

Table 3. IVIg後の治療と予後

患者 番号	IVIg後の初期治療			IVIg治療3ヵ月後の治療			IVIg治療6ヵ月後の治療		
	mPSL パルス療法	PSL 投与量 (mg/日)	CYC 投与量 (mg/日)	PSL 投与量 (mg/日)	CYC 投与量 (mg/日)	透析	PSL 投与量 (mg/日)	CYC 投与量 (mg/日)	透析
1	(-)	20	50	20	0	(-)	20	0	(-)
2	(-)	40	25	20	25	(-)	18	0	(-)
3	(-)	30	0	30	0	(-)	20	0	(-)
4	1g, 3days	50	50	30	0	(-)	18	0	(-)
5	(-)	50	50	25	50	(-)	10	25	(-)
6	(-)	25	0	40	0	HD	10	0	*
7	(-)	50	50	25	50	(-)	18	0	(-)
8	(-)	25	0	25	0	(-)	15	0	(-)
9	1g, 3days	40	50	15	0	(-)	8	0	(-)
10	(-)	20	50	10	0	(-)	10	0	(-)
11	(-)	30	0	25	0	(-)	10	0	(-)
12	1g, 3days	45	50	13	100	(-)	30	0	(-)
13	(-)	50	50	25	50	(-)	10	50	(-)
14	(-)	0	0	20	0	HD	10	0	HD
15	0.5g, 3days	30	0	25	0	(-)	13	0	(-)
平均		33.7±3.8	# 47.2±2.8	23.2±1.9	# 30.6±11.6		14.5±1.5	# 8.3±5.9	

mPSL pulse, methylprednisolone pulse therapy; PSL, prednisolone; CYC, cyclophosphamide; PE, plasmapheresis; HD, hemodialysis; *, 透析離脱; #, 初期治療としてCYCを投与した9例における平均1日投与量.

関節リウマチ患者に対する白血球除去療法の治療効果

分担研究者 橋本博史 順天堂大学 医学部 膠原病・リウマチ内科 教授

研究要旨 関節リウマチの治療の一つに血漿交換療法があり、その治療法の一つである白血球除去療法は疾患の炎症反応に関与する白血球を除去する治療法である。この治療法をメトトレキサートによる治療が副作用や合併症等で困難、あるいは効果を得にくい関節リウマチ患者に対し施行し治療効果を ACR コアセットにて検討した。治療後4週目のACRコアセット20%改善は66.7%に、ACRコアセット50%改善は22.2%の患者に認められ、関節リウマチ患者に対する白血球除去療法の有効性が示唆された。

A. 研究目的

関節リウマチの治療の一つに血漿交換療法が位置し、その中の従来からの治療法である二重膜濾過法や吸着療法は液性免疫能を対象とする方法である。一方で細胞性免疫能の中の白血球は、関節リウマチにおいて重要な役割を占めることが知られている。今回我々が注目した白血球除去療法は、この白血球を血液から除去する方法である。この治療法は潰瘍性大腸炎に対して保険適応があり、安全性も確立されている治療法であるが、関節リウマチ患者に対しても有効であることが報告されてきた。今回、この白血球除去療法をメトトレキサートによる治療が副作用や合併症等で困難、あるいは効果を得にくい関節リウマチ患者に対し施行し、ACR コアセット20%、50%の改善の有無、治療効果の発現時期と持続性の観察、治療1年後の関節破壊の有無に関して評価をした。

B. 研究方法

アメリカリウマチ学会の診断基準を満たし、メトトレキサートによる治療が困難なリウマチ患者9人(男性2例、女性8例、年齢31-64才;平均51.9才)を対象とした。治療の方法として白血球除去療法を週1回の間隔で白血球除去療法を計5回施行(治療期間5週間)。白血球除去フィルター

はセルソーバ(旭メディカル社製)を使用。治療中の抗凝固剤はメシル酸ナファモスタットを40ml/時にて使用。1回の血液処理量は全血3000Lを約1時間で処理。治療効果の判定はACRコアセット20%・50%改善を用い評価。判定は各5回の治療前の他に、治療後1、2、4週に評価。治療前から治療終了後4週間の間でACRコアセット20%改善を満たすものを効果のある有効群とした。その後、治療後8、12、24、48週の時点でも評価し、治療効果の持続性を検討。合計の観察期間は治療期間5週間と観察期間48週間を合わせ、約1年間の53週間。各評価時に、CRP、赤沈(ESR)、リウマチ因子(RF)、IL-6、MMP-3を検査。治療開始前と治療後48週に手関節X線を撮影し、Sharp法(van der Heijdeの変法)を用いて骨破壊の有無に関して評価。また、本研究開始1ヶ月前からこの研究期間中の内服治療等の変更は原則として行わないこととした。

(倫理面への配慮)

当大学の倫理委員会で臨床研究の承諾を受けた後、患者に対し治療前に具体的な治療方法、除去膜の作用機序、起こりうる副作用に関して説明を行い、承諾を得た上で治療を行った。また、治療中に患者本人の意思で治療の継続を望まない場合には、

患者の希望に従うこととした。治療中や観察期間中に症状の変化のため、他の治療が必要となった場合には、研究からの離脱を許可することとした。

C. 研究結果

治療開始後、治療3回前から、ACR コアセット 20% の改善を認める症例が確認され、治療後4週目の時点では ACR コアセット 20% 改善を認めた症例は9人中6人で66.7%、ACR コアセット 50%改善は9人中2人で22.2%であった。この時点で ACR コアセット 20%改善を認めた6人は有効群としてその後の観察を継続。効果を認めなかった3例に関しては、効果無効群とした。この3例は治療後4週直後に関節症状の悪化が2人、骨折を1人認め、内服等の治療内容の変更を必要としたため研究より除外した。治療効果有効群の6人に関しては、治療後8、12、24、48週の時点で評価したところ、ACR コアセット 20%は治療後8週と12週の時点で効果は6人中6人(100%)に効果を認めたが、24週目；1人(16.7%)48週目；2人(33.3%)と低下した。ACR コアセット 50%は治療後8週で4人(66.7%)に効果を認めたが、治療後12週は2人(33.3%)、その後は効果の持続性は認められなかった。

CRP に関しては、有効群で治療前と治療後8週で有意に変化し ($p < 0.05$)、無効群では変化を認めなかった。IL-6 も同様に有効群で治療前と治療後8週で有意に変化し ($p < 0.05$)、無効群では変化を認めなかった。血沈に関しては観察期間中、有意な変化は認めず。RF は治療前と治療後8、48週で、MMP-3 は治療前と治療5週、治療後48週でそれぞれ有意の改善 ($p < 0.05$) を認めた。

有効群の6例に対する手関節X線の Sharp 法 (van der Heijde の変法) による評価は、治療開始前の Sharp score 132.6 ± 41.5 、約1年後は 133.8 ± 42.2 で有意な変化を認めず、骨破壊の進行が無いことが示唆された。また、治療期間を含む

全観察期間では、副作用は認められなかった。

D. 考察

治療の対象となった患者はメトトレキサートによる治療が肝障害、脱毛等の副作用や間質性肺炎による合併症等で使用や増量が困難、あるいは効果を得にくい関節リウマチ患者であった。これら9人の患者に対する5回の白血球除去療法の治療効果は、治療後4週目の時点で ACR コアセット 20%の改善は66.7%、ACR コアセット 50%の改善は22.2%と効果があることが示唆された。20%の改善を認める効果有効群の6人の治療効果の持続性は治療後12週までは効果は100%続いたが、その後は低下。治療効果はある程度持続することが観察された。有効群では疼痛関節や腫脹関節の改善の他、CRP、IL-6、MMP-3、RF、も改善することが認められた。

