

齋藤 一番最初の質問から答えたいと思いますが、GVH反応、一般に proliferative な GVH 反応が起こる場合には、splenomegaly、これは古典的に Simonsen の assay と呼ばれ、いわゆる GVH 反応そのものの指標としているのです。我々も細胞が実際増えているかどうか、重さは非常に重くなるのですが細胞数はどうか、ということで確認してみますとある程度は細胞数は増えています。しかし実際肉眼的にあれ程大きな物が見える割には細胞は増えていない。ですが lymphoproliferative な1つの指標になるのではないかと考えております。それといわゆる初期像だけではないかという事ですが、経過を追ってみて長期にはやはり現在24週齢と、その他放っておいたマウスが6ヶ月以上経っておりますが、現在のところ PBC の様な、肝硬変の様な像は呈しておりません。従いまして、あくまでも granuloma と CNSBC とするものの形成機序、破壊機序、そういったメカニズムの1つのモデルと考えております。

司会 よろしいでしょうか。ヒトのモデルを考える時に、確かに野本先生がおっしゃったように初期病変でな

くて全体像が似てくれば非常に理想的なのです。その点で齋藤先生、AMA のことはあまりおっしゃらなかったけれど、AMA も今のところは検出されてないけれど、ずっと後になれば恐らく出てくるのではないのでしょうか。

齋藤 実は他のグループで、外国のグループなのですが、AMA が陽性であったという、…GVH を追いかけてまして、それで出たという……報告があります。ただ我々 IF で検討いたしております。切片はホルモットの凍結切片を用いているのですが、それで検出すると非常に難しい。で今回 pyruvate dehydrogenase がどうも AMA の対応抗原ではないかということで、現在 ELISA で検討中であります。

司会 それではこれから解析が進んでいくと思いますので、どうも有難うございました。時間の都合で次に移らせて頂きます。次は3番目の演題、自己免疫性心筋炎—新しい動物モデルの確立—第一内科、小玉先生お願いいたします。

### 3) 自己免疫性心筋炎：新しい動物モデルの確立

新潟大学医学部内科学第一教室 小玉 誠・和泉 徹  
柴田 昭  
同 医動物学教室 松本 陽・藤原 道夫

#### A Novel Experimental Model of Autoimmune Myocarditis

Makoto KODAMA<sup>\*,\*\*</sup>, Tohru IZUMI<sup>\*</sup>, Akira SHIBATA<sup>\*</sup>,  
Yoh MATUMOTO<sup>\*\*</sup> and Michio FUJIWARA<sup>\*\*</sup>

*First Department of Internal Medicine\* and Department of  
Immunology\*\*, Niigata University School of  
Medicine, Niigata, Japan*

Acute myocarditis has been suspected that its pathogenesis may be related to autoimmunity in part. Some of the experimental myocarditis by coxsackievirus B-3 were revealed that postinfection autoimmunity was an important mechanism of the diseases.

Reprint requests to: Makoto KODAMA,  
First Department of Internal Medicine,  
Niigata University School of Medicine,  
Niigata, 951, JAPAN.

別刷請求先：〒951 新潟市旭町通り1番町754番地  
新潟大学医学部内科学第一教室 小玉 誠

Thus, we tried to establish an animal model of autoimmune myocarditis.

Severe acute myocarditis can be induced in Lewis rats by immunization with human cardiac myosin in complete Freund's adjuvant. This myocarditis was characterized by massive pericardial effusion, marked enlargement of the heart, yellowish-white discoloration of the cardiac surface. In the lesion, remarkable cell infiltration containing multinucleated giant cells and extensive myocardial necrosis were observed. It was also found that the same lesion could be inducible in naive rats by the adoptive transfer of in vitro activated spleen cells from previously immunized rats.

In conclusion, this experimental myocarditis is a cell mediated autoimmune disease and may provide a unique animal model to elucidate a pathogenesis of human myocarditis.

