

表 1 温熱療法による血行動態変化

		sauna 前	39°C sauna 直後	30°C sauna 直後
深部体温, °C	1st sauna	35.4±0.2	36.4±0.1 <sup>§</sup>	36.2±0.1 <sup>§</sup>
	28th sauna	35.5±0.4	36.5±0.2 <sup>§</sup>	36.4±0.2 <sup>§</sup>
心拍数, bpm	1st sauna	353±17	364±29	349±18
	28th sauna	335±31	336±39	323±25
収縮期圧, mm Hg	1st sauna	124±4	123±3	117±16
	28th sauna	114±6*	104±9†	92±7* <sup>§</sup>
拡張期圧, mm Hg	1st sauna	85±4	84±10	81±13
	28th sauna	78±5*	70±10	63±6* <sup>‡</sup>

\*p<0.05 and †p<0.01 vs 1st sauna, ‡p<0.05 and §p<0.01 vs before sauna.

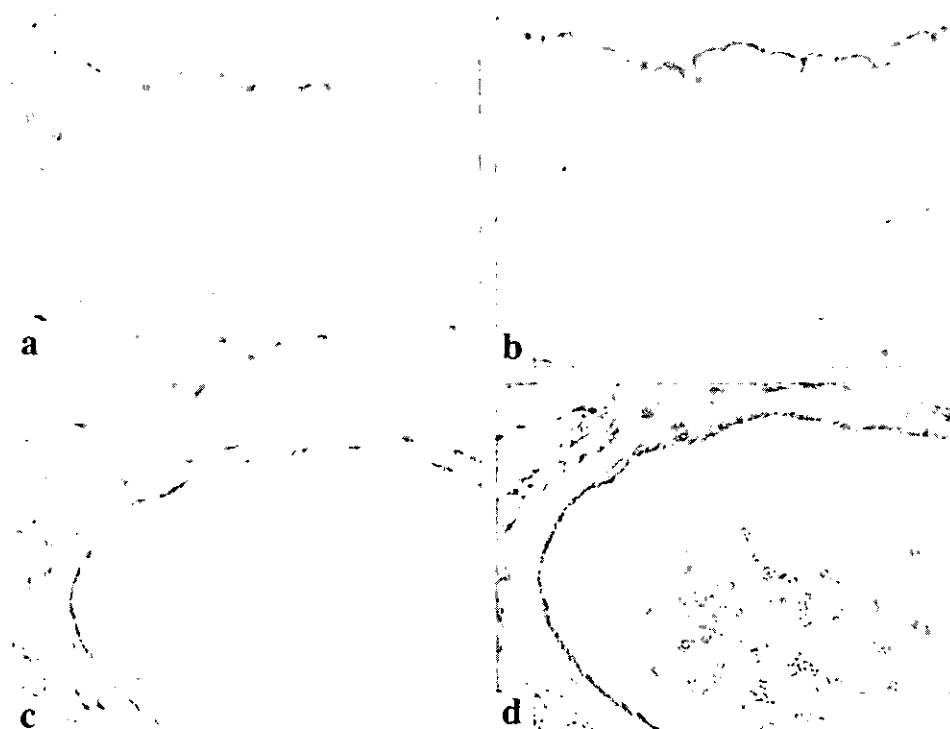


図 1

### 【結果と考察】

深部体温は 39°C のサウナ浴で約 1 度上昇し、30°C の保温にてほぼ維持された。心拍数は、サウナ浴中有意な変化を示さなかった。大動脈の収縮期圧・拡張期圧はともに、初回サウナ浴において変化しなかったが、28回目のサウナ浴中に、有意な低下を認めた。更に、初回サウナ浴開始前と比較し、28回目のサウナ浴開始前の大動脈圧は、収縮期圧・拡張期圧ともに有意な低下を認めた(表 1)。免疫組織化学染色では、コントロール群と比較し、サウナ群の大動脈・総頸動脈及び冠動脈の血管内皮細胞に eNOS

の発現増強を認めた(図 1a: 大動脈コントロール群・1b: 大動脈サウナ群, 1c: 冠動脈コントロール群・1d: 冠動脈サウナ群)。Western Blot 法による検討においても、コントロール群と比較し、サウナ群でより強い eNOS 蛋白の発現が認められた(図 2a)。これらの一連の実験を 4 回施行したが、いずれも再現性をもって同様の結果が得られた(quantitative densitometry: 109±10 vs. 74±16, n=4, P<.01) (図 2b)。次に、心不全モデル動物である TO2 ハムスターを用いて Western Blot 法により eNOS の発現を検討したところ、心不全の進行

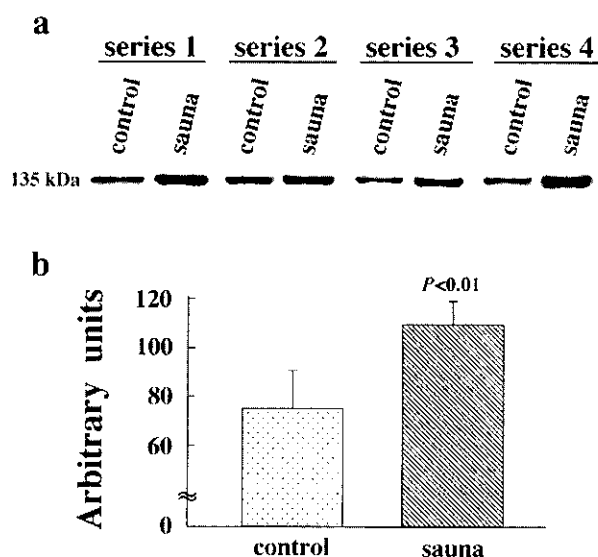


図 2

に伴い、eNOS の発現の低下を認めた(図 3a). 温熱療法はこの低下した eNOS の発現を 1 週間後より改善させた(図 3b). 以上の結果から考察すると、温熱療法により心拍出量が増加し、末梢血管での血流量が増加することから、血管において shear stress が増加することが示唆され、この shear stress の増加により血管内皮細胞における eNOS の発現が増強したものと考えられた。温熱療法により eNOS 発現が亢進しており、また血行動態変化の結果を合わせて考えると、同療法により NO の産生が増加していることが考えられる。NO は血管拡張作用物質であるため、この NO 産生増加により血管拡張反応の改善、すなわち血管内皮機能の改善がもたらされ、末梢血管抵抗は低下することが示唆される。これは心後負荷の減少を意味し、これにより心内圧の低下・心機能改善を招き、心拍出量の増加という循環の改善が得られることが示唆された。

#### 【結 語】

温熱療法は、心不全により低下した eNOS の発現を改善する。

#### 【参考文献】

- 1) Cohn J: Abnormalities of peripheral sympathetic nervous system control in congestive heart failure. *Circulation* 1990; 82: I59-67

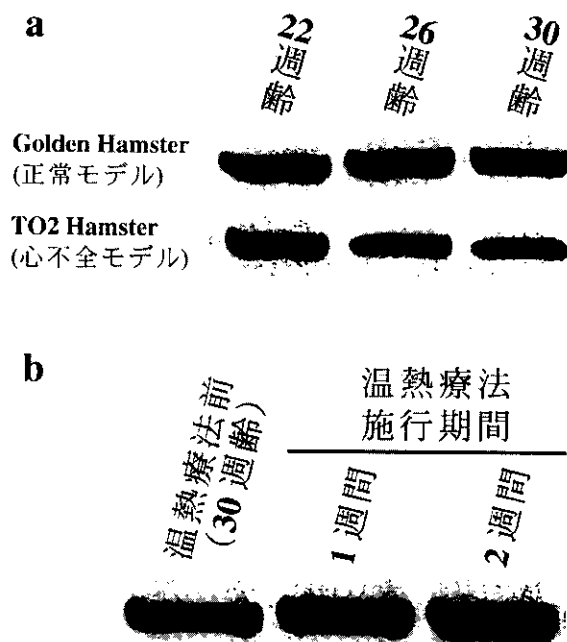


図 3

- 2) Packer M: Abnormalities of diastolic function as a potential cause of exercise intolerance in chronic heart failure. *Circulation* 1990; 81: III78-86
- 3) The SOLVD Investigators: Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. *N Engl J Med* 1991; 325: 293-302
- 4) Tei C, Horikiri Y, Park JC, Jeong JW, Chang KS, Toyama Y, Tanaka N: Acute hemodynamic improvement by thermal vasodilation in congestive heart failure. *Circulation* 1995; 91: 2582-2590
- 5) Tei C, Tanaka N: Thermal vasodilation as a treatment of congestive heart failure: a novel approach. *J cardiolog* 1996; 27: 29-30
- 6) Drexler H, Hornig B: Endothelial dysfunction in human disease. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31: 51-60
- 7) Katz SD: Mechanisms and implications of endothelial dysfunction in congestive heart failure. *Curr Opin Cardiol* 1997; 12: 259-264
- 8) Ferrari R, Bachetti T, Agnoletti L,

- Comini L, Curello S: Endothelial function and dysfunction in heart failure. *Eur Heart J* 1998; 19: G41-47
- 9) Kihara T, Biro S, Imamura M, Yoshiyuku S, Takasaki K, Otuji Y, et al: Thermal vasodilation therapy improves vascular endothelial and cardiac function in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: Suppl. A 155 [abstract]
- 10) Smith CJ, Sun D, Hoegler C, Roth BS, Zhang X, Zhao G, et al: Reduced gene expression of vascular endothelial NO synthase and cyclooxygenase-1 in heart failure. *Circ Res* 1996; 78: 58-64
- 11) Comini L, Bachetti T, Gaia G, Pasini E, Agnoletti L, Pepi P, et al: Aorta and skeletal muscle NO synthase expression in experimental heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28: 2241-2248
- 12) Moncada S, Palmer RM, Higgs EA: Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-142
- 13) Moncada S, Higgs A: The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329: 2002-2012

