

D. 考察

結論

TTR 遺伝子のミスセンス変異の種類により、末梢神経障害と自律神経障害が軽微で、心アミロイドーシスが中核症状になる例がある。その臨床的特徴は心不全、不整脈、心源性起立性低血圧、心筋虚血発作である。特に高齢者で心アミロイドーシスとして発症した例ではしばしば家族歴を伴わないことがあり、TTR の分子異常の検索が有用である。また、FAP の最も多いサブタイプである Met30TTR 型でも、末梢神経障害が極めて軽微で、心アミロイドーシス症状が急速に進行する例がある³⁾。あるいは高齢者に球麻痺で発症し、舌下神経にアミロイド沈着をきたした Met30TTR 型 FAP も報告されている⁴⁾。このように FAP には genotype-phenotype 相関に加え、同一変異でも異なる臨床像を呈することがある。

E. 結論

今回の新たな変異 TTR の発見により、本邦には少なくともアミロイドーシスの原因となる 16 種類の TTR の分子異常が存在する。

参考文献

- 1) 中里雅光 : 家族性アミロイドニューロパチー. 医学のあゆみ 1999; Ver 1: 555-559.
- 2) Kishikawa M, Nakanishi T, Miyazaki A, Shimizu A, Nakazato M, Kangawa K, Matsuo H: Simple detection of abnormal serum transthyretin from patients with familial amyloidotic polyneuropathy by high performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry using material precipitated with specific antiserum. J Mass Spectrom 1996;31:112-114.
- 3) Nakamura Y, Yutani C, Nakazato M,

Date Y, Baba K, Goto Y: A case of hereditary amyloidosis transthyretin variant, Met 30, with amyloid cardiomyopathy, less polyneuropathy, and the appearance of giant cells. Pathol Int 1999;49:898-902.

4) Ikeda K, Kinoshita M, Takamiya K, Iwasaki Y, Tomita Y, Nakano I, Nakazato M: Bulbar palsy in senile onset familial amyloid polyneuropathy (30Val→Met): transthyretin-amyloid deposits in the hypoglossal nerve root. Eur J Neurol 1998;5:211-214

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Schmidt HH, Nashan B, Propsting MJ, Nakazato M, Flemming P, Kubicka S, Boker K, Pichlmayr R, Manns MP: Familial amyloidotic polyneuropathy: domino liver transplantation. J Hepatol 1999;30:293-298.
- 2) Misu K, Hattori N, Nagamatsu M, Ikeda S, Ando Y, Nakazato M, Takei Y, Hanyu N, Usui Y, Tanaka F, Harada T, Hashizume Y, and Sobue G: Late-onset familial amyloid polyneuropathy type I (Met 30 transthyretin mutation) unrelated to endemic focus in Japan: Clinicopathologic and genetic features. Brain 1999;122:1951-1962.
- 3) Nakamura Y, Yutani C, Nakazato M, Date Y, Baba K, Goto Y: A case of hereditary amyloidosis transthyretin variant, Met 30, with amyloid cardiomyopathy, less polyneuropathy, and the appearance of giant cells. Pathol Int 1999;49:898-902.
- 4) Tachibana N, Tokuda T, Toshida K, Taketomi T, Nakazato M, Li YF, Masuda Y, Ikeda S: Rapid diagnosis of familial amyloid polyneuropathy by anal

- ysis of serum variant transthyretin using matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight mass spectrometry. Amyloid 1999;6:282-286.
- 5) 中里雅光: 家族性アミロイドポリニューロパチー医学のあゆみ 神経疾患医歯薬出版株式会社(東京) State of Arts 1999; Ver.1 555-559. 中村重信編
2. 学会発表
- 1) 中里雅光: 軽微な末梢神経障害を呈するトランスサイレチン型 FAP. 平成 11 年度厚生省精神・神経疾患研究委託費「遺伝性ニューロパチーの成因および治療に関する研究班」(1999)
- 2) 中里雅光: FAP の今後の研究の方向性に関して. 平成 11 年度厚生省特定疾患対策研究事業「アミロイドーシスに関する研究班」(1999)
- 3) 中里雅光: 軽微な末梢神経障害を呈するトランスサイレチン型 FAP. 平成 11 年度 厚生省特定疾患対策研究事業 アミロイドーシスに関する研究班 (1999)
- 4) 中里雅光、伊達 紫、松倉 茂: nested PCR を用いた FAP の遺伝子解析. 第 40 回 日本神経学会総会 (1999)
- 5) 中里雅光、松倉 茂: トランスサイレチン遺伝子変異による高齢発症のアミロイドーシス. 第 10 回九州老年病地方会 (1999)
- 6) 中里雅光、松倉 茂: トランスサイレチン遺伝子変異による高齢発症の心アミロイドーシス 第 41 回日本老年医学会学術集会 (1999)
- 7) 今村卓郎、中里雅光: 難治性心不全を呈するトランスサイレチンの遺伝子変異によるアミロイド心筋症の一例 臨床医のための循環器疾患研究会 (1999)
- G 知的所有権の所得状況
なし

厚生省科学研究費補助金 (特定疾患対策研究事業)
 アミロイドーシスに関する研究 分担研究報告書

本邦初の家族性アミロイドポリニューロパシー(FAP)の compound heterozygote (FAP ATTR Val30Met / ATTR Arg104His) の一例

分担研究者 安東由喜雄 熊本大学臨床検査医学講座 講師
 共同研究者 中村政明*、寺崎久泰**、松永典子、山下園加、
 大林光念*、田島和周*、安藤正幸**
 熊本大学医学部、臨床検査医学講座、*同神経内科、
 **同第一内科

研究要旨 我々は、本邦初の家族性アミロイドポリニューロパシー(FAP)の compound heterozygote (FAP ATTR Val30Met / ATTR Arg104His)を経験し、両 mutation が TTR 代謝に及ぼす影響を検討した。mass spectrometry, DNA シークエンスの結果より、ATTR Val30Met は母親に由来し、ATTR Arg104His は父親に由来していることが判明した。本症例では通常の FAP ATTR Val30Met 患者に比べ高齢発症で臨床症状も軽度であり、血清中のトランスサイレチン(TTR) とレチノール結合蛋白(RBP)の血中濃度は FAP ATTR Val30Met 患者及び健常人に比べ有意に高かった。Semidenaturing isoelectric focusing (IEF)の検討においても 4 量体の安定性が ATTR Val30Met より高く T4 結合能も高いことから、本症例での臨床経過は ATTR Arg104His が ATTR Val30Met の 4 量体の安定性を増加させていることに起因すると考えられた。

A. 研究目的

FAP ではこれまでに 70 種類以上の mutation が同定されているがそのほとんどが one point mutation による heterozygote であり、本邦においては FAP の compound heterozygote の症例は未だに報告されていない。

