

Procollgen III Peptide in Hypertrophic Cardiomyopathy

| | |
|-------|---|
| メタデータ | 言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属: |
| URL | http://hdl.handle.net/2297/8504 |

肥大型心筋症におけるプロコラーゲンⅢペプチド

金沢大学医学部内科学第二講座 (主任: 竹田亮祐教授)

大 里 和 雄

突然死をきたした肥大型心筋症の心臓の組織所見では全体が貫壁性の心筋線維化を示しており、微小血管は内膜の肥厚による狭窄を示す。Ⅲ型コラーゲンはプロコラーゲンから前駆体として合成され、その分子のアミノ酸末端に結合している。プロコラーゲンⅢペプチド (procollagen Ⅲ peptide, PⅢP) はコラーゲンが生合成される際に前駆体であるプロコラーゲンから細胞外で特異的酵素によって切り離されるペプチドで、血清 PⅢP の測定は線維化の進行を把握する上で有用である。そこで、肥大型心筋症例の血清 PⅢP をラジオイムノアッセイ (radioimmunoassay, RIA) 法にて測定し、心筋間質の線維化と PⅢP との関連性、ならびに肥大型心筋症における臨床的意義を検討した。肥大型心筋症 (hypertrophic cardiomyopathy, HCM) 23例、および対照群10例を対象とした。血清 PⅢP 値は対照群に比して肥大型心筋症群で有意に高値であった。血清 PⅢP は心筋生検標本より求めた総線維化、総Ⅲ型コラーゲン、筋周膜 (perimysium)、筋内膜 (endomysium) のⅢ型コラーゲンと有意な正の相関を認めた。臨床的には、Mモード心エコー図から求めた等容拡張時間 (isovolumic relaxation time, IRT) と血清 PⅢP との間には有意な負の相関を認め、左室径短縮率 (percentage of fractional shortening, %FS) と血清 PⅢP との間にも有意な負の相関を認めた。また負荷心筋スキャンにおいて灌流欠損陽性症例と灌流欠損陰性症例とでは、血清 PⅢP 値は灌流欠損陽性症例が、灌流欠損陰性症例に比して有意に高値であった。以上より肥大型心筋症における心筋間質の線維化の増大やⅢ型コラーゲンは血清 PⅢP にも反映されており、血清 PⅢP により心筋間質の線維化の程度を類推できると考えられた。また心筋間質の線維化の増大にともない心機能障害が進行し、心筋内微小循環も障害されるものと推定された。血清 PⅢP を測定することにより、簡便に心筋間質の線維化の程度を類推することが可能であり、臨床的にも肥大型心筋症の線維化の進行に伴う病態の推移を把握する上で有用である可能性が示唆された。

Key words hypertrophic cardiomyopathy, procollagen Ⅲ peptide (PⅢP), interstitial fibrosis, cardiac function, myocardial ischemia

肥大型心筋症は一般的には心肥大による拡張障害が主体となり、その結果左室への血液流入が障害され、左室拡張末期圧、左房圧の上昇を引き起こす¹⁾。心ポンプ機能は良好に保たれており、正常以上の駆出率を示すことが多い。病理組織学的にみると、奇妙な形をした心筋細胞の肥大、心筋間質の線維化、心筋細胞の錯綜配列が認められる²⁾。肥大型心筋症における拡張機能障害を病理組織学的に検討すると、心筋間質の線維化と錯綜配列が重要な役割をなしている³⁾。また、突然死は本症における最も多い死因として重要であるが、若年発症例、突然死の家族歴を有する例、失神の既往や、症状の進行を示す例、および心室頻拍を呈する例で、突然死の頻度が高いことが知られている⁴⁾。拡張型心筋症類似の病態を呈し、突然死をきたした肥大型心筋症の心筋病変は全周性にかなりの部分が線維化で占められ、光顕的にも心筋間質の線維化が著しく、小動脈の著明な狭窄、錯綜配列が認められる⁵⁾。これらのことから肥大型心筋症においては心筋間質の線維化が病態の推移に伴い重要な因子であると考えられる。

近年、コラーゲンの量的、質的な変動は心筋の構造および機能に何らかの影響を及ぼすものと考えられており、心筋にお

る間質コラーゲンの重要性が問題となっている。心筋症に関してはⅠ型、Ⅲ型コラーゲンが注目され、特に心筋間質線維化の進展にはⅢ型コラーゲンの増加が関与していると報告されている⁶⁾。プロコラーゲンⅢペプチド (procollagen Ⅲ peptide, PⅢP) はコラーゲンが生合成される際に細胞外で切り離されるペプチドで、血清の PⅢP の上昇は、線維化コラーゲンの合成や沈着そして分解を反映する。PⅢP は最初は肝線維化の指標として開発され⁷⁾、現在では糖尿病⁸⁾、動脈硬化⁹⁾、心筋梗塞の経過でも上昇する¹⁰⁾とされているが、心筋症に関する報告はない。

今回、病変の進行が疑われる中等症以上の肥大型心筋症において、心筋間質の線維化とⅢ型コラーゲンを定量し、その関連性を評価し、また線維化の指標と考えられる PⅢP との関連性および臨床的意義を検討した。

対象および方法

1. 対 象 (表1)

心臓カテーテル検査にて確診した非閉塞型肥大型心筋症 (hypertrophic cardiomyopathy, HCM) 23例 (男性16例, 女性7

平成5年9月20日受付, 平成5年12月22日受理

Abbreviations: A, atrial filling velocity; ABC, avidin-biotin complex; , deceleration time; DBP, diastolic blood pressure; E, early diastolic filling velocity; HR, heart rate; HCM, hypertrophic cardiomyopathy; IRT, isovolumic relaxation time; IVST, the thickness of interventricular septum; PBS, phosphate buffered saline;

例, 平均年齢 53 ± 15 歳(平均値土標準偏差)および心愁訴の精査目的にて当科へ入院し, 心臓カテーテル検査を含む各種心精査を施行するも異常を認めなかった対照群10例(男性8例, 女性2例, 平均年齢 56 ± 7 歳)を対象とした。心臓弁膜症, 冠状動脈狭窄, 高血圧症, 肝機能障害, 腎機能障害, 糖尿病を伴うものは対象より除外した。HCMの診断は, WHO/ISFC診断委員会¹¹⁾, ニューヨーク心臓協会(New York Heart Association,

NYHA)の診断基準¹²⁾に従った。症例はすべて, 心室中隔壁厚18mm以上の高度の非対称性左室壁肥厚を呈する例とした。なおHCM症例は心臓カテーテル検査時, 心室中隔右室側の心内膜心筋生検を全例に施行した。