Key words: Autoimmune myocarditis, Giant cell myocarditis, Cardiac myosin, Adoptive transfer

自己免疫性心筋炎, 巨細胞性心筋炎, 心筋ミオシン, 受身移入

## 1. はじめに

ヒト心筋炎は原因を特定できないことが多いが、一般にはウイルス感染がその主体であると考えられてきた。しかし、ウイルス感染を示唆するような臨床症例を伴わない症例も多くみられる。また、急性期死亡症例の心筋組織からはウイルスがほとんど検出されていない。ヒト心筋炎の原因ウイルスの中で最も頻度が高いのは Cocksakievirus-B3 であり、近年これらのウイルスを用いた動物実験が盛んに行われている。その結果、ウイルスによる直接心筋障害は感染直後の一時期だけであり、その後はおそらく自己免疫機序によると思われる二次性的心筋障害が引き続いて起こることが示されている<sup>1)</sup>。一方、原因を特定できない心筋炎は特発性心筋炎として分類されており、それらの中には組織学的に多核巨細胞の出現を特徴とする一病型が含まれている。この巨細胞性心筋炎では患者血清中に抗心筋抗体が出現することがあり、また免疫抑制療法が効果を示す症例もあることから自己免疫機序の関与が疑われている<sup>2)3)</sup>。このようにウイルス性心筋炎においても、また特発性心筋炎においても自己免疫という概念が注目されており、そのメカニズム解明のために適当な動物モデルが求められている。ここでは巨細胞性心筋炎の臨床症例と対比して我々の作成した自己免疫性心筋炎の動物モデルを紹介する。

## 2. 巨細胞性心筋炎の臨床

巨細胞性心筋炎は比較的希な疾患であり、また心筋炎の中では最も予後の悪い病型の1つである。ほとんどが剖検によって診断されている。ここでは感冒様症状に引き続いて発症し極めて短時日の間に心不全にて死亡した

症例と、ステロイドによる治療によく反応し自己免疫性心筋炎が強く疑われた症例について述べる。

[症例1] 61才, 男性. 40才から高血圧, 50才から糖尿病, 55才から心房細動出現. 1987年7月18日, 全身筋肉痛, 関節痛, 食欲低下, 微熱が出現し, 感冒として治療を受けたが改善せず, 全身倦怠感が強くなったため, 7月24日某病院を受診した. 血圧低下, GOT, LDH, CPK 等の心筋逸脱酵素の上昇を認め, 心筋梗塞を疑われて直ちに CCU へ転送された. 入院後各種治療にもかかわらず急速に心不全が進行し4日後に死亡した. 右室心内膜心筋生検では多数の炎症性細胞浸潤と強い心筋壊死をみとめ, また多核巨細胞も多数みとめた(図1, a). 抗心筋抗体をヒト心筋細胞を標的として蛍光抗体法で測定したところ抗体価は80倍だった.

[症例2] 45才, 女性. 1987年5月10日頃, 発熱, リンパ節腫脹とともに全身に赤色皮疹が現れ某病院皮膚科に入院. 中毒性皮疹の疑いで Prednisolone の投与を受け, 8月中旬に治癒した. 同年10月下旬から発熱, 労作時息切れが現れ, やがて房室ブロックが出現したため心筋炎を疑い当院へ転院となった. 入院後心不全が進行し, 1988年1月には NYHA IV度, 左室駆出分画19%まで心機能が低下したが, Prednisolone の投与を開始したところ徐々に左室壁運動が改善した. ステロイドを漸減し少量を維持量として退院した. ところが8月中旬から再び発熱, 全身倦怠感が現れ, 9月1日再入院となった. Prednisolone を増量し Azathiopurine を併用して免疫抑制療法を強化したところ, 心機能は改善したが, カリニ肺炎を合併して10月に死亡した. 心内膜心筋生検