## 心筋症患者における血中可溶性 gp130 の臨床的意義の検討

瀧 原 圭 子   廣 田 久 雄   和 泉 匡 洋

大阪大学大学院医学系研究科分子病態内科学講座

### 【研究要旨】

gp130 は IL-6 サイトカインファミリーに共通の受容体であり、IL-6 関連サイトカインの情報を細胞内に伝達するのに重要な役割を果たしている。重症心不全において IL-6 の血中レベルの上昇が知られており、さまざまな心疾患において IL-6 サイトカインファミリーの関与が示唆されている。本研究において、その共通受容体である可溶性 IL-6 レセプター (sIL-6R) および可溶性 gp130 (sgp130) を心筋症患者を対象として測定した。心不全の重症度と血中 sIL-6R レベルに有意な相関は認められなかったが、sgp130 レベルは心不全の重症度に伴い増加した。また、拡張型心筋症において虚血性心筋症と比べ sgp130 レベルはより高い傾向を示した。心筋細胞における gp130 の発現は病態により変化している可能性が、また、心不全におけるその発現の増加は、心不全病態において gp130 を介する情報伝達が亢進している可能性が示唆された。

### 【研究目的】

これまでに本研究班において、gp130 を介して心筋細胞肥大および心筋細胞の生存に関与する情報が伝達されることを明らかにしてきた<sup>1)</sup>。gp130 は IL-6 サイトカインファミリーに共通の受容体であり、IL-6 関連サイトカインの情報を細胞内に伝達するのに重要な役割を果たしている<sup>2)</sup>。最近の心臓特異的 gp130 欠損マウスを用いた実験結果により、この gp130 の心臓における役割の重要性が明らかにされた<sup>3)</sup>。このマウスにおいては、急性圧負荷刺激に対して代償性心肥大が形成されず、拡張型心筋症様病態を呈し心不全死することが示された。また、gp130 の活性化がドキシソルピシンにより誘導される心筋細胞のアポトーシスを抑制すること<sup>4)</sup>、

心筋特異的 STAT3 トランスジェニックマウスにおいてドキシソルピシン心筋症による心不全の発症が軽減される<sup>5)</sup>ことも報告されている。これらの実験結果は、圧負荷や虚血、ウイルス感染などのストレス状況下における心筋細胞の生存/維持に、gp130 を介する情報伝達系の活性化が極めて重要である可能性を示唆している。IL-6 関連サイトカインのなかでは、cardiotrophin-1 (CT-1) や leukemia inhibitory factor (LIF)、IL-11 などが心筋細胞に直接作用を及ぼすことが知られている<sup>6)</sup>。

近年、さまざまな循環器疾患、たとえば動脈硬化の発症/進展、虚血性心疾患、心不全、さらには心筋症の病態にサイトカインが関与していることが報告されている。以前より、tumor necrosis factor (TNF)  $\alpha$  や IL-6 が心不全患者の末梢血において上昇していることが報告されている<sup>7,8)</sup>。しかしながら、実際の心筋病態における gp130 を介する情報伝達系の関与を明らかにした報告はこれまでにない。血中の sgp130 レベルは gp130 の発現レベルと相関することが報告されており、本研究において心筋症患者における血中 sgp130 レベルを測定し、その臨床病態との関与について検討を加えることを目的とする。

### 【研究方法】

大阪大学医学部附属病院、大阪府立羽曳野病院、公立学校共済近畿中央病院に通院中あるいは入院中の患者38名(拡張型心筋症17名、虚血性心筋症10名、心臓弁膜症11名)を対象とした。これらの患者は、平均年齢66.7才、男女比26:12、NYHA 心機能分類において、NYHA II/III/IV はそれぞれ18名/12名/8名であった。同意を得て末梢静脈血を採血し、血漿分離した後、 $-20^{\circ}\text{C}$  で冷凍保存した。IL-6、可溶性 IL-

6 受容体(sIL-6R), 可溶性 gp130 (sgp130)の測定は, R&D Systems Inc. 社製の Monoclonal anti-human IL-6, anti-human soluble IL-6 receptor, anti-human gp130 antibody を用いた enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法により行った。

### 【結果と考察】

これまでに報告されているように, 心不全患者において血中 IL-6 濃度はその重症度に伴い有意に増加し, 特に NYHA IV で著しい高値を示した(図 1)。TNF $\alpha$  の測定も同時に行ったが, NYHA IV の一部の患者でのみ高値を示し, 心不全の重症度との相関は示さなかった。血中 TNF $\alpha$  濃度に比べ, IL-6 がより鋭敏に心不全の重症度を反映することが示唆された。以前より, 血中 TNF $\alpha$  レベルが心不全患者において高値を示し, その病態に深く関わっている可能性が指摘されているが, 心機能や重症度との相関や治療効果との関連については一致した見解は得られていない。一方, TNF 受容体は TNF $\alpha$  に結合することによりその作用を中和する。従って, TNF 受容体の血中濃度は ELISA 法で測定した TNF $\alpha$  濃度よりも正確に TNF $\alpha$  の活性亢進を反映すると考えられている。実際に, 可溶性 TNF レセプター(sTNFR1, sTNFR2)は, 心不全患者において有意に高値を示し, 心不全重症度に比例してその値は上昇することが報告されている<sup>9)</sup>。

今回, IL-6 の受容体である sIL-6R について検討を加えたが, 図 2 に示すように血中 sIL-6R 濃度は心不全の重症度と相関を示さなかった。sIL-6R に関しては, 急性心筋梗塞後に一過性にその血中レベルが低下することが報告されているが<sup>10)</sup>, 心不全において有意な変化は報告されていない。次に, sgp130 濃度について検討を行った。図 3 に示すように心不全の重症度に相関し有意にその血中濃度は増加した。さらに, 心不全患者をその基礎疾患にもとづいて比較したところ, 拡張型心筋症において虚血性心疾患や心臓弁膜症に比べて sgp130 レベルはより高い傾向を示した(図 4)。

これまでに, ラット心筋梗塞モデルにおいて心筋の gp130 の発現レベルが増加することが

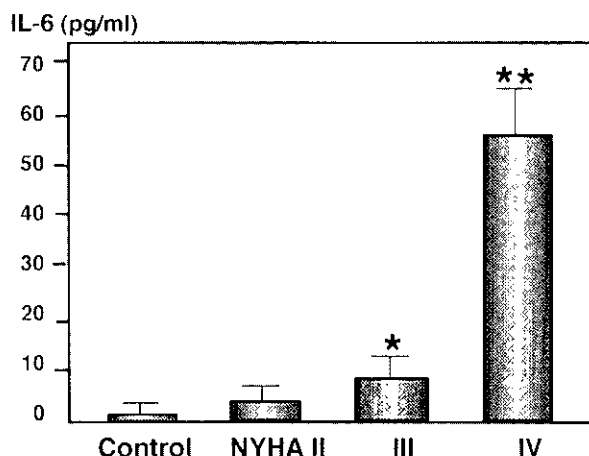


図 1 心不全患者における血漿 Interleukin-6 濃度  
\* P<0.05, \*\* P<0.01 vs Control

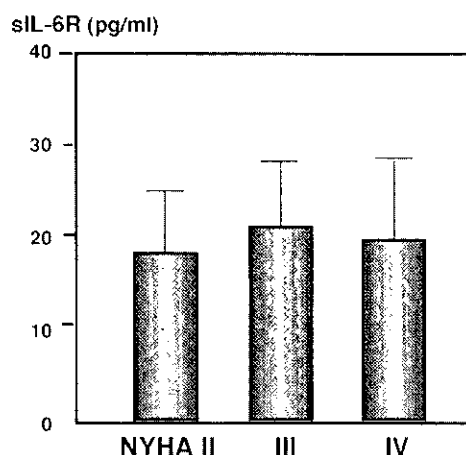


図 2 心不全患者における血漿可溶性 Interleukin-6 受容体濃度

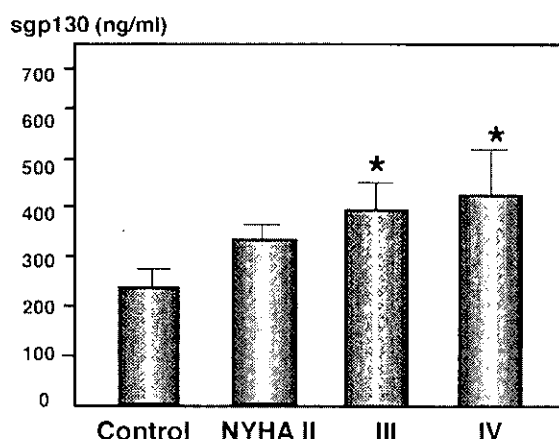


図 3 心不全患者における血漿可溶性 gp130 濃度  
\* P<0.05 vs Control

報告されている<sup>11)</sup>。心不全の重症度に伴い血中 sgp130 レベルが増加するという今回の結果は, 心臓における gp130 の発現の増加を示唆するものである。今後は, IL-6 cytokine family に含まれる IL-6 以外のサイトカインについても