II. 方法

1. ラジオイムノアッセイ (radioimmunoassay, RIA) による血清 PⅢP 濃度の測定法

Table 1. Clinical features and echocardiographic findings in control subjects and patients with HCM

| Subject number | Age (years) | Sex | HR | SBP | DBP | IVST | PWT | IRT | %FS | E | A | E/A | DT |
|----------------|-------------|--------------------|----|-----|-----|--------|-----|--------|--------|----|-----|-----|--------|
| Control | | | | | | | | | | | | | |
| 1) | 62 | M | 64 | 132 | 74 | 10 | 10 | 84 | 39.0 | 48 | 45 | 1.1 | 180 |
| 2) | 54 | M | 58 | 124 | 84 | 10 | 9 | 56 | 48.2 | 62 | 56 | 1.1 | 134 |
| 3) | 48 | M | 68 | 116 | 68 | 12 | 11 | 64 | 38.0 | 51 | 48 | 1.1 | 168 |
| 4) | 62 | M | 78 | 138 | 86 | 11 | 10 | 62 | 42.4 | 43 | 48 | 0.9 | 142 |
| 5) | 56 | M | 52 | 128 | 76 | 9 | 10 | 54 | 53.2 | 53 | 52 | 1.0 | 126 |
| 6) | 48 | M | 56 | 106 | 68 | 12 | 11 | 100 | 47.8 | 49 | 50 | 1.0 | 176 |
| 7) | 52 | F | 74 | 132 | 78 | 11 | 10 | 64 | 52.0 | 38 | 32 | 1.2 | 192 |
| 8) | 49 | M | 64 | 126 | 72 | 10 | 9 | 82 | 44.0 | 42 | 36 | 1.2 | 156 |
| 9) | 68 | M | 52 | 118 | 68 | 9 | 9 | 94 | 55.6 | 36 | 30 | 1.2 | 164 |
| 10) | 58 | F | 58 | 134 | 70 | 11 | 9 | 56 | 41.8 | 46 | 42 | 1.1 | 146 |
| Mean | 56 | 8/2 ^{a)} | 62 | 125 | 74 | 11 | 10 | 72 | 46.2 | 47 | 44 | 1.1 | 158 |
| ±SD | 7 | | 9 | 10 | 7 | 1 | 1 | 17 | 6.4 | 8 | 9 | 0.1 | 21 |
| HCM | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | 51 | M | 50 | 110 | 70 | 18 | 12 | 110 | 26.5 | 60 | 26 | 2.3 | 150 |
| 2 | 44 | F | 57 | 126 | 70 | 16 | 8 | 115 | 26.0 | 31 | 36 | 0.9 | 260 |
| 3 | 58 | M | 46 | 124 | 74 | 18 | 10 | 145 | 41.8 | 50 | 77 | 0.7 | 285 |
| 4 | 71 | F | 60 | 120 | 72 | 16 | 8 | 116 | 41.9 | 46 | 107 | 0.4 | 220 |
| 5 | 48 | M | 71 | 136 | 88 | 21 | 12 | 140 | 34.0 | 56 | 46 | 1.2 | 200 |
| 6 | 41 | M | 53 | 116 | 78 | 15 | 12 | 120 | 42.3 | 60 | 41 | 1.5 | 120 |
| 7 | 71 | F | 53 | 126 | 74 | 20 | 8 | 160 | 28.9 | 40 | 47 | 0.8 | 175 |
| 8 | 57 | M | 49 | 102 | 58 | 23 | 11 | 120 | 41.2 | 39 | 38 | 1.0 | 200 |
| 9 | 42 | M | 56 | 110 | 70 | 24 | 11 | 180 | 37.2 | 38 | 40 | 0.9 | 220 |
| 10 | 69 | M | 73 | 110 | 60 | 20 | 7 | 135 | 25.6 | 27 | 43 | 0.6 | 162 |
| 11 | 55 | M | 55 | 114 | 72 | 20 | 13 | 170 | 26.8 | 41 | 38 | 1.1 | 200 |
| 12 | 59 | F | 79 | 120 | 80 | 18 | 10 | 102 | 15.9 | 37 | 15 | 2.5 | 180 |
| 13 | 18 | M | 64 | 124 | 82 | 20 | 12 | 75 | 45.0 | 64 | 46 | 1.4 | 235 |
| 14 | 29 | M | 79 | 118 | 60 | 18 | 10 | 100 | 32.7 | 43 | 34 | 1.3 | 120 |
| 15 | 74 | M | 46 | 126 | 80 | 18 | 12 | 170 | 18.3 | 27 | 45 | 0.6 | 262 |
| 16 | 23 | M | 57 | 136 | 70 | 19 | 12 | 100 | 39.1 | 53 | 45 | 1.2 | 180 |
| 17 | 59 | F | 59 | 122 | 66 | 16 | 9 | 160 | 29.7 | 40 | 52 | 0.8 | 215 |
| 18 | 71 | M | 46 | 130 | 70 | 18 | 10 | 140 | 44.4 | 39 | 45 | 0.9 | 215 |
| 19 | 45 | F | 57 | 116 | 70 | 18 | 11 | 150 | 32.6 | 35 | 32 | 1.1 | 185 |
| 20 | 51 | M | 71 | 140 | 80 | 18 | 13 | 110 | 38.3 | 48 | 42 | 1.2 | 220 |
| 21 | 60 | M | 52 | 130 | 80 | 20 | 12 | 115 | 33.3 | 55 | 47 | 1.2 | 225 |
| 22 | 55 | F | 56 | 130 | 80 | 21 | 10 | 112 | 42.2 | 51 | 50 | 1.0 | 135 |
| 23 | 56 | M | 62 | 132 | 74 | 20 | 12 | 126 | 38.0 | 62 | 48 | 1.3 | 210 |
| Mean | 53 | 16/7 ^{a)} | 58 | 123 | 72 | 19 | 11 | 129 | 34.0 | 45 | 45 | 1.1 | 199 |
| ±SD | 15 | | 10 | 11 | 8 | 2 | 2 | 27 | 8.2 | 11 | 18 | 0.5 | 43 |
| p value | NS | | NS | NS | NS | p<0.01 | NS | p<0.01 | p<0.01 | NS | NS | NS | p<0.01 |

a) Number of male patients/number of female patients.

A, atrial filling velocity; DT, deceleration time; DBP, diastolic blood pressure; E, early diastolic filling velocity; F, female; HR, heart rate; HCM, hypertrophic cardiomyopathy; IRT, isovolumic relaxation time; IVST, the thickness of interventricular septum; M, male; NS, not significant; %FS, percentage of fractional shortening; PWT, the thickness of posterior wall; SD, standard deviation; SBP, systolic blood pressure.

%FS, percentage of fractional shortening; PWT, the thickness of posterior wall; PⅢP, procollagen Ⅲ peptide; RIA, radioimmunoassay; ROI, region of interest; SBP, systolic blood pressure

1) 材料

キットはベーリングベルケ社 (Marburg, ドイツ) により開発された RIA-gnost PⅢP (新 PⅢP キット) である。試薬の内容は¹²⁵I 標識抗マウス PⅢP モノクローナル抗体 42ml (<300 KBg) 1バイアル, 抗マウス PⅢP モノクローナル抗体で塗布した試験管, 既知濃度の凍結された 0.5ml 標識 PⅢP 7バイアル, pH7.7 の 0.05M リン酸緩衝液 (phosphate buffered saline, PBS) であった。

2) 測定方法 (図 1)

2種類のモノクローナル抗体を用いた試験管固相イムノラジオメトリックアッセイである。抗マウス PⅢP モノクローナル抗体で塗布した試験管に標準血清, 対照血清および患者血清 20μl を注入した。その後各試験管に 400μl の PBS を加えた。25°C でインキュベーションを行った後に各試験管に 400μl の¹²⁵I 標識抗マウス PⅢP モノクローナル抗体を加え, 3時間25°C でインキュベーションを行った。測定は各検体について2本ずつ二重測定を行った。測定装置はオートウエルガンマシステム ARC-600 (アロカ, 東京) を使用した。既知の標準血清より標準曲線を作成し, 標準血清および各検体の二重測定のカウント数の平均値を計算によって求め, 標準曲線上から検体の PⅢP 濃度を算出した。測定内誤差は5.4%, 測定間誤差は7.2%であった。

