

した。各々に対して、Ribosomal RNA とタ-ゲット遺伝子に対するプライマー、プロ-ブのペアを用い同一チューブで A.B.I.社 PRISM7700 を使ってリアルタイム定量的 PCR を行った。切除心筋のタ-ゲット遺伝子の量はコントロール RNA のタ-ゲット遺伝子の量に対する相対的な値として求めた。コントロールとしてのリボソ-マル RNA の CT 値とタ-ゲット遺伝子の CT との差を求め、2 回の結果の平均をとり、ABI 社提供の RNA に対する相対値として求めた。その結果 3 例では相対的なサイトカイン mRNA の定量において、炎症性サイトカイン mRNA の発現が亢進を示していた。また抗炎症性サイトカインである IL10 の発現はほとんど認めない（表 1）。

今回のウイルスゲノムの PCR については以下の方法で検討した。凍結左室部分切除心筋を Trizol 内でホモジネ-トし、プロトコ-ルに従い Total RNA を抽出した。RNA は Oligo dT とともに 90 °C で denature し、suprtscript2 で逆転写し、cDNA を作成した。続いて 5' NTR の PCR を行ない、電気泳動後、染色には SyberGreen を用いて housekeeping gene は約 15 分、ウイルスは 5 時間染色後、PCR 産物の確認を行った。

5' NTR の PCR 陽性症例においては、5' 付近からの約 3.2kb、3' 末端からの約 4kb ならびにほぼ全長 7kb の長鎖 PCR を行なった。酵素は Elongase enzyme mix を用い、94°C で 30 秒 denature し、55 °C 30 秒 anearing、68°C 7 分 30 秒の extention で 35 サイクル PCR を行った。

Negative Control としてはウイルス非感染マウス心筋に加え、各ステップで DW を用いた。

用いたプライマーは、5' 非翻訳領域には、E2n (FW) : 307-327 と E1n (REV) : 692-668 を用いた。また 5' 付近からの約 3.2kb は E2n (FW) と ID10 (REV) : 3544-3525 を、3' 末端からの約 4kb には ID9 (FW) : 3298-3318 と 3' end (REV) : 7399-7278 を、また長鎖 7kb には E2n (FW) と 3' end (REV) のペアを用いた。なお番号はコクサッキー-ウイルス B3 の遺伝子配列を示す。

研究結果

4 症例すべてで housekeeping gene としての β アクチン mRNA は陽性であった。また 4 症例すべてで 5' 非翻訳領域の PCR は陽性を示した（図 1）（図 2）。

長鎖 PCR についてはコクサッキー-ウイルス B3 のプラスミドとコクサッキー-ウイルス B3 を用いて予

備実験を行った。コクサッキー-ウイルス B3 のプラスミドとコクサッキー-ウイルス B3 から 5' 付近からの約 3.2kb、3' 末端からの約 4kb ならびにほぼ全長 7kb の長鎖 PCR の増幅を確認した（図 3）。そして 4 症例の cDNA を用いて 5' 付近からの約 3.2kb、3' 末端からの約 4kb ならびにほぼ全長 7kb の長鎖 PCR を行い、1 症例 (No.2) においてのみ 3' 末端からの約 4kb の PCR 産物が得られた（図 4）。

考察

5' 非翻訳領域の短鎖の PCR が陽性の症例では、oligo dT で逆転写していることより、これらでは、ほぼ 7kb の cDNA が作成されたことを意味する。今回用いた心筋は -80°C で 5 年以上保存されていたが、ウイルス RNA にかんしてはその保存状況は良好であると考えられた。

今回予備実験としてコクサッキー-ウイルス B3 のプラスミドとコクサッキー-ウイルス B3 を用いて 5' 付近からの約 3.2kb、3' 末端からの約 4kb ならびにほぼ全長 7kb の長鎖 PCR を行なった。これら長鎖 PCR の成功、不成功は RNA の質、逆転写の効率、長鎖 PCR の条件に依存した。エンテロウイルス 7kb の増幅はウイルス感染培養細胞からでも難度が高かった。また 3'、5' それぞれからの PCR 産物は数百 bp の重なりがあり、これらの混和液からは 7kb の PCR が比較的容易に可能であった。

今回症例 No.2 においてのみ 3' 末端からの約 4kb の PCR 産物が得られたが、本産物の遺伝子配列決定は現在検索中である。今回のような PCR 法を用いた研究では contamination が常に問題となる。5' 非翻訳領域の PCR についてもやはり遺伝子配列決定が contamination 除外のために必要と考えられる。この領域の遺伝子配列は我々が以前検索した 154bp を含んでおりこの部分が完全に一致すれば contamination はまず考えにくい。配列がコクサッキー B3 のプラスミドの配列と異なれば、contamination の可能性は低下する。しかし、感染ウイルスがコクサッキー-ウイルス B3 で遺伝子配列が一致する可能性もあり、この場合の評価は慎重を要する。また長鎖 PCR 産物については、まずこの遺伝子配列が 5' 非翻訳領域と一致することが必要で、かつ positive control のプラスミドと一致しない結果ができれば、contamination はほぼ除外しうると考えられる。

これまでに DCM 症例の心筋からこれほどの長い PCR 産物が得られた報告はなく、この約 4kb の遺伝子配列の決定によりヒトでの長期の感染をおこし

ているウイルスの変異について新たな知見が得られると考えられる。またこの領域はジストロフィンを切断するとされるプロテア-ゼ 2A 領域も含んだ領域であり、この PCR 産物を用いた蛋白発現実験等によりエンテロウイルス感染と DCM 病因との関連解明に進展がみられるものと期待される。

結論

DCM 患者の左室部分切除術切除心筋から 3' 末端からの約 4kb のエンテロウイルスの PCR 産物を得た。この PCR 産物の遺伝子配列の解析により、ヒト心筋に持続的に感染するウイルスの遺伝子変異の検索が可能である。これによりエンテロウイルス感染と DCM 病因との関連解明における進展が期待される。

文献

1. Fujioka S, Kitaura Y, Ukimura A, Deguchi H, Kawamura K, Isomura T, Suma H, Shimizu A. Evaluation of viral infection in the myocardium of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol 2000 ; 36 : 1920-1926
2. O. Jin, M.J. Sole, J.W. Butany et al, Detection of enterovirus RNA in myocardial biopsies from patients with myocarditis and cardiomyopathy using gene amplification by polymerase chain reaction. Circulation 82 (1990) , pp. 8-16
3. PE Applied Biosystems, Protocol of TaqMan Cytokine Gene Expression Plate I (P/N 4306744) ; <http://www.appliedbiosystems.com>

表 1

No	年齢	性	予後	線維化 (%)	細胞浸潤/mm ²	EV	遺伝子配列
1	16	male	死亡	41.4	40.5	P	CB4
2	64	female	死亡	10.8	10.1	P	
3	14	male	死亡	7.9	34.2	P	CB3
4	53	male	死亡	5.6	37.8	P	WCB3
No	IL-1 β	IL-8	IL-10	IL-12p35	IL-15	IFN- γ	TNF- α
1	n	0.645	n	0.203	1.60E-02	n	4256
2	2.81	1.11	n	1.846	3.01E-01	99897	0.0621
3	76.3	23.3	n	1.54	1.43E-01	n	0.0242
4	11.79	12.1	n	1.07	3.84E-01	n	0.0718

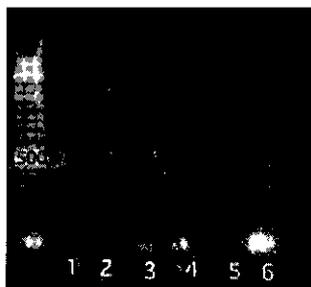


図 1 β アクトチン mRNA の PCR の結果 ; lane1 : case1, lane2 : case2, lane3 : case3, lane4 : case4, lane 5 : negative control, lane 6 : CVB3 infected Hela cells

