

新生仔ウサギのランゲンドルフモデルを用いたヒト自己抗体の房室伝導への影響

鈴木 博^{1,2)}, Xuejun Wu²⁾, Earl D Silverman³⁾
Robert M Hamilton²⁾

新潟大学大学院医歯学総合研究科内部環境医学講座小児科学分野¹⁾
トロント小児病院循環器科²⁾, 小児リウマチ科³⁾

Key words :

congenital heart block, autoantibody, neonatal lupus, atrioventricular block

Effects of Autoantibodies on Atrioventricular Conduction in a Neonatal Rabbit Langendorff Model

Hiroshi Suzuki,^{1,2)} Xuejun Wu,²⁾ Earl D Silverman,³⁾ and Robert M Hamilton²⁾

¹⁾Division of Pediatrics, Department of Homeostatic Regulation and Development, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata, Japan

²⁾Division of Cardiovascular Research of The Hospital for Sick Children Research Institute,

³⁾Division of Rheumatology, Department of Pediatrics, The Hospital for Sick Children, Toronto, Canada

Background: Maternal autoantibodies are considered to be pathogenic in inducing the conduction disorder of autoimmune congenital heart block (CHB). Experiments using Langendorff methods demonstrated exposure to sera from a CHB mother induced acute cardiac conduction disorder, suggesting that maternal antibody-induced acute disorder of AV conduction initiates developing CHB. We sought to quantify the effect of CHB-associated sera on atrioventricular conduction and compare it among different types and sources of sera in a neonatal rabbit Langendorff model.

Methods: We assessed sera from 4 different sources: 1) 6 anti-Ro and/or anti-La antibodies-positive patients who have a child with CHB, 2) 7 anti-Ro and/or anti-La antibodies-positive patients who do not have a child with CHB, 3) 6 anti-Ro and anti-La antibodies-negative patients with autoimmune disease, 4) 3 healthy volunteers. From group 1, we also assessed IgG and IgG-depleted fractions in both maternal and umbilical cord sera. With exposure of neonatal Langendorff rabbit hearts with each serum, Wenckebach cycle length (WBCL) was measured during progressive atrial pacing to quantify the atrioventricular conduction.

Results: Only sera from patients who have a child with CHB significantly prolonged WBCL. The IgG fraction from maternal sera produced the greatest effect on WBCL prolongation. Umbilical cord sera had less effect on the conduction system than maternal sera, and not only the IgG fraction but also the IgG-depleted fraction from CHB-associated sera affected the conduction system.

Conclusion: By applying WBCL in a Langendorff model, we successfully demonstrated measurable atrioventricular conduction disorder with exposure to CHB-associated sera or IgG. These results imply that only sera from mothers delivering CHB children may produce acute conduction damage.

要 旨

背景：先天性完全房室ブロック (congenital heart block : CHB) と母由来の自己抗体との関連が知られている。患児の母の血清がランゲンドルフ心の房室伝導を急性に抑制することが示され、母体抗体による急性房室伝導抑制がCHBの引き金と推察されている。

方法：新生仔ウサギランゲンドルフ心にさまざまなヒト血清を灌流させてWenckebach cycle length (WBCL) を測定し、房室伝導に与える影響を定量的に評価、比較する。第1の実験では1) 抗Ro, 抗La抗体陽性でCHB児の母, 2) 抗Ro, 抗La抗体陽性だがCHB児をもたない母, 3) 抗Ro, 抗La抗体陰性の自己免疫疾患患者, 4) 健康者, の血清を比較した。第2の実験ではCHB児の臍帯血清とその母の血清を、それぞれIgG成分とそれ以外の成分に分けて比較した。

結果：第1の実験ではCHB児の母の血清のみがWBCLを有意に延長させた。第2の実験では母のIgG成分がWBCLを最も延長させ、臍帯と母ともにIgG成分だけでなく、IgG以外の成分でもWBCLを延長させた。

平成19年1月23日受付

別刷請求先：〒951-8510 新潟市旭町通 1-757

平成19年10月4日受理

新潟大学大学院医歯学総合研究科内部環境医学講座小児科学分野 鈴木 博

結論：ランゲンドルフ心のWBCLを測定し、CHBに関連したヒト血清が房室伝導に与える影響を定量的に評価することができた。CHB児の母の血清が特異的に房室伝導の急性障害を引き起こすことが示唆された。

