

化させず，局所接着および遊走の抑制をきたしたことが想定された．G 蛋白シグナルは，心筋組織炎症の免疫制御において多様な修飾効果を有すると考えられる．

研究発表

学会発表

1. American College of Cardiology Annual Scientific Session 2005 発表予定

拡張型心筋症患者における「心抑制性抗心筋自己抗体」の ニワトリ胚による抗原同定

小川 聡

慶應義塾大学医学部循環器内科

研究要旨

拡張型心筋症患者に対する免疫吸着療法による自己抗体除去が海外で行われているが、心抑制性抗心筋自己抗体の存在が本治療法の有効性の鍵となることが最近わかった。ニワトリ胚の心エコー法を用いた簡易スクリーニング法を開発し、63%の症例に心抑制性自己抗体を検出した。本邦においても免疫吸着療法の適応となる拡張型心筋症患者は少なくないことが明らかとなった。

研究目的

抗心筋自己抗体の「心抑制作用」をスクリーニングする方法としてニワトリ胚の心エコー検査法を確立し、既知の自己抗原のいずれが「心抑制作用」を有するのかについて明らかにする。

研究方法

拡張型心筋症（DCM）患者例の保存血清を使用した。各血清からIgG分画を精製し、16日齢の有性鶏卵の気室より各々1mgずつ添加した。投与20分後に割殻し心エコー検査にて左室駆出率を計測した。

（倫理面への配慮）

研究への供与に関して予め文書による同意を得た。

研究結果

有性鶏卵の左室駆出率は生食投与群 $83.6 \pm 2.4\%$ 、

非DCM心不全群 $83.2 \pm 2.4\%$ であった。左室駆出率 $<60\%$ を心抑制作用ありと定義すると、DCM患者のうち65例(63%)が心抑制性自己抗体陽性となった。

考察

心抑制性抗心筋自己抗体の実態は未だ確認されていない。ムスカリンM2受容体抗体などが主役を演じることが予測されるが、今後の検討課題である。

結論

ニワトリ胚の簡易スクリーニング法により、DCM患者の63%に「心抑制性自己抗体」が検出された。免疫吸着療法の恩恵に浴すると思われるDCM患者は本邦でも少なくないことが明らかとなった。

サルによる心不全モデルの作製とその重症化機構の解明

豊岡 照彦

東京大学器官病態内科

河田 登美枝, 仲澤 幹雄

新潟大学

小澤 敬也, 卜部 匡司

自治医科大学遺伝子治療研究部

研究要旨

小型動物モデルで成功した各種の治療法をヒト臨床応用する際に大型動物の霊長類で安全性と有効性を確認する事が望ましい。しかし小型動物に比較して大型動物で心不全の作製は難しく、また時間的・経済的にも負担が大きい。更に動物愛護の観点から研究を始める前に文部科学省の大臣許可を頂き、学内の各種委員会と厚生労働省の各研究機関の倫理委員会の審査を通過する為に少なからぬ努力と時間を要した。今回は既に筆者らが先天性拡張型心筋症の遺伝子クローニング、遺伝子治療と重症化の病態を解明した機構が実際にサルでも働くか詳細に検討した。従来の心室頻回刺激による心不全モデルにペースメーカーとプロトコールで改良を加えて検討した。その結果、筆者らが本年小型動物で発表したジストロフィンの崩壊と細胞膜の透過性亢進による心不全の重症化機構 (Toyo-oka et al., PNAS, 2004) は後天的な原因に起因する本法の場合でも共通した機序により心不全に至ることと、従来、本法が可逆性と考えられた原因は心筋細胞の代償性肥大による誤解によることが判明した。この結果は、現在小型動物で成功した遺伝子・再生医療を発展させるため重要なステップをクリアーしてヒト臨床応用へ繋げると期待される。

研究目的

従来の研究から小型動物モデルで成功した治療がヒトで奏効するとは限らず、ヒト臨床応用を考慮する際に大型動物、可能であれば霊長類で効果を確認する事は重要なステップである。しかし小型動物に比較して大型動物で心不全の作製は難しく、また時間的・経済的にも負担が大きい。また動物愛護の観点から我が国ではサルを実験に供するには文部科学省の大臣許可を要するなど、倫理的な側面にも十分に配慮する必要がある。

筆者らが既に小型動物モデルで完成した遺伝子クローニング (Sakamoto et al., PNAS, 1997) と遺伝子治療 (Kawada et al., PNAS, 2002) の前臨床試験として大型動物を用いて、その安全性と有効性を確認する事はヒト臨床応用を計画する上で必須である。敢えて入手困難なサルを実験動物に用いる理由として、①病態生理がヒトに近いこと、特に直立姿勢が多いことは心機能を修飾する自律神経系

の影響がヒトと類似する、②各種薬物に対する反応もヒトと近く、遺伝子治療の安全性の確認にも大きく貢献する、③心臓の解剖学的な位置と大きさがヒトに近く、特殊な診断器具を要さず、ヒト用を準用できる、また④遺伝子・アミノ酸の配列がヒトと殆ど同じで病態との比較が容易、かつ正確に行える利点がある。

研究方法

今回は再現性に優れた心不全状態を特注ペースメーカー (図1, 2) による心室頻拍刺激 (rapid pacing) を用いた。従来、本法は大型動物に比較的簡便に心不全状態を作製可能な事から頻りに用いられてきたが、心機能が可逆性なことから、研究に適さないとの指摘が多かった。今回は、この点にも配慮して生理機能のみならず、組織病理学的変化も含め、詳細に病態を検討した。

具体的には、総重量、約 50gr. のペースメーカーと頻回の屈曲に耐えるリ-ド線を特注した (図1, 2)。

次に雄カニクイザル（体重 3-4Kg）の成獣をネンブタール麻酔、人工呼吸下に左胸開胸手術し（図 3）、左室心尖部の心外膜部に電極を縫着して（図 4）、閉胸した（図 5）。外科手術による創傷部位が治癒し、動物の状態が安定するまでに約 1 週間を要した。Rapid pacing による心不全状態をモニターする際のプロトコルを図 6 に、またヒトの診療と殆ど同様に、経時的に胸部 X 線写真、心電図、心エコー検査と、各種の血液・生化学指標を計測して一般状態を管理した。今回は特に心不全の進行、細胞膜障害を確認する目的で血中 BNP、心筋型 Tn-T 濃度と CPK 活性を経時的に測定した（図 7）。（倫理面への配慮）

上記のように、本研究では動物愛護の観点から研究を始める前に文部科学省の大臣許可を頂き、学内外の各種倫理委員会の審査に約 1 年半を要して全て通過させた上で実験を開始したために、手続きに少なからぬ努力と時間を要した。

