

ミロイドとはよく反応するが、形質細胞や血清成分とは反応が非常に弱かった。おそらくアミロイドと前駆体蛋白の立体構造の違いに起因する現象と思われるが、A λ 型アミロイドの免疫組織化学的診断において非常に有用な抗血清であるといえる。

E. 結論

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。今後さらに検討症例数を増やし、実際にどの程度の割合で診断可能かを検討する必要がある。

F. 引用文献

1) Wikler M, Titani K, Shinoda T, et al. The complete

amino acid sequence of a λ type Bence-Jones protein. *J Biol Chem* 1967;242:1668-1670.

2) Gottlieb PD, Cunningham BA, Rutishauser U, et al. The covalent structure of a human γ G-Immunoglobulin. VI. Amino acid sequence of the light chain. *Biochemistry* 1970;9:3155-3161.

3) Isersky C, Ein D, Page DL, et al. Immunochemical cross-reactions of human amyloid proteins with human immunoglobulin light polypeptide chains. *J Immunol* 1972;108:486-493.

4) Buxbaum J. Mechanisms of disease: Monoclonal immunoglobulin deposition. Amyloidosis, light chain deposition disease, and light and heavy chain deposition disease. *Hematol Oncol Clin North Am* 1992;6:323-346.

5) Engvig JP, Olsen KE, Gislefoss RE, et al. Constant region of a κ III immunoglobulin light chain as a major AL-amyloid protein. *Scand J Immunol* 1998;48:92-98.

写真 1 : IgA λ 型多発性骨髄腫に伴う A λ 型アミロイドーシス例の腎、抗 λ 鎖定常領域抗血清による免疫染色。血管壁や一部糸球体に沈着したアミロイドが明瞭に染色されている。血清成分は染色性が非常に弱い。

写真 2 : A λ 型の限局性咽頭喉頭アミロイドーシス例、抗 λ 鎖定常領域抗血清による免疫染色。血管壁や腺管周囲のアミロイドが陽性であるが、形質細胞はほとんど染まっていない。

写真 3 : 原発性の A κ 型アミロイドーシスの腎、抗 κ 鎖定常領域抗血清による免疫染色。血管壁などに沈着したアミロイドが明瞭に染色されている。

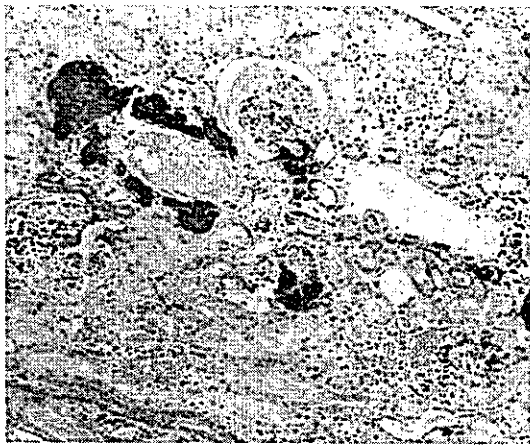


写真 1



写真 2



写真 3

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

多発性骨髄腫に伴うアミロイドーシスの臨床的検討
—血中遊離 L 鎖との関連について—

分担研究者 麻奥英毅 広島赤十字・原爆病院第 4 内科 副部長

研究要旨 多発性骨髄腫患者 (MM) の血中 free L 鎖を測定しアミロイドーシス合併との関連について検討した。κ type MM においては free κ 値とアミロイド沈着との関連は認めなかった。λ type MM において病初期の症例でアミロイド沈着例は尿中 BJP 陽性で血中 free λ が極めて高値であった。罹病期間 12 ヶ月以上の症例においてもアミロイド沈着例は非沈着例に比し free λ 値が有意に高かった。臨床病期 (cs) I 無治療症例においても罹病期間 12 ヶ月以上でアミロイド沈着例は free λ が有意に高く、free λ 高値は λ MM におけるアミロイドーシス合併の危険因子と考えられた。

A. 研究目的

多発性骨髄腫 (MM) 関連アミロイドーシスは M 蛋白の L 鎖に由来する AL 蛋白が沈着することに起因する。しかし全ての骨髄腫にアミロイドーシスが合併するわけではないことは周知のことである。我々はアミロイドーシス合併の危険因子を明らかにする目的で骨髄腫患者の血中 free L 鎖 (FLc) 量とアミロイドーシスの関連について検討した。

B. 対象と方法

対象は多発性骨髄腫患者 108 例で κ type 65 例、λ type 43 例。内アミロイドの沈着を認める例は 41 例 (κ type 24 例、λ type 17 例) である。病期 I 44 例、II Ⅲ期 64 例であり、I 期例は無治療、II Ⅲ期例には MSG2 プロトコールで治療を行っている。アミロイドーシスの確認は胃粘膜及び腹壁脂肪の生検、アミロイド沈着が疑われる病変部位の生検により行った。判定はコンゴレッド陽性で偏光顕微鏡

下で緑色偏光を示した例をアミロイド沈着とした。FLc の測定は抗ヒト BJP-κ、λ 血清 (DAKO) を用い、また血清 L 鎖 (IgLc) の測定は抗ヒト L 鎖 κ、λ 血清 (デイドペーリング) を用いてネフェロメトリー法で行った。尚これらの検査は全て患者の同意の元に行った。

C. 結果

κ MM における free κ 及び λ MM における free λ の平均値はそれぞれ amyloid 沈着例で 7.7 ± 6.3 mg/dl と 50.6 ± 54.9 mg/dl、非沈着例で 9.8 ± 9.3 mg/dl と 48.4 ± 79.4 mg/dl であり、いずれも λ MM における free λ が高い値を示した。MM の治療効果が上がると M 蛋白が減少することは当然であるが、それに伴い free L 鎖も減少する傾向にある。(図 1) そこで治療効果が安定する罹病期間 12 ヶ月以降とそれ未満に分けて検討してみると、λ MM 罹病期間 12 ヶ月以上の例において amyloid 沈着例は有意に free λ が高かった。(平均値

36.9 ± 46.2mg/dl vs 14.1 ± 10.0mg/dl) (図 2) λMM 12 ヶ月未満では有意差を認めず、また κ においては罹病期間 12 ヶ月未満及び 12 ヶ月以上とも有意差を認めなかった。

λMM における IgLc と FLc との間には罹病期間 12 ヶ月未満においても、また 12 ヶ月以上でも明らかな相関はない。また尿中 BJP の有無は MM 病初期の例においては free λ 値に差を認め、罹病期間 12 ヶ月未満のアミロイド沈着例は全例尿中 BJP 陽性であったが、罹病期間 12 ヶ月以上では差はなく amyloid 沈着との関連も認めない。(図 3) 次に無治療である cs1MM 患者に限定して検討した。κMM については amyloid 沈着と FLc に関連を認めなかったが、λMM についてはやはり罹病期間 12 ヶ月以上において amyloid 沈着例は free λ が有意に高かった (22.3 ± 8.1 mg/dl vs 11.3 ± 3.6 mg/dl)。(図 4)

D. 考案

従来 MM に伴うアミロイドーシスは約 10% 程度と考えられていたが、我々はより高頻度に (約 30%) にアミロイド沈着が認められることを示してきた。そしてその臨床経過は様々であるがおおよそ以下の 3 つに分けられる。1. アミロイド沈着を認めるが長期にわたり明らかな症状を顕わさない。2. MM 経過中ある時期より急激にアミロイド症を発症する。3. MM 病初期より急激にアミロイド症が進行する。さらに病変部位も一様でなく発症部位により予後は大きく左右される。このように複雑な病態をとる MM 関連アミロイドーシスにおいてアミロイドーシス発症の危険因子を明かにし high risk group を同定できれば、治療においてもより積極的なアプローチが可能となる。今回検討した血中 free L 鎖の定量においては MM BJ 蛋白の患者特異性が強いいため、使用する抗血清により測定値に差がでる可能性