今回我々は、本邦初の compound heterozygote (FAP ATTR Val30 Met/ ATTR Arg104His)の FAP の一例を経験したので、TTR, RBP の血中濃度と TTR の T4 結合の測定及び IEF を行い、臨床症状や両 mutation が TTR 代謝に及ぼす影響を検討した。

B. 研究方法

症例は 64 歳の男性。53 歳時に右硝子体混濁が出現し、61 歳時に両膝以下の温痛覚の低下が出現。63 歳時に左硝子体混濁を呈したが、硝子体混濁の発症後 11 年を経ても体重減少がなく、末梢神経障害は軽度で、電気生理学的検査でも軽度の異常に止まっていた。

a. Congo red 染色及び免疫組織染色

十二腸粘膜生検サンプルを用い、Congo red 染色を行い、アミロイドの沈着の有無を調べた。また、抗ヒト TTR 抗体を用いた免疫組織染色を行い、TTR の存在の有

無を調べた。

b. Mass spectrometry (MS)

患者血清中の異型 TTR の有無を調べるために安東らの方法に従い、MS を行った。

c. DNA シークエンス

患者及び正常者の血液から DNA を抽出し、TTR のエクソン 1 から 4 を PCR を用いて増幅した。得られた PCR 産物を Centricon-100 で精製した後、Terminator Cycle Sequencing Kit と ABI PRISM 310 DNA Sequencer を用いて DNA シークエンスを行った。

d. PCR-RFLP

ATTR Val30Met を確認するために、エクソン 2 の PCR 産物を制限酵素 NsiI で切断した。ATTR Arg104His を確認するために、この変異がある場合のみ制限酵素 BallI で切断されるように設計した mismatches プライマー (5'-CAACGACTCCGGCCCTGGC C-3') (3'末端から 4、5 番目の CC が TG に変更) とエクソン 4 プライマー (5'-ATCCCTCGTCCTTCAGGT CC-3') を用いて PCR を行った後、PCR 産物を BallI で切断した。

e. TTR 分子安定性の検討

患者の TTR, RBP の血中濃度及び TTR の T4 結合を測定し、正常対象 FAP ATTRVal30Met の症例と比較検討した。さらに、Saraiva らの方法に従い IEF を行い、TTR の 4 量体としての安定性を検討した。

(倫理面への配慮)

患者の十二指腸粘膜生検でアミロイドと TTR の沈着を確認した後、患者と家族に FAP の可能性と FAP の説明を行い、個人のプライバシーを厳守し、遺伝子診断と研究の為の血液の使用の承諾を得た上で採血した。

C. 研究結果

十二指腸粘膜生検サンプルを用いて Congo red 染色と抗ヒト TTR 抗体による免疫組織染色を行い、アミロイド沈着が確認されると共に、同部位が TTR 抗体で染色されるのが確認された。

MS では、患者では正常の TTR の free form, cystein- conjugated form に相当する 13,761 と 13,881Da のピークが認められず、それぞれ正常より 19Da づつ少ない 13,742 と 13,862Da のピーク及びそれぞれ 32Da づつ多い 13,793 と 13,913Da のピークを認め、本症例において 2 種類の異なる異型 TTR が存在することが明らかになった。本症例の父親の血清に対する同様の解析では、正常 TTR のピークに加え、正常より 19Da づつ少ない 13,742 と 13,862Da のピークがみられ、母親では正常 TTR のピークと正常より 32Da づつ多い 13,792 と 13,913Da のピークが認められた。

この 2 種類の mutation を明らかにするために、DNA シークエンスを行った。解析の結果、一つはエクソン 2 にある 30 番目の Val(GTG)が Met(ATG)に変異した ATTR Val30Met で、もう一つはエクソン 4 にある 104 番目の Arg (CGC)が His(CAC)に変異した ATTR Arg104 His であることが判明した。同時に PCR RFLP の結果から、患者及び母親が ATTR Val30Met を、患者、父親、妹、二人の子供が ATTR Arg104His の変異を持つことが明らかになった。遺伝子診断を行った症例においては MS による血清のスクリーニングも行ったが、全て遺伝子診断の結果と合致していた。

本症例の TTR 血中濃度は 38.9mg/dl で、正常者 (29.8 ± 8.1mg/dl)、FAP ATTR Val30Met (22.3 ± 5.6) に比べて高値を示した。また、本症例の RBP 濃度も 6.7mg/dl で、正常者 (3.2 ± 1.0), FAP ATTR Val30Met (2.8 ± 1.1) に比べ高値を示した。TTR の T4

結合親和性の検討においても、正常者を 1 とすると、本症例では 0.73、FAP ATTR Val 30Met で 0.54 を示し、FAP ATTR Val30Met よりも高親和性を示した。

IEF の検討においても FAP ATTR Val30Met 及び未発症の母親で 4 量体が検出されないのに対して本症例では 4 量体が確認された。

D. 考察

本症例は、MS の解析から、2 種類の異型 TTR がそれぞれ父親と母親に由来する compound heterozygote で、遺伝子解析の結果 ATTR Val30Met/ATTR Arg104His であることが判明した。ATTR Arg104His はこれまで報告されていない mutation であったことから本症例は極めて貴重であると考えられた。

本症例の臨床的特徴として、高齢発症で硝子体混濁で発症後 9 年経過しても体重減少がなく、多発神経炎が軽度であることが挙げられる。また、本症例の TTR 及び RBP の血中濃度が高く、T4 結合親和性が FAP Val30Met よりも強いことから、ATTR Val30Met/ATTR Arg 104His が、ATTR Val30Met に比べ血中により安定に存在し、クリアランスを受けにくい可能性が考えられた。これらの特徴は、Saraiva が報告している ATTR Thr119Met/ATTR Val30Met をもつ compound heterozygote の症例と類似している。彼らは IEF による解析で ATTR Val30Met では 4 量体がほとんど検出されないのに対し、ATTR Thr119Met/ATTR Val30Met では 4 量体が検出され、TTR 分子の安定性がアミロイド形成に重要な役割を果たしている」と指摘しているが、その原因として ATTR Thr119Met が ATTR Val30Met の 4 量体の不安定さを保護するためにアミロイド形成が起こりにくくなり、臨床経過が緩徐になるものと考えている。本症例の TTR 解析においても、IEF

で 4 量体を認めたことから、ATTR Arg104His が ATTR Thr119Met/ATTR Val30Met と同様の機序で、ATTR Val30Met のアミロイド形成に対し、阻止的な働きをしている可能性が示唆された。一方、同様の解析で 87 歳の未発症の ATTR Val30Met の母親の TTR は、FAP ATTR Val30Met 患者の TTR と同様に 4 量体がほとんど認められなかったことより、必ずしも 4 量体の安定性からだけではアミロイド形成のメカニズムは説明できないと考えられた。

