>。また、ヒト心筋炎の原因として、コクサッキーウイルスによるウイルス性心筋炎がその最も多い原因のひとつと考えられており、その治療効果の検討については以前から種々の報告があるが、既存の免疫抑制療法は、宿主の感染源に対する免疫応答をも抑制させる為、多くの場合でむしろ病態を悪化させることが報告されている<sup>3)</sup>。以上のことを踏まえ、われわれは今回、理論的に抗原特異的な抗原抗体反応の抑制が可能であると考えられる補助刺激シグナルの遮断によるEAMの治療効果の検討を行った。また、その際に単回の静注投与で、十分な血中濃度が得られる AdexCTLA4Igを用いた。CTLA4Ig濃度の検討から、AdexCTLA4Igは投与後3日から血中濃度が上昇し、漸減するものの21日後においても維持されていた。また21日後の重症度の検討では、心筋炎群では肉眼的には心臓の腫大と心臓表面の変色、組織学的には多数の炎症性細胞浸潤を伴う広範な心筋壊死像が観察された。CTLA4治療群では、肉眼的所見、心体重比、組織学的検討いずれにおいてもCTLA0群ではほぼ完全に、CTLA14群では完全ではないが有意に心



筋炎の発症を抑制した。以前の報告で、EAMの心筋における炎症細胞浸潤は免疫後13日前後から起こることがいわれており、このことは、補助刺激シグナルの遮断は、ミオシンによる免疫と同時に投与した時のみならず、発症後における病態をも改善する可能性を示唆している。発症後における有効性の機序については、発症後においても、ナイーブT細胞がリクルートメントしてその病態に関与している可能性が考えられる。次に心組織中のサイトカインをELISA法で測定した。サイトカインについては、Th1タイプのIL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、炎症性サイトカインであるIL-6を測定した。心組織中IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ は、CTLA0群では心筋炎群と比較して有意にその産生が抑制されていた。IL-6も、CTLA0群では心筋炎群と比較して、有意ではないが抑制されていた。心臓において、各種サイトカインが重要な役割を果たしており、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ などは、NOを介し、心筋細胞のアポトーシスや、直接障害に関与していることが報告されており、これらのサイトカインの産

生を抑制することは、心筋細胞、心筋収縮力を保存することに直接つながる可能性が考えられる。以上より、AdexCTLA4Igは自己免疫性心筋炎の治療に有効であることが示された。

#### 【結 論】

心筋炎群では肉眼的には心臓の腫大と心臓表面の変色、組織学的には多数の炎症性細胞浸潤を伴う広範な心筋壊死像が観察された。CTLA4治療群では、肉眼的所見、心体重比、組織学的検討いずれにおいてもCTLA0群ではほぼ完全に、CTLA14群では完全ではないが有意に心筋炎の発症を抑制した。

#### 【参考文献】

- 1) Nakagawa I, et al Hum. Gene Ther. 1998; 9: 1739-1745.
- 2) Kodama M, et al Circ Res. 1991 Oct; 69 (4): 1042-50.
- 3) Godsel LM, et al Circulation. 2001 Mar 27; 103(12): 1709-14.

## 細胞膜蛋白遺伝子欠損による心筋症の病態解明と 新しい遺伝子・薬物療法の開発

豊岡 照彦 山崎 研 辺見 智恵子  
増井 藤子 島本 涼一 申 偉秀  
鈴木 順一

東京大学・医学部・器官病態内科・保健管理センター・循環器内科, 理学部・動物学科

河田 登美枝 中澤 幹夫  
新潟大学・病院薬剤部, 医療工学

阪本 英二  
国立循環器病センター・分子生物部門

ト 部 匡 小澤 敬也  
自治医科大学・遺伝子治療部

### 【はじめに】

従来原因不明とされた特発性心筋症の治療として種々の薬物療法が開発され、徐々に進歩しているものの最終的に心不全に陥った症例では根本治療として心移植が行われている。移植にはドナー心の絶対数の不足、脳死の判定など一昨年の移植法制定後も多くの社会的、倫理的な問題の他に、手術が成功しても拒絶反応の確認の為の頻回の心筋生検や生涯にわたる免疫抑制剤の投与など医学的な問題が山積しており、最善の治療とは言い難い。特に小児では医学、倫理の両面から心移植の対象とはされてなく、その代替治療の開発は急務である。心筋症の一部の予後が遺伝子の多型で説明可能であり、適切な薬剤投与により予後が改善される。本稿では最近の分子生物学の急速な進歩により原因遺伝子の確定したジストロフィンまたはジストロフィン結合糖蛋白複合体(Dystrophin-Associated Glycoprotein Complex, DAGC)の先天的な異常に伴う心不全の進展仮説を概説し、次に当教室で解析の進んでいる遺伝子治療の開発経過を報告する。

### 【研究経過】

心筋は収縮・弛緩を恒常的に繰り返す必要か

らその細胞膜は骨格筋以上に強靱さが要求される。筆者らは各種の先天性、および後天性の原因により筋ジストロフィー様の病態が心筋に特異的に発生した結果、重症心不全を来すとする作業仮説を立てた。既にジストロフィン遺伝子の異常が Duchenne や Becker 型の筋ジストロフィー症を起こすことが判明し、更に最近ジストロフィンと関連する数種の細胞内外結合蛋白が発見された。ジストロフィン結合糖蛋白複合体(DAGC)と総称される分子集団を介して細胞外の基質のラミニン $\alpha$ -2と結合している。DAGCは $\alpha$ -と $\beta$ -の2種のジストログリカン(DG),  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -と $\delta$ -の4種のサルコグリカン(SG)より構成される。DAGCの生理機能について正確な証明は無いが、細胞内アクチンと細胞外マトリックスを結び付け筋収縮時に細胞膜が外に押し広げられる際に過度の膨隆を妨げ、細胞膜を安定化する作用、アクチンとミオシンの滑り合いによって発生する張力を能率良く細胞外に伝える作用や細胞外からの受動的な張力を細胞内に伝える作用等が想定されている。