E. 結論

関節リウマチの治療において薬物治療は重要であるが、副作用や合併症のため薬の試用が困難な場合がある。今回、この様にメトトレキサートによる治療が困難、あるいは効果を得にくい関節リウマチに対して白血球除去療法を行い、治療後4週目の ACR コアセット 20%の改善66.7%、ACR コアセット 50%の改善22.2%と効果を認め、治療効果の持続性と治療の安全性も認められた。この様に、薬物による治療が困難な症例に対し、白血球除去療法が治療の1つとして施行ことが期待される。今後は、治療の回数や血液処理量等の検討を含め、研究が必要と思われる。

F. 健康危険情報

一般的に、白血球除去療法での副作用としては、体外循環に基づく一過性の低血圧、発熱、気分不快、体外循環回路内の凝固を防ぐ抗凝固剤(メシル酸ナファモスタット)によるアレルギー症状などがあるが、今回の研究においては、治療中と治

療後に副作用は認められなかった。

G. 研究発表

1. Tokano Y, Ogasawara H, Ando S, Fujii T, Kaneko H, Tamura N, Yano T, Hirokawa K, Fukazawa T, Murashima A, Kobayashi S, Sekigawa I, Takasaki Y, Iida N, Hashimoto H. Cyclosporin A therapy for interstitial pneumonitis associated with rheumatic disease. *Mod Rheumatol*. 12:305-310, 2003.

2. Bando H, Tamura N, Kobayashi S, Ohyanagi M, Ichimura Y, Tajima M, Haruta K, Hashimoto H. Endothelial cell-binding antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Mod Rheumatol*. 13:44-49, 2003

3. Ikeda K, Takasaki Y, Hirokawa K, Takeuchi K, Hashimoto H. Clinical significance of antibodies to TS1-RNA in patients with mixed connective tissue disease. *J Rheum* 30: 998-1005, 2003

4. Kobayashi S, Yano T, Matsumoto Y, Numano F, Nakajima N, Yasuda K, Yutani C, Nakayama T, Tamakoshi A, Kawamura T, Ohno Y, Inaba Y, Hashimoto H. Clinical and epidemiologic analysis of giant cell (temporal) arteritis from a nationwide survey in 1998 in Japan: The first government-supported nationwide survey. *Arthritis Rheum* 49: 594-598, 2003

5. Tsuchiya N, Kobayashi S, Kawasaki A, Kyogoku C, Arimura Y, Yoshida M, Tokunaga K, Hashimoto H. Genetic background of Japanese patients with antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis: association of HLA-DRB1*0901 with microscopic polyangiitis. *J Rheum* 30: 1534-1539, 2003

6. Takaya M, Tamura N, Kato K, Kobayashi S, Haruta

K, Tajima M, Hara M, Yang K, Tsuda H, Hashimoto H. CD154 expression and mRNA stability of activated CD4-positive T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Mod Rheumatol* 13: 220-226, 2003

7. Kobayashi S, Yano T, Inaba Y, Hashimoto H, Matsumoto Y, Tamakoshi A, Kawamura T, Ohno Y. Ocular involvements of Japanese patients with giant cell arteritis from the first nation-wide survey. (letter) 2003.

8. Bando H, Kobayashi S, Matsumoto T, Tamura N, Yamanaka K, Yamaji C, Takasaki C, Takasaki Y, Hashimoto H. Acute acalculous cholecystitis induced by mesenteric inflammatory veno-occlusive disease (MIVOD) in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 22: 447-449, 2003

9. Kobayashi S, Ishizuka S, Tamura N, Takaya M, Kaneda K, Hashimoto H. Churg-Stauss syndrome (CSS) in a patient receiving pranlukast. *Clin Rheumatol* 22: 491-492, 2003

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

心筋炎の治療法に関する研究

分担研究者 相澤義房 新潟大学大学院医歯学総合研究科 教授

研究要旨

劇症型心筋炎と産褥心筋症（慢性心筋炎）の2症例に対して、既存のあらゆる治療法を用いても病態の改善が得られないため、大量免疫グロブリン療法を行った。その結果、2例とも病態の改善をみとめ、大量免疫グロブリン療法が有用と考えられた。動物モデルを用いて、様々なサイトカインや免疫関連遺伝子(IL-10、IL-13-IgG、CTLA4-IgG、IL-1受容体アンタゴニスト-IgG、SLPI-IgG)による心筋炎抑制効果を検討した。その結果、IL-10、IL-13-IgG、CTLA4-IgG、IL-1受容体アンタゴニスト-IgG、SLPI-IgG治療は効果があることが示された。また、同じ動物モデルを用いて、心筋炎後拡張型心筋症の予防効果を検討した。ACE阻害薬、アンジオテンシン受容体拮抗薬はいずれも、心室の拡大を抑制し、左室収縮性を保持させ、血行動態を改善し、心房性利尿ペプチドとコラーゲンのmRNA発現を抑制した。さらに、III群抗不整脈薬であるamiodaroneにもACE阻害薬と同程度のリモデリング抑制効果があることが示された。心筋炎の治療法は基礎的検討が進んでいるが、現在、臨床に用いる治療法は大量免疫グロブリン療法だけである。臨床使用可能な治療法の開発が切望される。

A. 研究目的

心筋炎はウイルス感染あるいはアレルギー/自己免疫による心筋壊死を伴う心筋内の炎症病変であり、様々な程度の心機能障害および不整脈を併発する。あらゆる年代に発症し若年者にも多い。重症例は劇症型心筋炎と呼ばれ死に至る。心筋傷害が広範な場合と、心筋炎が遷延する場合には、治癒後に心筋炎後拡張型心筋症と呼ばれる慢性心不全状態に進展する。心筋炎に対する特異的な治療法は乏しく、心不全管理、不整脈管理を中心とした対症療法が行われている。臨床病型によりステロイド治療や大量免疫グロブリン療法が試みられているが適応と効果については評価が定まっていない。そこで、心筋炎に対する治療法ならびに心筋炎後拡張型心筋症の予防法を臨床的ならびに基礎的に検討する。

B. 研究方法

臨床研究：当科で経験した劇症型心筋炎、産褥心筋症（慢性心筋炎）の2症例に対して、既存のあらゆる治療法にても改善が得られなかったため、大量免疫グロブリン療法を行った。その後の臨床経過と大量免疫グロブリン療法の有用性を検討した。

基礎研究：心筋炎の発症を抑制するため、ラット実験的自己免疫性心筋炎（EAM）に対して、様々なサイトカインや免疫関連遺伝子(IL-10、IL-13-IgG、CTLA4-IgG、IL-1受容体アンタゴニスト-IgG、SLPI-IgG)を組み込んだプラスミドを作成し、in vivoでエレクトロポレーションを併用した筋肉注射あるいは急速大量静注法（hydrodynamics法）をもちいて遺伝子治療を行い、その効果を病理組織学的あるいは血行力学的に評価した。

さらに、心筋炎後拡張型心筋症を予防するため、

実験的自己免疫性心筋炎を用いて、ACE 阻害薬 (quinapril, imidapril, benazepril)、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (valsartan, candesartan, TA606)、アミオダロンの効果を検討した。EAM の治癒期と考えられる抗原感作 28 日後から第 70 日まで治療薬を投与し、第 73 日に血行動態、病理所見、各種 mRNA 発現を評価した。

C. 研究結果

臨床研究：53 歳の男性が高熱を発し、数日後に心原性ショックとなり、当院に搬送された。カテコラミン多剤大量投与、体外式ペースメーカー、大動脈内バルーンパンピングによる治療に反応せず（心係数 1.1 L/min/m^2 ）、経皮的心肺補助装置（PCPS）を装着した（図 1）。

