

## インフルエンザAウイルス性心筋炎に対する免疫グロブリンの効果: 実験的検討

## Effects of Immunoglobulin on Murine Myocarditis Caused by Influenza A Virus: Experimental Study

岸本 千晴  
平岡 勇二<sup>\*1</sup>  
高田 均<sup>\*1</sup>  
黒川 昌彦<sup>\*2</sup>  
落合 宏<sup>\*2</sup>

Chiharu KISHIMOTO, MD  
Yuji HIRAOKA, MD<sup>\*1</sup>  
Hitoshi TAKADA, MD<sup>\*1</sup>  
Masahiko KUROKAWA, MD<sup>\*2</sup>  
Hiroshi OCHIAI, MD<sup>\*2</sup>

### Abstract

**Objectives.** Influenza A viruses play the largest role in the worldwide epidemiology of infectious diseases. We examined the effects of intact type and F(ab)<sub>2</sub> type of immunoglobulin preparations on murine influenza A virus myocarditis in mice.

**Methods and Results.** *In vitro* study showed that intact type and F(ab)<sub>2</sub> type of immunoglobulin preparations had antiviral activities against many substrains of influenza A virus and other cardiotropic viruses, and that dose-dependent suppression of an influenza A virus (NWS type) was demonstrated by the treatment of both intact immunoglobulin and F(ab)<sub>2</sub> fragments of immunoglobulin. The dose inhibiting 50% of plaques was same between intact type and F(ab)<sub>2</sub> type (both 0.0002 mg/dl). Intact immunoglobulin, but not F(ab)<sub>2</sub> fragments of immunoglobulin, suppressed serum macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) production in influenza A virus infected macrophages *in vitro*, which is a murine counterpart of interleukin-8. This suppression of MIP-2 production by intact immunoglobulin treatment was blocked by a specific Fc receptor (FcγR) antibody pretreatment. Intact immunoglobulin (1 g/kg/day) or F(ab)<sub>2</sub> fragments of immunoglobulin (1 g/kg/day) were administered to the virus-inoculated A/J mice intraperitoneally daily, starting simultaneously with virus inoculation (Experiment 1) and 2 days after the virus inoculation (Experiment 2) until 10th days after virus inoculation. In Experiment 1, survival was higher in treated (intact (100%, 20/20) and F(ab)<sub>2</sub> (100%, 20/20)) than in control (25%, 5/20) mice; intact type and F(ab)<sub>2</sub> type immunoglobulin administration completely suppressed the development of myocarditis. In Experiment 2, survival rate was significantly higher (75%, 15/20) and myocarditis was less severe in intact immunoglobulin treated mice, but not in F(ab)<sub>2</sub> fragment treated mice (60%, 12/20) than in untreated mice (35%, 7/20). Serum neutralizing antibody titers in treated mice were significantly higher compared with untreated mice in Experiments 1 and 2. In addition, serum MIP-2 concentrations in intact immunoglobulin treated mice, but not in F(ab)<sub>2</sub> fragments treated mice, were lower compared with untreated mice in Experiment 2. Immunoglobulin therapy suppresses influenza A virus myocarditis by increasing neutralizing antibody titers and the suppression of myocardial virus activities. From the standpoint of suppression of MIP-2 concentrations, intact type is superior to F(ab)<sub>2</sub> type.

**Conclusions.** Immunoglobulin treatment may be promising for the prevention of influenza A virus myocarditis.

J Cardiol 2005 Jun; 45(6): 247 - 255

### Key Words

- Myocarditis (influenza A virus)
- Experimental medicine
- Immunological factors (immunoglobulin)

京都大学大学院医学研究科 循環器内科: 〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町54; 富山医科薬科大学医学部<sup>\*1</sup>第二内科,<sup>\*2</sup>ウイルス学, 富山

Department of Cardiovascular Medicine, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto; <sup>\*1</sup>The Second Department of Internal Medicine, <sup>\*2</sup>Department of Virology, Faculty of Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University, Toyama

**Address for correspondence:** KISHIMOTO C, MD, Department of Cardiovascular Medicine, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kawara-machi 54, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507; E-mail: kkishi@kuhp.kyoto-u.ac.jp

Manuscript received December 10, 2004; revised March 2, 2005; accepted March 3, 2005

## はじめに

コクサッキーウイルス，とくにグループBはヒトに心筋炎を引き起こすウイルスとして知られているが<sup>1,2)</sup>，世界保健機関のレポートによれば，インフルエンザAウイルスによる心筋炎もしばしば報告されている．事実，臨床的にインフルエンザAウイルス感染による心筋炎の報告がみられている<sup>3,4)</sup>．インフルエンザAウイルスは肺炎を引き起こすのみでなく，炎症性心臓疾患をも引き起こし，世界的な流行をみる最もよく知られている病原体の一つである．インフルエンザAウイルスによる心筋炎は，ふだん認識されているよりもよりしばしばみられる可能性があり，したがって，インフルエンザAウイルス性心筋炎の病態生理を理解することは重要であると思われる．

