

急性心筋梗塞および心筋梗塞後症候群における末梢血リンパ球サブセット: Two-Color Flow Cytometry での検討

Two-Color Flow Cytometry Analysis of Lymphocyte Subsets in Patients With Acute Myocardial Infarction and Post-myocardial Infarction Syndrome

土橋 雅行
坂口 泰弘
中村 美奈
酢谷 俊夫
鶴田 俊介
加藤 茂
上村 史朗
西田 育功
橋本 俊雄
籠島 忠
土肥 和紘

Masayuki TSUCHIHASHI
Yasuhiro SAKAGUCHI
Mina NAKAMURA
Toshio SUTANI
Shunsuke TSURUTA
Shigeru KATO
Shiro UEMURA
Yasunori NISHIDA
Toshio HASHIMOTO
Tadashi KAGOSHIMA
Kazuhiro DOHI

Abstract

Serial changes in lymphocyte subsets were analyzed in 37 patients with acute myocardial infarction (AMI), in 2 patients with postmyocardial infarction syndrome (PMIS), and in healthy subjects (control group) using two-color flow cytometry to investigate cellular immunity after AMI and PMIS.

Peripheral blood lymphocyte subsets were measured on admission and at weeks 2, 4, 8, and 16 after the onset of AMI. The white blood cell count was significantly higher on admission and at week 2 in the AMI group compared with the control group. The percentage of CD4-positive helper T cells was significantly higher on admission and at weeks 2 and 4 in the AMI group compared with the control group, and the percentage of CD8-positive suppressor T cells was significantly lower in the AMI group at week 2 than in the control group. The ratio of helper-to-suppressor T cells peaked 2 weeks after the AMI and then decreased gradually. There were no significant changes in the CD4/CD8 ratio, the percentage of cytotoxic T cells, or the percentage of inducer T cells, throughout the observation period. There were no significant differences in the percentage of T cells, B cells, CD4-positive T cells, CD8-positive T cells, and natural killer cells between AMI patients and control subjects. The percentage of activated CD4- and CD8-positive cells was higher in the AMI group at weeks 4 and 8 than in the control group. There was no significant correlation between changes in lymphocyte subsets and infarct size.

The percentage of activated CD8-positive cells was consistently higher in the PMIS group compared with the control and AMI groups. The percentage of cytotoxic T cells in one of the PMIS patients was significantly higher than in the AMI group. There were no significant differences in the proportions of other subsets between PMIS and AMI patients.

The changes in lymphocyte subsets observed in patients with AMI suggested that immunological competence was enhanced in these patients. Abnormalities in humoral immunity, such as the appearance of anticardiac antibody, have been observed in patients with PMIS. Our results suggest that PMIS is also associated with changes in cellular immunity.

奈良県立医科大学 第一内科: 〒634 奈良県橿原市四条町 840

The First Department of Internal Medicine, Nara Medical University, Nara

Address for reprints: TSUCHIHASHI M, MD, The First Department of Internal Medicine, Nara Medical University, Shijo-cho 840, Kashihara, Nara 634

Manuscript Received March 10, 1995; accepted May 12, 1995

Key Words

myocardial infarction, blood cells, leucocytes (lymphocyte subsets), immunologic factors, two-color flow cytometry, activated CD8-positive cells

はじめに

急性心筋梗塞 (acute myocardial infarction : AMI) 発症後に, T 細胞の低下¹⁻³⁾, CD8 陽性細胞の上昇^{1,4,5)}, NK 活性の低下^{1,6)} および補体の活性化⁷⁾ などの免疫能異常の出現することが知られるようになったが, その本態はいまだに解明されていない. 臨床に応用されるようになった末梢血リンパ球サブセットの測定は, 免疫反応の主役をなすリンパ球を機能別にかつ量的に把握することが可能である. われわれは AMI 患者の末梢血リンパ球サブセットをフローサイトメトリーによる 2 カラー分析で経時的に測定し, AMI 後の免疫機能をリンパ球動態の面から検討したので報告する.

また AMI 後に発症する心筋梗塞後症候群は, 抗心筋抗体の出現することや副腎皮質ステロイドの奏功することから, 自己免疫機序によって発症するとされている⁸⁾. ただし, 同症候群が自己免疫機序によって発症することについては否定的な意見もみられる⁹⁾. 今回われわれは心筋梗塞後症候群の 2 例でのリンパ球サブセットの推移についても検討しており, 併せて報告する.

対象と方法

1. 対象

対象は奈良県立医科大学第一内科に入院した初回発症の AMI 患者 37 例である. 性別は男 31 例, 女 6 例, 年齢は 43-76 歳 (平均年齢 59±8 歳) であった. なお病歴, 身体および検査所見から活動性のある感染症, 悪性腫瘍および膠原病などの自己免疫疾患を有する患者は対象から除外した.

対照群には健康者 26 例を選んだ. 性別は男 20 例, 女 6 例, 年齢は 40-70 歳 (平均年齢 50±10 歳) であった.

2. 測定項目

1) Creatine kinase

Creatine Kinase (CK) は入院直後から 2 日間は 3 時間ごと, 以後は数日ごとに紫外線吸収スペクトル法 (UV

Table 1 Functional lymphocyte subsets

Antigen	Function
Leu4 ⁺ Leu12 ⁻	T
Leu4 ⁻ Leu12 ⁺	B
Leu2a ⁺ Leu15 ⁺	Suppressor T
Leu2a ⁺ Leu15 ⁻	Cytotoxic T
Leu3a ⁺ Leu8 ⁺	Inducer T
Leu3a ⁺ Leu8 ⁻	Helper T
Leu7 ⁺ Leu11 ⁻	Natural killer (+)
Leu7 ⁺ Leu11 ⁺	Natural killer (++)
Leu7 ⁻ Leu11 ⁺	Natural killer (+++)
Leu2a ⁺ HLA-DR ⁺	Activated CD8
Leu3a ⁺ HLA-DR ⁺	Activated CD4

法) で測定し, Shell ら¹⁰⁾ の方法で ΣCK を算出して梗塞サイズの指標とした.

