

では血流及び脂肪酸代謝障害が生じていることすなわち潜在性心筋障害が存在しインターフェロン投与により改善した事を示唆しているものと考えられる。

NR群の一部に201TIの集積がインターフェロン投与後に低下した症例が見られたが、持続するウイルス血症あるいはインターフェロンによる心筋障害の可能性が示唆された(27)。

本研究で認められた心筋障害がHCVの細胞障害性に基づくのかあるいは免疫学的機序に基づくのかは明らかではないが、HCV感染に関連したものであることは明らかである。慢性C型肝炎患者において血清IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF $\alpha$ 濃度が上昇しているとの報告もあり(28)、これらの炎症性サイトカインが核種の集積に影響を与えたり、心筋障害の原因となっているかもしれない(29)。慢性C型肝炎患者において肝組織の重症度と血清炎症性サイトカイン濃度との間の相関関係が報告されている(30)。本研究では提示していないが肝組織の重症度とシンチの重症度スコアとの間には関連が認められなかったことから、心筋障害はサイトカインよりもウイルスそのものによる影響の可能性が高いと考えられる。Cacoubらは最近HCV誘発性血管炎患者に高率に抗内皮細胞抗体が検出されることを報告している(31)。抗体による内皮細胞障害および血管炎がこれらの核種の集積低下の原因の可能性も考えられる。HCVは生体内でquasispeciesとして存在していることが知られている(32)。Sakaiらは最近同一個体内の異なる肝臓組織から異なるHCV cloneを検出しており(33)、心筋に親和性のあるquasispeciesの存在も考えられる。

心筋生検を行った症例の検討では、心筋からHCV-RNAが証明された患者の心疾患は心筋症から冠攣縮性狭心症、不整脈まで多彩であった。MRIにおいて心筋シンチの集積低下に一致して同部心内膜側にガドリニウム造影効果を認めた。

#### (結語)

C型肝炎ウイルスに感染している患者の一部に潜在する心筋障害が存在することが示唆された。本研究の結果よりインターフェロン治療はこの潜在性の病変の進行を改善する可能性が期待される。さらにC型肝炎ウイルスに感染している心筋症、心筋炎患者の治療に有用である可能性も示唆される。この仮説を明らかにし、その機序を解明するためにさらなる研究が望まれる。

## (参考文献)

1. Choo QL, Kuo G, Weiner A, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. 1989;244:359-362.
2. Alter HJ, Descartes before the horse: I clone, therefore I am: the hepatitis C virus in current perspective. *Ann Intern Med*. 1991;115:644-649.
3. Ferri C, Greco F, Longombardo G, Palla P, Moretti A, Marzo E, Fosella PV, et al. Antibodies to hepatitis C virus in patients with mixed cryoglobulinemia. *Arthritis Rheum*. 1991;34:1606-1610.
4. Haddad J, Deny P, Munz-Gotheil C, Ambrosini JC, Trinchet JC, Pateron D, Mal F, et al. Lymphocytic sialadenitis of Sjögren's syndrome associated with chronic hepatitis C virus liver disease. *Lancet*. 1992;339:321-323.
5. Johnson RJ, Gretch DR, Yamabe H, Hart J, Bacchi CE, Hartwell P, Couser WG, et al. Membranoproliferative glomerulonephritis associated with hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 1993;328:465-470.
6. Weidensaul D, Imam T, Holyst MM, King PD, McMurray RW. Polymyositis, pulmonary fibrosis, and hepatitis C. *Arthritis Rheum*. 1995;38:437-439.
7. Solo P, Galassi G, Merelli E, Ferrari MG, Sorgato P, Ghini M. Detection of HCV-specific sequences in chronic myopathy with hepatitis C: improvement with interferon-alpha 2A therapy. *Eur Neurol*. 1999;42:181-183.
8. Matsumori A, Matoba Y, Sasayama S. Dilated cardiomyopathy associated with hepatitis C virus infection. *Circulation*. 1995;92:2519-2525.
9. Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, Judson FN, Mares A, Alexander WJ, Hu PY, et al. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. The Sentinel Counties Chronic non-A, non-B Hepatitis Study Team. *N Engl J Med*. 1992;327:1899-1905.
10. Schachne JS, Stowers SA, Swett DD, Alexander J. Thallium perfusion imaging in myocarditis. *Conn Med* 1983;47:759-761.

11. Hiroe M, Sekiguchi M, Take M, Kusakabe K, Shigeta A, Hirosawa K. Long follow-up study in patients with prior myocarditis by radionuclide methods. *Heart Vessels*. 1985;11:199-203.
12. Knapp FF Jr, Knopp J. Iodine-123-labeled fatty acids for myocardial single-photon emission tomography: current status and future perspectives. *Eur J Nucl Med*. 1995;22:361-381.
13. Richardson CP, McKenna RW, Bristow CM, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, Olsen E, et al. Report of the 1995 World Health Organization/ International Society and Federation of Cardiology task force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Circulation*. 1996;93:841-842.
14. Bowles NE, Richardson PJ, Olsen EG, Archard LC. Detection of coxsackie-B-virus-specific RNA sequences in myocardial biopsy samples from patients with myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Lancet*. 1986;1:1120-1123.
15. Giacca M, Severini GM, Mestroni L, Salvi A, Lardieri G, Falaschi A, Camerini F. Low frequency of detection by nested polymerase chain reaction of enterovirus ribonucleic acid in endomyocardial tissue of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *JACC*. 1994;24:1033-1040.
16. Keeling PJ, Jeffery S, Caforio AL, Taylor R, Bottazzo GF, Davies MJ, McKenna WJ. Similar prevalence of enteroviral genome within the myocardium from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy and controls by the polymerase chain reaction. *Br Heart J*. 1992;68:554-559.
17. Matsumori A, Matoba Y, Nishio R, Shioi T, Ono K, Sasayama S. Detection of hepatitis C virus RNA from the heart of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;222:678-682.
18. Matsumori A, Ohashi N, Nishio R, Kakio T, Hara M, Furukawa Y, Ono K, et al. Apical hypertrophic cardiomyopathy and Hepatitis C virus infection. *Jpn Circ J*. 1999;63:433-438.
19. Matsumori A, Ohashi N, Hasegawa K, Sasayama S, Eto T, Imaizumi T, Izumi T, et al. Hepatitis C virus infection and heart diseases: a multicenter study in Japan. *Jpn Circ J*. 1998;62:389-391.

