

厚生省特定疾患重点領域研究

試験管内ALアミロイド線維形成機構の反応速度論モデルの開発、
および生理的重合阻害分子ならびに非ペプチド性重合阻害剤の探索班

1998年度研究報告書

1999年3月

主任研究者 内木 宏延

福井医科大学医学部病理学第二講座

厚生省特定疾患重点領域研究

試験管内ALアミロイド線維形成機構の反応速度論モデルの開発、
および生理的重合阻害分子ならびに非ペプチド性重合阻害剤の探索班

1998年度研究報告書

1999年3月

主任研究者 内木 宏延

福井医科大学医学部病理学第二講座

目 次

| | |
|---|----|
| 研究班構成 | 3 |
| 総括研究報告 | 7 |
| 分担研究報告 | |
| 全身性 AL アミロイドーシス剖検例の集積、及び臨床的・病理学的解析 | 13 |
| 福井医大第一内科 上田 孝典 | |
| 信州大医学部第三内科 池田 修一 | |
| 天理よろづ相談所病院病理 宮川 文 弓場 吉哲 | |
| 京都民医連中央病院病理 藤田 葉子 若田 泰 | |
| 熊本大医学部第一内科 寺崎 久泰 安東由喜雄 | |
| 山口大医学部第一病理 星井 嘉信 河野 裕夫 石原 得博 | |
| 福井医大臨床検査医学 下条 文武 | |
| 福井医大第二病理 内木 宏延 | |
| 新鮮凍結臓器からのALアミロイド線維の精製、及び電顕的・生化学的解析 | 21 |
| 福井医大臨床検査医学 下条 文武 長谷川一浩 山口 格 | |
| 信州大医学部第三内科 池田 修一 | |
| 福井医大第二病理 内木 宏延 | |
| 蛍光色素チオフラビンTを用いたヒト AL アミロイド線維分光蛍光定量法 | 25 |
| 福井医大第二病理 内木 宏延 | |
| 福井医大臨床検査医学 長谷川一浩 山口 格 下条 文武 | |
| 信州大医学部第三内科 池田 修一 | |
| 研究成果の刊行に関する一覧表 | 27 |

研 究 班 構 成

研究班構成

| 区 分 | 氏 名 | 所 属 | 職名 |
|----------------------|--------------------|---|----------|
| 主任研究者 | 内 木 宏 延 | 福井医科大学医学部第二病理 | 教 授 |
| 分担研究者 | 下 条 文 武 上 田 孝 典 | 福井医科大学医学部臨床検査医学 福井医科大学医学部第一内科 | 教 授 “ |
| (事務局) 経理事務連絡担当責任者 | 内 木 宏 延 | 福井医科大学医学部第二病理 〒910-1193 福井県吉田郡松岡町下合月 TEL: 0776-61-3111 (内線: 2235) ダイヤルイン 0776-61-8320 FAX: 0776-61-8123 | 教 授 |

平成10年度
総括研究報告

研究課題名：試験管内ALアミロイド線維形成機構の反応速度論モデルの開発、
および生理的重合阻害分子ならびに非ペプチド性重合阻害剤の探索

主任研究者氏名：内木 宏延

I 平成10年度における研究班の目標

全身性 AL アミロイドーシスは、日本におけるヒトアミロイドーシスの約半数を占めるが、他のアミロイドーシスと同様、有効な治療法はおろか発症機構の詳細は未だ解明されていない。われわれは、AL アミロイド線維沈着機構の解明、および沈着阻害剤の開発を目指し、以下の諸項目を3年計画の本研究課題の目標とする。

- (1) 全身性 AL アミロイドーシス患者から得た AL 蛋白、Bence Jones 蛋白 (BJP)、および臓器沈着 AL アミロイド線維を用い、試験管内 AL アミロイド線維形成を反応速度論的に解析する実験系を確立する。
- (2) 上記実験系を用い、アミロイド線維形成を阻害する生体分子、および非ペプチド性重合阻害剤を探索する。
- (3) 多発性骨髄腫患者における AL アミロイドーシス合併の有無と、BJP の1次/2次構造および試験管内アミロイド線維形成能を相関させ、BJP の構造および試験管内線維形成能から、AL アミロイドーシス発症を予測出来るか検討する。
- (4) アミロイド形成性 BJP の1次/2次構造および試験管内線維形成能を臨床的諸因子、特にアミロイド沈着の臓器分布パターンと比較し、生命予後に大きな影響を与える心臓、腎臓などへのアミロイド沈着を予測出来るか検討する。