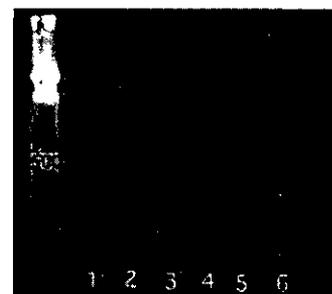


図 2 エンテロウイルス 5' 非翻訳領域の PCR の結果 ; lane1 : case1, lane2 : case2, lane3 : case3, lane4 : case4, lane 5 : negative control, lane 6 : infected Hela cells

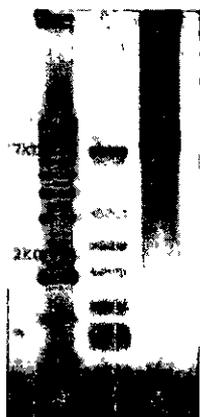


図3 長鎖 PCR の結果；M：1kb ladder, 1：CVB3 infected cells, 2：plasmid

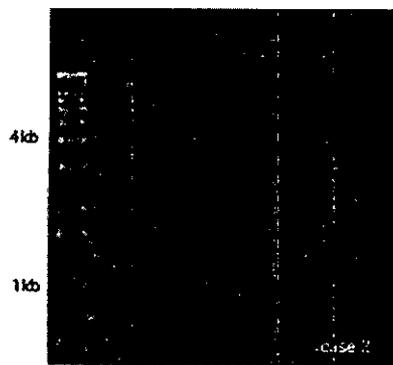


図4 症例からの長鎖 PCR（3' 末端からの約 4kb）の結果；case2 において 3' 末端からの約 4kb が陽性を示した。

拡張型心筋症における T 細胞異常

川名 正敏

東京女子医科大学循環器内科

研究要旨

拡張型心筋症の病因の一つとしての免疫応答の異常を、T細胞の活性化と分化について臨床例で Flow cytometry を用いて検討した。拡張型心筋症症例では末梢血中の CD3⁺/HLD-DR⁺細胞の著明な増加、CD40 ligand の発現の増加が認められた。また T細胞中のインターフェロン γ 産生の亢進、これを反映して単球表面 CD40 発現の増加が見られた。拡張型心筋症では末梢血中の T細胞の活性化と TH₁ への分化誘導が促進され、このような TH₁/TH₂ バランスの異常は、拡張型心筋症の病因とその進展に何等かの関与をしていると考えられる。

研究目的

拡張型心筋症の病因とその進展の機序として、炎症と免疫反応は重要なメカニズムの一つであると考えられている。これまでの研究においては主として心筋炎を中心として免疫学的アプローチが進められてきたが、近年様々なサイトカインが心肥大や心不全の病態にも重要な役割を果たすことが知られるようになった。しかし、拡張型心筋症における T細胞の活性化状態の検討はあまり行われていない。今回我々は、活性化した末梢 Tリンパ球が、その表面に HLD-DR と CD40 ligand を発現することを用いて拡張型心筋症症例の末梢血 Tリンパ球の活性化を測定し、拡張型心筋症で免疫応答の異常が見られるかどうかについて評価を行った。

現状では拡張型心筋症そのものに対する治療法はなく、心不全に対する治療が行われているだけである。拡張型心筋症の病因は多岐にわたる可能性があるが、その中でも免疫応答の異常が病因とされる例を特定できれば、今後そのような例に対して特異的治療法を導き出せる可能性があると考えられる。

研究方法（倫理面への配慮）

拡張型心筋症 10 例（DCM, 37 ± 15 才, NYHAI~III, EF 9-29%）と健常対照群（control, 31 ± 7 才）から末梢血採血を行い、flow cytometry を用いて CD3 陽性細胞 10,000 個中の HLA-DR 陽性細胞（CD3⁺/HLD-DR⁺）の頻度（%）と、CD3 陽性細胞上の CD40 ligand の発現量（mean fluorescence intensity (MFI)）の測定を行った。

本研究は末梢血を用いた研究であり侵襲的手技など対象症例に大きなリスクを伴うものではないが、施行に当たっては研究内容や個人情報の保護などに

ついて十分に説明し理解を得た。

研究結果

拡張型心筋症症例では末梢血中の CD3⁺/HLD-DR⁺細胞の著明な増加が認められた（DCM 7.8 ± 4.9%, control 1.8 ± 0.5%, p < 0.01）。同様に拡張型心筋症症例では、正常対照群と比して著明な CD40 ligand の発現の増加が認められた（DCM 4.4 ± 1.4, control 2.2 ± 0.5 MFI, p < 0.01）。このような T細胞の活性化の原因を解明するために flow cytometry を用いた Tリンパ球の細胞内サイトカインの測定を行ったところ、拡張型心筋症症例では、対照と比し細胞内のインターフェロン γ （INF- γ ）の産生の増加が認められた（DCM 22.1 ± 7.3, control 11.9 ± 3.7 MFI, p < 0.01）。このような Tリンパ球の活性化と INF- γ の産生の増加を反映して、拡張型心筋症症例での末梢血単球表面 CD40 の発現は有意に増加していることも確認された（DCM 235.3 ± 91.2, control 109.27 ± 12.4 MFI, p < 0.01）。

考察

拡張型心筋症の症例では末梢血中の T細胞の活性化と TH₁ 細胞の増加が認められた。また、INF- γ の産生の増加も認められ TH₁ への分化の誘導が促進されていると考えられる。実験的心筋炎において、心筋炎の病態から拡張型心筋症への進展に T細胞が大きな役割を果たしていることがこれまで報告されているが、今回のデータは臨床例の拡張型心筋症においてその病態発症・進展に T細胞の関与もあることを示したのと考えられる。今後症例を積み重ねて臨床所見との対比を積み重ねると同時に、現在 TCR 発現プロファイルの変化も検討中である。

結論

TH₁/TH₂ バランスの異常は、拡張型心筋症の病因とその進展に何等かの関与をしていると考えられる。

拡張型心筋症および肥大型心筋症における Z 帯構成要素の構造変異と機能異常

木村 彰方

東京医科歯科大学難治疾患研究所

研究要旨

特発性心筋症の病因と病態形成機構の解明を目的として、主に既知の原因遺伝子に変異が見出されていない肥大型心筋症 (HCM) 患者および拡張型心筋症 (DCM) 患者を対象として、Z 帯構成要素であるタイチン、テレットニン、MLP 遺伝子の変異を検索した。その結果、DCM 患者の一部にタイチン、テレットニン、MLP それぞれの遺伝子変異を検出した。一方、HCM 患者の一部にタイチン変異を見出したことを以前に報告しているが、本研究でテレットニン変異が検出された。なお、HCM 患者には MLP 変異は見出されなかった。同一遺伝子の変異が HCM および DCM の双方に見出されたことから、これらの変異についての機能解析を行ったところ、DCM 患者に見出されたタイチン変異はアクチニンあるいはテレットニン結合性を減弱させた。また、DCM 患者に見出されたテレットニン変異はタイチンあるいは MLP への結合性を減弱させ、MLP 変異はテレットニンへの結合性を減弱させた。これに対して、HCM 患者に見出されたタイチン変異はアクチニンへの結合性を増強し、テレットニン変異はタイチン結合性を増強した。以上の結果により、Z 帯構成要素に関する DCM 変異はタイチン-テレットニン-MLP-アクチニンの Z 帯構成要素間の結合性を低下させるのに対し、HCM 変異はこれを増強することから、同一遺伝子の変異でもその機能変化に応じて異なる病態をもたらすものと考えられた。