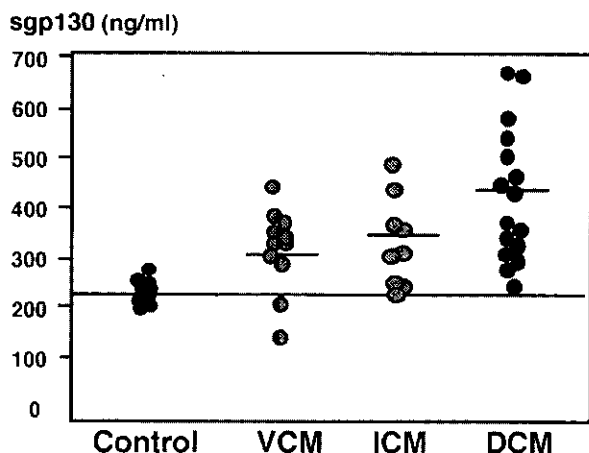


図4 基礎疾患別の血漿可溶性 gp130 濃度

VCM: 弁膜症(mean NYHA 2.6)  
 ICM: 虚血性心筋症(mean NYHA 2.5)  
 DCM: 拡張型心筋症(mean NYHA 2.7)

検討を加えるとともに、治療に伴い血中 sgp130 の変動がみられるかを検討する予定である。

#### 【結 論】

心筋細胞における gp130 の発現は病態により変化している可能性が、また、心不全におけるその発現の増加は、心不全病態における gp130 を介する情報伝達の亢進が示唆される。特に、拡張型心筋症患者において、心筋細胞におけるアポトーシスに対して保護的に働く gp130 を介するシグナルが増強し心不全の代償機構として働いている可能性がある。

#### 【参考文献】

- 1) Yamauchi-Takahara K, Kishimoto T. A novel role for STAT3 in cardiac remodeling. *Trends Cardiovasc Med* 2000; 10: 298-303.
- 2) Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T: Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* 1995; 86: 1243-1254.
- 3) Hirota H, Chen J, Betz UA, et al. Loss of a gp130 cardiac muscle cell survival pathway is a critical event in the onset of heart failure during biomechanical stress. *Cell* 1999; 97: 189-198.
- 4) Wollert KC, Chien KR. Cardiotrophin-1 and the role of gp130-dependent signaling pathways in cardiac growth and development. *J Mol Med* 1997; 75: 492-501.
- 5) Negoro S, Oh H, Tone E, et al. Gp130 regulates cardiac myocyte survival in doxorubicin-induced apoptosis through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt phosphorylation and bcl-xL/Caspase-3 interaction. *Circulation* 2001; 103: 555-561.
- 6) Kunisada K, Negoro S, Tone E, et al. Signal transducer and activator of transcription 3 in the heart transduces not only a hypertrophic signal but a protective signal against doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 315-319.
- 7) Torre-Amione G, Bozkurt B, Deswal A, Mann DL. An overview of tumor necrosis factor  $\alpha$  and the failing human heart. *Curr Opin Cardiol* 1999; 14: 206-210.
- 8) Tsutamoto T, Hisanaga T, Wada A, et al. Interleukin-6 spillover in the peripheral circulation increases with the severity of heart failure, and the high plasma level of interleukin-6 is an important prognostic predictor in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31: 391-398.
- 9) Nozaki M, Yamaguchi S, Shirakabe M, Nakamura H, Tomoike H. Soluble tumor necrosis factor receptors are elevated in relation to severity of congestive heart failure. *Jpn Circ J* 1997; 61: 657-664.
- 10) Ueda K, Takahashi M, Ozawa K, Kinoshita M. Decreased soluble interleukin-6 receptor in patients with acute myocardial infarction. *Am Heart J* 1999; 138: 908-915.
- 11) Aoyama T, Takimoto Y, Pennica D, et al. Augmented expression of cardiotrophin-1 and its receptor component, gp130, in both left and right ventricles after myocardial infarction in the rat. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32: 1821-1830.

## 不整脈源性右室心筋症の発症においてアポトーシスによる 心筋細胞死が関与する可能性についての病理学的検討

山路 國弘 池田 善彦 由谷 親夫

国立循環器病センター臨床検査部病理

### 【研究要旨】

〔目的〕 不整脈源性右室心筋症 (ARVC) は線維脂肪組織によって置換された右室の進行性萎縮によって特徴づけられる、一次性的な心筋疾患である。今回われわれは、ARVC における心筋細胞の喪失が、DNA 断片化やアポトーシス関連蛋白の検出によってとらえられるアポトーシスによる細胞死の結果であるか否かを検討した。

〔方法〕 11例の ARVC 例 (ARVC 群) と、年齢を一致させた、明らかな心疾患を有しない 10例の剖検例 (対照群) から得られた右室心筋標本を用いた。それぞれの細胞がアポトーシスに陥っているか否かを同定するために、TUNEL 法 (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling method) と ssDNA 法 (rabbit polyclonal anti-single stranded DNA method) を用いてパラフィン切片を病理組織学的に検討した。アポトーシス指数は、100個以上の心筋細胞を観察し、TUNEL 法や ssDNA 法によって陽性に染色された細胞核の百分率で表現した。また、免疫組織学的手法を用いて不全心に関係して発現される BNP とともに、アポトーシスに関係して発現されるアポトーシス関連蛋白 (CPP-3, Bcl-2, および Bax) の検出を試みた。

〔結果〕 ARVC 群において、アポトーシスが認められたが (アポトーシス指数: TUNEL 法;  $23.8 \pm 7.5\%$ , ssDNA 法;  $5.7 \pm 4.5\%$ )、対照群では認められなかった ( $p < 0.01$ )。ARVC 群において、明確な CPP-32 の発現、Bax の過剰発現、および BNP の発現が認められたが、Bcl-2 は両群ともに発現されなかった。

〔総括〕 ARVC において、アポトーシスによる心筋細胞死が惹起され、結果的に心不全に至

ると思われる心筋細胞の喪失に寄与している可能性が示唆される。

### 【研究目的】

アポトーシス (プログラム細胞死) は、それぞれの細胞に組織から排除されるように遺伝的に規定された過程である<sup>1)</sup>。最近になって、TUNEL 法<sup>2)</sup> (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling method) と ssDNA 法<sup>3)</sup> (rabbit polyclonal anti-single stranded DNA method) が、パラフィン切片においてアポトーシスを検出するために導入された。

不整脈源性右室心筋症 (ARVC) は、病理学的には線維脂肪組織によって置換された右室の進行性萎縮によって特徴づけられる、一次性的な心筋疾患である<sup>4)</sup>。主な病変部位は右室の自由壁で、通常心室中隔は侵されないが、時には左室が侵されることがある<sup>4,5)</sup>。

アポトーシスは、進行する心筋の萎縮の原因と推測されているが、その心筋の萎縮は ARVC の特徴であり、心臓の電気的不安定性の原因である<sup>4,6)</sup>。ARVC におけるアポトーシスの根拠は、死後の標本で報告されてきたが<sup>7)</sup>、死後の自己融解による細胞死も TUNEL 法陽性である可能性がある<sup>8)</sup>。今回われわれは、ARVC における心筋細胞の喪失が、DNA 断片化やアポトーシス関連蛋白の検出によってとらえられるアポトーシスによる細胞死の結果であるか否かを検討するために、ARVC 例 11例の右室心筋標本から得られたパラフィン切片を TUNEL 法と ssDNA 法を用いて病理組織学的に検討した。また、免疫組織学的手法を用いて不全心に関係して発現される BNP とともに、アポトーシスに関係して発現されるアポトーシス関連蛋白 (CPP-32, Bcl-2, および Bax) の検

出を試みた。

### 【研究方法】

ARVC 例11例 (ARVC 群) の診断は, in vivo で McKenna ら<sup>9)</sup> の診断基準に基づいてなされた。男性 8 例, 女性 3 例 (平均年齢;  $59.2 \pm 17.2$  歳) で, 標本はすべて外科手術で得られた。対照は, 年齢を一致させた, 明らかな心疾患を有しない10例の剖検例 (対照群) から得られた右室心筋標本を用いた。対照群は, 男性 3 例, 女性 7 例 (平均年齢;  $54.2 \pm 19.2$  歳) であった。標本を 10% ホルマリンで3~4時間固定し,  $3\mu\text{m}$  のパラフィン切片を作製した。

#### 1. TUNEL 法

脱パラフィンおよび水洗後,  $20\mu\text{g/mL}$  の Proteinase K を,  $37^\circ\text{C}$  で30分間反応させた。Endogenous peroxidase は 3% 過酸化水素水で不活化した。組織標本は, MEBSTAIN Apoptosis Kit II system (Medical & Biological Laboratories Co. Ltd., Nagoya, Japan) を用いて染色した。水洗後, 室温で5~10分間, DNA 断片の 3'-OH 末端部を TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) と反応させ,  $37^\circ\text{C}$  で60分間 TdT を触媒として DNA 断片の末端部を dUTP-biotin 残基と反応させた。水洗後,  $37^\circ\text{C}$  で30分間 Avidin-FITC と反応させた。

標本を蛍光顕微鏡下160倍で検鏡し, 組織の断端を除外して少なくとも100個以上の心筋細胞を観察した。アポトーシス指数は, 観察した心筋細胞に対する TUNEL 陽性細胞の百分率で表現した。心筋細胞と他の細胞は, 320倍で検鏡することにより形態学的に容易に区別できた。