本研究によりもたらされる非ペプチド性重合阻害剤の投与、およびアミロイド線維形成を阻害する生体分子の薬理的産生促進/分解抑制により、AL アミロイドーシスの発症予防、および線維沈着速度の抑制が可能になり、患者の生命予後および QOL の著しい改善、ひいては難病医療・福祉の向上が期待出来る。

本研究課題の初年度である平成10年度は、以下の諸項目を本研究班の目標とした。

- (1) 全国の病理医・臨床家の参加により、全身性 AL アミロイドーシス症例の新鮮凍結臓器を採取・収集するネットワークを構築する。
- (2) 全身性 AL アミロイドーシス剖検例の新鮮凍結臓器より AL アミロイド線維を精製し、電顕を用いた形態学的観察、及び Tricine-SDS-PAGE 法等による生化学的解析を行う。
- (3) 試験管内 AL アミロイド線維形成の反応速度論的解析の基本的分析手段として、蛍光色素チオフラビンTを用いた分光蛍光定量法のための至適条件（極大励起・蛍光波長等）を求め、ヒト AL アミロイド線維の試験管内分光蛍光定量法を確立する。
- (4) AL 蛋白及び関連諸蛋白の精製・解析のために、カラムクロマトグラフィシステム、及びウェスタンブロッティングシステムを構築する。

II 研究の概要及び成果

- (1) 本研究課題の成功は、全身性 AL アミロイドーシス症例の蓄積による線維形成モデルの一般化にかかっている。全身性 AL アミロイドーシスの疾患頻度から見て、同症の剖検数は限られてお

り、一施設のみでは数年に1～2症例しか同症の剖検に遭遇しないのが現状である。昨年6月に本研究課題が採択された後、われわれは直ちに、全国の関連する病理医、及び臨床家に共同研究を呼びかけ、全身性ALアミロイドーシス症例の剖検があった場合、本研究課題の遂行に必要十分量のアミロイド沈着新鮮凍結臓器を採取・収集するネットワークを構築した。現在、松本、京都、奈良、及び熊本の4施設より計5症例の新鮮凍結臓器の提供を受けている。本年度はこれら5症例について臨床的、及び種々の特殊染色を含め病理組織学的に解析し、来年度以降に予定している蛋白の1次/2次構造と臨床的諸因子との相関解析のためのデータベースを構築した。

(2) 上記症例の内、信州大学医学部第三内科より提供を受けた全身性ALアミロイドーシス剖検例(67歳女性、IgG λ 型)の新鮮凍結肺内リンパ節より、Pras法、不連続ショ糖密度勾配超遠沈等を組み合わせALアミロイド線維を精製した。電顕を用いた形態学的観察、及びTricine-SDS-PAGE法による生化学的解析の後、蛍光色素チオフラビンTを用いた分光蛍光定量法のための至適条件(極大励起・蛍光波長等)を求め、ヒトALアミロイド線維の試験管内分光蛍光定量法を確立した。これは来年度以降本格的に開始する、試験管内ALアミロイド線維形成の反応速度論的解析の基本的分析手段となる。

(3) 来年度以降本格的に開始する、AL蛋白及び関連諸蛋白の精製・解析のために、カラムクロマトグラフィシステム、及びウェスタンブロッティングシステムを構築した。

(4) われわれは本研究課題と共に、透析アミロイドーシス、及びアルツハイマー病におけるアミロイド線維形成の反応速度論的解析を並行して遂行している。そして、各々の成果を他のアミロイドーシス研究にフィードバックすることにより、個々のアミロイドーシスの特殊性と共に、ヒトアミロイドーシス全般に共通する発症機構・因子を明らかにすることをグループの主要な研究目標としている。今年度は、以下の成果を上げた。

(4-1) アミロイド β 蛋白からアルツハイマー病 β アミロイド線維が形成される過程がロジスティック方程式により記述出来ることを明らかにし、この方程式を用いて、アポリポ蛋白E₂、及び種々の抗酸化剤の β アミロイド線維形成に及ぼす阻害機構が異なることを明らかにした。この結果は、ALアミロイド線維形成を阻害する生体分子、および非ペプチド性重合阻害剤の探索に明確な方向性を与えると共に、解析システムを構築するための有用なモデルとなる。

(4-2) 精製した透析アミロイド線維、及びリコンビナントヒト β -2ミクログロブリンを用いて、透析アミロイド線維を、その基本構築を保持したまま増幅し純粋にする手法を確立した。これはALアミロイド線維の純粋化にも応用可能で、ALアミロイド線維の2次構造解析等に有用な手段となる。