2. 病理組織学的検討

1) 心内膜心筋生検

右大腿静脈より生検鉗子を用い, 心室中隔右室側下部より心

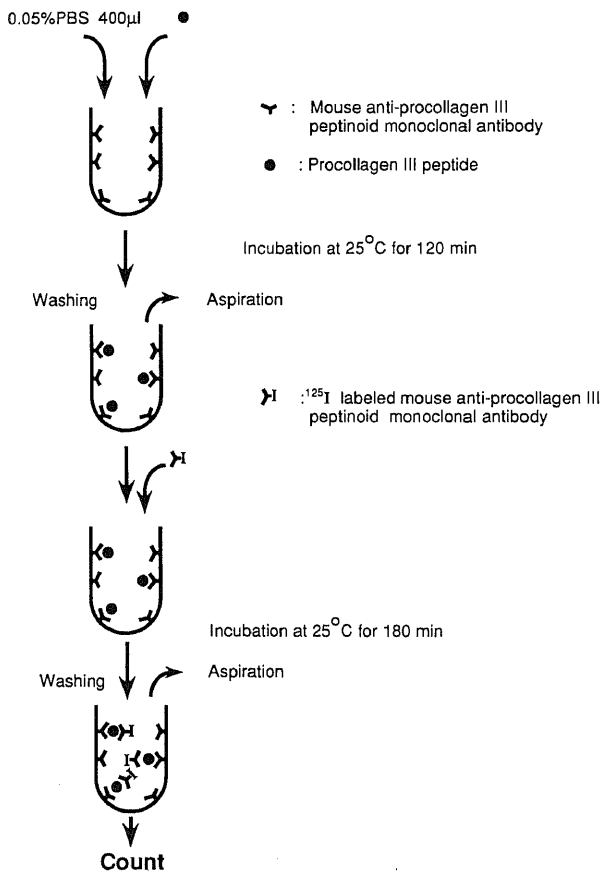


Fig. 1. Schema of radioimmunoassay (RIA) for procollagen III peptide (PⅢP).

筋を採取した。心内膜心筋生検により得られた標本は, 直ちに10%中性ホルマリン緩衝液で固定し, パラフィン包埋後, 心筋細胞が縦断される面で, 4μmの厚さに薄切りし, 連続切片を作成した。うち一つにマロリー・アザン染色を施し, また一つには, 抗Ⅲ型コラーゲン抗体を用いたアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体 (avidin-biotin complex, ABC) 法による免疫組織化学染色を行った。

2) 抗Ⅲ型コラーゲン抗体による間接酵素抗体法

HCM 23例の中で, 心内膜心筋生検にて得られた標本が充分で, かつ血清 PⅢP の測定が可能であった6例に対して抗Ⅲ型コラーゲン抗体の染色を行った。ホルマリン固定組織のパラフィン切片に対して0.05%プロテアーゼ X X I V 型 (Sigma, St. Louis, USA) で37°C, 30分間処理した後, 0.3%過酸化水素で非特異的の反応を阻害した。抗Ⅲ型コラーゲン抗体を用いて

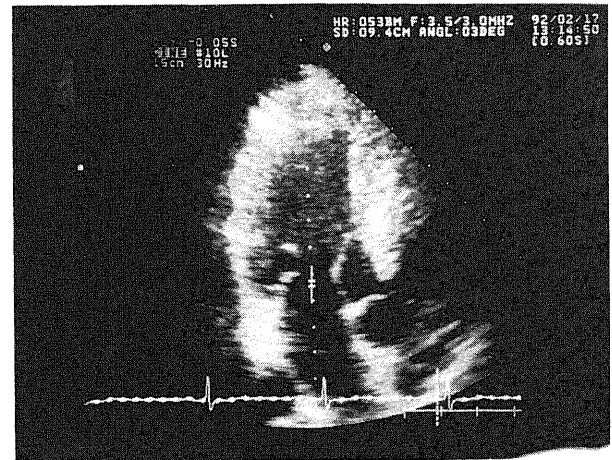


Fig. 2. Left ventricular inflow velocity tracing using pulsed-wave Doppler echocardiography in a patient with hypertrophic cardiomyopathy with reduced fractional shortening. Deceleration time (DT) is time for peak E velocity to decline to baseline. A, atrial filling velocity; E, early diastolic filling velocity.

ABC法で免疫染色を行った。

3) 心筋間質線維化ならびにⅢ型コラーゲンの定量化

各症例のマロリー・アザン染色で認められた線維化とⅢ型コラーゲンを個々の心筋細胞を取り巻くように存在する筋内膜線維化 (endomysial fibrosis) と数個の心筋細胞からなるサブユニットの周囲に存在する筋周膜線維化 (perimysial fibrosis) の2群に分け定量化した。心筋間質線維化およびⅢ型コラーゲンの定量化は、マロリー・アザン染色、Ⅲ型コラーゲン染色の標本で点-計数法 (point-counting method) にしたがって行った。著者の方法は、各ポイント間距離が $10\mu\text{m}$ の格子を用いて行い、心筋細胞および、マロリー・アザン染色では青く染色された間質線維化にあたるポイントを、Ⅲ型コラーゲン抗体による染色では褐色に染まったポイントを、計2000個以上測定し、間質線維化ならびにⅢ型コラーゲンの占める割合を求めた。

3. 臨床的検討

1) 心エコー図法

使用した超音波心臓検査装置は SSD870 (アロカ, 東京) で、2.5MHz または 3.75MHz の探触子を使用した。サンプル領域は深さ方向 2mm の大きさとし、100Hz および 200Hz の低周波成分除去フィルターを使用し、紙送り速度 100mm/sec にて記録した。1週間以上休薬の上、患者を左半身臥位の状態で左第3, または第4肋間傍胸骨左縁より乳頭筋先端レベルでの心室壁運動をMモード法にて記録した。左室流入血流は心尖部よりドプラービームを投入し、僧帽弁弁輪部にサンプルボリュームの位置を設定し、パルスドプラー法にて記録した。これらの記録は心電図とともに浅呼吸停止で記録した。Mモードにおけるビームが心室中隔を垂直にスキャンできない症例、心室中隔、左室後壁が鮮明に描出できない症例は除外した。Mモード心エコー図より、左室収縮機能の指標として左室径短縮率 (percentage of fractional shortening, % FS), 左室早期拡張機能の指標として等容拡張時間 (isovolumic relaxation time, IRT) を算出した。左室径短縮率は (左室拡張末期径 - 左室収縮末期径) / 左室拡張末期径として求め、等容拡張時間はⅡ音大動脈成分より僧帽弁開放点までの時間を等容拡張時間として求めた。図2に僧帽弁弁輪部における左室流入期速度波形を示す。左室

流入速度波形からは急速流入期最大速度 (E), 心房収縮期最大速度 (A), その比 (E/A), 急速流入期最大速度から基線に達するまでの時間, 減速時間 (deceleration time, DT) を測定した。計測値は連続する6心拍を平均した。