我々はすでに，免疫グロブリン療法が実験的コクサッキーB3ウイルス性心筋炎に対し，抗ウイルス作用により抑制することを報告した<sup>5)</sup>．臨床的には，Druckerら<sup>6)</sup>は，極めて最近に発症した心筋炎を患っている小児の治療で，経静脈的な免疫グロブリン投与が有効であると報告した．また，McNamaraら<sup>7,8)</sup>は成人の急性拡張型心筋症で免疫グロブリンを投与すると左室駆出率が回復した，との報告を行った．

このように心筋炎に対する免疫グロブリン療法の効果はほぼ確立しているが<sup>5-8)</sup>，グロブリン製剤のFc部分の重要性に関するメカニズムは依然として不明である．本研究では，マウスのインフルエンザAウイルス性心筋炎に対する免疫グロブリンの効果を検討し，さらに完全型とF(ab)<sub>2</sub>型の免疫グロブリンの効果の差異を，炎症性サイトカインであるマクロファージ炎症性蛋白質2(macrophage inflammatory protein-2: MIP-2)の分析をも含めて検討した．グロブリン製剤のFc部分の重要性と抑制性のFc受容体の意義についても考察を加えた．

## 対象と方法

### 1. 材料

#### 1) ウイルス

インフルエンザAウイルスは，富山医科薬科大学ウイルス学教室の落合宏博士より供与を受けた<sup>9,10)</sup>．インフルエンザAウイルスは，ニワトリの羊膜中で増やした．インフルエンザA以外のウイルスはアフリカミ

ドリザルの腎細胞で増やした<sup>5)</sup>．ウイルス液は使用するまでに - 80℃で保存した．

#### 2) マウス

4週齢オスの近交系A/Jマウスを使用した．動物の管理およびその取り扱いは，富山医科薬科大学のガイドラインに則って行った．

## 2. 方法

### 1) *In vitro*

完全型免疫グロブリン製剤(ペニロンμ)とF(ab)<sub>2</sub>型免疫グロブリン製剤(ガンマ・ベニンμ)は，それぞれ帝人(株)とアベンティス(株)より供与を受けた．インフルエンザAウイルス活性は既報のようにプラーク法で検出した<sup>9-11)</sup>．

約100プラーク形成単位(plaque-forming unit: PFU)のインフルエンザAウイルスと，段階希釈した正常型およびF(ab)<sub>2</sub>型免疫グロブリンとを37℃で1時間反応させた．30分後に反応を4℃で止め，サンプルをMDCK細胞に加えた．34℃，2日間の培養ののち，細胞を酢酸メタノールで固定し，クリスタルバイオレットで染色し，プラークをカウントした．プラークの形成能は対照プラーク数に対する百分率で表示した．

完全型およびF(ab)<sub>2</sub>型免疫グロブリンの10<sup>-2</sup> μg/ml存在下での種々のウイルスに対する抗ウイルス活性を検討した．結果は，ウイルスの成長がみられる最終の希釈倍率で表し，対照と対比した．

RAW264.7細胞(Fc受容体を有するマウスのマクロファージ細胞)を6-well plate中に37℃，2時間培養し，インフルエンザAウイルスを種々のmultiplicities of infection(MOI)0.1, 1, 10で感染させた．24時間後，最終濃度6 mg/mlの完全型およびF(ab)<sub>2</sub>型免疫グロブリンを加え，上清中のMIP-2濃度を測定した．またMOI = 1で2-36時間にわたって経時的なMIP-2濃度の変化も検討した．また，Fc受容体に関係している直接的な証拠を得るために，Fcγ受容体抗体である2.4G2を，グロブリン製剤を投与する6時間前に，それぞれ0.1, 1.0 ng/mlの投与前処置をした検討も行った．

### 2) *In vivo*

#### a. 感染プロトコル

マウスは，5 × 10<sup>3</sup> PFUのインフルエンザAウイルス(NWS型)を経鼻的に感染させ心筋炎を発症させた

のち、完全型免疫グロブリン(ベニロン、ヒト免疫グロブリン)あるいはF(ab)<sub>2</sub>型免疫グロブリン(ガンマ・ベニン、ヒト免疫グロブリン)を毎日腹腔内投与した。以前からの報告に基づき、用いた薬剤の用量は、1 g/kg/dayを採用した<sup>5)</sup>。それぞれの実験で正確な用量は実験開始時のマウスの体重より算出した。マウスとヒトの異種間での免疫グロブリンの抗原性の違いは、とくに問題ないと思われた<sup>5)</sup>。

マウスは以下のグループに分類した。無処置群(25匹)、完全型免疫グロブリン処置群(完全型処置群、25匹)、F(ab)<sub>2</sub>型免疫グロブリン処置群[F(ab)<sub>2</sub>型処置群、25匹]。無処置群では、生理食塩水を腹腔内投与した。実験ⅠはインフルエンザAウイルスを感染後から10日目まで、実験Ⅱはウイルス感染2日目から10日目まで観察処置を行った。実験Ⅲは、インフルエンザAウイルス感染の臨床的な時間経過を鑑み、計画したものである。マウスは毎日観察し、死亡したマウスについては剖検を行った。ウイルス学的あるいは病理学的検討に供するために、実験開始後5日目で各群それぞれ5匹ずつを屠殺した。したがって、生存率は実験Ⅰ、Ⅱとも、すべての群で20匹より算出した。実験終了までに生き延びたマウスは終了時に屠殺し、臓器は病理学的あるいはウイルス学的な検討に供した。