III 次年度に残された課題と目標

次年度の課題として以下の諸項目が挙げられる。

(1) 抽出したALアミロイド線維からAL蛋白質(モノマー)を精製し、ALアミロイド線維伸長の一次反応速度論モデル、及び重合核依存性重合モデルを構築する。

- (2) 全身性 AL アミロイドーシスにおいては、症例ごとに沈着した AL 蛋白質の 1 次構造が異なる。
そこで剖検症例を集積し、上記モデルの一般化を図る。
- (3) 全身性 AL アミロイドーシス、及び AL アミロイドーシス発症／非発症多発性骨髄腫患者尿より BJP を精製し、それぞれの 1 次／2 次構造、及び試験管内アミロイド線維形成能を検討する。

平成10年度
分担研究報告

I 研究課題

全身性 AL アミロイドーシス剖検例の集積、及び臨床的・病理学的解析

II 研究者氏名

上田孝典（福井医大第一内科）、池田修一（信州大医学部第三内科）、宮川 文・弓場吉哲（天理よろづ相談所病院病理）、藤田葉子・若田 泰（京都民医連中央病院病理）、寺崎久泰・安東由喜雄（熊本大医学部第一内科）、星井嘉信・河野裕夫・石原得博（山口大医学部第一病理）、下条文武（福井医大臨床検査医学）、内木宏延（福井医大第二病理）

III 研究要旨

試験管内 AL アミロイド線維形成機構を反応速度論的に解析する実験系を確立するため、全身性 AL アミロイドーシス剖検症例を5例集積した。患者はいずれも女性で平均年齢は54才、λ型4例、κ型1例であった。血清 M 蛋白、及び尿中 BJP は、症例2を除き全例に認められた。骨髄形質細胞比率は、症例3と5で10%を越え、多発性骨髄腫に合併した AL アミロイドーシスと位置付けられた。初発症状は労作時呼吸困難が最も多く（症例1、2、4）、症例2、4ではうっ血性心不全を基盤としていた。症例3、5は、それぞれネフローゼ症候群、及び巨舌・皮膚アミロイド症で発症していた。直接死因はいずれも心アミロイドーシスを基盤としており、症例1、2では心壁在血栓に起因した脳梗塞により、症例2、3、5では心室細動等の不整脈により、症例4では慢性左心不全による肺うっ血、及び続発性肺炎により死亡していた。全例とも臨床症状を反映して、心に中等度～高度のアミロイド沈着を認めた。さらに、症例1、2では肺に、症例3、5ではそれぞれ腎、及び舌・皮膚に高度の沈着を認めた。

IV 研究目的

全身性 AL アミロイドーシスは、日本におけるヒトアミロイドーシスの約半数を占めるが、他のアミロイドーシスと同様、有効な治療法はおろか発症機構の詳細は未だ解明されていない。われわれは、AL アミロイド線維沈着機構の解明、および沈着阻害剤の開発を目指し、以下の諸項目を3年計画で遂行する。

- (1) 全身性 AL アミロイドーシス患者から得た AL 蛋白、Bence Jones 蛋白 (BJP)、および臓器沈着 AL アミロイド線維を用い、試験管内 AL アミロイド線維形成を反応速度論的に解析する実験系を確立する。
- (2) 上記実験系を用い、アミロイド線維形成を阻害する生体分子、および非ペプチド性重合阻害剤を探索する。
- (3) 多発性骨髄腫患者における AL アミロイドーシス合併の有無と、BJP の1次/2次構造および試験管内アミロイド線維形成能を相関させ、BJP の構造および試験管内線維形成能から、AL

アミロイドーシス発症を予測出来るか検討する。

- (4) アミロイド形成性 BJP の 1 次 / 2 次構造および試験管内線維形成能を臨床的諸因子、特にアミロイド沈着の臓器分布パターンと比較し、生命予後に大きな影響を与える心臓、腎臓などへのアミロイド沈着を予測出来るか検討する。

本研究によりもたらされる非ペプチド性重合阻害剤の投与、およびアミロイド線維形成を阻害する生体分子の薬理的産生促進 / 分解抑制により、AL アミロイドーシスの発症予防、および線維沈着速度の抑制が可能になり、患者の生命予後および QOL の著しい改善、ひいては難病医療・福祉の向上が期待出来る。

本研究課題の初年度である平成10年度は、全国の病理医・臨床家の参加により、全身性 AL アミロイドーシス症例の新鮮凍結臓器を採取・収集するネットワークを構築し、可能な限り多数の症例を集積することを研究目的とした。

V 研究方法

全国の関連する病理医、及び臨床家に共同研究を呼びかけ、全身性 AL アミロイドーシス症例の剖検があった場合、本研究課題の遂行に必要十分量のアミロイド沈着新鮮凍結臓器を採取・収集するネットワークを構築した。現在、松本、京都、奈良、及び熊本の 4 施設より計 5 症例の新鮮凍結臓器の提供を受けている (表 1)。これら 5 症例について臨床的、及び種々の特殊染色を含め病理組織学的に解析し、来年度以降に予定している蛋白の 1 次 / 2 次構造と臨床的諸因子との相関解析のためのデータベースを構築した。