心臓の有効収縮と心拍出は完全に消失し、早期自然治癒の展望が得られないため大量免疫グロブリン療法を行った。ヒト免疫グロブリン製剤 25 g/日を 2 日間静注した（IVIG）。IVIG の 2 日後から有効な心拍出が得られ、7 日間で PCPS から離脱できた（図 2）。

ペーシングに加え、カテコラミンを投与するも著明な心機能低下のため大量グロブリン投与を行った。心拍出量の低下も著明で、肺には大動脈血が逆流していた。

35 歳の女性が分娩後にうっ血性心不全を発症し入院した。左室壁運動はびまん性に低下していた（図—3）。

入院時の壁運動はほぼ消失している。治療により第 7 病日には、壁運動が改善した。心内膜心筋生検により炎症性細胞浸潤と心筋壊死、線維化をみとめ慢性心筋炎と診断された（図 4）。

カテコラミン持続静注、血管拡張薬、 β 遮断薬微量投与などでも混合静脈血酸素飽和度 40% 未満の低拍出状態が持続し、多臓器不全への進行が予想されたため、メチルプレドニゾロン短期大量療法（500 mg/日を 3 日間）と大量免疫グロブリン

療法（ヒト免疫グロブリン製剤 25 g/日を 2 日間静注）を行った。その後、低拍出状態から離脱でき、家庭生活に復帰できた。

基礎研究：EAM に対する遺伝子治療によって、IL-10、IL-13-IgG、CTLA4-IgG、IL-1 受容体アンタゴニスト-IgG、SLPI-IgG 治療は効果があることが示された。特に、IL-13-IgG、CTLA4-IgG の hydrodynamics 法による治療では、組織学的にも心筋炎がほとんどみられないこともあり、有効な治療になりうる可能性が示唆された。

ACE 阻害薬、アンジオテンシン受容体拮抗薬はいずれも、心室の拡大を抑制し、左室収縮性を保持させ、血行動態を改善し、心房性利尿ペプチドとコラーゲンの mRNA 発現を抑制した。その結果、心筋線維化も抑制した。レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系を強力に抑制することが心筋炎後の心室リモデリング予防に有効であることが示された。ACE 阻害薬とアンジオテンシン受容体拮抗薬の比較では、同程度の血圧降下作用を呈する薬用量では、ACE 阻害薬の方がリモデリング抑制効果が強かった。さらに、III 群抗不整脈薬である amiodarone にも ACE 阻害薬と同程度のリモデリング抑制効果があることが示された。

D. 考察

近年、劇症型心筋炎に対する大量免疫グロブリン療法（2.0 g/kg）の有効性が注目されている。大量免疫グロブリン療法には抗原非特異的な免疫抑制作用、抗炎症作用があり、既に特発性血小板減少性紫斑病や川崎病に対して用いられている。抗原提示細胞やマクロファージは Fc 受容体を有しており、Fc 受容体にはいくつかのサブタイプがある。抑制性 Fc 受容体（Fc γ R II B）にリガンドが結合すると抗原提示細胞やマクロファージの活性化が抑制される。大量免疫グロブリン療法によって投与された免疫グロブリンの Fc 部分がマクロファージの抑制性 Fc 受容体と結合し、それ以

降の過剰な抗原提示やサイトカイン分泌などの炎症反応を抑制するものと考えられている。したがって Fab 分画製剤ではこの作用を期待できない。もちろん、ウイルス性心筋炎では、投与された免疫グロブリンのウイルス中和抗体が高ければウイルスの排除にも役立つことになる。この治療はウイルス性心筋炎と自己免疫/アレルギー性心筋炎の両者に用いる。臨床的に大量免疫グロブリン療法が適応となる病態は、劇症型心筋炎、慢性心筋炎、巨細胞性心筋炎であると考えられる。しかし、医療保険制度上の問題が解決されていないため、現状では重症例に限って用いられている。

E. 結論

現在、大量免疫グロブリン療法は心筋炎に対する唯一の治療法であり、ウイルス性心筋炎とアレルギー/自己免疫性心筋炎の両者に適用できることから安全性が高い。一方、経済的問題、そのための医療保険上の問題、需要が増大したときの供給問題などを抱えており、人口ポリクローナルグロブリン製剤の開発が切望される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Satoru Abe, Yuji Okura, Makoto Hoyano, Ryu Kazama, Satoru Watanabe, Takuya Ozawa, Takashi Saigawa, Manabu Hayashi, Tsuyoshi Yoshida, Hitoshi Tachikawa, Ken Kashimura, Keisuke Suzuki, Masayuki Nagahashi, Junzo Watanabe, Kouji Shimada, Go Hasegawa, Kiminori Kato, Haruo Hanawa, Makoto Kodama, Yoshifusa Aizawa. Plasma Levels of Cytokines and Neurohumoral Factors in a Case of Fulminant Myocarditis Successfully Treated with

Intravenous Immunoglobulin and Percutaneous Cardiopulmonary Support. *Circulation Journal* (in press)

2. Koichi Fuse, Makoto Kodama, Yuji Okura, Masahiro Ito, Kiminori Kato, Haruo Hanawa, Yoshifusa Aizawa. Short-term Prognostic Value of Initial Serum Levels of Interleukin-10 in Patients with Acute Myocarditis. *European Journal of Heart Failure* (in press).
3. Takeshi Kashimura, Takao Yanagawa, Makoto Kodama, Ritsuo Watanabe, Yuji Okura, Kiminori Kato, Haruo Hanawa, Yoshifusa Aizawa. Successful induction of β -blocker therapy for a patient with peripartum cardiomyopathy complicated with significant aortic stenosis. *Acta Medica et Biologica* (in press).
4. Fuse K, M Kodama, M Ito, Y Okura, K Kato, H Hanawa, S Aoki, Y Aizawa. Polarity of helper T cell subsets represents disease nature and clinical course of experimental autoimmune myocarditis in rats. *Clin Exp Immunol* 134: 403-408, 2003.
5. Kenichi Watanabe, Yuki Saito, Meilei Ma, Mir Wahed, Yuichi Abe, Kenichi Hirabayashi, Gurusamy Narasimman, Juan Wen, Palaniyandi Suresh, Fadia Ali, Ken Shirai, Mayako Soga, Yusuke Nagai, Mikio Nakazawa, Go Hasegawa, Makoto Naito, Hitoshi Tachikawa, Makoto Kodama, Yoshifusa Aizawa, Kenichi Yamaguchi, Toshihiro Takahashi. Comparative effects of perindopril with enalapril in rats with dilated cardiomyopathy. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 42 (Supple 1): S105-S109, 2003.
6. Takeshi Kashimura, Manabu Hayashi, Makoto Kodama, Mikio Nakazawa, Satoru Abe, Tsuyoshi Yoshida, Hitoshi Tachikawa, Haruo Hanawa, Kiminori Kato, Kenichi Watanabe, Yoshifusa Aizawa. Effects of Imidapril and TA-606 on Rat