2) 白血球数, リンパ球数

白血球数は入院時, AMI 発症後 2, 4, 8 および 16 週に採血し, 自動化法で測定した. リンパ球数は白血球数にリンパ球分画の比率を乗じて算出した.

3) リンパ球サブセット

今回測定したリンパ球サブセットの項目を **Table 1** に示す. ナチュラルキラー (NK) 細胞は表面抗原の違いから活性度別に軽度 (+), 中等度 (++), 高度 (+++) に分類¹¹⁾ した. 使用した抗体は Becton Dickinson 製の Leu シリーズ抗体である. 以下にリンパ球サブセットの測定方法を述べる.

入院時, AMI 発症後 2, 4, 8 および 16 週の早朝空腹時に heparine 加採血した血液を, リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 2 倍に希釈し, 分離液に LSM solution (Organon Teknika) を用いた比重遠心法で末梢血単核球を分離した¹²⁾. 得られた末梢血単核球を PBS で 3 回洗浄した後, 細胞数が $2 \times 10^7/\mu\text{l}$ となるように PBS を加えて調整した. この細胞浮遊液 $50 \mu\text{l}$ に fluorescein isothiocyanate (FITC) または phycoerythrin (PE) 標識モノクローナル抗体をおのおの $20 \mu\text{l}$ ずつ加え, 水中暗所で約 30 分間反応させた. その後, 5°C の条件下で PBS を用いて 3 回洗浄し, 約 1 ml の細胞浮遊液 (細胞数 $1 \times 10^7/\mu\text{l}$) とし, FACStar (Becton Dickinson) による

Table 2 Clinical characteristics of patients with AMI

No.	Gender	Age (yrs)	Infarct sites	Σ CK (IU/l)	Forrester subsets	Catheter interventions	Complications
1	M	54	Inf	—	I	PTCA	
2	M	65	Ant	6,740	I	PTCR	
3	M	54	Ant	—	—	—	
4	M	54	Ant	—	I	PTCR	
5	M	75	Ant	7,231	I	—	
6	M	66	Ant	—	I	PTCR	
7	M	47	Inf	9,933	I	PTCR, PTCA	
8	M	67	Ant	—	—	—	
9	M	72	Ant	—	—	—	
10	M	53	Inf	13,514	I	—	
11	M	59	Inf	—	—	PTCR	
12	M	58	Ant	3,094	I	PTCR	
13	M	48	Post	2,498	I	PTCA	
14	M	56	Ant	5,137	I	PTCR	
15	M	57	Inf	5,513	I	PTCA	
16	M	68	Ant	1,775	I	PTCA	
17	M	60	Inf	3,116	II	PTCR	
18	F	73	Inf	—	IV	—	Shock, VF
19	M	56	Inf	5,541	I	PTCA	
20	M	68	Ant	—	I	PTCA	
21	M	47	Inf	6,211	I	PTCR, PTCA	
22	M	60	Ant	7,332	I	PTCA	
23	F	43	Inf	1,258	III	PTCR, PTCA	
24	F	69	Ant	—	I	PTCA	
25	F	56	Inf	—	I	PTCA	
26	M	44	Ant	—	—	PTCR, PTCA	
27	M	60	Ant	—	I	PTCA	
28	M	59	Ant	1,814	I	PTCA	
29	M	49	Ant	751	I	PTCA	
30	M	55	Ant	1,737	I	PTCA	
31	M	76	Ant	4,549	I	PTCA	
32	M	62	Inf	—	I	PTCA	
33	M	59	Ant	4,560	IV	PTCA	Shock
34	F	59	Ant	2,139	I	PTCA	
35	F	61	Inf	7,298	I	PTCR, PTCA	
36	M	54	Inf	2,339	I	PTCR, PTCA	
37	M	61	Ant	—	III	PTCR, PTCA	

AMI=acute myocardial infarction; CK=creatin kinase; M=male; F=female; Ant=anteroseptal or anterolateral; Inf=inferior; Post=posterior; PTCA=percutaneous transluminal coronary angioplasty; PTCR=percutaneous transluminal coronary recanalization; VF=ventricular fibrillation.

2 カラー分析を実施した。以上の一連の実験操作は採血から6時間以内に終了した。

有意差の判定は $p < 0.05$ とした。なお、測定値は平均 ± 標準偏差で示した。

3. 推計学的処理

推計学的処理は平均値の差の検定を paired t 検定または unpaired t 検定, 群平均と1標本の差の検定を Smirnov の検定, 相関係数の検定を t 検定で実施した。

成 績

1. 患者背景

AMI患者の臨床的特徴を Table 2 に示す。梗塞部位別の症例数は前壁(前壁中隔, 広範囲前壁を含む)22

Table 3 White blood cells and lymphocytes in patients with AMI and control subjects

	C	Patient group (weeks after AMI)				
		A	2	4	8	16
WBC (μ l)	5,708 \pm 1,035	14,442 \pm 4,661* ¹	7,434 \pm 1,732* ²	5,883 \pm 1,524	5,693 \pm 1,035	5,730 \pm 1,035
Lymph (μ l)	1,867 \pm 547	1,630 \pm 846	2,201 \pm 1,623	1,943 \pm 601	1,903 \pm 558	1,817 \pm 528

*¹A vs C, 2, 4, 8 and 16 weeks, $p < 0.05$, respectively; *²2 weeks vs C, 4, 8 and 16 weeks, $p < 0.05$, respectively. Values are expressed as mean \pm standard deviation (SD).

C=control group; A=on admission; WBC=white blood cells; Lymph=lymphocytes. Other abbreviation as in Table 2.