研究目的

特発性心筋症は原因不明の心筋疾患と定義され、臨床的には肥大型心筋症 (HCM) と拡張型心筋症 (DCM) の 2 病型が主体である。いずれの疾患ともその発症に遺伝的变化が関与する。HCM の約 50% は家族性であり、これまでに 12 種類の原因遺伝子が報告されているが、それらに変異が見出されるのは患者の約 50% に過ぎない。一方、DCM では約 20-30% が家族性であり、成人型 DCM ではこれまでに 10 種類の原因遺伝子が報告されているものの、それらに変異が見出される患者は約 10% に過ぎない。これらのことより、HCM、DCM とも、さらに別の原因遺伝子が存在すると考えられる。また、既知の HCM 原因遺伝子と DCM 原因遺伝子の一部はオーバーラップするが、なぜ同一遺伝子の変異が異なる病型を呈するかに関しては不明な点が多い。特発性心筋症の分子遺伝学的手法による病因と病態形成機構の解明は、発症機構の理解に基づいた診断法、予後予測法、治療法および予防法を確立する上での解決すべき最重要課題である。本研究では、HCM および DCM の新たな原因遺伝子を究明することを目的として、特に Z 帯構成要素に着目した解析を行い、見出された変異についてはその機能

変化を解析した。

研究方法 (倫理面への配慮)

既知の原因遺伝子に変異が見出されていない HCM 患者 146 名および DCM 患者 134 名を対象とした。これらの患者群を対象として、タイチン Z 帯領域、テレットニン、MLP 遺伝子の変異を SSCP 法によってスクリーニングし、異常 SSCP パターンを呈する例についてはダイレクトシーケンス法により塩基変化を確認した。見出された病因関連変異については、酵母 2 ハイブリッド法 (Y2H) を用いて、変異に起因する Z 帯構成要素間の結合性変化を₂ガラクトシダーゼ活性の変化として測定した。なお、Y2H に用いたコンストラクトは市販されている正常ヒト心筋 cDNA をテンプレートとして PCR 法で増強した DNA 断片をクローン化したものであり、HCM あるいは DCM 変異の導入は変異プライマーを用いた連結 PCR 法による。本研究はヒト遺伝子解析研究にあたるが、3 省合同遺伝子解析研究ガイドラインに従って行うものであり、東京医科歯科大学難治疾患研究所倫理審査委員会の承認 (平成 13 年度 1 月 18 日付) を受けて実施している。

研究結果

変異スクリーニングの結果、日本人 DCM 患者にタイチン変異 (Val54Met および Ala743Val) を見出した。一方、日本人 HCM 患者にテレットニン変異 (Thr137Ile および Arg153His) を見出した。また、国外の研究者らとの共同研究を行っているが、ドイツの DCM 患者に MLP 変異 (Trp4Arg) およびテレットニン変異 (Arg87Gln)、韓国の DCM 患者にテレットニン変異 (Glu132Gln) が、それぞれ見出されている。これらの変異はいずれも各人種、民族の健常者コントロールには見出されず、多発家系では心筋症との連鎖を認め、かつ各々のタンパクの中で進化的に保存されたアミノ酸の変異であることから、疾患特異的変異であることが強く示唆された。また、それぞれの変異は当該タンパクが他のタンパクと結合する際に必須のドメインに存在するため、それぞれの変異について、他のタンパクとの結合能の変化を酵母 2 ハイブリッド法 (Y2H) を用いて測定した。その結果、DCM に見出されたタイチンの Val54Met 変異はテレットニン結合性、Ala743Val 変異はアクチニン結合性をそれぞれ減弱させた。一方、HCM に見いだされたテレットニン変異 (Thr137Ile, Arg153His) はいずれもタイチン結合性を増強させた。これに対して、DCM に見出された MLP 変異 (Trp4Arg) はテレットニン結合性を、テレットニン変異 (Arg87Gln, Glu132Gln) はいずれも MLP およびタイチンへの結合性を減弱させた。

考察

本研究で DCM 患者にタイチン、テレットニン、MLP などの Z 帯構成要素の変異が見出され、それ

らはいずれも Z 帯構成要素間の結合性を減弱させるものであった。一方、HCM 患者に見出されたテレットニン変異はタイチン結合性を増強するものであり、以前に我々が報告した HCM におけるタイチン変異がアクチニン結合性を増強させることと考え合わせると、HCM における Z 帯構成要素間の結合性変化は DCM の場合とは全く逆の関係になっていることが判明した。一方、我々との共同研究を行っている米国グループは、DCM のモデル動物である MLP ノックアウトマウスにおいて、Z 帯が幅広くなっており、ストレッチに対する肥大反応 (ストレッチ反応) が生じないことを明らかにしている。また MLP 変異を有する DCM 患者でも同様の Z 帯形態異常が認められることから、DCM における Z 帯構成要素間の結合性の減弱はストレッチ反応の減弱を生じさせるものと考えられる。すなわち DCM はストレッチ刺激に対する肥大反応が生じにくい病態としてとらえられる。これに対して、HCM 変異では Z 帯構成要素間の結合性増強がストレッチ反応をより容易に生じやすい状況、すなわちストレッチ刺激に対して肥大を生じやすい病態であることが示唆される。また、このような観点から捉えると、Z 帯要素異常による DCM では、伸展刺激を減弱させることが病態進行阻止ないし改善に役立つと考えられ、 β ブロッカー治療が有効であることとよく合致する所見である。

結論

Z 帯構成要素であるタイチン、テレットニン、MLP の変異は DCM あるいは HCM の病因となるが、その機能変化の方向性は全く逆である。

研究発表

論文発表

1. Itoh-Satoh M, Hayashi T, Nishi H, Koga Y, Arimura T, Ueda K, Hohta S, Nouchi T, Takahashi M, Hiroe M, Marumo F, Imaizumi T, Yasunami M, Kimura A: Titin mutations as the molecular basis for dilated cardiomyopathy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291: 385-393, 2002.
2. Knoell R, Hoshijima M, Hoffmann HM, Person V, Lorenzen-Schmidt I, Bang M-L, Hayashi T, Shiga N, Yasukawa H, Schaper W, McKenna W, Yokoyama M, Schork J, Jeffrey H, Omens J, Andrew D, McCulloch A, Kimura A, Gregorio CC, Poller W, Schaper J, Schulthelss HP, Chien KR: The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. *Cell* 111: 943-955, 2002.
3. Kimura A, Hayashi T, Itoh-Satoh M, Arimura T, Lee WH, Lee SY, Park JE: Molecular etiology of idiopathic cardiomyopathy: Identification of novel disease genes for

hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy. *In Proceedings of ICCHF* (eds. Matsumori A, et al), Klumer Academic Publishers, Boston, in press

4. Kimura A, Itoh-Satoh M, Hayashi T, Takahashi M, Arimura T, Yasunami M, Lee SY, Hwang TH, Lee WH, Park JE : Mutational profiles and molecular pathogenesis of hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy in Asian populations. *In Frontiers in Cardiovascular Health* (eds. Dhalla NS, et al), Klumer Academic Publishers, Boston, in press

学会発表

1. Arimura T, Hayashi T, Takahashi M, Ueda K, Hohda S, Yasunami M, Kimura A : Mutation of ZASP causes alteration in the affinity to protein kinase C subtypes and associates with familial dilated cardiomyopathy. 第66回日本循環器学会, 北海道, 平成14年4月
2. Hayashi T, Arimura T, Ueda K, Hohda S, Takahashi M, Matsumoto Y, Nakano N, Yasunami M, Kimura A : Identification of caveolin-3 in familial cardiomyopathy. 第66回日本循環器学会, 北海道, 平成14年4月
3. Kimura A : Novel Genetic Etiologies of Hypertrophic Cardiomyopathy. 第50回日本心臓病学会学術集会, 名古屋, 平成14年9月
4. 林 文晴, 有村卓郎, 古賀義則, 上田和雄, 宝田 茂, 野内達人, 高橋めぐみ, 柴田宏樹, 中野記嗣, 松本雄二, 稲垣夏子, 堀 久枝, 安波道郎, 木村彰方 : 特発性心筋症における caveolin-3 変異とその機能変化. 第47回日本人類遺伝学会, 名古屋, 平成14年11月