先天性の拡張型心筋症の原因について既に

我々は心筋細胞膜の構成異常を指摘してきた<sup>1)</sup>。ヒトでは心筋細胞骨格のアクチン<sup>2)</sup>、ジストロフィン<sup>3)</sup>、ジストロフィン関連蛋白のSG<sup>4)</sup>およびデスミン<sup>5)</sup>の遺伝子異常が報告され、筆者等は40年間不明だった心筋症自然発症ハムスターの原因を BIO 14.6 と TO-2 の 2 系統で  $\delta$ -SG の遺伝子欠損である事を報告し、その break point を示した<sup>6)</sup>。同じ  $\delta$ -SG の遺伝子変異は DCM を呈し、心移植に至った 4 家系が昨年報告され<sup>7)</sup>、 $\delta$ -SG の欠損による重症心不全はヒトにも共通した病態である。更に核内蛋白の lamin A/C 遺伝子変異による DCM の家系も報告され<sup>8)</sup>、こうした遺伝子異常に伴う DCM の症例は解析法の進歩により今後更に増加すると予想される。

また初期に HCM を呈し、末期に DCM に至る BIO 14.6 系では  $\delta$ -以外の SG は一部残留している。一方初期から DCM を呈する TO-2 系では  $\delta$ -の他に全 SG も発現していなかった<sup>9)</sup>。これらの結果は全 SG が完備している場合には膜が正常機能を有し、 $\delta$ -SG の遺伝子欠損しても他の SG が残存している間は HCM を示し、代償不能の拡張相で全 SG が消失する興味ある病態を示唆する。一方 Northern blotting の結果、mRNA は  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -SG 共に対照動物と同様に open reading frame 部分も十分発現し、promoter に変化が無かった。従って各 SG の蛋白発現はハムスターの間でも系と年齢により変化し、重症化と一致していた。各 SG の発現と代謝過程を解明する事は今後の課題である。

一般に疾患の病因と治療を確立するためには疾患モデル動物の利用が極めて有用である。今回用いた自然発症のモデル動物はノックアウト動物とは基本的に異なる。人工的に遺伝子を改変した transgenic 動物では予想外の結果をもたらす。レポーター遺伝子でさえ DCM を来す時があり、必ずしも病態を正確に反映しない<sup>10)</sup>。一方自然発症の遺伝子欠損症に正常遺伝子を発現させれば直接治療に繋がり、従来の増悪因子を減少させたり、改善因子を過剰発現させる間接的な遺伝子治療に比較して遙かに有効な治療効果が期待される。

### 【材料および方法】

目的遺伝子を生体内組織内に強制発現させる為に、世界的にはアデノウイルスベクターが頻用されたが、その起炎作用、他動物への病原性やウイルス抗体生産の問題など多くの隘路が残っていた。実際2000年に米国でヒトの遺伝子治療の際の死亡事故以来現在使用が禁止された。これを克服する為に各種のベクターを試みた結果、自治医大、遺伝子治療部の協力を得て、アデノ随伴ウイルス (Adeno-associated virus, AAV, 11) ベクターにより安全に長期間心筋細胞内に発現させる事に成功した。recombinant adenoassociated virus (rAAV) ベクターはヒトも含め動物に病原性が無く、また数ヶ月から数年継続して発現が可能である。筆者等は先と同様、正常配列の  $\delta$ -SG 遺伝子を組み込んだ rAAV を既報に従い作成して<sup>11)</sup>、モデル動物の TO-2 の心尖部筋層に投与した。

### 【結果及び考察】

TO-2 系ハムスターの心臓に正常配列の  $\delta$ -SG 遺伝子を強制発現させた結果、30 週後にも  $\delta$ -SG の mRNA と翻訳蛋白が発現した (図 1)。HVJ-リポソームベクターと同様、 $\delta$ -SG 以外に発現していなかった  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -SG も再発現し (図 2)、萎縮していた心筋細胞の直径も戻った。更に心カテーテルの検討結果、左室拡張末期圧

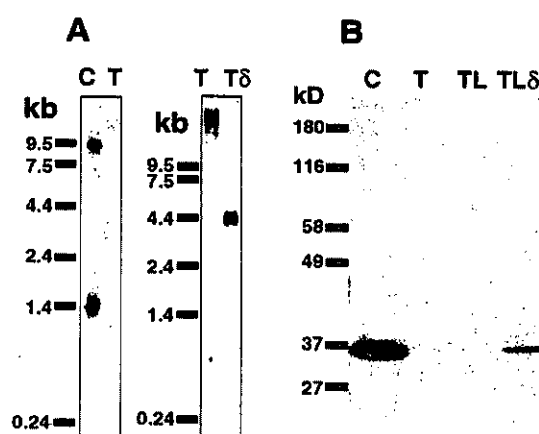


図 1 生体内心筋細胞における遺伝子治療後の Northern blotting による  $\delta$ -SG の mRNA (A) 及び Western blotting による蛋白の発現 (B)。C, T, T $\delta$ , TL, TL $\delta$  は各々正常動物, TO-2 ハムスター, TO-2 に  $\delta$ -SG 遺伝子投与, レポーター遺伝子 (Lac Z) 投与及び  $\delta$ -SG 遺伝子とレポーター遺伝子の共投与後を示す (文献 12 より)。