があり議論の余地がある。しかし臨床の場で有用な危険因子を検討する目的から、一般病院で検査可能な方法を選択した。

κMM において free κ はアミロイド沈着例、非沈着例とも病初期を除いていずれも低値であり差を認めなかった。一方 λMM において罹病期間 12 ヶ月未満では病初期よりアミロイド沈着を認める例と非沈着例とで free λ 値に差を認めなかったが、罹病期間 12 ヶ月以上のアミロイド沈着例で free λ が有意に高かった。また無治療の cs1 λMM においても同様の結果であった。その境界はおおよそ 18mg/dl であり血中にそれ以上の濃度で長期間 free λ が存在することがアミロイド沈着の一要因である可能性が高い。これらの症例はアミロイドの沈着を認めるものの無症状であり MM の臨床経過とあわせ今後の観察が必要である。

λMM において病初期よりアミロイドの沈着を認めた例はいずれも尿中 BJP 陽性例であり free λ は極めて高値であった (80.0 ± 65.0mg/dl)。一方陰性例は free λ も比較的 low 値 (17.5 ± 10.4mg/dl) でありアミロイド沈着を認めなかった。しかし罹病期間 12 ヶ月以上のアミロイド沈着例には尿中 BJP 陰性例が多く含まれる。これらの症例の free λ 平均値は 25.6 ± 15.3mg/dl であり、尿免疫電気泳動で BJP が明らかでない例にも血中に高濃度の free λ が存在することは注目すべきである。

今回の検討で κMM の free κ 値は λMM の free λ 値に比べ全体に低値であった。しかし κMM の 60% は cs2 以上であり対象症例による差であるとは思われない。また一部症例については尿中の free κ を測定したところかなり高値例もあり高血清の感度の問題とも考えにくい。Sølling らは血中 FLc の dimer/monomer 比の検討で、少数例であるが localized amyloidosis においてこの比が高く特に free λ で

dimeric form が多いことを示した¹⁾。また血中 FLc の monomer はλ型よりκ型が多く腎より排泄されやすいとしている²⁾。κ MM では free κ の多くが尿中に排泄され血中に残存しにくく、そして血中での FLc の存在形態及び濃度の差がλ type MM にアミロイドーシスがより多くが発症する要因かもしれない。この点について今後さらに検討したい。

E. 結論

κ MM において血中 free κ は全体に低値でアミロイドーシスとの関連は認めなかった。しかしλ MM においては血中 free λ 高値例にアミロイドーシスが発症すると考えられ、free λ 高値はλ MM におけるアミロイドーシス合併の危険因子である。

文献

1) S φ lling, J ; Free light chains of immunoglobulins in amyloidosis. Acta Med Scand ,206 ; 283-287,1979

2) S φ lling,K; Free light chains of immunoglobulins in normal serum and urine determined by radioim -munoassay. Scand J Clin Lab Invest , 35 ; 407-412, 1975

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 多発性骨髄腫に伴うアミロイドーシスの臨床的検討 厚生省特定疾患 代謝系疾患調査研究班 アミロイドーシス分科会 1997 年度研究報告書. 1998

2) 多発性骨髄腫に伴うアミロイドーシスの臨床的検討 —アミロイドーシス合併の危険因子— 厚生省特定疾患 代謝系疾患調査研究班 アミロイドーシス分科会 1998 年度研究報告書. 1999