VI 結果と考察

まず、5 症例の臨床経過、主要剖検所見、及び病態の考察を以下に述べる。

症例 1 (信州大学医学部第三内科)¹⁾ :

臨床経過 : 患者は 67 才女性で、63 才時より胸部レ線上異常結節陰影を、66 才時には両側肺門リンパ節腫脹を指摘された。頸部リンパ節および直腸粘膜生検にて AL- λ 型アミロイドーシスと診断された。67 才時に労作時呼吸困難が出現し入院となった。入院時、低血圧 (96/65mmHg)、軽度の巨舌を認め、IgG- λ 型 M 蛋白血症、尿中 Bence Jones 蛋白 (BJP) を認めた。クレアチニンクリアランス、血中 γ -グロブリンレベルは正常で、骨髄形質細胞比率の増加は認められなかった。心エコーにて左室壁の対称性肥大を認めたが、心機能はほぼ正常であった。胸部レ線上大量の右胸水があり、穿刺にて黄色浸出液を認めた。結核等の感染症は否定された。ピシバニールによる胸膜癒着術後、右胸水および呼吸困難は消失し、少量のプレドニゾン投与により、胸水の再発は起こらず、介助無しに日常生活を送ることが出来た。退院 1 年 8 カ月後、心アミロイドーシスに基づく心壁在血栓に起因した塞栓によると考えられる右大脳半球の広範な出血性脳梗塞を発症し、2 カ月後に死亡した。

主要剖検所見：心重量は 325g で両室壁が高度に肥厚し、心内膜下、及び血管周囲にアミロイド沈着を認めた。両肺上部に径 1~3cm 大のアミロイド結節を多数認めたが、結節以外の肺実質肺胞壁および末梢血管壁にアミロイド沈着は認められなかった。気管~気管支壁は、線維化を伴うアミロイド沈着のためびまん性に高度肥厚し、特に両側肺門部では、主気管支外膜肥厚による塊状病変を形成していた。肺門リンパ節自体に腫大は認められなかった。

考察：AL アミロイドーシス患者において肺は好発沈着臓器の一つであるが、多くは肺胞壁、及び末梢血管壁にびまん性に沈着する。本症例に認められた結節性肺内アミロイド沈着は、AL アミロイドーシスにおいて稀な沈着様式と言える。また、本症例では大量の右胸水を認めた。AL アミロイドーシス患者において胸水貯留はしばしば認められるが、多くは心アミロイドーシスに続発するうっ血性心不全が原因となる。本症例では剖検時両心室壁へのアミロイド沈着を認めたが、生前心機能は比較的保持され、明らかなうっ血性心不全も認められなかった。肺門部への高度のアミロイド沈着により、リンパ液還流が阻害されたことが、本症例の胸水貯留の原因と考えられる。

凍結保存臓器：肺門部軟部組織

症例 2 (天理よろづ相談所病院病理)：

臨床経過：患者は 57 才女性で、死亡 1 年程前から労作時呼吸困難が出現、心エコーにて求心性心肥大を認め、歯肉生検、心筋生検にて AL 型アミロイドーシスと診断された。死亡 5 カ月前、血圧 130/60mmHg で舌腫大無く、腹部エコー、呼吸機能、腎機能、甲状腺機能は正常であった。血清総蛋白 6.0g/dl ↓、 γ -グロブリン分画 7.4% ↓、IgG 480mg/dl ↓、IgA 267mg/dl、IgM 64mg/dl、CRP < 0.2、尿中 BJP (-)。血清免疫電気泳動、骨髄穿刺は施行されなかった。死亡 1 カ月半前の平成 10 年 8 月 16 日、意識消失発作を来し、著明なうっ血性心不全が確認された。9 月 21 日、突然、構語障害および左上下肢麻痺が出現、CT にて右中大脳動脈根部閉塞による右大脳半球の広範な脳梗塞を確認した。9 日後、心室細動が出現し死亡した。