高感度心筋トロポニン T による慢性血液透析患者の 心筋障スクリーニングと C 型肝炎ウイルス感染と 心・血管障害の関連について

島田 俊夫

島根医科大学循環器疾患治療部

研究要旨

高感度心筋トロポニン T は心筋特異性が高く、これまで心筋梗塞、心筋炎の診断と治療評価に用いられている。また慢性血液透析患者で心筋トロポニン T 値の持続高値例では予後不良との報告もみられる。この研究の目的は増加する慢性血液透析患者の心筋障害のスクリーニングに心筋特異性の高い高感度心筋トロポニン T が有用か否か検討することにある。慢性血液透析患者 91 名を対象とした。透析直前、透析終了直後に高感度心筋トロポニン T 測定のための採血を行った。高感度心筋トロポニン T の測定はロッシュ社製エクルーシスを用い化学発光により測定した。この際、冠危険因子評価のために血清コレステロール、空腹時血糖、血清クレアチニン、中性脂肪、ヘモグロビン、透析前後の血漿 BNP、血清 HGF、HCV-RNA、HCV-Ab、血圧、心電図、脈波伝搬速度を測定した。連続的に選択された 91 例の透析患者中の透析直前の心筋トロポニン T 値において 49/91 例 (54%) に血清高感度心筋トロポニン T 値に異常を認めた。透析直後では 45/91 (34%) に異常を認めた。ロジスティック回帰分析の結果血清の HGF、血清 HCV-RNA 濃度がトロポニンの上昇と密接に関連しており、血清高感度心筋トロポニン T 値上昇に HCV-RNA 感染が関与する可能性が示唆された。また脈波伝搬速度の加速に血清 HCV-RNA 感染の関与が示唆された。慢性透析患者では心・血管障害の頻度が高いことはよく知られているが我々のデータもそれを支持する結果であり、さらに慢性血液透析患者の血清トロポニン T 値の上昇ならびに動脈硬化の進展に HCV-RNA の関与が示唆された。

研究目的

慢性血液透析患者の心筋障害スクリーニングに心筋特異性の高い高感度心筋トロポニン T の測定が有用か否かまたその要因について検討することである。

研究方法（倫理面への配慮）

単一施設で維持透析を受けている 91 例の慢性血液透析患者（男性/女性：67/32、年齢：33-85 歳、平均 63 歳、かつ少なくとも 6 ヶ月以上透析を受けている患者：透析期間 0.5-32 年、平均 10.4 年）を研究の対象として選んだ。この患者 91 例に測定の臨床的意義を十分に説明し、了解の上で通常の採血時に心筋トロポニン T 測定のための採血を行った。基礎疾患として 57 (51.6%) 例が糸球体腎炎、21 例 (23.1%) が糖尿病性腎症を有していた。空腹時血糖は 12 時間の絶食後に採血した。血清中の C 型肝炎ウイルスの RNA は逆転写 PCR (RT-PCR) 法により測定した。血清高感度心筋トロポ

ニン T は Roche 社製 ECLusys2010 を用い化学発光法により測定し、0.01ng/mL 未満を陰性と判定した。血漿 BNP 濃度は塩野義製薬のシオノリア BNP キットを用い免疫放射測定法 (RIA 法) により測定した。心機能評価目的で Siemens 社製の Aspen を用い心エコー図法により左室拡張末期径、収縮末期径、心室中隔壁厚、左室後壁厚の測定ならびに左心室重量係数、駆出分画を算出した。さらに、動脈硬化の評価目的でフクダ電子社製 VaSera を用い頸動脈-大腿動脈間での脈波伝搬速度を併せ計測した。統計処理は統計ソフト GB-STAT 6.0 を用い t-検定、 χ^2 検定、重回帰分析、ロジスティック回帰分析を行った。危険率は 0.05 未満を有意とした。

研究結果

91 例中 27 例 (30%) で血清学的に C 型肝炎ウイルスが陽性で、17 例 (19%) で C 型肝炎ウイルス RNA (HCV RNA) が陽性で、59 例 (54%) が透析前の血清高感度心筋トロポニン T が陽性であった。血漿 BNP、血清 CRP 濃度は心筋トロポニン T

が陽性群が陰性群に比べ有意に高値を示した（血漿BNP：陽性群 523 ± 63.2 vs 308.2 ± 199.2 pg/mL 陰性群；血清CRP：陽性群 0.61 ± 1.57 vs 0.12 ± 0.06 pg/mL 陰性群）。高血圧，高脂血症，糖尿病，喫煙等の冠危険因子には両群間に差を認めなかった。心エコー図法から算出した左室重量係数は心筋トロポニンT 陰性群よりは陽性群で有意に重かったが（左室重量係数：陽性群 127.8 ± 39.9 vs 112.2 ± 24.9 g/m² 陰性群），しかし，左室拡張末期径，収縮末期径，駆出分画には差を認めなかった。ロジスティック回帰分析の結果血清C型肝炎ウイルスRNAの存在と透析前の肝細胞増殖因子の濃度が高感度心筋トロポニンT陽性と密接に関連し，それぞれ独立した因子として評価された（表1，表2，図1）。91例の患者の48例で脈波伝搬速度を測定した。重回帰分析により，脈波伝搬速度の増加と年齢，糖尿病，血圧，血清C型肝炎ウイルスRNAの存在が有意な独立した危険因子として評価された（表3）。対象患者の約半数に異常血清心筋トロポニンT異常が認められた。透析期間は血清高感度心筋トロポニンT陽性群と陰性群の間に差を認めなかった。

考察

これまで Chlamydia pneumoniae, Cytomegalovirus のような微生物による慢性炎症と動脈硬化との関連では多くの研究が行われてきたがきたがC型肝炎ウイルスとの関連では動脈硬化に関する研究は少ない。しかしながら，アジア地域でのC型肝炎ウイルスの感染率を考慮する時，C型肝炎ウイルスが動脈硬化と密接に関連するならばこれは大きな問題となる。動脈硬化合併症（心筋梗塞，脳梗塞等）による死亡率の高い慢性血液透析患者を対象として心筋障害の有無，血管の動脈硬化度を検討した結果50%以上の患者で高感度心筋トロポニンT濃度の上昇が認められた。この事実は慢性血液透析患者では高頻度に心筋障害が潜在していることを示しているものと理解される。われわれの研究結果からC型肝炎ウイルスの感染率が高い慢性維持血液透析患者の心筋障害にC型肝炎ウイルス，左室肥大，血漿BNP濃度が密接に関連していることが判明した。これまでC型肝炎ウイルスの慢性感染が拡張型，肥大型心筋症，心筋炎の発生に関連した一因になるとの報告がなされているが，今回の我々の対象は心筋症の患者を含んでいなかった。我々の結果はC型肝炎ウイルスによる左室肥大，慢性心筋障害へ関与を示唆している。さらに，重回帰分析の結果から増加した脈波伝搬速度は大動脈の硬化を中心とした

動脈硬化を反映するに留まらず，最近の健康診断受診者を対象とした研究報告によれば血清のC型肝炎ウイルス抗体陽性と頸動脈プラーク形成，内膜・中膜壁厚増加の間には密接な関係が存在することが証明されている。本研究の結果は慢性血液透析患者に認められる心筋障害，脈波伝搬速度の増加がC型肝炎ウイルスの持続する慢性感染により部分的に説明できる可能性を示していると理解される。

結論

今回提示した証拠はC型肝炎ウイルスの慢性持続感染が慢性血液透析患者の心筋障害ならびに動脈硬化の促進に関与していること示している。多数の慢性C型肝炎ウイルス感染者を有するアジア地域においては癌の発生への関与みならず動脈硬化の視点からもさらなる臨床研究が必要と思われる。これをさらに確実なものとするためには多施設による大規模臨床研究が必要になるとと思われる。