Table 4 T, B, CD4- and CD8-positive cells, and CD4/CD8 ratio in patients with AMI and control subjects

	C	Patient group (weeks after AMI)				
		A	2	4	8	16
T (%)	62.56 \pm 13.97	55.34 \pm 13.94	64.32 \pm 13.25	67.00 \pm 12.19* ¹	55.27 \pm 12.94	55.95 \pm 13.09
B (%)	12.45 \pm 5.94	16.50 \pm 6.37* ²	11.69 \pm 6.87* ³	9.97 \pm 4.29	8.37 \pm 4.07	10.01 \pm 4.07
CD4-positive (%)	36.04 \pm 14.25	32.14 \pm 12.46* ⁴	41.04 \pm 12.78	39.22 \pm 13.90	32.54 \pm 11.58	33.37 \pm 14.57
CD8-positive (%)	19.20 \pm 8.95	16.45 \pm 7.47	16.93 \pm 8.65	19.73 \pm 7.69	20.54 \pm 8.74	17.94 \pm 8.49
CD4/CD8 ratio	2.84 \pm 2.66	2.49 \pm 1.98	3.36 \pm 2.79	2.28 \pm 1.14	1.86 \pm 1.09	2.18 \pm 1.23

*¹4 weeks vs A and 8 weeks, $p < 0.05$, respectively; *²A vs 2, 4, 8 and 16 weeks, $p < 0.05$, respectively; *³2 weeks vs 4, 8 and 16 weeks, $p < 0.05$, respectively; *⁴A vs 2 weeks, $p < 0.05$. Values are expressed as mean \pm SD.

Abbreviations as in Tables 2, 3.

例, 下壁 14 例, 純後壁 1 例であった。入院時全例で冠動脈造影を施行した。うち 7 例に経皮的冠動脈血栓溶解療法 (percutaneous transluminal coronary recanalization: PTCR), 17 例に経皮的冠動脈形成術 (percutaneous transluminal coronary angioplasty: PTCA), 7 例に PTCA と PTCR の両法を施行した。ΣCK, Forrester 分類および合併症は **Table 2** に示したとおりである。なお, 経過観察中に死亡した症例はなかった。

2. 急性心筋梗塞の末梢血リンパ球サブセット

1) 白血球数, リンパ球数

AMI 群の白血球数は入院時が他の測定時期に比して最も増多していたが, 経過とともに減少して 4 週から有意の増多を示さなくなり, 対照群との差もなくなった。一方, AMI 群のリンパ球数は経過を通して有意の変動を示さず, 対照群との間にも差がなかった (**Table 3**)。

2) T・B 細胞比

AMI 群の T 細胞比は経過中対照群と差がなかったが, 入院時および 8 週に比して 4 週で有意に高値を示した。B 細胞比は入院時が他の測定時期に比して最も上昇していたが, 4 週から減少して差を示さなくなっ

た。また対照群との間にも差がなかった (**Table 4**)。

3) CD4・CD8 陽性細胞比

AMI 群の CD4 陽性細胞比は入院時に比して 2 週で有意に上昇したが, 以後には有意の変動を示さなくなり, 対照群との間にも差がなかった。AMI 群の CD8 陽性細胞比は経過中に有意の変動を示さず, 対照群との間にも差がなかった (**Table 4**)。

4) CD4/CD8 比

CD4/CD8 比は AMI の経過中に有意の変動を示さなかった (**Table 4**)。

5) ヘルパー・インデューサー T 細胞比

AMI 群のヘルパー T 細胞比は対照群に比して入院時に有意に上昇しており, 2 週に最高となってから漸次低下し, 8 週には対照群と差を示さなくなった。AMI 群のインデューサー T 細胞比は 2 週に比して入院時に有意に低下したが, 他の観察期間では有意の変動を示さず, 対照群との間にも差がなかった (**Table 5**)。

6) サプレッサー・サイトトキシック T 細胞比

AMI 群のサプレッサー T 細胞比は対照群および入院時以外の他の観察期間に比して 2 週で有意に低下していたが, 4 週から有意な変動を示さなかった。一方, サイトトキシック T 細胞比は有意の変動を示さなかつ

Table 5 Helper, inducer, suppressor, cytotoxic T cells, and H/S ratio in patients with AMI and control subjects

	C	Patient group (weeks after AMI)				
		A	2	4	8	16
Helper T (%)	5.59 ± 3.30	9.13 ± 7.20* ¹	9.72 ± 5.77* ²	8.55 ± 4.69* ³	6.91 ± 3.24	6.26 ± 3.85
Inducer T (%)	30.44 ± 14.69	23.01 ± 11.20* ⁴	31.32 ± 11.87	30.67 ± 32.20	25.63 ± 11.93	27.11 ± 13.30
Suppressor T (%)	6.61 ± 4.43	6.46 ± 3.94	4.59 ± 2.48* ⁵	5.78 ± 2.68	6.87 ± 3.30	6.90 ± 3.77
Cytotoxic (%)	12.59 ± 7.60	9.98 ± 5.82	12.34 ± 8.85	13.94 ± 7.57	13.67 ± 7.93	11.04 ± 7.41
H/S ratio	1.54 ± 1.84	2.08 ± 1.78	3.08 ± 2.79* ⁶	2.12 ± 1.87	1.49 ± 1.41	1.20 ± 1.03

*¹A vs C, $p < 0.05$; *²2 weeks vs C, 8 and 16 weeks, $p < 0.05$, respectively; *³4 weeks vs C, $p < 0.05$; *⁴A vs 2 weeks, $p < 0.05$; *⁵2 weeks vs C, 4, 8 and 16 weeks, $p < 0.05$, respectively; *⁶2 weeks vs C, 8 weeks and 16 weeks, $p < 0.05$, respectively. Values are expressed as mean ± SD. H/S=helper T cells/suppressor T cells. Other abbreviations as in Tables 2, 3.

た。

7) ヘルパー T 細胞/サプレッサー T 細胞比 (H/S 比)

H/S 比は AMI 群で発症 2 週に最高に達してから漸次低下し, 4 週から有意の変動を示さなくなり, 対照群との間にも差がなくなった (Fig. 1).