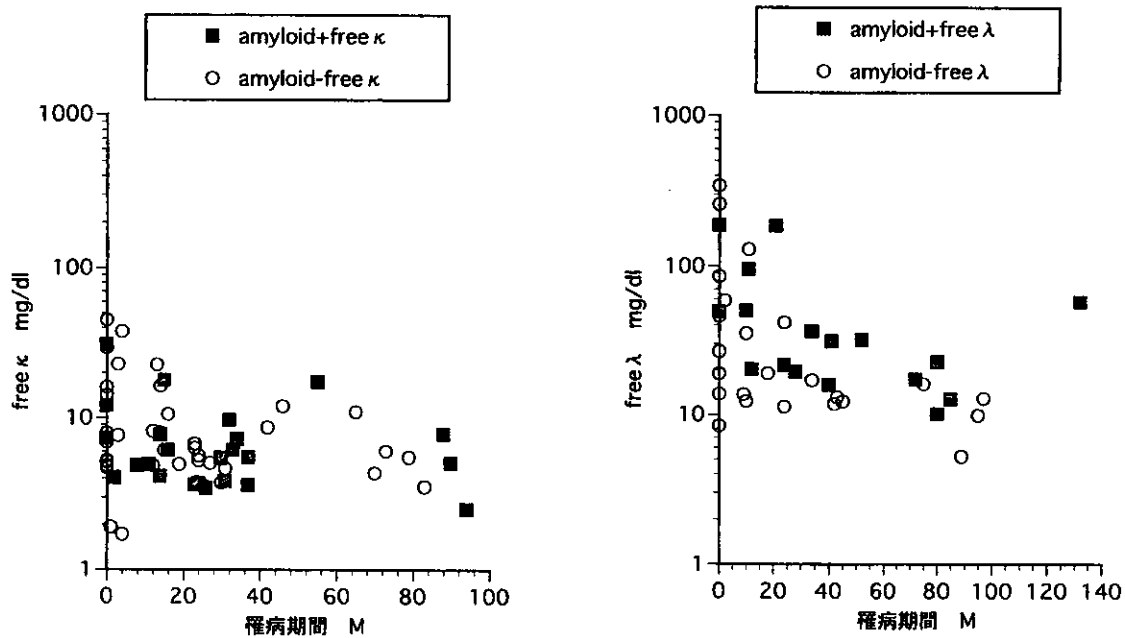


図1.MMにおけるamyloid freeL鎖と罹病期間

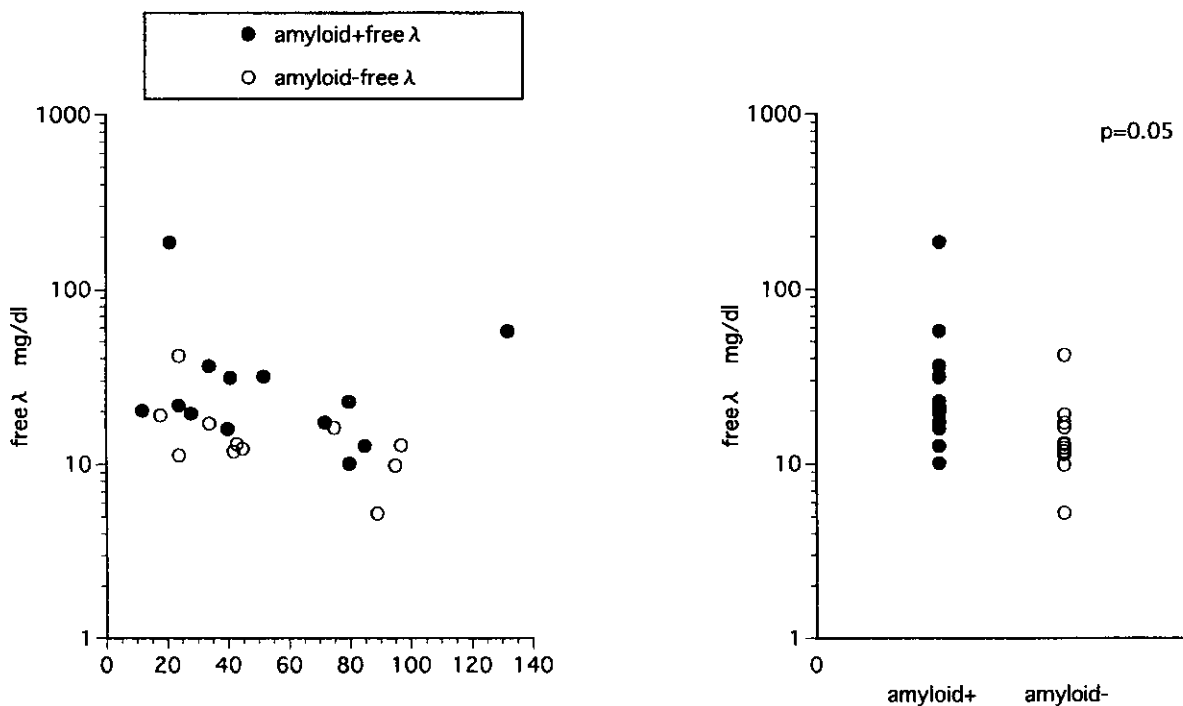


図2.罹病期間>12M MM患者における血中free λとamyloid

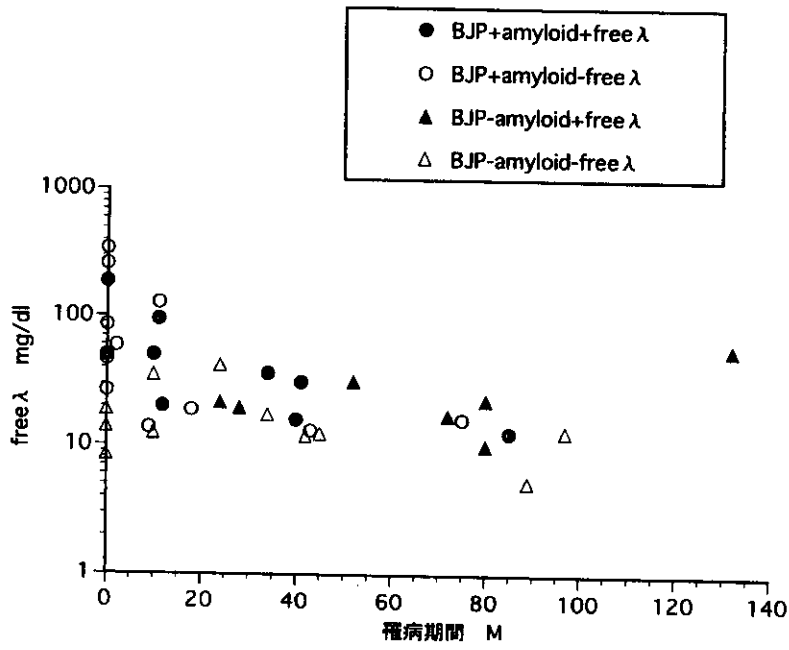


図3.尿中BJPの有無と血中free λ

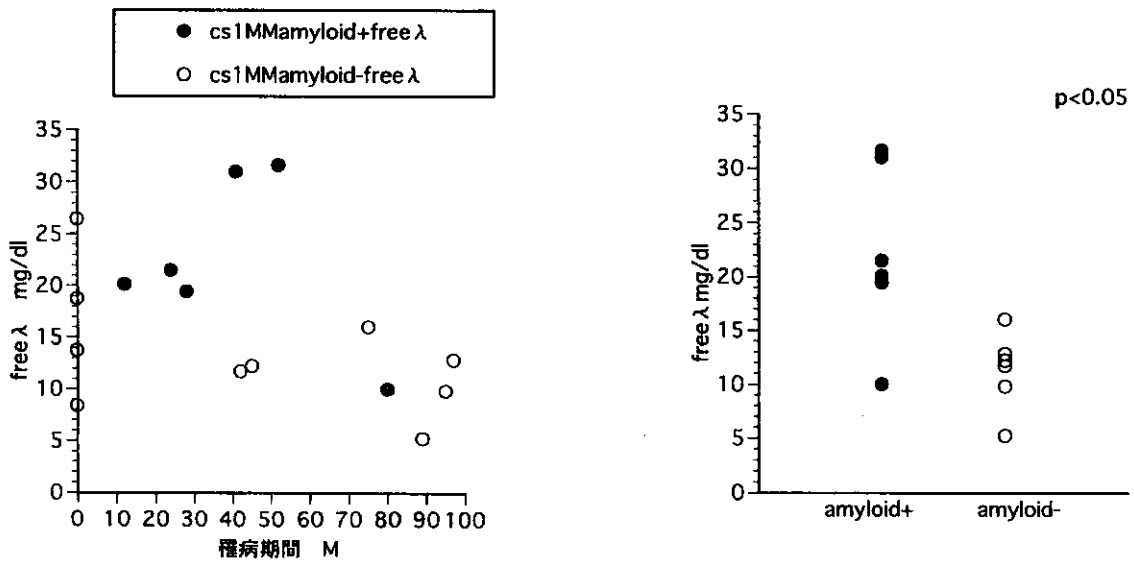


図4.cs1MM患者におけるfree λ と amyloid

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 アミロイドーシスに対する新しい 治療法としての遺伝子治療法の開発

分担研究者 今井浩三 札幌医大第一内科 教授

研究要旨 AL アミロイドーシスの治療には、異常形質細胞クローンに対する化学療法が主に行われている。最近、末梢血幹細胞移植を併用した大量化学療法も試みられているが、その治療成績は十分とは言えない。我々は現在、アミロイド原性 L 鎖そのものに対する特異的治療の開発を目指している。今回は、骨髓腫細胞株や、多発性骨髄腫患者の臨牀材料を用いて、PCR 法による簡便な単クローン性 L 鎖のクローニングを試みた。骨髓腫細胞株 RPMI8226 から total RNA を抽出し、λ 鎖の V 領域に対応したプライマーを用いて RT-PCR を行った。約 330bp のバンドがみられ、シークエンスの結果、λ 鎖 V 領域のものと確認された。同様に多発性骨髄腫患者 (IgG, λ 型) の骨髓液より RNA を抽出して、RT-PCR を行った。増幅産物をサブクローニングして、5 個のクローンについてシークエンスしたところ、うち 3 個の配列が一致しており、単クローン性 L 鎖に相当すると思われた。このように PCR 法を用いて、骨髓腫患者の骨髓液から、単クローン性 L 鎖の V 領域一次構造を決定することが可能であった。クローン化した L 鎖 V 領域を用いたアンチセンス DNA の導入などを検討中である。

A. 研究目的

AL アミロイドーシスの予後は不良で、平均生存期間は約 13 ヶ月といわれている¹⁾。AL アミロイドに対する治療には、大まかに i) アミロイド原性 L 鎖を産生する形質細胞クローンに対する治療、ii) 沈着したアミロイドの吸収を促進する治療、が考えられる。従来の Melphalan と Prednisolone の併用療法は前者を目指すものだが、その平均生存期間は 17 ヶ月程度であった²⁾。後者を期待するものとして、4'-Iodo-4'-Deoxydoxorubicin (I-DOX)³⁾ の AL アミロイドーシス患者への投与が行われているが、単独投与では予後を改善しえないと報告されている⁴⁾。最近、前者