研究結果

従来から rapid pacing 法は刺激中止後に心不全が改善する事から可逆性とされ、ヒト心不全モデルとして不適当と考えられて来た。実際、当研究室の予備検討の結果でも胸部 X 線検査は刺激中のみ軽度の心拡大を認めるが、刺激中止後には完全に刺激前の状態に戻った（図 8,9）。心電図（図 10-12）、心エコー検査（図 13-16）、カテーテルによる血行動態など生理的な指標も、また BNP による生化学的マーカーは刺激を中断する事により刺激前値に戻った（図 17）。

しかし最後に剖検による病理学的な検討の結果、左室自由壁、右室自由壁、乳頭筋と心室中隔など左室全体に及ぶ心筋の著明な線維化が認められ、これは非可逆的变化と考える（図 18-21）。また、この部位に白血球の浸潤は少なかったことから、炎症は殆ど消退したことが窺われる。

一見、可逆性とされた誤解された理由は心室筋の代償性による事が判明した（豊岡ら、日本心不全学会総会、Plenary session, 2004）。この際にヒトでは得られない蛋白・遺伝子の解析により貴重なデータが多数得られた。

心不全として先天性 DCM 動物の他に慢性心筋梗塞巣やイソプロテレノール負荷による後天的な原因でも DRP が崩壊したことから、我々は筋ジストロフィー様の変性が心筋特異的に起こり、重症化する一般的な機序を発表した。これは小型動物だけでなく、ヒトでも DCM が重症化して心移植に至った場合も共通した病態の進展過程を示す（図 22-24, Toyo-oka et al, Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 2004）。

実際、このジストロフィンの崩壊が細胞膜の透過性の亢進を伴うことは、先のサル的心不全モデルで確認された。即ちサルに rapid pacing による心不全が起きたことを心臓カテーテル検査で確認した後、Evans blue 蛍光色素を静注し、in situ で細胞膜の透過性を検討した結果、左室自由壁や乳頭筋で細胞膜からジストロフィンが一部離脱した細胞に一致して Evans blue が細胞質に染め出された（図 25-30）。以上のデータをヒトから得ることは絶望的に難しく、サルによって初めて示すことができた。

考察

サルを用いる場合、前記のように多くの法的な手続きが必要となる。更に慢性心不全状態を作製して経時的に各種臨床検査を繰り返した。心不全が慢性的に進展する事を確認した後に最終的に病理・組織学および分子生物学的なデータを得るには約 2 年を要する。サルの実験を始めて現在 1 年半経過し、15 頭目を検討中である。得られた結果は他種の動物やヒトの移植心臓のデータを超える貴重な結果が出つつあり、ヒトの病態解明に大きく貢献すると予想する。

結論

実際サルの遺伝子とアミノ酸配列の 99% 以上、ヒトと共通する事から、例えば心不全の生化学的診断に重要な BNP の特異抗体もヒト用を準用可能で、他種と大きく異なる。これはヒト病態との優れた相同性を示すと同時に、研究を進める上で労力・時間と経費の大幅節減に繋がった。なお詳細な結果はデータが揃った段階で順次公表する予定である。

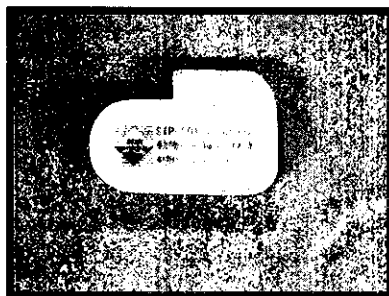


図1 刺激発生装置

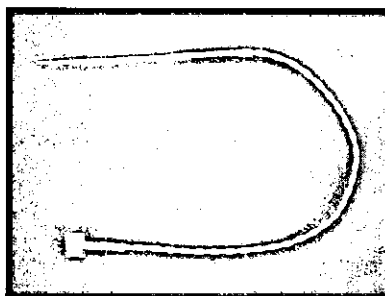


図2 リード線と刺激用の表面電極



図3 左胸開胸手術部位



図4 心表面に電極縫着



図5 閉胸後の手術創

Protocol of pacing-induced HF

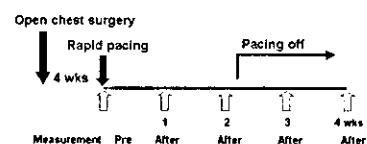


図6 心室の rapid pacing による心不全作製のプロトコール

Blood Exam. (Before Pacing)			
CBC		Chemical lab	
RBC ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	599	TP (g/dl)	7.7
WBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	85	Alb (g/dl)	4.0
Hb (g/dl)	13.6	GOT (IU/L)	47
Plt ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	36.8	GPT (IU/L)	45
Na (mEq/L)	145	ALP (IU/L)	366
K (mEq/L)	4.7	BUN (mg/dl)	27.6
Cl (mEq/L)	109	Cr (mg/dl)	1.1
BNP (pg/ml)	49.4	GLU (mg/dl)	62
Troponin-T (ng/ml)	0.01	CPR (IU/L)	1769
		LDH (IU/L)	427
		CRP (mg/dl)	0.06