8) ナチュラルキラー (NK) 細胞比

AMI 群の NK 細胞比のうち活性度 (+) 群は 2 週に比して 8 週で有意に高値を示した以外, 他の観察時期に変動がなく, 対照群とも差を示さなかった. 活性度 (++) 群は 2 および 4 週に比して 16 週で有意に高値であった. 活性度 (+++) 群は AMI 群と対照群で差がなく, 各観察時期でも変動はなかった (Table 6).

9) 活性化 CD4・CD8 陽性細胞比

AMI 群の活性化 CD4 陽性細胞比 (CD4⁺HLA-DR⁺) は, 入院後に漸増して, 4 週で対照群および入院時に比して有意に高値となり, 8 週に最高となってから低下し, 16 週には差がなくなった. AMI 群の活性化 CD8 陽性細胞化 (CD8⁺HLA-DR⁺) は, 入院後に漸増して, 対照群および入院時に比して 4 および 8 週で有意に上昇したが, 16 週には低下して差を示さなくなった (Table 6).

10) リンパ球サブセットの変動と梗塞サイズとの相関

末梢血リンパ球の各サブセットの変動と Σ CK 値, すなわち梗塞サイズとの間には有意の相関は認められなかった. また H/S 比の最大値と梗塞サイズとの間にも有意の相関がなかった.

3. 心筋梗塞後症候群

われわれは AMI の経過中に心嚢液貯留, 胸膜炎, C 反応性蛋白 (CRP) の上昇などを呈した 2 例の心筋梗塞後症候群を経験しており, そのリンパ球サブセットの

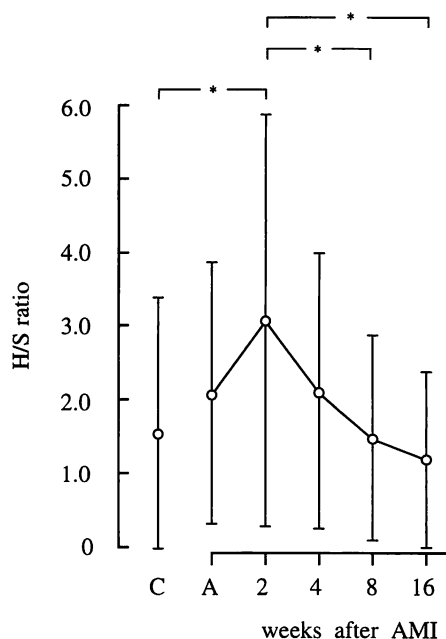


Fig. 1 Serial changes in the H/S ratio in patients with AMI
* $p < 0.05$.
Abbreviations as in Tables 2, 3, 5.

推移について述べる。

1) 症例呈示

症例 1 は広範囲前壁梗塞で入院した 71 歳の女性であり, 発症 1 週から胸痛とともに発熱, 心嚢液の貯留, 血沈の促進および CRP の上昇を呈した. 症例 2 は 69 歳の男性であり, 広範囲前壁梗塞発症後約 2 ヶ月に呼吸困難で再入院した. 入院時に発熱, 浮腫, 心嚢液貯留, 右側胸水, 血沈の促進および軽度の CRP 上昇を呈した. 前記の所見から 2 例は心筋梗塞後症候群と診断された. この 2 例の症状は非ステロイド系抗炎症薬の投与により軽快あるいは消失した.

Table 6 Natural killer cells and activated CD4- and CD8-positive cells in patients with AMI and control subjects

	C	Patient group (weeks after AMI)				
		A	2	4	8	16
NK (+) (%)	14.77±9.86	13.66±6.54	13.61±7.56	16.49±7.21	21.78±8.94* ¹	14.22±5.43
NK (++) (%)	7.10±5.89	6.73±5.05	4.62±3.00	5.71±4.26	7.21±4.96	11.01±6.38* ²
NK (+++) (%)	4.34±2.71	3.59±2.02	3.68±1.96	3.99±2.34	4.54±2.14	4.21±2.19
CD4 ⁺ HLA-DR ⁺ (%)	2.67±1.47	2.42±1.78	3.25±2.05	3.98±2.13* ³	4.33±2.28* ⁴	2.69±1.79
CD8 ⁺ HLA-DR ⁺ (%)	4.75±3.20	3.66±2.74	5.21±3.75	7.29±4.38* ⁵	7.71±2.97* ⁶	4.80±2.50

*¹8 weeks vs 2 weeks, $p < 0.05$; *²16 weeks vs 2 and 4 weeks, $p < 0.05$, respectively; *³4 weeks vs C and A, $p < 0.05$, respectively; *⁴8 weeks vs C and 4 weeks, $p < 0.05$, respectively; *⁵4 weeks vs C and A, $p < 0.05$, respectively; *⁶8 weeks vs C and A, $p < 0.05$, respectively. Values are expressed as mean±SD. NK=natural killer cells. Other abbreviations as in Tables 2, 3.

2) リンパ球サブセット

末梢血リンパ球サブセットは心筋梗塞後症候群の症例 1 では AMI 発症 2-16 週まで、症例 2 では 8-16 週まで検討できた。この 2 例は心筋梗塞後症候群を発症しなかった AMI 症例に比して、観察期間中を通して活性化 CD8 陽性細胞比の増加を示した (Fig. 2)。症例 2 のサイトキニン T 細胞比は他の AMI 群に比して観察期間中、有意に上昇していた。しかし、これら以外のサブセットは、AMI 群と心筋梗塞後症候群との間に差がなかった (Fig. 3)。

考 察

ヒト末梢血リンパ球はその生物学的機能および細胞表面抗原の相違から、T 細胞、B 細胞、および NK 細胞の 3 つに大別されている。近年、これらの細胞の表面抗原に対するモノクローナル抗体を用いることで、より詳細な分類が可能となっている。つまり特定の抗体を組み合わせることによって、リンパ球機能の違いから、さらに細かいサブセットが分類可能となる。T 細胞では Leu2a⁺Leu15⁺ は抑制性機能¹³⁾、Leu3a⁺Leu8⁻ はヘルパー機能¹⁴⁾、HLA-DR⁺ は活性化 T 細胞といった具合である¹⁵⁾。また、NK 細胞は Leu7 と Leu11 の組み合わせから、活性度別に 3 つのサブセットに分けられる¹¹⁾。リンパ球のこうした機能別分類から、免疫機能のより詳細な検討が可能になっている。