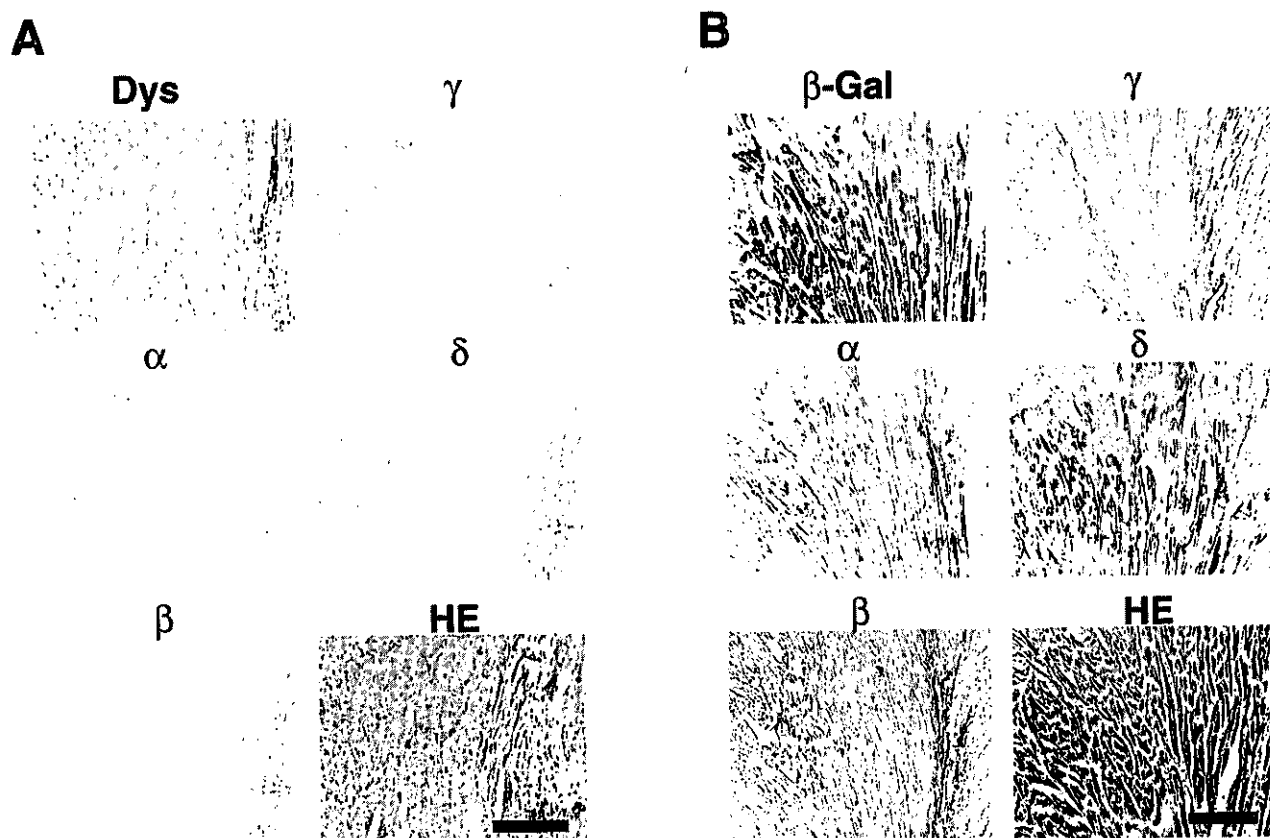


図2  $\delta$ -SG 遺伝子欠損ハムスターに正常の  $\delta$ -SG 遺伝子を含む rAAV ベクターによる遺伝子治療後の心筋組織像。レポーター遺伝子(Lac Z)と  $\beta$ -SG 遺伝子を生体内で共発現させた結果,  $\beta$ -Gal 蛋白(A)および  $\beta$ -SG 蛋白 B が同一の細胞に高能率で発現している事が免疫組織学的に示された(B, 文献12より)。

(LVEDP), その左室最大拡張圧速度(dP/dt<sub>min</sub>)と中心静脈圧(CVP)が改善して遺伝子治療により心機能も一部正常化した<sup>12)</sup>(図3)。また高周波心超音波検査で左室収縮径(LVDs), %FS と左室駆出率(LVEF)も改善した。驚くべき事に, 動物の生存率をKaplan-Meier 法で解析した結果責任遺伝子で治療した TO-2 系ハムスターでは生命予後も改善した。これは動物レベルではあるが, 心不全の遺伝子治療に成功した最初の報告である(投稿中)。

#### 【今後の展望とまとめ】

このようにジストロフィン自体またはこれと複合体を形成する DAGC の障害により心筋症や, これと類似した病態を形成する事が先天的にもまた後天的にも起こる事が示された。また心筋症の新しい責任遺伝子も徐々に解明され, その遺伝子治療が試み始められた。上記の rAAV による遺伝子治療の速報は報告したが<sup>12)</sup>, 完全論文は現在投稿中であり, 詳細なデータの公表は論文が受理されるまで差し控える。

なお本年度研究助成を頂き, 上記の他にによる画像診断や新しい遺伝子変異との関連等を報告ができた<sup>13-21)</sup>。厚く御礼申し上げる。

#### 【参考文献】

- 1) Toyooka T, Nagayama K, Suzuki J *et al.*, *Circulation* 86; 295-301, 1992.
- 2) Olson TM, Michels VV, Thibodeau SN, *et al.*, *Science* 280; 750-2, 1998.
- 3) Cox GF and Kunkel L. *Curr.Opin.Cardiol.* 12; 329-43, 1997.
- 4) Fadic R, Sunada Y, Waclawik AJ, *et al.*, *N.Engl.J.Med.* 334; 362-6, 1996.
- 5) Li D, Tapscoft T, Gonzalez O, *et al.* *Circulation* 100; 461-4, 1999.
- 6) Sakamoto A, Ono K, Abe M, *et al.*, *Proc. Natl.Sci.Acad.USA* 94; 13873-8, 1997.
- 7) Tsubata S, Bowles KR, Vatta M, *et al.*, *J.Clin.Invest.* 106; 655-62, 2000.
- 8) Fatkin D, MacRae C, Sasaki T, *et al.*, *N.*

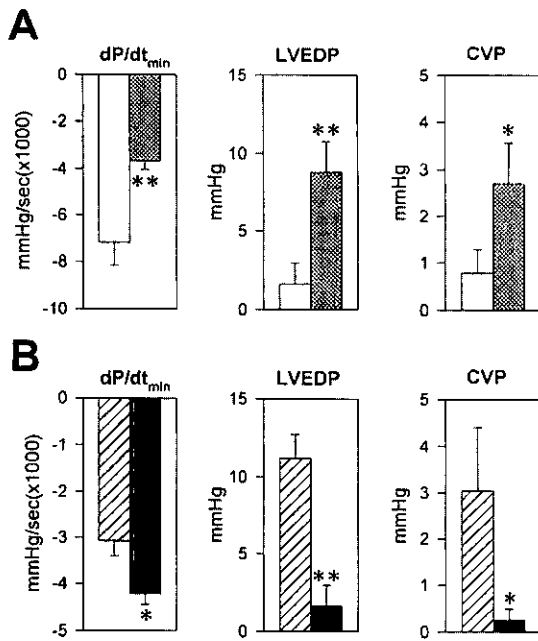


図3  $\delta$ -SG 遺伝子欠損ハムスターに正常の  $\delta$ -SG 遺伝子を含む rAAV ベクターによる血行動態の改善(文献21より). 正常動物に比較して収縮能と拡張能がともに  $\delta$ -SG 遺伝子欠損ハムスターでは低下している. この動物に正常の  $\delta$ -SG 遺伝子を含む rAAV ベクターによりレポーター遺伝子(Lac Z)単独, または  $\beta$ -SG 遺伝子を共発現させた結果, 左室拡張退潮速度(dP/dt<sub>min</sub>), 左室拡張末期圧(LVEDP), および中心静脈圧(CVP)が著明に改善している(文献12より).