- Dilated Cardiomyopathy after Myocarditis. *Japanese Heart Journal* 44: 735-744, 2003.
7. Juan Wen, Mikio Nakazawa, Kenichi Watanabe, Meilei Ma, Mir I I Wahed, Go Hasegawa, Makoto Naito, Tadashi Yamamoto, Koichi Fuse, Kiminori Kato, Makoto Kodama, Yoshifusa Aizawa. Quinapril inhibits progression of heart failure and fibroses in rats with dilated cardiomyopathy after myocarditis. *Molecular and Cellular Biochemistry* 251: 77-82, 2003.
 8. Kenichi Watanabe, Makoto Kodama, Yoshifusa Aizawa. Immune-mediated myocarditis and interleukin-10. *Inflammation and Cardiac Diseases*, Edited by Giora Z Feuerstein, Peter Libby and Douglas L Mann, Birkhaeuser Verlag, pp189-202, 2003.
 9. Kazama R, Okura Y, Hoyano M, Toba K, Ochiai Y, Ishihara N, Kuroha T, Yoshida T, Namura O, Sogawa M, Nakamura Y, Yoshimura N, Nishikura K, Kato K, Hanawa H, Tamura Y, Morimoto S, Kodama M, Aizawa Y. Therapeutic role of pericardiocentesis for acute necrotizing eosinophilic myocarditis with cardiac tamponade. *Mayo Clinic Proceedings* 78: 901-7, 2003.
 10. Seitaro Maruyama, Kiminori Kato, Makoto Kodama, Yuji Okura, Satoru Hirono, Koichi Fuse, Haruo Hanawa, Osamu Nakagawa, Mikio Nakazawa, Takashi Miida, Eishin Taoita, Tadashi Yamamoto, Ikuo Inoue, Yoshifusa Aizawa. FR167653 suppresses the progression of experimental autoimmune myocarditis. *Molecular and Cellular Biochemistry* 246: 39-44, 2003.
 11. Yuji Okura, William G Dec, Joshua M Hare, Makoto Kodama, Gerald R Berry, Henry D Tazelaar, Kent R Bailey, Leslie T Cooper. A clinical and histopathologic comparison of cardiac sarcoidosis and idiopathic giant cell myocarditis. *Journal of the American College of Cardiology* 41: 322-329, 2003.
 12. Hitoshi Tachikawa, Makoto Kodama, Liu Hui, Tsuyoshi Yoshida, Manabu Hayashi, Satoru Abe, Takeshi Kashimura, Kiminori Kato, Haruo Hanawa, Kenichi Watanabe, Mikio Nakazawa, Yoshifusa Aizawa. Angiotensin II type 1 receptor blocker, valsartan, preventrd cardiac fibrosis in rat cardiomyopathy after autoimmune myocarditis. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 41 (Supplement 1): S105-S110, 2003.
 13. Kenichi Watanabe, Wen Juan, Gurusamy Narasimman, Meilei Ma, Mikio Inoue, Yuki Saito, Mir II Wahed, Mikio Nakazawa, Go Hasegawa, Makoto Naito, Hitoshi Tachikawa, Naohito Tanabe, Makoto Kodama, Yoshifusa Aizawa, Tadashi Yamamoto, Kenichi Yamaguchi, Toshihiro Takahashi. Comparative effects of angiotensin II receptor blockade (candesartan) with angiotensin-converting enzyme inhibitor (quinapril) in rats with dilated cardiomyopathy. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 41 (Suppl 1): S93-S97, 2003.
 14. Kenichi Watanabe, Wen Juan, Gurusamy Narasimman, Meilei Ma, Mikio Inoue, Yuki Saito, Mir II Wahed, Mikio Nakazawa, Go Hasegawa, Makoto Naito, Hitoshi Tachikawa, Naohito Tanabe, Makoto Kodama, Yoshifusa Aizawa, Tadashi Yamamoto, Kenichi Yamaguchi, Toshihiro Takahashi. Betaxolol improves the survival rate and changes natriuretic peptide expression in rats with heart failure. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 41 (Suppl 1): S99-S103, 2003.
2. 学会発表

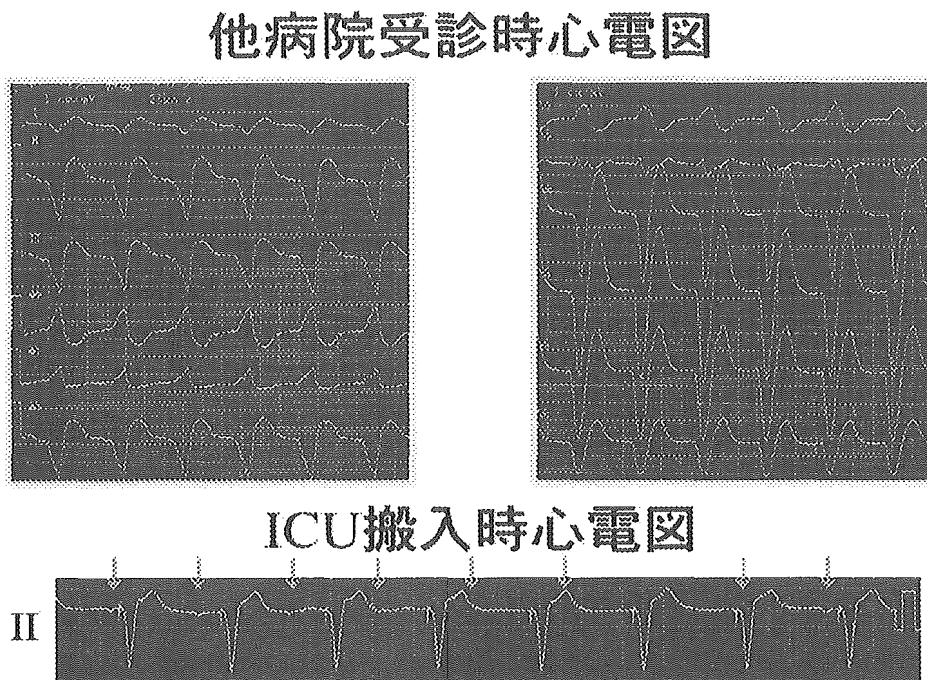
1. Takeshi Kashimura, Makoto Kodama, Satoru Abe, Manabu Hayashi, Tsuyoshi Yoshida, Hitoshi Tachikawa, Yuji Okura, Kiminori Kato, Haruo Hanawa, Yoshifusa Aizawa. Localization of coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) in rat heart. 第 67 回 日本循環器学会総会学術集会
2. Takeshi Kashimura, Makoto Kodama, Satoru Abe, Manabu Hayashi, Tsuyoshi Yoshida, Hitoshi Tachikawa, Yuji Okura, Kiminori Kato, Haruo Hanawa, Yoshifusa Aizawa. In vitro cytotoxic activity of heart infiltrating cells in experimental autoimmune myocarditis. 第 67 回 日本循環器学会総会学術集会
3. Hitoshi Tachikawa, Makoto Kodama, Kenichi Watanabe, Toshihiro Takahashi, Manabu Hayashi, Tsuyoshi Yoshida, Kiminori Kato, Haruo Hanawa, Yoshifusa Aizawa. Amiodarone preserves cardiac sympathetic function, as well as prevents left ventricular remodeling and improves cardioac function in heart failure after EAM. 第 67 回 日本循環器学会総会学術集会
4. Hitoshi Tachikawa, Makoto Kodama, Kenichi Watanabe, Toshihiro Takahashi, Tsuyoshi Yoshida, Manabu Hayashi, Takashi Kashimura, Kiminori Kato, Haruo Hanawa, Yoshifusa Aizawa. Intramitochondrial fatty acid metabolism is accelerating in heart failure after myocarditis in rat. 第 67 回 日本循環器学会総会学術集会
5. Tsuyoshi Yoshida, Haruo Hanawa, Ken Toba, Kaori Yoshida, Hiroshi Watanabe, Manabu Hayashi, Yukio Hosaka, Satoru Abe, Hitoshi Tachikawa, Takeshi Kashimura, Yuji Okura, Kiminori Kato, Makoto Kodama, Yoshifusa Aizawa. Characteristics of Cardiomyocytes, Infiltrating Cell and Non-Myocyte in Experimental Auto immune Myocarditis. 第 67 回