1. 急性心筋梗塞におけるリンパ球サブセット

1) ヘルパー T 細胞/抑制性 T 細胞比

Kuroki ら¹⁾は AMI 患者 21 例を対象に発症後 1, 7, 28 日に採血し、発症後第 1 日に対照群に比して AMI で T 細胞比と CD4 陽性細胞比が有意に低下、CD8 陽性細

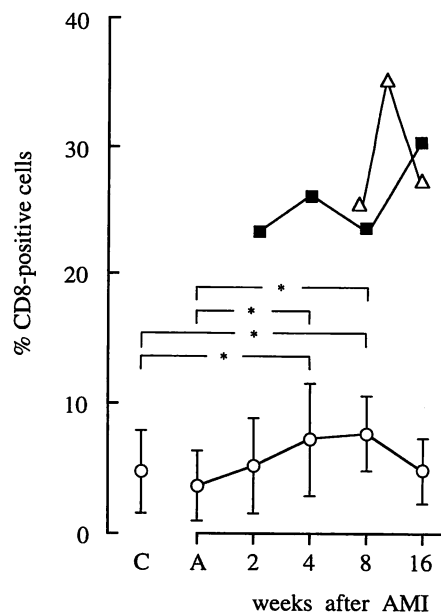


Fig. 2 Serial changes in the percentage of activated CD8-positive cells in patients with AMI and postmyocardial infarction syndrome

○: activated CD8-positive cells in AMI; ■: postmyocardial infarction syndrome: case 1; △: case 2.

* $p < 0.05$.

Abbreviations as in Tables 2, 3.

胞比が有意に上昇、CD4/CD8 比が有意に低下したと報告している。またリンパ球数と B 細胞比は有意の変動を示さなかったが、NK 活性は発症後 1, 7 および 28 日で低下していたという。さらに発症第 1 日での CD4 陽性細胞比の低下と心筋梗塞巣の大きさの間に有意の負の相関が認められたとしている。Kuroki らはこうした免疫能の変化が主としてストレスに起因しているであろうと推測している¹⁾。その他の報告からも、同様に発症早期での T 細胞の低下^{2,3)}、CD8 陽性細胞の増加⁴⁾、CD4/CD8 比の低下⁵⁾ が明らかにされている。こ

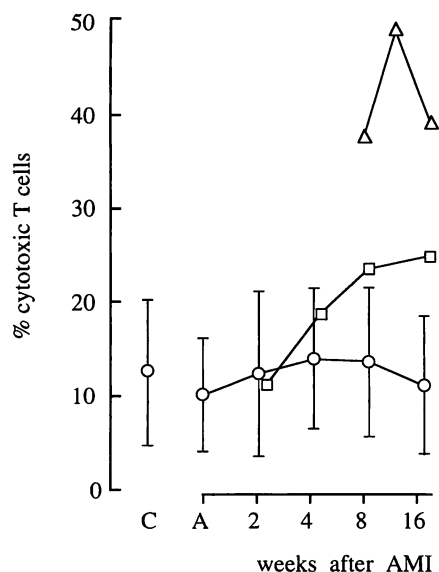


Fig. 3 Serial changes in cytotoxic T cells in patients with AMI and postmyocardial infarction syndrome

Percentage of cytotoxic T cells in case 2 with postmyocardial infarction syndrome was significantly higher than in AMI patients.

○: cytotoxic T cells in AMI; □: postmyocardial infarction syndrome: case 1; △: case 2.

Abbreviations as in Tables 2, 3.

これらの成績から、免疫能はAMI発症早期に一過性に低下するものと考えられてきた。

しかし、これらの研究で検討されたCD4陽性細胞やCD8陽性細胞は、それぞれが異なる機能を持ついくつかの細胞群で構成されている。したがって、CD4、CD8陽性細胞数の変動が示す意義はなんであるかを正確に知るには、細胞を機能ごとに分類して検討することが不可欠となる。今回の検討では、CD4陽性細胞のうちヘルパーT細胞比がAMI発症から4週まで有意に上昇、同時にCD8陽性細胞のうちサプレッサーT細胞比が有意に低下しており、両者は時間的に並行して変動していた。これら2つのサブセットの比であるH/S比は両者の変動を明確に示していた。

一方、今回の検討では、従来から免疫能の指標の一つであるCD4/CD8比に有意の変動が認められず、AMI後の免疫能の推移を判定する指標にはH/S比がCD4/CD8比より優れていると思われる。ヘルパーT細胞は免疫反応を亢進させる働きをし、逆にサプレッサーT細胞は免疫反応を抑制する働きをされるとされている。したがって、AMI患者の免疫機能は発症後少なくとも約1ヵ月間亢進しており、この機能亢進はヘルパーT細胞の増加とサプレッサーT細胞の減少の両方に起因

するものと推測される。

2) ヘルパー・サプレッサーT細胞の変動とストレス

そこでAMI発症後の免疫能亢進の発生機序が問題となってくる。AMI患者の大半は発症早期に種々の肉体的、精神的ストレスを受けていると考えられる。このストレスに対する生体反応は一種の適応現象であり、神経系、内分泌系および免疫系が互いに影響し合ったものとされている¹⁶⁾。従来ではストレスは免疫反応を抑制する¹⁷⁻¹⁹⁾とされてきたが、最近ではストレス負荷の種類によっては免疫能を亢進させる²⁰⁾ことも知られるようになった。

AMI患者が曝されるストレス刺激は単一なものではなく、それに対する免疫系の応答は複雑であると容易に推測されるが、AMI患者に対するストレス刺激は全体として免疫賦活に働いている可能性もある。AMI急性期には交感神経系が興奮し、血中のカテコラミン濃度も上昇する²¹⁾。リンパ系組織にはコリン作働性神経やアドレナリン作働性神経が分布している^{22,23)}ことは周知の事実であり、一方ではTリンパ球の膜表面にコリン受容体やβアドレナリン受容体が存在する²⁴⁾ことも知られている。