はじめに

胎盤を介して胎児に移行する母体の抗Ro抗体、抗La抗体が先天性完全房室ブロック(congenital heart block : CHB)の成因に関与していることが推察されているが、これらの抗体が陽性の母親からでさえCHBの発生頻度は1.6%と低い¹⁾。より特異的な抗体の発見が俟たれるが、それにはさまざまな血清成分の比較検討が有用と考えられる。

CHB患児の母の血清を動物^{2,3)}やヒト胎児⁴⁾のランゲンドルフ心に暴露させ房室ブロックを引き起こす実験がなされ、自己抗体による急性の房室伝導抑制が房室結節の不可逆的变化の引き金と推察されている。しかし今までの実験では房室ブロックが定量化されないため異なる血清成分の比較は困難であった。

Wenckebach cycle length(WBCL)は、房室伝導の定量的評価法として臨床や基礎研究で広く用いられている。

今回われわれは、新生仔ウサギのランゲンドルフ心にさまざまな血清を灌流させWBCLを測定し、血清が引き起こす急性の房室伝導障害を定量的に評価し、さまざまな血清の比較を試みた。

方 法

1. 新生仔ウサギランゲンドルフモデル

われわれの実験は、米国の国立保健研究所による『Guide for the Care and Use of Laboratory Animals』に則って行われた。新生仔ウサギ(4~10生日、体重66~124g)にケタミン25mg/kgの筋注による沈静、ヘパリン300単位/kgの腹腔内投与による抗凝固とペントバルビタール30mg/kgによる麻酔を行った。麻酔が十分に効いていることを確認したうえで開胸し、速やかに心臓を取り出し、1.6mm大動脈カニューラに吊るした。O₂95%とCO₂5%の混合ガスでバブリングしたKrebs-Henseleit溶液を37°Cに保ち、60cm水柱の定圧で摘出心に灌流させた。30分間血液を洗い流し、安定化させた後、Krebs-Henseleit溶液を再循環させたうえで血清や血清成分を同溶液に加えた。これまでの報告では²⁻⁶⁾、正常血清の1/10~50のIgG濃度で検討されているため血清や血清成分容量は、溶液との比が1:30となるようにした。30分間血清灌流をさせたのちに、30分間新鮮なKrebs-

Henseleit溶液で血清を洗い出した。

2. 血 清

第1の実験として、CHB患児の母の血清とほかのさまざまな血清を比較した。以下の4群の血清を用いた。1) CHB群では、CHBの子どもをもつ母親6名、6名全員が抗Ro抗体陽性で、うち3名が抗La抗体陽性であった。2) Non-CHB群では、子どもはCHBではないが、抗Ro抗体、抗La抗体ともに陽性の母親7名。3) Autoimmune群では全身性エリテマトーデス患者4名と若年性関節リウマチ患者2名の計6名。いずれの患者も抗Ro抗体、抗La抗体ともに陰性であった。4) Normal群は健康な子どもをもつ抗Ro抗体、抗La抗体ともに陰性の母親3名。

第2の実験として、6名のCHB患児臍帯血とその母体血の血清成分を、それぞれIgGとIgG以外の血清成分に分けて計4群で比較した。

IgG成分精製するにはHitrap Protein G Column (Amersham Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ)を用いた。pH 7.0に調整した血清をシリンジを用いてHitrap Protein G Columnに通し、ろ過したものをIgG以外の血清成分、ろ過されたものをIgG成分とし、それぞれが同容量となるよう調整した。

3. 電気生理学的プロトコル

ペーシングと記録のため心室と心房に電極 (Model6500, Medtronic, Inc., Minneapolis, MN) を装着した。心房電極は左右心耳に、心室電極は左右の自由壁に装着した。

まず洞調律を心房電極で記録 (Fig.1A)、次にプログラム刺激装置 (Model5325, Medtronic, Inc.) を用いて心房電極でペーシングを行い心室電極の記録によりWBCLを測定した (Fig. 1B)。記録は、血清灌流直前と灌流後は5分ごとに行った。WBCLは1:1の房室伝導が欠落する最低のcycle lengthとした。