日本循環器学会総会学術集会

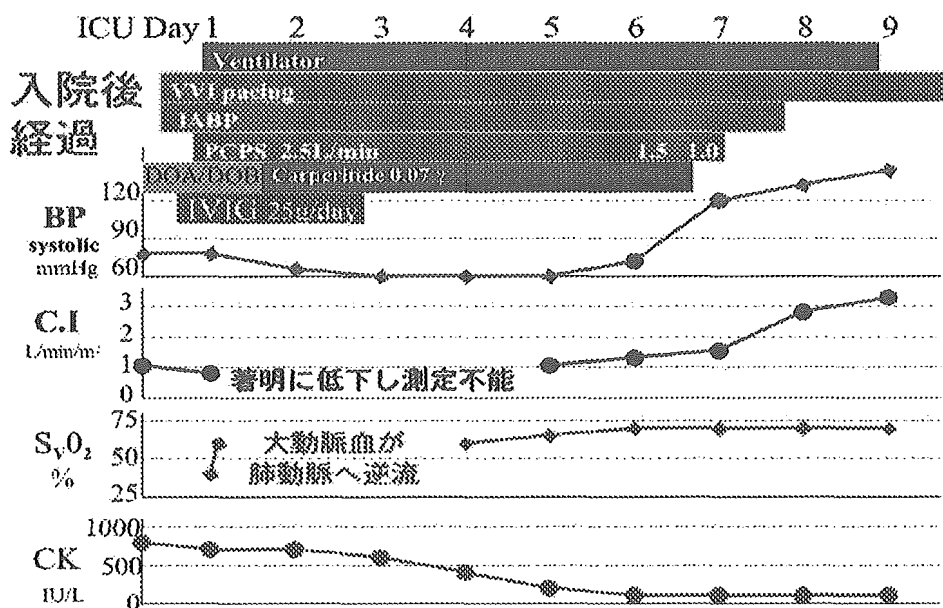
H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

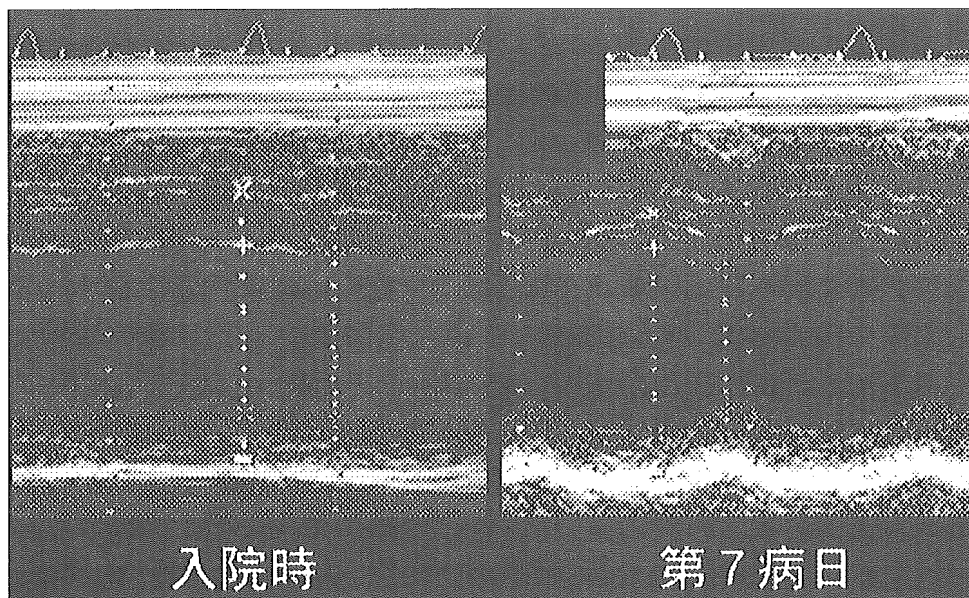
図—1：他院受診時の心電図図（上）と、完全房室ブロックのためにペースメーカー挿入時のモニター心電図



図—2：入院後の経過



図—3：心エコー図



図—4：心内膜生検における組織所見



DBA/2 マウスの真菌多糖に対する *in vitro* での応答性の検討

分担研究者 大野尚仁 東京薬大教授

研究要旨

我々は、*Candida albicans* IFO 1385 を完全合成培地で培養し、その培養上清中から得られる可溶性多糖画分（CAWS）をマウスに腹腔内投与すると川崎病類似の血管炎を発症させることを報告してきた。CAWS 誘発血管炎の発症頻度、重篤性にはマウス系統差が存在し、DBA/2 マウスは高い感受性を示し、血管炎誘発過程において致死が観察された。そこで今回は、DBA/2 マウスに着目し、DBA/2 マウス由来白血球の真菌多糖（SCG）に対する感受性を、サイトカイン産生を中心に解析した。その結果、DBA/2 マウスの脾細胞は SCG 刺激により著しい IFN- γ 産生を示し、この応答は他の系統のマウスでは観察されなかったことから、DBA/2 マウスに特徴的な応答であると考えられた。

A. 研究目的

病原性真菌 *Candida albicans* 菌体外多糖画分（CAWS）は、マウスに川崎病類似の血管炎を発症させることができる。CAWS 誘発血管炎の発症頻度、重篤性にはマウス系統差が存在し、DBA/2 マウスは高い感受性を示す。そこで今回は、DBA/2 マウス白血球の真菌多糖に対する感受性を、サイトカイン産生を中心に解析した。

B. 研究方法

1. 真菌由来の多糖として *Sparassis crispa* 由来 β グルカンである SCG を用いた (Fig. 1, Table 1).
2. マウス脾細胞を真菌多糖 SCG の共存下 48 時間 *in vitro* 培養し、その上清中のサイトカイン産生を ELISA にて測定した。

C. 研究結果

1. CAWS による血管炎誘導活性にはマウス系統差が存在する。CAWS によって重篤な血管炎を誘導される DBA/2 マウスの脾細胞は、高い IFN- γ 産

生能を有していた。そこで、種々の系統のマウス脾細胞を真菌多糖 SCG の共存下 48 時間 *in vitro* 培養し、その上清中の IFN- γ 産生を ELISA にて測定した。その結果、DBA/2 マウスの脾細胞のみが SCG に対して高い反応性を示し、IFN- γ 産生を増強した (Fig. 2)。

2. DBA/2 マウスの脾細胞は SCG によって高い IFN- γ 産生が誘導された。そこで、SCG の至適濃度を検討すると、30~250 μ g/mL であった (Fig. 3a)。また、DBA/2 マウスの脾細胞は *in vitro* で培養すると未刺激でも 72 時間後には IFN- γ 産生が観察されたが、SCG 群では 48 時間後から IFN- γ 産生が誘導された (Fig. 3b)。

3. CAWS の致死活性には性差が存在する。そこで、DBA/2 マウス脾細胞における *in vitro* での IFN- γ 産生に性差があるかどうか検討した。その結果、性差は観察されなかった (Fig. 4a)。更に、マウスの週令による感受性の違いを観察したところ、低週令のマウスは低応答性であった (Fig. 4b)。

4. SCG 刺激による DBA/2 マウス脾細胞からの IFN- γ 産生を, LPS 刺激と比較した. その結果, SCG の IFN- γ 誘導能は, LPS よりも高かった (Fig. 5a). 同じ培養上清中の IL-6 産生量を ELISA で測定したところ, LPS 刺激では著しい IL-6 産生が観察されたが, SCG 刺激では IL-6 は産生誘導されていなかった (Fig. 5b). これらのことから真菌多糖と LPS による DBA/2 マウス脾細胞活性化能は質的に異なることが明らかとなった.

5. DBA/2 マウスの脾細胞のうち, どのような細胞画分が IFN- γ 産生に関わっているのか検討するために, 脾細胞を plastic dish で 1.5 時間培養し, 付着性細胞 (adherent), 及び非付着性細胞 (nonadherent) に分画したところ, SCG 刺激による IFN- γ 産生が減少した. それらの細胞を再び混合して培養すると (whole), 著しい IFN- γ 産生が観察された (Fig. 6).

