川崎病の心筋障害とミオシン軽鎖

——抗ヒト心筋ミオシン軽鎖モノクローナル抗体を用いた検討——

村野浩太郎・黒川叔彦・森内久夫・大山 学・

目黒 嵩・滝 正志・山田兼雄^{*1)}、土持英嗣^{*2)}

Myocardial damage in Kawasaki disease and myosin fragments, determined with monoclonal antibodies specific for human myosin light chains In order to investigate the myocardial damage in Kawasaki disease (KD), we determined light chains of human cardiac myosin in the blood by the dot-blotting method and the ELISA method, using the monoclonal antibodies specific for light chains of human cardiac myosin.

In the acute phase of patients with KD, levels of myosin light chains in the blood were approximately 4 to 8 times higher than normal controls in the dot-blotting method. This change was found in about 30% of patients. In the ELISA method, patients with high levels of myosin light chains (over 1 ng/ml) were about 15%.

In the chronic phase about 80% of the patients with high levels returned to normal control level, but about 20% of them were still high levels as compared with normal controls in the dot-blotting method. In the ELISA method, about 80% of the patients with high levels returned to normal control level, but the remaining patients were still detectable.

These results suggest that some patients with KD show the long-term release of myosin light chains resulted from the damage of heart muscle and/or skeletal muscle.

We conclude that the long term evaluation of myocardial damage should be necessary in the patients with KD.

Kohtaro Murano・Yoshihiko Kurokawa・Hisao Moriuchi・Manabu Ohyama・
Takashi Meguro・Masashi Taki・Kaneo Yamada^{*1)}, Hidetsugu Tsuchimochi^{*2)}

^{*1)} Department of Pediatrics, St. Marianna University School of Medicine

^{*2)} Third Department of Internal Medicine, University of Tokyo

**key words: Kawasaki disease, myocardial damage,
myosin, myosin light chain**

川崎病は、川崎¹⁾によって報告された原因不明の強度の炎症反応を伴う全身性の血管炎である。その冠動脈病変に関する報告は多数認められるが、心炎、心膜炎に関する報告は症例報告が散見されるのみである^{2,3)}。画像診断上では、鈴木ら⁴⁾が川崎病急性期の患児にカラーフローマッピング、Gaシンチグラムを施行し、約半数の症例に心炎の合併を示唆する報告をしている。

病理診断上では、Yutaniら^{5,6)}が、川崎病発症後の右室内膜および右室筋層生検の検討を行っている。その結果、川崎病患児では細胞浸潤、線維化、心筋配列異常などが約30%に認められ、これらの所見が5年以上経過した症例でも高率に認められることから、臨床症状を伴わない心筋炎の所見が組織学的には長期に、高頻度に存在することを示唆すると報告している。

今回、筆者らは、心筋梗塞の急性期に血中へ逸脱し、梗塞の範囲と相関が認められることが報告されている心筋ミオシン軽鎖⁷⁾に着目し、川崎病における心筋の変化

を推察する目的で、入院時、1週後、2週後、3週後、および3～6カ月後の血中心筋ミオシン軽鎖をモノクローナル抗体を用いて、経時的に測定し検討した。

対象と方法

(1) 対象

① 患者血漿およびコントロール血漿

dot-blotting法における対象は、1988年3月から1989年4月までに当科に入院した平均年齢2歳5カ月の川崎病患児15名であり、心エコー上、冠動脈病変は認められなかった(表1)。川崎病の診断は、厚生省研究班：“診断の手びき”によった⁸⁾。検体は入院時(3～6病日)、1週後(10～13病日)、2週後(17～20病日)、3週後(23～27病日)、3～6カ月後(遠隔期)の血漿を用いた。ELISA法では、前述の15名の検体および遠隔期については、発症後3～6カ月の川崎病患児8名の血漿を加えた計23名の検体を用いた。新たに加えた遠隔期8名中2名に心エコー上、冠動脈拡張を認めた。正常コントロールは0歳から4歳までの正常児7名の血漿を、また、陽性コントロールは3歳男児に発症したインフルエンザウイルスによ

*1) 聖マリアンナ医科大学小児科学教室

*2) 東京大学医学部第三内科学教室

表 1 patients in Kawasaki disease

	age	sex	CAL
1	1 y 6m	F	no*
2	6 y 7m	M	no
3	1 y 1m	M	no
4	2 y 4m	F	no*
5	1 y 11m	M	no
6	1 y 8m	M	no
7	3 y 6m	F	no
8	2 y 7m	M	no
9	5 y 0m	M	no
10	3 y 11m	F	no
11	0 y 11m	M	no
12	1 y 0m	F	no
13	2 y 4m	F	no
14	0 y 9m	M	no
15	2 y 2m	M	no