*Engl.J.Med.* 341; 1715-24, 1999.

- 9) Kawada T, Nakatsuru Y, Sakamoto A, *et al.*, *F.E.B.S.Lett.* 458; 405-8, 1999.
- 10) Huang WY, Aramburu J, Douglas PS *et al.*, *Nature Med.* 6; 482-3, 2000.
- 11) Fan DS, Ogawa M, Fujimoto KI, *et al.*, *Hum.Gene Ther.* 17; 2527-35, 1998.
- 12) Kawada T, Sakamoto A, Nakazawa M, *et al.*, *B.B.R.C.* 2001 (in press).
- 13) Xi H, Shin WS, Suzuki J, *et al.*, *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 36 (Suppl. 2); S25-9, 2000.
- 14) Chen J, Wang, Y.P., Nakajima, T. *et al.*, *J.Biol.Chem.* 275; 28739-49, 2000.
- 15) Shin WS, Tanaka M, Suzuki J, *et al.*, *Am.J.Hum.Gen.* 67; 1617-20, 2000.
- 16) Suzuki J, Shimamoto R, Yamazaki T, *et al.* *Radiology* 6; 189-97, 2000.
- 17) Sasaki S, Ushio F, Amano K, *et al.* *J. Nutr.Sci.Vitaminol.* 46; 285-96, 2000.
- 18) Hikiji H, Shin WS, Koizumi T, *et al.* *Am.J.Physiol.* 278; E1031-7, 2000.
- 19) Nakajima, T., Okuda, Y., Chisaki, K., *et al.* *Br.J.Pharmacol.* 130; 1457-67, 2000.
- 20) Suzuki, J., Nagai, R., Nishikawa, J., *et al.* *Jpn.Heart J.* 41; 417-24, 2000.

## G蛋白質共役受容体アゴニストによる 心筋細胞肥大における活性酸素の関与

堀 正 二

大阪大学大学院医学系研究科病態情報内科学

### 【研究要旨】

本研究ではG蛋白質共役受容体(GPCR)アゴニストによる心筋細胞肥大に活性酸素が関与しているかどうかそしてその細胞内情報伝達機構を検討した。アンジオテンシンII, エンドセリン-1, フェニレフリンはラット新生仔単離心筋細胞において細胞内活性酸素レベルを時間依存性に増加した。この活性酸素の増加はNAC,あるいはRac1のドミナントネガティブ体の発現により阻害された。これらはGPCRアゴニストによる細胞面積の増大,サルコメア構造の増強,ANF発現増加を阻害した。p38, JNKはGPCRアゴニストにより活性化され,この活性化はRac1のドミナントネガティブ体の発現により消失した。GPCRアゴニストはNF-kBを活性化しその活性化は抗酸化剤により阻害された。またMKK6,7のドミナントネガティブ体の発現によりGPCR受容体アゴニストによるNF-kBおよびBNPプロモーター活性化は部分的に,さらに両分子の同発現により完全に抑制された。したがってGPCRアゴニストによる心筋細胞肥大には活性酸素が関与しておりp38, JNKを活性化しNF-kBを介して心筋細胞肥大を惹起していることが示唆された。

### 【研究目的】

活性酸素は細胞障害に大きな役割を果たしていると考えられているが近年細胞内情報伝達分子としての役割が明らかになってきた。心筋細胞肥大の分子機構については精力的に研究が行われているがまた完全には明らかになっていない。G蛋白質共役受容体(GPCR)アゴニストによる心筋細胞肥大に活性酸素が関与しているかどうか

かをラット単離心筋細胞を用いて検討した。さらにその細胞内情報伝達機構を検討した。

### 【研究方法】

ラット新生仔より心筋細胞をコラゲナーゼ法により単離した。この細胞を無血清培地で24時間培養した後アンジオテンシンII, エンドセリン-1, フェニレフリン存在下で48時間培養した。コラーゲンコートしたカバーグラスに培養した細胞をファロイジンにより染色し,細胞面積を測定すると共にサルコメア構造を検討した。また抗ANF抗体を用いて免疫染色によるANF蛋白質の発現を検討した。活性酸素の関与はアゴニスト投与前1時間前に活性酸素スカベンジャーであるNアセチルシステイン(NAC), Diphenylene Iodonium (DPI)を前処理することあるいはRac1のドミナントネガティブ体アデノウイルスを24時間前に感染することにより検討した。さらに細胞内活性酸素は2, 7-ジクロロフルオレシニン(DCF)を細胞内に負荷し,その蛍光強度の変化を蛍光光度計あるいは単細胞イメージングシステムを用いて評価した。NF-kBの活性化はkBルシフェラーゼレポーターコンストラクトをリポフェクチン法で導入し,ルシフェラーゼ活性を測定することにより評価した。さらにNF-kBの心肥大に対する効果はp38あるいはJNKのアゴニストによる活性化はそれらに対するリン酸化抗体を用いウエスタンブロット法により検討した。p38, JNKの関与はその上流MKKであるMKK6,7のドミナントネガティブ体とkBあるいはBNPプロモーターレポーターコンストラクトをリポフェクチン法で導入し,ルシフェラーゼ活性を測定することにより評価した。