図7 心不全の進行中前の血液生化学検査

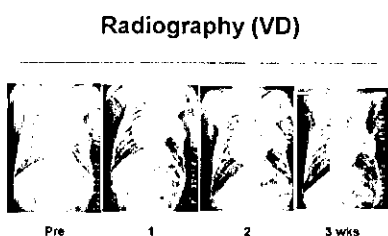


図8 pacing 前後の胸部 X 線検査。後→前像で rapid pacing による左室の拡大を示す。

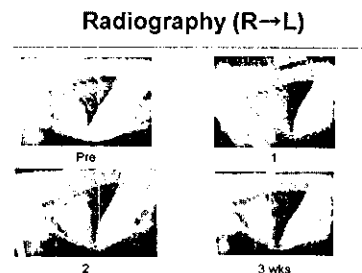


図9 pacing 前後の胸部、右→左像で pacing による左室の拡大を示す。

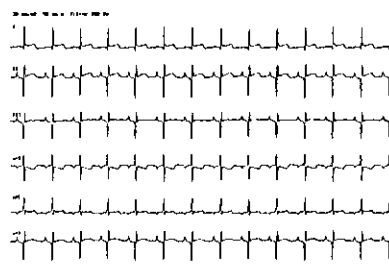


図10 電気刺激前の心電図



図11 刺激中

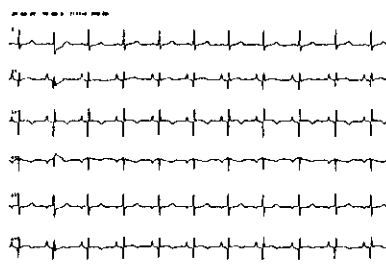


図12 刺激後



図13 電気刺激前のエコー所見



図14 刺激中



図15 刺激中止後

M-Mode Echo of LV

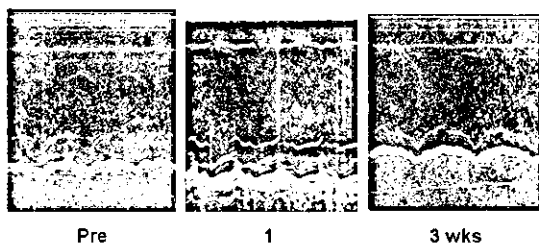


図16 M mode エコー検査. Rapid pacing 中は一過性に左室長径の拡大を示す。

Time course of BNP level

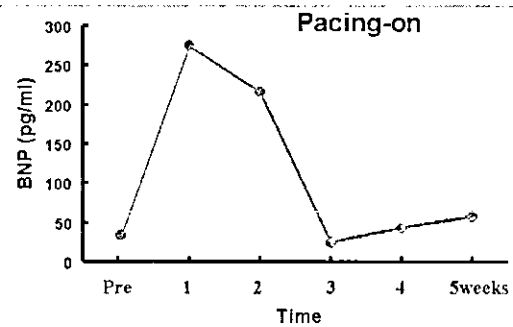


図17 M mode エコー検査. Rapid pacing 中は一過性に著明に上昇する。



図18 電気刺激後の Azan 染色（左室自由壁）

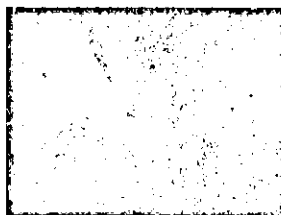


図19 右室自由壁

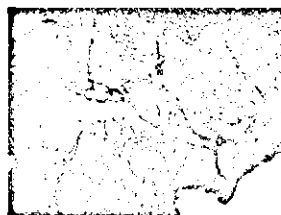


図20 左室乳頭筋

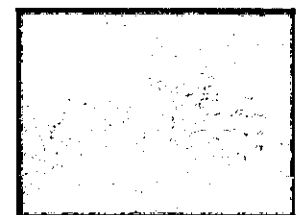


図21 心室中隔

いずれも結合組織が認められ、コラーゲンの顕著な増勢と心筋細胞の崩壊が目立つ。



図22 正常ヒト心筋細胞のジストロフィン（緑）の細胞膜局在。赤は核を示す。



図23 DCM 患者の心移植時のジストロフィン。細胞膜から細胞質への移行が認められる。

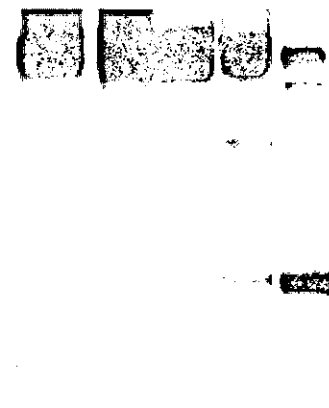


図24 正常対照 (N1, N2) と DCM (D1, D2, D3). 正常者に比較して DCM では 60kD 周辺の断片化。

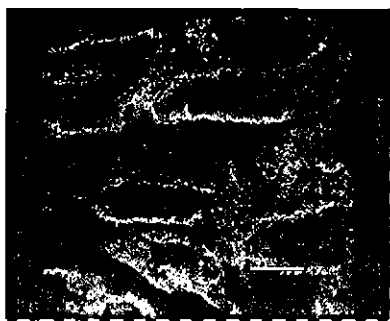


図25 rapid pacing 後の左室自由壁
心筋のジストロフィン（緑）
の細胞膜局在

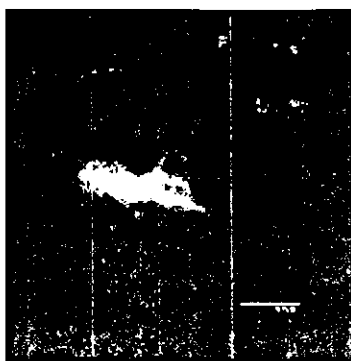


図26 同一部位の Evansblue の取込
み

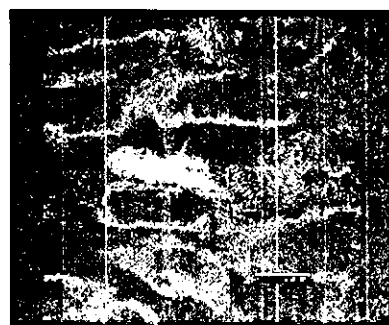


図27 同一部位の二重染色



図28 rapid pacing 後の左室乳頭筋
のジストロフィンの局在

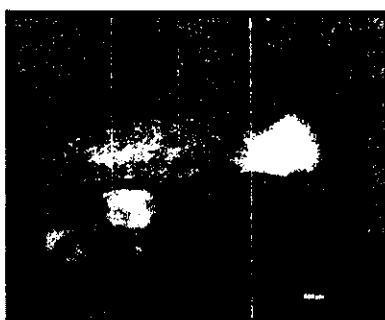


図29 同一部位の Evansblue の取込
み

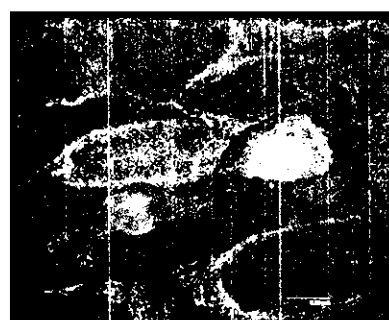


図30 同一部位の二重染色

研究発表

1. Toyo-oka T, Kawada T, Nakata J, et al., Translocation and cleavage of myocardial dystrophin as a common pathway to advanced heart failure: a scheme for the progression of cardiac dysfunction. Proc. Natl.Acad.Sci.USA. 101; 7381-7385, 2004.
2. Sago N, Omi K, Tamura Y, Kunugi H, et al., RNAi induction and activation in mammalian muscle cells where Dicer and eIF2C translation initiation factors are barely expressed. Biochem.Biophys.Res.Comm. 319; 50-57, 2004.
3. Hori M, Sasayama S, Kitabatake A, et al. Low-dose carvedilol improves left ventricular function and reduces cardiovascular hospitalization in Japanese patients with chronic heart failure: the Multicenter Carvedilol Heart Failure Dose Assessment (MUCHA) trial. Am.Heart J. 147; 324-330, 2005.
4. Ma J, Iida H, Jo T, Takano H, Oonuma H, Morita T, Toyo-oka T, et al. Ursodeoxy-cholic acid inhibits endothelin-1 production in human vascular endothelial cells. Eur.J. Pharmacol. 505; 67-74, 2004.
5. Takahashi M, Tanonaka K, Yoshida H, Oikawa R, Koshimizu M, Daicho T, Toyo-oka T, et al. Effects of ACE inhibitor and AT (1) blocker on dystrophin-related proteins and calpain in failing heart. Cardiovasc.Res., 65; 356-365, 2005.