Reference

1. Dierkes J., Dormrose U., Westphal S., Ambrosch A., Bosselmann H, Neumann, Claus Luley K.H. Cardiac troponin T predicts mortality in patients with end-stage renal disease. *Circulation*. 2000 ; 102 : 1964-1969
2. Jacques Blacher, Alain P Guerin, Bruno Pannier, Sylvain J Marchais, Michel E Sarfar, Gerald M London. Impact of aortic stiffness on survival in end-stage renal disease
3. Freda BJ, Wilson Tang W.H., Van Lente F, Peacock W.F., Francis G.S. Cardiac troponins in renal insufficiency Review and clinical implications *JACC* 2002 ; 40 : 2065-71
4. Tomiyama H, Arai T, Hirose K, Hori S, Tamamoto Y, Yamashita A. Hepatitis C virus seropositivity, but not hepatitis B virus carrier or seropositivity, associated with increased pulse wave velocity. *Atherosclerosis* 2003 ; 166 : 401-403
5. Nobukazu Ishizuka, Yuko Ishizuka, Eiko Takahashi, Ei-ichi Tooda, Hideki Hashimoto, Ryozo Nagai, Minoru Yamakado. Association between hepatitis C virus seropositivity, carotid-artery plaque, and intima-media thickening. *Lancet* 2002 ; 359 : 133-135
6. Ramirez JA, the Chlamydia pneumoniae / Atherosclerosis Study Group. Isolation of Chlamydia pneumoniae from the coronary artery of a patient with coronary atherosclerosis. *Ann Intern Med* 1996 ; 125 : 979-82.
7. Muhlestein JB, Anderson JL, Hammond EH, et al. Infection with Chlamydia pneumoniae

- accelerates the development of atherosclerosis and treatment with azithromycin prevents it in a rabbit model. *Circulation* 1998 ; 97 : 633-6
8. Saikku P, Leinonen M, Tenkanen L, et al. Chronic Chlamydia pneumoniae infection as a risk factor for coronary heart disease in the Helsinki Heart Study. *Ann Intern Med* 1992 ; 116 : 273-8
9. Sorlie PD, Nieto Fj, Adam E, Folsom AR, Shahar E, Massing M. A prospective study of cytomegalovirus, herpes simplex virus 1, and coronary heart disease : the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study 2000 ; 160 : 2027-32
10. Akira Matsumori, Chikao Yutani, Yoshihiko Ikeda, Sachiko Kawai, Shigetake Sasayama. Hepatitis C virus from the hearts of the patients with myocarditis and cardiomyopathy. *Laboratory investigation*. 2000 ; 80 : 1137-1142

表 1. Clinical characteristics between patients with and without positive serum cTnT levels

Variables	cTnT(+)(n=49)	cTnT(-) (<0.010) (n=42)
Age(year)	65.3±10.6	59.6±12.4 †
Sex(m/f)	31/18	28/14
mBP(mmHg)	120.1±18.3	118.3±21.9
HR(beats/min)	69.5±11.5	75.3±9.8
BMI	20.2±3.3	20.4±2.6
HD duration(day)	4088±2993	3471±2512
HT(+/-)	34/15	27/15
DM(+/-)	12/37	10/32
HL(+/-)	15/34	16/26
Smoking(+/-)	25/24	18/24
HCV-Ab(+/-)	17/32	10/32
HCV-RNA(+/-)	12/37	5/37
cTnT preHD (ng/ml)	0.096±0.096	<0.010
cTnT postHD (ng/ml)	0.043±0.058	<0.010
ANP preHD (pg/ml)	205.6±178.0	159.0±101.5
ANP postHD (pg/ml)	76.4±92.1	45.9±26.9 †
BNP preHD (pg/ml)	523.1±634.2	308.2±199.2 †
BNP postHD (pg/ml)	326.2±390.9	184.5±110.3 †
HGF preHD (ng/ml)	0.362±0.313	0.185±0.113 ‡
HGF postHD (ng/ml)	1.004±1.703	0.483±1.703

† p<0.05, ‡ p<0.01, # p<0.001

表 2. Clinical characteristics between patients with and without positive serum cTnT levels

Variables	cTnT(+)(n=49)	cTnT(-) (<0.010) (n=42)
CTR (%)	50.7±6.3	46.6±4.2 #
SV1+RV5 (mV)	3.5±1.6	2.9±1.1 †
ST dep (+/-)	26/23	6/36 #
LDVd (cm)	4.70±0.60	4.60±0.47
%FS (%)	38.6±12.1	38.1±7.4
LVMi (g/m ²)	127.8±39.9	112.2±24.9 †
Ht (%)	31.6±3.0	32.4±2.3
Cr (mg/dl)	11.5±2.8	12.4±2.7
K (mEq/l)	5.2±0.8	5.2±0.6
Alb (g/dl)	3.8±0.3	4.0±0.3 ‡
TC (mg/dl)	150.8±27.5	152.1±25.9
CPK (IU/l)	129.8±114.7	119.1±75.2
CRP (mg/dl)	0.610±1.573	0.121±0.061 †
Fibrinogen (mg/dl)	307.4±75.8	268.8±57.2 ‡
Ca (mg/dl)	9.4±1.0	9.3±0.8
IP (mg/dl)	6.2±1.5	5.6±1.3
Ca×P	58.0±16.0	52.0±13.7
HbA1c補正 (%)	4.5±1.0	4.5±0.8
iPTH (pg/ml)	210.2±179.2	215.3±217.9
ChE (IU/l)	190.3±52.0	206.1±38.5

† p<0.05, ‡ p<0.01, # p<0.001

图 1 : Predictors of Elevation of Serum cTnT
- Multiple Logistic Regression Analysis-
-Model Coefficients 95% Confidence Intervals-

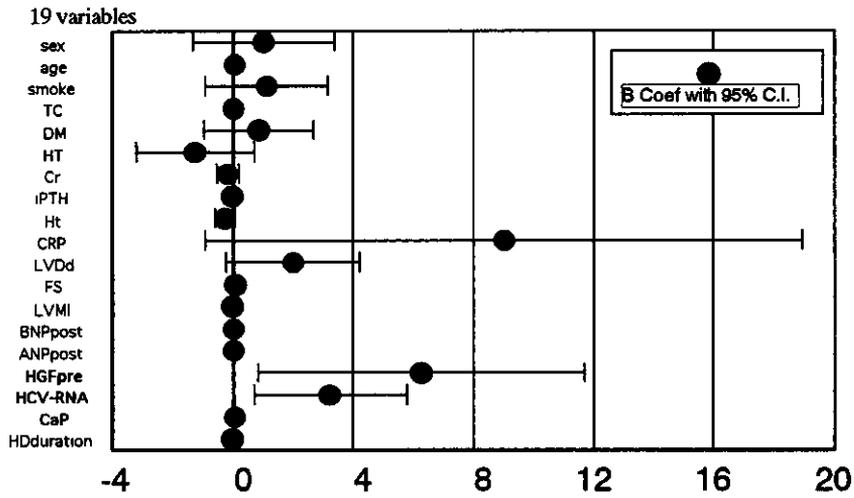


表 3. Results of forward stepwise multiple regression analysis to assess the correlation of PWV with other variables (n=66)

Covariate	Beta	t-value	P-value	R ²
Sex	-0.74	-1.21	Ns	0.79
Age	0.07	3.18	0.003	
Smoke	0.81	1.53	Ns	
DM	0.61	1.22	Ns	
Cr	0.04	0.39	Ns	
iPTH	0.00	0.40	Ns	
Hematoerit	-0.26	-2.98	0.006	
CRP	-0.18	-0.91	Ns	
LVMi	0.02	2.87	0.007	
BNP	0.001	0.55	Ns	
cTnT	-0.729	-2.05	Ns	
HGF	0.85	0.67	Ns	
Heparin	0.00	0.13	Ns	
mBP	0.06	4.81	<0.0001	
HCV-RNA	3.18	5.14	<0.0001	
Ca×P	-0.03	-1.47	Ns	
Duration of dialysis	0.00	-1.35	Ns	