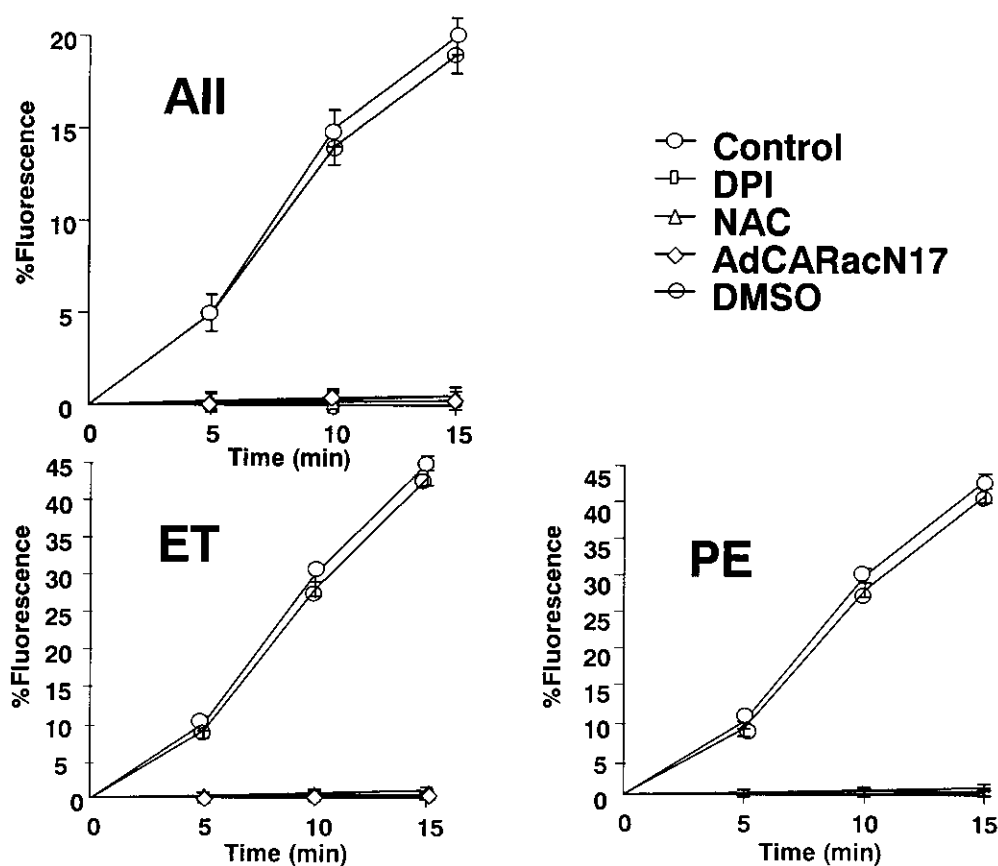


図 1

### 【結果と考察】

まずアンジオテンシンⅡ，エンドセリン-1，フェニレフリンの投与により心筋細胞内に活性酸素が産生されるかどうか検討した。図1に示すように活性酸素感受性蛍光色素 DCF の蛍光強度はアンジオテンシンⅡ，エンドセリン-1，フェニレフリンの投与により増加した。ここでは示さないがこの蛍光強度の増加を単細胞イメージングシステムで評価するとアゴニスト投与後1分以内に有意な活性酸素の産生が観察された。この活性酸素の増加はNACによって阻害された。活性酸素産生部位を同定するため膜に存在するNAD(P)Hオキシダーゼの阻害薬であるDPIあるいはその構成分子であるRac1のドミナントネガティブ体の発現による効果を検討した。これらはGPCRアゴニストによる活性酸素の産生を阻害した。したがってGPCRアゴニストは心筋細胞ではNAD(P)Hオキシダーゼを介して活性酸素を産生することが明らかとなった。またこれらによる活性酸素の産生の阻害は図2に示すようにGPCRアゴ

ニストによる細胞面積の増大，サルコメア構造の増強，ANF発現増加を抑制した。つまりGPCRアゴニストによる心筋細胞肥大には活性酸素が関わっていることが明らかとなった。

次に活性酸素を介する心筋細胞肥大に関わる転写因子を検討した。NF- $\kappa$ Bは活性酸素によって活性化されることが報告されている。そこでまずアンジオテンシンⅡ，エンドセリン-1，フェニレフリンの投与によりNF- $\kappa$ Bが活性化されるかどうか検討した。これらGPCRアゴニストにより濃度依存性にNF- $\kappa$ Bは活性化された(図3)。この濃度依存性はこれらアゴニストの細胞面積肥大に対する濃度依存性とよく類似していた。このNF- $\kappa$ Bの活性化はNAC，DPI，Rac1のドミナントネガティブ体の発現により抑制された。つまりGPCRアゴニストは活性酸素依存的にNF- $\kappa$ Bを心筋においても活性化していることが明らかとなった。NF- $\kappa$ Bの心肥大に対する効果を検討するためI $\kappa$ BのDegradation-resistant変異体I $\kappa$ BMを組み込んだアデノウイルスの効果を検討した。

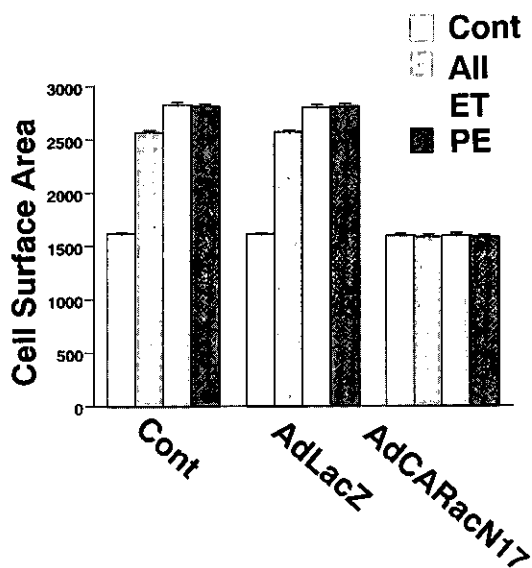


図2

IkBM の感染により GPCR アゴニストによる心筋細胞面積増加効果は抑制された(図4)。また同時にサルコメア構造の増強, ANF の発現も抑制された。

次に活性酸素が NF-kB を活性化する情報伝達機構を検討した。p38, JNK は活性酸素によって活性化されることが知られている。そこで p38, JNK の活性化を検討した。それらの活性化はそれらのリン酸化抗体を用いて検討した。GPCR アゴニストにより3-5分をピークにして一過性に活性化された。この活性化は Rac1 のドミナントネガティブ体の発現により消失した。p38, JNK の上流にリン酸化酵素である MKK 6,7 のドミナントネガティブ体の発現により GPCR 受容体アゴニストによる NF-kB の活性化は部分的にさらに両分子の同発現により完全に抑制された。したがって活性酸素は JNK, p38 両 MAPK を介して NF-kB を活性化していることが明らかとなった。この p38, JNK を介した NF-kB の活性化が心肥大に関与しているかどうか検討するため心肥大のマーカーである BNP プロモーター活性に対する効果を検討した。GPCR 受容体アゴニストによる BNP プロモーター活性化も同様に MKK6,7 のドミナントネガティブ体の発現により部分的にさらに