20. Grumbach IM., Heermann K, Figulla HR. Low prevalence of hepatitis C virus antibodies and RNA in patients with myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Cardiology*. 1998;90:75-78.
21. Kao JH, Hwang JJ. Hepatitis C virus infection and chronic active myocarditis. *Circulation*. 1998;98:1044-1045.
22. Hiroe M, Sekiguchi M, Take M, Kusakabe K, Shigeta A, Hirokawa K. Long follow-up study in patients with prior myocarditis by radionuclide methods. *Heart Vessels*. 1985;11:199-203.
23. Nakagawa M, Sato A, Okagawa H, Okuno M, Takamatsu T. Detection and evaluation of asymptomatic myocarditis in schoolchildren: report of four cases. *Chest* 1999;116:340-345.
24. Hashimoto Y, Yamabe H, Yokoyama M. Myocardial defect detected by <sup>123</sup>I-BMIPP scintigraphy and left ventricular dysfunction in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Ann Nucl Med*. 1996;10:225-230.
25. Wakasugi S, Fischman AJ, Babich JW, Callahan RJ, Elmaleh DR, Wilkinson R, Strauss HW. Myocardial substrate utilization and ventricular function in adriamycin cardiomyopathy. *J Nucl Med*. 1993;34: 1529-1535.
26. Kim Y, Sawada Y, Fujiwara G, Chiba H, Nishimura T. Therapeutic effect of co-enzyme Q 10 on idiopathic dilated cardiomyopathy: assessment by iodine-123 labeled 15-(p-iodophenyl)-3(R,S)-methyl pentadecanoic acid myocardial single-photon emission tomography. *Eur J Nucl Med*. 1997;24:629-634.
27. Sonnenblick M, Rosin A. Cardiotoxicity of interferon. A review of 44 cases. *Chest*. 1991;99:557-561.
28. Tilt H, Wilmer A, Vogel W, Herold M, Nolchen B, Judmaier G, Huber C. Serum levels of cytokines in chronic liver diseases. *Gastroenterology*. 1992;103:264-274.
29. Kelly RA, Smith TW. Cytokines and Cardiac Contractile Function. *Circulation*. 1997; 95: 778-781.
30. Oyanagi Y, Takahashi T, Matsui S, Takahashi S, Boku S, Takahashi K, Furukawa K, et al. Enhanced expression of interleukin-6 in chronic hepatitis C. *Liver*. 1999; 19: 464-472.

31. Cacoub P, Ghillani P, Revelen R, Thibault V, Calvez V, Charlotte F, Musset L, et al. Anti-endothelial cell auto-antibodies in hepatitis C virus mixed cryoglobulinemia. *J Hepatol* 1999;31:598-603.
32. Enomoto N, Kurosaki M, Tanaka Y, Marumo F, Sato C. Fluctuation of hepatitis C virus quasispecies in persistent infection and interferon treatment revealed by single-strand conformation polymorphism analysis. *J Gen Virol*. 1994;75:1361-1369.
33. Sakai A, Kaneko S, Honda M, Matsushita E, Kobayashi K. Quasispecies of hepatitis C virus in serum and in three different parts of the liver of patients with chronic hepatitis. *Hepatology* 1999;30:556-561.

### Figure legends

**Figure 1:** Left ventricular segmentation used for regional semiquantitative analysis of myocardial SPECT. SPECT = single photon emission computed tomography.

**Figure 2:** Positive correlation between severity scores by  $^{201}\text{Tl}$  and  $^{123}\text{I}$ -BMIPP before interferon therapy. SS = severity score; Tl = thallium; BMIPP =  $\beta$ -methyl-p-iodophenyl pentadecanoic acid.

**Figure 3:** Differences of severity scores by  $^{201}\text{Tl}$  and  $^{123}\text{I}$ -BMIPP between high BNP group ( $\geq 20$  pg/ml) and low BNP group ( $< 20$  pg/ml). Changes in serum BNP levels before and after interferon therapy. Tl = thallium; BMIPP =  $\beta$ -methyl-p-iodophenyl pentadecanoic acid; BNP=brain natriuretic peptides.

**Figure 4:** Myocardial SPECT images from Case No. 22. The HCV genotype was 1B, and RNA titers were 450 kcopies/ml before interferon therapy and negative at the end of treatment. *Upper panels:* before interferon therapy. *Lower panels:* after interferon therapy. The decreased  $^{201}\text{Tl}$  and  $^{123}\text{I}$ -BMIPP uptake in the anterior, inferior and apical segments observed before interferon were almost normalized after treatment. SPECT = single photon emission computed tomography; Tl = thallium; BMIPP =  $\beta$ -methyl-p-iodophenyl pentadecanoic acid; HCV = hepatitis C virus.

**Figure 5:** Case 3 had congestive heart failure, dilated cardiomyopathy, diabetes mellitus. The HCV genotype was 1B, and RNA titers in serum were 441.3 kcopies/ml, cardiac troponin T levels 0.03 ng/ml, serum BNP levels 339.1, serum ANP levels 85 pg/ml. Echocardiography revealed mild dilatation and impaired contraction of left ventricle. Cardiac catheterization study revealed low cardiac output (cardiac index 1.98 l/min/m<sup>2</sup>) and dilatation and impaired contraction of left ventricle (left ventricular end-diastolic volume 186 ml, ejection fraction 35%). Both plus and minus strands of HCV-RNA in myocardium were not detected.

**Table 1.**

Echocardiographic measurements, serum ALT levels and severity score of  $^{201}\text{Tl}$  and  $^{123}\text{I}$ -BMIPP SPECT in control patients versus hepatitis C patients

Group	Sex	Age *	ALT *	LVDd *	EF *	SS(Tl) *	SS(BM) *
	M/F	y	IU/L	mm	%	point	point
<b>Fatty Liver</b>	6/4	55±13	42.4±23.1	49.5±7.5	66.3±10.2	1.3±0.8	1.1±0.9
<b>Hepatitis C</b>	15/18	53±10	79.8±50.6 <sup>#</sup>	48.6±4.0	67.1±4.7	2.8±2.1 <sup>#</sup>	3.0±2.7 <sup>§</sup>

SS = severity score; ALT = serum alanine aminotransferase; LVDd – left ventricular enddiastolic dimension;

EF – left ventricular ejection fraction; Tl= $^{201}\text{Tl}$ ; BM= $^{123}\text{I}$ -BMIPP. \* Values are mean±SD; # p<0.05; § p<0.01 hepatitis group vs control group

**Table 2.**

Severity score of two isotopes and serum ALT levels before and after interferon therapy among three groups of patients who completed therapy

	SS(Tl)			SS(BM)			ALT		
	(point)			(point)			(IU/L)		
	pre	post	p	pre	post	p	pre	post	p
<b>SR</b> (n=9)	3.8±1.8	1.4±1.1	0.02 <sup>#</sup>	4.6±4.3	1.5±1.2	0.07	68.9±50.1	35.6±36.3	0.10
<b>ETR</b> (n=8)	3.1±1.5	1.8±1.8	0.11	2.6±1.5	2.0±2.0	0.52	83.0±13.2	44.5±21.7	0.006 <sup>§</sup>
<b>NR</b> (n=7)	2.3±3.1	2.9±2.7	0.46	1.6±1.5	3.0±3.5	0.65	77.0±47.8	44.3±20.4	0.66

SS = severity score; Tl= $^{201}\text{Tl}$ ; BM =  $^{123}\text{I}$ -BMIPP; ALT = serum alanine aminotransferase;

SR = sustained response; ETR = end-of-treatment response; NR = nonresponse # p<0.05;

§ p<0.01; pre vs post.