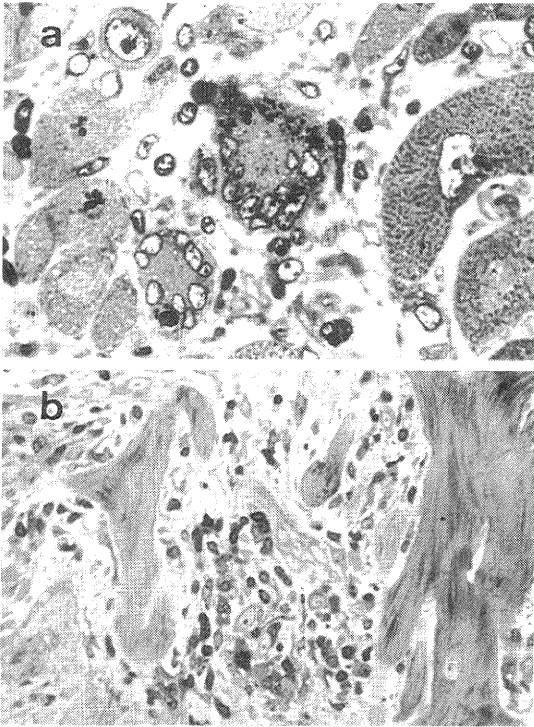


図1 a: 症例1の右室心内膜心筋生検像。  
炎症性単核球浸潤, 心筋細胞の変性, 壊死とともに, 多核巨細胞を多数認める。  
b: 症例2の心内膜心筋生検像, 炎症性細胞浸潤, 広範な心筋壊死, 間質の線維化をみとめる。

では強い炎症性細胞浸潤と間質の線維化を認め(図1, b), 多核巨細胞も認めた。血中抗心筋抗体価は, 病初期は640倍と高く, 治療後20倍まで低下し, 再燃時は80倍に再上昇していた。

この2例はどちらも巨細胞性心筋炎であり, 抗心筋抗体価が高い点でも共通している。特に症例2においては, 炎症反応や心機能が免疫抑制療法によく反応したことからより強く自己免疫機序の関与が疑われる。

### 3. 自己免疫性心筋炎の動物実験

歴史的には実験的自己免疫性心筋炎の研究は, 1950年代までは抗心筋自己抗体の産生についての検討だけであった。1963年に Kaplan M.H. によって初めて組織障害としての心筋炎モデルがつくられている<sup>4)</sup>。その後も多くの研究がおこなわれているが, いずれも顕微鏡レベルでの限局性心筋炎にとどまっており, 心機能に影響するようなものはない。抗原としては, 1980年頃までは心筋の homogenate を用いていたが, その後は心筋の構成蛋白である心筋ミオシンや心筋膜蛋白が精製して用いら

れている<sup>5)6)</sup>。しかし, ヒト心筋炎の最も基本的な症状の一つである心不全を引き起こすような動物モデルはつくられておらず, また実験的心筋炎の再現性も安定していない。

### 4. 新しい動物モデル

我々は, 各種の実験的臓器特異性自己免疫疾患に感受性の高い Lewis ラットを用いて, また精製したヒト心筋ミオシンを抗原として検討した<sup>7)</sup>。

心筋ミオシンの精製は村上らの方法に基づいて行った<sup>8)</sup>。精製された心筋ミオシンは重鎖が主体であり軽鎖はほとんど含まれていなかった。

免疫群は, 心筋ミオシンと完全 Freund アジュバントを混合して, 1週間隔で2回足底に皮下注射した。対照群はミオシンの代わりに燐酸緩衝液を用いた。初回免疫後第1週から第6週まで1週間毎に2匹から5匹のラットを屠殺し, 心臓を摘出し重量を測定した。さらに心臓はホルマリン固定後パラフィン包埋し, ヘマトキシリン-エンジン染色で組織学的検索を行った。また, ELISA法で抗ミオシン抗体の産生を調べた。

免疫群は対照群にくらべ体重増加が抑制され, 第2週頃から体毛が毛羽立ち, 飼育箱の片隅にうずくまっていた。第3週で調べると, 全てのラットは大量の心外膜炎を貯留し, 心臓は著しく腫大し, 心臓表面の大部分は白黄色に変色していた(図2, a)。肉眼的に変色の見られた部分は組織学的には強い炎症性細胞浸潤と心筋壊死であり, 貫壁性に心筋細胞が脱落している箇所もみられた(図2, b)。細胞浸潤は単核球とともに好中球も多くみられ(図2, c), また炎症巣の中心付近には多核巨細胞が多数みとめられた(図2, d)。他に線維芽細胞の増生や, 肉芽腫様病変も見られた。

この心筋炎の経時的变化を心臓重量を指標として調べてみると, 第2週までは変化がなく, 第3週から心臓の腫大が現れ, 第4週で最高となる。また, これは組織学的に細胞浸潤の程度とよく一致する。一方抗ミオシン抗体はまだ炎症所見の見られない第2週から既に産生されている。第6週になると細胞浸潤はほとんど消退しており, 心筋細胞の脱落した部分は線維化によって修復されていた。個々の心筋細胞を包むように線維化が起こっている部分もみられた(図2, e)。