ミトコンドリアゲノム多型の機能的多様性が エネルギー代謝に及ぼす影響

田中 雅嗣

財団法人岐阜県国際バイオ研究所遺伝子治療研究部

研究要旨

ミトコンドリア DNA の点変異あるいは欠失はミトコンドリア心筋症の重要な病因である。心筋症における病態の進展にミトコンドリアゲノム多型が影響を及ぼしている可能性がある。我々は日本人における多型の全貌を明らかにするために、192 個体のミトコンドリアゲノムの全塩基配列を決定した。多数例の mtDNA 全塩基配列を決定することより、mtDNA の haplogroup をさらに細分類し、特徴的なアミノ酸置換を有する sub-haplogroup を同定することができた。肥満群と非肥満群の間で、頻度が有意に異なる 3 種の haplogroup を見いだした。集団において検出される mtDNA の多様な haplogroup には互いに機能的な相違が存在すると推定された。特発性心筋症におけるミトコンドリアゲノム多型を解明する基礎が得られた。

研究目的

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。心筋症における病態の進展にミトコンドリアゲノム多型が影響を及ぼしている可能性がある。我々はミトコンドリアゲノム多型の機能的相違を明らかにするために、エネルギー代謝と密接に関連する病態として肥満に注目し、これに関連するミトコンドリアゲノム多型を解析した。

研究方法（倫理面への配慮）

実施に先立ち、本研究所の倫理委員会の承認を得た。血液細胞を若年の肥満者および非肥満者から同意を得た上で採取し、DNA を抽出した。既報に従って、ミトコンドリアゲノム全長を第 1PCR 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 2PCR により増幅した。Big-Dye terminator 法によってシーケンス反応を行い、全塩基配列を決定した。

研究結果

肥満者および非肥満者の各 96 例の mtDNA 全塩基配列（16,569 塩基×96 例×2 群=318 万塩基）を決定した結果、mtDNA の coding region において肥満および非肥満に関連する SNP がそれぞれ 15 個および 4 個検出された。これらの SNP は互いに連鎖しているものが多く、肥満に関連する 2 つの haplogroup と非肥満に関連する 1 つの haplogroup の計 3 つの群に分類された。

Haplogroup M7b2 を代表とする 5 個の同義置換と 5 個のアミノ酸置換（ND1 Asp→Asn, ND2 Ala→Thr, CO2 Val→Ile, ND3 Ile→Thr, ND5 Tyr→His）、ならびに Haplogroup A1a を代表とする 4 個の同義置換と 1 個の挿入（16S rRNA）は非肥満群に比較し肥満群で有意に高頻度であった（ $p=0.03$ ）。一方、Haplogroup F に代表される 2 個の同義置換と 2 個のアミノ酸置換（ND5 Ser→Thr, Val→Ile）は非肥満群に比較し肥満群において有意に低頻度であった（ $p=0.02$ ）。

考察

mtDNA のハプログループは、非翻訳領域である D-ループ領域の塩基配列と mtDNA 全領域の制限酵素切断片長多型（RFLP）に基づいて分類され、人類学的研究に用いられてきた。多数例の mtDNA 全塩基配列を決定することより、mtDNA の haplogroup をさらに細分類し、特徴的なアミノ酸置換を有する sub-haplogroup を同定することができた。肥満群と非肥満群の間で、頻度が有意に異なる 3 種の haplogroup を見いだした。集団において検出される mtDNA の多様な haplogroup には互いに機能的な相違が存在すると推定された。

結論

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、病態の進展に関与している可能性を検討する必要がある。

研究発表

論文発表

1. 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
2. Tanaka M. Mitochondrial genotypes and cytochrome b variants associated with longevity or Parkinson's disease. *J Neurol* 249 : II/11-II/18, 2002
3. Tanaka M, Borgeld H-J, Zhang J, Gong J-S, Yoned 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, Yagi K. Gene therapy for mitochondrial disease by delivering restriction endonuclease SmaI into mitochondria. *J Biomed Sci* 9 : 534-541, 2002
4. 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, 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* 70 : 347-355, 2002
5. Uchigata Y, Okada T, Gong J-S, Yamada Y, Iwamoto Y, Tanaka M. A mitochondrial genotype associated with development of autoimmune-related type-I diabetes. *Diabetes Care* 25 : 2106, 2002
6. Yamada Y, Fujisawa M, Ando F, Niino N, Tanaka M, Shimokata H. Association of a polymorphism of the transforming growth factor-beta1 gene with blood pressure in Japanese individuals. *J Hum Genet* 47 : 243-8., 2002
7. Yamada Y, Ichihara S, Takatsu F, Ishihara H, Hirayama H, Sone T, Tanaka M, Yokota M. Prediction of the risk of myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes. *N Engl J Med* 347 : 1916-1923, 2002
8. Yamamoto T, Maruyama W, Kato Y, Yi H, Shamoto-Nagai M, Tanaka M, Sato Y, Naoi M. Selective nitration of mitochondrial complex I by peroxynitrite : involvement in mitochondria dysfunction and cell death of dopaminergic SH-SY5Y cells. *J Neural Transm* 109 : 1-13, 2002

学会発表

1. Tanaka, M. Mitochondrial genome polymorphisms associated with obesity, thinness, and diabetes mellitus. The First Scientific Meeting of Asian Society of Mitochondrial Research and Medicine, Seoul, February 5, 2003.

タコツボ型心筋障害における tenascin-C 発現

河合 祥雄

順天堂大学医学部循環器内科

研究要旨

タコツボ型心筋症（心筋障害）は、筋収縮帯形成、心筋融解、分節化などの心筋細胞障害像を示す。しかし、それらの所見のうち、心筋分節化（segmentation）は死戦期の変化とも考えられ、従来は非特異的所見と等閑視されてきた。たこつぼ心筋症剖検例に創傷の治癒過程を反映するとされる、tenascin-C 免疫染色を施し、生前の心筋障害かを検討した。心筋分節化周囲に tenascin-C の有意の発現を見ず、このことは治癒機転の未発動を意味する可能性もしくは分節が死戦期に形成された可能性を示唆すると考えられた。

研究目的

tenascin-C は創傷の治癒過程などに発現し、生前の心筋障害の指標と考えられる。その発生機序が不明である、タコツボ型心筋症の心筋分節化が心筋過収縮の結果かどうかを、tenascin-C 発現の有無で検討した。

研究方法（倫理面への配慮）

タコツボ心筋症剖検 4 例（全経過 2 日から 20 日）、対照として急性心筋梗塞右室穿破例 1 例の心筋組織標本に tenascin-C 免疫染色を施し、組織所見を検討した。

研究結果

心筋梗塞例では梗塞部、その周辺の間質に tenascin-C 発現をみた。タコツボ心筋症では障害

心筋付近に巣状、心内膜下間質に tenascin-C の沈着を見た。心筋融解周辺には軽度の発現を認めたが、分節化周囲の間質には有意な発現は見られなかった。

考察

心筋梗塞例では梗塞部、その周辺の間質に tenascin-C 発現をみた。タコツボ心筋症では障害心筋付近に巣状、心内膜下間質に tenascin-C の沈着を見た。心筋融解周辺には軽度の発現を認めたが、分節化周囲の間質には有意な発現は見られなかった。

結論

タコツボ型心筋症剖検心の心筋分節化周囲に tenascin-C の有意の発現を見ないことは、治癒機転の未発動を意味する可能性もしくは分節が死戦期に形成された可能性を示唆する。

タコツボ心筋障害（タコツボ心筋症）の診断の手引き案作成

河合 祥雄

順天堂大学医学部循環器内科

研究要旨

タコツボ心筋症（心筋障害）は我が国の高齢女性に頻発する病態であるが、多数例の検討が可能となる共有できる診断の手引きが求められる。手引きを作成するにあたり、実際に症例を経験した医師の意見を取り入れるべく、アンケート調査を行い、その結果に基づいて、診断の手引きを作成した。心室収縮部位は心尖部バルーン状拡張を基本とするが、心基部の動態については意見が分かれた。死亡例は多数例経験施設で存在し、本症は必ずしも予後良好な病態ではない。