2) 負荷心筋シンチグラフィ

1週間以上休薬の上、絶飲、絶食にて運動負荷心筋シンチグラフィを施行した。運動負荷は、自転車エルゴメータ EL405 (健部清州堂, 東京) を用い、仰臥位にて 25W より開始し、2分ごとに 25W ずつ増量する多段階運動負荷を行った。負荷の終了点は二重積 (double product, 収縮期血圧 × 心拍数) が 25×10^3 を超えることを目安とし、各患者の予測最大心拍数の75~80%に達した症例を選択した。各症例とも亜最大負荷量に達した時点で TI-201 を 2mCi 肘静脈より注入し、さらに1分間同じ負荷量にて運動を継続させ負荷終了とした。分析はγカメラ Pho/Gamma LFOV スタンドシステム (島津, 東京) により行った。撮影は5方向からなり各撮影を3分画し、それぞれ3個の関心領域 (region of interest, ROI) を設定、最大 ROI のカウント数を100%とし、各 ROI の摂取率を計算した。

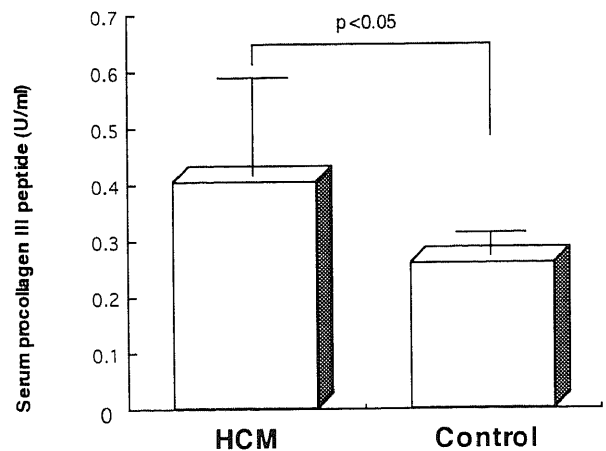


Fig. 3. Comparison of serum procollagen III peptide in control subject and patients with hypertrophic cardiomyopathy.

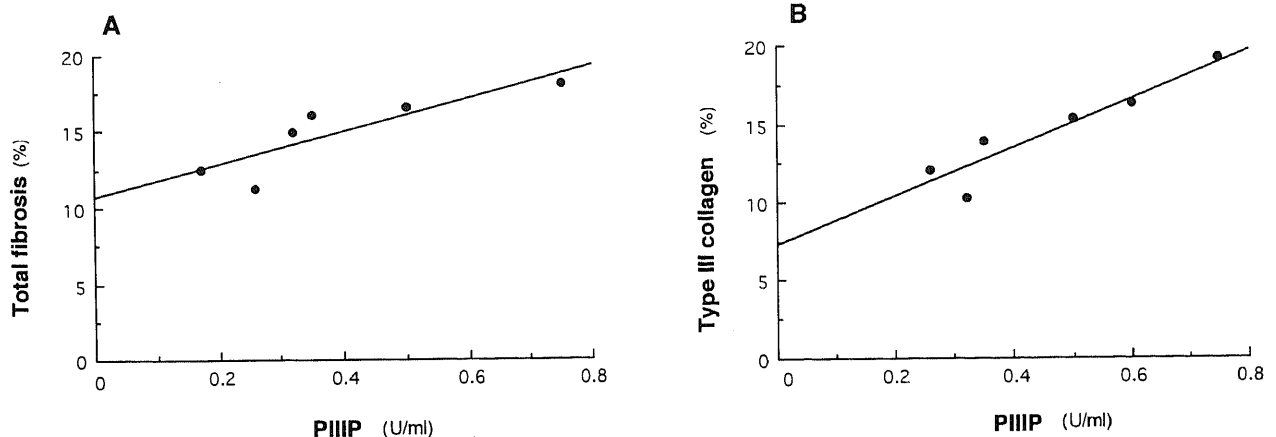


Fig. 4. Relationships between serum procollagen III peptide and total fibrosis (A) or type III collagen (B) in patients with hypertrophic cardiomyopathy. Statistically significant positive correlations are shown between serum procollagen III peptide, total fibrosis and type III collagen. In total fibrosis (A), the regression equation is $Y=10.6X+10.7$ and the coefficient of correlation is $r=0.85$ ($p<0.01$), and in type III collagen (B), the regression equation is $Y=15.6X+7.3$ and the coefficient of correlation is $r=0.94$ ($p<0.01$).

TI-201 スキャン異常陽性像 (positive) は、ROI のうち1ヶ所以上が75%以下の摂取率を示すものとし、75%以上の摂取率を陰性像 (negative) とした。バックグラウンドは各方向ごとに近接する肺野のカウントとし、コンピュータはシンチパック230を使用した。

Ⅲ. 検定法

成績はすべて平均値と標準偏差で示した。HCM 群と対照群の各データの平均値の検討および負荷心筋シンチグラフィの検討は、対応のない場合の t 検定 (unpaired t-test) を用い、血清 PⅢP 値と組織学的データ、血清 PⅢP 値と心機能の諸指標との関係は、Pearson の相関係数、および回帰分析を用いて検討した。危険率 $p < 0.05$ を有意差ありとして判定した。

成 績

表1に示すごとく、年齢、心拍数、収縮期血圧、拡張期血圧、左室後壁厚に有意差を認めなかった。性差では男性が多く、心室中隔厚のみ HCM 群が有意に厚かった。

Ⅰ. 血清 PⅢP 値の対比検討

血清 PⅢP 値は HCM 群 $0.41 \pm 0.17 \text{ U/ml}$ 、対照群 $0.26 \pm 0.04 \text{ U/ml}$ ($p < 0.05$) で HCM 群で有意に高値であった (図3)。

Ⅱ. 血清 PⅢP 値と病理組織学的検討

心筋生検にてアザン染色、免疫組織化学染色を施行し、点-計数法で測定可能であった6例の血清 PⅢP と心筋間質の線維化との関連を検討した。血清 PⅢP は、総線維化率 ($r = 0.85$, $p < 0.01$)、および総Ⅲ型コラーゲン ($r = 0.94$, $p < 0.01$) と有意な正の相関を示したが (図4)、血清 PⅢP と筋周膜の線維化率、および筋内膜の線維化率との間には有意な相関を認めなかった。また血清 PⅢP は、筋周膜のⅢ型コラーゲン ($r = 0.98$, $p < 0.01$) および筋内膜のⅢ型コラーゲン ($r = 0.78$, $p < 0.05$) と有意な正の相関を示した (図5)。