ストレスにより交感神経系が興奮すると、前述の神経線維末端や副腎髄質からエピネフリンを主とする神経伝達物質が放出され、この神経伝達物質が免疫細胞の膜受容体を介して免疫応答を調節していると考えられている。免疫応答はβアドレナリン受容体の刺激で増強される^{25,26)}ことから、AMI発症早期の免疫能亢進はストレスにより刺激された交感神経系のβ作用を介したものであると考えられる。

藤原ら²⁷⁾によると、ストレスによる免疫能増強時にヘルパー機能を有する胸腺非依存性のCD4⁻/CD8⁻ double negative T細胞が出現し、ストレスによる免疫抑制時にはサプレッサー機能を持ったdouble negative T細胞が出現するという。彼らはこのT細胞が胸腺依存性CD4陽性ヘルパーT細胞やCD8陽性サプレッサーT細胞に働きかけてストレスに対する免疫応答を制御しているのではないかと推測している²⁷⁾。またH/S比と梗塞サイズとの間に有意の相関が認められなかった今回の成績は、梗塞巣の大きさが免疫応答の強さと比例しないことを示している。つまり、AMI患者に加わるストレスの強度は、必ずしも梗塞サイズの大きさによって決定されるのではなく、種々の因子によ

り左右されることを示唆している。

3) 活性化 CD4・CD8 陽性細胞, NK 細胞

さらに今回の検討から, AMI 発症後 4-8 週に CD4 陽性細胞と CD8 陽性細胞の両者が活性化することも判明した。両者の活性化は 4 週以降に認められたのであり, ヘルパー T 細胞比およびサプレッサー T 細胞比の推移と時間的に一致しない。この不一致の理由は不明であるが, 活性化された CD4 陽性細胞と CD8 陽性細胞は, ヘルパー T 細胞とサプレッサー T 細胞以外のサブセット, つまりインデューサー T 細胞とサイトトキシック T 細胞である可能性が残されている。活性化したインデューサー T 細胞は, サプレッサー T 細胞を誘導²⁸⁾することが知られているので, 減少していたサプレッサー T 細胞数はインデューサー T 細胞によって増加したのかもしれない。一方サイトトキシック T 細胞は, 抗体依存性細胞性細胞毒性によって主としてウイルス感染細胞や腫瘍細胞を排除するように働くが, 自己免疫性臓器障害にも一部関与している²⁹⁾。

心筋梗塞を病理組織学に検討した報告では, 梗塞巣のリンパ球浸潤は発症 4 日から出現して約 3 週に最大となり, 以後数ヶ月間持続するという³⁰⁾。梗塞巣でのこれらリンパ球の働きは明らかではないが, 壊死組織の認識や排除の一端を担っている可能性がある。とくにサイトトキシック T 細胞は梗塞巣での変性細胞の排除に関わっている可能性が強い。いずれにしても, ヘルパー T 細胞およびサプレッサー T 細胞の推移と, CD4 陽性細胞および CD8 陽性細胞の活性化には, 別々の機序が働いていると推測される。

Klarlund ら⁶⁾は AMI 患者での NK 活性と NK 細胞数を AMI 発症後 6 週まで経時的に測定し, NK 活性の低下が認められたにもかかわらず NK 細胞数には変化がなかったと報告している。つまり, AMI 後の NK 活性低下は NK 細胞の量的低下によるのではなく, NK 細胞の機能的低下に起因すると考えられた。われわれは表面抗原から分類した活性度別に NK 細胞比を測定した。NK 活性は AMI 群と対照群間に差がなかったが, 8-16 週で他の観察時期に比して上昇していた。しかし, この変化は低度と中等度活性群で観察されたのであり, NK 活性度が全体として亢進していたと結論することは困難である。ただし今回の成績は, 少なくとも従来の報告¹⁶⁾とは異なっており, NK 活性低下は認められなかった。

2. 心筋梗塞後症候群におけるリンパ球サブセット

1) 活性化 CD8 陽性細胞, サイトトキシック T 細胞

Dressler³¹⁾は心筋梗塞発症後 2-10 週に発熱, 心膜炎, 胸膜炎, 肺臓炎などの症状が出現する症例を報告し, その発症機序に壊死心筋組織を抗原とする自己免疫が関与していることを想定した。以来, 心筋梗塞後症候群では抗心筋抗体が高頻度に出現する^{8,32)}ことが示され, 自己免疫疾患の根拠とされた。しかし, 同時に抗心筋抗体は心筋梗塞患者でも比較的高率に出現することが判明しており, 抗心筋抗体を心筋梗塞後症候群の原因とすることへの疑問も多い^{9,33)}。また細胞性免疫能からの検討でも, 現在までに特異的な成因を示唆する所見は得られていない³⁴⁻³⁶⁾。

今回われわれが経験した心筋梗塞後症候群の 2 症例では, CD8 陽性細胞は AMI 群に比して持続的に活性化しており, サイトトキシック T 細胞比も上昇していた。少数例の成績ではあるが, 心筋梗塞後症候群に細胞性免疫異常が存在し, AMI から心筋梗塞後症候群への発症に CD8 陽性細胞, とくにサイトトキシック T 細胞の活性化が関与することが示唆される。2 例とも抗心筋抗体陰性例であり, このような抗心筋抗体陰性の心筋梗塞後症候群の診断には, 活性化 CD8 陽性細胞比の測定が有用であると思われる。

2) 成 因

今回われわれが心筋梗塞後症候群で認めた前述の免疫異常の原因は不明である。しかし, 従来から心筋壊死に由来する変性蛋白や心筋壊死巣から血中に遊出する心筋構成蛋白を抗原とする自己免疫反応の可能性が推測されている。抗アクチン抗体および抗ミオシン抗体は心臓手術例と AMI 例で上昇し, さらに心筋梗塞後症候群を合併した例ではより高値を示したという報告³⁷⁾があり, 心筋構成蛋白のうちアクチンとミオシンが抗原となっていることが示唆されている。