未感染群実験プロトコルとして無処置群、完全型処置群、F(ab)<sub>2</sub>型処置群(それぞれ5匹ずつ)の10日間の実験も行った。

#### b. 病理学的検討

組織はパラフィンに包埋し、5 μmの厚さで切り出しを行い、ヘマトキシリン・エオシン染色を行った。心臓病変は、細胞浸潤と壊死病変につき、それぞれ重症度を算出した。重症度の程度に対する基準は以下の通りである。+1: 微小病変、+2: 小病変、+3: 中等度病変、+4: 大病変。ほかの臓器はウイルス性病変、あるいはその他の病理学的な病変があるかどうかを検討した。

#### c. ウイルス学的検討

心臓のウイルス量と血中の中和抗体量を以前の報告のように決定した<sup>5)</sup>。

#### d. MIP-2測定

血液は屠殺時に後眼窩静脈叢より得て、血中のMIP-2濃度をenzyme-linked immunosorbent assay

(ELISA)法により測定した<sup>9-11)</sup>。

#### e. 統計学的検討

マウスの生存率はKaplan-Meier法により分析した。統計学的な検討は分散分析法により行った。統計学的な有意差がみられた後は、*t*検定を用いて検討した。*p* < 0.05を有意差の判定とし、結果は平均 ± 標準偏差で表示した。

## 結 果

### 1. *In vitro*での抗インフルエンザウイルス活性

Table 1に示すように、免疫グロブリン製剤の持つ種々のウイルスに対する抗ウイルス活性を検討した。一般的に、F(ab)<sub>2</sub>型より完全型免疫グロブリン製剤のほうがより強い抗ウイルス活性を示した。

完全型免疫グロブリン製剤のプラーク形成能は、 $10^{-5}$  mg/mlでは $97 \pm 19\%$ (5匹)であり、 $10^{-4}$  mg/dlでは $59 \pm 17\%$ (5匹)、 $10^{-3}$  mg/dlでは $23 \pm 9\%$ (5匹)であった。プラーク形成と免疫グロブリンの濃度の間に $Y = -88.5 - 37.0 \log_{10} X$  ( $r = -0.91$ ,  $p < 0.01$ )の回帰直線が得られた。したがって、完全型免疫グロブリンは抗インフルエンザウイルス活性を示すことになる。同様に、F(ab)<sub>2</sub>型は $10^{-5}$  mg/dlでは $106 \pm 24\%$ (5匹)であり、 $10^{-4}$  mg/dlでは $57 \pm 16\%$ (5匹)、 $10^{-3}$  mg/dlでは $21 \pm 8\%$ (5匹)であった。 $Y = -107.6 - 42.2 \log_{10} X$  ( $r = -0.91$ ,  $p < 0.01$ )の回帰直線が得られた。したがって、F(ab)<sub>2</sub>型もまた抗インフルエンザウイルス活性を示した。両薬剤の50%プラーク抑制量はともに0.0002 mg/dlである。したがって、50%プラーク抑制用量という観点からは、完全型とF(ab)<sub>2</sub>型はほぼ等しいという結果が得られた。

### 2. Fc部分の重要性

Table 2に示すように、インフルエンザAウイルスが感染したRAW細胞の上清中で、感染用量依存性のMIP-2の上昇がみられた。つぎに、完全型製剤の処理によって経時的なMIP-2濃度の上昇の抑制がみられたが、F(ab)<sub>2</sub>型ではみられなかった。すなわち、2, 14, 24, 36時間後のMIP-2濃度は、完全型免疫グロブリン製剤処置によって無処置群に比べて相対的に低下したが、F(ab)<sub>2</sub>型処置群では低下しなかった。加えて、Table 2に示すように、Fcレセプター抗体(2.4G2)の処理により、完全型免疫グロブリン処理によってみ

Table 1 *In vitro* antiviral activities of immunoglobulins

Virus strain	End-point dilution		
	Control	Intact	F(ab) <sub>2</sub>
Influenza A virus, NWS (H1N1)	- 12	- 2	- 2
Influenza A virus, PR/8/34 (H1N1)	- 10	- 1	- 3
Influenza A virus, Virginia (H3N2)	- 11	- 4	- 4
Influenza B virus	- 8	- 3	- 4
Coxsackievirus B1	- 8	- 1	- 1
Coxsackievirus B3, myocarditic	- 10	- 2	- 2
Coxsackievirus B3, amyocarditic	- 12	- 4	- 5
Coxsackievirus B4	- 7	- 1	- 1
Encephalomyocarditis virus, myocarditic	< - 10	< - 10	< - 10
Encephalomyocarditis virus, pancreatic	< - 10	< - 10	< - 10
Herpes simplex virus	- 7	- 2	- 2

The *in vitro* sensitivity of immunoglobulin preparations against different substrains of influenza virus and other viruses was tested by incubation of various dilutions of the virus in the presence of both intact type and F(ab)<sub>2</sub> type at a concentration of 10<sup>-2</sup> μg/ml. The results were expressed as end-point titers of virus growth and were compared with the titers of the untreated stocks.