**Table 3.**

Left ventricular diastolic dimension and ejection fraction before and after interferon therapy among three groups of patients who completed therapy, and HCV RNA levels before therapy

	LVDd			LVEF			HCV-RNA
	(mm)			(%)			(kcopies/ml)
	pre	post	p	pre	post	p	pre
<b>SR</b> (n=9)	48.4±4.7	49.1±5.4	0.58	65.4±3.9	64.0±5.1	0.49	190.6±307.8
<b>ETR</b> (n=8)	48.3±5.7	49.3±4.3	0.27	69.6±4.5	66.9±3.7	0.09	288.9±490.6
<b>NR</b> (n=7)	49.7±1.6	48.5±2.7	0.35	69.5±2.4	68.0±6.1	0.56	806.8±1357.5

LVDd= left ventricular diastolic dimension; LVEF=ejection fraction; HCV=Hepatitis C virus;

SR = sustained response; ETR = end-of-treatment response; NR – nonresponse

**Table 4**

Relationship between change in SS of  $^{201}\text{Tl}$  and  $^{123}\text{I}$ -BMIPP and serum HCV RNA levels  
( $>$  or  $< 5 \times 10^5$  copies/ml by RT-PCR)

Group	SS (Tl)		SS (BM)	
	(point)		(point)	
	pre	post	pre	post
high HCV RNA (n=6)	2.7 $\pm$ 1.6	3.9 $\pm$ 2.3	2.9 $\pm$ 0.9	4.0 $\pm$ 2.3
low HCV RNA (n=18)	3.2 $\pm$ 2.3	1.2 $\pm$ 1.1 <sup>#</sup>	3.5 $\pm$ 3.5	1.2 $\pm$ 0.9 <sup>§</sup>

HCV= Hepatitis C virus; Tl= $^{201}\text{Tl}$ ; BM= $^{123}\text{I}$ -BMIPP; <sup>#</sup> p<0.01; <sup>§</sup> p<0.05 pre. vs post.

**Table 5.**

心筋生検を施行し得た慢性C型肝炎を有する心疾患患者

No	年齢	性別	病名	HCV-RNA (kcopies/ml)	心筋 HCV- RNA(+) <sup>鎖</sup>	心筋 HCV- RNA(-) <sup>鎖</sup>	LVDd (mm)	EF (%)	IVS (mm)	PW (mm)	cTnT (ng/ml)	SS (Tl)	SS (BM)	MRI-Gd 造影
1	66	M	HCM		-	-	41	50	26	19				
2	71	M	HCM,AF,HT		+	-	56	61	17	12	<0.02	4	6	-
3	75	M	DCM,DM	441.3	-	ND	50	35	11	10	0.03	10	9	+
4	60	M	DHCM,DM,CRF		-	-	56	35	23	18				
5	79	F	HOCM	79.8	+	ND	40	72	20	10		3		
6	66	F	HOCM	769.2	+	ND	35	63	21	15				
7	71	M	VSA,HT	376.2	+	-	52	71	11	9				
8	67	F	VSA	68.9	-	-	45	65	85	10	<0.02	1	2	-
9	72	F	VSA,HT		+	-						1		
10	64	M	AF,HT		+	+	47	57	10	11				
11	71	F	AVB,PAF,HT		+	-	47	65	8	8		0		

SS = severity score; Tl= $^{201}\text{Tl}$ ; BM =  $^{123}\text{I}$ -BMIPP; HCM=hypertrophic cardiomyopathy; DCM=dilated cardiomyopathy; VSA=vasospastic angina; AF=atrial fibrillation; HT=hypertension; AVB=AV block; DM=diabetes mellitus; CRF=chronic renal failure; HOCM=hypertrophic obstructive cardiomyopathy; LVDd=left ventricular end-diastolic dimension; EF=ejection fraction; IVS=interventricular septum; PW=posterior wall; cTnT=cardiac troponin T; Gd=gadolinium-DTPA



## 厚生科学研究費補助金（ 研究事業）

## 分担 研究報告書

C型肝炎ウイルス蛋白質による細胞増殖制御に関する研究

分担研究者 下遠野 邦忠 京都大学 ウイルス研究所

## 研究要旨

C型肝炎ウイルス感染は慢性肝炎の他に免疫異常を伴う疾患と関連する。これらの疾患とウイルスタンパク質の機能との関連を明らかにするため、および、HCVの複製機構を解明する目的でHCVゲノムレプリコンの開発を行った。

## A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）は慢性肝炎、肝がんの発症の危険因子のひとつであるが、その他に、自己免疫疾患、ある種のB細胞リンパ腫、拡張性心筋症の原因因子の可能性などが指摘されている。HCV感染が細胞の増殖にどのような影響を与えるかを明らかにすることにより、これらの疾患との関わりを分子レベルで明らかにし、その成果を予防、治療に役立てることを目的とする。

## B. 研究方法

ウイルスタンパク質のなかに細胞の増殖を制御する働を持つものが存在する事が示唆されるので、各種のHCVウイルスタンパク質を発現させた細胞の増殖変化を検索する。特に、これまでに明らかにしてきた研究成果をウイルスが複製する状況においても確認するために、ウイルスゲノムの自己複製系を構築し、それをを用いた細胞増殖変化を解析する系を確立する。ヒトリンパ球において感染が確認されたHCVのゲノムを試験管内で合成し、それを肝がん由来の培養細胞に導入する。ウイルスゲノムが複製する細胞を薬剤耐性試薬で選択できるように工夫し、ウイルスゲノムが複製している細胞を増やす。本細胞におけるウイルスゲノムの複製効率をRNA合成能、ウイルスタンパク質の産生量を指標にして解析する。また、ウイルスの複製とインターフェロンの関係を本系を用いて解析する。

本実験は培養細胞および既に単離されている遺伝子を用いて行う実験なので倫理面での問題は生じない。

## C. 研究結果

HCVに感染し複製しているヒトリンパ球からRNAを抽出し、それからHCVのゲノムをRT-PCRにて増幅単離した。このゲノムのうち構造タンパク質をコードする領域を除いた部分ゲノムを作成した。このゲノムの中にネオマイシン耐性遺伝子を導入し、複製が起こればネオマイシン耐性遺伝子を指標にして細胞を選択できるようにした。その結果、いくつかのHCV部分レプリコン複製細胞を単離した。これらの細胞についてウイルスRNAの発現を調べたところノーザンブロットで検出できるほどに発現が確認された。RNAの定量を行い細胞あたり約1,000コピー相当量と推定した。また、ウイルスタンパク質もウエスタンブロットにより産生を確認した。本細胞をインターフェロンで処理しウイルスの消長を解析したところ、100ユニット/mlで処理したときに5日目にはウイルス量が0.1%に低下した。

