

心筋内ミオグロビン代謝に対するアルコール摂取の影響

I. 剖検心における免疫組織学的検討

鳥居 尚志

アルコール性心筋症の発生機序についてはいまだ不明な点が多い。ミオグロビン (Mb) は、筋細胞中で主に酸素の運搬と貯蔵を行い、その代謝にとって重要な役割を演じるので、アルコール摂取が心筋細胞の Mb 代謝に与える影響について、剖検心を用いて免疫組織学的に検討することを目的に本研究を行った。

対象は剖検例から3群、すなわち、I群: 10年以上の習慣的な飲酒歴のある28例、II群: 飲酒歴のない28例、III群: 疾病対照 (特発性心筋症、心筋炎、進行性筋チストロフィー症、Kugelberg-Welander 病) 9例を選んだ。検索方法は、左心房・心室壁筋のホルマリン固定・パラフィン切片を用い、抗ヒト Mb 家兎血清 fab' 分画によりペルオキシダーゼ酵素抗体法 (直接法) で Mb 染色を行い、あわせて心筋細胞の変性と間質の線維化との関連を検討するために、alcian blue-PAS と azan 染色を行った。

I群では、II群に比べて、心筋細胞の Mb 染色性が明らかに低下していた。特に大酒家 (10年以上にわたるエタノール換算量 125 ml /日) では、その傾向が顕著であった。III群も Mb 染色性が低下していたが、II群との間に統計的な有意差はなかった。各症例における心筋の部位別染色性は、I群において左室壁の心内膜側半で Mb 染色性の低下を示すものが、その心外膜側半や心房壁におけるものよりも有意に多かった。

心筋細胞の変性と間質の線維化の頻度は、3群間で有意の差がなかった。

以上の結果より、長期間のアルコール摂取によって心筋細胞の Mb 代謝に何らかの障害が起こり、それがアルコール性心筋症の発生に関与する可能性が示唆された。

(平成元年5月24日採用)

Effect of Alcohol-Intake on the Myoglobin Metabolism of the Myocardium I. Immunohistochemical Study of Autopsy Hearts

Takashi Torii

The etiology of alcoholic cardiomyopathy remains unknown. Myoglobin plays an important role in the metabolism of muscle cells, by which oxygen is transported and stored intracellularly. The purpose of this study was to examine the effect of alcohol-intake on the myoglobin metabolism of myocardial cells by using immunohistochemical techniques on autopsy hearts.

Three groups were selected for study from autopsy cases; Group I: 28 cases with a history of habitual alcohol-intake of over 10 years, Group II: 28 cases

with no history of alcohol-intake, and Group III : 9 control cases with other diseases (idiopathic cardiomyopathy, myocarditis, progressive muscular dystrophy and Kugelberg-Welander disease).

Myoglobin was stained on formalin-fixed paraffin sections of the left atrial and ventricular myocardium by the direct immunoperoxidase method, using fab' fragments of anti-human myoglobin rabbit serum. Alcian blue-PAS and azan staining were also done, to study, respectively, how cellular degeneration or interstitial fibrosis in the myocardium, if present, correlates with alcohol-intake.

In Group I, the myoglobin staining reaction in myocardial cells was lower than that in Group II. The decrease was especially evident in the myocardium of heavy drinkers (daily intake of alcoholic beverages with more than 125 ml of ethanol content over 10 years duration). The myoglobin stainability in Group III was also lower than that in Group II, but there was no significant statistical difference between the two groups. Regarding differences in the myoglobin stainability of 3 selected myocardial portions taken from each case, it was only in Group I that the stainability was significantly lowered in the endocardial half of the left ventricular wall as compared to that in the other epicardial half or in the left atrial wall.

There was no significant difference among the 3 groups in the occurrence of cellular degeneration or interstitial fibrosis in the myocardium.