6. 5. の結果をふまえ, 次に DBA/2 マウスの脾細胞による IFN- γ 産生には付着性細胞と非付着性細胞の contact が必要なのか, 産生される液性因子が重要であるのかを transwell を用いて検討した. その結果, 付着性細胞と非付着性細胞を upper well と lower well に分けると, SCG による IFN- γ 産生誘導は観察されなかったことから, IFN- γ 産生誘導には付着性細胞と非付着性細胞の間の細胞間接着が重要であることが示唆された (Fig. 7).

7. SCG 刺激による DBA/2 脾細胞からのその他のサイトカインの産生を検討したところ, IFN- γ 産生を誘導するサイトカインである IL-12p70 産生の増強が観察された. 一方, IL-10 産生誘導は観察されなかった (Fig. 8).

D. 考察

真菌由来の多糖である SCG によって著しい IFN- γ の産生誘導が観察されるのは DBA/2 マウスの脾細胞のみであり, その他の系統のマウス脾細胞からは IFN- γ 産生誘導はほとんど観察されなかった. このことより, DBA/2 マウスは真菌多糖に対して特徴的な応答をする系統であると考えられた.

DBA/2 マウスの脾細胞を付着性細胞と非付着性細胞に分画して SCG で刺激すると, IFN- γ の産生は著しく減少したが, IFN- γ は付着性細胞によって産生されていることが明らかとなった. また, 付着性細胞と非付着性細胞を再混合して SCG で刺激すると著しい IFN- γ 産生誘導が観察されることが明らかとなり, 更に transwell を用いた実験から SCG による IFN- γ 産生誘導には, 付着性細胞と非付着性細胞の接着が重要であることが示唆された. また, SCG 刺激によって DBA/2 脾細胞から IFN- γ 産生を誘導するサイトカインである IL-12p70 産生の増強が観察されたことから, DBA/2 脾細胞からの IFN- γ 産生誘導には付着性細胞及び非付着性細胞の接着並びに, 液性因子の仲介が必要であることが示唆された.

E. 結論

DBA/2 マウスは真菌多糖に対して特徴的な応答をする系統であると考えられた. CAWS 誘発血管炎においても DBA/2 マウスは高い感受性を示し, 血管炎を発症したマウスの脾細胞は *in vitro* で培養すると高い IFN- γ 産生を示すことが明らかになっている. CAWS による血管炎誘導においても IFN- γ 産生能が何らかの重要な役割を演じているのではないかと考えられた.

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 大野尚仁, 血管炎を誘導する真菌糖蛋白質の免疫活性化, 医学のあゆみ, 206(2), 150-152, 2003
- 2) Naohito Ohno, Chemistry and Biology of Angiitis Inducer, *Candida albicans* Water-Soluble Mannoprotein- β -Glucan Complex (CAWS), *Microbiol. Immunol.*, 47(7), 479-490, 2003
- 3) Kiyoshi Kurihara, Yuko Shingo, Noriko N. Miura, Shuichi Horie, Yukio Usui, Yoshiyuki Adachi, Toshiro Yadomae, and Naohito Ohno, Effect of CAWS, a Mannoprotein- β -glucan Complex of *Candida albicans*, on Leukocyte, Endothelial Cell, and Platelet Functions *in Vitro*, *Biol. Pharm. Bull.*, 26(2), 233-240(2003)
- 4) Toshie Harada, Noriko N. Miura, Yoshiyuki Adachi, Mitsuhiro Nakajima, Toshiro Yadomae, and Naohito Ohno, Antibody to Soluble 1,3/1,6- β -D-Glucan, SCG in Sera of Naive DBA/2 Mice, *Biol Pharm Bull.*, 26(8), 1225-1228 (2003)
- 5) Noriko N. Miura, Yoshiyuki Adachi, Toshiro Yadomae, Hiroshi Tamura, Shigenori Tanaka, and Naohito Ohno, Structure and Biological Activities of β -Glucans from Yeast and Mycelial Forms of *Candida albicans*, *Microbiol. Immunol.*, 47(3), 173-182 (2003)

2. 学会発表 (発表誌名巻号・頁・発行年)

- 1) 原田 敏江, 三浦 典子, 安達 禎之, 鈴木和男, 大野 尚仁: 真菌多糖の *in vitro* における IFN- γ 産生増強作用の検討. 第5回オステオポンチン研究会 生体防御異常ワークショップ 2003 第6回肝臓生物学研究会 合同年会, 札幌, 2003
- 2) 三浦 典子, 新郷 裕子, 大原関 利章, 高橋 啓, 直江 史郎, 大川原 明子, 鈴木 和男, 大野 尚仁: *Candida albicans* 由来可溶性菌体外

- 多糖 CAWS の血管炎誘発活性. 第68回日本インターフェロン・サイトカイン学会, 東京, 2003
- 3) Noriko N. Miura, Hiroki Sankawa, Yoshiyuki Adachi, Akiko Okawara, Toshiaki Oharaseki, Kei Takahashi, Shiro Naoe, Kazuo Suzuki, and Naohito Ohno: Immunological Analysis in Coronary Arteritis Induced with Mannoprotein-Beta-Glucan Complex Released by *Candida albicans*, CAWS, in DBA/2 Mice. 第9回MPO研究会・サテライトシンポジウム, 八王子, 2003
 - 4) Naohito Ohno: Murine Model of Kawasaki Disease Induced by Fungal Polysaccharide. 第9回MPO研究会・サテライトシンポジウム, 八王子, 2003
 - 5) 三川 浩輝, 三浦 典子, 安達 禎之, 大川原 明子, 鈴木 和男, 大原関 利章, 高橋 啓, 直江 史郎, 大野 尚仁: *Candida albicans* 由来菌体外多糖 CAWS による致死的血管炎誘発メカニズムの解析. 第33回日本免疫学会総会・学術集会, 福岡, 2003
 - 6) 大野 尚仁: モデル動物の開発, CAWS誘発血管炎. ナノとバイオイメージングの融合と医用への展開, 東京, 2003