## D. 考察

HCVのゲノムの一部分を効率よく複製する細胞を得た。既にこの様な細胞は他のグループによっても得られているが、筆者らが以前にヒトリンパ球で複製しうる事を示したウイルスゲノムを用いて複製することを示したのは、最初の事例である。本細胞を用いてウイルスタンパク質の複製に対する機能解析、細胞に及ぼす効果などが解析できると期待される。

#### E. 結論

本研究で構築したHCV自己複製レプリコンはウイルスタンパク質の機能を複製と細胞増殖の両方から解析できるのみならず、抗HCV剤開発にも有用である。

#### F. 健康危険情報

HCV感染は肝炎のみならず、種々の免疫疾患にも関連していることが示唆されているので、HCVを積極的に排除する薬剤の開発見向けの研究が重要である。その意味で抗HCV剤開発に向けたプロテアーゼの性質を明らかにする意義は大きい。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kishine H, Sugiyama K, Hijikata M, Kato N, Takahashi H, Noshi T, Nio Y, Hosaka M, Miyanari Y, Shimotohno K. Subgenomic replicon derived from a cell line infected with the hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun.* ;293 :993-999, 2002.

2. Shimotohno K, Watashi K, Tsuchihara K, Fukuda K, Marusawa H, Hijikata M.

Hepatitis C virus and its roles in cell proliferation., *J Gastroenterol.* 37 Suppl 13: 50-54, 2002.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担 研究報告書

実験的ラットウイルス性心筋炎に関する研究

（分担）研究者 武田信彬 東京慈恵会医科大学青戸病院総合診療部部長

研究要旨

拡張型心筋症の一部は慢性ウイルス性心筋炎が原因ではないかと推測されているが、心筋炎と心筋症との関連検索のため、まずラットにウイルス性慢性心筋炎を生じさせることができるかを検討した。生後間もないSD、Wistar、FisherラットにコクサッキーB3ウイルスを腹腔内投与し、急性期と慢性期での病理組織学的観察、CD4、CD8、MHC class I、MHC class IIのモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学的観察、rapid in situ hybridization法によるウイルスゲノムの検索、さらに血液学的検討を加えた。生後3-7日目より心臓、腎臓、胸腺にコクサッキーB3ウイルスゲノムが認められたが、肝臓、肺、大脳、消化管には見られなかった。病理組織学的には慢性期には心臓の心内膜下に線維化がみられるのみであった。免疫組織学的観察では対照群と比較してCD4、CD8陽性細胞が数個単位で集簇しているのが散見された。MHC class Iは陰性であったが、MHC class IIはコクサッキーB3ウイルス投与群でわずかに陽性を示した。慢性期の観察ではウイルスゲノムは見られなかった。末梢白血球検査では総数はヒトと同様であったが、リンパ球優位であった。

A. 研究目的

心筋炎と心筋症との関連検索のためウイルス性心筋炎モデル動物が研究に用いられてきた。特に、マウスやハムスターを用いたコクサッキーB3ウイルス感染心筋炎では、しばしば、ヒト同様の心臓への後遺症変化を残すことが知られている。ここでは、生後間もないSprague Dawley(SD)、Wistar、FisherラットにコクサッキーB3ウイルスを腹腔内投与し、コクサッキーB3ウイルス感染の急性期（生後3-14日）と、継続飼育した慢性期（4-6ヶ月）の各ラットにおける病理組織学的観察、免疫組織化学的観察、ウイルスゲノム検索と、血液学的検討を加えることを目的としている。

B. 研究方法

生後1-2日齢のSD、Wistar、Fisherラッ

ト各24匹を、それぞれコクサッキーB3ウイルス投与群、非投与群（対照群）

（Control）各12匹の2群に分け、投与群はコクサッキーB3ウイルスを106PFU腹腔内に投与した。生後3、5、7、14日目にペントバルビタール麻酔下でと殺し心臓、肝臓、胸腺、脾臓、腎臓を摘出した。同時に、慢性期の観察も行い、病理組織学的、In situ hybridization法による検索を行い急性期と比較検討した。また同時に、末血からの血液学的考察も加えた。

1. 組織学的観察

ホルマリン固定を行った心臓およびその他の臓器から5 $\mu$ mの厚さの切片を作り、Masson trichrome染色を行い、光顕にて観察。

2. 免疫組織化学的観察

4 $\mu$ mの凍結切片に抗CD4、抗CD8、抗MHC class I、抗MHC class IIモノクロー

ナル抗体を用いて免疫組織化学的観察を行った。

### 3. 組織内ウイルスゲノムの検出

従来のin situ hybridizationに比べて短時間かつ安定性のあるビオチン標識オリゴヌクレオチドをプローブとして用いたrapid in situ hybridizationを用いて検索を行った。各臓器をホルマリン固定後、パラフィン包埋した組織から厚さ3 $\mu$ mの切片を製作し、ウイルスゲノムの検索を行った。

### 4. 末梢血白血球

末梢血塗沫標本を顕微鏡で観察、各白血球の割合を計算した。

## C. 研究結果

生後3-7日目より、心臓、腎臓、胸腺にコクサッキーB3ウイルスゲノムが認められたが、肝臓、大脳、肺、消化管（小腸、大腸）ではみられなかった

一方、慢性期の観察では、病理組織学的に心臓の心内膜直下に線維化がわずかに観察されたが、心筋細胞の脱落、同部の置換性線維症は見られなかった。他臓器では変化は見られなかった。同時にウイルスゲノムも陰性であった。免疫組織化学的検索では対照群と比較してCD4、CD8陽性細胞が数個単位で集簇しているのが散見された。MHC class IIは対照群と同様ほとんど陰性であったが、class IIはコクサッキーB3投与群でわずかに陽性を示した。末梢血ヘモグラムではリンパ球が約80%を占めていた。

## D. 考察

マウスやハムスターを用いたコクサッキーB3ウイルス感染心筋炎ではしばしばヒト同様の心臓の後遺症的变化を残すことが知られている。ラットにおいてはウイルス感染に強い抵抗性を有するため、心筋炎モデルとしては用いられてこなかったという経緯がある。しかし、ラットは免疫組織学的にヒトと共通抗原を有することから、

ラットでの実験的ウイルス性心筋炎の発症が成功するとヒトでの研究にもフィードバックすることができる。今回コクサッキーB3ウイルス腹腔内接種後の慢性期の観察では心筋炎後遺症は見られなかった。末梢血白血球数はヒトと同様であるが。リンパ球優位、CD4/CD8比の違いも後遺症の有無に関係しているかも知れぬ。ウイルス接種量、あるいは他のウイルスの追加接種などの工夫が必要と思われる。

## E. 結論

ラットに対するコクサッキーB3ウイルス投与で、急性期には心臓にウイルスゲノムが認められたが、慢性期では認められず、心筋炎の持続像も見られなかった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- ・ Takeda N: Effect of pimobendan in patients with chronic heart failure. *Exp Clin Cardiol* 6:195-199, 2001.
- ・ Shikata C, Takeda N, et al: Effect of an ACE inhibitor and an AT1 receptor blocker on cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 32: A100, 2000.
- ・ Takeda A, Takeda N, et al: Detection of hepatitis C virus RNA in the hearts of patients with hepatogenic cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem* 195: 257-261, 1999.