主要剖検所見：(1) 骨髄は脂肪組織比率の増加した軽度低形成性骨髄で、造血細胞は 3 系とも認められた。形質細胞比率は全体に低く、領域によりばらつきを認めるが、5~10% 程度と推定された。内皮細胞の明瞭な毛細血管周囲に、形質細胞の比較的均質な集簇を認めた。これらの形質細胞は、偏心した比較的大型の核と豊富な好塩基性細胞質から成り、分化した車軸様核を持つ plasma cells も認められるが、幼弱核を持つ plasmablasts が優勢であった。これらの細胞胞体は、抗ヒト λ 鎖抗体で陽性に染色され、腫瘍性増殖と考えられた。細胞質が均質に染色される細胞も認められるが、不規則顆粒状に染色される細胞も多数認められた。抗ヒト κ 鎖抗体で陽性に染色される形質細胞も少数認められるが、いずれも核は小型車軸状で良く分化しており、反応性細胞と考えられた。(2) 心重量は 500g で壁は硬く剖面に光沢を認めた。左室肥大があり(左室壁厚 2.3cm)、左心耳腔内に大豆大血栓を認めた。組織学的に、心内膜側を中心とする血管周囲、および心筋線維間質に高度のアミロイド沈着を認めた。沈着アミロイド

は、過マンガン酸カリウム消化試験に抵抗性で、抗ヒトλ型 AL 蛋白抗体を用いた免疫染色で陽性に染色された。(3) 肺重量は 640 : 580g でやや硬く弾力性があり、断面は充実性であった。組織学的に気管支～細気管支壁、末梢血管壁、及び肺胞壁に高度のアミロイド沈着を認めた。(4) 肝 (1000g)、脾 (100g)、腎 (100 : 150g) へのアミロイド沈着は軽度で、いずれも末梢血管壁に沈着を認めた。(5) その他全身諸臓器の主として血管壁に、軽度のアミロイド沈着を認めた。

考察：本症例は、剖検により心、肺に高度のアミロイド沈着を認め、これが生前認められた著明なうっ血性心不全、及び呼吸困難を引き起こしたと考えられる。また高度の心アミロイドーシスにより左房内壁血栓が惹起され、これにより右中大脳動脈根部血栓塞栓、ひいては右大脳半球の広範な脳梗塞が発症したものと考えられる。直接死因は、心アミロイドーシスによる心室細動と考えられる。

凍結保存臓器：心、肺、肝、脾、腎

症例 3 (京都民医連中央病院病理)：

臨床経過：患者は44才女性で、死亡1年7カ月前の1997年2月、蛋白尿を指摘された。同年6月の腎生検にて腎アミロイドーシスの診断を受けた。骨髄穿刺にて形質細胞比率の増加を認め、MP療法2クール施行。同年10月、血清総蛋白 3.5g/dl、IgG↓、IgA↓、IgM↑、骨髄形質細胞比率9.4% (λ>>κ)、尿中BJP陰性。死亡4カ月前の1998年5月、浮腫高度、蛋白尿 10g/day 前後、血清総蛋白 3g/dl、IgG↓、λ型 M 蛋白血症 (疑)、尿中λ型 BJP 陽性、骨髄形質細胞比率 15.8%を認め、MP療法3クール施行、7月15日より血液透析を開始した。死亡1カ月前にはうっ血性心不全が進行し、低血圧、胸水貯留、呼吸不全を来した。9月19日、心室頻拍が出現し死亡した。

主要剖検所見：(1) 骨髄は軽度過形成性で、造血細胞は3系とも認められ、G/Eは正常範囲であった。形質細胞 (plasma cells ~ plasmablasts) 比率は 20~30%と推定された。(2) 腎重量は 160 : 144g で、全ての糸球体、及び皮質間質に高度のアミロイド沈着を認めた。沈着アミロイドは、過マンガン酸カリウム消化試験に抵抗性で、抗ヒトλ型 AL 蛋白抗体を用いた免疫染色で陽性に染色された。(3) 心重量は 365g で、血管周囲、及び心筋線維間質に、カルシウム沈着を伴う高度のアミロイド沈着を認めた。(4) 脾重量は 180g で、実質はほぼ全てアミロイドに置換されていた。(5) その他、肝 (1800g)、甲状腺 (21g)、消化管、子宮壁等の全身臓器に、中等度～高度のアミロイド沈着を認めた。

考察：本症例は、剖検により腎、心に高度のアミロイド沈着を認め、これが生前認められた高度のネフローゼ症候群、及びうっ血性心不全を引き起こしたと考えられる。直接死因は、心アミロイドーシスによる心室頻拍と考えられる。

凍結保存臓器：腎、肝、脾、子宮

症例 4 (熊本大学医学部第一内科) :