### 5. Adoptive transfer

以上のごとく処置を施した動物を全て発症せしめ得る重症自己免疫性心筋炎が達成された。そこで, 実験的アレルギー性脳炎と同じように細胞性免疫がその主役を担っているのかどうかをリンパ球の移入実験で調べてみた。

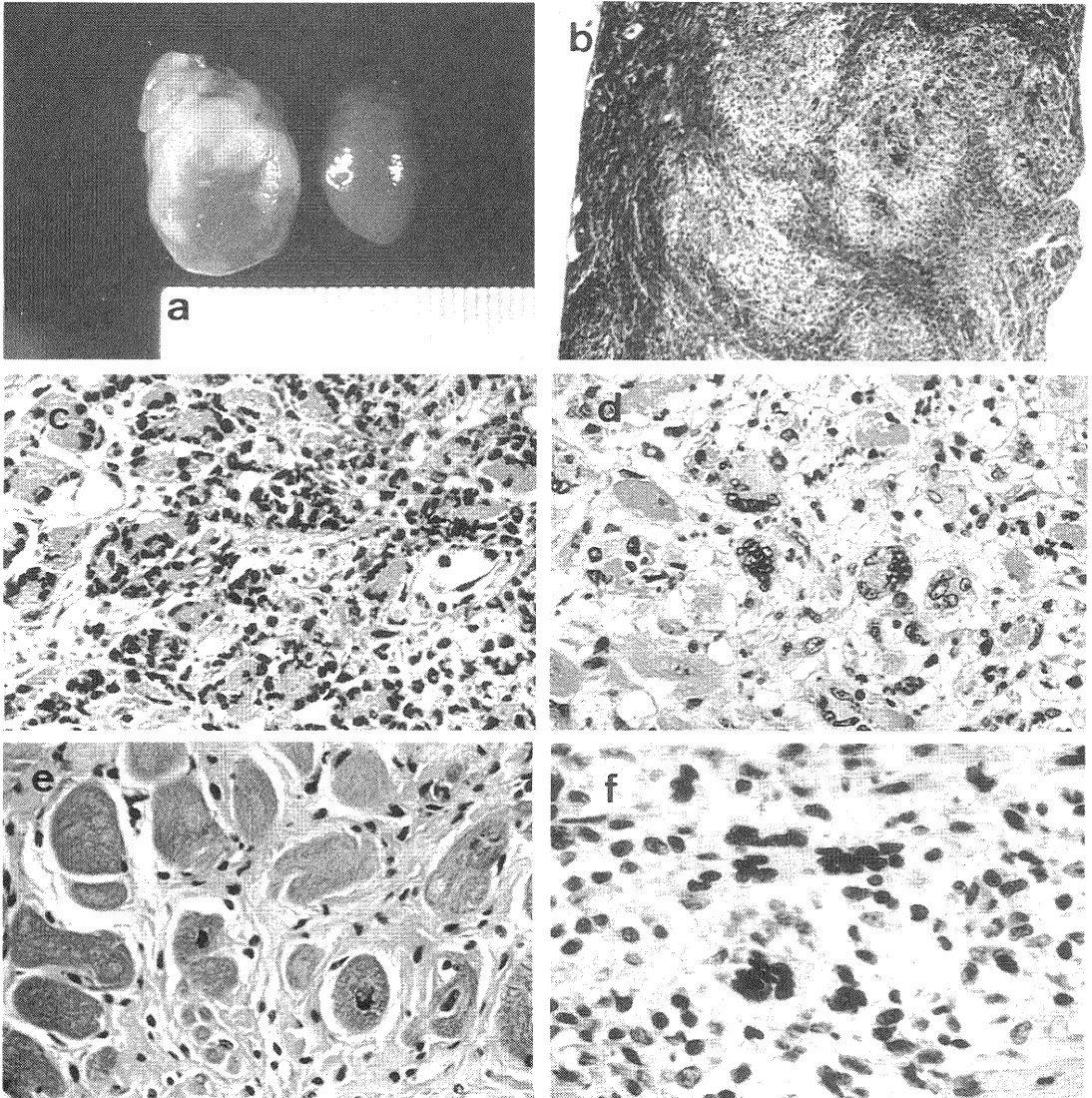


図 2 a : 初回免疫後 21 日. 左は免疫ラット, 右は対照ラット. 免疫群は心臓の腫大と変色が著しい.  
 b : 右室の貫壁性心筋炎.  
 c : 炎症巣には多数の単核球及び好中球の浸潤を認め, 広範な心筋細胞壊死がみられる.  
 d : 炎症巣には多核巨細胞が多数出現している.  
 e : 初回免疫後 42 日. 炎症性細胞は消退し, 強い間質の線維化がみられる.  
 f : 細胞移入により発症した心筋炎. 細胞移入による心筋炎でも多核巨細胞が出現している.