Ⅲ. 臨床的意義

1. 心機能との対比検討

Mモード心エコー図より求めた %FS を収縮期指標として用い、また IRT を拡張早期指標として用いて血清 PⅢP 値との関

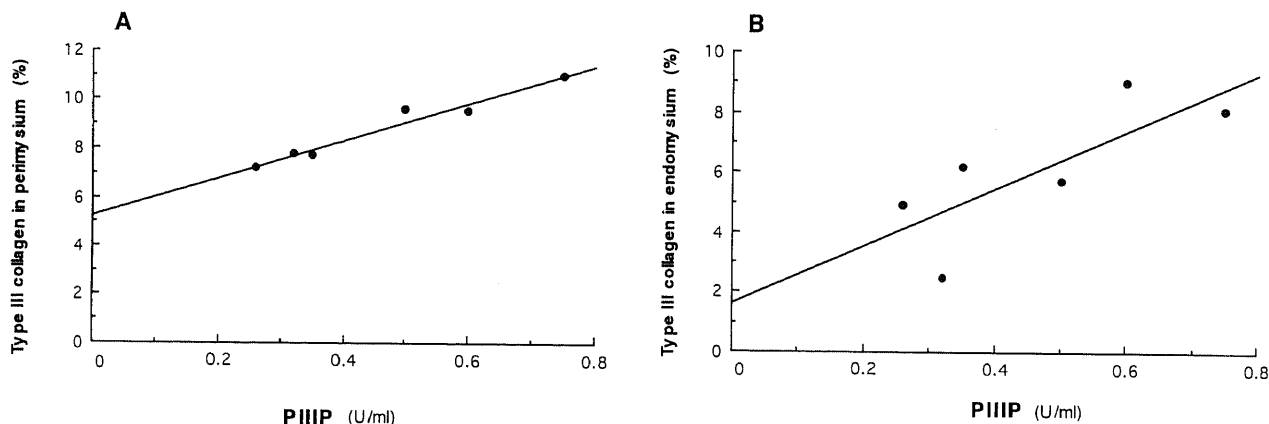


Fig. 5: Relationships between serum procollagen III peptide and type III collagen in perimysium (A) or type III collagen in endomysium (B) in patients with hypertrophic cardiomyopathy. Statistically significant positive correlations are shown between serum procollagen III peptide, type III collagen in perimysium and type III collagen in endomysium. In type III collagen in perimysium (A), the regression equation is $Y = 7.6X + 5.3$ and the coefficient of correlation is $r = 0.98$ ($p < 0.01$), and in type III collagen in endomysium (B), the regression equation is $Y = 9.6X + 1.6$ and the coefficient of correlation is $r = 0.78$ ($p < 0.05$).

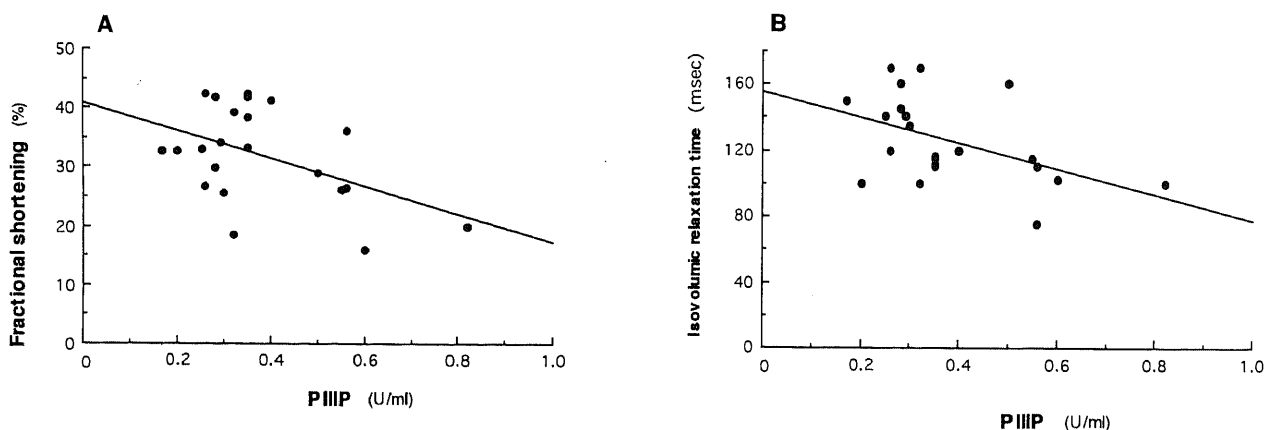


Fig. 6: Relationships between serum procollagen III peptide and percentage of fractional shortening (A) or isovolumic relaxation time (B) in patients with hypertrophic cardiomyopathy. Statistically significant negative correlations are shown between serum procollagen III peptide, percentage of fractional shortening and isovolumic relaxation time. In percentage of fractional shortening (A), the regression equation is $Y = -25.3X + 41.0$ and the coefficient of correlation is $r = 0.46$ ($p < 0.05$), and in isovolumic relaxation time (B), the regression equation is $Y = -77.8X + 155.1$ and the coefficient of correlation is $r = 0.47$ ($p < 0.05$).

係を検討した。%FSと血清PⅢPとの間には有意な負の相関を認め($r=-0.46, p<0.05$) IRTと血清PⅢPとの間には有意な負の相関($r=-0.47, p<0.05$)がみられた(図6)。ドプラー心エコー図から得られたE, A, E/A, そしてDTはHCM群と対照群とでは有意差を示さなかった(表1)。

2. 負荷心筋シンチグラフィ所見と血清PⅢP(図7)

HCM群における負荷心筋シンチグラフィと血清PⅢPの対比では、血清PⅢP値は負荷心筋シンチグラフィ陽性症例(11例)で $0.48\pm 0.19\text{U/ml}$ 、陰性症例(12例)で $0.33\pm 0.14\text{U/ml}$ であり、陽性症例で有意に血清PⅢP値が高値であった。

考 察

コラーゲンは分子量30万の巨大分子で、電顕的に、直径1.5nm、長さ300nmの桿状体として観察され、細胞外マトリックスとなる線維蛋白の主成分として、生体内に広く分布している。分子量10万の3本のペプチド鎖(α 鎖)の三重らせん構造を形成している。 α 鎖のアミノ酸配列の違いと組み合わせにより、コラーゲンは、type I~type XIIIの13型に分類されている。プロコラーゲンペプチドは、コラーゲンが生成される際に前駆体であるプロコラーゲンからプロコラーゲンペプチターゼの作用により細胞外で切り離されるペプチドで、コラーゲンのN末端とC末端に、非コラーゲン性球状蛋白として結合している。Ⅲ型プロコラーゲンのN末端ペプチドは、分子量約45,000で三重らせん構造を持つコラーゲン部分と非コラーゲン部分から成り、血液中に可溶成分として存在している¹³。血清PⅢPの測定法はRohdeら⁷によりウシ皮膚より分離精製され、そのポリクローナル抗体によるRIA法が開発された。当初の方法に関してはNiemela¹⁴によれば血清PⅢPには分子多様性があり、これが制御曲線(inhibition curve)に影響し、複雑な方法を必要とし、なおかつ定量性に問題を残すとされていた。その後PⅢPのFabに対する抗体を用いたPⅢP(Fab)法が開発されたが¹⁵、臨床的有用性が低く、広く用いられることはなかった。それに対し今回使用した測定法は、ウシの皮膚組織より精製されたPⅢPをマウスに免疫して得られたモノクローナル抗体を用いたRIA法である。この測定法では希釈の必要はなく、わずか20 μl で測定が可能であり、実際の測定は従来法とは比較にならないほど短時間で測定が可能である。新しい測定法によるPⅢP濃度は慢性肝疾患において、線維化のマーカーとして意義が認められているラミニンと正の相関があることが示されている¹⁶。わが国においては最も早く臨床に応用された肝線維化マーカーであり、一般的にはアルコール性および非アルコール性肝障害において肝線維化の程度を反映した血清PⅢP濃度の上昇がみられる¹⁶。Ⅲ型コラーゲンは結合組織や大血管に広く分布しており、組織の線維化にともなって沈着しており、PⅢPは組織の線維化の進展を観察するのに有用であるとされている⁸。また骨髄線維症¹⁷やPaget病¹⁸、リウマチ性関節炎¹⁹、肺線維症²⁰、サルコイドーシス²⁰などでも線維化の進展の良い指標として報告されている。Shimizuら²¹は12例の糖尿病患者に心筋生検を施行し、抗コラーゲン抗体を用いた免疫組織学的検討を行い、糖尿病心におけるコラーゲンのリモデリングはおもに筋周膜や血管周囲のⅢ型コラーゲンの増加によると報告している。糖尿病においては、また血清PⅢPの上昇も報告されており⁸、これは心筋内微小循環障害の進展に伴い血管のコラーゲンの沈着が増加すると考えられているが、一方インスリンが生体外の培養線維芽細胞におけるグリコーゲン合成²²や線維芽細胞のコラーゲン合成を刺激するという報告²³や、インスリンに関連した免疫機構がコラーゲンの合成を促進するという報告もなされている²⁴。心疾患と血清PⅢP値に関する検討ではBonnetら⁹は虚血性心疾患36例と健康人35例で血清PⅢPを比較検討し、虚血性心疾患例では有意に血清PⅢPは高値であるが、冠動脈硬化の重症度や危険因子とは相関関係はなかったと報告している²⁴。この理由として動脈硬化におけるPⅢPの合成が多様であり、動脈硬化の進展時期に相違があるためと考えている。またJensenら¹⁰は16例の心筋梗塞の血清PⅢPを連続的に測定し、血清PⅢPは梗塞後2~3日目より上昇し始め、4ヶ月以降も上昇し続け、梗塞後3~7ヶ月までピーク値を呈すると報告した。彼らはこの結果よりPⅢPは心筋梗塞における組織修復過程、炎症の初期の治癒過程を反映し、心筋梗塞の治癒過程に関連した情報が得られる可能性を示唆している。