#### 2. ポリクローナル・ウサギ抗一本鎖 DNA 抗体によるアポトーシス細胞の免疫組織化学的検出

脱パラフィンおよび水洗後, Endogenous peroxidase は 3% 過酸化水素水で不活化した。すべての切片を室温で60分間, ssDNA 抗体 (200倍希釈, DAKO JAPAN Co., Ltd., Kyoto, Japan) と反応させた。リン酸緩衝液で洗浄した後, 室温で30分間, EnVision+, Peroxidase, Rabbit (DAKO Co., Ltd., Carpintia, Calif.) と反応させた。その後, Diaminobenzidine (DAKO DAB Chromogen) を用い

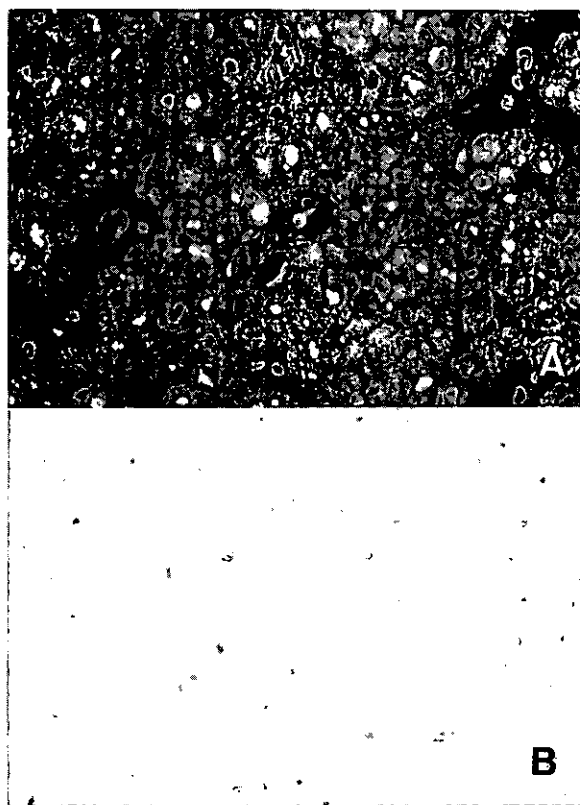


図1 TUNEL 法陽性細胞は, FITC を用いているので, 核が黄緑色の蛍光を発している細胞である(A)が, ssDNA 法陽性細胞は, 核が茶色に染色されている細胞である(B)。

Calif.) と反応させた。その後, Diaminobenzidine (DAKO DAB Chromogen) を用いて発色させた。

標本を光学顕微鏡下200倍で検鏡し, 組織の断端を除外して少なくとも100個以上の心筋細胞を観察した。アポトーシス指数は, 観察した心筋細胞に対する ssDNA 法陽性細胞の百分率で表現した。心筋細胞と他の細胞は, 400倍で検鏡することにより形態学的に容易に区別できた。

#### 3. protease CPP-32 の免疫組織化学的検出

脱パラフィンおよび水洗後, Endogenous peroxidase は 3% 過酸化水素水で不活化した。すべての切片を室温で60分間, ポリクローナル・ウサギ抗ヒト CPP-32 抗体 (DAKO Co., Ltd., Carpintia, Calif.) と反応させた。リン酸緩衝液で洗浄した後, 室温で30分間, EnVision+, Peroxidase, Rabbit (DAKO Co., Ltd., Carpintia, Calif.) と反応させた。その後, Diaminobenzidine (DAKO DAB Chromogen) を用い

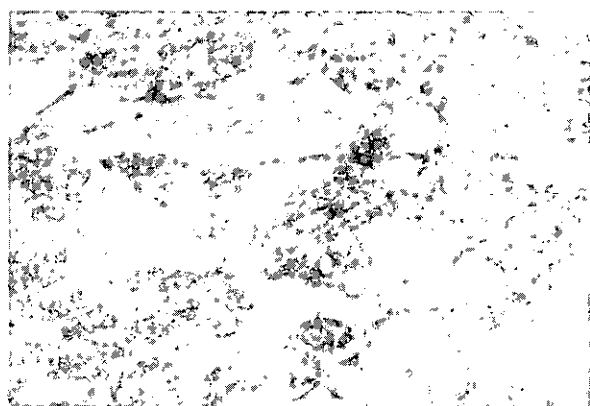


図2 CPP-32 陽性細胞は、細胞質が茶色に染色されている細胞である。

て発色させた。

#### 4. Bax および Bcl-2 の免疫組織化学的検出

脱パラフィンおよび水洗後、Endogenous peroxidase は 3% 過酸化水素水で不活化した。一次抗体としてポリクローナル・ウサギ抗ヒト Bax 抗体を 1500 倍に希釈し、DAKO CSA detection system を用いて反応させた。抗体を希釈するために DAKO Antibody Diluent with Background Reducing Components を用いた。すべての切片を、95-99°C、pH6.0 の 10mM クエン酸緩衝液中で 40 分間、ポリクローナル・ウサギ抗ヒト Bax 抗体 (DAKO Co., Ltd., Carpintia, Calif.) と反応させた。一方、一次抗体としてモノクローナル・マウス抗ヒト Bcl-2 抗体 (DAKO Co., Ltd., Carpintia, Calif.) と室温で 60 分間、反応させた。リン酸緩衝液で洗浄した後、室温で 30 分間、EnVision+, Peroxidase, Mouse (DAKO Co., Ltd., Carpintia, Calif.) と反応させた。その後、Diaminobenzidine (DAKO DAB Chromogen) を用いて発色させた。

#### 5. BNP の免疫組織化学的検出

IgG1 サブクラスに属する、モノクローナル・抗ヒト BNP-32 抗体を用いた。脱パラフィンおよび水洗後、DAKO LSAB を用いて、streptavidin-biotin method で免疫染色を施行した。まず最初に、Endogenous peroxidase は 3% 過酸化水素水で不活化した。非特異的な結合は正常のヤギ血清でブロックされた。一次抗体としてすべての切片を 4°C で 48 時間、ヒト BNP-32 に対するモノクローナル抗体 (Shiono

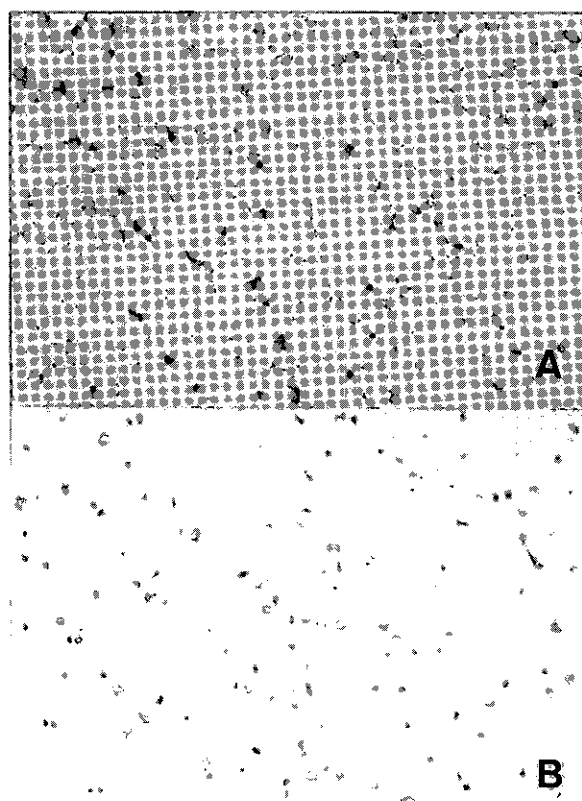


図3 Bax 陽性細胞は、細胞質が茶色に染色されている細胞であるが(A), Bcl-2 陽性細胞は認められなかった(B)。

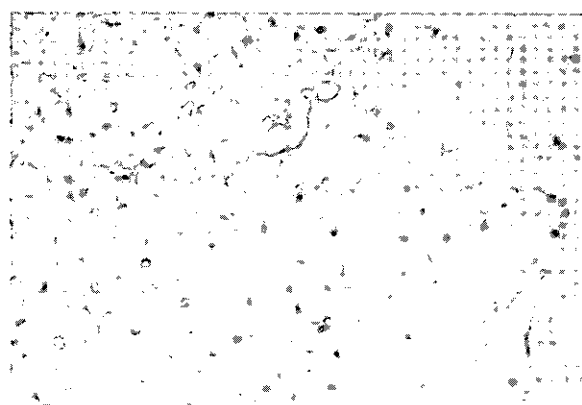


図4 BNP 陽性細胞は、細胞質が茶色に染色されている細胞である。

RIA BNP assay kit, Shionogi Co., Ltd.) と反応させた。その後、Diaminobenzidine (DAKO DAB Chromogen) を用いて発色させた。

#### 【結 果】

ARVC 群 11 例の結果を表 1 に示す。

TUNEL 法のアポトーシス指数は、 $23.7 \pm 7.6\%$  と高値であるが、ssDNA 法では  $5.7 \pm 4.5\%$  と TUNEL 法に比してかなり低値である。