を強化する目的で、造血幹細胞移植を併用した大量化学療法も行われている。Melphalan 大量療法と末梢血幹細胞移植を組み合わせを行った報告⁵⁾では、完全寛解 (M 蛋白消失と骨髓内形質細胞 5% 未満) が 62% で、平均観察期間 24 ヶ月において生存率 68% であった。このうちアミロイドによる臓器障害が 2 臓器以下では生存率 87%、3 臓器以上では生存率 40% であった。このように、アミロイド沈着が多臓器に進展した場合、形質細胞クローンに対する化学療法を強化しても十分な治療効果を得ることは困難である。したがって、治療成績をより改善するためには、さらに別の機序からアミロイド

原性 L 鎖の産生を抑制することが必要と思われる。我々は現在、アミロイド線維の主成分となっている単クローン性 L 鎖をクローニングして、そのアンチセンス鎖を導入して L 鎖の産生を抑制する、という方法を目指している。本研究では、Vλ鎖のうち比較的保存されている、Framework (FR) 1 と FR4 に対応したプライマーを用いて RT-PCR を行い、細胞株及び臨床材料からの単クローン性 L 鎖のクローニングを試みた。

B. 研究方法

- 1) 多発性骨髄腫の細胞株 RPMI8226, 多発性骨髄腫患者の骨髄液, 同末梢血から total RNA を抽出し, RT-PCR を行う。今回は AL amyloidosis において比較的頻度の高い, λ鎖に対応したプライマー⁶を用いた。多発性骨髄腫患者は, 79歳女性, IgG λ型, 臨床病期 stage IIIA, 骨髄中形質細胞 41.4%, 末梢血中形質細胞(-), 血中 IgG 3587.9mg/dl であった。
- 2) PCR 産物を回収した後, プラスミドベクター pGEM-T (Promega, Madison, WI) に組み込み, サブクローニングして, 塩基配列を決定した。

C. 結果および考察

- 1) 骨髄腫細胞株 RPMI8226 から抽出した total RNA を材料に RT-PCR を行い, アガロースゲル電気泳動で, 産物の確認をした。Fig.1 に示すように, Vλの増幅産物の塩基長として矛盾ない約 330 bp のバンドが得られた。対照として, ヒト免疫グロブリンの発現のない事を確認している, 胃癌細胞株 MKN45 から抽出した RNA についても同様に PCR を行ったが, バンドは見られなかった。
- 2) 骨髄腫患者の骨髄液, 及び末梢血を材料に RT-PCR を行った。1) と同様に約 330

bp のサイズのバンドが骨髄腫患者の骨髄液由来の RNA, 及び末梢血由来の RNA の両者で増幅していた (Fig.2)。

3) 上記 1) で得られた PCR 産物を回収してサブクローニングし, 塩基配列を決定した。既知のλ鎖の配列と比較すると, FR1~4, Complementary determining region (CDR) 1~3 の構造を備えたλ鎖の変領域の配列が得られた。

4) 上記 2) で得られた PCR 産物についても塩基配列を決定した。骨髄液から得た PCR 産物をサブクローニングし, 5 個のクローンについて塩基配列を調べた。何れもλ鎖の変領域の構造を示していた。このうち, 3 個の塩基配列が一致しており, 他の 2 個は互いに異なる配列を示した。配列の一致する 3 クローンは, 骨髄腫細胞の産生する Vλに相当すると思われた。同様に, 末梢血から得た PCR 産物をサブクローニングして 5 個のクローンについて塩基配列を調べた。この場合も, 3 個が一致した配列であった。一致した 3 クローンの配列は, 上記のように骨髄から得た Vλの配列とを比べると, プライマーに相当する FR1 の 5'側と FR4 の 3'側の一部を除いて完全に一致していた。以上より, 骨髄腫患者の骨髄液から, M 成分に相当する免疫グロブリン Lλ遺伝子の塩基配列, 及びアミノ酸配列の決定が可能であった。また, 末梢血を用いて同様の操作を行うことより, 同様に単クローン性 L 鎖を同定する事が可能であった。いずれも, 少量の臨床材料から比較的簡便に単クローン性 L 鎖の一次構造を決定する事ができた。

D. 結論

RT-PCR 法により, Vλ鎖のクローニングが可能であった。これにより, 少量の臨床材料で単クローン性 L 鎖の一次構造を決定することができた。現在アンチセ

ンス治療などへの応用を検討中である。

文献

1. Kyle RA, Gertz MA: Primary systemic amyloidosis: Clinical and laboratory features in 474 cases. *Semin Hematol* 32:45, 1995
2. Kyle RA, Gertz MA, Grepp PR, Witzig TE, Lust JA, Lacy MQ, Therneau TM: A trial of three regimens for primary amyloidosis: Colchicine alone, melphalan and prednisone, and melphalan, prednisone, and colchicine. *N Engl J Med* 336:1202, 1997
3. Gianni L, Bellotti V, Gianni AM, Merlini G: New drug therapy of amyloidosis: resorption of AL-type deposits with 4'-iodo-4'-deoxydoxorubicin. *Blood*, 86:855-861 1995
4. Merlini G, Anesi E, Garlini P, Perfetti V, Obici L, Ascari E, Lechuga MG, Capri G, Gianni L: Treatment of AL amyloidosis with 4'-Iodo-4'-deoxydoxorubicin: an update. *Blood* 93:1112-1113, 1999
5. Comenzo RL, Vosburgh E, Falk RH, Sanchowala V, Reisinger J, Dubrey S, Dember LM, Berk JL, Akpek G, LaValley M, O'Hara C, Arkin CF, Wright DG, Skinner M.: Dose-intensive melphalan with blood stem-cell support for the treatment of AL (Amyloid light-chain) amyloidosis: Survival and responses in 25 patients. *Blood* 91:3662-3670, 1998.
6. Songsivilai S, Bye JM, Marks JD, Hughes-Jones NC: Cloning and sequencing of human I immunoglobulin genes by the polymerase chain reaction. *Eur J Immunol* 20:2662-2666, 1990