最近、FAP に対して肝臓移植が行われるようになり、早期の症例に対して良好な治療成績があげていることから、簡便で正確な FAP の診断の確立が望まれている。今回、我々が示した組織学検査と MS を組み合わせる方法は SSCP 法と比較して簡便で正確であり、compound heterozygote の症例を発掘するためには極めて有効なスクリーニング法と考えられた。

E. 結論

1. FAP のフォーカスのない地域に本邦初の FAP ATTR compound ヘテロ接合体が発見された。
2. ATTR Arg104His を持つ家系内の 4 名は、いずれも FAP 症状がなく、本症例においても症状の進行は極めて緩徐で、臨床症状が緩徐であること、及び 4 量体の安定度の検討より、ATTR Arg104His が非アミロイド原性で、ATTR Val30Met のアミロイド形成に対し、阻止的な働きをしている可能性が示唆された。
3. IEF の解析の結果、87 歳で未発症の FAP ATTR Val30Met の母親の TTR は、FAP ATTR Val30Met 患者の TTR と同様に 4 量体がほとんど認められなかったことより、必ずしも 4 量体の安定性からだけではアミロイド形成のメカニズムは説明できないと考えられた。

4. FAP ATTRのcompound heterozygoteのスクリーニングには、MS が極めて有用であった。

F. 研究発表

1. 研究発表

1. Misu K, Hattori N, Nagamatsu M, et al. Late onset familial amyloid polyneuropathy type I (transthyretin Met30- associated familial amyloid polyneuropathy) unrelated to endemic focus in Japan. Clinopathological and genetic features. Brain 1999; 122: 1951-62.

1. Nakamura M, Yamashita T, Ando Y, et al. Identification of a new transthyretin variant (Ile49) in familial amyloidotic polyneuropathy using electrospray ionization mass spectrometry and nonisotopic RNase cleavage assay. Hum Hered 1999; 49: 186-9.

3. Suhr OB, Svendsen IH, Ohlsson PI, et al. Impact of age and amyloidosis on thiol conjugation of transthyretin in hereditary transthyretin amyloidosis. Amyloid 1999; 6: 187-91.

4. Terazaki H, Ando Y, Misumi S, et al. A novel compound heterozygote (FAP ATTR Arg104His/ATTR Val30Met) with high serum transthyretin (TTR) and retinol binding protein (RBP) levels. Biochem Biophys Res Commun 1999; 264: 365-70.

5. Sakashita N, Ando Y, Marklund SL, et al. Familial amyloidotic polyneuropathy type I with extracellular superoxide dismutase mutation: a case report. Hum Pathol 1998; 29: 1169-72.

6. Suhr OB, Ando Y, Ohlsson PI, et al. Investigation into thiol conjugation of transthyretin in hereditary transthyretin amyloidosis. Eur J Clin Invest 1998; 28:

687-92.

7. Terazaki H, Ando Y, Suhr O, et al. Post-translational modification of transthyretin in plasma. Biochem Biophys Res Commun 1998; 249: 26-30.

8. Ando Y, Suhr O, Yamashita T, et al.: Detection of different forms of variant transthyretin (Met30) in cerebrospinal fluid. Neurosci Lett 1997; 238: 123-6.

9. Ando Y, Yamashita T, Nakamura M, et al. Down regulation of a harmful variant protein by replacement of its normal protein. Biochim Biophys Acta 1997; 1362: 39-46.

10. Ando Y, Nyhlin N, Suhr O, et al. Oxidative stress is found in amyloid deposits in systemic amyloidosis. Biochem Biophys Res Commun 1997; 232: 497-502.

11. Ranlov I, Ando Y, Ohlsson PI, Holmgren G, Ranlov PJ, Suhr OB. Rapid screening for amyloid-related variant forms of transthyretin is possible by electrospray ionization mass spectrometry. Eur J Clin Invest 1997; 27: 956-9.

2 学会発表

1. Yukio Ando Mass spectrometry as a probe of amyloidogenicity. The 4th International Symposium on Familial Amyloidotic polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders. 1999. 6, 3-5, Umea, Sweden.

2. Hisayasu Terazaki, Yukio Ando, Hirofumi Kai, et al. Role of amyloid β precursor protein (A β PP) in amyloid formation mechanism of familial amyloidotic polyneuropathy (FAP). The 4th International Symposium on Familial Amyloidotic polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders. 1999. 6, 3-5, Umea, Sweden.

3. Yukio Ando, Taro Yamashita, Eiko Ando, Hisayasu Terazaki, Konen Obayashi, Noboru Fujise, Per-Ingvar Ohlsson, Ole Suhr, Akira Negi, Masayuki Ando, Taihei Miyakawa. Analysis of vitreous amyloid of patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP ATTR Tyr114Cys). The 4th International Symposium on Familial Amyloidotic polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders. 1999. 6, 3-5, Umea, Sweden.
4. Konen obayashi, Yukio Ando, Eiko Ando, Taro Yamashita, Hisayasu Terazaki, Kazuhiro Tashima, Makoto Uchino, Masayuki Ando. Dementia in familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) (ATTR Tyr114Cys). The 4th International Symposium on Familial Amyloidotic polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders. 1999. 6, 3-5, Umea, Sweden.
5. Nils Nyhlin, Yukio Ando, Ryoji Nagai, Seikoh Horiuchi, Magdy EL-Sahly, Hisayasu Terazaki, Taro Yamashita, Masayuki Ando, Ole Suhr. Advanced glycation end products in familial amyloidotic polyneuropathy (FAP). The 4th International Symposium on Familial Amyloidotic polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders. 1999. 6, 3-5, Umea, Sweden.
6. Charles Mambule, Yukio Ando, Ole Suhr, Intissar Anan, Kazuhiro Tashima, Gosta Holmgren. Impact of familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) amyloid fibrils and PEG on secondary amyloidosis in mice. The 4th International Symposium on Familial Amyloidotic polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders. 1999. 6, 3-5, Umea, Sweden.
7. Masaaki Nakamura, Yukio Ando, Barbara Kluge-Beckerman, Kamuran Hamidi Asl*, Juris J. Liepnieks, Merrill D. Benson. Dual expression of normal and Met30 TTR using baculovirus system. The 4th International Symposium on Familial Amyloidotic polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders. 1999. 6, 3-5, Umea, Sweden.
8. Sonoka Yamashita, Hisayasu Terazaki, Yukio Ando, Shogo Misumi, Konen Obayashi, Taro Yamashita, Shin-ichi Yoshimatsu, Kazuhiro Tashima, Kazuko Nakagawa, Takashi Ishizaki, Makoto Uchino, Shozo Shoji, Masayuki Ando. Cysteamination as an important modification of transthyretin (TTR) in familial amyloidotic polyneuropathy. The 4th International Symposium on Familial Amyloidotic polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders. 1999. 6, 3-5, Umea, Sweden.
9. Ole Suhr, Intissar Anan, Yukio Ando, Magdy El-Salhy, Gosta Holmgren, Kenneth Lang, Kazuhiro Tashima, Lars Wikstrom. Scavenger treatment of free radical injury in familial amyloidotic polyneuropathy (FAP ATTR V30M). An open study on Swedish transplanted and non-transplanted patients. The 4th International Symposium on Familial Amyloidotic polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders. 1999. 6, 3-5, Umea, Sweden.
10. Charles Mambule, Yukio Ando, Masaaki Nakamura, Yukio Kusunose, Konen Obayashi, Kazuhiro Tashima, Eiko Ando, Taro Yamashita, Hisayasu Terazaki, Makoto Uchino, Masayuki Ando. Clinical manifestation of familial amyloidotic