また以前から熱刺激を代表とするさまざまな物理的ストレスを細胞に与えると, その後は同一のストレスに対して抵抗性が出現することが知られていた。最近ではこの抵抗性はストレス蛋白質の誘導によることが判明している。心筋細胞は虚血に曝露されると, 細胞内にストレス蛋白質が誘導され, 次の虚血曝露に対して抵抗性を獲得することが知られており, preconditioning の機序の一つ³⁸⁾と考えられている。このストレス蛋白質は強い免疫原性を有することから, 感染防御

や自己免疫疾患への関与³⁹⁾が注目されている。壊死を免れた心筋細胞内にストレス蛋白質が心筋梗塞後に誘導され、免疫原となっている可能性がある。このストレス蛋白質を認識するのはCD4⁻/CD8⁻ double negative T細胞であるといわれており⁴⁰⁾、ストレスに対する免疫能の変化を制御している細胞と同一であるのは興味深い。

結 論

急性心筋梗塞(AMI)37例と心筋梗塞後症候群2例の末梢血リンパ球サブセットを経時的に検討し、以下の結論を得た。

1. AMI群のヘルパーT細胞比は入院時からAMI発症4週まで上昇し、サプレッサーT細胞比はAMI発症2週に低下した。この両者の比であるH/S比は、発症2週に上昇した。また活性化CD4陽性細胞比と活性化CD8陽性細胞比は、AMI発症後4週から8週に上昇した。これらのリンパ球サブセットの変動は、AMI発症後に免疫能の亢進することを示唆している。

2. 心筋梗塞後症候群の2例では活性化CD8陽性細胞比は持続的に上昇し、うち1例ではサイトトキシクT細胞比が上昇した。これらのサブセットの変動は心筋梗塞後症候群の発症に細胞性免疫異常が関与していることを示唆している。

要 約

急性心筋梗塞発症後に出現する免疫能異常を検討するため、急性心筋梗塞例における末梢血リンパ球サブセットを経時的に測定した。また自己免疫機序によって発症するとされる心筋梗塞後症候群でのリンパ球サブセットの推移も併せて検討した。

対象は37例の急性心筋梗塞患者と2例の心筋梗塞後症候群である。リンパ球サブセットは入院時と発症後2,4,8および16週に、フローサイトメーターを用いた2カラー分析で検討した。

急性心筋梗塞群の白血球数は入院時と2週で健常対照群に比して有意に増加していた。CD4陽性ヘルパーT細胞比は、入院時、2および4週で健常対照群に比して有意に高値を示し、CD8陽性サプレッサーT細胞比は2週で健常対照群に比して有意に低値を示した。したがって、両者の比(H/S)は2週で最高に達し、以後漸減した。一方、CD4⁺/CD8⁺比は経過を通して有意の変動を示さなかった。サイトトキシクT細胞比とインデューサーT細胞比も有意の変動を示さなかった。さらにT細胞比、B細胞比、CD4陽性細胞比、CD8陽性細胞比およびナチュラルキラー(NK)細胞比も、梗塞群と健常対照群の両群間に差がなかった。しかし、梗塞群の活性化CD4およびCD8陽性細胞比は、4と8週で健常対照群に比して有意に高値を示した。なお、各サブセットの推移と梗塞サイズの間には有意の相関が認められなかった。

心筋梗塞後症候群例は健常対照群および急性心筋梗塞群に比して活性化CD8陽性細胞比が持続的に有意に上昇しており、うち1例ではサイトトキシクT細胞比が急性心筋梗塞群に比して有意に高値を示した。しかし、その他のサブセットは両群間に差がなかった。

今回の検討から、末梢血リンパ球サブセットの一部は、梗塞発症後に変動を示すことが判明した。これらの変動は細胞性免疫能が梗塞発症後に変動することを示唆している。また、心筋梗塞後症候群の末梢血リンパ球サブセットは急性心筋梗塞群と異なる変動を示しており、末梢血リンパ球サブセットの測定は本症候群の病因解明の一助となりうることを示唆された。