られた MIP-2 産生の相対的抑制が消失した。したがって、免疫グロブリン製剤の Fc 部分が RAW 細胞下での MIP-2 産生の抑制に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

### 3. 実験 での完全型および F(ab)<sub>2</sub> 型免疫グロブリン製剤によるインフルエンザ A ウイルス性心筋炎の抑制 (Table 3)

10 日目までに、無処置群では 15 匹のマウスが死亡し、完全型処置群と F(ab)<sub>2</sub> 型処置群ではマウスの死亡はなかった。したがって、10 日目での生存率は無処置群では 25% (5/20)、完全型および F(ab)<sub>2</sub> 型ではともに 100% (20/20) であった。無処置群と処置群ではそれぞれ  $p < 0.01$  の有意差がみられた。

5 日目および 10 日目での検討により、心筋炎のスコア (細胞浸潤と心筋壊死) は、完全型および F(ab)<sub>2</sub> 型処置群では無処置群に比べて有意に低かった (Fig. 1)。注目すべきは、免疫グロブリン処置をした両群では心筋炎がまったくみられなかったことである。すなわち、免疫グロブリン製剤の処置により、インフルエンザ A ウイルス性心筋炎の進展が完全に抑制された。

おそらくはインフルエンザ A ウイルス感染によると思われる肺炎が、無処置群ではすべてのマウスにみられたが、免疫グロブリン処置群ではどのマウスにもみ

られなかった。

10 日目より得られた血清の中和抗体価は、無処置群に比べて免疫グロブリン処置群ではともに有意に高かった。

5 日目での血中の MIP-2 濃度は、無処置群に比べて、免疫グロブリン処置群では有意に低かった。

免疫グロブリン処置マウスの心臓からは、ウイルスはまったく検出されなかった。すなわち、外因性に投与された抗体がインフルエンザ A ウイルスを完全に中和し、その結果、心臓への感染を抑制したことが考えられた。

未感染マウスを使った対照実験では、3 群とも全期間通じて死亡したマウスはみられず、また病理学的検討でもとくに変化はなかった。

### 4. 実験 での完全型免疫グロブリンによるインフルエンザ A ウイルス性心筋炎の抑制と F(ab)<sub>2</sub> 型による非抑制 (Table 4)

ウイルス接種後 2 日目までの間では、死亡したマウスはなかった。したがって、残存マウス全体を 3 つのグループに分けた。10 日目までに無処置群では 13 匹のマウスが死亡、完全型処置群では 5 匹のマウスが死亡、F(ab)<sub>2</sub> 型処置群では 8 匹のマウスが死亡した。したがって、10 日目での生存率は無処置群では 35% (7/20) であり、完全型処置群では 75% (15/20) であり、

**Table 2 Changes of MIP-2 by the treatment of immunoglobulins on virus-infected RAW cells**

Treatment	MOI	MIP-2 concentrations( ng/ml )			
		0.1	1	1	10
Control( 0 hr )		49.4 ± 16.9	75.2 ± 17.3*		89.2 ± 24.0*
				Fc receptor antibody( 2.4G2 )	
				0.1 ng/ml	1.0 ng/ml
2 hr			□		
Untreated			165.0 ± 38.7	169.6 ± 25.4	161.0 ± 40.0
Intact			89.6 ± 8.6**	172.8 ± 35.9	179.4 ± 49.3
F(ab) <sub>2</sub>			155.2 ± 32.5	164.8 ± 40.5	160.2 ± 36.4
14 hr					
Untreated			292.0 ± 64.5		
Intact			124.2 ± 27.2**		
F(ab) <sub>2</sub>			262.0 ± 49.1		
24 hr					
Untreated			384.6 ± 107.0	378.6 ± 76.7	423.2 ± 40.0
Intact			193.0 ± 39.6**	408.2 ± 71.2	422.2 ± 64.2
F(ab) <sub>2</sub>			404.0 ± 68.8	434.0 ± 65.0	424.6 ± 59.2
36 hr					
Untreated			687.0 ± 130.5		
Intact			246.8 ± 61.8**		
F(ab) <sub>2</sub>			773.0 ± 70.0		

Values are mean ± SD. \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.01$  vs Untreated.

RAW264.7 cells were cultured in 6-well plates at 37 °C and were infected with influenza A virus at the indicated MOI. Twenty-four hr later, intact immunoglobulin or F(ab)<sub>2</sub> fragments of immunoglobulin( 6 mg/ml ) was added to these cells. From 2 to 36 hr after the treatment, MIP-2 levels in the conditioned medium were determined. To demonstrate the direct evidence for Fc receptor involvement, a specific Fc receptor( Fcγ1 receptor ) antibody, 2.4G2( PharMinger ), was pretreated( 0.1, 1.0 ng/ml ) 6 hr before immunoglobulin preparation administration. Five wells were used for each experimental time point to calculate the mean ± SD. As a result, the serial MIP-2 productions were depressed by the treatment of intact type immunoglobulin, but not by the F(ab)<sub>2</sub> type. Also, pretreatment by a specific Fc receptor antibody blocked the suppression of MIP-2 productions by the intact immunoglobulin treatment. Values of 0 hr indicate those of just before the treatment of immunoglobulins. MIP-2 = macrophage inflammatory protein-2; MOI = multiplicities of infection.