- polyneuropathy (FAP)(ATTR Thr49Ile).The 4th International Symposium on Familial Amyloidotic polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders. 1999. 6, 3-5, Umea, Sweden.
11. Taro Yamashita, Yukio Ando, Hisayasu Terazaki, Konen Obayashi, Per-Ingvar Ohlsson, Ole Suhr, Makoto Uchino, Masayuki Ando. A novel prenatal diagnosis in transthyretin (TTR) related amyloidosis.The 4th International Symposium on Familial Amyloidotic polyneuropathy and OtherTransthyretin Related Disorders. 1999. 6, 3-5, Umea, Sweden.
 12. Taro Yamashita, Yukio Ando, Katsuki Haraoka, Shogo Misumi, Makoto Uchino. Role of tryptophan in familial amyloidotic polyneuropathy.The 4th International Symposium on Familial Amyloidotic polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders. 1999. 6, 3-5, Umea, Sweden.
 13. Noriko Matsunaga, Yukio Ando, Hisayasu Terazaki, Shogo Misumi, Konen Obayashi, Eiko Ando, Shozo Shoji, Akira Negi, Kazuko Nakagawa, Takashi Ishizaki, Makoto Uchino, Masayuki Ando. A novel transthyretin (TTR) mutation (TTR Arg104His) in familial amyloidotic polyneuropathy (FAP ATTR Val30Met).The 4th International Symposium on Familial Amyloidotic polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders. 1999. 6, 3-5, Umea, Sweden.
 14. Yukio Ando, Masaaki Nakamura, Ole Suhr, Maria Joao Saraiva. Change in transthyretin (TTR) forms in oxidative stress: the role of cysteine 10. The 4th International Symposium on Familial Amyloidotic polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders. 1999. 6, 3-5, Umea, Sweden.
 15. Ole Suhr, Lars Wikstrom, Anders Rydh, Yukio Ando, Gosta Holmgren. The Swedish monozygous ATTR V30M twin brothers revisited.The 4th International Symposium on Familial Amyloidotic polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders. 1999. 6, 3-5, Umea, Sweden.

厚生省科学研究費補助金 (特定疾患対策研究事業)
 アミロイドーシスに関する研究 分担研究報告書

遺伝カウンセリングで見いだされた症状の乏しい家族性 アミロイドポリニューロパチー(FAP)患者に対する肝移植の適応

分担研究者 池田修一 信州大学第三内科 教授
 共同研究者 武井洋一 信州大学第三内科

研究要旨 発症前遺伝子診断で陽性であった者の内、組織へのアミロイド沈着が証明され、さらに軽微な臨床症状を認めた 2 名の FAP 発症初期の患者について肝移植の適応を考慮した。発症前遺伝子診断によって、FAP 発症初期の患者を見いだすことが可能となり、FAP 特有の症状が軽度であっても組織へのアミロイド沈着が証明されれば、肝移植治療について積極的に検討する必要がある。

A. 研究目的

我々の施設では遺伝子診療部が独立した診療科として運営されており、遺伝カウンセリング、発症前遺伝子診断を中心に診療を行っている。そのうち、家系内に FAP 患者が存在したために FAP の遺伝カウンセリングを希望する者も多数いる。発症前遺伝子診断で陽性であった者の内、組織へのアミロイド沈着が証明され、さらに軽微な臨床症状を認めた 2 名の FAP 発症初期の患者の治療、特に肝移植の適応を評価する。

B. 研究対象

FAP の発症前遺伝子診断を希望した 2 名 (いずれも 32 歳の女性で特に FAP の症状を自覚していない)。患者 1 は妊娠を希望し遺伝相談に訪れた。また患者 2 は離婚しており、家族および自分の将来を不安に思い遺伝子診断を希望した。

C. 研究結果

患者 1 は 1997 年頃より立ちくらみを自覚しており、1998 年の胃内視鏡検査では食物残渣を認めていたが FAP の症状と自覚していなかった。1999 年 4 月に当院遺伝子診療部を受診し、5 月 Met30TTR 遺伝子陽性と診断。病歴上立ちくらみ、胃部不快感があったため腹壁脂肪吸引生検を施行し、アミロイド沈着を認めた。さらに胃生検でも明らかなアミロイド沈着を認めた。このため立ちくらみおよび胃部不快感が FAP の症状であると考え、FAP を発症していることを患者および家族に説明した。一般身体所見では明らかな異常なし。神経学的所見では下肢先端にごく軽度の温痛覚障害を認める程度であった。末梢神経伝導速度は運動神経、感覚神経ともに正常であった。FAP を発症してごく初期の状態であると判断された。しかし小川村出身の患者の母は、突然出現する強い嘔吐発作を繰り返し、短期間のうちに全身が衰弱して 43 歳で死亡しており、患者 1 も突然の嘔吐発作が出

現する可能性があると考えられた。以上の点を患者ならびにその家族に説明したところ、生体部分肝移植を希望し、父親をドナーとして 2000 年 2 月 15 日肝移植手術を施行した。

患者 2 は飯山型 FAP 家系の一員であり、1991 年に結婚、1993 年に一子をもうけたが離婚し、子供と母親と生活している。1997 年頃から夏に立ちくらみを自覚するようになった。1999 年 FAP 患者の脳死体からの肝移植、ドミノ肝移植などの情報をマスコミを通じて知る機会があり、家族および自分の将来に不安を覚え、1999 年 9 月当院遺伝子診療部へ受診。Met30TTR 遺伝子が陽性と判明し、立ちくらみがあることから、腹壁脂肪吸引生検を施行。アミロイド沈着を認め、FAP を発症していると考えられた。一般身体所見では特記すべき異常はなく、神経学的所見でも異常は便秘と起立性低血圧のみであった。運動神経の M 波は正常であり、運動神経、感覚神経ともに伝導速度も上下肢ともに正常であった。患者 2 に FAP を発症していることを説明したところ、肝移植を希望された。しかし家系内に適切なドナー候補が無く、また海外で脳死肝移植をうけることも希望されないため、国内で脳死肝移植の登録を行い、待機している。