The results of the present study suggest the possibility that long-term alcohol-intake may disarrange the myoglobin metabolism in myocardial cells, leading to the occurrence of alcoholic cardiomyopathy. (Accepted on May 24, 1989) *Kawasaki Igakkaishi* 15(3) : 415-421, 1989

Key Words ① Alcoholic cardiomyopathy ② Myoglobin
③ Immunohistochemical study

はじめに

わが国におけるアルコール消費量は年々増加し、それに伴ってアルコールに起因する臓器障害や代謝異常に対する関心が高まってきた。長期で大量のアルコール摂取は、心筋の物質代謝を障害し、心臓の肥大や拡張さらには心機能低下を引き起こすことが知られている。一般には、アルコール性心筋症あるいはアルコール性心筋障害と呼ばれているが、その発生機序については不明な点が多い。

ミオグロビン (Mb) は筋組織中に存在するヘム蛋白であり、分子量は 17,500 でヘモグロビン (Hb) の約 1/4 に相当する。その主な機能は、筋組織において血中の Hb から酸素を受

け取り、それを筋組織中で運搬、貯蔵し、エネルギー産生系に供給することである。^{1),2)} この機能は心筋組織においても同様で、³⁾ 心筋の代謝や運動にとって不可欠で重要な働きを果たしている。したがって、何らかの原因で Mb 代謝に異常が生じれば筋組織の代謝が障害され、いろいろな筋・心筋障害を来す可能性がある。そこでもし、アルコールによって心筋内 Mb 代謝に異常が生じるならば、そのことがアルコール性心筋症の発症に関与する可能性が十分考えられる。

本研究は、アルコール摂取が心筋細胞の Mb 代謝に与える影響の検討を目的として、剖検心を用いて心筋細胞の Mb 染色性を免疫組織学的に検索したものである。

対 象

1980年から7年間の当院剖検例から、下記のごとく対象を選んだ。I群：10年以上の習慣的飲酒歴を有する28例（エタノール量で1日125 mlの大酒家13例を含む）。年齢37～78（平均54.1）歳。II群：飲酒歴のない28例。年齢48～82（平均66.0）歳。III群：疾病対照9例（特発性心筋症4例，心筋炎3例，進行性筋ジストロフィー症1例，Kugelberg-Welander病1例）。年齢9～81（平均51.7）歳。男女比はI群とIII群でそれぞれ27：1と9：0で，圧倒的に男性が多く，またII群は14：14と同数であった。III群の心平均重量は，I・II群より有意に重かった。なおI群中でも，臨床病理学的にアルコール性心筋症と確診できる症例はみられなかった。I群では，肝硬変例が17例（60%）と多かったため，II群にも同数の肝硬変例を含めた。虚血性心疾患合併例はいずれの群からも除外した（Table 1）。

方 法

剖検心ホルマリン固定標本から，左心房および左心室壁と僧帽弁を1ブロックに含むパラフィン切片を作り，ペルオキシダーゼ酵素抗体法（直接法）によるMb染色のほか，alcian blue-PAS（AB-PAS）およびazan染色を行った。Mb染色用の抗体は，MBL社に依頼して，DAKO社製抗ヒトMb家兎血清のhorse-radish peroxidase標識fab'分画抗体を作成したものをを用いた。

Mbの染色結果は，左心房全壁（LA），左心室心内膜側半（ED）と左心室外膜側半（EP）の3か所に分けて，次の基準で判定した。すなわち，A：心筋細胞はほぼ均一によく染色される（Fig. 1），B：Mb染色性の低下した心筋細胞が中等度混在する（Fig. 2），C：Mb染色性の低下した心筋細胞が多数混在する（Fig. 3），ものとした。以上の方法でI・II・III群間に

Table 1. Patient characteristics in three groups

Group	Age (mean)	♂ : ♀	Cardiac weight (g)	Liver cirrhosis (%)
I n=28	37~78 (54.1)	27 : 1	m 349.3	17 (60)
①n=13	37~74 (55.2)	13 : 0	m 338.5	8 (61)
II n=28	48~82 (66.0)	14 : 14	m 339.6	17 (60)
III n= 9	9~81 (51.7)	9 : 0	m 427.8*	0 (0)

*=P<0.05

I=Alcoholic group; II=Nonalcoholic group; III=Control from other diseases; ①=Heavy drinker (125 ml-daily intake as equivalent to ethanol over 10 years); m=mean