方法は, 初回免疫後第 21 日に脾細胞を取り出し, Concanavalin A  $1\mu\text{g}/\text{ml}$  で 72 時間培養した後, 無処置のラットに静注した<sup>9)</sup>.

実験結果は, Concanavalin A 刺激を加えなかった

ものは脾細胞  $1 \times 10^9$  個, リンパ節細胞  $2 \times 10^8$  個でも発症しなかったが, 培養したものは  $1 \times 10^7$  個まで全てのラットが心筋炎を発症した. また細胞移入後第 11 日の方が第 20 日より心臓重量は重く, 炎症が強かった. 多

核巨細胞の出現も一部のラットで確認され、組織学的にはミオシン感作による実験的心筋炎と基本病像は同じであった(図2, f).

## 6. ま と め

心筋炎は、それ自体まだ発症機序も治療法も確立されておらず、より深い解明が求められている疾患である。そればかりでなく、近年、心筋炎は難治性心筋疾患の1つである拡張型心筋症との関連でも注目されている。従来心筋炎の病態としては、(図3, A)に示すように、ウイルスあるいは他の心筋障害性物質によって直接引き起こされる一次的心筋障害が主体と考えられてきた。しかし、近年のマウスを用いたウイルス性心筋炎の研究では、(図3, B)のようにウイルスによる一次的心筋障害に引き続いて、おそらく自己免疫機序によると思われる二次的心筋障害が起こり、これが心筋炎遷延化の主役を担っていることが明らかになりつつある。したがって、急性期を臨床的に心筋炎として捉えられずに経過し、慢性期に拡張型心筋症として発見される場合もあるものと思われる(図3, C)。今回自己免疫性心筋炎の動物モデルを確立できたことは、今後ヒト心筋炎の発症機転の解明と治療方法の検討、及び拡張型心筋症の病因解明に役立つものと思われる。

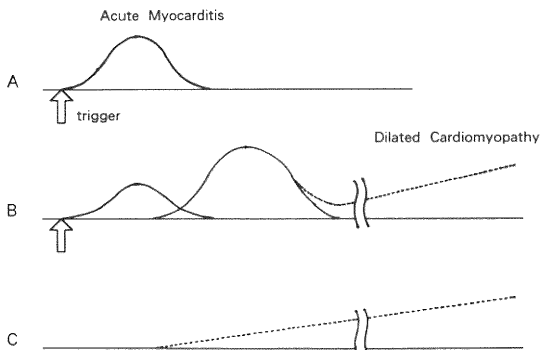


図3 心筋炎の病態

## 謝 辞

稿を終えるにあたって、心筋ミオシンの精製に御協力していただいたデンカ生研株式会社研究開発部川俣治先生、藤原明先生、元田昭策先生、新潟市民病院岡崎悦夫先生、県立がんセンター新潟病院角田弘先生に深く感謝致します。また、貴重な症例を提供してくれました新潟市民病院循環器科樋熊紀雄先生、佐藤広則先生に深謝致します。