心リモデリングの分子機構

堀 正二

大阪大学大学院医学系研究科

研究要旨

慢性心不全の新たな治療法を開発するため心リモデリングにおける分子機序を明らかにすることを目指した。本研究では特に MAP キナーゼ系の役割を明らかにするため遺伝子改変マウスの解析を行った。リモデリングの発症、進展には様々な神経体液因子、サイトカインにより活性化される MAP キナーゼ系が大きな役割を果たしており ASK1-JNK および p38 のバランスにより細胞の生死が規定されていることが明らかとなった。

研究目的

慢性心不全の予後はいまだ不良であり、新たな治療法の開発が急務である。その為心不全発症進展の過程である心リモデリングの分子機構を解明し、心不全治療の標的分子を同定する。

研究方法

心リモデリングに重要な働きをしていると考えられる MAP キナーゼの働きを遺伝子改変マウスを解析することにより検討する。

（倫理面への配慮）

大阪大学医学部動物実験委員会、DNA 組み換え実験委員会の許可を得ている。

研究結果

ASK1 ノックアウトマウスは圧負荷、ならびに心

筋梗塞後リモデリングを呈さなかった。P38 ノックアウトマウスは圧負荷によりアポトーシス、心臓リモデリングを呈した。

考察

リモデリングの発症、進展には様々な神経体液因子、サイトカインにより活性化される MAP キナーゼ系が大きな役割を果たしており ASK1-JNK および p38 のバランスにより細胞の生死が規定されている。

結論

活性酸素、ASK1, JNK は心不全治療薬の創薬において標的分子となりうる。

研究発表

論文発表

1. Cardiac-specific Disruption of c-raf-1 Gene Induces Cardiac Dysfunction and Apoptosis (2004) J. Clin. Invest. 114:937-943.
2. p38 α mitogen-activated protein kinase plays a critical role in cardiomyocyte survival but not in cardiac hypertrophic growth in response to pressure overload (2004) Mol. Cell. Biol. 24:10611-10620.

学会発表

1. 山口修他: Targeted Deletion of Apoptosis Signal-regulating Kinase 1 Attenuates Left Ventricular Remodeling, 第 68 回日本循環器学会年次学術集会

分離心筋梗塞モデルを使用した心筋再生の検討

松崎 益徳

山口大学医学部器官制御医科学循環病態内科学

研究要旨

既報の分離心筋梗塞モデルを応用した新規なる再生医学の実験方法を開発した。このモデルでは、ドナー心臓中に観察された長形の GFP 陽性細胞は再生した心筋であると考えられた。レシピエントの幹細胞がドナー心臓内に移行し、新たに心筋の再生を起こしたと考えられた。本モデルは心筋梗塞後における心筋再生のメカニズムの解析にも有用である可能性が示唆された。

研究目的

心筋再生を目的とした再生医療は主に動物実験を用いて研究されている。一般的には GFP 等で標識したマウスより骨髄幹細胞を取り出し、非標識の心筋梗塞マウスに注入し梗塞部位での心筋再生を観察する方法が取られて来た。しかしこの方法では様々な侵襲が、幹細胞を含めた細胞全体と生体にも掛かるため、結果として心筋再生の効率が悪く且つ方法論が複雑で実験結果の信憑性に欠けることが知られている。

研究方法

12 週齢雄 GFP マウス（バックグラウンド C57/BL6）をレシピエントとし、同じく 12 週齢雄 C57/BL6 のマウスをドナーとし、中村らの方法（JACC 2003）にて分離心筋梗塞を作成した。手術後 5、40、60 日目に心臓を摘出し組織学的に解析した。

（倫理面への配慮）

実験プロトコールは山口大学医学部動物実験委員

会の承諾を得ている（No.23-034）。

研究結果

手術の成功率は 90% であり、移植した心臓は最低でも 6 ヶ月以上拍動することを確認した。GFP 陽性細胞は術後 5 日目より梗塞部周辺に観察された。術後 60 日目には梗塞周辺部位に紡錘形の巨大細胞が一塊となって認められ、ミオシンとの二重染色でも陽性であった。

考察

移植心臓中に観察された長形の GFP 陽性細胞は再生した心筋であると考えられ、本モデルは心筋梗塞後における心筋再生のメカニズムの解析にも有用である可能性が示唆された。

結論

分離心筋梗塞モデルは再生心筋の時間的分布や定性評価が可能であり、心筋梗塞後心筋再生実験に有用と思われた。

研究発表

論文発表

1. Identification of Autoantibodies With the Corresponding Antigen for Repetitive Cocksackievirus Infection-Induced Cardiomyopathy.

Satoko Takata, Hiroshi Nakamura, Seiji Umemoto, Kazuhito Yamaguchi, Taichi Sekine, Tomohiro Kato, Kusuki Nishioka, Masunori Matsuzaki
Circulation Journal Vol. 68 No.7. 677-682, 2004.

2. TCAP mutations in hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy.

Takeharu Hayashi, Takuro Arimura, Manatsu Itoh-Satoh, Kazuo Ueda, Shigeru Hohda, Natsuko Inagaki, Megumi Takahashi, Hisae Hori, Michio Yasunami, Hirofumi Nishi, Yoshinori Koga, Hiroshi Nakamura, Masunori Matsuzaki, Bo Yoon Choi, Sung

Won Bae, Cheol Woon You, Kyung Hoon Han, Jeong Euy Park, Ralph Knoll, Masahiko Hoshijima, Kenneth R. Chien, Akinori Kimura.

Journal of the American College of Cardiology Vol. 44 No.11, 2192-2201, 2004.

3. 中村浩士, 松崎益徳：鑑別のポイント／心筋炎. Heart View. Vol.8 No.6; 533-537; 2004.
4. 中村浩士, 松崎益徳：ウイルス性心筋炎を識る. Heart View. Vol.8 No.11; 44-50; 2004.
5. 班員；松崎益徳, 協力者；中村浩士：循環器病の診断と治療に関するガイドライン（2002-2003年度合同研究班報告）急性および慢性心筋炎の診断・治療に関するガイドライン. Circulation Journal Vol. 68 , Suppl. IV. 1231-1272, 2004.