F. 研究発表

1. 論文発表

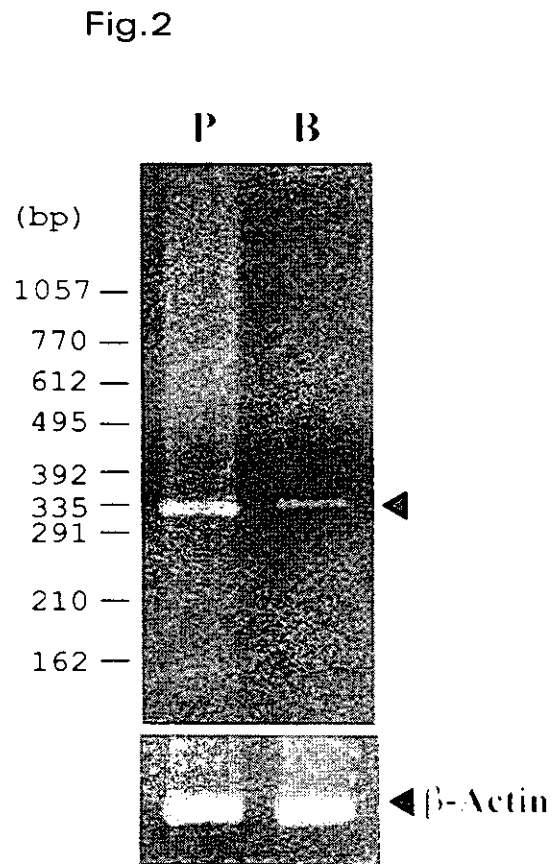
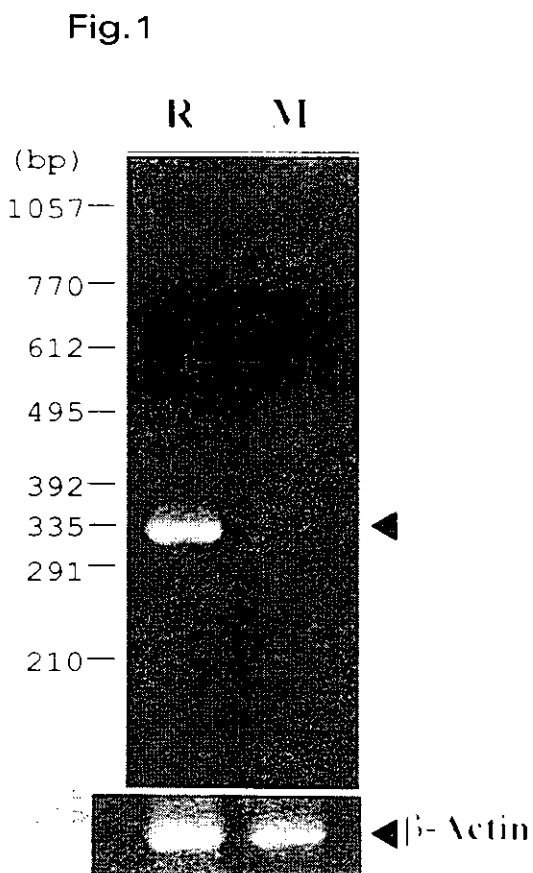
- 1) Takahashi T, Hayashi T, Minami T, Adachi M, Hinoda Y, and Imai K: Overexpression of cyclin D1 in chronic lymphoproliferation with t(11; 14)(p13; p32). *Int J Hematol* 66, 521-523, 1997.
- 2) Noto H, Takahashi T, Makiguchi Y, Hayashi T, Hinoda Y, and Imai K: Cytotoxic T lymphocytes derived from bone marrow mononuclear cells of multiple myeloma patients recognize an underglycosylated form of MUC1 mucin. *Int Immunol* 9, 791-798, 1997.
- 3) Honda S, Itoh F, Yoshimoto M, Hinoda Y, and Imai K: Changes in morphology of neuroblastoma cells treated with all-*trans* retinoic acid combined with transfer of the C-terminal region of the amyloid precursor protein. *J Clin Lab Anal* 12, 172-178, 1998.
- 4) 高橋 徹, 伊藤嘉行, 林 敏昭, 堀内志奈, 小畑俊郎, 安達正晃, 日野田祐治, 今井浩三, 柴田香織: サイクリン D1 の過剰発現を認め, 急激に白血化をきたした多発性骨髄腫. *癌の臨牀* 45, 233-236, 1999.
- 5) Honda S, Itoh F, Yoshimoto M, Ohno S, Hinoda Y, and Imai K: Association between complement regulatory protein factor H and AM34 antigen, detected in senile plaques. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* (*in press*)
- 6) Tsuzuki K, Fukatsu R, Yamaguchi H, Tateno M, Imai K, Fujii N, and Yamauchi T: Transthyretin binds amyloid β peptides, A β 1-42 and A β 1-40 to form complex in the autopsied human kidney - possible role of transthyretin for A β sequestration. *Neurosci Lett* (*in press*)

Figure 1

Ethidium bromide-stained agarose (2%) gel electrophoresis of the PCR products from cell lines. R:RPMI8226 (myeloma), B:MKN45 (gastric carcinoma).

Figure 2

Agarose gel electrophoresis of the PCR products from samples of the patient with multiple myeloma. P:peripheral blood, B:bone marrow.



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 アミロイドーシスに対するデキサメサゾン・ α -インターフェロン療法

分担研究者 山田正仁 金沢大学医学部神経内科 教授
 共同研究者 坂本昌己、入岡 隆、神田 隆、水澤英洋
 (東京医科歯科大学大学院脳神経機能病態学)
 大橋健一 (東京医科歯科大学医学部附属病院病理部)
 窪田哲朗 (東京医科歯科大学医学部附属病院保健衛生学科)

研究要旨 AL アミロイドーシスの薬物療法としてメルファラン・プレドニゾン(MP)療法が多く用いられているが、その効果は不十分で速効性に乏しい。そこで、大量デキサメサゾン・ α -インターフェロン (DEX・ α -IFN) 療法の効果を自験 AL3 症例において検討した。DEX・ α -IFN 療法は最終的な効果は十分ではなかったものの、異常蛋白を減少させ、経過中臨床症状・所見 (末梢神経障害によるしびれ、肝腫大など) を改善させた。また治療前と治療後の病理学的な比較では、症例 1 の腓腹神経の神経線維脱落は進行傾向を示したが、症例 2 の肝の単位面積あたりのアミロイド沈着は減少した。DEX・ α -IFN 療法は、MP 療法では速やかな効果が期待できない例、MP 療法の適応とならない例などに対する薬物療法として今後試される価値のある治療法と考えられる。

A. 研究目的

AL アミロイドーシスの薬物療法としてメルファラン・プレドニゾン(MP)療法が現在多く用いられているが、効果が十分ではないこと、効果発現に要する期間が長いこと、重篤な副作用など問題も多いことが報告されている^{1,2)}。

一方、すでに多発性骨髄腫の治療法として確立している大量デキサメサゾン・ α -インターフェロン (DEX・ α -IFN) 療法³⁾が AL アミロイドーシスにおいてアミロイド沈着による諸臓器症状を改善させることが報告されている⁴⁾。

そこで今回、AL アミロイドーシス自

験例において、DEX・ α -IFN 療法の効果を検討した。

B. 研究方法

AL3 例 (49 歳 男性 A λ 型、59 歳 男性 A κ 型、57 歳 女性 A κ 型) を対象とし、DEX・ α -IFN 療法を施行し、その効果を臨床的、病理学的に検討した。

DEX・ α -IFN 療法では、導入療法として 1クール 35 日(デキサメサゾン一日 40mg、4 日間パルス(第 1、第 9、第 17 日目より施行)を 3 クール施行し、導入療法終了後、維持療法として α -IFN300 から 600 万単位週 3 回皮下注射を行った。

C. 研究結果

症例 1：ポリニューロパチーを主徴とした死亡時 49 歳の男性。

46 歳時、下肢遠位部のしびれ感で発症した。ポリニューロパチー（感覚・運動及び自律神経）、洞不全症候群を認めた。血清 M 蛋白は陰性、尿中 Bene-Jones 蛋白 (BJP)- λ 型陽性、皮膚、筋、消化管の生検でアミロイド沈着(A λ 陽性)を認め、AL アミロイドーシスと診断した。洞不全症状、自律神経障害による症状と考えられた立ちくらみ、ふらつきは DDD ペースメーカーの装着にて改善した。

発症 12 ヶ月にて DEX・ α -IFN 療法を導入したところ、DEX 療法 1 クール目にて下肢のしびれはほぼ消失、尿中 BJP の陰性化が見られ、また 3 クール終了時、骨髄形質細胞は 7%から 1.5%に減少した。一方で末梢神経伝導検査、自律神経機能検査においては治療前と変化は見られなかった。