F(ab)<sub>2</sub>型処置群では60%( 12/20 )であった。無処置群との有意差は、完全型処置群ではみられたが( $p < 0.05$ )、F(ab)<sub>2</sub>型処置群ではみられなかった。

病理学的な検討では、無処置群に比べて完全型処置群では有意に重症度は低下したが、F(ab)<sub>2</sub>型処置群では低下しなかった。

10日目での血中の中和抗体価は、無処置群に比べてグロブリン製剤治療群で有意に高値であった。

5日目での血中のMIP-2レベルは、無処置群に比べて、完全型処置群で有意に低かった。

心臓のウイルス量は3群間で有意な差はなかった。

## 考 察

免疫グロブリン療法の有効性はさまざまな自己免疫

疾患あるいは炎症性疾患で見られている<sup>12,13</sup>。今までの報告によれば、免疫グロブリンの作用メカニズムは以下の通りである。

1) ウイルスあるいは細菌の毒素の中和, 2) 補体による組織傷害の軽減, 3) 抑制性Fcレセプターを経由した抗炎症作用, 4) 抗サイトカイン抗体あるいはサイトカイン受容体拮抗などによる抗炎症作用, 5) 抗イディオタイプ抗体作用などによる免疫修飾活性。さらに免疫グロブリン療法の有効性は、病的な免疫グロブリンの代謝を促進することによるとも考えられている。なぜならば、新生児の腸管上皮に認められる新生児Fcレセプターが飽和されると、そのことが病的免疫グロブリンの代謝を促進するということから知られる。

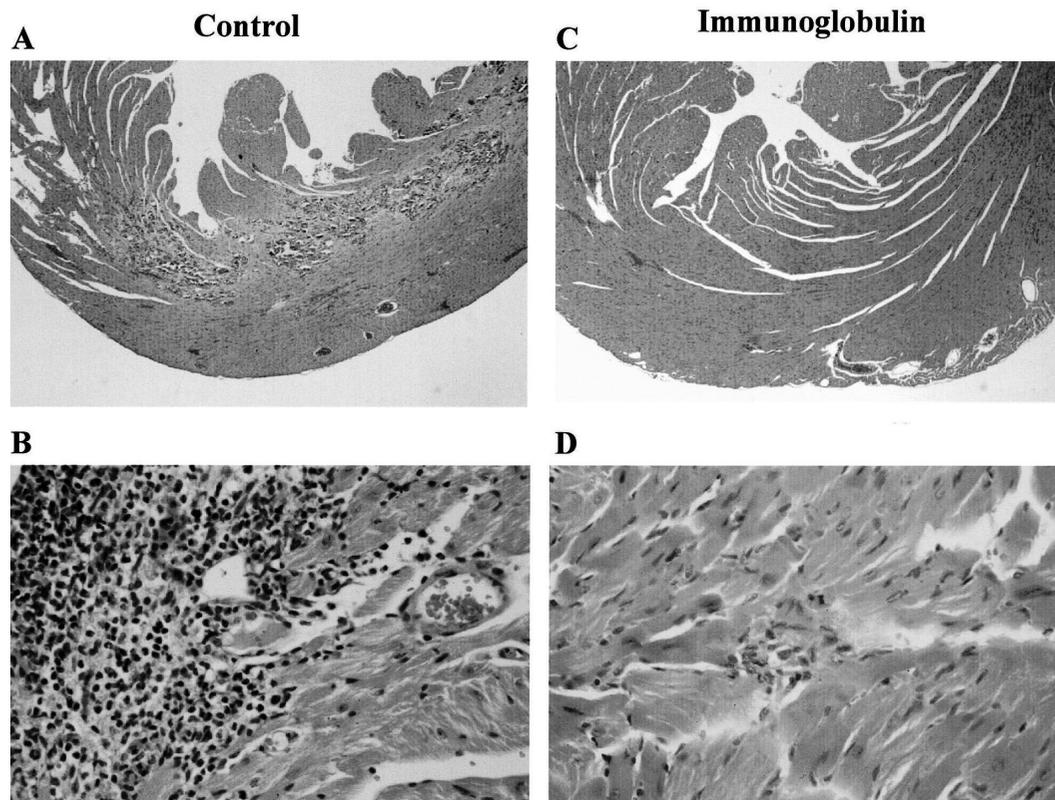
**Table 3 Results of Experiment I**

	Treatment		
	Untreated	Intact	F(ab) <sub>2</sub>
Cardiac pathology			
Day 5			
Infiltration	1.4 ± 0.6	0**	0**
Necrosis	1.6 ± 0.6	0**	0**
Day 10			
Infiltration	2.4 ± 0.6	0**	0**
Necrosis	2.2 ± 0.6	0**	0**
Pneumonia (n)	25/25 (100%)	0/25 (0%)	0/25 (0%)
Neutralizing antibody titers (log 4)	2.6 ± 0.0 (n = 4)	6.0 ± 0.0* (n = 5)	6.0 ± 0.0* (n = 5)
MIP-2 levels (ng/ml)	380 ± 124 (n = 5)	58 ± 14** (n = 5)	50 ± 26** (n = 5)
Myocardial virus titers (PFU/mg tissue)	5.7 ± 8.0 × 10 <sup>3</sup> (n = 4)	0* (n = 4)	0* (n = 4)

Values are mean ± SD. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01 vs Untreated.