研究目的

タコツボ心筋症の本態、発症機序、心尖部無収縮・心基部過収縮の理由、高齢女性頻発の理由、精神的ストレス関与の意味、発症契機としての情動ストレス、各種心電図変化の機序など様々な問題点がある。多数（典型）例の検討を可能にするために、症例を経験した医師の意見を取り入れた、共有できる診断の手引きを作成する。

研究方法（倫理面への配慮）

循環器学会地方会等で症例を報告した200数施設に、本症の和文名称、心室収縮異常の部位、心室流出路の機能性狭窄の評価の必要性、診断方法、除外項目、検査項目、予後、後遺症などを、アンケート調査した。

研究結果

心筋収縮異常は左心室が指定されたが、両心室収縮異常を指摘した施設も多く見られた。心尖部バルーン状拡張がほぼ共通の認識と考えられたが、心基部の収縮については、過収縮と正常収縮に見解が分か

れた。流出路狭窄は米国ほどの注目はされていない。心室造影を診断根拠とする施設が多いが、造影なしの心エコー図法を選択した施設では冠状動脈有意狭窄を除外項目としてあげており、心エコー図のみでの確定診断は困難と考えられた。

考察

本病態は一過性であり、多くが可逆的であるので、心筋障害と考えることが合理的であるが、歴史的には心筋症の名称を残しても妥当であろう。

結論

心室造影上心尖部バルーン状拡張を第1診断根拠とするが、造影なしの心エコー図法を選択した施設では冠状動脈有意狭窄を除外項目としてあげており、心エコー図のみでの確定診断は困難と考えられた。

健康危険情報

本病態は一過性であり、多くが可逆的である予後良好な疾患と理解されているが、多数経験施設において、死亡例、重篤後遺症例は少なからず存在した。

研究発表

論文発表

1. 河合祥雄 たこつぼ型心筋障害の臨床像とその背景 Medical Tribune Circulation Today, 2001年3月, 61
2. 河合祥雄 たこつぼ 心エコー 2(6):478-4789, 2001
3. 河合祥雄 “タコツボ”型心筋炎とはどういう疾患か—“タコツボ”型心筋障害炎症説の検討—心エコー 2(10):860-865, 2001
4. 河合祥雄, 韋 晴明, 五十嵐弘一, 小泉憲司, 坂井建雄 心房細動の病理 Therapeutic Research 23(1):61-72
5. 河合祥雄 激症心筋炎の病理 激症型心筋炎の臨床」和泉徹編集, 医学書院, 東京, 2002年4月, 21-29.

6. 河合祥雄 激症心筋炎における心不全 2002.5.25 高野照夫, 清野精彦編集「実地診療に即した心不全・診療マニュアル」医薬ジャーナル社, 大坂, 2002年5月, 120-127.

学会発表

1. 河合祥雄. タコツボ様心筋障害の現状 第24回心臓血管系の調節に関する研究会 平成13年2月16日,
2. S. Kawai, H. Suzuki, H. Daida AMPULLA-TYPE CARDIOMYOPATHY IN JAPAN. WHF/ISCP Joint International Symposium on Cardiomyopathy in the 21st Century. Kyoto, Japan, S. Sasayama, 28 March 2001 (Cardiovascular Drugs and Therapy 15 (Supple 1) : 39,2001.
3. S. Kawai, H. Suzuki, H. Daida Prevalence study of ampulla or amphora-type cardiomyopathy in Japan.--with critical analysis of Japanese case reports--.第65回日本循環器学会総会・学術集会 3月26日,
4. 河合祥雄 たこつぼ心筋障害の本態 第14回超音波血流研究会, 当番世話人竹中克, 座長澤田準, 6月2日, 河合祥雄病理学的検討 シンポジウム「タコツボ心筋症(心筋障害)を検証する」—核医学的検証を中心に—, 第7回日本心臓核医学学会・学術大会
5. 河合祥雄 たこつぼ型心筋障害 第50回日本心臓病学会学術集会, モーニング・セミナー 2002年9月11日

テネイン C を利用した心筋疾患の病態診断

廣江 道昭

国立国際医療センター腎臓循環器科

今中一吉田 恭子, 吉田 利通

三重大学医学部病理

矢崎 義雄

国立国際医療センター

研究背景

テネイン C は細胞外マトリックス蛋白の一つで、胎児期の形態形成、癌浸潤、創傷治癒、組織再生など組織構造の改築にともなって限られた場所に一過性に発現し、細胞遊走、細胞接着の制御など多彩な機能を持つ。心臓では、発生初期に心筋細胞分化、冠動脈前駆細胞の遊走に関連して一過性に発現し (Imanaka-Yoshida et al., Differentiation in press), 正常成体ではほとんど発現しないが、心筋梗塞、心筋炎や特発性心筋症の一部など種々の病的状態で再発現する。我々のグループは、ラット心筋梗塞モデルでは、発症基数時間から約 1 週間まで、梗塞巣と健常部の境界に局限して沈着し、細胞接着をゆるめ、MMP の発現、活性をあげるなど組織リモデリングを制御することが明らかにした (Imanaka-Yoshida et al. Lab. Invest 81,1015-24, 2001), さらに、ラット、マウスの自己免疫性及びウイルス性心筋炎モデルで、テネイン C が心筋炎活動期に発現、治癒期に消失し、その発現レベルは、組織障害・炎症の程度を反映することも明らかになった (Imanaka-Yoshida et al. J Pathol 197, 388-94, 2002).

これらの知見にもとづき、特に特異的な発現様式を利用すれば、人心筋疾患の活動性あるいは心室リモデリングの進行の新しい指標になりうると予想した。

研究目的

テネイン C を利用したヒト心筋疾患活動性の非侵襲的診断法の確立を目的として、1) 基礎データとしてヒト心筋炎患者でも組織の疾患活動性とテネイン C 発現レベルが相関することを確認し、2) 動物モデルによるテネイン C 抗体を用いた免

疫シンチグラフィによる画像診断法、3) ELISA によるヒト血中テネイン C 測定による病態診断の可能性を検討した。

研究方法 (倫理面への配慮)

ヒト心筋炎患者心筋組織におけるテネイン C 発現の検討

剖検心および、臨床的に急性心筋炎と診断された 36 例から得られた心筋生検組織計 109 片の連続切片を作成し、H・E 染色、抗 TNC 抗体による免疫染色を行った。1 切片ごとに、それぞれの切片について、免疫染色による TNC 発現の程度を、TNC 陽性面積率により grade0 (発現なし), grade1 (25%以下), grade2 (25~50%), grade3 (50~75%), grade4 (75%以上) の 5 段階にわけてスコア化し、それぞれの Dallas criteria に基づく組織診断と対比した。27 例については、2 回ないし 3 回、経時的に心筋生検を行い発現の経時的変化について検討した。対照として房室ブロックなどの不整脈のみを呈し、明らかな心病変を示さない 14 例 39 切片を用いた。

動物モデルによる免疫シンチグラフィの可能性

ブタ心筋ミオシンで Lewis ラットを感作して自己免疫性心筋炎モデルを作成し、インジウム 111 標識 抗 TNC モノクロナル抗体 Fab' fragment を静脈内投与し、生体内での動態、オートラジオグラフィ、テクネシウム 99m 標識 MIBI を用いた 2 核種 SPECT 像の撮影を行った。

ELISA による血中テネイン C 濃度の測定

急性心筋梗塞 20 例、陳旧性心筋梗塞 9 例、健常者 16 例を対象とし、末梢静脈血を入院時から第 8 病日まで経時的に採血し、血中テネイン C を抗テネイン C モノクロナル抗体を用いた ELISA 法によって測定し、CPK-MB 値と比較した。

倫理面への配慮

イメージングは三重大学医学部病理学教室で作製した抗体を、千葉大学でインジウム標識し画像撮影を行った。また、インフォームドコンセントに基づき了解を得られた心筋炎患者生検組織、剖検組織の免疫組織染色、心筋梗塞患者の血清中のテネイシンC濃度測定を三重大学で行った。動物実験、および臨床材料を用いた研究は、それぞれ各施設の動物実験委員会および倫理委員会および承認されたプロコールに従って行った。