ARVC 群全例において CPP-32 抗体と Bax

表 1

Pt. No.	Age(yr)/ Gender	TUNEL(%)	ssDNA(%)	CPP-32	Bcl-2/Bax	BNP
1	41/M	19.9	2.0	+	-/+	+
2	18/M	26.2	4.0	+	-/+	+
3	52/M	19.9	4.9	+	-/+	+
4	53/F	22.5	5.1	+	-/+	+
5	33/M	9.5	2.0	+	-/+	+
6	55/M	20.5	12.7	+	-/+	+
7	56/F	22.5	6.7	+	-/+	+
8	46/M	22.2	3.5	+	-/+	+
9	55/M	25.6	15.8	+	-/+	+
10	42/F	35.9	3.0	+	-/+	+
11	46/M	41.8	3.0	+	-/+	+
		23.7±7.6	5.7±4.5			

抗体によって染色されたが、Bcl-2 抗体では染色されなかった。

また、ARVC 群全例において BNP 抗体によって染色された。

一方、表には示していないが、対照群におけるアポトーシス指数は、TUNEL 法では  $10.2 \pm 8.3\%$ 、ssDNA 法では  $0\%$  であった ( $p < 0.01$ )。さらに、対照群では CPP-32 抗体、Bax 抗体、および Bcl-2 抗体によって染色された細胞は認められなかった。

## 【考 察】

### 1. TUNEL 法と ssDNA 法

近年、Gavrieli ら<sup>2)</sup>が考案した TUNEL 法を用いることにより、さまざまな組織切片上でのアポトーシスの検索が可能となり、アポトーシス小体の形態をとるもの以外にもアポトーシスに陥った細胞やその準備段階にあると思われる細胞を捉えることが容易になった。しかし、一方で TUNEL 法では断片化した DNA を認識するために、アポトーシス細胞ばかりでなく、壊死した細胞や固定条件により崩壊した細胞なども認識することが明らかとなっている<sup>10)</sup>。また、TUNEL 法では、操作が繁雑であるために非特異的反応が増幅される可能性もある。

他方、ssDNA 法では、ポリクローナル・ウサギ抗一本鎖 DNA (ssDNA) 抗体を用いる。ssDNA 抗体は、5~6 塩基以上の一本鎖 DNA に特異的に反応し、二本鎖の DNA や RNA と

は交差反応しないので、アポトーシスの過程にある核で解裂した一本鎖の DNA 断片を認識し、TUNEL 法に比してかなり特異性が高いと考えられる<sup>3)</sup>。

本研究では、10% ホルマリンで固定した標本に TUNEL 法を施行しているためにアポトーシスに陥った細胞以外にも非特異的反応が起っていると考えられる。そのため、TUNEL 法のアポトーシス指数は、 $23.7 \pm 7.6\%$  と高値であるが、ssDNA 法では  $5.7 \pm 4.5\%$  と TUNEL 法に比してかなり低値となっているものと思われる。したがって、アポトーシス細胞を検出する際には、ssDNA 法の方が操作が簡単であるため非特異反応の介在する可能性が小さく、特異性はかなり高いと考えられる。

### 2. CPP-32 抗体によるアポトーシス細胞の検出

CPP-32 は、アポトーシスの開始に必要な cysteine protease であり、線虫 *Caenorhabditis elegans* のプログラム細胞死に必要な遺伝子産物である interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme (ICE) や CED-3 に関連している。CPP-32 は、DNA の修復やゲノムの完成に関連した酵素である poly (adenosine diphosphate ribose) polymerase を解裂し、不活化する特異的な ICE/CED-3 のような哺乳類の cysteine protease である<sup>11)</sup>。

本研究では、ARVC 群全例において明確な

CPP-32 の発現が認められたが、対照群では認められなかった。よって、ARVC 群では多数の細胞がアポトーシスに陥る可能性がある。

### 3. Bax および Bcl-2

bcl-2 遺伝子でコードされる蛋白は、アポトーシス(プログラム細胞死)の調節因子である。この蛋白による細胞の生存を促進させる作用は、Bax によって抑制されるが、Bax は Bcl-2 と相同の蛋白である。in vivo では Bax は、ホモダイマーを形成したり、Bcl-2 とヘテロダイマーを形成する。Bax の過剰発現は、アポトーシスを促進し、Bcl-2 による細胞死の抑制に対抗する。よって Bax に対する Bcl-2 の比が、アポトーシスを惹起させる刺激が生じた後、細胞が生存するか否かを決定するものと考えられる<sup>12,13)</sup>。

本研究では、ARVC 群全例において、Bax の過剰発現が認められたが、Bcl-2 の発現は認められなかった。また、対照群では Bax の発現も Bcl-2 の発現も認められなかった。よって、ARVC 群では多数の細胞がアポトーシスに陥る可能性がある。

### 4. BNP の発現

BNP は左室容量の増大や圧負荷に反応して心室細胞内の顆粒から分泌される心臓ホルモンである<sup>14)</sup>。BNP の血中濃度は、症状のある左心不全の患者で上昇し、左室充満圧、NYHA の分類、および予後と相関することが認められる<sup>15)</sup>。

ARVC 群全例において BNP の発現が認められたことから、ARVC 群では心不全を呈していた可能性がある。

### 【結 論】

ARVC において、アポトーシスによる心筋細胞死が惹起され、結果的に心不全に至ると思われる心筋細胞の喪失に寄与している可能性が示唆されるが、心筋細胞に BNP の発現が認められることから、血中 BNP 値の測定は ARVC の予後評価に有用である可能性がある。

### 【参考文献】

- 1) Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257.
- 2) Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119: 493-501.
- 3) Frankfurt OS. Detection of apoptosis in leukemic and breast cancer cells with monoclonal antibody to single-stranded DNA. *Anticancer Res* 1994; 14: 1861-1870.
- 4) Basso C, Thiene G, Corrado D, Angelini A, Nava A, Valente M. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. Dysplasia, Dystrophy, or Myocarditis? *Circulation* 1996; 94: 983-991.
- 5) Pinamonti B, Sinagra G, Salvi A, Di Lenarda A, Morgera T, Silvestri F, Bussani R, Camerini F. Left ventricular involvement in right ventricular dysplasia. *Am Heart J* 1992; 123: 711-724.
- 6) James TN. Normal and abnormal consequences of apoptosis in the human heart. From postnatal morphogenesis to paroxysmal arrhythmias. *Circulation* 1994; 90: 556-573.
- 7) Mallat Z, Tedgui A, Fontaliran F, Frank R, Durigon M, Fontaine G. Evidence of apoptosis in arrhythmogenic right ventricular dysplasia. *N Engl J Med* 1996; 335: 1190-1196.
- 8) Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R. In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology* 1995; 21: 1465-1468.
- 9) McKenna WJ, Thiene G, Nava A, Fontaliran F, Blomstrom-Lundqvist C, Fontaine G, Camerini F. Diagnosis of ar-
- 10) Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon

- rhythmogenic right ventricular dysplasia/ cardiomyopathy. *Br Heart J* 1994; 71: 215-218.
- 10) Yasuda M, Umemura S, Osamura RY, Kenjo T, Tsutsumi Y. Apoptotic cells in the human endometrium and placental villi: pitfalls in applying the TUNEL method. *Arch Histol Cytol* 1995; 58: 185-190.
  - 11) Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA, Munday NA, Raju SM, Smulson ME, Yamin T, Yu VL, Miller DK. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 1995; 376: 37-43.
  - 12) Krajewski S, Krajewska M, Shabaik A, Miyashita T, Wang HG, Reed JC. Immunohistochemical determination of in vivo distribution of Bax, a dominant inhibitor of Bcl-2. *Am J Pathol* 1994; 145: 1323-1336.
  - 13) Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993; 74: 609-619.
  - 14) Nakagawa O, Ogawa Y, Itoh H, Suga S, Komatsu Y, Kishimoto I, Nishino K, Yoshimasa T, Nakao K. Rapid transcriptional activation and early mRNA turnover of brain natriuretic peptide in cardiocyte hypertrophy. Evidence for brain natriuretic peptide as an "emergency" cardiac hormone against ventricular overload. *J Clin Invest* 1995; 96: 1280-1287.
  - 15) Maeda K, Tsutamoto T, Wada A, Hisanaga T, Kinoshita M. Plasma brain natriuretic peptide as a biochemical marker of high left ventricular end-diastolic pressure in patients with symptomatic left ventricular dysfunction. *Am Heart J* 1998; 135: 825-832.