DEX 療法終了後、維持療法として α -IFN を開始し 3 ヶ月が経過した時点で、自宅で突然死した。剖検では心臓のアミロイド沈着は心内膜下に著明で、ペーシング不全または不整脈死が考えられた。

DEX・ α -IFN 療法開始前の腓腹神経生検所見と、治療後、剖検時に採取した対側の腓腹神経の所見とを比較した。治療前では腓腹神経にコンゴレッド染色においてアミロイド沈着は認められなかったが、剖検時には少量のアミロイド沈着を認めた。また、治療前では小径優位の有髄線維の脱落、無髄線維の脱落を認め、有髄線維密度は 1912/mm² であったのに対し、剖検時においては単位面積あたり 1358/mm² と治療前よりさらに減少していた。

症例 2：肝障害を主徴とした死亡時 59

歳の男性。

51 歳時、右肋骨孤立性骨髄腫の診断にて肋骨切除術をうけた。その後、経過観察されていたが骨髄腫の再発は認められなかった。

59 歳時、食欲低下、体重減少、肝機能障害、肝腫大が出現し、急速に進行した。入院前の一ヶ月間に、総ビリルビンは 3.2 から 11.6 mg/dl と急速に上昇し、入院時には著明な肝腫大（胸骨剣状突起下に 10 cm 触知）を認め、著明な胆汁うっ滞所見を示した。

単純写真、骨シンチ、ガリウムシンチ上、全身の骨病変は明らかなものは認められなかったが、骨髄形質細胞は 22%で異形性を認めた。血清 M 蛋白陰性、尿中 BJP- κ 型陽性であった。肝生検にて、Disse 腔を中心に著明なアミロイド沈着(A κ 陽性)を認めた。孤立性骨髄腫より移行した多発性骨髄腫による、肝障害を主徴とする AL アミロイドーシスと診断した。

発症 9 ヶ月にて DEX 療法を開始し、開始と共に肝腫大は急速に軽快し、総ビリルビンの低下を認め、アルカリフォスファターゼは 1775 から 702IU/L まで改善した。しかし、経過中肺炎を契機に心不全を来したため治療は 1 クールのみで中止となった。さらに感染症に伴い多臓器不全に陥り死亡した。

DEX 療法治療前の肝生検時と剖検時の肝の組織所見とを比較した。生検時、剖検時のそれぞれの肝組織について、5 切片ずつ単位面積あたりの沈着アミロイドの面積(%)を算出して統計学的に比較した所、アミロイド沈着(%)の有意な減少(43%→12%, p=0.009)が認められた。

症例 3：ネフローゼを主徴とした 57 歳女性。55 歳時、下肢のむくみ、蛋白尿にて発症した。血清 M 蛋白陰性、尿中 BJP- κ 型陽性、アミロイド沈着は A κ 陽

性でネフローゼ症候群を主徴とする AL アミロイドーシスと診断した。ネフローゼに対し PSL40mg/day、引き続き MP 療法 1クール施行したが治療効果がなかったため、発症 18ヶ月にて DEX 療法開始した。DEX 3クール施行後精神症状が出現し、ステロイド精神病と考え治療を中止した。BJP- κ の陰性化、骨髄形質細胞の減少(2.6→1.0%)を認めたがネフローゼは進行した。

D. 考察

DEX・ α -IFN 療法は多発性骨髄腫の治療としてすでに確立されており、多発性骨髄腫では MP 療法耐性例に対して DEX・ α -IFN 療法が施行されている³⁾。初回治療において DEX・ α -IFN 療法は MP 療法に比べ治療効果発現が 3~4ヶ月と早いですが、長期的には有効率・生存率は MP 療法と有意差を認めないと報告されている³⁾。初回治療例では早急な効果が必要な症例に投与すべきと考えられている³⁾。

DEX・ α -IFN 療法が、AL アミロイドーシスにおいて、M 蛋白血症ばかりでなく、消化器障害、末梢神経障害、腎障害などアミロイドーシスによる臓器障害に短期間で効果があったことが Dhodapkar ら(1997)により報告されている⁴⁾。

自検 AL3 例では、最終的な効果は十分ではなかったものの、異常蛋白の減少(BJPの陰性化、骨髄形質細胞の減少)を認め、経過中アミロイドーシスによる臨床症状・所見(末梢神経障害によるしびれ、肝腫大など)を改善させた。また治療前と治療後の病理学的な比較では、症例 1 の腓腹神経の神経線維脱落は進行傾向を示したが、症例 2 の肝の単位面積あたりのアミロイド沈着は減少していた。

Gerz らは未治療、および既に何らかの治療がなされた AL アミロイドーシスに

対して DEX 療法を実施し、MP 療法と DEX 療法には median survival の有意差はないと報告している^{5,6)}。

症例 2 のような著明な肝障害を主徴とする AL アミロイドーシス(肝アミロイドーシス)は非常に予後不良であり、median survival は 3.3 ヶ月と報告されている⁷⁾。症例 2 において、DEX 療法開始後、短期間で肝アミロイドーシスの臨床所見が改善し、また、組織学的にも肝に沈着したアミロイドの減少が示唆されたことは特筆に値すると考えられる。

また、DEX+ α -IFN 療法の実施においては、アミロイドーシスによって全身状態が悪い患者に大量のステロイドが投与されるため、感染症や精神症状などのステロイドの副作用の出現・コントロールに十分な注意が必要である。

E. 結論

DEX・ α -IFN 療法は、MP 療法では速やかな効果が期待できない例、MP 療法の適応とならない例などに対する薬物療法として今後試される価値のある治療法と考えられる。

引用文献

- 1) Skinner M, Anderson JJ, Simms R, et al. Treatment of 100 patients with primary amyloidosis: a randomized trial of melphalan, prednisone, and colchicine versus colchicine only. *Am J Med* 100:290-298, 1996.
- 2) Kyle RA, Gertz MA, Greipp PR, et al. A trial of three regimens for primary amyloidosis: colchicine alone, melphalan and prednisone, and melphalan, prednisone, and colchicine. *N Engl J Med* 336:1202-1207, 1997.
- 3) Alexanian R, Dimopoulos MA, Delasalle K, Barlogie B. Primary dexamethasone treatment of multiple myeloma. *Blood*

80:887-890, 1992.

4) Dodapkar MV, Jagannash S, Vessole D, et al. Treatment of AL amyloidosis with dexamethasone plus alpha interferon. *Leukemia Lymphoma* 27:351-356, 1997.

5) Gerz MA, Lacy MQ, Lust JA, et al. Phase II trial of high dose dexamethasone for untreated patients with primary systemic amyloidosis. *Medical Oncol* 16:104-109, 1999.

6) Gerz MA, Lacy MQ, Lust JA, et al. Phase II trial of high dose dexamethasone for previously treated immunoglobulin light-chain amyloidosis. *Am J Hematol* 61:115-119, 1999.

7) Gerz MA, Kyle RA. Hepatic amyloidosis (primary [AL], immunoglobulin light chain): the natural history in 80 patients. *Am J Med* 85:73-89, 1988.

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Yamada M, Tomimitsu H, Yokota T, Tomi H, Sunohara N, Mukoyama M, Itoh Y, Suematsu N, Otomo E, Okeda R, Matsushita M, Mizusawa H. Involvement of the spinal posterior horn in Gerstmann-Strussler-Scheinker's disease (PrP P102L). *Neurology* 52:260-265, 1999.

2) Sodeyama N, Ishida K, Jaekle KA, Zhang L, Azuma A, Yamada M, Mizusawa H, Wada Y. Epitope mapping of Hu antigen in paraneoplastic encephalomyelitis and sensory neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 66:97-99, 1999.