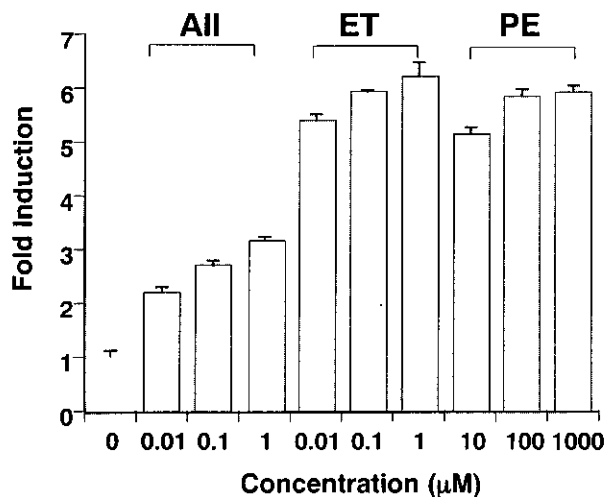


図3

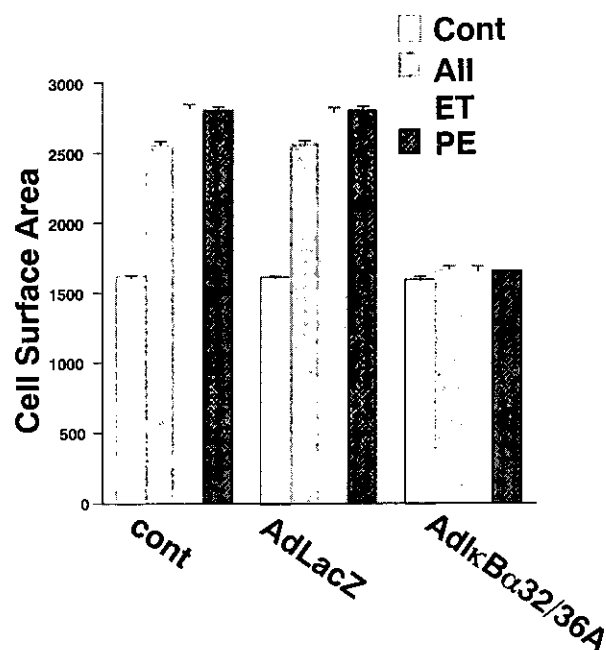


図4

両分子の同発現により完全に抑制された。活性酸素による p38, JNK の活性化は心肥大に関与していることが明らかとなった。

#### 【結論】

アンジオテンシンⅡ, エンドセリン-1, フェニレフリンによる心筋細胞肥大には活性酸素が関与している。産生された活性酸素は p38, JNK を活性化し NF-kB を介して心筋細胞肥大を惹起していることが示唆された。



## 新しい分離梗塞心臓における TNF- $\alpha$ の動態と作用(免疫学的検討)

中村 浩 士   高 田 智 子   松 崎 益 徳  
山口大学医学部器官制御医科学講座   循環病態内科学(旧内科学第二講座)

Gordon Moe, Peter Liu  
トロント大学, Canada

### 【研究要旨】

TNF- $\alpha$ は心筋症や心筋炎, また心筋梗塞後リモデリングなど循環器疾患の病態の進展と予後に大きく影響をする重要なサイトカインである。今回, ラットの心筋梗塞心臓を正常レシピエントに移植し, 梗塞心を心不全から完全に分離することにより, 心臓リモデリング時のTNF- $\alpha$ の動態を時間的かつ空間的に解析した。TNF- $\alpha$ は他の神経体液因子である angiotensin II (ANG II)や adrenomedullin (ADM)とは明らかに違う分布と動態を示した。血清TNF- $\alpha$ の産生系は末梢血中(leukocyte recruitment)と考えられた。虚血という自己の内的傷害に対しても免疫システムが動員されていることを示唆していると考えられた。

### 【研究目的】

ラット異所性心臓移植術を用い, 同時に冠動脈も結紮することにより心筋梗塞を引き起こし, さらに正常レシピエントの腹くう内で長期間拍

動させることにより, 心負荷状態より完全に分離させ, 且つ梗塞後リモデリングのみを起こすことが可能なモデルを開発した(図1)。この方法により, 梗塞心を梗塞後の心不全環境から完全に分離することが可能であり, かつ免疫学的解析も容易となる。反対に今までの古典的冠動脈結紮モデルでは, 心筋梗塞作製後より高頻度に心不全を合併(死亡率30-50%)するため, 梗塞を起こした個体の全ての部位で全ての神経体液因子や免疫系が活性化されてしまい, 個々の因子の詳細な解析には限界があった。今回我々が開発した新しいモデルを使い, 心不全から分離した梗塞(傷害)心における組織各部位及び血漿中のTNF- $\alpha$ , ANG II及びADMの動態について詳細に検討し, 病態を明らかにすることを目的とした。

### 【研究方法】

200g雄LEWISラットを用い, 異所性心臓移植術を施行した。同時に移植心の冠動脈前下降

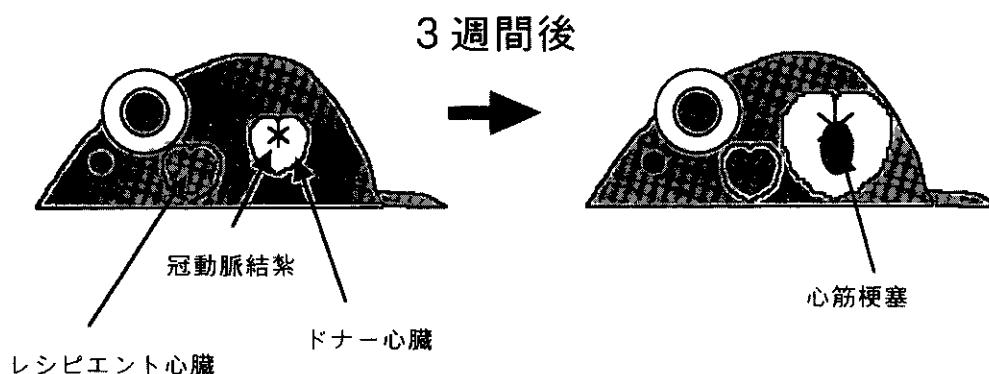


図1 分離梗塞心臓モデル。ドナー心臓をレシピエントラットの腹くう内に異所性心臓移植を行う, その際に同時にドナー心の冠動脈も結紮し, 移植心のみ心筋梗塞を起こす。Syngenic移植であるため拒絶反応は起こらない。