4. 統 計

血清灌流直前の各群間の比較はone-way ANOVAsで行った。各群内での変化の比較は、one way-repeated measure ANOVAsで行った。各測定時の群間の比較はStudent's unpaired t-testまたはone-way ANOVAsを適宜用いて行った。測定値は平均 ± 標準誤差で示し、p < 0.05

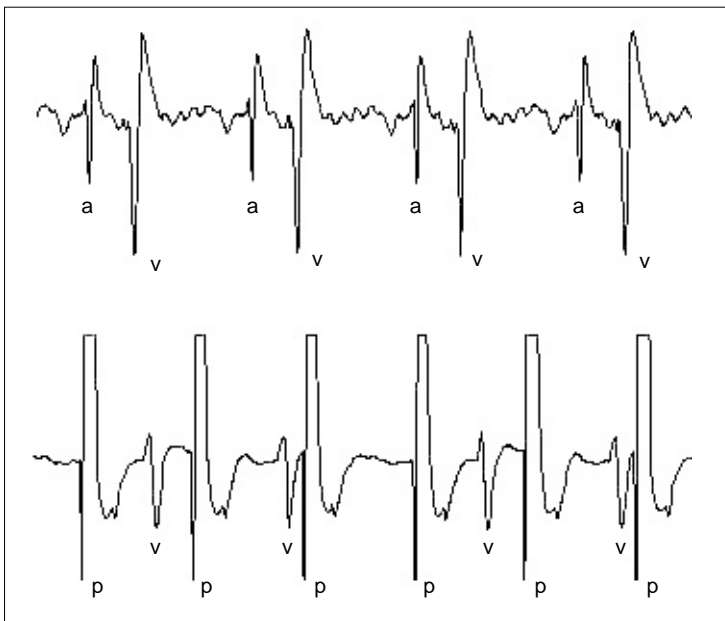


Fig. 1 Panel A demonstrates a recording of intrinsic rhythm from atrial wires. a = the atrial electrogram, v = the ventricular electrogram. Time scale is in seconds. The intrinsic sinus cycle length, heart rate, and atrioventricular conduction time can be measured. Panel B demonstrates a recording from the ventricular wires following atrial pacing. p = the far field atrial pacing spike, v = the ventricular electrogram. The first and second atrial paced beats (p) demonstrate a prolonging conduction interval (p-v), following which the third atrial paced beat does not conduct to the ventricle. The longest pacing interval resulting in this pattern is termed the atrioventricular Wenckebach cycle length, and is a standard measure of clinical and experimental atrioventricular conduction disorder.

を有意と判定した。

結 果

第1の実験では、CHB群と他の3群を比較した(Table 1, Fig. 2)。4群間に血清灌流前のWBCL値に差はなかった。CHB群のみでWBCLが血清灌流により有意に変化した($p < 0.05$)。CHB群では血清灌流前に比し血清灌流15分後で有意にWBCLが延長した($p < 0.05$)。また血清灌流15分後のWBCLはNormal群やAutoimmune群に比しCHB群が有意に延長していた($p < 0.01$)。さらにCHB群のWBCLは、洗い出し後に延長の有意な回復がなく、Normal群やAutoimmune群に比し有意に延長していた($p < 0.05$)。一方、他の3群でWBCLの有意な変化はなかった。灌流前のRR間隔は4群間に差はなく、全群合わせた平均は 233 ± 10 msであった。血清灌流により統計的に有意なRR間隔延長を認めた群はなかったが、CHB群の2心で洞徐脈(RR間隔が灌流前に比し1.3倍以上延長)を認めた。灌流前のPR間隔は4群間に差はなく、全群合わせた平均は 75 ± 6 msであった。血清灌流により有意なPR延長を認めた群はなく、II°以上の房室ブロックもなかった。

第2の実験ではCHB患児臍帯血とその母体血の血清成分を、それぞれIgGとIgG以外の血清成分に分けて、計4群で比較した(Table 2, Fig. 3)。血清灌流前のWBCLに4群で差はなく、4群すべてで有意な変化を示した($p < 0.05$)。母体のIgGとIgG以外の血清成分のWBCLは、血清灌流前に比し血清灌流15分後で延長した($p < 0.05$)。洗い出し後では4群すべてで血清灌流前に