M: male, F: female

CAL: coronary artery lesion

*: relapse case

る心筋炎の急性期血漿を同様に測定し、それらを比較検討した。

(2) 組織材料

① 心筋ホモジネイト検体

心筋は、凍結保存したものをホモジネイトし、洗浄液 (50 mM potassium phosphate buffer (PPB), pH 6.85, 1 mM EDTA) を加え、攪拌洗浄後 3,000 rpm, 10 分間遠沈し、沈渣に 600 mM K-Cl, 150 mM PPB, 1 mM EDTA を加え、さらに攪拌後、1 mM EDTA をもとの沈渣 1 g に対し 13 ml の割合で加え、再度 3,000 rpm, 10 分間遠沈した上清を採取した。同上清をセルロースチューブに移し、1 mM EDTA 中に浸しスターラーにかけ、4°C で over night 透析したものを検体として用いた。

② 血小板ホモジネイト検体

血小板は 10% (V/V) の 3.1% クエン酸ナトリウム加全血から 600 rpm, 15 分間遠沈し、上清の多血小板血漿 (PRP) を得、15% (V/V) の ACD-A 液を加え遠沈した。得られた pellet を 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, pH 7.3 (TES) に浮遊し、15% (V/V) の ACD-A 液を加え、1,000 rpm, 8 分間の遠沈を 2 回繰り返し、血小板の pellet を得た。この pellet をさらに凍結融解し、10,000 rpm, 20 分間遠沈した上清を検体とした。

(2) 方 法

① dot-blotting 法

スロット型ドットブロッキング装置“バイオドット

SF”(BIO-RAD 社)を用いて行った。ニトロセルロース膜(NCM)を装置上に設置し、2ⁿ 希釈(4~128倍)した検体のうち 10 μ l を生理食塩液 300 μ l で希釈し、各ウェルに全量添加したのち吸引濾過を行った。

② sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel 電気泳動法(SDS-PAGE)

検体を sample buffer(6.8 mM Tris-HCl pH 6.8, 10 % (v/v) glycerol, 2.2 % (w/v) SDS) で可溶化したものと、さらに 5 % (v/v) 2-mercaptoethanol(2-ME, BIO-RAD 社)を加え還元したものを泳動した。ゲル濃度は濃縮ゲルを 3 % polyacrylamide, 分離ゲルは 7.5 % polyacrylamide および 4~15 % gradient polyacrylamide を用いた。

③ Western-blotting 法

泳動後のゲルと NCM を BIO-RAD 社製ブロッキング装置“ミニプロティアン II”に設置し、30 V, over night の条件下で転写した。

④ avidin-biotin peroxidase complex (ABC)法

dot-blotting あるいは SDS-PAGE 後、Western-blotting を行った NCM を 100 mM PPB にて洗浄し、アビジン、ビオチン(Vector 社)にてブロッキングした。一次抗体として抗ヒト心筋ミオシン軽鎖 I モノクローナル抗体マウス IgG(抗軽鎖抗体)を用い、室温で 6 時間振盪した。つぎに 5 % スキムミルク(BLOTTING, bovine lacto transfer technique optimizer)を用いてブロッキングを行い、十分洗浄後、二次抗体としてビオチン化抗マウス IgG 抗体(ベクタステイン ABC キット, Vector 社)を用い室温で 1 時間振盪した。100 mM TPPB(100 mM PPB, 1 % (v/v) Tween 20) にて洗浄後、avidin-biotinylated peroxidase complex 試薬(Vector 社)中にて室温で 1 時間振盪した。100 mM TPPB にて再度洗浄後、0.5 % DAB(3,3-diaminobenzidine hydrochloride) にて染色した。染色後の NCM は洗浄後、乾燥させ、同 NCM 上のコントロール群との比較にて半定量を行った。

⑤ ELISA 法

抗ヒト心筋ミオシン軽鎖 I a モノクローナル抗体を一次抗体として、マイクロプレート上に固相化し、検体 50 μ l を添加したのち、一次抗体と異なるエピトープを認識する抗ヒト心筋ミオシン軽鎖 I b モノクローナル抗体をペルオキシダーゼにて標識し、二次抗体として反応させ、デンシトメーター下で測定した。測定可能な最低値を 1 ng/ml とし、それ以下の検体は感度以下とした。