3) Sodeyama N, Yamada M, Itoh Y, Suematsu N, Matsushita M, Otomo E, Mizusawa H. Lack of genetic associations of $\alpha 1$ -antichymotrypsin polymorphism with Alzheimer type neuropathological changes or sporadic Alzheimer's disease. *Dement*

Geriatr Cog Disord 10:221-225, 1999.

4) Tsunemi T, Yokota T, Kikyo H, Yamamoto M, Yamada M, Kobayashi T, Mizusawa H. Nonsystemic vasculitic neuropathy presenting with truncal segmental sensory disturbance and hyperhidrosis. *Muscle Nerve* 22:646-647, 1999.

5) Yamada M, Nonaka A, Kamata T, Furuya T, Mizusawa H. A sporadic case of late-onset familial amyloid polyneuropathy with Bence-Jones proteinuria. *J Neurol* 246:726-727, 1999.

6) Yamada M, Itoh Y, Inaba A, Wada Y, Takashima M, Satoh S, Kamata T, Okeda R, Kayano T, Suematsu N, Kitamoto T, Otomo E, Matsushita M, Mizusawa H. An inherited prion disease with PrP P105L mutation: clinicopathological and PrP heterogeneity. *Neurology* 53:181-188, 1999.

7) Toru S, Yokota T, Inaba A, Yamawaki M, Yamada M, Hayashi M, Mizusawa H. Sympathetic postganglionic fiber dysfunction caused by vitamin B12 deficiency. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 66:804-805, 1999.

8) Itoh Y, Yamada M, Sodeyama N, Suematsu N, Matsushita M, Otomo E, Mizusawa H. Atherosclerosis is not implicated in association of apolipoprotein E e4 with Alzheimer's disease. *Neurology* 53:236-237, 1999.

9) Sodeyama N, Yamada M, Itoh Y, Suematsu N, Matsushita M, Otomo E, Mizusawa H. Association between butyrylcholinesterase K variant and the Alzheimer type neuropathological changes in the apolipoprotein E e4 carriers over 75 years. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 67:693-694, 1999.

10) Sodeyama N, Yamada M, Itoh Y, Suematsu N, Matsushita Y, Otomo E, Mizusawa H. No association of paraoxonase

gene polymorphism with atherosclerosis or Alzheimer's disease. *Neurology* 53:1146-1148, 1999.

11) Yamada M, Sodeyama N, Itoh Y, Suematsu N, Otomo E, Matsushita M, Mizusawa H. A deletion polymorphism of a2-macroglobulin gene and cerebral amyloid angiopathy. *Stroke* 30:2277-2279, 1999.

12) Sodeyama N, Yamada M, Itoh Y, Suematsu N, Matsushita Y, Otomo E, Mizusawa H. a2-macroglobulin polymorphism is not associated with AD or AD type neuropathology in Japanese. *Neurology* 54:443-446, 2000.

13) Yamada M. Cerebral amyloid angiopathy: an overview. *Neuropathology* 20:1-15, 2000.

14) 岩崎 靖、曾根美恵、加藤武志、吉田英治、印東利勝、吉田真理、橋詰良夫、山田正仁：プリオン蛋白遺伝子 codon 180 の点変異と異なるアシル上に codon 129 の多型を伴った Creutzfeldt-Jakob 病の臨床病理学的特徴。臨床神経 39:800-806, 1999.

15) 山田正仁：老化・老年病をめぐる最近のトピックス：神経疾患。老化と疾患 12:25-29, 1999.

16) 山田正仁：脳血管障害を起こす各種疾患と病態：アミロイド・アンギオパチー。Clin Pharmacotherapy 5:145-151, 1999.

17) 山田正仁：インフォームドコンセントの実際 - 患者への説明のポイント：プリオン病。内科 83:1385-1388, 1999.

18) 山田正仁：神経原線維変化型老年痴呆(辺縁系神経原線維変化痴呆)。Clin Neurosci 17:901-903, 1999.

2. 学会発表

1) Yamada M, Itoh Y, Sodeyama N, Suematsu N, Matsushita M, Otomo E, Mizusawa H. Senile dementia of the

neurofibrillary tangle type: a clinicopathological and molecular genetic study. The International Symposium on Dementia, Kobe, Japan, September, 1999.

2) 山田正仁、袖山信幸、伊藤嘉憲、末松直美、大友英一、松下正明、水澤英洋。脳アミロイドアンギオパチーの遺伝的危険因子。第 24 回日本脳卒中会総会。横浜。1999 年 4 月 21 日。

3) 伊藤嘉憲、山田正仁、袖山信幸、水澤英洋、末松直美、松下正明、大友英一。アポリポ蛋白 E e4 を有しながらアルツハイマー型痴呆を発症しなかった高齢者剖検例の臨床的背景。第 40 回日本神経学会総会。東京。1999 年 5 月 19 日。

4) 鎌田智幸、山田正仁、水澤英洋、勝部憲一。Wnt ノックアウトマウスおよび Splotch マウスにおける神経蓋板関連遺伝子 R-spondin の発現について。第 40 回日本神経学会総会。東京。1999 年 5 月 19 日。

5) 前田淳子、伊藤嘉憲、吉田亮一、大友英一、末松直美、山田正仁、水澤英洋。びまん性レビー小体病の神経症候の臨床的解析。第 40 回日本神経学会総会。東京。1999 年 5 月 20 日。

6) 袖山信幸、山田正仁、水澤英洋、伊藤嘉憲、末松直美、大友英一、松下正明。Butyrylcholinesterase K variant と孤発性 Alzheimer 病および Alzheimer 型神経病理変化の関連。第 40 回日本神経学会総会。東京。1999 年 5 月 20 日。

7) 入岡 隆、山脇正永、三浦義治、叶内匡、神田 隆、山田正仁、水澤英洋：Acute sensory neuropathy の臨床的・免疫学的特徴および治療についての検討。第 40 回日本神経学会総会。東京。1999 年 5 月 20 日。

8) 山田正仁、稲葉 彰、和田義明、高島実、佐藤志津子、鎌田智幸、水澤英洋、桶田理喜、茅野照雄、伊藤嘉憲、末松直

美、大友英一、松下正明、北本哲之。プリオン蛋白(PrP)遺伝子コドン 105 変異に伴う遺伝性プリオン病：臨床病理学的表現型および PrP の多様性。第 40 回日本神経学会総会。東京。1999 年 5 月 21 日。

9) 石橋 哲、横田隆徳、山田正仁、水澤英洋、塩尻俊明。分節性発汗過多に対する塩酸メキシレチン経口投与による治療効果の検討。第 40 回日本神経学会総会。東京。1999 年 5 月 21 日。

10) 坂本昌己、山田正仁、入岡 隆、原 健、神田 隆、水澤英洋。AL アミロイドーシスに伴うニューロパチー：I 型(TTR Met30)との比較。第 40 回日本神経学会総会。東京。1999 年 5 月 21 日。

11) 谷沢 徹、桶田理喜、山田正仁、井上千秋、叶内 匡、横田隆徳、水澤英洋。25 年を経過した HTLV-1 関連脊髄症(HAM/TSP)の一部検例。第 40 回日本神経病理学会。横浜。1999 年 6 月 3 日。

12) 末松直美、大友英一、山田正仁。Lewy 小体を伴う痴呆とパーキンソン病との形態学的異同。剖検脳における ubiquitin 陽性物の分布パターンから。第 40 回日本神経病理学会。横浜。1999 年 6 月 4 日。