比しWBCLが延長した($p < 0.05$)。

母体血と臍帯血の比較では、母体血のIgGが臍帯血のIgGに比し血清灌流15分後と洗い出し後でWBCLが有意に延長していた($p < 0.05$)。同様にIgG以外の血清成分でも、母体血が臍帯血に比し血清灌流15分後と洗い出し後でWBCLが有意に延長していた($p < 0.01$)。

IgGとIgG以外の血清成分の比較では、臍帯血のIgGがIgG以外の血清成分に比し、血清灌流15分後でWBCLが有意に延長していた($p < 0.05$)。また母体のIgGがIgG以外の血清成分に比し、洗い出し15分後でWBCLが有意に延長していた($p < 0.05$)。

考 察

われわれは、新生仔ウサギランゲンドルフ心のWBCLを測定することにより、さまざまなヒト血清成分による房室伝導障害を定量的に評価することができた。第1の実験では、CHBの母の血清のみが、急性の房室伝導障害を起こし、それは不可逆的であった。第2の実験では、CHB児の臍帯の血清成分が房室伝導に及ぼす影響は、母の血清成分に比し少なかった。また臍帯血と母体血ともにIgG成分だけでなく、IgG以外の成分でも房室伝導を障害した。

これまでに、ヒト胎児⁴や哺乳動物^{2, 3}のランゲンドルフ心にヒト血清成分を灌流させた実験が報告され、CHB患児の母のもののみでランゲンドルフ心の房室伝導が急性に障害されることが示されている。今回のわれわれの結果も同様のものとなった。単離心筋細胞^{3, 4}やカルシウムチャンネルを発現させた卵母細胞⁶)にCHB患

Table 1 Change in Wenckebach cycle length (ms) in neonatal rabbit hearts perfused by different sera. Perfusion and washout times are in minutes.

	Normal	Autoimmune	Non-CHB	CHB
n	3	6	7	6
Baseline	118 ± 3	117 ± 8	119 ± 3	118 ± 6
15' sera	120 ± 2	120 ± 5	125 ± 13	136 ± 3 ^{¶*†}
15' wash	121 ± 0	123 ± 5	124 ± 6	138 ± 8 ^{¶*†#}

Values are means ± SE. ¶: Values differ significantly from baseline value by one-way repeated ANOVA, *: p < 0.01 compared with Normal, †: p < 0.01 compared with Autoimmune, #: p < 0.01 compared with Non-CHB by 1-way ANOVA. CHB: congenital heart block