結 果

(1) dot-blotting 法を用いた検討

① 川崎病患児における血中ミオシン軽鎖

患者血漿を用いた検討において、抗軽鎖抗体は良好な

図1 plasma myosin light chain in KD by dot-blotting method

図2 fluctuation of plasma myosin light chain by dot-blotting method

control: age matched control plasma
W: week. M: month

反応を示し、陽性コントロールの心筋炎患児の血漿に対しても、同程度の反応を示した(図1)。また、冠動脈病変の有無における有意差は認められなかった。

② 川崎病における血中ミオシン軽鎖Ⅰの経時的変動
dot-blotting 法による血中ミオシン軽鎖Ⅰの経時的変化は、発症後1~2週から上昇し、3~4週で最高となり、3カ月以上の遠隔期では、正常コントロール群と同レベルに復する傾向が認められた。しかし、遠隔期においても正常コントロール群に比較して、明らかに高値を示す症例が認められた(図2)。

(2) ELISA 法による川崎病における血中ミオシン軽鎖Ⅰの経時的変動

ELISA 法では、発症後0~2週で検出されはじめ、3~4週で高値を呈する症例が存在し、遠隔期では大部分が感度以下となったが、約20%の症例が1 ng/ml 以上を示した。正常コントロールとして測定した7名については全例感度以下であり(図3)、冠動脈病変の有無による有意差は認められなかった。

(3) 血中ミオシン軽鎖Ⅰの存在様式の検討

dot-blotting 法、および ELISA 法により測定した血

図3 fluctuation of plasma myosin light chain by ELISA method

control: age matched control plasma
W: week. M: month

中ミオシン軽鎖の存在様式を検討するために、前述した心筋および血小板ホモジネイト検体と、川崎病の急性期および遠隔期の血漿を SDS-PAGE に供し、western-blotting 後、抗軽鎖抗体を反応させ、ABC 法に準じて染色した。

lane 1 は、心筋ホモジネイト検体で、分子量 100 K 以下の4本のバンドが認められ、分子量 26 K の軽鎖は濃染したバンドとして認められた。

lane 2 は、血小板ホモジネイト検体で、反応するバンドは認められなかった。

lane 3~6 は、川崎病急性期の血漿で、分子量 200 K 以上の broad なバンドが認められ、他のバンドは認められなかった。

lane 7 は、川崎病遠隔期の血漿で、急性期の血漿と同部位に淡い broad なバンドを認めた(図4)。さらに、gradient gel を用いて川崎病患児急性期の血漿、心筋炎患児血漿、正常1歳児血漿をそれぞれ 2-ME 非処理群(非還元系)、2-ME 処理群(還元系)にわけ、SDS-PAGE, western-blotting 後、同様に染色した。

lane 4~6 は非還元系群で、lane 1~3 は還元系群である。lane 4 の川崎病患児急性期の血漿では、前述の分子量 200 K 以上の broad なバンドは、分子量 67 K 前後の4本と分子量 30 K 前後の1本の明瞭なバンドとして認められた。さらに、lane 1 は同検体の還元系で、分子量 50 K 前後と 20 K 前後の2本の集約されたバンドとして認められた。lane 5 および lane 2 は、心筋炎患児の血漿で、川崎病患児血漿とほぼ同様なバンドを認めた。lane 6 および lane 3 は、正常血漿で、明らかなバンドは認められなかった(図5)。

考 察

ミオシンは、分子量は45万~48万⁹⁻¹¹⁾の杆状の分子

図4 myosin light chain by western blotting method using monoclonal antibody
M.Wt.: molecular weight
lane 1: human heart muscle
lane 2: human platelet
lane 3~6: plasma in KD (acute phase)
lane 7: plasma in KD (chronic phase)

で、分子の重量の大部分を占めるアミノ酸配列の等しい2本の重鎖(分子量20万)¹²⁾と収縮系の種類によって大きさの異なる2対の軽鎖(分子量15,000~25,000)¹³⁾からなる。心筋と骨格筋ではサブユニット構成が異なり、心筋ミオシン重鎖には、ATPase 活性の異なる2種のアイソザイム(α 重鎖, β 重鎖)が存在することが明らかとなった¹⁴⁾。