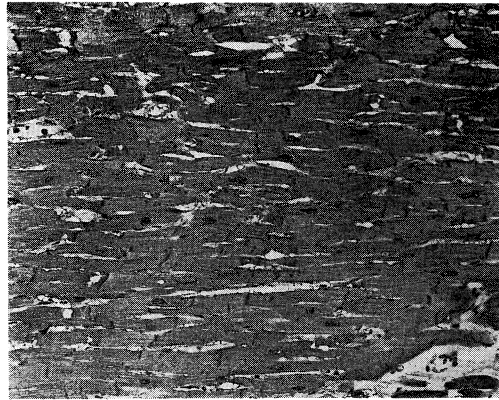


Fig. 1. Direct peroxidase staining of myoglobin in the myocardium. Grade A-staining. The majority of myocardial cells are well and uniformly stained. Group II (Nonalcoholic), $\times 200$.



Fig. 2. Direct peroxidase staining of myoglobin in the myocardium. Grade B-staining. Small numbers of myocardial cells are irregularly unstained. Group I (Alcoholic), $\times 200$.

において、Mb 染色性の判定結果を比較検討し、また心筋の部位別にも判定結果を比較検討した。

AB-PAS 染色により心筋細胞内の粘液性変性物質の沈着の有無を、また azan 染色により間質の線維化の有無を判定し、その結果を各群間で比較検討した。

結 果

I・II・IIIの3群間における Mb 染色性の比較では、LA, ED および EP のうち1か所

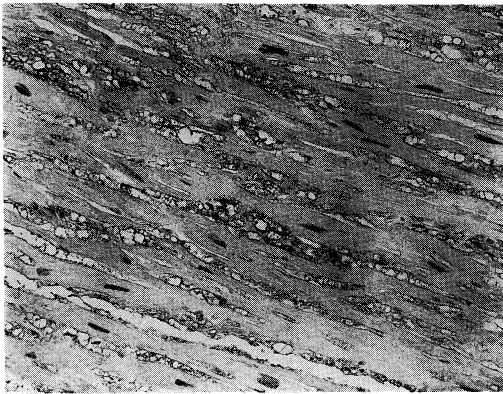


Fig. 3. Direct peroxidase staining of myoglobin in the myocardium. Grade C-staining. Large numbers of myocardial cells are diffusely unstained. Group I (Alcoholic), $\times 200$.

Table 2. Immunohistochemical staining of myoglobin in the myocardium

Group	Staining grade		
	A	B	C
I n=28 (%)	3 (11)	6 (21)	19 (68)*
①n=13 (%)	0 (0)	3 (23)	10 (77)*
II n=28 (%)	3 (11)	15 (54)	10 (35)
III n= 9 (%)	1 (11)	1 (11)	7 (78)

*= $P < 0.05$

I = Alcoholic group; II = Nonalcoholic group; III = Control from other diseases; ① = Heavy drinker; A = The majority of myocardial cells to be well-stained uniformly; B = Small numbers of myocardial cells to be unstained; C = Large numbers of myocardial cells to be unstained

でもCであったものについてみると、I群では28例中19例(68%)に認められ、II群の28例中10例(35%)の発生率よりも有意に多かった。I群中の大酒家に限ってみると、Cは13例中10例(77%)とさらに高頻度にみられた。III群におけるCの頻度は、II群との間に統計的な有意差はなかったが、9例中7例(78%)と高率であった(**Table 2**)。

次に、心筋の部位別による Mb 染色性の違いを示す(**Table 3**)。各部位別に3群間の比較を

Table 3. Immunohistochemical staining of myoglobin in three different portions of the myocardium

Portion examined	Group	Staining grade		
		A	B	C
LA	I n=28	8	17	3
	II n=28	8	19	1
	III n= 9	1	7	1
ED	I	3	7	18*
	II	6	13	9
	III	1	1	7
EP	I	7	13	8
	II	14	10	4
	III	1	6	2

*= $P < 0.05$

I = Alcoholic group; II = Nonalcoholic group; III = Control from other diseases; A = The majority of myocardial cells to be well-stained uniformly; B = Small numbers of myocardial cells to be unstained; C = Large numbers of myocardial cells to be unstained; LA = Entire layer of the left atrial wall; ED = Endocardial half of the left ventricular wall; EP = Epicardial half of the left ventricular wall