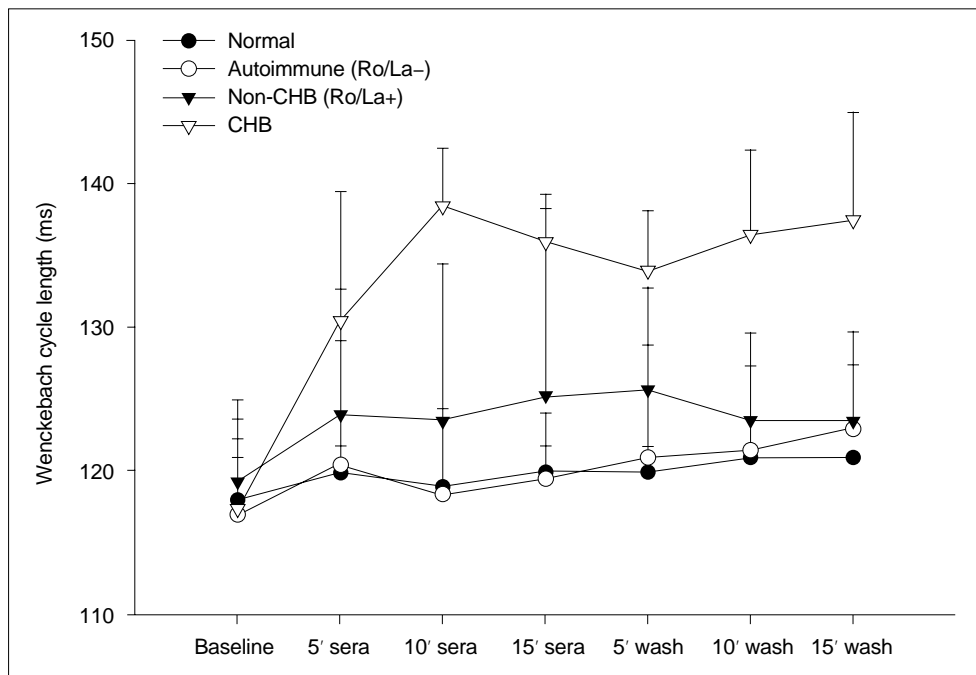


Fig. 2 The atrioventricular Wenckebach cycle length (ms) and its prolongation following perfusion by different maternal sources of sera are demonstrated. Perfusion and washout times are in minutes. CHB: congenital heart block

児の母の抗体を暴露させたパッチクランプの研究により、抗体による房室伝導障害にはカルシウム電流抑制の関与が示唆されている。母体抗体が胎児心カルシウムチャンネルに直接結合してカルシウム電流を抑制し、房室伝導の急性機能障害を引き起こすことがCHB発症メカニズムの最有力仮説として挙げられる⁸⁻¹⁰⁾。急性の房室伝導の機能障害がいかんして不可逆的な損傷へと変化するかは未だに十分明らかになっていないが、カルシウムチャンネルは興奮収縮関連など胎児心筋の維持に極めて重要な役割を果たしており¹¹⁾、カルシウム電流抑制が細胞死といった不可逆的な損傷を引き起こすきっかけになり得ると推察されている。

また今回の研究では、使用血清の抗体量が測定され

ておらず、抗体価の差が実験結果に与えた影響は不明である。しかし抗Ro抗体陽性血清がランゲンドルフ心の房室伝導に与える影響を検討した報告では⁷⁾、抗体価の高い血清が必ずしも房室伝導を強く抑制せず、抗体量では説明ができない違いが示唆されている。

抗Ro抗体、抗La抗体陽性の母親からのCHBの発生頻度は1.6%と低いことが前向きな臨床研究で報告されている¹⁾。抗Ro抗体、抗La抗体以外のCHB発症の要因が今までに推察されているが特異的なものはない。今回の研究でも、抗Ro抗体、抗La抗体を含むことが急性の房室伝導障害を起こす十分条件ではなく、他の血清中の成分も関与していることが示唆されたが、特定することはできなかった。

Table 2 Change in Wenckebach cycle length (ms) of neonatal rabbit hearts for IgG fractions and IgG-depleted fractions of sera from mothers of just delivered congenital heart block children or their umbilical cord. Perfusion and washout times are in minutes.

	IgG fraction cord	IgG-depleted cord	IgG fraction mother	IgG-depleted mother
n	6	6	12	12
Baseline	114 ± 3	113 ± 3	115 ± 2	119 ± 2
15' sera	127 ± 3*	118 ± 3	141 ± 4 [¶] #	136 ± 3 [¶] **
15' wash	132 ± 7 [¶]	124 ± 2 [¶]	156 ± 7 [¶] #†	142 ± 3 [¶] **

Values are means ± SE. [¶]: Values differ significantly from baseline value by 1-way repeated ANOVA, *: p < 0.05 compared with IgG-depleted cord, **: p < 0.01 compared with IgG-depleted cord, #: p < 0.05 compared with IgG-fraction cord, †: p < 0.05 compared with IgG-depleted mother by Student's unpaired t-test.