## 右室異形成を呈した乳児剖検例における N-カドヘリンの分布異常について

池田 善彦 由谷 親夫

国立循環器病センター臨床検査部病理

### 【研究要旨】

特発性拡張型心筋症の病因は現在不明であるが、患者集団の10～25%には明らかな家族歴が認められることから、単因子遺伝病と考えられている。中でもZ帯や介在板に関わる細胞骨格蛋白は病因遺伝子として注目されており、最近、Naxos病(不整脈源性右室心筋症、掌蹼角皮症、羊様毛髪)の家系で、プラコグロビン( $\gamma$ -カテニン)遺伝子の欠失が<sup>1)</sup>、また、拡張型心筋症、角皮症、羊様毛髪の臨床像をもつ家系ではデスモプラキンの変異が報告され<sup>2)</sup>、これら介在板に関わる細胞骨格蛋白の異常が相次いで見つかっている。以前、我々は左室機能が正常で著明な右室機能不全および右室の拡張を呈した乳児剖検例を経験した。同症例の右室は肉眼的にゼラチン様で、組織学的には個々の心筋細胞は離開し、筋原性由来の多形性細胞からなっていた。心筋細胞の介在板接着野に存在するN-カドヘリンに対する免疫染色では、左室においては介在板に一致して陽性像を示したのに対し、右室では、介在板への染色性が低下し、心筋細胞膜への異常分布が認められた。接着野は、心筋細胞間の機械的結合にあずかるとされており、そこに存在するカルシウム依存性細胞接着分子であるN-カドヘリンの分布異常が、著明な機能不全を呈した右室にのみ認められたことは、心筋症における心筋収縮不全の病態解明の点でも興味深いと考えられた。

### 【研究目的】

N-カドヘリンはカルシウム依存性細胞接着分子で、心筋細胞の介在板における接着野に存在し、心筋細胞の機械的結合に重要な役割を果たしていると考えられている。今回我々は、左室は正常の機能を有し、右室に高度な機能不全

および拡張を呈した乳児剖検例において、両心室心筋細胞のN-カドヘリン分布を検討することを目的とした。

### 【症例提示】

症例：生後1カ月の女児。

母体妊娠分娩歴：妊娠中期頃、一度発熱、38週6日2630g、正常分娩で出生。仮死無し。

現病歴：出生後1週で産院を退院。自宅で末梢冷感、顔色不良に気づくも軽度であり、哺乳力良好のため放置。1カ月検診では体重増加良好。体重3530gで特に異常は指摘されなかった。検診2日後の夜より急に多呼吸、哺乳力低下、顔色不良著明となり、近医に緊急入院し、全身チアノーゼのため心エコー施行され、Ebstein心奇形を疑われ、転院となった。

入院時現症と経過：体重3540g、栄養状態は普通。心拍数162/分、呼吸数100/分、陥没呼吸、全身蒼白、チアノーゼ。心音は軽度の収縮期雑音を聴取。肝は4cm硬く触知した。活動性弱く、入院時血圧40/28mmHg、カテコールアミン、PGE1、酸素等の投与を行い、血圧80/40mmHgに維持。また、同時に輸血を行った。血液検査データ：表1参照。

胸部X線：CTR 0.59、肺血管陰影減少。

心電図：洞調律、右側胸部誘導(V1R～V4R)のST-T上昇1～1.5mm。

心エコー図：心内の構造的な心奇形は無く、右房、右室の著明な拡大と右室のakineti c状態。一見右室自由壁は厚く見えた。三尖弁と肺動脈弁は解放状態で動き無く、肺動脈は軽度拡大し、動脈管の血流は認めず、卵円孔より右左短絡を認めた。肺高血圧パターンなものの、肺動脈内の血流信号はatrial fillingに一致し、三尖弁部の逆流信号より右室圧は低いと思われた(図

表 1

	転院前日	転院日
pH	7.453	7.386
PaCO <sub>2</sub> (mmHg)	32.3	39.8
PaO <sub>2</sub> (mmHg)	34.9	29.2
HCO <sub>3</sub> (mmHg)	22.5	23.6
ABE	-0.5	-0.9
SaO <sub>2</sub> (%)	70	54.8
WBC (/mm <sup>3</sup> )	6000	9700
RBC ( $\times 10^4$ /mm <sup>3</sup> )	337	311
Hb (g/dl)	11.6	10.5
Plt ( $\times 10^4$ /mm <sup>3</sup> )	40.9	39.8
GOT (U/l)	47	43
GPT (U/l)	50	40
ALP (U/l)	1195	1114
LDH (U/l)	1315	1066
BUN (mg/dl)	11.5	15.7
Na (mEq/l)	133	133
K (mEq/l)	5.1	4.7
Cl (mEq/l)	97	95
CK (U/l)	569	260
CRP (mg/dl)	0.1	0.6

1). 左室機能は良好で左室駆出率 74%, 心室中隔部の動きも良好. 冠状動脈は左主幹部から前下行枝まで認め, 右冠状動脈は起始部は認めるものの, それ以降は不明であった.

動脈血酸素飽和度は進行性に低下し, 肺血流を増加させる目的で緊急に右 Blalock-Taussig shunt を施行したが, 術中に進行性の低酸素, アシドーシスのため死亡した.

#### 【研究方法】

10% 中性緩衝ホルマリンにて固定後, 両心室横切面でのパラフィン切片を作製し, ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色, リンタングステン酸ヘマトキシリン(PTAH)染色, 抗ヒト筋線維アクチン・マウスモノクローナル抗体(DAKO), 抗ヒトデスミン・マウスモノクローナル抗体(DAKO), 抗ウシビメンチン・マウスモノクローナル抗体(DAKO), 抗ヒトミオグロビン・ウサギポリクローナル抗体(DAKO)および抗ヒト N-カドヘリン・ウサギポリクローナル抗体を用いて各々免疫染色を施行し, 病理組織学的に検討した.

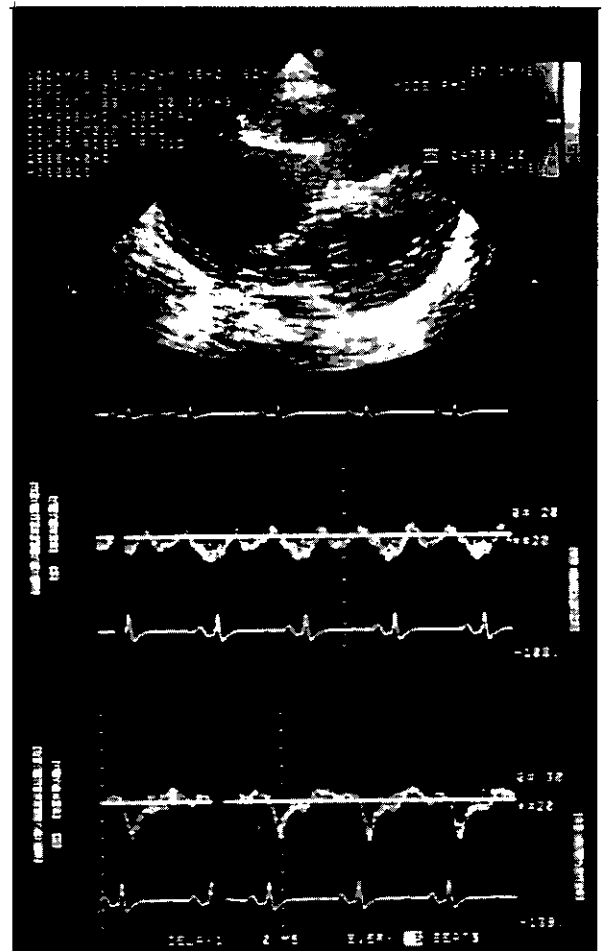


図 1 (上段)四腔断面像. 三尖弁逆流と卵円孔より右左短絡が認められる. (中段)肺動脈血流シグナル. 肺高血圧パターンなものの, 肺動脈内の血流信号は atrial filling に一致している. (下段)三尖弁逆流シグナル. 三尖弁部の逆流信号より右室圧は低いと思われる.

#### 【結果と考察】

右室は肉眼的にゼラチン様で, 組織学的には正常に分化した心筋細胞が消失し, 多形性細胞により置換されていた(図 2). PTAH 染色では, 心筋細胞の A 帯に染色性を示すが, 左室では全体にわたって陽性像がみられるのに対し, 右室では一部の乳頭筋と肉柱以外陰性であった(図 3). 同細胞は, 筋線維アクチン, デスミン, ビメンチン, ミオグロビンに陽性で(図 4), 筋原性由来と考えられた. また, 左室心筋細胞の介在板に一致して認められた N-カドヘリンは, 右室の筋原性由来多形性細胞には介在板だけでなく, 細胞膜への異常分布が認められた(図 5).

N-カドヘリンは, 心筋細胞の介在板接着野に存在し, 心筋細胞の機械的結合に重要な役割

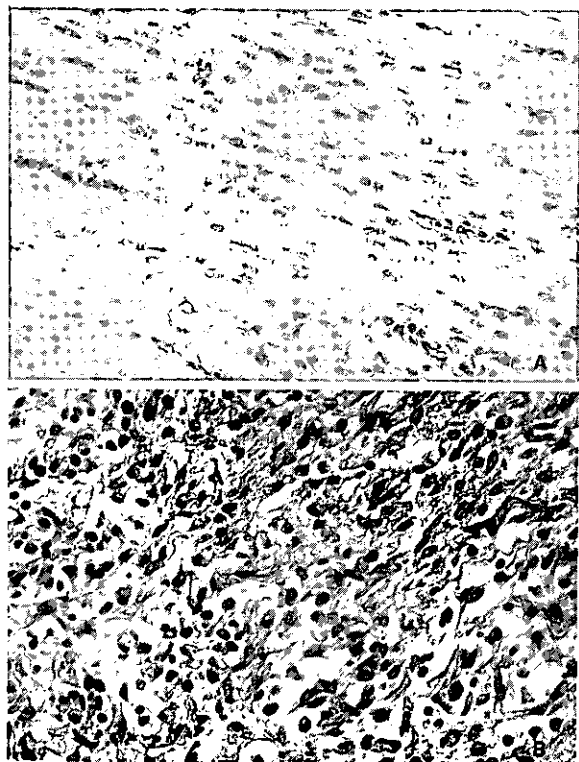


図2 (A)左室側壁. 左室心筋細胞は、接合部異常がなく正常配列を呈しているのに対し(HE染色,  $\times 560$ ), (B)右室側壁. 右室心筋は、個々に離開し多形性細胞より構成されている(HE染色,  $\times 560$ ).