Table 4. Mucoid degeneration and fibrosis as revealed by AB-PAS and azan stains

Group	Degeneration	Fibrosis
I n=28 (%)	8 (29)	7 (25)
II n=28 (%)	7 (25)	9 (32)
III n= 9 (%)	5 (56)	5 (56)

I = Alcoholic group; II = Nonalcoholic group; III = Control from other diseases; AB-PAS = Alcian blue-PAS

すると、EDでは、I・III群はCの頻度がII群におけるより高かったが、LAとEPでは3群間にCの頻度に有意差がなかった。一方、各群について部位別によるMb染色性の違いをみると、I群では、EDにおけるCの頻度がLAとEPにおけるよりも高かった。II・III群ではEDにおけるCの頻度がLAにおけるより高かったが、EDとEPの間には差がなかった。

心筋細胞内の変性物質の沈着と、心筋間質の線維化の出現頻度は、I群とII群の間には差がなかった。III群では、変性物質と線維化がともに9例中5例(56%)とI群およびII群よりも高率にみられたが、統計的には有意差がなかった(Table 4)。

考 察

アルコール性心筋症における心筋の組織学的変化については、今日までに多くの報告がみられるが、特異的な変化は知られていない。一般的には心筋細胞の空胞変性、水腫様変性、脂肪変性などの種々の変性と、心筋細胞の肥大と萎縮、横紋の消失のほか、心筋間質における血管周囲のびまん性または斑状の線維化などである。^{4),5)} これらの組織学的変化は、アルコール以外の心筋障害でも認められ、アルコール性心筋症に特異的とはいえない。Hibbsら⁶⁾は、電顕的検索によりアルコール性心筋症に特異的な変化を指摘している。すなわち、① formation of dense intramitochondrial inclusions, ② the appearance of stacks of osmiophilic cristae within some of the mitochondria, ③ increased numbers of lipofuscin granules and lysosome-like bodies, ④ extensive fragmentation of the sarcoplasmic reticulumである。しかしながら、これらの変化も実験的虚血の心筋電顕像⁷⁾と類似している。また急性アルコール中毒実験での心筋の電顕像⁸⁾も、同様に実験的虚血の心筋電顕像と類似している。

Mbは、筋・心筋細胞内で主に酸素の運搬と貯蔵に関与している。¹⁾⁻³⁾ 心筋組織が虚血に

よって壊死に陥ると、CPKなどの酵素と同様にMbが細胞外へ漏出し、⁹⁾ 心筋細胞のMb染色性も低下することが知られている。¹⁰⁾ 一方、Mb代謝に異常がある場合、細胞内で酸素の運搬と貯蔵が円滑に行われず、筋・心筋細胞の代謝に悪影響を及ぼすことが当然予想される。実際に筋ジストロフィー症のDuchenne型では、Mbの構成成分が正常と異なっていると報告されている。¹¹⁾

本研究におけるMb免疫染色の結果からは、I群(アルコール群)において心筋細胞のMb染色性が低下した例がII群(非アルコール群)におけるよりも明らかに多く、大酒家においてとくにその傾向が顕著であった。このことは、アルコールまたはその代謝産物が何らかのメカニズムにより、心筋細胞内のMbの変性、遊出あるいは産生障害を引き起こすか、または過剰な消耗を来した結果、その染色性が低下した可能性を示唆するものであろう。Mbの代謝異常があれば、心筋細胞の酸素需要の増加にうまく対応できなくなり、循環障害がなくても細胞内レベルでの虚血が生じ得ると考えられる。長期間の飲酒によりこのような状態が継続すれば、中性脂肪の沈着¹²⁾をはじめとするアルコールによる種々の代謝障害¹³⁾⁻¹⁵⁾が起り、さらには心筋細胞の変性や心収縮力の低下も起き得ると推定される。

しかしMbの代謝障害はもちろんアルコール性障害だけに特異的なものではない。急性心筋梗塞をはじめ種々の心筋および骨格筋疾患において、病変部の細胞膜透過性の亢進から血中ないしは尿中にMbが増加することが知られ、^{16),17)} 臨床検査にさえ利用されている。