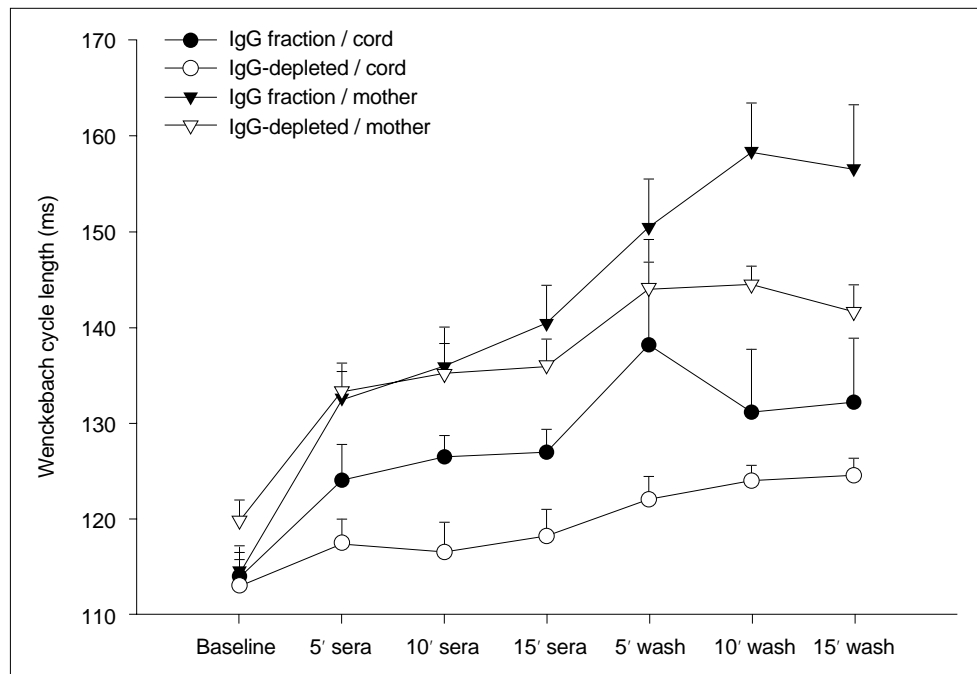


Fig. 3 The atrioventricular Wenckebach cycle length (ms) and its prolongation following perfusion by the IgG fraction or IgG-depleted fraction sera from either mothers just delivered of congenital heart block children or their umbilical cord is demonstrated. Perfusion and washout times are in minutes.

今回の結果では、CHB新生児の臍帯血の影響は、母体の血に比し少なかった。CHBの胎児や新生児の剖検心には抗体が沈着しており、胎児心を障害する際に病因抗体が消費されることが示唆されている^{12, 13}。われわれの研究においても、病因抗体が患児内で消費されて臍帯血中で減少していたため、母体の血清に比し、ランゲンドルフ心に与える影響が少なかったのかもしれない。血清学的研究でもこの推察を支持するものがある。Harleyらは、ヒト白血球型抗原 (human leukocyte antigen: HLA) が一致した双生児で1児のみがCHBに罹

患した症例を報告している¹⁴。そのなかで、7生日の抗体価を双生児間で比較したところ抗核抗体価に差はなかったが、抗Ro抗体価は、正常児が罹患児に比し13倍高かったと述べている。Taylorらも、出生時の母児間の抗Ro抗体、抗La抗体の抗体価の比を、CHB児とそうでない児で比較し、CHB児の抗Ro、抗La抗体価が有意に低いことを報告している¹⁵。一方でBuyonらも、同様にCHB児とそのCHBでない兄弟を比較しているが、抗体価の差はほとんどなく、CHBが引き起こされるときに原因抗体の消費はあるが、その量はかなり少ないと推

察している¹⁶⁾。今回の研究では原因抗体を特定することはできなかった。しかし母体血と比較し臍帯血で減少している抗体が原因抗体である可能性を示唆しており、原因抗体の特定には母体血と臍帯血の血清学的な比較が有用な一つの方法と考えられた。

われわれの新生仔ウサギランゲンドルフモデルでは、IgG成分以外の血清成分によってもWBCLが延長した。IgGがCHBの重要な成因の一つであることは広く認められている。しかしCHBの胎児や新生児の剖検心では、IgGのみならずIgAやIgMの沈着も認められている¹³⁾。さらに、抗Ro抗体、抗La抗体陽性の母を対象にした研究で、CHB患児をもった母親がもたなかった母親に比して抗Ro IgA抗体や抗La IgA抗体を高頻度に認めたと報告されている¹⁷⁾。IgG成分以外の血清成分も、房室伝導に影響を与え得るのかもしれない。