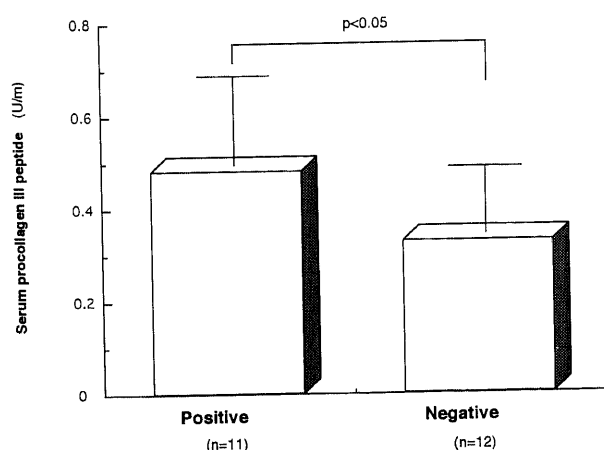


Fig. 7. Comparison of serum procollagen III peptide with and without thallium-201 scintigraphic abnormality in patients with hypertrophic cardiomyopathy. Positive, patients with thallium-201 scintigraphic abnormality; negative, patients without thallium-201 scintigraphic abnormality.

肥大型心筋症における血清PⅢPに関する報告は現在までのところみあたらないが、今回著者の行なった肥大型心筋症と対照群におけるPⅢPの比較では、肥大型心筋症群においてPⅢPの有意な上昇を認めた。

次にこのPⅢPが心筋間質の線維化との程度関連があるかを検討したところ、PⅢPと心筋の総線維化率の間には有意な相関を認め、PⅢPはある程度心筋線維化を反映し得るものと考えられた。PⅢPはコラーゲン合成中に放出され、その過程の指標として有用であるとされており、PⅢPの急速な変化もⅢ型コラーゲンの分解に影響を受けると言われている²⁵。PⅢPと右室心内膜心筋生検より求めたⅢ型コラーゲンとは有意な相関を認め、また筋周膜、筋内膜のⅢ型コラーゲンとも有意な相関を認めたことから、このPⅢPは心筋のⅢ型コラーゲンの合成、代謝を反映しているものと考えられた。したがってPⅢPにより心筋間質の線維化、ならびに心筋におけるⅢ型コラーゲンの推測が可能と考えられた。

心筋症におけるコラーゲンの意義に関しては全く不明であるが、圧負荷を伴う心肥大の過程においては、コラーゲンの合

成、線維芽細胞の増殖、間質の構築や生化学的变化がみられる⁹⁾。ヒト拡張型心筋症では病理組織学的所見よりⅢ型コラーゲンの比率が増加していることが報告されており²⁷⁾、このⅢ型コラーゲンの増加が心筋症の病因あるいは病態の進行に関与している可能性が推定されている。また、Ⅲ型コラーゲン優位の心筋では内腔が拡張し、壁が非薄化するとともに心機能が低下する可能性も示唆されている⁹⁾。

肥大型心筋症の自然歴ならびに臨床像は多様であり、突然死例、心房細動例、壁の非薄化を伴う左室拡大例、びまん性の左室壁肥大を示す左室拡大例、左室流出路狭窄消失例、形態不変例などがある。このような状況の中、左室の拡大と心筋の収縮機能低下を示すようになり、心不全を発症する症例が報告されている²⁸⁾。初診時、閉塞性肥大型心筋症であった症例が心電図変化とともに徐々に変化をし非閉塞性肥大型心筋症となり拡張型心筋症様病態を示し、突然死をきたした症例も報告されている⁹⁾。組織所見では全体が貫壁性の心筋線維化を示しており、微小血管の狭窄と内膜の肥厚を伴っていた。Maron ら²⁹⁾は正常の表在冠動脈であるにもかかわらず貫壁性の心筋の線維化を示し、心室の拡張を認めた肥大型心筋症の例を報告し、心筋間質線維化に対してこの線維化を交代線維化 (replacement fibrosis) と説明している。心室の収縮力低下には心筋の線維化が強く関与していることが推測されている。線維化面積率は拡張能の指標である正規化急速流入速度と逆相関を示し、左室拡張末期径と正相関を示すと報告されている³⁰⁾。また、由谷らは³¹⁾、心不全症状のない肥大型心筋症の線維化面積比率は、最大6.3%であるのに対して心機能の低下した肥大型心筋症では平均約50%の著明な高値を示し、しかも拡張型心筋症とは線維化の分布が異なり、側壁、前壁、後壁、中隔の順に多かったとしている。このような過剰な線維化は、肥大型心筋症の収縮、拡張機能低下に大きく関与しているものと推察される。

今回の検討で求められた PⅢP と収縮能の指標である左室径短縮率との間には有意な負の相関がみられ、心筋の間質の線維化、Ⅲ型コラーゲンの増加に伴い、左室収縮能も低下すると考えられた。一般的に肥大型心筋症における拡張機能は障害されており、等容拡張時間の延長が認められるが、病変の進行、収縮機能の障害にもなって拡張期諸指標は偽正常化するとされており、PⅢP と等容拡張時間との間に有意な負の相関がみられたことや、E波高に関して肥大型心筋症と対照群との間に有意差が認められなかったのは、このような理由によるものと考えられる。

広範な心筋の線維化をきたす原因として、主として心筋虚血の関与が考えられている。肥大型心筋症における心筋虚血は、過剰な心肥大に基づく相対的な心筋虚血、小血管病変、冠動脈スパズム、血栓、負荷による灌流圧の低下により生ずると推測されている。貫壁性の線維化の原因として筋層内の小動脈の異常、内皮、中膜の肥厚による内腔の狭小化をあげる報告²⁸⁾もあれば、線維化部分と非線維化部分を比較すると、線維化部分で小動脈の壁肥厚が著しいとの報告もある³²⁾。森ら³³⁾は肥大型心筋症症例にジピリダモール負荷タリウム心筋シンチグラフィを施行し、不均一な肥厚部位に灌流欠損を認めた群は灌流欠損を認めない群に比べ心室中隔の線維化率が高く、肥大型心筋症における冠予備能の低下と線維化および心機能の低下との関連を報告し、その機序として小血管病変の異常の可能性を示唆している。また肥大型心筋症症例の約50%の症例に心筋肥厚部位