田村ら¹⁸⁾はラット灌流心を用いた実験で、Mbの酸素化レベルの低下が心筋組織内低酸素の指標となり、さらにMbの酸素化レベルと心収縮力との間に相関があることも証明している。またアルコール性心筋症の組織学的変化が、虚血性心筋障害の変化と類似している点⁶⁾⁻⁸⁾を考慮に入れてもMbの代謝異常に基づく心筋細胞内虚血がアルコール性心筋症の発生に何らかに関与する可能性が示唆される。

本研究のⅢ群(疾病対照群)のMb染色結果をみると、症例数が少ないためにⅡ群(非アルコール群)との間に統計的な有意差はなかったが、C(Mb染色性が低下した心筋細胞が多数混在)の判定が9例中7例(78%)でⅠ群(アルコール群)と同様に高率であった。とくに特発性心筋症の5例は、肥大型・拡張型を問わず全例がCであった。このことは、特発性心筋症においてもMb代謝に何らかの異常が存在する可能性を示唆するものと思われ、興味深い。

心筋部位別にMb染色結果を検討すると、3群ともC判定は心内膜側半で多い傾向があり、Ⅰ群(アルコール群)では心内膜側半のCの頻度が他の部位よりも有意に高かった。またⅠ群はCの頻度がⅡ群(非アルコール群)のそれより有意に高かったが、その差は心内膜側半だけに認められ、左心房壁と心外膜側半ではCの頻度に有意の差がみられなかった。一般に、心筋の心内膜側は心外膜側に比べて心筋内圧が高く、冠血流がより末梢性であるため、その低下時の血流調節予備能が低い。このため、心筋虚血時に心内膜側は心外膜側より強い障害を受けることはよく知られている。したがって、アルコールによってMb代謝に異常が起き、心筋全体が低酸素状態に陥ったとすると、心内膜側でその影響がより強く現れることは容易に理解できる。

アルコール性心筋症では、特異的ではないが一般的な心筋細胞の形態学的変化として、細胞内のalcian-blueないしはPAS陽性の粘液性

変性物質の沈着のほか、血管周囲や間質の線維化が認められる。^{4),5)}本研究では、Ⅲ群(疾病対照群)で細胞内変性物質と線維化が最も高率にみられた。しかし、Ⅰ群(アルコール群)とⅡ群(非アルコール群)では両方とも低率で、両群間にもそれらの出現頻度に差がなかった。これは、Ⅰ群として選ばれた症例28例中には、臨床病理学的にアルコール性心筋症と確実に診断できる例が含まれず、したがってアルコール性心筋障害としては軽症の症例ばかりであったことが関係しているのかもしれない。

以上の成績からみて、過度のアルコール摂取は心筋細胞内のMb代謝に何らかの影響を与えるようである。

これまでに、正常な筋細胞内のMb局在についてはいくつかの報告がみられるが、一定の知見は得られていない。^{19)~21)}Kent²²⁾は、動物実験で虚血早期の可逆性心筋障害の段階では、Mbは心筋細胞内から脱失しないで細胞質から核内へ拡散し、その細胞内局在が可逆性に变化することを示した。アルコール性心筋障害においてはどのようなMbの細胞内局在の変化がみられるか興味があり、その解明がアルコール性心筋症の発生とMb代謝異常との関係を明らかにするうえで一つの重要な手掛かりとなるかもしれない。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲をいただいた川崎医科大学附属川崎病院病理部 伊藤慈秀教授に感謝いたします。また、本研究に対し御助言、御協力をいただいた川崎医科大学附属川崎病院病理部 水島睦枝講師をはじめ病理検査部の各位に感謝いたします。