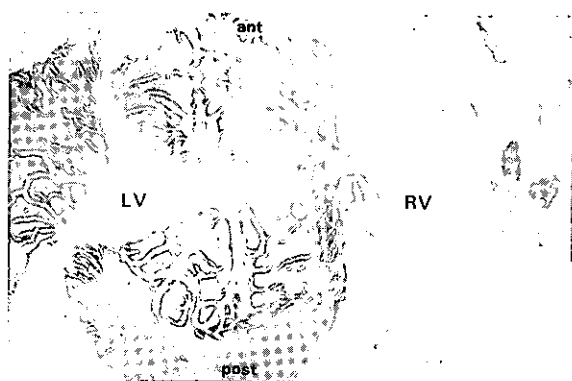


図3 両心室横切面. 左室心筋は染色性を示すのに対し, 右室心筋は一部の乳頭筋と肉柱以外は染色されない(PTAH, ルーベ像).



図4 右室側壁. (A)抗ヒト筋線維アクチン・マウスモノクローナル抗体,  $\times 140$ . (B)抗ヒトデスミン・マウスモノクローナル抗体,  $\times 140$ . (C)抗ウシビメンチン・マウスモノクローナル抗体,  $\times 140$ . (D)抗ヒトミオグロビン・ウサギポリクローナル抗体,  $\times 140$ . 多形性細胞は、各免疫染色において陽性像を示す.

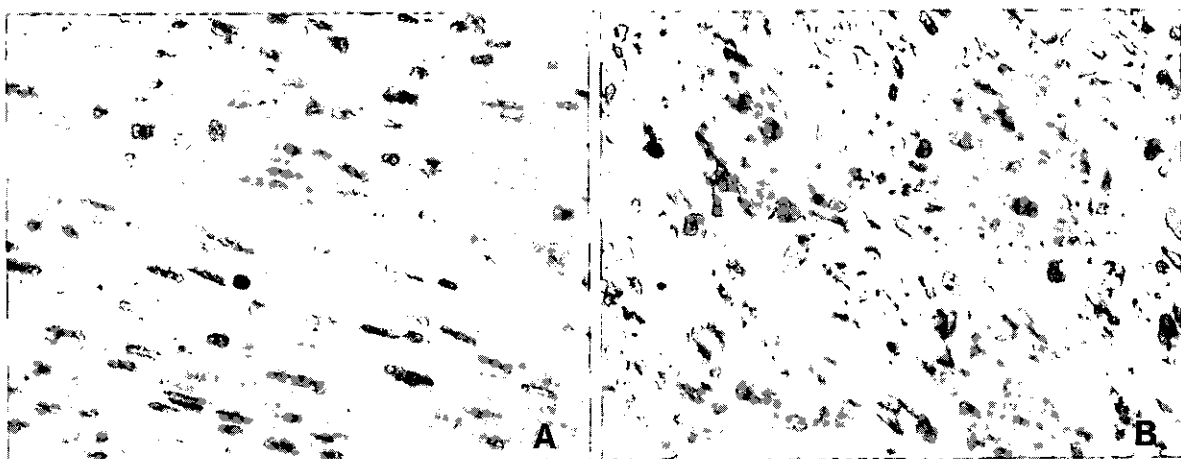


図5 (A)左室側壁. 心筋細胞の介在板に一致して陽性像が認められる(抗ヒト N-カドヘリン・ウサギポリクローナル抗体,  $\times 800$ ). (B)右室側壁. 心筋細胞の介在板と思われる部位だけでなく, 細胞膜への異常分布が認められる(抗ヒト N-カドヘリン・ウサギポリクローナル抗体,  $\times 800$ ).

を果たしていると考えられている。細胞内領域では  $\gamma$ -カテニンもしくは  $\beta$ -カテニンと結合している。 $\gamma$ -カテニンおよび  $\beta$ -カテニンは  $\alpha$ -カテニンと結合し、 $\alpha$ -カテニンは  $\alpha$ -アクチニンを介して、また、直接アクチンと結合している。ニワトリの胎生期の心筋細胞培養の検討では、発生過程に伴って、細胞膜全周性に分布する N-カドヘリンが、隣接する心筋細胞接合部に集積し、その後、 $\alpha$ -アクチニン、ミオシン、タイチン、 $\alpha$ -アクチンが順次形成されて収縮を開始するが、抗ヒト N-カドヘリン抗体で処理すると、それぞれの心筋細胞間の接着性が失われ、心筋細胞は個々に球形を呈し、 $\alpha$ -アクチニンやミオシンといった心筋細胞構成成分が形成されない<sup>3)</sup>。in vivo でも、胎生期の段階で抗ヒト N-カドヘリン抗体による処理を加えると、心筋は幾分収縮性を示すが、協調性はもたない<sup>4)</sup>。また、ノックアウトマウスの検討では、 $\gamma$ -カテニンの欠損で心破裂により胎生致死に至ることや<sup>5)</sup>、 $\alpha$ -アクチニン結合 LIM 蛋白の欠損で右室心筋症様の病態に至ることが報告されている<sup>6)</sup>。最近、ヒトの症例でも Naxos 病(不整脈源性右室心筋症、掌蹼角皮症、羊様毛髪)の家系で、プラコグロビン( $\gamma$ -カテニン)遺伝子の欠失が、また、拡張型心筋症、角皮症、羊様毛髪の臨床像をもつ家系ではデスモプラキンの変異が報告され、介在板接着斑に関わるこれらの細胞骨格蛋白の異常が心筋症例で相次いで見つかった。今回、同一個体において、正常の心機

能を呈した左室心筋細胞には、形態学的に心筋細胞の接合異常がなく、N-カドヘリンは介在板に濃縮しており、一方、高度な収縮能低下を呈し、組織学的に個々の心筋細胞が離開し、多形性を示した右室心筋細胞には、N-カドヘリンの分布異常が認められたことから、介在板における N-カドヘリンの分布異常によって、個々の心筋細胞の収縮力の伝達性が減じ、心臓全体としての収縮能低下の一因となっている可能性が示唆される。

我々の施設における、過去の心筋症剖検例の検討でも、16例中 3 例(拡張型心筋症 1 例、肥大型心筋症 2 例)に N-カドヘリンの分布異常を認めている。3 例とも家族性心筋症であり、また、肥大型心筋症例はいずれも拡張相肥大型心筋症であった。対照群として心疾患を有さない 8 例と虚血性心疾患あるいは弁膜疾患の 8 例には、そのような異常が認められなかったことから、家族性心筋症の中に、N-カドヘリンの分布異常をきたす一群が存在すると考えている。先述したように、カドヘリンは細胞内領域においてカテニン分子と結合しており、カドヘリンの分布異常が認められた肺低分化腺癌培養株ではカテニンの遺伝子変異が同定されていることから<sup>7)</sup>、これら細胞骨格蛋白の異常により、カドヘリン分布異常が生じることが想定される。したがって、これまでヒトの心筋症例で報告されている接着斑に関わる細胞骨格蛋白異常と同様に、接着野に関わるこれらの細胞骨格蛋白の

遺伝子異常についても今後検討する必要があると考えられる。

### 【結 論】

正常の左室機能を有し、高度な右室機能不全と拡張を呈した一乳児例を経験した。剖検では、左室心筋に形態異常は認められず、N-カドヘリンは正常の分布を示していた。右室心筋は個々に離開した筋原性由来の多形性細胞より構成されており、同細胞にはN-カドヘリンの分布異常が認められた。

### 【参考文献】

- 1) Mckoy G, Protonotarios N, Crosby A, et al: Identification of a deletion in plakoglobin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with palmoplantar keratoderma and wooly hair (Naxos disease). *Lancet* 2000; 355: 2119-2124.
- 2) Norgett EE, Hatsell SJ, Carvajal-Huerta L, et al: Recessive mutation in desmoplakin disrupts desmoplakin-intermediate filament interactions and causes dilated cardiomyopathy, wooly hair and keratoderma. *Hum Mol Genet.* 2000; 9: 2761-2766.
- 3) Imanaka-Yoshida K, Knudsen KA, Linask KK: N-cadherin is required for the differentiation and initial myofibrillogenesis of chick cardiomyocytes. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 1998; 39: 52-62.
- 4) Nakagawa S, Takeichi M: N-cadherin is crucial for heart formation in the chick embryo. *Develop Growth Differ.* 1997; 39: 451-455.
- 5) Ruiz P, Brinkmann V, Ledermann B, et al: Targeted mutation of plakoglobin in mice reveals essential functions of desmosomes in the embryonic heart. *J Cell Biol.* 1996; 135: 215-225.
- 6) Pashmforoush M, Pomies P, Peterson KL, et al: Adult mice deficient in actinin-associated LIM-domain protein reveal a developmental pathway for right ventricular cardiomyopathy. *Nature Med.* 2001; 7: 591-597.
- 7) Shimoyama Y, Nagafuchi A, Fujita S, et al: Cadherin dysfunction in a human cancer cell line; possible involvement of loss of a-catenin expression in reduced cell-cell adhesiveness. *Cancer Res.* 1992; 52: 5770-5774.