厚生科学研究費補助金「特発性心筋症調査研究」  
分担研究報告書

特発性心筋症におけるチトクローム *b* 多型の解析

分担研究者 田中雅嗣 岐阜県国際バイオ研究所遺伝子治療研究部長

研究要旨

ミトコンドリアゲノムの進化速度は核ゲノムの進化速度の 5-10 倍であり、塩基配列の個体差が大きい。ミトコンドリア心筋症の病因変異を同定するためには、病因となる変異と正常集団にも存在する多型とを明確に区別する必要がある。我々は日本人のミトコンドリアゲノム多型データベース構築の一環として、百寿者 64 名、パーキンソン病患者 96 名および若年肥満者 96 名のチトクローム *b* 遺伝子の塩基配列を決定した。Andreu らは組織球様心筋症(histiocytoid cardiomyopathy)の患者においてチトクローム *b* の Gly251 を Asp に置換する Mt15498G→A 変異を報告した。我々は同じアミノ酸残基 Gly251 を Ser に置換する Mt15497G→A transition の頻度が、百寿者群 (0.0%) よりもパーキンソン病患者群 (6.9%) において高いことを見いだした。Mt15497G→A は特発性心筋症患者では 253 例中 9 例 (3.6%) に、心筋梗塞患者では 340 例中 10 例(2.9%)に見いだされた。従って、この Mt15497G→A 多型が特発性心筋症の発症に直接影響を及ぼすことはないと考えられた。多型データベースの構築により、チトクローム *b* 変異を迅速に同定することが可能になった。

A. 研究目的

ミトコンドリア心筋症はミトコンドリア異常に基づく疾患であるが、特発性心筋症と診断されている患者の中にミトコンドリア異常を有する例が含まれている可能性があるため、効率的な変異探索システムが必要である。

ミトコンドリアゲノムは 16,569 塩基からなる環状二重鎖 DNA であり、2 種のリボソーム RNA、22 種のトランスファーRNA、13 種のメッセンジャーRNA をコードしている。これらによって、ミトコンドリア内において、酸化リン酸化系の複合体 I-V の 13 種のサブユニットが合成される。

ミトコンドリアは酸素を利用して ATP を合成する。心筋細胞ではその断面積の 33%を占め、神経細胞においても重要な役割を果たしている。mtDNA は母性遺伝し、活性酸素の主要な発生源であるミトコンドリア内にあるため、老化や各種の病態において mtDNA の変異が蓄積することが明らかになっている。またアポトーシスの過程や高血糖時の内皮細胞傷害にミトコンドリアが関与していることが注目されている。

Odawara と Yamashita は 25 例の肥大型心筋

症患者を含む 46 例の心筋症患者において、3 種の mtDNA 変異 (Mt3243A→G, Mt3260A→G, Mt3316G→A) をスクリーニングした結果、Mt3316G→A を 1 例において検出したと報告し、さらに多様な mtDNA 変異に対してスクリーニングを行えば、肥大型心筋症における mtDNA 変異の関与が明らかになると推定した。Arbustini らは 601 例の拡張型心筋症患者のうち、超微形態学的に異常なミトコンドリアを検出したのは 85 例 (14%) であり、その 85 例うちの 19 例 (22%) に変異 mtDNA (ヘテロプラズミー) を検出したことから、拡張型心筋症の約 3%が mtDNA 変異に基づくものと推定した。特発性心筋症調査研究班による心筋症全国アンケート一次調査によれば、ミトコンドリア心筋症患者は 280 例報告されており、全国では数百名の患者が存在するものと推定されている。

Terasaki ら (業績 5) は、肥大型心筋症から拡張型に移行し心不全に陥ったために、左心室部分切除術 (いわゆる Batista 手術) を受けた患者のミトコンドリア DNA の全塩基配列を決定し、tRNA-Lys 遺伝子領域内の Mt8348A→G 変異を

検出した。この変異 mtDNA の患者心筋における割合は血液における割合より高く、患者の兄弟の血液においても変異 mtDNA が検出された。光学顕微鏡では、心筋細胞の肥大と空胞化が観察され、電子顕微鏡では、同心円状のクリスタ、あるいは指紋状に平行に重積したクリスタを有する巨大ミトコンドリアの集積が観察された。我々の報告に続いて、ベルギーの Hilbert も、ミトコンドリア脳筋症の患者においてこの変異を独立に見出したので、この変異はミトコンドリア内での蛋白合成障害をもたらす、ミトコンドリア機能異常の原因となっていると推定される。MERRF 症候群においては tRNA-Lys 遺伝子領域内の Mt8344A→G 変異などが病因となる変異として報告されてきたが、Terasaki らが心筋症患者において見出した Mt8348A→G 変異は新規の病因変異である。

ミトコンドリアゲノムの進化速度は核ゲノムの進化速度の 5-10 倍であり、塩基配列の個体差が大きい。ミトコンドリア心筋症の病因変異を同定するためには、病因となる変異と正常集団にも存在する多型とを明確に区別する必要がある。我々は、ミレニアムプロジェクトの一環として日本人におけるミトコンドリアゲノム多型の全貌を明らかにするために、各 96 例からなる 6 群（百寿者・パーキンソン病患者・一般糖尿病患者・血管病変を伴う糖尿病患者・若年肥満者・若年非肥満者）、合計 576 例のミトコンドリアゲノムの全塩基配列の解析を開始した。今年度は百寿者 64 名、パーキンソン病患者 96 名、若年成人 96 名についてミトコンドリアのチトクローム *b* 遺伝子の塩基配列を決定し、そのアミノ酸置換を比較した。

## B. 研究方法

血液細胞あるいは粘膜細胞を 64 例の百寿者（年齢 100 歳以上）、96 例のパーキンソン病患者、および 96 例の若年肥満者から同意書を得た上で採取した。この研究は慶応大学、順天堂大学、名古屋大学総合保健体育センターおよび岐阜県国際バイオ研究所の倫理委員会の承認を得た。DNA を試料から Dr. GenTLE (Takara, Osaka, Japan) あるいは MagExtractor System MFX-2000 (Toyobo, Osaka) を用いて抽出した。ミトコンドリアゲノム全長を第 1 PCR により 6 本の断片として増幅し、60 本の互いに重なり合う断片を第 2 PCR により増幅した。これらの増幅は基本的に既に報告した方法に従った (Tanaka et al., 1996)。

Cytb 遺伝子を約 3.0 kb の断片としてプライマー対 (H1 および L1 プライマー) を用いて PCR によって増幅した。用いた PCR 条件は、最初の