学会発表

1. 第26回心筋生検研究会（平成16年11月26-27日）
2. 平成16年度第1回特発性心筋症に関する調査研究班会議（平成16年10月8日）
3. 平成16年度第2回特発性心筋症に関する調査研究班会議（平成17年2月4日）

知的財産権の出願・登録状況（予定含む）

特許取得

1. 広範囲心筋梗塞病態モデル動物及びその作成方法並びにそのモデル動物を用いて行う薬物のスクリーニング方法
中村浩士, 松崎益徳, 吉田勉, 山口 TLO（特開：2002-209473）.
2. An extensive myocardial infarction model animal, method for preparation thereof, and application for drug screening and regenerative medicine.
Hiroshi Nakamura, Masunori Matsuzaki, Tsutomu Yoshida.（米国特許出願：10/141608）
3. 分離心筋梗塞モデルを応用した心筋再生方法
中村浩士, 松崎益徳, 山口 TLO（特願 2004-044096）

蛋白脱リン酸化酵素阻害因子 (PP1 inhibitor-2) の心臓特異的遺伝子導入は心筋症ハムスターの左室機能を改善する

松崎 益徳

山口大学医学部器官制御医科学循環病態内科学

研究要旨

心筋症ハムスター心不全において蛋白ホスファターゼ活性の上昇は、心不全の進行と平行してみられた。特異的内因性阻害因子 inhibitor-2 (I-2) をアデノウイルスベクターにより、生体内心筋に導入すると、心機能は改善し、 Ca^{2+} 調節蛋白であるホスホランバンのリン酸化は上昇した。 Ca^{2+} ハンドリングの亢進が心機能改善の一因として考えられた。一方、Protein kinase A 活性は、対照群に比べ優位に低く、血中カテコラミンは I-2 治療群で低い傾向があるため、前腎の交感神経活性は、心機能が改善しているにもかかわらず、緩和されていることが示唆された。したがって、心筋細胞内での PP1 の特異的阻害は、細胞内 cAMP 濃度の上昇をきたすことなく PLN のリン酸化を上昇させ、心機能を改善し心不全治療として有望であると考えられた。

研究目的

慢性心不全は多様な原因によりおこる心臓の収縮・弛緩障害に伴う予後不良の疾患であり、現在多くの EBM のある薬物療法によっても重症例での 5 年生存率は 50% 以下である。米国での患者数は約 500 万人で、さらに毎年 50 万人以上の増加がみられ、我が国においても、罹患人口は年々増加しつつある (現在約 120 万人)。また心不全患者は再入院を繰り返すことが多く、患者数の増加とあわせ著しい医療費増加の原因でもあり、医療経済的にも新しい心不全治療法の開発は現在の循環器医学における急務であるといえる。

近年の動物実験研究から、遺伝子異常や発症機序に関わらず、不全心では心筋細胞内 Ca^{2+} ホメオスタシスに破綻をきたしていることが病態悪化の大きな要因であることが示されてきた。さらに遺伝子操作により Ca^{2+} ハンドリング機能を強制的に亢進させることにより、心機能が改善し心不全の進行を抑制しうる可能性が示唆されている (Marx O et al, Cell 2000, Minamisawa S. et al Cell 1999)。我々も、これまで Ca^{2+} ホメオスタシスの根幹である筋小胞体の Ca^{2+} 調節を改善させる 2 通りの治療戦略の可能性について報告してきた。一つは、筋小胞体からの Ca^{2+} 放出口である Ryanodine 受容体 (RyR) の構造を安定化させる方法 (Yano et al. Circulation 2002) であり、もう一つは、筋小胞体への Ca^{2+} の取り込み口である Ca^{2+} ATPase (SERCA2) ポンプの機能を Phospholamban (PLN) の遺伝子操作により亢進させる方法

(Hoshijima and Ikeda et al. Nat Med 2002, Iwanaga et al. JCI 2004) である。また最近、慢性心不全で過剰な Protein phosphatase type1 (PP1) の活性上昇とそれに伴う PLN のリン酸化低下が Ca^{2+} cycling を低下させ病態進行に直接関わっていることが示唆されている。今回我々は、UMX7.1 心筋症ハムスターにおいて、心臓での PP1 活性の変化・ Ca^{2+} 調節蛋白のリン酸化が心筋症の進行や加齢によりどう変化するかを検討し、さらに PP1 の特異的阻害因子である PP1 inhibitor-2 (I-2) を心臓特異的に発現させた際の心不全進行への影響を検討した。

研究方法

UMX7.1 で心筋症の進行に対応して 6, 10, 28 週齢の時点で正常ゴールデンハムスターを対照として PP 活性, PKA 活性, 蛋白発現を経時的に測定・心機能との相関を検討した。次に、14 週齢の UMX7.1 ハムスターに I-2 および lacZ 遺伝子をアデノウイルスベクターによる高効率心筋遺伝子導入法を用いて導入し、心機能・PP 活性・PKA 活性の変化を検討した。

(倫理面への配慮)

心不全モデル動物への実験なので、動物の苦痛が内容に、遺伝子導入手術を行った。

研究結果

UMX7.1 ハムスターでは心機能低下に伴う代償性心肥大期 (10 週齢) では正常ハムスターと比較し PP1 活性は上昇していた。また左室機能が高度

に低下し、左室拡張末期圧が上昇を呈した 28 週齢でも PP1 活性は上昇していた。心筋への I-2 遺伝子の導入 7 日後、有意な左室機能の改善を認め、心筋での BNP の発現は減少した。また、I-2 遺伝子導入群では PLN の baseline のリン酸化は上昇していたが、PKA 活性は lacZ 導入群より減少していた。血中カテコラミン濃度も低い傾向が見られた。

考察

UMX7.1 ハムスターでは心筋症の進行過程での

PP1 活性の上昇は、この心筋症モデルの心機能増悪の一因になっていると考えられる。PP1 の特異的阻害因子の心筋への導入は、PKA 活性を上昇させることなく PLN リン酸化を上昇させ、心筋障害を助長することなく左室機能を改善可能であると考えられた。

結論

PP1 の阻害は、心不全治療の標的として有望である。

研究発表

論文発表

投稿中

学会発表

1. American Heart Association Scientific Sessions 2004
Nov 7-10, 2004, New Orleans, LA, USA
Michio Yamada, Yasuhiro Ikeda, Hiroki Aoki, Koichi Yoshimura, Masafumi Yano, Masunori Matsuzaki Cardiac Gene Transfer of Protein Phosphatase 1 Inhibitor-2 Restores Left Ventricular Function in Progressive Hamster Cardiomyopathy Circulation
Circulation 110; III-162, 2004

特発性心筋症の予後調査

松森 昭, 北畠 顕, 中川 秀昭, 三浦 克之, 曾山 善之, 森河 裕子, 稲葉 裕

京都大学大学院医学研究科循環器内科学

研究要旨

本研究では、1999年に実施した特発性心筋症全国疫学調査の2次調査において調査し、1998年受診の特発性心筋症患者4,135例を対象として、2003年末現在（5年後）の予後調査を実施した。1999年調査に協力した235診療科のうち203診療科において調査を行い、182診療科から返送を得、3,317例（80.2%）が予後調査対象症例となった。そのうち転院などによる観察打ち切り例1,075例について住民票（除票）請求を行い、生死の確認作業が完了しつつある。今後、わが国における本症の予後を明らかにし、予後規定要因について詳細に解析する予定である。