## 拡張型心筋症に対する心臓移植実施例の検討

北村 惣一郎 笹子 佳門 小林 順二郎  
坂 東 興 田 鎖 治 公文 啓二  
八木 原 俊 克

国立循環器病センター心臓血管外科

中 谷 武 嗣 花 谷 彰 久 庭 屋 和 夫  
国立循環器病センター臓器移植部

小 野 安 生  
国立循環器病センター小児科

佐 藤 長 人 駒 村 和 雄 宮 武 邦 夫  
国立循環器病センター心臓内科

由 谷 親 夫  
国立循環器病センター病理

### 【研究要旨】

従来の治療法の限界を越えた末期的心不全を呈した拡張型心筋症(DCM) 3例に対する心臓移植について検討を行った。2例は補助人工心臓装着にて、また1例はカテコラミン投与にて心臓移植待機したが、移植後の経過は順調である。

### 【研究目的】

我が国において、平成9年10月の臓器移植法施行後これまでに心臓移植は10例が実施された。このうち6例は国立循環器病センターにおいて施行された。本稿では、初期3例の経過を報告する(表1, 2, 3)<sup>1,2,3)</sup>。

### 【研究方法】

1) 症例1: 43歳, 男性

12歳時に心拡大を指摘された。27歳時に心不全症状が発症し、DCM、冠状動脈肺動脈瘻と診断された。その後発作性心房粗動を引き金にして心不全を繰り返していた。1991年冠状動脈肺動脈瘻閉鎖術が施行された。1997年3月より発作性心房粗動が増加し、アミオダロン、β遮断薬にて加療された。1998年12月に右腎梗塞を発症した。1999年1月発作性心房粗動が頻回と

なり、2月に当センターへ入院した。入院後の心エコーでは、左室拡張/収縮末期径(LVDd/Ds)74/68mm、左室短縮率(LVFS)8%であった。また、運動耐容能検査では、peak VO<sub>2</sub> 10.5ml/min/kgと低値であった。

その後心不全が憎悪し、ドブタミン、ミルリノン、ドパミンおよび利尿剤を用いたが、両心不全症状および肝・腎機能の悪化を認めた。このため、東洋紡製国立循環器病センター型空気圧駆動ダイアフラム型体外式左心補助人工心臓(LVAS)装着術を左房脱血方式にて施行した<sup>4)</sup>。LVAS装着後、全身循環は安定し、術後11日目には外科一般病棟へ転棟した。歩行、自転車こぎなどのリハビリテーションを行い、心臓移植を待機していた。

2) 症例2: 25歳, 男性

15歳時心電図異常至適されるも放置していた。21歳時、脈の結滞を自覚し、全身倦怠感、立ちくらみを伴うようになった。精査にてDCMと診断され、β遮断薬の治療が開始された。23歳時、失神が生じるようになり、心室性頻拍症(VT)と診断され、またEMBによりDCMと確定された。24歳時、VT出現し、アミオダロ

表1 国立循環器病センターにおける心臓移植3例のまとめ(1)

症 例	1	2	3
移植実施日	1999. 5.12	1999. 6.13	2000. 7. 8
年齢	40代	20代	40代
性別	男	男	女
心疾患	DCM	DCM	DCM
体重	R<D	R<D	R>D
医学的緊急度	1(LVAS)	1(強心剤投与)	1(LVAS)
待機期間	29	69	198
補助人工心臓	左房 type	(-)	左室 type
補助期間(日)	39	(-)	227
退院(移植後日)	65	46	90
現状	社会復帰	社会復帰	社会復帰

表2 国立循環器病センターにおける心臓移植3例のまとめ(2)

症 例	1	2	3
提供施設所在地	宮城県	東京都	福岡県
搬送方法	チャーター機	チャーター機	チャーター機
搬送時間	1:33	2:20	1:43
心虚血時間	3:46	3:35	3:29
心移植手技	Lower-Shumway	Bicaval	Bicaval

表3 国立循環器病センターにおける心臓移植3例のまとめ(3)

症 例	1	2	3
免疫抑制療法			
抗胸腺細胞抗体製剤	OKT3	使用せず	OKT3
シクロスポリン	(+)	(+)	(+)
プレドニゾロン	(+)	(+)	(+)
ミコフェノール酸	(+)	(+)	(+)
拒絶反応の治療の有無	(-)	(+)	(-)
拒絶反応の治療法	(-)	ステロイドパルス	(-)
治療を要する感染症	(-)	(-)	(-)
CMV 予防的治療	(+)	(+)	(+)

ンの服用を開始したが、コントロール不良で同年8月植え込み型除細動器(ICD)植え込み術が施行された。その後、数度のICD作動がみられた。12月下旬より心不全症状を認め、平成11年1月緊急入院となった。ドブタミン、ミルリノン投与が開始され、内科的治療の限界として、心臓移植適応として、日本臓器ネットワークへ登録し、移植待機となった。

### 3) 症例3: 44歳、女性

1998年1月感冒時に心不全症状出現したが、自然消失したため放置していた。10月に同症状

出現し、11月初旬憎悪し近医に入院した。EMBにてDCMと診断され、 $\beta$ 遮断薬、ACE阻害剤を含む内科的治療にて軽快し、外来にて加療されていた。1999年9月より呼吸困難出現し、入院加療を行うも心不全悪化し、10月下旬には人工呼吸器、カテコラミン依存となり、当センターへ転院した。その後、僧坊弁および三尖弁形成術を施行したが、術後も心不全は持続し、IABP補助が必要となり、同日LVAS(左室脱血)装着術を行った<sup>5)</sup>。LVAS装着後全身状態は改善した。自己心機能の回復は期待しが

たいと判断し、心臓移植待機となった。12月より内科一般病棟にて心臓移植待機を続けた。

### 【結果と考察】

1) 症例1：LVAS 補助39日目ドナーが出現した。当日軽度の多臓器障害を認めたが、全身状態は良好であり、移植可能と判断した。移植手術は標準的術式(Lower-Shamway 法)<sup>6)</sup>を用いた。術後ICU クリーンルームへ入室し、11時間後には抜管し、経口摂取も開始された。初回の心筋バイオプシーにて拒絶を認めなかったため、一般病棟のクリーンルームへ転棟し、リハビリテーションを積極的に進めた。65日目に退院した。移植後10ヵ月で復職し、現在月1回移植外来にて加療を継続している。

免疫抑制療法は、軽度肝・腎障害を認めたことより、術中よりムロモナブ-CD3(オルソクロン OKT3)と methylprednisolone (ソル・メドロール)により導入し、全身状態安定後 cyclosporine-A (ネオール), mycophenolate mofetil (セルセプト), および prednisolone (プレドニン)による三者併用療法へ移行した。心筋バイオプシー(EMB)は、当初1週ごとに右内頸静脈より行い、順次間隔をあけて定期的に行った。これまでに行った EMB では、国際心臓肺移植学会基準<sup>7)</sup>Ⅱ以下と治療を要する拒絶反応を認めていない。心機能上も良好で、EMB 時に行う右心カテにても、肺動脈圧、肺楔入圧、心拍出量も正常であった。また、3ヵ月および1年目に冠動脈造影および冠血管内エコーを施行したが、特に異常所見を認めていない。最近行った1.5年後の EMB も0と拒絶反応を認めず、現在はネオール 450mg, セルセプト 2g のみとし、プレドニンは中止している。

2) 症例2：登録68日目にドナーが出現した。本例は、初回手術であり、手術法としては、ドナー心、特に右心の変形が少ないとされる両大静脈吻合法(bicaval 法)を用いた<sup>8)</sup>。

免疫抑制療法は、ネオール, セルセプト, プレドニンによる三者併用療法を行った。EMB は、国際基準Ⅰa 以下で、術後46日目に退院した。移植後3ヵ月の EMB にて治療を要するⅢa の所見をみたため、入院にてソル・メ

ドロールによる 500mg/day 3 日間のパルス療法を行った。1 週後の EMB にて、Ⅰa と軽快していた。その後、8ヵ月目の EMB にて再度Ⅲa の所見を認めたため、ソル・メドロール 2.5g のパルス療法を行った。その後、1年目の EMB にて Quilty effect を認めたが、Ⅰa であり、その後 Quilty effect は消失しており、現在経過観察中である。1 例目同様3ヵ月および1年目に冠動脈造影および冠血管内エコーを施行したが、特に異常所見を認めていない。移植後10ヵ月で復職し、現在月1回移植外来にて加療を継続している。

3) 第3例：LVAS 補助227日目にドナー情報があり、移植手術を行った。手術術式としては、再々手術ではあったが癒着が比較的軽度であったため、自己右房後壁を温存する modifid bicaval 法を用いた。術後ICU クリーンルームへ入室したが、ドナー心がレシピエントの体重に比し、小さめであったが、頻拍を維持することで循環動態は安定していた。早期の抜管、経口摂取が可能であった。初回の心筋バイオプシーにて国際基準0と拒絶を認めなかったため、一般病棟のクリーンルームへ転棟し、リハビリテーションを積極的に進めた。歯科治療を必要としたため、90日目に退院し、現在自宅でのリハビリテーション施行中で、月2回の移植外来にて加療を継続している。

免疫抑制療法は、LVAS 装着例であり、また PRA 陽性およびドナー HLA への抗体陽性既往であるため、1 例目と同様に術中よりオルソクロン OKT3 とソル・メドロールにより導入し、ネオール, セルセプト, およびプレドニンによる三者併用療法へ移行した。EMB では現在まで国際基準Ⅰa 以下である。

本例はドナー体重がレシピエントより小さく、当初1回拍出量は小さかった。その後、心臓リハビリ室にてリハビリテーションを行うようになってから、増大してきた。

4) 考察：末期的心不全に対する治療法として、現在のところ心臓移植がもっとも安定した治療成績を示している。しかし、心臓移植を行うには脳死下での臓器提供が必要であり、我が国では、平成9年10月に施行された臓器移植法の施