本論文の要旨は第41回日本小児循環器学会総会・学術集会(2005年7月,東京)にて発表し、座長から投稿推薦を受けた。

謝辞 本論文をご校閲いただきました新潟大学大学院医歯学総合研究科内部環境医学小児科学分野、内山 聖教授に感謝いたします。

【参考文献】

- 1) Cimaz R, Spence DL, Hornberger L, et al: Incidence and spectrum of neonatal lupus erythematosus: A prospective study of infants born to mothers with anti-Ro autoantibodies. *J Pediatr* 2003; 142: 678-683
- 2) Garcia S, Nascimento JH, Bonfa E, et al: Cellular mechanism of the conduction abnormalities induced by serum from anti-Ro/SSA-positive patients in rabbit hearts. *J Clin Invest* 1994; 93: 718-724
- 3) Boutjdir M, Chen L, Zhang ZH, et al: Serum and immunoglobulin G from the mother of a child with congenital heart block induce conduction abnormalities and inhibit L-type calcium channels in a rat heart model. *Pediatr Res* 1998; 44: 11-19
- 4) Boutjdir M, Chen L, Zhang ZH, et al: Arrhythmogenicity of IgG and anti-52-kD SSA/Ro affinity-purified antibodies from mothers of children with congenital heart block. *Circ Res* 1997; 80: 354-362
- 5) Alexander E, Buyon JP, Provost TT, et al: Anti-Ro/SS-A antibodies in the pathophysiology of congenital heart block in neonatal lupus syndrome, an experimental model. In vitro electrophysiologic and immunocytochemical studies. *Arthritis Rheum* 1992; 35: 176-189
- 6) Xiao GQ, Hu K, Boutjdir M: Direct inhibition of expressed cardiac L- and T-type calcium channels by IgG from mothers whose children have congenital heart block. *Circulation* 2001; 103: 1599-1604
- 7) Viana VS, Garcia S, Nascimento JH, et al: Induction of in vitro heart block is not restricted to affinity purified anti-52 kDa Ro/SSA antibody from mothers of children with neonatal lupus. *Lupus* 1998; 7: 141-147
- 8) Xiao GQ, Qu Y, Hu K, et al: Down-regulation of L-type calcium channel in pups born to 52 kDa SSA/Ro immunized rabbits. *FASEB J* 2001; 15: 1539-1545
- 9) Boutjdir M: Molecular and ionic basis of congenital complete heart block. *Trends Cardiovasc Med* 2000; 10: 114-122
- 10) Hu K, Qu Y, Yue Y, et al: Functional basis of sinus bradycardia in congenital heart block. *Circ Res* 2004; 94: e32-38
- 11) Fisher DJ: Recent insights into the regulation of cardiac Ca²⁺ flux during perinatal development and in cardiac failure. *Curr Opin Cardiol* 1995; 10: 44-51
- 12) Litsey SE, Noonan JA, O'Connor WN, et al: Maternal connective tissue disease and congenital heart block. Demonstration of immunoglobulin in cardiac tissue. *N Engl J Med* 1985; 312: 98-100
- 13) Taylor PV, Scott JS, Gerlis LM, et al: Maternal antibodies against fetal cardiac antigens in congenital complete heart block. *N Engl J Med* 1986; 315: 667-672
- 14) Harley JB, Kaine JL, Fox OF, et al: Ro (SS-A) antibody and antigen in a patient with congenital complete heart block. *Arthritis Rheum* 1985; 28: 1321-1325
- 15) Taylor PV, Taylor KF, Norman A, et al: Prevalence of maternal Ro (SS-A) and La (SS-B) autoantibodies in relation to congenital heart block. *Br J Rheumatol* 1988; 27: 128-132
- 16) Buyon JP, Waltuck J, Caldwell K, et al: Relationship between maternal and neonatal levels of antibodies to 48 kDa SSB(La), 52 kDa SSA(Ro), and 60 kDa SSA(Ro) in pregnancies complicated by congenital heart block. *J Rheumatol* 1994; 21: 1943-1950
- 17) Salomonsson S, Dörner T, Theander E, et al: A serologic marker for fetal risk of congenital heart block. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 1233-1241