熱変性を 94°C で 5 分、続いて、熱変性を 94°C で 15 秒、アニーリングを 60°C で 15 秒、伸長反応を 72°C で 3 分のサイクルを 40 回行い、そして最後に伸長反応を 72°C で 10 分行った。増幅された断片を 1% アガロースゲル電気泳動で分離し、臭化エチジウム染色により確認した。シーケンス反応に用いる鋳型 DNA は、600-1000 bp の長さの互いに重なり合う 6 本の断片として PCR 法により既に報告した方法に従って増幅した (Tanaka et al., 1996)。

ヒトの複合体 III (ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase, EC 1.10.2.2 あるいは cytochrome *bc*<sub>1</sub> complex) の相同モデル構築 (homology modeling) は Iwata ら (Iwata et al., 1998) が報告したウシの酵素の結晶構造 (PDB ID: 1BGY) に基づいて分子モデル構築パッケージ InsightII (Accelrys Inc., San Diego, CA) の Homology and Modeler モジュールを用いて行った。モデル構造は InsightI に含まれているプログラム CHARMM を用いて分子動力学的に最適化した。これらの計算はワークステーション Octane2 (Silicon Graphics) を用いて行った。

## C. 研究結果

3 群に属する合計 256 個体において 46 個の同義置換と 30 個の非同義置換が見いだされた。Cytb 遺伝子の Mt15326A→G (T194A) は分析した全ての個体で見いだされた。従って我々は Mt15326A をケンブリッジグループによって分析された個体が有していた稀な多型とし、Mt15326G を「コンセンサス」塩基、A194 を「コンセンサス」アミノ酸と見なした。従って、日本人におけるコンセンサスチトクローム *b* アミノ酸配列は改訂版ケンブリッジ参考配列 (revised Cambridge reference sequence) (Andrews et al., 1999) から導かれるアミノ酸配列と比較して 1 カ所のアミノ酸が異なっている。Cytb 遺伝子では、6.7% (76/1140) の塩基部位が置換され、7.9% (30/380) のアミノ酸部位が置換されていた。置換部位の割合は 39% (30/76) であった。

百寿者群では 9 種の異なったアミノ酸置換が見いだされたのに対し、若年成人群およびパーキンソン病患者群ではそれぞれ 15 種および 21 種のアミノ酸置換が見いだされた。大多数の個体（百寿者 49 名、若年成人 75 名、パーキンソン病患者 70 名）は、日本人のコンセンサスチトクローム *b* アミノ酸配列を有していた。5 個のアミノ酸置換 (I78T, I164V, N260D, I306V, I369V) は 3 群に共通に見られた。百寿者群では H16R, A39T, A191T および V343M が 1 個体ずつに見いださ

れた。若年成人群では、百寿者群で検出されなかった 10 種のアミノ酸置換が見いだされた。T2A+I338V, Y109H, D159N, L296M および A380T はそれぞれ 1 個体に、A193T+G251S+L82F は 1 個体に、A193T+G251S+I372V は 2 個体において見いだされた。

標準アミノ酸配列からの逸脱度を定量化するために、我々は、Grantham が報告した値に従って、標準アミノ酸と変化したアミノ酸の間の物理化学的相違の合計を個体ごとに計算した。ただし、3 群において共通に見られたアミノ酸置換はこの計算から除外した。百寿者群における標準アミノ酸配列からの逸脱度 (Grantham 値: 58, 58, 29, 21 が各 1 個体、60 個体については 0) は、若年成人群における逸脱度 (Grantham 値合計: 143, 143, 136, 87, 83, 58, 23, 15 が各 1 個体、他の 88 個体については 0) よりも統計的に有意に小さかった ( $p < 0.0001$ )。

百寿者群においては検出されず、かつ若年成人群とパーキンソン病患者群において共通に観察されたアミノ酸置換は T2A+I338V および A193T+G251S+I372V であった。パーキンソン病患者群においてのみ見いだされたアミノ酸置換は T2I, T47K, T61A, T158A, D171N, A190T, F245L, P247A, I300T, S344N, および A354T であった。パーキンソン病患者群における標準アミノ酸配列からの逸脱度 (Grantham 値合計: 143 が 5 個体、114, 89, 89, 87, 78 が各 1 個体、58 が 5 個体、46, 29, 27, 27, 23, 22 が各 1 個体、他の 75 個体については 0) は、百寿者群における逸脱度よりも統計的に有意に大きく ( $p = 0.0058$ , Mann-Whitney の U 検定)、また若年成人群における逸脱度よりも大きかった ( $p = 0.0097$ )。

それぞれの群において 5%以上の頻度で見いだされたアミノ酸置換について統計的に解析した。N260D は百寿者群において 6.25%の頻度 (64 名中 4 名) で見いだされたのに対し、若年成人群とパーキンソン病患者群においてともに 1.04% の頻度で見いだされた (96 名中 1 名)。百寿者群における N260D の頻度 (64 名中 4 名) は他の 2 群における頻度 (192 名中 2 名) より有意に高かった (オッズ比=6.33,  $p = 0.036$ , Fisher の直接法)。これらの観察結果は N260D 置換を有することが長寿につながることを示唆しているが、その機能的影響についてはさらに検討を要する。

これに対して、パーキンソン病患者群における G251S 置換の頻度 (96 名中 6 名) は百寿者群における頻度 (64 名中 0 名) より有意に高かった ( $p = 0.044$ , Fisher の直接法)。G251S 置換のよ

うな標準アミノ酸配列からの逸脱は、ミトコンドリアからの活性酸素種の産生上昇を伴い、それが加齢に関連する疾患をもたらす可能性がある。アミノ酸残基 Gly251 は哺乳類の種において高度に保存されている。Gly251 はチトクローム *b* 蛋白質におけるユビキノンの外側結合部位 (Qo site) に位置しており、ユビキノンとの結合に重要な働きをしている Glu271 残基の近傍にある。Ser が Gly251 を置換すると、この Ser は Glu271 と水素結合を形成する可能性がある。これによって Glu271 の動きが制限されると、ユビキノンの Qo site への結合が変化すると想定される。これらの知見は G251S 置換は長期生存に不利であることを示唆している。

Andreu らは組織球様心筋症 (histiocytoid cardiomyopathy) の患者においてチトクローム *b* の Gly251 を Asp に置換する Mt15498G→A 変異を報告した。我々は同じアミノ酸残基 Gly251 を Ser に置換する Mt15497G→A transition の頻度が、百寿者群 (0.0%) よりもパーキンソン病患者群 (6.9%) において高いことを見いだした。Mt15497G→A は特発性心筋症患者では 253 例中 9 例 (3.6%) に、心筋梗塞患者では 340 例中 10 例 (2.9%) に見いだされた。