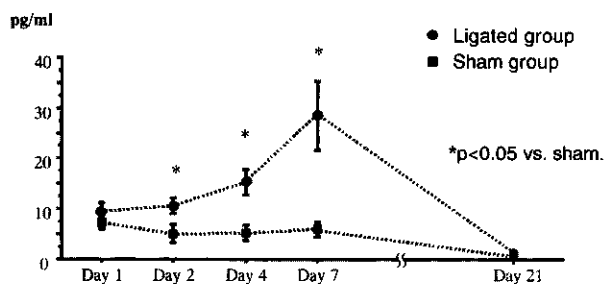


図2 血漿 TNF- $\alpha$  のタイムコース

枝を結紮しドナー心において心筋梗塞を作成した。コントロールとして移植のみを行った sham 群を用いた。梗塞後第 1, 2, 4, 7 及び 21 日目の白血球数と血漿 TNF- $\alpha$  濃度を比較した。次に組織 TNF- $\alpha$ , ANG II 及び ADM の解析には移植(ドナー)心の①梗塞部, ②境界部, ③健常部そして④レシピエント心に分け, sham 群と比較した。また術後 1 及び 3 週目の心機能の評価をドナーとレシピエントの両心臓に対して行った。

#### 【結果と考察】

梗塞後第 7 日目において ligation 群では sham 群に比して, 末梢血白血球数の有意な増加と血漿 TNF- $\alpha$  濃度の上昇を認めた(図 2)。興味深いことに, ligation 群では sham 群に比して梗塞後第 7 日目において有意な体重減少が見られ, ドナー心の局所の心筋梗塞がレシピエントに何らかの変化を引き起こしていると考えられた。この体重減少が一過性の減少であり, 梗塞後 3 週の慢性期には代償され, 認められなかった。組織 TNF- $\alpha$  の解析では, ②境界部で梗塞直後より 2 相性の上昇を示した後低下するのは対照的に, 遅延性(第 4, 7 日目)にレシピエント心において組織 TNF- $\alpha$  の上昇を認めた(図 3)。また, レシピエント心機能の有意な低下(心臓超音波, 心カテテル法)を認め, この心機能の低下は TNF inhibitor (Immunex) により抑制された(表 1)。このことから, レシピエントの心機能低下には TNF- $\alpha$  が関与していると考えられた。一方, 組織 angiotensin II (ANG II) と adrenomedullin (ADM) は梗塞部位(ドナー心)で高く, 末梢血液中でも濃度上昇も見られず, 遠隔作用は認められなかった(図 4, 5)。これらのことより TNF- $\alpha$  は, 他の神経体液因子である ANG II や ADM とは違う分

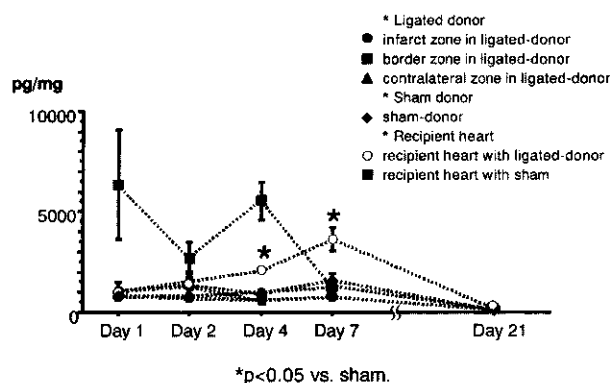


図3 組織 TNF- $\alpha$  のタイムコース

布を示し, 梗塞後 1 週間に遠隔作用を持つことが確認された。

#### 【結論】

従来, 心筋梗塞後のリモデリングのメカニズムの解析は, ラットやマウスなどの動物の冠動脈を結紮した心筋梗塞モデルで検討が為されてきた。しかし従来の動物を使った冠動脈結紮モデルでは大きな問題があった。手術後リモデリングも起こるが続発的に心不全も高率におこすためこれら二つの病態が混在してしまうことである。心不全を併発すれば神経体液因子やサイトカインが末梢血中や, 健常臓器を含む全ての部位で上昇してしまい, 従って各因子の局在の解析には限界があった。今回我々は, リモデリング心臓をレシピエントの体内で長期間分離し拍動させることで心筋梗塞心を作成することができた。この際, TNF- $\alpha$  は梗塞後第 7 日目に ligation 群の血中およびレシピエント心筋組織中で上昇し, また一過性(1 週間後)にレシピエント心の血行動態にも影響を及ぼすことが確認された。このことは外傷, 手術, ショックといった外的ストレスのみならず, 心筋梗塞という自己の内的傷害に対しても免疫システム(systemic inflammatory response)が動員されていることを示唆していると考えられた。本モデルは今後, 心不全時のサイトカインの動態のみならず, 心筋障害時の神経体液性因子の解析, さらには心筋障害に対するホストの免疫反応の解析にも応用可能と考えられる。

#### 【参考文献】

- 1) 特許申請2001-011866「広範囲心筋梗塞の

表1 梗塞後1週間目のレシピエント心の血行動態 (心臓カテーテル法)

	Sham	Ligation	Ligation+TNFR:Fc
Heart rate	322±34	378±18*	364±29
Max LVP	123±10	112±16.3	108±11
LVEDP	6.8±1.3	16.1±2.5*	3.0±2.7*†
+ dP/dt	8654±1412	5393±2583*	7602±1132
- dP/dt	5861±1607	4146±1718	6039±530†