一方で、心筋ミオシン軽鎖は分子量ばかりでなく、一次分子構造が骨格筋ミオシン軽鎖と異なることがわかり^{15,16)}、Yazaki らは、ヒト心筋中から精製したミオシン軽鎖を分画電気泳動法にて軽鎖ⅠおよびⅡに分画し¹⁷⁾精製したものを、モルモットに免疫することにより、抗ヒト心筋ミオシン軽鎖Ⅰ抗体(抗軽鎖Ⅰ抗体)、同軽鎖Ⅱ抗体(抗軽鎖Ⅱ抗体)を作成した。両抗体を用いたRIA法による測定値の比較では、抗軽鎖Ⅰ抗体が測定感度が高い点(2 ng/ml)、および骨格筋軽鎖との交差反応が低い点(10.2%)で、抗軽鎖Ⅱ抗体より有用性が高いと述べている¹⁸⁾。

今回の測定系において、抗軽鎖Ⅰ抗体を用いた理由は、筆者がすでに報告したように、抗ヒト心筋ミオシン α 重鎖モノクローナル抗体および β 重鎖モノクローナル抗体、抗軽鎖Ⅰ抗体の3者を用いた比較で、抗軽鎖Ⅰ抗体がヒト心筋に対してより強い反応を示し、ヒト血小板との交差反応がより少なかったことからである。しかし、ヒト骨格筋との交差反応については、3者に明らかな差異は認められなかった¹⁹⁾。

図5 myosin light chain by Western blotting method using monoclonal antibody
M.Wt.: molecular weight
lane 1: plasma in KD (reduced)
lane 2: plasma in myocarditis (reduced)
lane 3: normal control plasma (reduced)
lane 4: plasma in KD (non-reduced)
lane 5: plasma in myocarditis (non-reduced)
lane 6: normal control plasma (non-reduced)

dot-blotting 法による成績から、抗軽鎖Ⅰ抗体に対して反応するミオシン軽鎖が、急性期の川崎病患児の約30%に認められた。このうち、80%は発症後3カ月の遠隔期で正常コントロールと同レベルとなったが、残りの20%で依然高値を示した。ELISA 法でも同様に、急性期の患児の約15%が2~4週に高値を示し、その後、遠隔期で85%は正常コントロールと同レベルに復したものの、残りの15%は依然やや高値を示した。両者の測定系における差異は、dot-blotting 法では軽鎖Ⅰ抗体のみに反応するミオシン関連物質を、ELISA 法では軽鎖Ⅰa抗体および軽鎖Ⅰb抗体の両者に反応するミオシン関連物質を、検出する点での鋭敏性による差異と考えられた。

このミオシン関連物質の患児血中における存在様式を確認する目的で行った SDS-PAGE, Western-blotting の結果では、抗軽鎖Ⅰ抗体に反応する分子量20万を超える broad なバンドが急性期の血漿では濃く、遠隔期の血漿では淡く認められた(図4)。また、gradient gel を用いた検索からも明らかのように(図5)、血中のミオシン関連物質が、SDS では解離せず、還元系において解離す

る強固な結合様式をとっていることは、十分に考えられた。しかし、これらのミオシン関連物質が血清蛋白との複合蛋白として存在しているのか、あるいはポリマーとして存在しているのかは、いまだ明らかではない。

今回の筆者らの成績を裏付けるものとして、病理組織学的な検討を行った報告が散見される²⁰⁻²²⁾。

Yutani ら^{5,6)}は、川崎病経過症例の右室内膜および右室筋層の生検を経時的に行った結果、冠動脈病変の有無にかかわらず光顕の検索によって小リンパ球あるいは形質細胞からなる細胞浸潤を約30%に認め、程度の差はあるが約40%に線維化を認めたとし、その頻度は発症からの時期が長いほど増加傾向が認められたとしている。

以上の報告は、川崎病における心筋の炎症性変化が、病初期より始まり長期間継続し、それに伴う線維性変化が徐々に出現する可能性を示唆するものである。

今回、筆者らの測定した血中ミオシン軽鎖もしくはその関連物質は、川崎病急性期で15~30%の患児が高値を示し、遠隔期においても15~20%の患児で依然高値を示した。このミオシン軽鎖およびその関連物質の逸脱様式に関しては、今後さらに検討を要するが、少なくとも川崎病における心筋の病理組織学的変化の一端を反映しているものと考えられる。

今回の成績より、川崎病において、心筋あるいは骨格筋などの障害が急性期より生じ、長期にわたり継続する可能性が考えられ、今後の川崎病の治療および管理のうえで、より一層の注意を払う必要性が示唆されるものと思われた。