D. 考察

FAP の罹病期間、発症の時期については患者の病歴に依存することが多く、また自覚症状は個人の感受性によるところ

が多い。発症前遺伝子診断で、陽性であった患者について定期的な経過観察、または詳細に症状を聴取する事により、症状が軽微な FAP 患者を確定診断することができる。また本疾患に対する肝移植の時期は罹病期間が短いほど肝移植後の経過および予後が良好であることから、肝移植も罹病期間が短く、症状が軽微な患者に施行することが望ましい。今後さらに発症前遺伝子診断の希望が増加すると思われるが、FAP の発症前遺伝子診断が陽性である場合には、詳細な病歴聴取ならびに臨床症状の評価が必要である。またたとえ症状が軽微であっても組織へのアミロイド沈着を認める場合には治療について積極的に考慮する必要がある。肝移植の適応があると考えられる。

E. 結論

発症前遺伝子診断によって、FAP 発症初期の患者を見いだすことが可能となった。また FAP 特有の症状が軽度であっても組織へのアミロイド沈着が証明されれば、肝移植治療について、積極的に検討する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Takei Y, Ikeda S, Hashikura Y, Ikegami T, Kawasaki S. Partial-liver transplantation to treat familial amyloid polyneuropathy: follow-up of 11 patients. *Ann Intern Med.* 1999; 131: 592-595

厚生省科学研究費補助金 (特定疾患対策研究事業)
 アミロイドーシスに関する研究 分担研究報告書

家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)患者の 肝臓移植後の眼科検診の必要性について

分担研究者 安東由喜雄 熊本大学医学部臨床医学講座 講師
 共同研究者 寺崎久泰*、大林光念**、田島和周**、中村政明**
 山下園加、松永典子、安東えい子***、安藤正幸*
 熊本大学医学部臨床検査医学講座、*同第一内科
 同神経内科、*国立熊本病院眼科

研究要旨 家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)における網膜及び脈絡叢から産生されるトランスサイレチン(TTR)の役割を明らかにするために、脳死、及び部分生体肝移植をうけた 17 名の FAP 患者の移植前後の中枢神経症状と眼症状について検討した。経過中、中枢神経症状の出現は認められなかったが、3 名の患者にレンズ表層と瞳孔の辺縁にアミロイド様の沈殿物、そのうち一名の患者に硝子体混濁、緑内障が確認された。新たに出現した眼アミロイドは網膜から産生された異型 TTR(ATTR)によるものと考えられるため、移植患者の定期的な眼科的検診は必要不可欠からざるものと考えられた。

A. 研究目的

FAP の原因蛋白である異型トランスサイレチン(ATTR)は主として肝臓で産生されることから、1990 年、初めてスウェーデンで脳死肝移が行われて以来、世界の各施設で肝移植が試みられている。FAP の肝移植者数は約 400 名を越え、その約 8 割が生存しており、肝移植は FAP 患者にとって唯一の有効な治療法であることは間違いない。当施設においても、1994 年の 2 月より現在まで計 12 名の FAP 患者が海外での脳死肝移植を、5 名が国内での部分生体肝移植を受けたが、全員が生存しており、軽度の術後の合併症や拒絶反応は認められたが、ほとんどが社会復帰を果たしており、概ね良好な経過

をたどっている。しかし、FAP 患者においては肝臓移植後も引き続き、網膜色素上皮細胞や、脈絡叢からも ATTR が産生されていることから、移植後の眼病変や中枢神経症状の出現も詳細に検討される必要がある。従って、当施設においては、移植後、特に、定期的な神経学的検査と眼科検診を行った。

B. 研究方法

当院通院中の 17 名の FAP 肝移植患者 (FAP ATTR Val30Met : 15 名、FAP ATTR Tyr114Cys : 2 名、男性 : 9 名、平均年齢 34 ± 10.6 歳、女性 : 8 名、平均年齢 38.5 ± 6.5 歳、移植後期間 1 ヶ月から 5 年、平均 25.9 ± 23.4 ヶ月)に対し、1-6

ヶ月毎に熊本大学第一内科で神経学評価を行うと共に、髄液中の総 TTR と ATTR 濃度を single radial immunodiffusion (SRID)法と mass spectrometry 法にて測定し、その変化を比較検討した。また、当院眼科にて移植前後の眼病変の変化を経時的に診察し比較検討した。

C. 研究結果

中枢神経症状に関しては、移植後、新たな所見が認められた移植患者は認められず、髄液の検査においても、移植前後で、髄液中の総 TTR 濃度、ATTR 濃度に変化は見られなかった。眼症状に関しては、35 歳、44 歳、及び 50 歳の女性 FAP ATTR Val30Met 患者において、移植後、それぞれ移植後 5 ヶ月、12 ヶ月、及び 36 ヶ月後に眼のレンズ表層と瞳孔辺縁にアミロイド様の沈着物が確認された。このうち 44 歳女性は、移植後 12 ヶ月から両眼とも眼圧が上昇し、特に左眼においては術後 48 ヶ月の時点で、硝子体混濁、及び緑内障を併発した。現在、眼圧降下剤の治療を続けているが、薬物抵抗性の傾向が認められ、将来的には外科的処置が必要となると考えられる。

D. 考察

移植患者においては、これ迄のところ何等新たな異常な神経症状が認められないことから、脈絡叢から産生される ATTR に関しては、FAP に対するその役割は小さいと考えられる。一方、網膜からの ATTR は、眼病変を認めたいずれの FAP 患者も、移植後血中の ATTR のレベルは移植前値の 1/100 以下に低下していたことから、移植後新たに出現したアミロイド沈着に大きく関与している可能性が高い。今回眼症状を呈した症例が、いずれも女性である点は特筆される。年齢が移植後のリスクファクターになり得るかは、

今後の検討が必要と考えられた。以上述べた如く、移植患者に眼病変が合併する可能性が充分考えられるため、定期的な眼科検診は必要欠くべからざるものと考えられた。

E. 結論

当施設の FAP ATTR 肝臓移植患者 3 名に肝臓移植後、新たな眼病変が出現し、そのうち 1 名に明らかな進行を認めた。肝臓移植では、FAP の眼病変を阻止することはできないと考えられるため、定期的な眼科検診を行い、早期に眼病変を発見し、治療を行う必要がある。

F. 研究発表

論文発表

1. Anan I, El-Salhy M, Ando Y, et al. Colonic enteric nervous system in patients with familial amyloidotic neuropathy. *Acta Neuropathol* 1999; 98: 48-54.
2. Anan I, El-Salhy M, Ando Y, et al. Colonic endocrine cells in patients with familial amyloidotic polyneuropathy. *J Intern Med* 1999; 245: 469-73.
3. Lendoire JC, Trigo P, Ando Y et al. Liver transplantation in transthyretin familial amyloid polyneuropathy: first report from Argentina. *Amyloid*. 1999; 6: 297-300.
4. Misu K, Hattori N, Nagamatsu M, et al. Late-onset familial amyloid polyneuropathy type I (transthyretin Met30-associated familial amyloid polyneuropathy) unrelated to endemic focus in Japan. Clinicopathological and genetic features. *Brain* 1999; 122: 1951-62.
5. Nyhlin N, Anan I, el-Salhy M, Ando Y, Suhr OB. Endocrine cells in the upper gastrointestinal tract in relation to gastrointestinal dysfunction in patients with familial amyloidotic polyneuropathy.