を中心として一過性欠損像が認められベラパミル投与により一過性欠損像が消失することから肥大型心筋における相対的血管床の減少、冠拡張予備能の低下などを推測する報告もある³⁵⁾。今回の検討で、負荷心筋シンチにて灌流欠損を認めた症例と灌流欠損を認めない症例とで PⅢP を比較検討すると、灌流欠損を認めた症例で有意な PⅢP の上昇を認めた。このことから肥大型心筋症のなかでも線維化やコラーゲンの増加を伴う症例では心筋虚血が存在することが示唆され、上記の報告と合致する結果であった。

肥大型心筋症の心室拡張と収縮不全を生じると考えられる過剰な心筋間質の線維化の原因としては心筋虚血がその一因と考えられるが、そのほか多様な要因の影響が考えられる。肥大型心筋症においては非常に広いスペクトルをもった疾患だけにさらに症例の蓄積をし、慎重な観察が必要と思われる。心エコー図で肥大型心筋症の包括的な形態は把握することは可能であるが、光顕レベルの病理組織学的な検討は、何度も繰り返し施行することは不可能である。今回の著者の検討結果より血清 PⅢP は肥大型心筋症における心筋間質線維化の増大やコラーゲンの増加を反映しており、血清 PⅢP を測定することにより、簡便に今後の肥大型心筋症の進行をある程度予想することが可能であり、臨床的にも肥大型心筋症の線維化の進行に伴う病態の推移を把握する上で極めて有用であると考えられた。

結 論

肥大型心筋症における血清 PⅢP の病理組織学像との関連性ならびに臨床的意義を明らかにすることを目的に、血清 PⅢP を RIA 法にて測定し、PⅢP と生検心筋から得られた心筋間質の線維化とⅢ型コラーゲンとの関連性を検討し、また心エコー図から求めた左心機能各指標や負荷心筋シンチグラフィの結果との関係について検討した。

1. 血清 PⅢP 値は対照群に比して肥大型心筋症で有意に高値であった。
2. 心筋間質線維化を筋周膜と筋内膜に分け、各部分の線維化を点-計数法を用いて定量的に求めた。血清 PⅢP は総線維化、総Ⅲ型コラーゲン、筋周膜のⅢ型コラーゲンと有意な正の相関を示した。
3. 等容拡張時間と血清 PⅢP との間には有意な負の相関を認め、%FS と血清 PⅢP との間には有意な負の相関を認めた。負荷心筋シンチグラフィにおいて灌流欠損陽性症例と灌流欠損陰性症例とについては、血清 PⅢP 値を比較した結果、灌流欠損陽性症例が、灌流欠損陰性症例に比して有意に高値であった。

これらの結果から肥大型心筋症における心筋間質の線維化の増大は血清 PⅢP にも反映されており、血清 PⅢP により心筋間質の線維化の程度を類推できると考えられた。また心筋間質の線維化の増大に伴い心機能障害が進行し、心筋内微小循環も障害される可能性が示唆された。血清 PⅢP を測定することにより、簡便に心筋間質の線維化の程度を類推することが可能であり、臨床的にも肥大型心筋症の線維化の進行に伴う病態の推移を把握する上で有用である可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜りました恩師、金沢大学医学部第二内科、竹田亮祐教授に深甚なる謝意を表します。また終始、御指

導頂きました金沢大学医学部第二内科、清水賢巳講師に深く感謝し、本研究の遂行に際し、多大な御協力を頂きました小松市民病院、杉原範彦博士、金沢大学医学部第二内科循環器グループ各位に感謝いたします。また、検体に関し御協力頂いた福井心臓血圧センター福井循環器病院院長、大中正光先生および諸先生方に感謝いたします。

なお、本論文の要旨は、第56回、第57回日本循環器学会総会にて発表した。

文 献

- 1) Wigle, E. D., Sasson, Z. & Henderson, M. A.: Hypertrophic cardiomyopathy: the importance of the site and extent of hypertrophy: a review. *Prog. Cardivas. Dis.*, 28, 1-83 (1985).
- 2) Maron, B. J., Bonow, R. O., Cannonn, R. O., Leon, M. B. & Epstein, S. E.: Hypertrophic cardiomyopathy: interrelations of clinical manifestations, pathophysiology, and therapy. *N. Engl. J. Med.*, 316, 780-789 (1987).
- 3) Ohsato, K., Shimizu, M., Sugihara, N., Konishi, K. & Takeda, R.: Histopathological factors related to diastolic function in myocardial hypertrophy. *Jpn. Circ. J.*, 56, 325-333 (1992).
- 4) Fananapazir, L., Chang, A. C. & Epstein, S. E.: Prognostic determinants in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*, 86, 730-740 (1992).
- 5) Horita, Y., Shimizu, M., Sugihara, N., Suematsu, T., Shibayama, S., Hideaki, I., Takeda, R. & Terada, T.: An autopsy case of hypertrophic cardiomyopathy showing dilated cardiomyopathy-like features by serial ventriculography. *Jpn. J. Med.*, 29, 448-453 (1990).
- 6) Weber, K. T.: Cardiac interstitium in health and disease: The fibrillar collagen network. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 13, 1637-1652 (1989).
- 7) Rohde, H., Vargas, L., Hahn, E. G., Kalbfleisch, H., Breguera, M. & Timple, R.: Radioimmunoassay for the type III procollagen peptide and its application to human liver disease. *Eur. J. Clin. Invest.*, 9, 451-459 (1979).
- 8) Trriolo, G., Giardina, E., Zarcione, M. R., Seddio, G. & Bompiani, G. D.: Serum levels of type III procollagen peptide in diabetes mellitus. *Horm. metabol. Res.*, 21, 77-80 (1989).
- 9) Bonnet, J., Garderes, P. E., Aumailley, N., Moreau, C., Gouverneur, G., Benchimol, D., Crockett, R., Larrue, J. & Bricaud, H.: Serum type III procollagen peptide levels in coronary artery disease (a marker of atherosclerosis). *Eur. J. Clin. Invest.*, 18, 18-21 (1988).
- 10) Jensen, L. T., Petersen, K. H., Toft, P., Bentsen, K. D., Grande, P., Simonsen, E. E. & Lorenzen, I.: Serum aminoterminal type III procollagen peptide reflects repair after acute myocardial infarction. *Circulation*, 81, 52-57 (1990).
- 11) Report of the WHO/ISFC task force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Br. Heart. J.*, 44, 672-673 (1980).
- 12) The Criteria Committee of in New York Heart Association: Nomenclature and Criteria for Diagnosis of Disease of the Heart and Great Vessels, 7th ed., p83, Little Brown & Co., Boston, 1973.
- 13) Fessier, J. H. & Fessier, L. I.: Biosynthesis of procollagen. *Ann. Rev. Biochem.*, 47, 129-162 (1978).
- 14) Niemela, O., Risteli, L. & Sotaniemi, E. A.: Heterogeneity of the antigen related to the aminoterminal peptide of type III procollagen in human serum. *Clin. Chin. Acta.*, 124, 39-44 (1982).
- 15) 松田芳郎, 安原 稔, 高田 昭: アルコール性肝疾患における血清の肝線維化指標について. *最新医学*, 42, 2026-2030 (1987).
- 16) 中山 一, 山内真義, 水原祐治, 大畑 充, 平川淳一, 中島尚登, 中原正雄, 北原敏久, 小倉和雄, 木村和夫, 亀田治男: 新しく開発された monoclonal 抗体を用いた血清 type III procollagen N-peptide 濃度測定法の有用性について. *肝胆膵*, 22, 317-323 (1991).
- 17) Hasselbach, H., Junker, P., Lisse, K., Risteili, L. & Risteli, J.: Serum markers for type IV collagen and type III procollagen in the myelofibrosis-osteomyelosclerosis syndrome and other chronic myeloproliferative disorders. *Am. J. Haematol.*, 23, 101-111(1986).
- 18) Simon, L. S., Krane, S. M., Wortman, P. D., Krane, I. M. & Kovitz, K. L.: Serum levels of type I and III procollagen fragments in Paget's disease of bone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 58, 110-120 (1984).
- 19) Hørslev-Peterson, K., Bentsen, K., D., Junker, P. & Lorensen, I.: Serum type III procollagen peptide in rheumatoid arthritis. Relation to disease activity, treatment and development of joint erosions. *Arthritis Rheum.*, 29, 592-599 (1986).
- 20) Robert, B. Low., Kenneth, R. C., Gerald, S. D. & Michael, S. G.: Lavage type III procollagen N-terminal peptides in human pulmonary fibrosis and sarcoidosis. *Lab. Invest.*, 48, 755-759 (1983).
- 21) Shimizu, M., Umeda, K., Sugihara, N., Yoshio, H., Ino, H., Takeda, R., Okada, Y. & Nakanishi, I.: Collagen remodelling in myocardia of patients with diabetes. *J. Clin. Pathol.*, 46, 32-36 (1993).
- 22) Craig, J. W., Huang, L. S. & Lerner, J.: Insulin stimulation of glycogen synthetase activity in cultured human fibroblasts from diabetic and control subjects. *Diabetologia.*, 18, 109-113 (1980).
- 23) Kjellstom, T. & Malmquist, J.: Insulin effects on collagen and protein production in cultured human skin fibroblasts from diabetic and non-diabetic subjects. *Horm. Metabol. Res.*, 16, 168-171 (1984).
- 24) Komori, K., Nakayama, H., Aoki, S., Kuroda, Y., Tsushima, S. & Nakagawa, S.: Effects of anti-insulin antibody on insulin binding to liver membranes: evidence against antibody-induced enhancement of insulin binding to the insulin receptor. *Diabetologia*, 29, 447-452 (1986).
- 25) Robert, L. J., Szendrol., Goeau, G. & Robert, L.: Comparative distribution patterns of type I and III collagens and fibronectin in human arteriosclerotic aorta. *Pathol. Biol.*