J Cardiol 1995; 26: 69-79

文 献

- 1) Kuroki S, Miyahara K, Uematsu T : Immunological aspect in patients with acute myocardial infarction. *Jpn Circ J* 1993; **57** : 37-46
- 2) Agrawal CG, Gupta SP, Chaturvedi UC, Mitra MK, Gupta NN, Gupta S : T lymphocytes and anticardiac antibodies in patients with ischemic heart diseases. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1978; **57** : 246-252
- 3) Kaufman HS, Kvitash VI : Immunologic abnormalities associated with acute ischemic heart disease (a pilot study). *Ann Allergy* 1989; **63** : 287-290
- 4) Horváth M, Jovanovich N, Kádár K, Györfy GY : Distribution of T lymphocyte subsets in patients with vascular diseases. *Cor Vasa* 1984; **26** : 429-437
- 5) Syrjälä H, Surcel HM, Ilonen J : Low CD4/CD8 T lymphocyte ratio in acute myocardial infarction. *Clin Exp Immunol* 1991; **83** : 326-328
- 6) Klarlund K, Pedersen BK, Theander TG, Andersen V : Depressed natural killer cell activity in acute myocardial infarction. *Clin Exp Immunol* 1987; **70** : 209-216
- 7) Earis JE, Marcuson EC, Bernstein A : Complement activation after myocardial infarction. *Chest* 1985; **87** : 186-190
- 8) van der Geld H : Anti-heart antibodies in the postpericardiotomy and postmyocardial-infarction syndromes. *Lancet* 1964; **II** : 617-621
- 9) Lichstein E, Arsura E, Hollander G, Greengart A, Sanders M : Current incidence of postmyocardial infarction (Dressler's) syndrome. *Am J Cardiol* 1982; **50** : 1269-1271
- 10) Shell WE, Kjekshus JK, Sobel BE : Quantitative assessment of the extent of myocardial infarction in the conscious dog by means of analysis of serial changes in serum creatine phosphokinase activity. *J Clin Invest* 1971; **50** : 2614-2625
- 11) Lanier LL, Le AM, Phillips JH, Warner NL, Babcock GF : Subpopulations of human natural killer cells defined by expression of the Leu-7 (HNK-1) and Leu-11 (NK-15) antigens. *J Immunol* 1983; **131** : 1789-1796
- 12) Böyum A : Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood : Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest* 1968; **21** (Suppl 97) : 77-89
- 13) Landay A, Gartland GL, Clement LT : Characterization of a phenotypically distinct subpopulation of Leu-2⁺ cells that suppresses T cell proliferative responses. *J Immunol* 1983; **131** : 2757-2761
- 14) Gatenby PA, Kansas GC, Xian CY, Evans PC, Engleman EG : Dissection of immunoregulatory subpopulations of T lymphocytes within the helper and suppression sublineages in man. *J Immunol* 1982; **129** : 1997-2000
- 15) Reinherz EL, Kung PC, Pesando JM, Ritz J, Goldstein G, Schlossman SF : Ia determinants on human T-cell subsets defined by monoclonal antibody. *J Exp Med* 1979; **150** : 1472-1482
- 16) Besedovsky HO, del Rey A, Sorkin E : Immune-neuroendocrine interactions. *J Immunol* 1985; **135** : 750-754
- 17) Munster AM : Post-traumatic immunosuppression is due to activation of suppressor T cells. *Lancet* 1976; **I** : 1329
- 18) Miller CL, Baker CC : Changes in lymphocyte activity after thermal injury. *J Clin Invest* 1979; **63** : 202-210
- 19) Kupper TS, Baker CC, Ferguson TA, Green DR : A burn induced Ly-2 suppressor T cell lowers resistance to bacterial infection. *J Surg Res* 1985; **38** : 606-612
- 20) Fujiwara R, Orita K : The enhancement of the immune response by pain stimulation in mice. : The enhancement effect on PFC production via sympathetic nervous system in vivo and in vitro. *J Immunol* 1987; **138** : 3699-3703
- 21) Ceremuzynski L : Hormonal and metabolic reactions evoked by acute myocardial infarction. *Circ Res* 1981; **48** : 767-776
- 22) Bulloch K, Pomerantz W : Autonomic nervous system innervation of thymic-related lymphoid tissue in wildtype and nude mice. *J Comp Neurol* 1984; **228** : 57-68
- 23) Felten DL, Felten SY, Carlson SL, Olschowka JA, Livnat S : Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid tissue. *J Immunol* 1985; **135** : 755s-765s
- 24) Hadden JW : Neuroendocrine modulation of the thymus-dependent immune system. *Ann NY Acad Sci* 1987; **496** : 39-48
- 25) Sanders VM, Munson AE : Beta adrenoreceptor mediation of the enhancing effect of norepinephrine on the murine primary antibody response in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 1984; **230** : 183-192
- 26) Besedovsky HO, del Rey A, Sorkin E, Da Prada M, Keller HH : Immunoregulation mediated by the sympathetic nervous system. *Cell Immunol* 1979; **48** : 346-355
- 27) 藤原良一, 横山三男 : ストレスと免疫応答. *医のあゆみ* 1990; **154** : 355-358
- 28) Mohaghehpour N, Benike CJ, Kansas G, Bieber C, Engleman EG : Activation of antigen-specific suppressor T cells in the presence of cyclosporin requires interactions between T cells of inducer and suppressor lineage. *J Clin Invest* 1983; **72** : 2092-2100
- 29) Braciale VL : Cytotoxic T lymphocytes. *in* Encyclopedia of Immunology (ed by Roitt IM). Academic Press, New York, 1992; pp 447-450
- 30) Olsen EGJ : Ischemic disease of the myocardium and its complications. *in* Cardiovascular Pathology (ed by Silver MD). Churchill Livingstone, New York, 1983; pp 393-439
- 31) Dressler W : The post-myocardial-infarction syndrome : A report on forty-four cases. *Arch Intern Med* 1959; **103** : 28-42
- 32) Ehrenfeld EN : Specific antibodies in heart-disease. *Lancet* 1961; **I** : 1138-1141
- 33) Liem KL, ten Veen JH, Lie KI, Feltkamp TEW, Durrer D : Incidence and significance of heartmuscle antibodies in patients with acute myocardial infarction and unstable angina. *Acta Med Scand* 1979; **206** : 473-475
- 34) Lawrence MSTA, Wright R : Tamponade in Dressler's syndrome with immunological studies. *Br Med J* 1972; **1** : 665-666
- 35) Wartenberg J, Brostoff J : Leucocyte migration inhibition by heart extract and liver mitochondria in patients with myocardial infarction. *Br Heart J* 1973; **35** : 845-848
- 36) Kennedy HL, Das SK : Postmyocardial infarction (Dressler's)

- syndrome : Report of a case with immunological and viral studies. *Am Heart J* 1976; **91** : 233-239
- 37) De Scheerder I, Vandekerckhove J, De Buyzere M, Robbrecht J, Delanghe J, Bogaert AM, Clement DL : Humoral immune response in post-cardiac injury syndrome. *Eur Heart J* 1987; **8** : 229-231
- 38) Das DK, Engelman RM, Kimura Y : Molecular adaptation of cellular defences following preconditioning of the heart by repeated ischaemia. *Cardiovasc Res* 1993; **27** : 578-584
- 39) Young RA, Elliott TJ : Stress proteins, infection, and immune surveillance. *Cell* 1989; **59** : 6-8
- 40) Holoshitz J, Koning F, Coligan JE, de Bruyn J, Strober S : Isolation of CD4⁺ CD8⁻ mycobacteria-reactive T lymphocyte clones from rheumatoid arthritis synovial fluid. *Nature* 1989; **339** : 226-229