本研究の要旨は第10回日本炎症学会(1989年7月、於：東京)において発表した。

文 献

- 川崎富作：指趾の特異的落屑を伴う小児の急性熱性皮膚粘膜淋巴腺症候群(自験例50例の臨床的観察)。アレルギー 16: 178-225, 1967.
- 山本高次郎, 木村順子：急性熱性皮膚粘膜淋巴腺症候群(川崎)―広義皮膚粘膜眼症候群もしくは多形滲出性紅斑(Stevens-Johnson)の1亜型―に合併した心炎の1例。小児科臨床 21: 336-339, 1968.
- 杉浦潤一：急性熱性皮膚粘膜淋巴腺症候群(川崎)に心炎を合併した1例。小児科臨床 22: 221-223, 1969.
- 鈴木淳子, 新垣義夫, 土屋恵司, 佐藤 勇, 神谷哲郎：川崎病急性期における僧帽弁閉鎖不全と三尖弁閉鎖不全。第49回日本超音波医学会講演論文集, 1986, p 491-492.
- Yutani, C., Go, S., Kamiya, T., Hirose, O., Misawa, H., Maeda, H., Kozuka, T., Onishi, S.: Cardiac biopsy of Kawasaki disease. Arch. Pathol. Lab. Med. 105: 470-473, 1981.
- Yutani, C., Okano, K., Kamiya, T., Oguchi, K., Kozuka, T., Ota, M., Onishi, S.: Histo-pathological study on right endomyocardial biopsy of Kawasaki disease. Br. Heart J. 43: 589-592, 1980.
- Nagai, R., Chiu, C.C., Yamaoki, K., Ohuchi, Y., Ueda, S., Imataka, K., Yazaki, Y.: Evaluation of methods for estimating infarct size by myosin LC 2: comparison with cardiac enzymes. Am. J. Physiol. 245: 413-419, 1983.
- 厚生省川崎病研究班：診断の手びき(改訂4版)。日児誌 88: 2693, 1984.
- Tonomura, Y., Appel, P., Morales, M.F.: On the molecular weight of myosin. II. Biochemistry 5: 515-521, 1966.
- Gershman, L.C., Stracher, A., Dreizen, P.: Subunit structure of myosin. J. Biol. Chem. 244: 2726-2736, 1969.
- Godfrey, J.E., Harrington, W.F.: Self-association in the myosin system at high ionic strength. II. Evidence for the presence of a monomer dimer equilibrium. Biochem. 9: 894-908, 1970.
- Kielley, W.W., Harrington, W.: A model for the myosin molecule. Biochim. Biophys. Acta 41: 401-421, 1960.
- Weeds, A.G., Lowey, S.: Substructure of the myosin molecule. II. The light chain of myosin. J. Mol. Biol. 61: 701-725, 1971.
- Hoh, J.F.Y., McGrath, P.A., Hale, P.T.: Electrophoretic analysis of multiple forms of rat cardiac myosin: Effects of hypophysectomy and thyroxine replacement. J. Mol. Cell. Cardiol. 10: 1053-1076, 1977.
- Weeds, A.G., Pope, B.: Chemical studies on light chains from cardiac and skeletal muscle myosin. Nature 234: 85-88, 1971.
- Sarkar, S., Sreter, F.A., Gergely, J.: Light chains of myosin from white, red, and cardiac muscle. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68: 946-950, 1971.
- Yazaki, Y., Mochinaga, S., Raben, M.S.: Fractionation of the light chains from rat and rabbit cardiac myosin. Biochim. Biophys. Acta 328: 464-469, 1973.
- Yazaki, Y., Nagai, R., Ueda, S.: Estimation of the extent of myocardial damage from serum cardiac myosin light chain I in acute myocardial infarction (Abstract). Circulation, Suppl. III: 216, 1980.
- 村野浩太郎：川崎病における血中ミオシンの検討。聖マリアンナ医大誌 17: 474-481, 1989.
- 濱島義博：川崎病。日病理会誌 66: 59-92, 1977.
- Fujiwara, H., Kawai, C., Hamashima, Y.: Clinicopathologic study of the conduction systems in 10 patients with Kawasaki's disease (mucocutaneous lymph node syndrome). Am. Heart J. 96: 744-750, 1978.
- Tanaka, N., Sekimoto, K., Naoe, S.: Kawasaki disease: Relationship with infantile periarteritis nodosa. Arch. Pathol. Lab. Med. 100: 81-86, 1976.