- 33, 261-266 (1985).
- 26) Hørslev-Petersen, K., Kim, K. Y., Pedersen, L. R., Bentsen, K. D., Uldbjerg, N., Oxlund, H., Garbarsch, C., Hahn, E. G., Schuppan, D. & Lorenzen, I.: Serum aminoterminal type III procollagen peptide: Relation to biosynthesis of collagen type III in experimental induced granulation tissue in rats. *Acta. Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.*, **96**, 793-804 (1988).
- 27) Weber, K. T., Pick, R., Janicki, J. S., Gadodia, G. & Lakier, J. B.: Inadequate collagen tethers in dilated cardiomyopathy. *Am. Heart. J.*, **116**, 1641-1646 (1988).
- 28) Fujiwara, H., Onodera, T. & Tanaka, M.: Progression from hypertrophic obstructive cardiomyopathy to typical dilated cardiomyopathy like features in the end stage. *Jap. Circ. J.*, **48**, 1210-1214 (1984).
- 29) Maron, B. J., Epstein, S. E. & Roberts, W. C.: Hypertrophic cardiomyopathy and transmural myocardial infarction without significant atherosclerosis of the extramural coronary arteries. *Am. J. Cardiol.*, **43**, 1086-1102 (1979).
- 30) 江本隆一, 横田慶之, 三木 隆, 野村秀樹, 三木隆彦, 薄木成一郎, 周 湘台, 黒住泰明, 瀬尾俊彦, 福崎 恒: 肥大型心筋症の予後: 死亡30例の心エコー図ならびに病理組織所見の検討. *J. Cardiol.*, **18**, 695-703 (1988).
- 31) 由谷親夫, 植田初江: 肥大型様より拡張型様に移行する心筋症とその分析 (1) 病理的考察. *臨床化学*, **22**, 1522-1531 (1987).
- 32) 藤原久義, 河合忠一: 肥大型心筋症から拡張型心筋症への移行. *内科*, **54**, 57-63 (1984).
- 33) 森 孝夫, 須田研一郎, 大西正孝, 加納康至, 塩谷英之, 横田慶之, 藤谷和大, 福崎 恒, 前田和美: ジピリダモール負荷 Tl-SPECT による非閉塞性肥大型心筋症の病態評価: 拡張型心筋症類似肥大型心筋症との比較検討. *J. Cardiol.*, **17**, 35-46 (1987).
- 34) 西村常彦, 永田正毅, 植原敏勇, 林田孝平, 小塚隆弘, 榊原 博: 肥大型心筋症におけるタリウム心筋灌流異常に関する検討. *核医学*, **24**, 1365-1369 (1987).

Procollagen III Peptide in Hypertrophic Cardiomyopathy Kazuo Ohsato, Department of Internal Medicine (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Jusen Med Soc., **102**, 1012—1020 (1993)

Key words hypertrophic cardiomyopathy, procollagen III peptide (P III P), interstitial fibrosis, cardiac function, myocardial ischemia

Abstract

Histopathology of the heart obtained from patients with hypertrophic cardiomyopathy (HCM) who died suddenly, revealed that the whole transmural muscular layer had changed to massive fibrosis and small arteries had developed severe stenosis due to intimal thickening. Type III collagen is synthesized as a precursor from procollagen, which contains additional peptide extensions at the aminoterminal ends of the molecule. This peptide is cleaved off by specific enzymes when procollagen is converted into collagen, and it has been suggested that the serum assay for the peptide of procollagen III peptide (P III P) may be useful for monitoring the development of fibrosis. The aim of the present study was to evaluate the relationship between myocardial interstitial fibrosis and P III P determined by radioimmunoassay technique, and the clinical significance of P III P in 23 patients with HCM and 10 patients with controls. Hypertrophic cardiomyopathy exhibited significantly increased serum P III P as compared with controls. The P III P correlated significantly to the amount of total type III collagen, type III collagen in perimysium and type III collagen in endomysium obtained by myocardial biopsies. In M-mode echocardiography, significant correlations were observed between serum P III P and isovolumic relaxation time, and between serum P III P and the percentage of fractional shortening. In the Tl-201 stress scintigraphic findings, the level of P III P in positive cases was significantly higher than that in negative cases. Therefore the increase of myocardial interstitial fibrosis was found to be reflected in the serum P III P level. The degree of myocardial interstitial fibrosis and the amount of collagen may be able to be analogized by serum P III P level. Cardiac function and microcirculation in hypertrophic cardiomyopathy appeared to be injured with the increase of myocardial interstitial fibrosis. Serum P III P may be useful to increase understanding of the transition of the condition with the progression of myocardial interstitial fibrosis in hypertrophic cardiomyopathy.