臨床経過 : 患者は56才女性で、死亡2年4カ月前の1996年8月、労作時呼吸困難が出現、翌年5月には右胸水、心肥大、左室壁運動のびまん性低下を認めた。この時点で血清 IgG 3733mg/dl、直腸、及び皮下脂肪織生検にて AL アミロイドーシスの診断を受けた。骨髓穿刺にて明らかな形質細胞比率の増加は認められなかった。1997年10月、血圧 88/52mmHg、両側胸水、心房細動、及び軽度の末梢神経障害 (感覚、運動) を認めた。pO₂ 70.5mmHg、血清 CRP 0.25、IgG 3110mg/dl ↑、IgA 211mg/dl、IgM 79mg/dl で、M 蛋白血症 (IgG-λ)、尿中 λ 型 BJP を認めた。夜間、徐脈 (心拍数30前後) が出現するためペースメーカーを植え込んだ。その後うっ血性心不全症状 (肺うっ血、胸水貯留、両下肢浮腫) が増悪し、死亡10日前には肺炎を合併、死亡前日には無尿となり、12月13日死亡した。

主要剖検所見 : 心重量は 440g で両室壁が高度に肥厚し、肺、肝、脾、消化器、皮膚のうっ血、及び高度の腔水症を認めた。肺重量は 330 : 510g で、上記うっ血に加え両肺全野に細菌性肺炎を認めた。組織所見は現在検索中である。

考察 : 本症例は、剖検により高度の心アミロイドーシスを認め、これが生前認められた高度のうっ血性心不全、低血圧、及び不整脈を引き起こしたと考えられる。直接死因は、肺うっ血水腫、及び細菌性肺炎による呼吸不全と考えられる。

凍結保存臓器 : 心、腎

症例 5 (熊本大学医学部第一内科) :

臨床経過 : 患者は46才女性で、死亡約3年前の1996年、巨舌、及び下腿浮腫が出現、骨髓穿刺にて形質細胞比率の増加を認め、多発性骨髓腫に続発した AL アミロイドーシスと診断された。punched out lesion は無く、M 蛋白血症 (IgG-κ)、尿中 κ 型 BJP を認めた。MP 療法、COP 療法を施行するも効果無く、1997年には、著明な舌腫大のため両側舌側面切除術を施行した。死亡4カ月前の1998年9月、両下腿、及び右前腕の浮腫が増強、全身皮膚硬化、顔面、手指、手掌への黄色アミロイド沈着、及び甲状腺機能低下症を認めた。血清 CRP 1.30、IgG 2280mg/dl ↑、IgA 629mg/dl ↑、IgM 221mg/dl で、骨髓形質細胞比率は 13.6%であった。死亡1ヶ月前には両下腿浮腫、及び左足背膿瘍が出現、浸出液より E. coli を認めた。1999年1月16日、誘因無く心停止・呼吸停止を来し、死亡した。

主要剖検所見 : 心重量は 250g で、心筋、心内膜冠動脈周囲に結節性の、心外膜にびまん性のアミロイド沈着を認めた。舌は著明に腫大し、高度のびまん性アミロイド沈着を認めた。その他、肝 (980g)、皮膚 (顔面)、結合織 (皮下、消化管周囲)、消化管粘膜下 (頸部食道、胃前庭部~空腸) 等にアミロイド沈着を認めた。肺重量は 645 : 640g で、肺出血、及びうっ血水腫を認めた。組織所見は現在検索中である。

考察 : 本症例のアミロイド沈着の分布には特徴があり、舌、皮膚~皮下結合織、上部消化管壁に高度の沈着を認めた。四肢浮腫の原因としては、皮膚アミロイド沈着によるリンパのうっ滞、

及び甲状腺機能低下症が考えられる。また、剖検時心アミロイドーシスを認めたが、これが心室細動等の不整脈を惹起し、突然の心停止の原因となったと推定される。

凍結保存臓器：舌、心、肝、脾、腎

5 症例のまとめと考察：

表1に、これまでに集積されたALアミロイドーシス5症例のまとめを示す。

表1 ALアミロイドーシス5症例のまとめ

| 症例 | 年齢・性 | 主症状 | 血清M蛋白 | 尿中M蛋白 | 骨髓形質細胞比率 | 直接死因 | 主要沈着臓器 |
|----|------|----------------------|-------------------|---------|-----------------------------|--------------------|---------------------------|
| 1 | 67 女 | 労作時呼吸困難 (右胸水) | IgG-λ | BJP (+) | 明かな増加 (-) | 心壁在血栓→脳梗塞 | 心、肺 (アミロイド結節 +肺門部気管支壁) |
| 2 | 57 女 | 労作時呼吸困難 (うっ血性心不全) | N.D. ¹ | BJP (-) | 5-10% ² (λ陽性) | 心壁在血栓→脳梗塞、 心室細動 | 心、肺 (びまん性) |
| 3 | 44 女 | ネフローゼ症候群、 うっ血性心不全 | λ疑 | BJP-λ | 15.8% | 心室頻拍 | 腎、心、脾 |
| 4 | 56 女 | 労作時呼吸困難 (うっ血性心不全) | IgG-λ | BJP-λ | 明かな増加 (-) | 肺うっ血+肺炎 | 心 |
| 5 | 46 女 | 巨舌、 皮膚アミロイド症 | IgG-κ | BJP-κ | 13.6% | 突然の心停止 | 心、舌、皮膚 |