- Amyloid 1999; 6: 192-8.
6. Tashima K, Ando Y, Terazaki H, et al. Outcome of liver transplantation for transthyretin amyloidosis: follow-up of Japanese familial amyloidotic polyneuropathy patients. *J Neurol Sci* 1999; 171: 19-23.
7. Tashima K, Suhr OB, Ando Y, et al. Gastrointestinal dysfunction in familial amyloidotic polyneuropathy (ATTR Val30Met)--comparison of Swedish and Japanese patients. *Amyloid* 1999; 6: 124-9.
8. Yamashita T, Ando Y, Bernt Suhr O, et al. A new diagnostic procedure to detect unknown transthyretin (TTR) mutations in familial amyloidotic polyneuropathy (FAP). *J Neurol Sci* 2000; 173: 154-159.
9. Ando Y, Suhr OB. Autonomic dysfunction in familial amyloidotic polyneuropathy (FAP). *Amyloid* 1998; 5: 288-300.
10. Ohnishi A, Yamamoto T, Murai Y, et al. Denervation of eccrine glands in patients with familial amyloidotic polyneuropathy type I. *Neurology* 1998; 51: 714-21.
11. Suhr OB, Ando Y, Holmgren G, et al. Liver transplantation in familial amyloidotic polyneuropathy (FAP). A comparative study of transplanted and non-transplanted patient's survival. *Transpl Int* 1998; 11: S160-3.
12. Terazaki H, Ando Y, Yamashita T, et al. Visceral orthostatic hypotension in patients with severe autonomic dysfunction. *J Auton Nerv Syst* 1998; 68: 101-8.
13. Yoshimatsu S, Ando Y, Terazaki H, et al. Endoscopic and pathological manifestations of the gastrointestinal tract in familial amyloidotic polyneuropathy type I (Met30). *J Intern Med* 1998; 243: 65-72.
14. Ando Y, Suhr O, Tashima K, et al. Liver transplantation in Japanese patients with familial amyloidotic polyneuropathy. *Lancet* 1997; 350: 593-594.
15. Ando E, Ando Y, Okamura R, Uchino M, Ando M, Negi A. Ocular manifestations of familial amyloidotic polyneuropathy type I: long-term follow up. *Br J Ophthalmol* 1997; 81: 295-8.
16. Kawano O, Kohrogi H, Ando Y, et al. Bronchial hyperreactivity in patients with familial amyloidotic polyneuropathy and autonomic neuropathy. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 1465-8.
17. Ranlov I, Ando Y, Ohlsson PI, Holmgren G, Ranlov PJ, Suhr OB. Rapid screening for amyloid-related variant forms of transthyretin is possible by electrospray ionization mass spectrometry. *Eur J Clin Invest* 1997; 27: 956-9.
18. Shiraishi M, Ando Y, Mizuta H, Nakamura E, Takagi K, Ando M. Charcot knee arthropathy with articular amyloid deposition in familial amyloidotic polyneuropathy. *Scand J Rheumatol* 1997; 26: 61-4.
19. Suhr OB, Wiklund U, Ando Y, Ando E, Olofsson BO. Impact of liver transplantation on autonomic neuropathy in familial amyloidotic polyneuropathy: an evaluation by spectral analysis of heart rate variability. *J Intern Med* 1997; 242: 225-9.
20. Takahashi K, Sakashita N, Ando Y, Suga M, Ando M. Late onset type I familial amyloidotic polyneuropathy: presentation of three autopsy cases in comparison with 19 autopsy cases of the ordinary type. *Pathol Int* 1997; 47: 353-9.
- 学会発表
1. Yukio Ando, Taro Yamashita, Eiko Ando, Hisayasu Terazaki, Konen Obayashi, Noboru Fujise, Per-Ingvar Ohlsson, Ole Suhr, Akira

- Negi, Masayuki Ando, Taihei Miyakawa. Analysis of vitreous amyloid of patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP ATTR Tyr114Cys). The 4th International Symposium on Familial Amyloidotic polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders. 1999. 6. 3-5. Umea, Sweden.
2. Yukio Ando. Autonomic disturbances in TTR amyloidosis. The 4th International Symposium on Familial Amyloidotic polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders. 1999. 6, 3-5, Umea, Sweden.
3. Eiko Ando, Jyunko Yonezawa, Konen Obayashi, Yukio Ando, Hisayasu Terazaki, Taro Yamashita, Masayuki Ando, Akira Negi. Glaucoma in patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) in Japan. The 4th International Symposium on Familial Amyloidotic polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders. 1999. 6, 3-5, Umea, Sweden.
4. Kazuhiro Tashima, Bo-Goran Ericzon, Per-Ingvar Ohlsson, Yukio Ando, Gosta Holmgren, Ole Suhr. Variant transthyretin transverse blood-brain barrier. The 4th International Symposium on Familial Amyloidotic polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders. 1999. 6, 3-5, Umea, Sweden.
5. Kazuhiro Tashima, Yukio Ando, Charles Mambule, Per-Ingvar Ohlsson, Ole Suhr. Detection of variant transthyretin from dry-frozen samples. The 4th International Symposium on Familial Amyloidotic polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders. 1999. 6, 3-5, Umea, Sweden.
6. Ole Suhr, Intissar Anan, Yukio Ando, Magdy El-Sally, Gosta Holmgren, Kenneth Lang, Kazuhiro Tashima, Lars Wikstrom. Scavenger treatment of free radical injury in familial amyloidotic polyneuropathy (FAP ATTR V30M). An open study on Swedish transplanted and non-transplanted patients. The 4th International Symposium on Familial Amyloidotic polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders. 1999. 6, 3-5, Umea, Sweden.
7. Ken-ichi Misu, Naoki Hattori, Shu-ichi Ikeda, Yukio Ando, Masamitsu Nakazato, Gen Sobue. Late-onset familial amyloidotic polyneuropathy type I (Met 30 transthyretin mutation) unrelated to endemic focus in Japan. The 4th International Symposium on Familial Amyloidotic polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders. 1999. 6, 3-5, Umea, Sweden.
8. Naomi Sakashita, Yukio Ando, Konen Obayashi, Hisayasu Terazaki, Taro Yamashita, Mineo Takei, Kiyoshi Takahashi. Familial amyloidotic polyneuropathy (Ser50Ile): The first autopsy case report. The 4th International Symposium on Familial Amyloidotic polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders. 1999. 6, 3-5, Umea, Sweden.
9. Intissar Anan, Magdy El-Sally, Yukio Ando, Hisayasu Terazaki, Ole Suhr. The amount of amyloid is increased in the upper compared to the lower gastrointestinal tract. The 4th International Symposium on Familial Amyloidotic polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders. 1999. 6, 3-5, Umea, Sweden.
10. Konen Obayashi, Yukio Ando, Akio Ohnishi, Tatsunori Yamamoto, Yoshiyuki Murai, Yoshinobu Hoshii. Denervation of eccrine glands in patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP ATTR Val30Met). The 4th International Symposium

on Familial Amyloidotic polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders. 1999. 6, 3-5, Umea, Sweden.