#### D. 考察

チトクローム *b* のアミノ酸残基 Gly251 が Asp に置換されると組織球様心筋症の病因となり、Ser に置換されたものは多型として存在し、これらは隣接する塩基の置換に基づいていた。このことはミトコンドリア心筋症の病因となる変異と一般集団にも存在する多型との鑑別が相当困難な作業であることを示している。対照群の分析数が少ない場合には低頻度の多型を病因に関連する多型と誤認する可能性もある。多数の日本人における多型を網羅的にデータベース化することは、病的変異と低頻度の多型を迅速に鑑別するための重要な研究基盤を提供することとなる。

一方、低頻度の多型が完全に中立なアミノ酸置換ではなく、ミトコンドリア機能に影響を与える可能性も十分考えられる。ミトコンドリアゲノム多型が、特発性心筋症におけるエネルギー代謝に影響を及ぼし、肥大型心筋症から拡張型への移行などの病態に関与している可能性も考えられる。今後、特発性心筋症の進展および予後に対するミトコンドリアゲノム多型の影響を遺伝疫学的に解析する必要があると考えられる。

#### E. 結論

日本人におけるチトクローム *b* 多型を明らかに

日本人におけるチトクローム *b* 多型を明らかにし、ミトコンドリア心筋症の心筋症の病因となる変異と多型を鑑別するための研究基盤を整備した。同時に特発性心筋症の進展および予後に対するチトクローム *b* 多型の影響を解析するための基礎データが得られた。今後、塩基配列解析を全ミトコンドリアゲノムに拡大し、ミトコンドリアゲノム多型データベースを平成 15 年 4 月提供する予定である。

F. 健康危険情報 該当なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Tanaka M, Fuku N, Takeyasu T, Guo L-J, Hirose R, Kurata M, Borgeld H-J, Yamada Y, Maruyama W, Arai Y, Hirose N, Oshida Y, Sato Y, Hattori N, Mizuno Y and Yagi K. Golden mean to longevity: Rareness of mitochondrial cytochrome *b* variants in centenarians but not in patients with Parkinson's disease. *J Neurosci Res* 2002; in press:
2. Tanaka M, Borgeld H-J, Zhang J, Gong J-S, Yoneda M, Maruyama W, Naoi M, Ibi T, Sahashi K, Shamoto M, Fuku N, Kurata M, Yamada Y, Nishizawa K, Akao Y, Ohishi N, Miyabayashi S, Umemoto H, Muramatsu T, Furukawa K, Kikuchi A and Yagi K. Gene therapy of mitochondrial disease by delivering restriction endonuclease *Sma*I into mitochondria. *J Biomed Sci* 2002; in press:
3. Fuku N, Oshida Y, Takeyasu T, Guo L-J, Kurata M, Yamada Y, Sato Y, Tanaka M. Mitochondrial ATPase subunit 6 and cytochrome *b* gene polymorphisms in young obese adults. *Biochem Biophys Res Commun* 290: 1199-1205, 2002
4. Sahashi K, Yoneda M, Ohno K, Tanaka M, Ibi T. Functional characterisation of mitochondrial tRNA(Tyr) mutation (5877->GA) associated with familial chronic progressive external ophthalmoplegia. *J Med Genet* 38: 703-705, 2001
5. Terasaki F, Tanaka M, Kawamura K, Kanzaki Y, Okabe M, Hayashi T, Shimomura H, Ito T, Suwa M, Gong JS, Zhang J, Kitaura Y. A case of cardiomyopathy showing progression from the hypertrophic to the dilated form: association of Mt8348A->G mutation in the mitochondrial tRNA(Lys) gene with severe ultrastructural alterations of

mitochondria in cardiomyocytes. *Jpn Circ J* 65: 691-694, 2001

6. Umetsu K, Tanaka M, Yuasa I, Saitou N, Takeyasu T, Fuku N, Naito E, Ago K, Nakayashiki N, Miyoshi A, Kashimura S, Watanabe G, Osawa M. Multiplex amplified product-length polymorphism analysis for rapid detection of human mitochondrial DNA variations. *Electrophoresis* 22: 3533-3538, 2001

7. Yamada Y, Ichihara S, Izawa H, Tanaka M, Yokota M. Association of a G994->T (Val279->Phe) polymorphism of the plasma platelet-activating factor acetylhydrolase gene with myocardial damage in Japanese patients with nonfamilial hypertrophic cardiomyopathy. *J Hum Genet* 46: 436-441, 2001

### 2. 学会発表

1. Tanaka M, Borgeld H-J W, Zhang J, Shamoto M, Fuku N, Kurata M, Yamada Y, Nishizawa K, Akao Y. Gene therapy for mitochondrial cardiomyopathy. In 10th International Congress on Cardiovascular Pharmacotherapy and WHF/ISCP Joint International Symposium on Cardiomyopathy in the 21st Century, Kyoto, March 29, 2001

2. Tanaka M, Takeyasu T, Kurata M, Yamada Y, Fuku N, Shamoto M. Possible contribution of mitochondrial polymorphisms to neurodegenerative diseases. The 5th International Conference on Progress in Alzheimer's and Parkinson's Disease. Kyoto, April 1, 2001

3. Tanaka M. Single nucleotide polymorphisms of mitochondrial DNA associated with longevity. International Workshop on Mitochondria, Taipei, August 14, 2001

## H. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

田中雅嗣：ヒトミトコンドリア DNA を用いた遺伝子検出方法 (登録 3251219)

田中雅嗣：ミトコンドリア DNA を用いた遺伝子検出方法 (特願 2001-318805)

### 2. その他 なし



## タコツボ型心筋障害心筋炎症説の検討

順天堂大学 循環器内科

河合祥雄 鈴木宏昌

国立神戸病院

河田正仁、中村哲也

島根医科大学

島田俊夫、長崎真琴

たこつぼ型心筋症は、情動ストレスを誘因として高齢女性に好発する、心尖部のバルーン状無収縮と心基部過収縮、ST上昇後のT波逆転（巨大陰性T波）・QT延長、心筋逸脱酵素の僅かな上昇、心室収縮・心電図・酵素値・心筋シンチグラム所見などが速やかに回復するなどの特異な特徴<sup>1,2)</sup>を持つ、わが国多い病態である。欧米では僅かしか報告<sup>3,7)</sup>がない理由は不明である。当初、心筋気絶<sup>8)</sup>が成因と考えられた<sup>9)</sup>が、全例に一過性虚血を証明しえず、組織障害像を呈する症例がある<sup>10)</sup>ことより否定された。白血球増多例が散見され、感冒様症状を先行する症例があること、シンチグラフィー所見で障害部位に集積する<sup>99mTc</sup>-PYPと心筋障害部位で低下する<sup>201Tl</sup>との解離がみられること、Gd-DTPA造影MRI所見でのまだらな造影効果が無収縮域に見られることなどから心筋炎が原因<sup>11)</sup>でないかと疑われている。心筋生検所見の記載がある20症例報告中、心筋炎または心筋炎の修復過程疑いとされた症例は、正常/非特異的または心筋炎なしとの報告（7例）に次いで多い（6例）<sup>11)</sup>。