¹ 血清免疫電気泳動施行せず。

² 剖検時採取した腰椎骨髓より推定。

患者はいずれも女性で平均年齢は54才、λ型4例、κ型1例であった。血清M蛋白、及び尿中BJPは、症例2を除き全例に認められた。骨髓形質細胞比率は、症例3と5で10%を越え、多発性骨髓腫に合併したALアミロイドーシスと位置付けられた。初発症状は労作時呼吸困難が最も多く(症例1、2、4)、症例2、4ではうっ血性心不全を基盤としていた。症例3、5は、それぞれネフローゼ症候群、及び巨舌・皮膚アミロイド症で発症していた。直接死因はいずれも心アミロイドーシスを基盤としており、症例1、2では左心房、あるいは左心室壁在血栓に起因した脳梗塞により、症例2、3、5では心室細動等の不整脈により、症例4では慢性左心不全による肺うっ血、及び続発性肺炎により死亡していた。全例とも臨床症状を反映して、心に中等度～高度のアミロイド沈着を認めた。さらに、症例1、2では肺に、症例3、5ではそれぞれ腎、及び舌・皮膚に高度の沈着を認めた。

VII 結 論

全身性 AL アミロイドーシス剖検症例を 5 例集積した。今後は、各症例の新鮮凍結臓器より AL アミロイド線維、及び AL 蛋白を精製し、試験管内 AL アミロイド線維形成機構を反応速度論的に解析する実験系を確立する。

VIII 参考文献

- 1) Ikeda S., Tkabayashi Y., Maejima Y., Tachibana N., Ehara T., Nezu A., Hoshii Y. Unilateral large pleural effusion as the first clinical manifestation in a patient with AL systemic amyloidosis. *submitted to Amyloid*.

I 研究課題

新鮮凍結臓器からの AL アミロイド線維の精製、及び電顕的・生化学的解析

II 研究者氏名

下条文武・長谷川一浩・山口 格（福井医大臨床検査医学）、池田修一（信州大医学部第三内科）、
内木宏延（福井医大第二病理）

III 研究要旨

試験管内 AL アミロイド線維形成を反応速度論的に解析する実験系を確立するため、67歳女性の全身性 AL アミロイドーシス剖検例（IgG λ 型）の新鮮凍結肺門部気管支周囲軟部組織より、Pras 法、 $10^5 \times g$ 超遠沈、及び 50–60%不連続ショ糖密度勾配超遠沈により AL アミロイド線維を精製した。電子顕微鏡を用いた形態学的観察により、若干の無構造な不純物を認めるものの、幅約 10nm、らせん構造を持つ典型的 AL アミロイド線維を確認した。還元条件下に Tricine-SDS-PAGE 法を行い、分子量約 7、15、及び 36kDa のバンドを認めた。今回の研究により、1) 蛍光色素チオフラビン T を用いたヒト AL アミロイド線維分光蛍光定量法を確立するための標準物質を得、2) AL アミロイド線維伸長の反応速度論的解析に不可欠の重合核を得ると共に、3) AL アミロイド線維を構成する AL 蛋白を精製する過程の第一段階を確立した。

IV 研究目的

全身性 AL アミロイドーシスは、日本におけるヒトアミロイドーシスの約半数を占めるが、他のアミロイドーシスと同様、有効な治療法はおろか発症機構の詳細は未だ解明されていない。われわれは、AL アミロイド線維沈着機構の解明、および沈着阻害剤の開発を目指し、全身性 AL アミロイドーシス患者から得た AL 蛋白、Bence Jones 蛋白（BJP）、および臓器沈着 AL アミロイド線維を用い、試験管内 AL アミロイド線維形成を反応速度論的に解析する実験系を確立する事を本研究の目的とする。今回、全身性 AL アミロイドーシス剖検症例の新鮮凍結臓器より AL アミロイド線維を精製し、電顕を用いた形態学的観察、及び Tricine-SDS-PAGE 法等による生化学的解析を行った。

V 研究方法

症例提示（信州大学医学部第三内科）¹⁾：

臨床経過：患者は67才女性で、63才時より胸部レ線上異常結節陰影を、66才時には両側肺門リンパ節腫脹を指摘された。頸部リンパ節および直腸粘膜生検にて AL- λ 型アミロイドーシスと診断された。67才時に労作時呼吸困難が出現し入院となった。入院時、低血圧（96/65mmHg）、軽度の巨舌を認め、IgG- λ 型 M 蛋白血症、尿中 Bence Jones 蛋白（BJP）を認めた。クレアチニンクリアランス、血中 γ -グロブリンレベルは正常で、骨髓形質細胞比率の増加は認めら