11. Charles Mambule, Yukio Ando, Masaaki Nakamura, Yukio Kusunose, Konen Obayashi, Kazuhiro Tashima, Eiko Ando, Taro Yamashita, Hisayasu Terazaki, Makoto Uchino, Masayuki Ando. Clinical manifestation of familial amyloidotic polyneuropathy (FAP)(ATTR Thr49Ile). The 4th International Symposium on Familial Amyloidotic polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders. 1999. 6, 3-5, Umea, Sweden.

12. Taro Yamashita, Yukio Ando, Katsuki Haraoka, Shogo Misumi, Makoto Uchino. Role of tryptophan in familial amyloidotic polyneuropathy. The 4th International Symposium on Familial Amyloidotic polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders. 1999. 6, 3-5, Umea, Sweden.

13. Kazuhiro Tashima, Ole Suhr, Yukio Ando, Gosta Holmgren, Taro Yamashita, Konen, Obayashi, Hisayasu Terazaki, Makoto Uchino. Gastrointestinal dysfunction in familial amyloidotic polyneuropathy (FAP ATTR Val30Met)-comparison of Swedish and Japanese patients. The 4th International Symposium on Familial Amyloidotic polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders. 1999. 6, 3-5, Umea, Sweden.

14. Hisayasu Terazaki, Yukio Ando, Eiko

Ando, Konen Obayashi, Shin-ichi Yoshimatsu, Taro Yamashita, Kazuhiro Tashima, Moritaka Suga, Akira Negi, Makoto Uchino, Masayuki Ando.

Role of extrahepatic production of transthyretin (TTR) in familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) after liver transplantation. The 4th International Symposium on Familial Amyloidotic polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders. 1999. 6, 3-5, Umea, Sweden.

15. Shu-ichi Ikeda, Yo-ichi Takei, Masamitsu Nakazato, Yukio Ando, Ken-ichiro Missu, Gen Sobue. Geographic distribution of familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) in Japan. The 4th International Symposium on Familial Amyloidotic polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders. 1999. 6, 3-5, Umea, Sweden.

16. Ole Suhr, Lars Wikstrom, Anders Rydh, Yukio Ando, Gosta Holmgren. The Swedish monozygous ATTR V30M twin brothers revisited. The 4th International Symposium on Familial Amyloidotic polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders. 1999. 6, 3-5, Umea, Sweden.

G 知的所有権の所得状況

高度先進医療承認

Mass spectrometry によるトランスサイレチン関連アミロイドーシスの診断

厚生省科学研究費補助金 (特定疾患対策研究事業)
アミロイドーシスに関する研究 分担研究報告書

AL アミロイドーシス発症に関する骨髓腫細胞の細胞生物学的研究

分担研究者 河野 道生 山口大学医学部寄生体 (免疫血液) 学講座 教授

研究要旨 ALアミロイドーシスのマウスモデルを確立するべく、免疫不全マウス SCID にヒト IL-6 遺伝子を恒常的に発現する SCID-hIL6 transgenic mice の腹腔内にヒト骨髓腫細胞株を移植できる系を樹立した。この移植系において、細胞移植前に予め agarose gel を腹腔内に注射しておき、細胞も agarose gel とともに移植すると、骨髓腫細胞株を長期に移植生存させることが可能であることがわかった。

A. 研究目的

AL アミロイドーシスの多くは骨髓腫に随伴するものである。今までのところ、どのような骨髓腫細胞がアミロイドーシスを惹起するのか明らかでない。ヒト骨髓腫細胞 (株) を SCID-hIL6 transgenic mice へ移植できる系を確立して、in vivo 系でアミロイドーシスを起こしやすい骨髓腫細胞を明らかにしてゆく。

B. 研究方法

SCID-hIL6 mice にヒト骨髓腫細胞 (株) を腹腔内に移植する。今回は IL-6 依存性細胞株 U-266 を主に使用した。移植効率をよくするために、予め1あるいは3日前に agarose gel (0.6%) あるいは Matrigel (CR 社) を腹腔内に投与した。移植時にも同時に agarose gel あるいは Matrigel とともに細胞を腹腔内に注射した。4 および 8 週に腹腔内の細胞を回収して、フローサイトメーター (Epics Elite, Coulter) にて解析した。ヒト骨髓腫細胞 (株) の同定には、抗ヒト CD54 抗体の反応性で行なった。

C. 研究結果

ヒト骨髓腫細胞株 U-266 は in vitro 培養にて IL-6 依存性に増殖する。U-266 細胞株は、皮

下注射では腫瘍形成はできず、静脈注射にて移植できなかった。腹腔内注射では、単独では移植困難であったが、agarose gel (0.6%) あるいは Matrigel とともに注射すると移植可能であった。更に、細胞移植前 1 日に agarose gel (0.6 ml) を腹腔内注射した後、U-266 細胞を agarose gel とともに注射した場合、腹腔内の細胞回収が極めて多かった (表-1)。

D. 考察

SCID-hIL6 mice の腹腔内に予め agarose gel を注射して細胞にとっての scaffold を作っておくと、IL-6 依存性骨髓腫細胞株の移植が極めて良好であることがわかった。骨髓腫患者からの骨髓腫細胞も同様な方法で移植可能と思われる。

E. 結論

IL-6 依存性骨髓腫細胞株 U-266 の SCID-hIL6 transgenic mice の腹腔内移植への効率良い移植の条件が明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Fujii R, Ishikawa H, Mahmoud MS, Asaoku H,

Kawano MM: MPC-1-CD49e- immature myeloma cells include CD45+ subpopulations that can proliferate in response to IL-6 in human myelomas. Br J Haematol 105: 131-140, 1999.

2) Mahmoud MS, Fujii R, Ishikawa H, Kawano MM: Enforced CD19 expression leads to growth inhibition and reduced tumorigenicity. Blood 94: 3551-3558, 1999.

2. 学会発表

1) Mahmoud MS, Ishikawa H, Fujii R, Kawano

MM: Introduction of CD19 expression leads to growth inhibition and reduced tumorigenicity in human myeloma cell lines. 41th Annual meeting of American Society of Hematology. Dec. 3-7, 1999. (Blood 94 (Supl 1): 703a, 1999.)