研究目的

わが国における特発性心筋症患者の予後については、厚生省特発性心筋症研究班が1983年に報告して以来¹⁾、全国規模でわが国を代表するデータを示したものはなかった。したがってここ20年来でわが国での本症患者の予後がどの程度改善したのかについては明らかになっておらず、特に病院規模などによる偏りのない全国レベルでの調査が必要であった。

全国患者数推定および臨床疫学像を明らかにするために、1999年厚生省特定疾患の疫学研究班と特発性心筋症研究班（臨床班）が共同で実施した特発性心筋症全国疫学調査では、2次調査において4,000例以上の本症患者の検査・治療等の諸データが得られている^{2)~6)}。そこで、2003年末にて調査実施後5年を経過するにあたり、わが国の本症患者の予後を明らかにするとともに予後規定要因を明らかにすることを目的として、2次調査報告症例を対象とした5年後の予後調査を実施した。

研究方法

1. 対象

1999年に厚生省特定疾患の疫学研究班と特発性心筋症研究班（臨床班）が共同で実施した特発性心筋症全国疫学調査の第2次調査（臨床疫学像調査）において調査された1998年受診の特発性心筋症症例計4,135例を対象とし、2003年末現在の予後を調査することを目的とした。

拡張型心筋症 1,932例、肥大型心筋症 2,134例、拘束型心筋症 26例であった。

2. 実施可能性調査

予後調査への協力可能性調査を郵送にて各2次調

査報告医療機関宛てに行った。各医療機関に対しては調査方法の説明と該当症例数、前回報告担当者名を提示した。

3. 本調査

実施可能性調査で協力を表明した医療機関に対し郵送にて1999年報告症例の予後調査を実施し、2003年末現在の予後を確認した。調査項目は高い協力率・回収率を得るため、予後を知るための必要最小限にとどめて以下の項目とした。

①最終生存確認年月②生死の別③死亡している場合は死因④転院者・通院中止者の住所（住民基本台帳、住民票を利用した生死の確認のため）

4. 倫理審査委員会の承認

研究全体として、以下の2施設における倫理審査委員会の承認を得た。

①特定疾患の疫学調査研究班における特発性心筋症予後調査主任研究者の中川秀昭が所属する金沢医科大学倫理委員会②特発性心筋症調査研究班（臨床班）の予後調査主任研究者である松森昭が所属する京都大学大学院医学研究科倫理委員会（倫理面への配慮）

本調査では、1999年に全国患者数を把握するために実施した全国疫学調査の2次調査資料報告症例について予後調査を実施した。また、予後調査の実施に当っては報告医療機関からの予後情報の提供を受けなければならない。その場合、医療機関では患者本人からインフォームドコンセントをとることが原則であるが、調査から5年を経っており、かつ多人数を対象としているため、現時点で対象者全員からインフォームドコンセントをとるのは大変困難である。そこで「疫学研究に関する倫理指針」（文部科学省・厚生労働省）に基づいて、以下のような倫理的配慮を行った。

1) 倫理審査委員会の承認（倫理指針 11 (1)）

研究全体の実施計画に関して、研究を遂行する金沢医科大学、京都大学の2大学倫理委員会の承認を得た。

2) 資料の匿名化（倫理指針 11 (2)）

2次調査票は、個人識別情報のファイルAと、臨床症状に関するファイルBとに分割し、ファイルAを基に予後調査を実施する。個人情報管理者を研究グループ外の金沢大学医学部保健学科の城戸照彦教授に依頼した。ファイルAを含めた研究班が所持する個人情報関連資料すべては個人情報管理者が管理し、調査事務局（金沢医科大学）にはおかなかった。個人情報管理者から調査医療機関に対して、予後調査用の2種類の調査用紙を発送した。

調査用紙Ⅰは個人識別情報を記載、調査用紙Ⅱは予後に関する回答用紙とした。調査用紙Ⅱは整理番号のみにて匿名化されている。調査用紙Ⅱを研究事務局宛て返送してもらい、臨床データファイルBと整理番号で連結し、匿名化された解析用の資料を作成した。

転院ないし通院中断し、生死不明の者に関しては個人情報管理者がファイルAと結合し、転院・中断者ファイルを作成した。これを基に各住所地の市役所、町・村役場に住民票（除票）の請求を行い、生死および転出に関する情報を得た。

研究班研究者が入手できる予後情報は匿名化されているので、調査医療機関の担当者は、①対象者のインフォームドコンセントが得てなくとも、また、②対象医療機関の倫理委員会や所属機関の長の承認を得ていなくとも、情報提供が可能となり（疫学倫理指針 11 (2)）、個人情報の保護は担保される。

3) 研究計画、研究結果の公表

本研究の方法は倫理的配慮も含めて、研究成果と一緒に広く社会に公表する。

データ解析

5年間の生存率曲線および5年生存率を明らかにする。

ベースラインとなる全国疫学調査2次調査における各要因から予後規定因子を明らかにする。

研究結果

1. 実施可能性調査

1999年の全国疫学調査2次調査に協力した全国235の診療科に対する予後調査実施可能性調査を2003年11月に実施した。実施可能性調査に対しては207診療科から回答があり、回収率88.1%であった。

2. 本調査

本調査依頼を行った203診療科の報告患者数は3,657例（拡張型心筋症1,785例、肥大型心筋症1,849例、拘束型心筋症23例）で全国疫学調査2次調査症例全体の88.4%を占める。203診療科のうち63診療科（31.0%）が大学病院、140診療科（69.0%）が一般病院である。小児科が50診療科（24.6%）を占めた。

2004年2月～3月にかけて本調査を郵送した。本調査は182診療科（89.7%）（うち大学病院59診療科）から返送があり、本調査返送症例数は3,340例であった。これは全国疫学調査2次調査対象症例の80.8%、予後本調査依頼症例の91.3%にあたる。

3,340例のうち「特発性心筋症ではなかった」、「全国疫学調査2次調査以前にすでに死亡していた」等の理由により追跡調査から除外される者は23例であった。これらを除外した最終の予後解析対象症例3,317人の内訳は、拡張型心筋症1,627例、肥大型心筋症1,693例、拘束型心筋症22例であった。

予後解析対象となる3,317例の現時点までの追跡実施状況は以下の通りであった。

①2003年12月31日までの生存確認：1,565例②転院などによる観察打ち切り：1,075例③死亡にて観察打ち切り：442例④途中観察打ち切りにてその後不明：235例