れなかった。心エコーにて左室壁の対称性肥大を認めたが、心機能はほぼ正常であった。胸部レ線的大量の右胸水があり、穿刺にて黄色浸出液を認めた。結核等の感染症は否定された。ピシバニールによる胸膜癒着術後、右胸水および呼吸困難は消失し、少量のプレドニゾン投与により、胸水の再発は起こらず、介助無しに日常生活を送ることが出来た。退院1年8カ月後、心壁在血栓に起因した塞栓によると考えられる右大脳半球の広範な出血性脳梗塞を発症し、2カ月後に死亡した。

主要剖検所見：心重量は325gで両室壁が高度に肥厚し、心内膜下、及び血管周囲にアミロイド沈着を認めた。両肺上部に径1~3cm大のアミロイド結節を多数認めたが、結節以外の肺実質肺胞壁および末梢血管壁にアミロイド沈着は認められなかった。気管~気管支壁は、線維化を伴うアミロイド沈着のためびまん性に高度肥厚し、特に両側肺門部では、主気管支外膜肥厚による塊状病変を形成していた。肺門リンパ節自体に腫大は認められなかった。

考察：ALアミロイドーシス患者において肺は好発沈着臓器の一つであるが、多くは肺胞壁、及び末梢血管壁にびまん性に沈着する。本症例に認められた結節性肺内アミロイド沈着は、ALアミロイドーシスにおいて稀な沈着様式と言える。また、本症例では大量の右胸水を認めた。ALアミロイドーシス患者において胸水貯留はしばしば認められるが、多くは心アミロイドーシスに続発するうっ血性心不全が原因となる。本症例では剖検時両心室壁へのアミロイド沈着を認めたが、生前心機能は比較的保持され、明らかなうっ血性心不全も認められなかった。肺門部への高度のアミロイド沈着により、リンパ液還流が阻害されたことが、本症例の胸水貯留の原因と考えられる。

凍結保存臓器：肺門部軟部組織

ALアミロイド線維の精製：

上記症例の新鮮凍結肺門部気管支周囲軟部組織(3.2g)を4℃で解凍、はさみにて小片に切断後、Pras法にて粗抽出し、さらに $10^5 \times g$ 超遠沈、及び50-60%不連続ショ糖密度勾配超遠沈により精製した²⁾。

ALアミロイド線維の電顕的解析：

精製ALアミロイド線維の形態は、1%燐タングステン酸(pH7.0)でネガティブ染色後、透過電顕(Hitachi H-7000)にて観察した³⁾。加速電圧は75kVであった。

ALアミロイド線維の電気泳動による解析：

精製したALアミロイド線維の蛋白組成は、還元条件下にTricine-SDS-PAGE法により解析した⁴⁾。

VI 結果と考察

(i) 電子顕微鏡を用いた形態学的観察により、若干の無構造な不純物を認めるものの、幅約 10nm、らせん構造を持つ典型的 AL アミロイド線維を確認した。(ii) 還元条件下に Tricine-SDS-PAGE 法を行い、分子量約 7、15、及び 36kDa のバンドを認めた。これらの内のどのバンドが AL 蛋白であるかを確認するため、抗ヒト λ 鎖抗体等を用いた Western blot を現在遂行中である。

VII 結論

全身性 AL アミロイドーシス剖検症例の新鮮凍結臓器より、AL アミロイド線維を精製、解析した。今回の研究により、1) 蛍光色素チオフラビンTを用いたヒト AL アミロイド線維分光蛍光定量法を確立するための標準物質を得、2) AL アミロイド線維伸長の反応速度論的解析に不可欠の重合核を得ると共に、3) AL アミロイド線維を構成する AL 蛋白を精製する過程の第一段階を確立した。

VIII 参考文献

- 1) Ikeda S., Tkabayashi Y., Maejima Y., Tachibana N., Ehara T., Nezu A., Hoshii Y. Unilateral large pleural effusion as the first clinical manifestation in a patient with AL systemic amyloidosis. *submitted to Amyloid*.
- 2) Naiki H., Hashimoto N., Suzuki S., Kimura H., Nakakuki K., Gejyo F. Establishment of a kinetic model of dialysis-related amyloid fibril extension in vitro. *Amyloid* 1997; 4: 223-232.
- 3) Naiki H., Nakakuki K. First-order kinetic model of Alzheimer's β -amyloid fibril extension in vitro. *Lab. Invest.* 1996; 74: 374-383.
- 4) Schägger H., von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100kDa. *Anal. Biochem.* 1987; 166: 368-379.