G. 知的所有権の取得状況

なし

表 1

U-266 cell line
in the peritoneal cavity of SCID-hIL6 mice

	1×10^6 injected	1×10^7 injected
none → agarose gel	2,600*	17,000
KM-102 → agarose gel	3,120	14,800
agarose 0.3 ml → agarose gel	64,700	140,200
agarose 0.6 ml → agarose gel	87,200	465,300

★ cell number in one-tenth of total harvested peritoneal fluid

厚生省科学研究費補助金 (特定疾患対策研究事業)
 アミロイドーシスに関する研究 分担研究報告書

AL アミロイドーシスを免疫組織化学的に診断しうる 抗免疫グロブリン L 鎖抗体の作製および組織切片への適用

分担研究者 石原得博 山口大学医学部病理学第一講座 教授

共同研究者 星井嘉信¹⁾, 岩田隆子²⁾, 瀬戸口美保子³⁾

¹⁾山口大学医学部病理学第一講座

²⁾山口大学医療技術短期大学部

³⁾山口大学医学部附属病院病理部

研究要旨 ALアミロイドーシスを免疫組織化学的に診断しうる、より汎用性の高い抗体を作製する目的で、免疫グロブリンλ鎖のN末端側から118-134番目および免疫グロブリンκ鎖のN末端側から116-133番目に相当する合成ペプチドを抗原とする抗血清を作製し、組織切片への適用を試みた。抗λ鎖定常領域抗血清はAλ型アミロイドーシスとは反応したが、Aκ型アミロイドーシスとは反応せず、また血清成分や形質細胞も非常に弱い染色性であった。抗κ鎖定常領域抗血清は70%蟻酸処理後にプロテイナーゼK処理を行うことによりAκ型アミロイドーシスと強く反応したが、Aλ型アミロイドーシスとは反応しないかあるいは非常に弱い染色性であった。今後さらに検討症例数を増やし、今回作製した抗血清で実際にどの程度診断可能かを検討する必要がある。

A. 研究目的

AL アミロイドーシスは、免疫グロブリン L 鎖の一部あるいは全部がアミロイド線維蛋白として組織に沈着する疾患である。AL アミロイドーシスの免疫組織化学的診断のさいには、通常市販の抗免疫グロブリン L 鎖抗体、あるいは一部の施設では抽出したアミロイド線維を抗原とする抗体を用いて染色が行われている。しかしながら市販の抗 L 鎖抗体ではアミロイドに対する反応性が十分でなかったり、また周囲の血清成分が強く染まってしまう、確定的な判定が困難な場合がしばしばある。一方アミロイド線維に対する抗体は、使用できる施設が限られると

いう問題点がある。今回我々は AL アミロイドーシスを免疫組織化学的に診断しうる、より汎用性の高い抗体を作製する目的で、免疫グロブリン L 鎖定常領域の一部に相当する合成ペプチドを抗原とする抗血清を作製し、組織切片への適用を試みた。

B. 研究方法

1)抗体作製：免疫グロブリンλ鎖の N 末端側から 118-134 番目¹⁾に相当する配列の N 末端側にシステインを付加した直鎖ペプチドを合成し、KLH を担体としてウサギに免疫し、抗λ鎖定常領域抗血清を作製した。また免疫グロブリンκ鎖の

N 末端側から 116-133 番目²⁾に相当する MAP ペプチドを作製、ウサギに免疫して、抗 κ 鎖定常領域抗血清を作製した。なおペプチド合成および抗体作製については旭テクノグラス株式会社の抗ペプチド抗体作製一貫サービスを利用した。

2)免疫組織化学：Dr. Glennerより供与された抗 λ および抗 κ 抗体³⁾をはじめとする諸種のアミロイドに対する抗体を用いた免疫組織化学的検討で、これまでに λ 型と診断された全身性アミロイドーシス剖検例6例、限局性咽頭喉頭アミロイドーシス生検例1例、また κ 型と診断された全身性アミロイドーシス剖検例6例のホルマリン固定パラフィン切片を材料とした。切片を脱パラフィン後、内因性ペルオキシダーゼおよび非特異反応のブロックを行い、一次抗体として抗 λ 鎖定常領域抗血清400倍、または抗 κ 鎖定常領域抗血清200倍を室温で30分間反応させた。二次抗体として DAKO Envision+ポリマー試薬（ウサギ一次抗体用）を室温30分間反応させた後、DABにて5分間発色を行った。抗 κ 鎖定常領域抗血清については脱パラフィン後70%ギ酸処理5分およびプロテイナーゼK処理5分の賦活処理を行った。なお λ 型の限局性咽頭喉頭アミロイドーシス例については、市販の抗 λ 鎖抗体(DAKO)についても検討した。

C. 研究結果

抗 λ 鎖定常領域抗血清は λ 型アミロイドーシス7例のアミロイドとは反応した(写真1)が、 κ 型アミロイドーシス6例のアミロイドとは反応しなかった。 λ 型全身性アミロイドーシス例において血管内の血清成分は陰性あるいは非常に弱い染色性であった。また λ 型の限局性咽頭喉頭アミロイドーシス例ではアミロイド周囲にモノクローナルな形質細胞

の集簇がみられ、市販の抗 λ 鎖抗体ではこの形質細胞および血管内の血清成分が陽性であったが、アミロイドは弱陽性あるいは部位によってはほとんど染まっていなかった。一方抗 λ 鎖定常領域抗血清ではアミロイドは陽性であったが、形質細胞や血管内の血清成分はほとんど染まっていなかった(写真2)。

抗 κ 鎖定常領域抗血清は70%ギ酸処理後にプロテイナーゼK処理を行うことにより κ 型アミロイドーシス6例のアミロイドと強く反応した(写真3)が、 λ 型アミロイドーシス7例のアミロイドとは反応しないかあるいは非常に弱い染色性であった。なおアミロイド以外に線維性結合織も陽性となったが、コンゴレッド染色標本と比較することでアミロイドが陽性か否かは判定可能であった。

D. 考察

免疫組織化学的に AL アミロイドーシスと十分な反応性を有する抗免疫グロブリン λ 鎖定常領域抗血清および抗免疫グロブリン κ 鎖定常領域抗血清を作製しえた。今回作製した抗血清は合成ペプチドを抗原としており、今後同様な反応性を有する抗血清を作成することが比較的容易ではないかと思われる。AL アミロイドーシスの 85~90%の症例は λ 鎖定常領域の一部を含んでいるといわれている⁴⁾ので、AL アミロイドーシスの 10~15%程度の症例は今回作製した抗血清とは反応しないことが予測されるが、実際にどの程度診断可能か、今後症例数を増やして検討する必要がある。近年 κ 鎖定常領域が主なアミロイド蛋白であった症例の報告もでてきているが、⁵⁾今回作製した抗血清はこのような症例も検出しうるであろう。

また抗 λ 鎖定常領域抗血清はホルマリン固定パラフィン切片上では λ 型のア