In Experiment I, intact immunoglobulin or F(ab)<sub>2</sub> fragments of immunoglobulin were administered daily on days 0 - 10. Severity of myocardial lesions were scored on a scale of 1+ to 4+ in terms of severity.

PFU = plaque-forming units. Other abbreviation as in Table 2.



**Fig. 1 Representative photomicrographs of cardiac pathology in Experiment I**

In an untreated mouse (A, B), cellular infiltration with myocyte necrosis around the intramyocardial small vessels was observed, but myocarditis was not observed in a mouse treated with intact immunoglobulin (C, D).

Hematoxylin-eosin staining, A, C: × 100, B, D: × 380.

Table 4 Results of Experiment II

	Treatment		
	Untreated	Intact	F(ab) <sub>2</sub>
Cardiac pathology			
Day 5			
Infiltration	1.2 ± 0.5	0.2 ± 0.5**	0.6 ± 0.6
Necrosis	1.6 ± 0.6	0.2 ± 0.5**	0.6 ± 0.6
Day 10			
Infiltration	2.1 ± 0.6	0.6 ± 0.6**	1.9 ± 0.7
Necrosis	2.1 ± 0.9	0.4 ± 0.6**	1.8 ± 0.6
Pneumonia(n)	25/25(100%)	18/25(72.0%)*	22/25(88.0%)
Neutralizing antibody titers(log <sub>4</sub> )	3.6 ± 0.5(n=5)	6.6 ± 0.5*(n=5)	6.0 ± 0.5*(n=5)
MIP-2 levels(ng/ml)	514 ± 167(n=5)	107 ± 26**(n=5)	307 ± 115(n=5)
Myocardial virus titers(PFU/mg tissue)	6.0 ± 7.6 × 10 <sup>3</sup> (n=4)	2.1 ± 8.2 × 10 <sup>3</sup> (n=4)	4.6 ± 7.0 × 10 <sup>3</sup> (n=4)

Values are mean ± SD. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01 vs Untreated.

In Experiment II, intact immunoglobulin or F(ab)<sub>2</sub> fragments of immunoglobulin were administered daily on days 2 - 10.

Abbreviations as in Tables 2, 3.

本研究では、免疫グロブリン療法が完全にインフルエンザAウイルス性心筋炎を、抗インフルエンザウイルス抗体活性とMIP-2濃度低下による両効果により軽減したことを示した。In vitroでは、完全型およびF(ab)<sub>2</sub>型の免疫グロブリン製剤はともに、インフルエンザAウイルスをも含むさまざまなウイルスに対する抗ウイルス活性を示した。抗インフルエンザウイルス活性はF(ab)<sub>2</sub>型よりも完全型のほうがやや勝っていた。また、経時的なMIP-2濃度の産生は、完全型免疫グロブリン処置ではインフルエンザAウイルス感染のマクロファージ上清中で経時的に低下したが、F(ab)<sub>2</sub>型ではそのようなことはみられなかった。この現象にFcレセプターが関係しているということは、Fcレセプター抗体を用いた抑制実験によりさらに確認された。

インフルエンザAウイルスに対するワクチン療法は、時に感染から宿主を防御することができない、ということがよく知られている。なぜならば、インフルエンザAウイルスは、しばしばその抗原性に突然変異をきたすからである。免疫グロブリンの持つ未知の抗原に対する再配合能力という特徴を考え合わせると、突然変異をきたした新規のインフルエンザAウイルスに対しても免疫グロブリンの投与は有効である、との推論が成り立つ。以前から認められているように、免疫グロブリン療法は、さまざまな自己免疫疾患あるいは

は炎症性疾患に対して、抗病原体作用と抗炎症性作用により有効であることが知られている<sup>12,13</sup>。我々はすでに、ヒトの免疫グロブリンは、抗ウイルス抗体活性以外の作用によりマウスでの心筋炎を抑制することも報告している<sup>5,14</sup>。これらの報告を考え合わせると<sup>5,14</sup>、未知のウイルスにより引き起こされた心筋炎であっても宿主を保護する可能性を十分持っていることになる。

インターロイキン8はサイトカインファミリーに属する単球・マクロファージ由来のペプチドであり、MIP-2はマウスでのヒトインターロイキン8に相当するものと考えられている<sup>9,11</sup>。このサイトカインは好中球やリンパ球に対する走化活性を有する<sup>15,18</sup>。例えば、インターロイキン8投与によるTリンパ球の回帰現象がsevere combined immunodeficiency(SCID)マウスでの実験やSCIDラットでの糸球体腎炎で報告されている<sup>16,17</sup>。したがって、マウス心筋炎でMIP-2の変化を検討することは有意義なことであると思われた。Cookら<sup>18</sup>は、MIP-2ファミリーの一員であるMIP-1が、マウスのコクサッキーウイルス性心筋炎で炎症の進展に関係しているということをノックアウトマウスを用いた検討で明らかにした。すなわち、MIP-1のノックアウトマウスではコクサッキーウイルスによる心筋炎がコントロールのマウスに比べて軽症であることが示された<sup>18</sup>。インフルエンザAウイルス感染症では