3. 住民票（除票）請求

転院などにより観察打ち切りとなっている1,075例については、各症例の住所地にあたる491市区町村役場に宛てて2004年12月に住民票（除票）請求にて生死確認調査を実施した。現時点までに489市区町村（99.6%）より住民票（除票）の交付があり、1,075例のほぼ全例において予後が判明しつつある。転出症例についてはさらに追跡を行っている。

結論

全国疫学調査2次調査対象患者4,135例のうち3,317例（80.2%）について5年後の生死確認作業を完了しつつある。本調査においてなされた倫理的配慮によって各種の問題がほぼ解決でき、わが国を代表する本症患者の予後が判明しつつある。

本研究については今後、生死確認が完了し次第、初発症例における5年生存率の算出による本症患者の予後解明、各種の要因ごとの5年生存率算出による予後規定要因の分析を実施する予定である。

研究発表

論文発表

1. 河合忠一, 他: 特発性心筋症の予後調査 厚生省特定疾患特発性心筋症調査研究班 昭和 57 年度研究報告集, 1983;63-66.
2. 中川秀昭, 森河裕子, 三浦克之, 篠山重威, 松森昭, 中山登美子, 玉腰暁子, 大野良之, 川村孝: 特発性心筋症の全国疫学調査成績 厚生省特定疾患調査研究事業 特定疾患の疫学に関する研究班 平成 11 年度研究業績集 (主任研究者稲葉裕), 2000;49-54.
3. 中川秀昭, 三浦克之, 森河裕子, 篠山重威, 松森昭, 玉腰暁子, 大野良之, 川村孝: 特発性心筋症の臨床疫学像—全国疫学調査 2 次調査より— 厚生科学研究特定疾患調査研究事業 特定疾患の疫学に関する研究班 平成 12 年度研究業績集 (主任研究者稲葉裕), 2001;97-103.
4. 松森昭, 長谷川浩二, 篠山重威, 中川秀昭, 森河裕子, 三浦克之: 特発性心筋症の全国疫学調査 厚生科学研究特定疾患調査研究事業 特発性心筋症調査研究班 平成 12 年度研究報告集 (班長篠山重威), 2001;40-60.
5. Miura K, Nakawgawa H, Morikawa Y, Sasayama S, Matsumori A, Hasegawa K, Ohno Y, Tamakoshi A, Kawamura T, Inaba Y. Epidemiology of idiopathic cardiomyopathy in Japan: results from a nationwide survey. *Heart* 2002;87:126-130.
6. Matsumori A, Furukawa Y, Hasegawa K, Sato Y, Nakagawa H, Morikawa Y, Miura K, Ohno Y, Inabe Y, Sasayama S. Epidemiologic and clinical characteristics of cardiomyopathies in Japan: results from nationwide surveys. *Circ J* 2002;66:323-336.

心筋炎多施設治療試験 (Myocarditis Treatment Trial) における C 型肝炎ウイルス感染頻度

松森 昭, Nora M. Chapman, Steven M. Tracy, Jay W. Mason

京都大学大学院医学研究科循環器内科学

研究要旨

ウイルスによる心筋障害は種々の臨床像を呈することが知られ、心筋炎、心筋症の重要な原因であることが示唆されていた。これまで、ピコルナウイルス群の中でもエンテロウイルス、特にコクサッキーウイルスは、ウイルス性心筋炎の来す最も頻度の高い原因と考えられてきたが、直接的な証明が行われたものは少ない。

最近の分担研究者らの研究により C 型肝炎ウイルス (HCV) により種々の心異常を来すことが明らかとなった¹⁾⁻⁷⁾。

研究目的

本研究では、米国を中心として実施された心筋炎に対する免疫抑制療法が多施設共同研究のため保存された血清を用いて、心筋炎における HCV 感染頻度を明らかにすることを目的とした。

米国、カナダ、日本の 31 施設において、1986 年～1990 年の間に、心不全の病歴 (2 年以内) を有し、心エコー図、運動負荷試験、心筋生検を実施し、駆出分画 45% 未満で冠動脈疾患が除外できた症例が登録された。

心筋生検によりグラス基準に従い“心筋炎”、“境界型心筋炎”、“非心筋炎”に分類された 2,233 例の登録例のうち 2003 年まで -80°C で保存された 1,355 例の血清を検討した。

抗 HCV 抗体は AxSYM HCV Dynapack-II (Abbott 社)、HCV RNA 定量は AMPLICOR (Roche 社)、HCV 型分類は PCR 法により行った。血中心筋トロポニン I は AxSYM Troponin I (Abbott 社) により測定し、2.0ng/ml 以上を異常値とした。

研究結果

HCV 抗体は、1,355 例中 59 例 (4.4%) で陽性で、Dallas 基準を満たした“心筋炎”群で 102 例中 6 例 (5.9%)、Dallas 基準を満たさない群で 1,253 例中 53 例 (4.2%) で陽性であった。米国における一般住民の HCV 感染率は 1.8% (n=21,241, N Eng J Med 1999;341:556-562) と報告されており、この数値と比較すると χ^2 値はそれぞれ 9.5, 36.9, 43.5 で ($p<0.01$) 患者群で有意に高い陽性頻度を示した

(表 1)。HCV 抗体陽性頻度は各施設により差が大きく最高 15.4% を示し、9 施設で 5% 以上が陽性であった (表 2)。HCV RNA は HCV 抗体陽性者 59 例中 29 例 (49%) から検出され、グループ 1 が 23 例、グループ 2 が 1 例、分類不能が 5 例であった。HCV 定量では 159/37 (1-800) KU/ml であった。血中心筋トロポニン I は HCV 抗体陽性者 56 例中 17 例 (30%) で高値を示した。

考察

われわれの施設におけるこれまでの研究では、当初、拡張型心筋症の剖検ないし心筋生検標本から 31 例中 6 例 (19%) から HCV RNA を検出し¹⁾、その後当科を受診した 191 例の拡張型心筋症では 9.9% が HCV 抗体陽性であった⁷⁾。

一方、国立循環器病センターおよび順天堂大学での心筋炎の剖検心では、12 例中 4 例 (33.3%) が陽性であり⁵⁾、世界心臓連盟 (WHF) 心筋症科学委員会の国際共同研究では、心筋炎 / 拡張型心筋症 16 例の心筋の中で 4 例 (25%) から HCV RNA が検出され⁷⁾、また、米国ユタ大学の拡張型心筋症からは、23 例中 8 例 (34.8%) が陽性であったが、施設間や地域によって頻度に大きな差があることが明らかとなった⁷⁾。