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

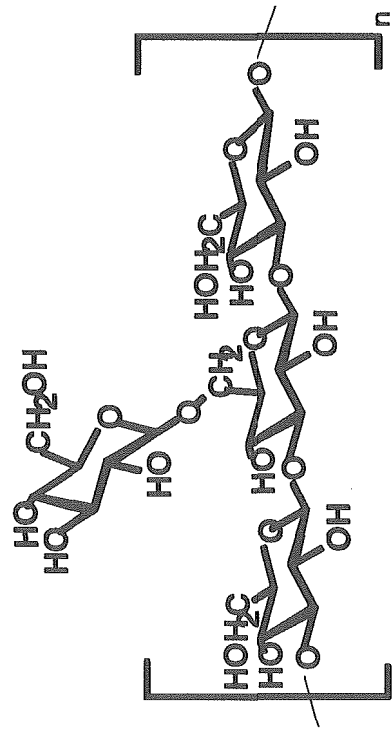


Fig.1 Major Structural Unit of SCG

Table 1 Physicochemical properties of SCG

Structure; 6 branched 1,3- β -glucan

Zymolyase Sensitive; > 80%

Molecular Weight; > $\sim 10^6$

Elemental Analysis; N < 0.1%

Endotoxin Content; < 12.5pg/mg

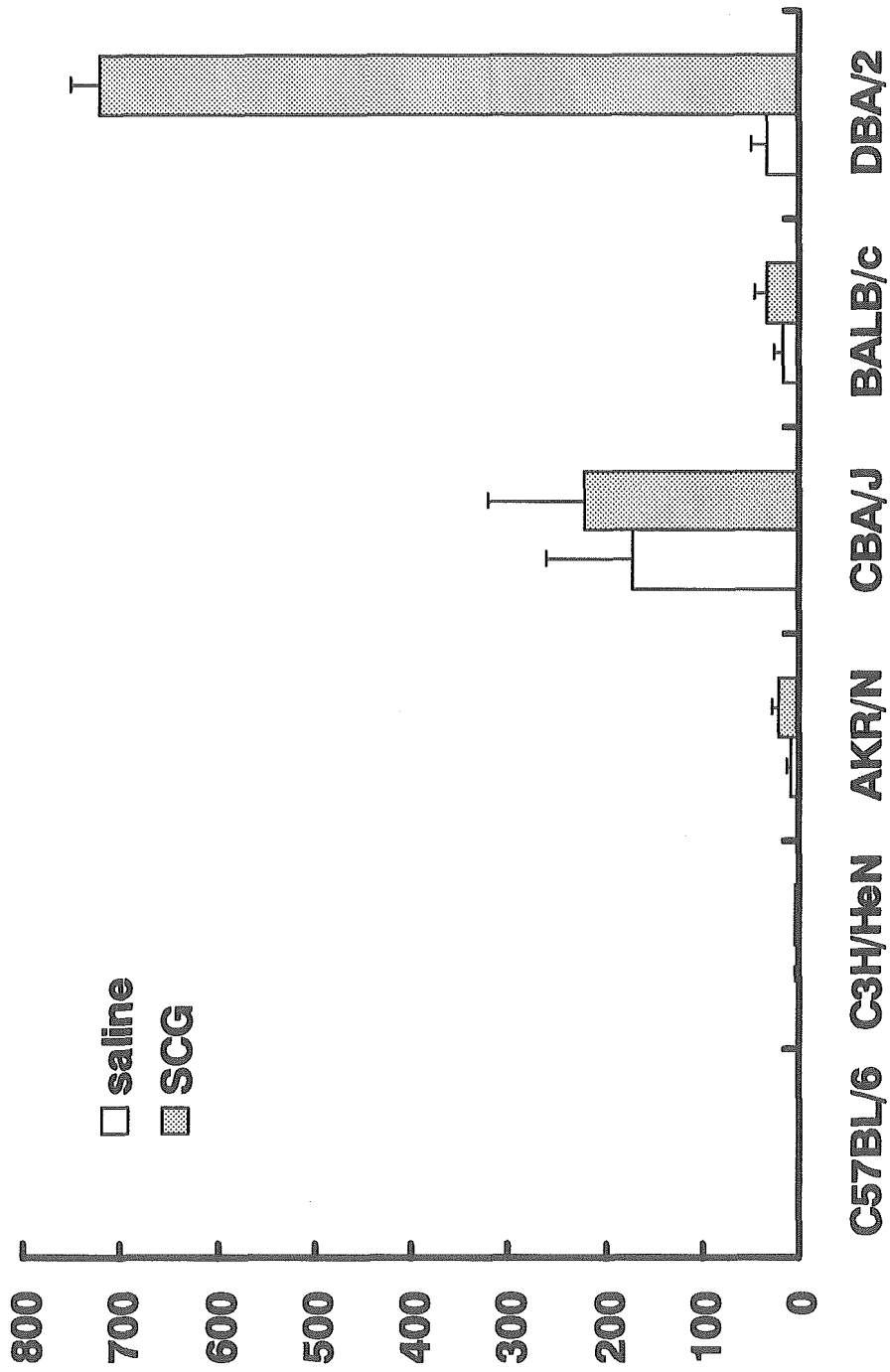


Fig. 2 Strain Difference of IFN- γ Production by Splenocytes Stimulated with SCG in Naive Mice

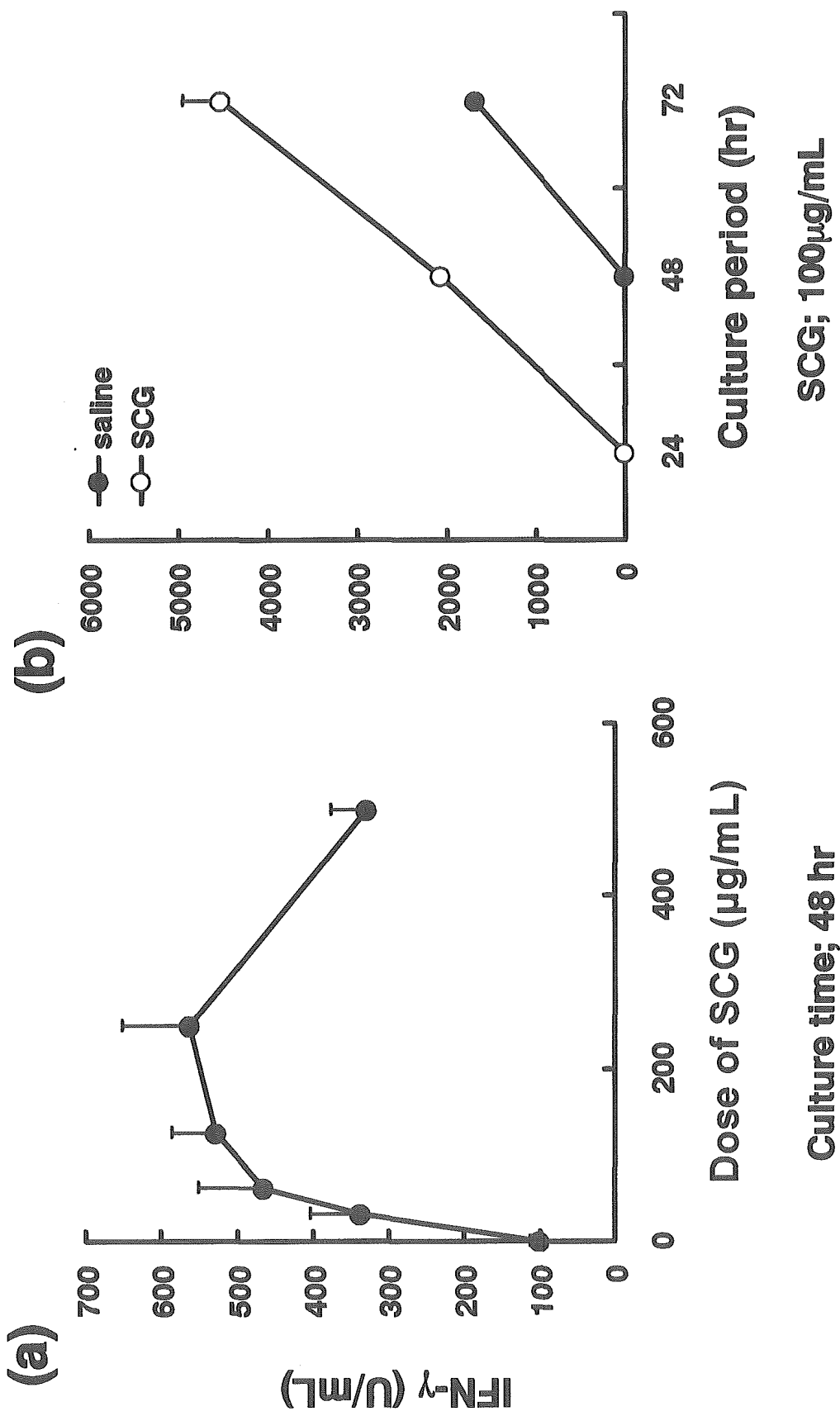


Fig. 3 Dose Response(a) and Kinetics(b) of IFN- γ Production by Splenocytes Stimulated with SCG in DBA/2 Mice