± SD \* p<0.05 vs. sham. † p<0.05 vs. ligation

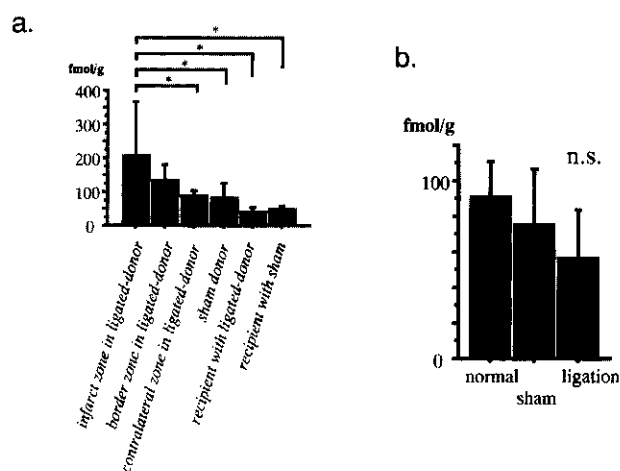


図4 血漿及び組織中 ANG II 濃度(RIA 法)  
a. 組織中 ANG II b. 血漿中 ANG II

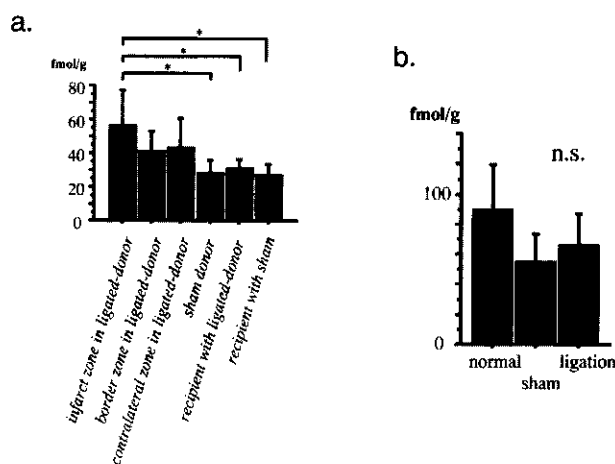


図5 血漿及び組織中 ADM 濃度(RIA 法)  
a. 組織中 ADM b. 血漿中 ADM

作成と心不全からの分離並びにそのモデル動物を用いて行う薬物スクリーニング方法」

- 2) Nakamura H, et al. Induction of TNF- $\alpha$  and left ventricular dysfunction in the recipient heart following myocardial infarction in the remote donor heart in a heterotopic syngenic transplant model: Evidence of a novel unique cytokine intranet signaling pathway. *J Am Coll Cardiol* 37 (Suppl A),192 (2001).
- 3) Nakamura H, et al. Autoimmune response in chronic ongoing myocarditis demonstrated by heterotopic cardiac transplantation in mice. *Circulation* 94,

3348-3354 (1996).

- 4) Nakamura H, et al. Characterization of T cell receptor  $\beta$  chains of accumulating T cells in chronic ongoing myocarditis demonstrated by heterotopic cardiac transplantation in mice. *Jpn Circ J* 65, 106-110, 2001.
- 5) Nakamura H, et al. Induction of TNF- $\alpha$  and left ventricular dysfunction in the recipient heart following myocardial infarction: Insights into the pathophysiologic role of TNF- $\alpha$  from a novel heterotopic transplant-coronary ligation model. (submitting).

## 特発性心筋症の全国疫学調査

松 森 昭 長谷川浩二 篠山重威  
京都大学大学院医学研究科・循環病態学

中川秀昭 森河裕子 三浦克之  
金沢医科大学・公衆衛生学

厚生省特定疾患特発性心筋症調査研究班

特定疾患の疫学に関する研究班

### 【目的】

わが国における特発性心筋症の疫学像を明らかにする目的で、全国疫学調査を実施したので、その概要を報告する。

### 【方法】

対象は、拡張型心筋症、肥大型心筋症、拘束型心筋症、ミトコンドリア病、心 Fabry 病、QT 延長症候群、不整脈原性右室心筋症(右室異形成)である。調査対象病院は、全国の一般病院から規模別に無作為抽出し、大学病院と大規模病院は悉皆調査とした。調査対象診療科は、内科、循環器科、小児科とし、一次調査票を郵送した診療科は計2,414である。一次調査では、1998年1月1日から12月31日の患者数を調査した<sup>1)</sup>。一次調査で「患者あり」との返事があった診療科に対して拡張型、肥大型、拘束型については二次調査を依頼した。二次調査票(付表)では各患者の詳しい情報を得た。ミトコンドリア病、心 Fabry 病、QT 延長症候群、不整脈原性右室心筋症では一部の項目についてのみ調査を行った。患者数の推計は疫学研究班全国疫学マニュアル<sup>2)</sup>によった。統計学的検定は $\chi^2$ 検定にて行った。

### 【結果】

#### 1. 一次調査結果

一次調査の回収状況を表1に示す。一次調査全体の回収率は58.4%であった。規模の大きい病院ほど回収率がよかった。一次調査で報告された症例数は拡張型が6,341例、肥大型が7,262例、拘束型が112例であった。また、ミト

コンドリア病280例、心 Fabry 病70例、QT 延長症候群389例、不整脈原性右室心筋症245例であった。1998年の全国推計患者数および95%信頼区間を求めたところ、拡張型は17,700人(16,500-18,800)、肥大型は21,900人(20,600-23,200)、拘束型は300人(250-350)、ミトコンドリア病640人(500-780)、心 Fabry 病150人(95-205)、QT 延長症候群1,000人(690-1,320)、不整脈原性右室心筋症520人(360-680)と推計された(表2)。

#### 2. 二次調査結果

二次調査可能例のうち、不適格例、重複例、性年齢不詳のものを除いた症例数は拡張型心筋症が1,932例、肥大型心筋症が2,134例、拘束型が26例、ミトコンドリア病25例、心 Fabry 病17例、QT 延長症候群70例、不整脈原性右室心筋症63例であった。それぞれの性年齢分布(年齢は報告時のもの)を表3に示す。

拡張型心筋症は男が1,400例、女が532例で男女比は2.6であり、年齢分布は1歳から93歳にわたっていた。肥大型心筋症は男が1,490例、女が644例で男女比は2.3であり、年齢分布は1歳から100歳にわたっていた。両型とも60歳台にピークがみられた。拘束型は男14例、女12例であり年齢の分布は1歳から81歳にわたっていた。表4には、調査前1年間の受療状況を示す。

以下の項目については拡張型および肥大型心筋症を中心に述べる。家族内に発症者があるものの割合は拡張型が5.2%、肥大型が14.1%、拘束型が23.1%であった(表5)。発症から受