## 参 考 文 献

- 1) **Jack F. Woodruff:** Viral Myocarditis. *Am. J. Pathol.*, **101**: 427~279, 1980.
- 2) **Edward O. McFalls:** Granulomatous Myocarditis. Diagnosis by Endomyocardial Bipsy and Response to Corticosteroids in Two Patients. *Chest*, **89**: 509~511, 1986.
- 3) **Phillippe Humbert:** Giant Cell Myocarditis: An Autoimmune Disease? *Am. Heart J.*, **115**: 485~487, 1988.
- 4) **Melvin H. Kaplan:** Immunologic Studies of Heart Tissue. IV. Cardiac Lesions in Rabbits Associated with Autoantibodies to Heart Intuced by Immunization with Heterologous Heart. *J. Immunol.*, **90**: 725~733, 1963.
- 5) **Tohru Izumi:** Experimental Murine Myocarditis after Immunization with Cardiac Membranous Proteins. *Eur. Heart J.*, **8**(Suppl.): 419~424, 1987.
- 6) **Nikolaus Neu:** Cardiac Myosin Induces Myocarditis in Genetically Predisposed Mice. *J. Immunol.*, **139**: 3630~3636, 1987.
- 7) **I. Friedman:** Experimental Myocarditis: Enhancement by the Use of Pertussis Vaccine in Lewis Rats. *Experientia*, **26**: 1143~1145, 1970.
- 8) **Umeji Murakami:** Cardiac Myosin from Pig Heart Ventricle: Purification. and Enzymatic Properties. *J. Biochem.*, **80**: 611~619, 1976.
- 9) **Hillel S. Panitch:** Adoptive Transfer of Experimental Allergic Encephalomyelitis with Activated Spleen Cells: Comparison of in vitro Activation by Concanavalin A and Myelin Basic Protein. *Cell. Immunol.*, **56**: 163~171, 1980.

司会 非常にみごとな動物モデルができたのではないかと我々思っております。……何かありませんか。……この心筋炎は、細胞のトランスは、マーカーから言うとCD4ですね。

小玉 調べてないですけど。

司会 おそらくCD4と予想されるのですが、DC4ではほぼ完全な病像が出来るということで、おそらく液性の抗体による病変形成というのはまあ無いであろうと今

のところ予想している訳ですね。

小玉 それも近々やってみるつもりなのですが。

司会 何かありませんでしょうか。……一言言いますと、動物の疾患モデルを作る時、色々な操作をしますので、ヒトの場合と違う面はあると言えます。斎藤先生の場合には CD4<sup>+</sup> 細胞で GVH 反応を起こす系を用いていますし、小玉先生の場合は抗原とフロイド完全アジュバントとを一緒に免疫するという人為的な操作を加えています。その結果最終的にはヒトの病気と非常に似

ている病像が出来る事がはっきり出てきた。ヒトの場合には triggering factor が全く解らないと言っていると思うのですが、動物モデルはそういうところをはっきりさせている訳です。動物モデルでの操作の過程がヒトの場合にも何かの役割をしているだろうと逆に推論できるのではないかと考えられる訳です。……何かありませんでしょうか。もしありませんでしたら、どうも有難うございました。では4番目のエリテマトーデスの治療モデルということで伊藤先生お願いします。

#### 4) エリテマトーデスの治療モデル

新潟大学医学部医動物学教室 伊藤 聡・藤原 道夫  
同 第二内科学教室 荒川 正昭

#### The Therapeutic Model of Systemic Lupus Erythematosus

Satoshi ITO\*, Michio FUJIWARA\* and Masaaki ARAKAWA\*\*

*Department of Immunology\* and Medicine (II)\*\*  
Niigata University School of Medicine*

The therapeutic effect of 15-deoxyspergualin (DSP), a newly developed immunosuppressive agent, on the development of spontaneously occurring lupus glomerulonephritis in MRL/1pr and male BXSB mice was examined. Administration of the drug was begun from the age of 13 weeks, when polyclonal B cell activation and lupus nephropathy were apparent. Treatment with DSP up to 20 weeks of age at a dose of 2mg/kg twice a day, 5mg/kg daily or 20mg/kg three times a week strongly suppressed the increment of IgG-producing cell numbers in the spleen, and decreased serum levels of immune complexes and anti-DNA antibodies. Glomerular histological score by light microscopy and IgG and C3 deposition estimated by immunofluorescence were remarkably improved. In MRL/1pr mice, DSP reduced the swelling of lymph node and the numbers of Thy-1<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup> cell population in lymphoid organs. Responsiveness to Con A and IL-2 production of spleen cells were improved by the treatment.

Thus, DSP was shown to suppress the progression of polyclonal B cell activation and lupus nephropathy in MRL/1pr and male BXSB mice. These results suggest that DSP might be used as a therapeutic agent for human erythematosus.

Reprint requests to: Satoshi ITO,  
Department of Immunology Niigata  
University School of Medicine,  
Niigata City, 951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町  
新潟大学医学部医動物学教室  
伊藤 聡