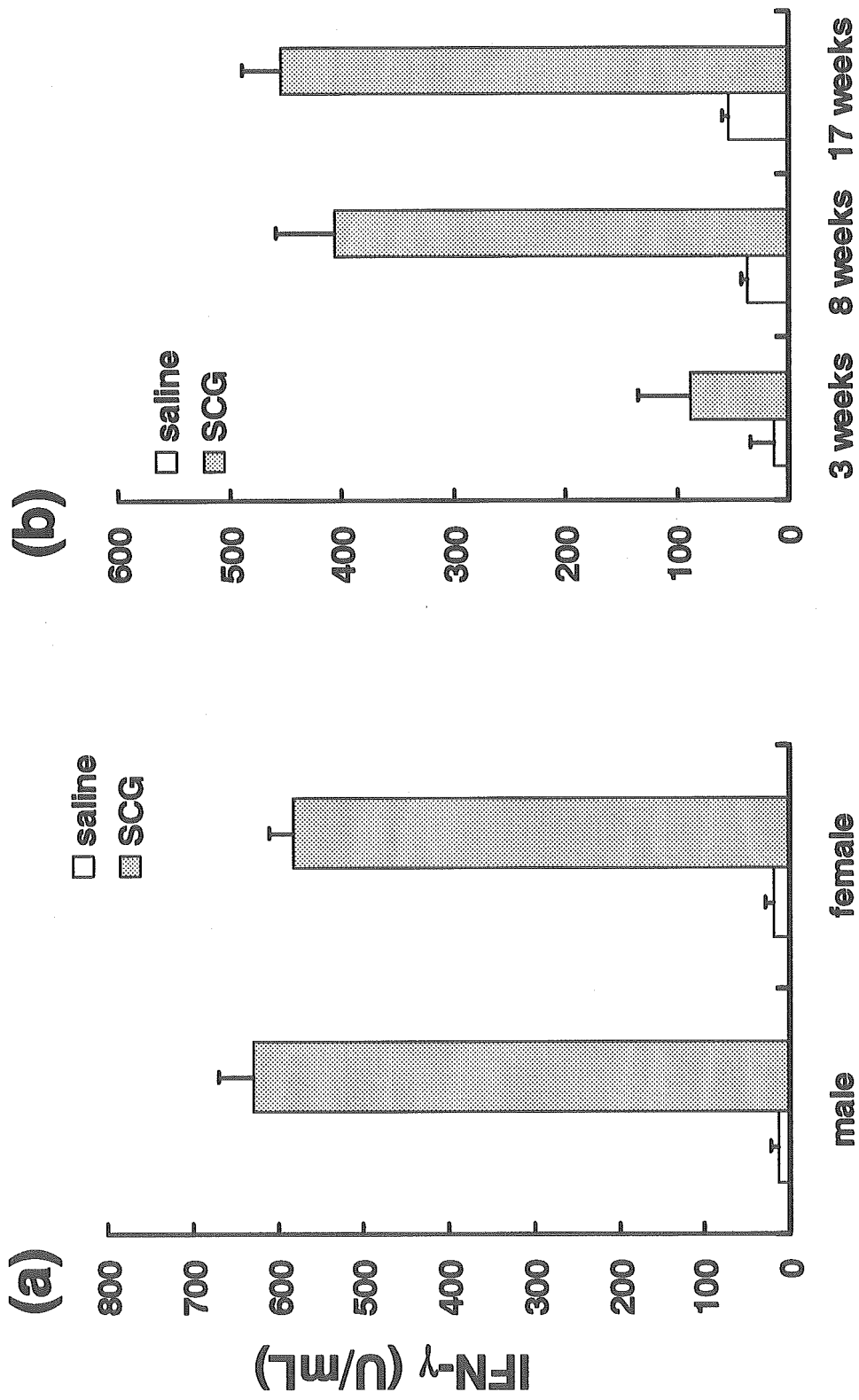


Fig. 4 Effect of Genders(a) and Age(b) on SCG-elicited IFN- γ Synthesis

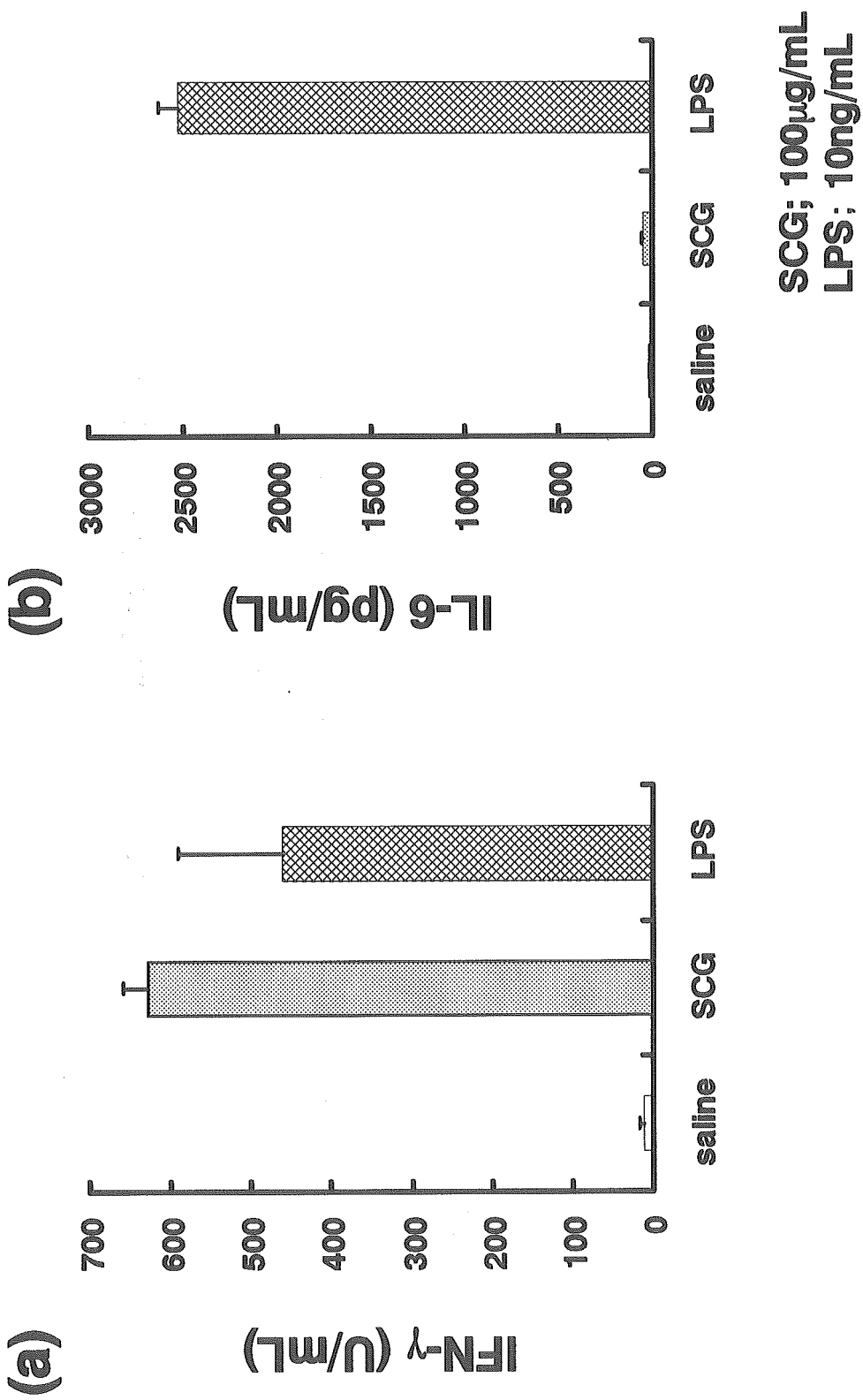


Fig. 5 Comparison of IFN- γ (a) or IL-6(b) Induction with SCG and LPS in DBA/2 Mice