文 献

- 1) Theorell, H.: Kristallinisches myoglobin. *Biochem. Z.* 268: 73—82, 1934
- 2) Rossi-Fanelli, A. and Antonini, E.: Studies on the oxygen and carbon monoxide equilibria of human myoglobin. *Arch. Biochem. Biophys.* 77: 478—492, 1958
- 3) Åkeson, Å., Björck, G. and Simon, R.: On the content of myoglobin in human muscles. *Acta Med. Scand.* 183: 307—316, 1968
- 4) Schenk, E. A. and Cohen, J.: The heart in chronic alcoholism. *Clinical and pathologic findings.* *Pathol. Microbiol.* 35: 96—104, 1970
- 5) 桑島宏充: 常習飲酒者における心血管系の形態学的変化、特にこれと死因との関係について。日法医誌 19: 126—158, 1965

- 6) Hibbs, R. G., Ferrans, V. J., Black, W. C., Weilbaecher, D. G., Walsh, J. J. and Burch, G. E.: Alcoholic cardiomyopathy. *Am. Heart J.* 69: 766—779, 1965
- 7) Jennings, R. B., Baum, J. H. and Herdson, P. B.: Fine structural changes in myocardial ischemic injury. *Arch. Pathol.* 79: 135—143, 1965
- 8) 伊藤順通, 庄司宗介, 桐林 香: 急性アルコール中毒家兎心筋の形態学的変化. *Jpn. J. Stud. Alcohol* 1: 265—274, 1966
- 9) Grenadier, E., Keidar, S., Kahana, L., Alpan, G., Marmur, A. and Palant, A.: The roles of serum myoglobin, total CPK, and CK-MB isoenzyme in the acute phase of myocardial infarction. *Am. Heart J.* 105: 408—416, 1983
- 10) 乾 道夫, 木村寿子, 徳留省吾, 松尾義裕, 熊谷哲雄, 阿部伸幸: 突然死剖検例にみるヒト心筋内ミオグロビンの動態, 特に虚血性心不全との関連について. *病理と臨* 4: 71—79, 1986
- 11) 大島康男: 進行性筋ジストロフィー症のミオグロビン異常, 特に電気泳動的亜分画の異常. *四国医誌* 24: 307—321, 1968
- 12) Lieber, C. S., Spritz, N. and DeCarli, L. M.: Accumulation of triglycerides in heart and kidney after alcohol ingestion. *J. clin. Invest.* 45: 1041, 1966
- 13) Pachinger, O. M., Tillmanns, H., Mao, J. C., Fauvel, J. M. and Bing, R. J.: The effect of prolonged administration of ethanol on cardiac metabolism and performance in the dog. *J. clin. Invest.* 52: 2690—2696, 1973
- 14) Sarma, J. S. M., Ikeda, S., Fischer, R., Maruyama, Y., Weishaar, R. and Bing, R. J.: Biochemical and contractile properties of heart muscle after prolonged alcohol administration. *J. mol. cell. Cardiol.* 8: 951—972, 1976
- 15) Miles, B. K., Gunnar, R. M. and Tobin, J. R.: Chronic ethanol ingestion and myofibrillar adenosine triphosphatase (ATPase) activity. *Clin. Res.* 15: 215, 1967
- 16) Rowland, L. P. and Penn, A. S.: Myoglobinuria. *Med. Clin. North Am.* 56: 1233—1256, 1972
- 17) 三好和夫, 川井尚臣, 岩朝 勝, 近藤 彰, 今井幸三, 虫本光徳, 八木田正聖: ミオグロビン. *日臨* 38: 44—54, 1980
- 18) 田村正秀, 橋 秀光, 竹内章二, 久保良彦, 鮫島夏樹, 田村 守: 光学的手法を用いた組織酸素代謝の検討, とくに無侵襲計測をめざして. *人工臓器* 15: 1142—1145, 1986
- 19) Goldfischer, S.: The cytochemical localization of myoglobin in striated muscle of man and walrus. *J. Cell Biol.* 34: 398—403, 1968
- 20) Kagen, L. J. and Gurevich R.: Localization of myoglobin in human skeletal muscle using fluorescent antibody technique. *J. Histochem. Cytochem.* 15: 436—441, 1967
- 21) 西野 洋, 川井尚臣: 人ミオグロビンの筋細胞内局在: 免疫電顕による研究. *四国医誌* 41: 363—369, 1985
- 22) Kent, S. P.: Intracellular diffusion of myoglobin. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 108: 827—830, 1984