2001 年、心筋炎のウイルス病因を明らかにする目的で WHF の支援を受けて、心筋炎の国際共同研究ネットワーク (会長：松森昭) が設立され、現在 25 ヶ国 50 施設が参加しているが、本研究の一部として HCV による心筋炎の共同研究が開始された。1986 年から Jay Mason 博士らによって実施され、分担研究者らも参加した心筋炎の免疫抑制療法に関する臨床試験に登録された症例のうち、1,355 例の

凍結保存血清を今回検討した。その結果、心筋生検組織が Dallas 基準（心筋細胞壊死を伴う細胞浸潤の存在）を満たした活動性心筋炎および Dallas 基準を満たさない臨床的心筋炎において、米国における一般住民の HCV 感染率に比べ明らかに高い陽性率を示した。

なお、施設の地域によって陽性頻度は異なり最高 15% で HCV 抗体が陽性であったが、0% の施設もあり大きな差がみられた。しかし、これらの血清は十数年間凍結保存されていたもので、抗体活性が失われている可能性もあることから、実際の陽性率はさらに高い可能性もある。HCV RNA は抗体陽性者の約半数から検出され、HCV RNA 量には大

きな差があった。この長期保存された血清中から心筋トロポニン I の測定も可能であることがわかり、HCV 抗体陽性者の約 1/3 で高値を示し、持続的な心筋障害の存在が示唆された。

結論

抗 HCV 抗体は 13 ～ 17 年間凍結保存された血清からも検出され、心筋炎において高頻度に検出された。HCV は心筋炎による心不全の重要な病因であることが示唆された。また、これらの血清で心筋トロポニン I が高値を示し持続する心筋障害の存在が示唆された。

表 1 心筋炎多施設治療試験における HCV 抗体

	陽性数／全体数	頻度
Dallas 基準を満たした症例	6 / 102	5.9%*
Dallas 基準を満たさない症例	53 / 1,253	4.2%†
計	59 / 1,355	4.4%§

米国住民における陽性率 1.8%との比較 (n = 21,241)

* $\chi^2 = 9.5$, $p < 0.01$

† $\chi^2 = 36.9$, $p < 0.001$

§ $\chi^2 = 43.5$, $p < 0.001$

表2 多施設における HCV 抗体陽性頻度

施設名	症例数(n)	%
Beth-Israel Med Center, NY	2/13	15.4
Univ. of Cincinnati, OH	6/64	9.5
Univ. of Connecticut, CT	10/107	9.4
Univ. of Tennessee, TE	5/60	8.3
Oregon Health Science Ctr., OR	2/27	7.4
Univ. of Michigan, MI	4/60	6.7
Univ. of Ottawa, Canada	1/15	6.7
Loyola Univ., IL	2/34	5.9
ST. Louis Univ., MO	1/20	5.0
Univ. of Pennsylvania, PE	2/43	4.7
Winthrop Univ., SC	6/131	4.6
Univ. of Utah, UT	2/53	3.8
Beth Israel Hospital, MA	3/84	3.6
Massachusetts General Hosp, MA	6/173	3.5
Univ. of California, CA	1/29	3.5
Cleveland Clinic, OH	1/32	3.1
Univ. of California, CA	2/71	2.8
Toronto General Hospital, Canada	2/139	1.4
Ohio State Univ., OH	1/89	1.1
Baylor College of Medicine, TX	0/8	0.0
Mt Sinai Hospital, NY	0/13	0.0
New York City College, NY	0/36	0.0
Univ. of Nebraska, NE	0/19	0.0
Univ. Hospital, London, Canada	0/1	0.0
Univ. of Pittsburgh, PA	0/25	0.0
Tulsa Heart Institute, OK	0/2	0.0
Minneapolis Heart Institute, MN	0/7	0.0
計	59/1355	4.4%

研究発表

論文発表

1. Matsumori A, et al: Dilated cardiomyopathy associated with hepatitis C virus infection. *Circulation* 92:2519-2525, 1995.
2. Matsumori A, et al: Detection of hepatitis C virus RNA from the heart of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 222:678-682, 1996.
3. Matsumori A, et al: Apical hypertrophic cardiomyopathy and hepatitis C virus infection. *Jpn Circ J* 63:433-438, 1999.
4. Matsumori A, et al: Hepatitis C virus infection and heart diseases. A multicenter study in Japan. *Jpn Circ J* 62:389-391, 1998.
5. Matsumori A, et al: Hepatitis C virus from the hearts of patients with myocarditis and cardiomyopathy. *Lab Invest* 80: 148-153, 2000.
6. Matsumori A. Role of hepatitis C virus in myocarditis and cardiomyopathies. *J Geriatr Cardiol* 1:83-89, 2004.
7. Matsumori A: Hepatitis C virus infection and cardiomyopathies. *Circ Res* 96:144-147, 2005.

ウイルス性心筋炎の病態における心臓リンパ管の関与の解明

西尾 亮介

京都大学医学部附属病院救急部

松森 昭

京都大学大学院医学研究科循環病態学

研究要旨

EMC ウイルスによるウイルス性心筋炎モデルマウスを用い、心臓リンパ管の病態への関与を解明することを目的とした。免疫染色により、ウイルス性心筋炎モデルマウスにおいて、心臓におけるリンパ管の存在が明かとなった。ウイルス性心筋炎の病態では、心臓におけるリンパ管の関与が予想され、左室のリモデリングや拡張能障害との関連が予想された。今後、新しい治療法に発展する可能性が示唆される。

研究目的

EMC ウイルスによるウイルス性心筋炎モデルマウスを用い、心臓リンパ管の病態への関与を解明することを目的とした。

研究方法

4 週齢の DBA/2 マウスに EMC ウイルスを接種し、第 1, 3, 4, 5, 7, 9, 12, 14, 90 日に心臓を採取し、抗 VEGFR-3 抗体および抗 prox-1 抗体にて免疫染色を行った。また、アデノウイルスベクターを用い、VEGF-C156S と VEGFR3-Fc の過剰発現が生存率、心筋傷害、血行動態におよぼす効果を検討した。

(倫理面への配慮)

当研究は京都大学動物実験規約に則り行われており、倫理面での問題はないものと考えられる。

研究結果

免疫染色により、ウイルス性心筋炎モデルマウス

において、心臓におけるリンパ管の存在が明かとなった。VEGF-C156S と VEGFR3-Fc の効果が明らかとなりつつある。

考察

ウイルス性心筋炎の病態では、心臓におけるリンパ管の関与が予想され、左室のリモデリングや拡張能障害との関連が予想される。今後、新しい治療法に発展する可能性が示唆される。

結論

ウイルス性心筋炎の病態では、心臓におけるリンパ管の関与が予想された。

健康危険情報

ウイルス性心筋炎の病態では、心臓におけるリンパ管の関与が予想され、左室のリモデリングや拡張能障害との関連が予想される。