【対象と方法】たこつぼ心筋障害が疑われた心筋生検症例14例（59歳-82歳女性12名、48歳ならびに53歳男性）、剖検4例を臨床病理学的に検討した。

【結果】生検例では先行感冒様症状は14例中2例にしか認めず、白血球数増加に比してCK値は低値であった。発症当日の生検（症例9）で心筋障害とは離れて間質に多核白血球の浸潤を認めた。経時的生検例（症例9）において、急性期（第5病日）組織像は水腫状で、小円形細胞の増加があり、心筋細胞障害像を散見したが、浸潤細胞は結合織系の細胞で、リンパ球、マクロファージは僅かであった（表）。慢性期では間質水腫は消退し、線維化巣を主とする治癒期の所見を示した。

組織所見では急性期例では多形核白血球を含む細胞浸潤、巣状心筋障害を、慢性期例では比較的細胞成分に富む線維症を認めた。心筋生検資料でのいずれの所見も量的に僅かであった。

激症心筋炎を疑われた剖検例（83歳女性<sup>12)</sup>）では、心基部中間層で分節化が著明で、心尖部では障害心筋細胞の萎縮融解、また障害心筋に対しての円形細胞浸潤像が見られた。過収縮をおこした心基部左心室中間層（図a）で分節化が著明であり、無収縮の心尖部（図b）では障害を受けた細胞が萎縮融解を起こしている像が見られる。右室でも同様で、心基部では心筋細胞分節化、心尖部では分節化に加え、心筋細胞傷害・融解、間質細胞浸潤が著明である。左心室心尖部の心外膜側も同様で、外膜側よりの心筋細胞の障害と心外膜への細胞浸潤が見られた。

【考案】心筋逸脱酵素上昇の極めて乏しい例がある、心電図変化が一定の経過（ST上昇、T波陰転、巨大陰性T波）をとる、先行感染症状が少ないことなどが臨床的に心筋炎と矛盾する。形態学的に、細胞浸潤は心筋障害・壊死の強いところに多く、活動性心筋炎の診断基準（心筋への小円形細胞浸潤とそれによる心筋壊死）には合致しない。

本病態の所見が通常的心筋炎と異なる第二の点は超急性期に浸潤する細胞の違いにある。カテコラミン投与直後では血管浮腫、間質浮腫が生じ、心筋細胞胞体には横紋消失、空胞化、脂肪滴、電顕的には筋原線維障害が生じる。数時間後では、間質浮腫。多核白血球、次いで単核球の浸潤が起き、血管周辺にAnitschkow細胞の出現、小動脈のfibrinoid変性が生じる。3日目には明らかな巣状壊死(筋原線維融解)、組織球・リンパ球ときに形質細胞の浸潤がみられ、数週経過した場合には、壊死心筋のマクロファージによる処理、急性炎症反応の終息、線維性置換が認められる。従って、初期に見られた多核白血球はカテコラミン心筋障害<sup>13)</sup>を示唆する所見と考えられる。

本邦では本病態を可逆性の左心室収縮異常として注目しているが、文献で見られる限り、米国では左心室流出路動的狭窄<sup>14)</sup>が注目されている。海外報告は最近の症例に偏っているが、高齢女性で心基部の過収縮が認められること、本邦での左室流出路圧較差の出現頻度は一施設の連続症例で4/11程度とされていることから判断すると、タコツボ心筋症の海外からの報告は今後、増加すると予想される。

【総括】たこつぼ心筋障害の病態を心筋炎で説明することは困難である。

貴重な症例の組織をお見せいただいた、心臓血管研究所付属病院内科 澤田準先

生、相澤忠範先生、手稲溪仁会病院 村上弘則先生、埴なぎさ先生、京都府立与謝の海病院 循環器科（現 京都府立医大第二内科）竹村佳純先生、国際親善病院循環器科 山中修先生、島根医科大学第四内科 島田俊夫先生、小谷暢頰先生、板橋中央病院 田村勤先生、東京大学循環器内科 渡辺昌文先生、鹿児島生協病院循環器内科 馬渡耕史先生、国立神戸病院循環器科 河田正仁先生、同研究検査科 中村哲也先生、虎ノ門病院 循環器内科 西山信一郎先生、百村伸一先生、同 病理検査室 松下央先生はじめ、多くの関連された先生方に深謝いたします。

## 引用文献

- 1) 河合祥雄：たこつぼ型心筋障害、またはたこつぼ（Ampulla or Amphora）心筋症 --- 本邦学会報告例の検討--- 呼吸と循環 48：1237-1248, 2000.
- 2) 河合祥雄：「たこつぼ」。心エコー 2：478-4789, 2001
- 3) Case 18-1986 . New Engl J Med 314:1240-1247.1986.
- 4) Brandspiegel HZ, Marinchak RA, Rials SJ, Kowey PR.: A broken heart. Circulation 98:1349,1998.
- 5) Armstrong WF, Marcovitz PA.: Dynamic left ventricular outflow tract obstruction as a complication of acute myocardial infarction. Am Heart J 131:827-830, 1996.
- 6)Haley JH, Sinak LJ, Tajik AJ, Ommen SR, Oh JK.: Dynamic left ventricular outflow tract obstruction in acute coronary syndromes: An important cause of new systolic murmur and cardiogenic shock. Mayo Clin Proc 74:901-906, 1999.
- 7) Villareal RP, Achari A, Wilansky S, Wilson JM.: Anteroapical stunning and left ventricular outflow tract obstruction.. Mayo Clin Proc 76:79-83,2001.
- 8) Braunwald E, et al: The stunned myocardium: Prolonged, post ischemic ventricular dysfunction. Circulation 66:1146-9,1982.
- 9) 佐藤 光、立石博信、内田俊明、土手慶吾、石原正治：多枝spasmにより特異な左室造影「ツボ型」を示したstunned myocardium。「臨床から見た心筋細胞障害：虚血から心不全まで」児玉和久、土師一夫、堀章二 編集、科学評論社、東京、1990, p 56-64.
- 10) Kawai S , Suzuki H, Yamaguchi H, et al. : Ampulla cardiomyopathy ("takotusbo" cardiomyopathy)--- reversible left ventricular dysfunction --- Jpn Circ J 64:156-159,2000.
- 11) 川上秀生ほか：急性心筋炎が原因と思われるいわゆる"たこつぼ"型心筋症の1例.呼吸と循環 46:913-917,1998.
- 12) 小谷暢啓ほか：たこつぼ型の激症心筋炎を呈した一症例（抄）。Jpn Circ J 64 (S2) :826,2000.
- 13) 河合祥雄、橋本敬祐：カテコラミン心筋炎。日本臨床 38（秋期増刊号）「内科から病理へ」:3680-3685,1980.
- 14) Henein MY, O'Sullivan C, Sutton GC, Gibson DG, Coats AJ.: Stress-induced left ventricular outflow tract obstruction: A potential cause of dynamic dyspnea in the elderly. JACC 30:1301-1307, 1997.