MIP-2による走化活性上昇により、重篤な炎症性細胞・組織傷害をもたらされると考えられている<sup>9-11)</sup>。したがって、本研究で示したように、インフルエンザAウイルス感染症によるMIP-2産生を抑制することは宿主にとって非常に有用であり、免疫グロブリン療法の有用性はまさにそこにある。加えて、完全型がF(ab)<sub>2</sub>型より有効性に勝ることも示された。すなわち、完全型は実験で示したように、ウイルス接種2日目から開始するプロトコルにおいても血中のMIP-2レベルの上昇を抑制したが、F(ab)<sub>2</sub>型ではみられなかった。したがって、免疫グロブリンのFc部分はMIP-2を減少するという役割において重要であることがわかった。

最近、抑制性のFcレセプターであるFcγ受容体Bの役割が、種々の自己免疫あるいは炎症性疾患での免疫グロブリンの有効性のメカニズムの本体として示されている<sup>19,20)</sup>。加えて、完全型免疫グロブリンによる、免疫担当細胞の活性化、すなわちサイトカインやフリーラジカルの遊離あるいは細胞傷害性活性などが、Fcレセプターと関係しているとの証拠が得られつつある<sup>21,22)</sup>。実験でみられた血中のMIP-2レベルの抑制におけるF(ab)<sub>2</sub>型に比べた完全型の優位性は、

免疫グロブリンのFc部分の役割に帰することができる、と思われる。このことは、理論的にはFc部分がMIP-2の減少をもたらすとの解釈が成り立つ。

本研究は、あくまでもインフルエンザAウイルスが生体内に存在する時期から免疫グロブリンを投与したものである。すなわち、実験はウイルス感染直後から、また実験はウイルス感染2日目からである。実験は、より臨床的時間経過に近づけるように意図したものである。臨床的には、症状が現れた時点では心臓内でのウイルスはすでに消失していることが予想される中での免疫グロブリン投与の有効性については疑問が残るであろう。

## 結 論

免疫グロブリン療法は、中和抗体活性を上昇させ、MIP-2活性を低下させるという相互作用でマウスインフルエンザAウイルス性心筋炎を抑制した。MIP-2の産生を抑制するという観点からは、完全型免疫グロブリンのほうがより選択されるべきであると思われる。この治療法は、しばしばインフルエンザAウイルスでみられるウイルス抗原の突然変異を考え合わせても、非常に有望な治療法であると結論づけられる。

## 要 約

目的: インフルエンザAウイルスは、しばしば感染の世界的な流行を引き起こすことで知られている。我々は、マウスの実験的インフルエンザA型ウイルス性心筋炎に対する完全型免疫グロブリンとF(ab)<sub>2</sub>型免疫グロブリン製剤の効果を検討した。

方法と結果: 完全型とF(ab)<sub>2</sub>型の免疫グロブリン製剤の種々のウイルスに対する抗ウイルス活性が示された。さらに、両剤ともインフルエンザAウイルス(NWS型)に対する用量依存性の抗ウイルス活性を示した。マクロファージに感染したインフルエンザAウイルスによって産生されるマクロファージ炎症性蛋白質α(MIP-2; インターロイキン8に相当)の上清中での濃度が完全型免疫グロブリン処置で減少したが、F(ab)<sub>2</sub>型ではみられなかった。この完全型免疫グロブリンの処置でみられたMIP-2産生抑制は、Fcγ受容体抗体による前処置で消失した。

つぎに、インフルエンザAウイルスを感染したA/Jマウスに、完全型とF(ab)<sub>2</sub>型免疫グロブリンを、実験ではウイルス接種直後より、実験ではウイルス接種後2日目より、それぞれ10日目まで腹腔内投与(1g/kg/day)を行った。実験では、生存率は免疫グロブリン処置群で非処置群に比べて有意に高かった(それぞれ100%, 100%, 25%)。すなわち、両免疫グロブリン製剤の投与によって、心筋炎は完全に抑制され、また心筋炎ウイルスは検出されなかった。実験では、生存率は完全型免疫グロブリン処置群で有意に高く(それぞれ75%, 60%, 35%)、また心筋炎の程度は低く、このことはF(ab)<sub>2</sub>型ではみられなかった。血中の中和抗体は実験、とも両剤処置群で有意に高かった。さらに、血清のMIP-2濃度は、実験で完全型免疫グロブリン処置群で有意に低かった。したがって、免疫グロブリン治療は、中和抗体活性を上昇させ、心筋のウイルス量を

減少させることによって、インフルエンザAウイルス心筋炎を抑制した。MIP-2濃度を抑制するという観点からは、正常型免疫グロブリン製剤のほうがFcγ2型よりも勝っている。