研究結果

ヒト心筋炎組織における活動性とテネイシンC発現レベルとの相関

心筋炎剖検新組織では、炎症細胞浸潤、細胞壊死の見られる部位の間質にテネイシンCの強い免疫染色が見られ、その沈着領域は、組織学的炎症所見がみられる領域よりやや広がった。心筋炎患者から得られた初回生検組織を、Dallas criteria にそって active myocarditis (AM), borderline myocarditis (BM), no myocarditis (NM) に分類し、それぞれの群のテネイシンCの発現平均スコアは、 3.3 ± 0.8 , 2.1 ± 0.8 , 0.9 ± 1.0 , コントロール 0.4 ± 0.5 と、AM, BM, NM 間ではそれぞれ有意差が認められた。心筋炎切片では発現平均スコアは有意に高かった。また、経時的に生検を行ったもので TNC 発現は、時間経過とともに漸減し、心症状発現 40 日以降では grade 1 以下となった。

ラット心筋炎モデルの免疫シンチグラフィによる画像診断

インジウム標識テネイシンC抗体静注後の血中放射活性は急速に低下し、心筋炎ラットではコントロールに比べ心臓に有意に高い取り込みが見られた。オートラジオグラフィでは、炎症の強い部位に高い取り込みが確認され、2核種 SPECT 像で、MIBI で血流低下が見られる部位、すなわち炎症の激しい部位に一致して抗テネイシンC抗体の集積が描出された。

心筋梗塞患者の血中テネイシンC濃度

血清中のテネイシンC濃度は、健常者 ($49.1 \pm 12.8 \text{ ng/ml}$)、陈旧性心筋梗塞症 ($33.8 \pm 18.2 \text{ ng/ml}$) に比較して、急性心筋梗塞症の入院時では $128.6 \pm 62.1 \text{ ng/ml}$ で有意に高値を呈した ($p < 0.01$)。経時的に観察すると、CPK-MB 値は入院 12 時間後に最大値を呈し、第 3 日には正常値に復するのに比べ、血中テネイシンCは第 5 病日に最大値 $196.0 \pm 81 \text{ ng/ml}$ まで有意に上昇し、第 8 病日でも

高値を呈した。また、血中テネイシンC濃度の最大値が 100 ng/ml 以上のものと未満のもの2群に分けると、テネイシンC濃度が高かったも群のほうが、6ヶ月後の左室拡張終期径が有意に大きく、左室駆出率の改善が有意に悪かった。

考察

ヒト心筋炎組織でのテネイシンの発現を検討したところ、実験動物で見られたのと同様、ヒト心筋炎でも活動期にテネイシンCの発現が見られることを確認した。現在、ヒト心筋炎の確定診断は、Dallas criteria にもとづいて HE 染色した生検標本の組織診断で行われ、炎症の程度により、active myocarditis, borderline myocarditis, no myocarditis の3段階に分けられる。しかし、現実には borderline myocarditis, no myocarditis の診断は非常に困難で、診断者の主観に基づくといっても過言ではない。また、一般に、心筋炎の病変はびまん性にみられるとされるが、実際には、病変が局所的に限局することが多く、小さい生検組織切片では複数片、採取しても、サンプリングエラーによる偽陰性の可能性を常に考慮しなければならない。最初、我々は、マウス心筋炎モデルで、組織学的炎症所見が明らかになる前にテネイシンの沈着が明らかに認められること [Imanaka-Yoshida et al. J Pathol 197, 388-94, 2002]、また、今回明らかにしたように、ヒト剖検例の心筋の大きな組織切片で検討すると、組織学的炎症所見の分布よりテネイシンCの分布がやや広いことから、抗テネイシンC抗体による免疫染色を併用することにより、診断感度をあげられるのではないかと予想した。今回検討した生検組織は、いずれも、臨床的には明らかな心筋炎と診断された患者由来のもので、borderline myocarditis, no myocarditis と診断された組織片は偽陰性の可能性が非常に高い。予想に反して、各切片でのテネイシンの発現レベルは、組織診断をそのまま反映し、抗体染色を用いても、ほとんどの場合、診断率を上げることはできないと思われた。しかしながら、組織診断は no myocarditis であるにも関わらず強いテネイシンCの染色がみられたものが 36 例中 1 例だけあり、基本的には炎症の程度を反映するが、まれに診断率をあげるのに有効な例があると思われる。

次にサンプリングエラーを解決し、より非侵襲的な方法として、抗テネイシンC抗体を用いた免疫シンチグラフィによる画像診断を試みたところ、極期の心筋炎病巣を明瞭に描出することができ、将

来、炎症を描出する新しい診断法として臨床応用可能と思われる。今後、抗ミオシン抗体を用いた免疫シンチグラフィーとなど他の診断法との特性や有効性の差について検討する必要がある。

さらに、ヒト血清中のテネイシンCの測定すると、急性心筋梗塞急性期で明らかな上昇をみとめることができ、外来でもできる最も簡便な診断法として、実用可能と考えられた。血中のテネイシンCの変動は心筋細胞逸脱酵素の経時変化と異り、有意に遷延する。我々のこれまでの研究により、テネイシンCの発現は心筋細胞障害そのものではなく、それに対する周囲間質の活発な反応、すなわち組織リモデリングを反映することは明らかである。また、

我々の今回の検討では、血中テネイシンC値が、梗塞後の心室拡張の程度を規定する因子の一つであるという結果が示され、テネイシンCは梗塞後の心臓リモデリング進展の新しい指標になる可能性が強く示唆される。今後、各症例ごとの、テネイシンC値の推移と臨床経過との詳細な対比により、臨床診断上の意義が明らかになることが期待される。

結論

抗テネイシンCを利用したイムノシンチグラフィー、ELISAによる血中濃度測定は、ヒト心筋疾患活動性の診断、心室リモデリング評価法として有効であり実用化可能と思われる。

研究発表

論文発表

1. Imanaka-Yoshida, K., Hiroe, M., Yasutomi, Y., Toyozaki, T., Tsuchiya, T., Noda, N., Maki, S., Nishikawa, T., Sakakura, T., and Yoshida, T. Tenascin-C is a useful marker for disease activity in myocarditis. J. Pathol. 2002 ; 197 : 387-94.
2. Sato, M., Toyozaki, T., Odaka, K., Uehara, T., Arano, Y., Hasegawa, H., Yoshida, K., Imanaka-Yoshida, K., Yoshida, T., Hiroe, M., Tadokoro, H., Irie, T., Tanada, S., and Komuro, I. Detection of experimental autoimmune myocarditis in rats by ¹¹¹In monoclonal antibody specific for tenascin-C. Circulation 2002 ; 106 : 1397-402
3. Imanaka-Yoshida K, Matsumoto K, Hara M, Sakakura, T., and Yoshida, T. The dynamic expression of tenascin-C and tenascin-X during early heart development. Differentiation (in press)

学会発表

1. American Heart Association, Scientific sessions, November 17-20, 2002, Chicago, IL
Detection of experimental autoimmune myocarditis in rats by ¹¹¹Indium-labeled monoclonal antibody for tenascin-C.
Odaka, K., Toyozaki, T., Uehara, U., Arano, A., Yoshida, K., Sato, M., Hasegawa, H., Imanaka-Yoshida, K., Yoshida, T., Hiroe, M., Tadokoro, H., Irie, T., Tanada, S., Issei Komuro
2. 第67回 日本循環器学会総会 2003年3月28-30日, 福岡
Serum tenascin-C levels are a novel marker of left ventricular remodeling in patients with acute myocardial infarction.
Sato, A., Yamauchi, Y., Yokoyama, Y., Sekiguchi, Y., Kumagai, K., Suzuki, A., Inada, M., Korenaga, M., Aonuma, K., Hiroe, M., Imanaka-Yoshida, K., Isobe, M

知的財産権の出願・登録状況（予定含む）

1. 特許申請中〔標識抗テネイシンモノクロナル抗体〕