結論：免疫グロブリンはインフルエンザAウイルス心筋炎に対する治療として有望である。

*J Cardiol* 2005 Jun; 45(6): 247 - 255

## 文 献

- 1) Woodruff JF: Viral myocarditis: A review. *Am J Pathol* 1980; **101**: 425 - 484
- 2) Reyes MP, Lerner AM: Coxsackievirus myocarditis: With special reference to acute and chronic effects. *Prog Cardiovasc Dis* 1985; **27**: 373 - 394
- 3) Finland M, Parker JrF, Barnes MW, Joliffe CLS: Acute myocarditis in influenza A infections: Two cases of non-bacterial myocarditis, with isolation of virus from the lungs. *Am J Med Sci* 1945; **209**: 455 - 468
- 4) Engblom E, Ekfors TO, Meurman OH, Toivanen A, Nikoskelainen J: Fatal influenza A myocarditis with isolation of virus from the myocardium. *Acta Med Scand* 1983; **213**: 75 - 78
- 5) Takada H, Kishimoto C, Hiraoka Y: Therapy with immunoglobulin suppresses myocarditis in a murine coxsackievirus B3 model: Antiviral and anti-inflammatory effects. *Circulation* 1995; **92**: 1604 - 1611
- 6) Drucker NA, Colan SD, Lewis AB, Beiser AS, Wessel DL, Takahashi M, Baker AL, Perez-Atayde AR, Newburger JW: Gamma-globulin treatment of acute myocarditis in the pediatric population. *Circulation* 1994; **89**: 252 - 257
- 7) McNamara DM, Rosenblum WD, Janosko KM, Trost MK, Villaneuva FS, Demetris AJ, Murali S, Feldman AM: Intravenous immune globulin in the therapy of myocarditis and acute cardiomyopathy. *Circulation* 1997; **95**: 2476 - 2478
- 8) McNamara DM, Holubkov R, Starling RC, Dec GW, Loh E, Torre-Amione G, Gass A, Janosko K, Tokarczyk T, Kessler P, Mann DL, Feldman AM: Controlled trial of intravenous immune globulin in recent-onset dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2001; **103**: 2254 - 2259
- 9) Ochiai H, Ikesue A, Kurokawa M, Nakajima K, Nakagawa H: Enhanced production of rat interleukin-8 by in vitro and in vivo infections with influenza A NWS virus. *J Virol* 1993; **67**: 6811 - 6814
- 10) Sakai S, Kawamata H, Mantani N, Kogure T, Shimada Y, Terasawa K, Sakai T, Imanishi N, Ochiai H: Therapeutic effect of anti-macrophage inflammatory protein 2 antibody on influenza virus-induced pneumonia in mice. *J Virol* 2000; **74**: 2472 - 2476
- 11) Ochiai H, Sakai S, Kogure T, Hirabayashi Y, Nakajima K, Terasawa K: Development and some applications of enzyme linked immunosorbent assay system for murine macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2). *Mediat Inflamm* 1996; **5**: 206 - 209
- 12) Wolf HM, Eibl MM: Immunomodulatory effect of immunoglobulins. *Clin Exp Rheumatol* 1996; **14**( Suppl 15 ): S17 - S25
- 13) Yu Z, Lennon VA: Mechanism of intravenous immune globulin therapy in antibody-mediated autoimmune diseases. *N Engl J Med* 1999; **340**: 227 - 228
- 14) Kishimoto C, Takamatsu N, Kawamata H, Shinohara H, Ochiai H: Immunoglobulin treatment ameliorates murine myocarditis associated with reduction of neurohumoral activity and improvement of extracellular matrix change. *J Am Coll Cardiol* 2000; **36**: 1979 - 1984
- 15) Yue TL, Wang X, Sung CP, Olson B, McKenna PJ, Gu TL, Feuerstein GZ: Interleukin-8: A mitogen and chemoattractant for vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994; **75**: 1 - 7
- 16) Taub DD, Anver M, Oppenheim JJ, Longo DL, Murphy WJ: T lymphocyte recruitment by interleukin-8 (IL-8): IL-8-induced degranulation of neutrophils releases potent chemoattractants for human T lymphocytes both in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 1996; **97**: 1931 - 1941
- 17) Feng L, Xia Y, Yoshimura T, Wilson CB: Modulation of neutrophil influx in glomerulonephritis in the rat with anti-macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) antibody. *J Clin Invest* 1995; **95**: 1009 - 1017
- 18) Cook DN, Beck MA, Coffman TM, Kirby SL, Sheridan JF, Pragnell IB, Smithies O: Requirement of MIP-1 for an inflammatory response to viral infection. *Science* 1995; **269**: 1583 - 1585
- 19) Samuelsson A, Towers TL, Ravetch JV: Anti-inflammatory activity of IVIG mediated through the inhibitory Fc receptor. *Science* 2001; **291**: 484 - 486
- 20) Shioji K, Kishimoto C, Sasayama S: Fc receptor-mediated inhibitory effect of immunoglobulin therapy on autoimmune giant cell myocarditis: Concomitant suppression of the expression of dendritic cells. *Circ Res* 2001; **89**: 540 - 546
- 21) Nemes E, Teichman F, Roos D, Marodi L: Activation of human granulocytes by intravenous immunoglobulin preparations is mediated by FcγR and FcγR receptors. *Pediatr Res* 2000; **47**: 357 - 361
- 22) Jodo S, Hohlbaum AM, Xiao S, Chan D, Strehlow D, Sherr DH, Marshak-Rothstein A, Ju ST: CD95 (Fas) ligand-expressing vesicles display antibody-mediated, FcR-dependent enhancement of cytotoxicity. *J Immunol* 2000; **165**: 5487 - 5494