13) 山田正仁、袖山信幸、伊藤嘉憲、末松直美、大友英一、松下正明、水澤英洋。

Butyrylcholinesterase K variant と脳アミロイドアンギオパチーとの関連。第 40 回日本神経病理学会。横浜。1999 年 6 月 5 日。

14) 山田正仁、伊藤嘉憲、白石 淳、稲葉 彰、和田義明、高島 実、佐藤志津子、鎌田智幸、桶田理喜、茅野照雄、末松直美、高橋真冬、綿引定清、北本哲之、大友英一、松下正明、水澤英洋。プリオン蛋白(PrP)遺伝子コドン 105 変異に伴う遺伝性プリオン病の 2 家系：臨床病理学的表現型、PrP 遺伝子型、脳 PrP の解析。第 3 回日本神経ウイルス研究会。仙台。1999 年 7 月 17 日。

15) 山田正仁。神経原線維変化型老年痴呆。第 13 回老年期痴呆研究会。東京。1999 年 7 月 24 日。

16) 山田正仁、伊藤嘉憲、袖山信幸、末松直美、大友英一、松下正明、水澤英洋。神経原線維変化型老年痴呆に関する研究：海馬領域病変およびタウ遺伝子の検討。第 18 回日本痴呆学会。熊本。1999 年 10 月 8 日。

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

アミロイド蛋白前駆体への変異型 プレセニリン1の作用に関する研究

分担研究者 森 啓 大阪市立大学医学部教授

研究の要旨 アルツハイマー病における老人斑を形成するアミロイド蛋白の生成・脳内沈着機序は重要な病因の解明に繋がることが考えられている。本研究では、原因遺伝子の1つであるヒト型プレセニリン1を導入した神経系培養細胞を用いてアミロイド蛋白の成因を調査検討することにした。その結果、プレセニリン1の変異効果は細胞内発現量を高進する可能性があることを示すことができた。

A. 研究目的

<目的>アルツハイマー病脳では、化学的に凝集しやすく、アミロイド線維化しやすいA β 42が量的に増加し、沈着初期の主要成分であることが明らかにされている。この分子種が脳内で増加することがアルツハイマー病の病因と密接に関与していると考えられている。最近になり、遺伝性(家族性)アルツハイマー病の原因遺伝子産物がプレセニリンであることが明らかにされ、その突然変異も脳内のA β 42を増加させることが報告された。これらのことから、A β 42の増加をもたらす代謝機序の解明が、アルツハイマー病の予防、治療法の確立に必須であると考えられている。アルツハイマー病(AD)原因遺伝子産物プレセニリン1(PS1)はアミロイド前駆体タンパク質(APP)代謝に関与し、A β 産生を制御していることが知られている。最近、PS1はAPPをはじめとするタンパク輸送系に関与するという報告がなされている一方、PS1は γ 分泌酵素そのものであるという報告もなされ、APPC末断片の輸送に関与して

いるのか、あるいは直接代謝に関与しているのか不明である。我々はこれまでPS1とAPP代謝との関連性を解析し、突然変異PS1を発現するPC12D細胞で、APPC末断片の増加傾向が見られることを見出した。平成11年度の研究ではヒトPS1および突然変異型PS1を安定的に発現するPC12D細胞を用いて、PS1とAPPC末断片の細胞内の分布、量的な関係等を解析し、PS1がAPPC末断片の代謝にどのように関与するのか検討した。

B. 研究方法

(1) ヒトPS1および突然変異PS1(A260V)を安定的に発現するPC12D細胞は、これらの遺伝子とヒト遺伝子の野生型APP695をリポフェクチン法によって導入したあと抗生物質であるG418(ネオマイシン)耐性を指標に選択した。PC12D系の細胞は5%非動化胎児ウシ血清、5%ウマ血清を含むDMEM培地中で経代培養した細胞を0.25M sucrose溶液でホモゲナイズした後、1,000 x gの遠心上清をさらに遠心し、5,000 x g沈殿画分(P2a)、8,000 x g沈

殿画分(P2b)、100,000 x g沈殿画分(P3)に分画した。

(2) それぞれの膜画分に含まれるAPPおよびAPPC末断片はRIPA緩衝液(22mMリン酸,緩衝液pH7.5, 500mM塩化ナトリウム, 0.1% SDS, 1% NP-40, 0.5% デオキシコール酸ナトリウム, 0.02% NaN₃)で処理後、再度高速遠心処理をした上清を膜蛋白画分として得た。

(3) ヒトPS1および突然変異PS1 (A260V)を安定的に発現するPC12D細胞および野生型PC12D細胞を用いて、細胞内での γ 分泌酵素活性(A β 40およびA β 42)をドットプロットにより定量測定した。

(4) イムノプロットイングは対象試料を2-メルカプトエタノールを含んだSDSサンプルバッファー中で溶解した後、5分間熱処理をした。プレセニン1を解析する場合には、37°Cにて加温処理した。処理したサンプルを10%のポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、150mA定電流で2時間PVDF膜に転写した。転写した膜は、3%スキムミルクと1%ウシ血清アルブミンを含んだトリス緩衝液(50mM Tris-HCl, pH 7.6, 150mM NaCl)で室温1時間ブロッキングを行い、トリス緩衝液で希釈した一次抗体で室温3時間反応させた後、1000倍希釈したビオチン化2次抗体(抗マウスIgG(免疫生物研究所)あるいは抗ラビットIgG(Vector labs., Burlingame, CA)で室温1時間反応させた。トリス緩衝液で洗浄後、アビチン-ビオチン複合体(Vector labs.)に室温30分間反応させ、4-クロロ-1-ナフトールもしくはECLキット(Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK)を用いて発色させた。タンパク染色には、転写された膜をCBB色素で染色した。また、プロット結果の定量解析にNIH imagingソフトを用いた。蛋白定量はBCA蛋白定量キット(Pierce社)を用いた。

C. 研究結果

(1) PS1およびPS1A260Vを安定的に発現するPC12D細胞および野生型PC12D細胞において、PS1およびPS1A260Vと α および β 分泌酵素による切断活性との間の関連性は見出せなかった(図1)。

(2) PS1およびPS1A260Vを安定的に発現するPC12D細胞では、野生型PC12D細胞に比べAPPCTFの量が若干増加していた(図2)。突然変異の有無での差は見られなかった(図3)。

(3) PS1およびPS1A260Vを安定的に発現するPC12D細胞の各膜画分におけるAPPCTFの量比を野生型のものと比べると、P2a画分に含まれるAPPCTFの量が有意に増加していた。また突然変異の有無によらず、導入されたPS1あるいはPS1A260Vの発現量の多いものほど、P2a画分にあるAPPCTFの量が増加していた。PS1は細胞内では矢印でしめした分子量28,000のPS1断片として存在する。

(4) ヒトPS1および突然変異PS1 (A260V)を安定的に発現するPC12D細胞ではドットプロットによりA β 42活性の増加が見られた(図4)が、この結果は突然変異効果というより遺伝子発現量効果であった(図5)。

D. 考察

以上の結果から導入したPS1は突然変異の有無にかかわらずPC12D細胞内でAPPCTFの分布を変化させていると考えられる。最近、PS1をノックアウトした培養細胞ではAPPCTFが増加し、 γ 分泌酵素活性が見られなくなること、PS1のアンチセンスを導入した細胞では、A β 42活性が増加すること、PS1が細胞間接着に参加し、情報伝達に密接に関与していること等の報告がなされている。本研究の結果とこれらの結果をあわせて考えると、PS1は γ 分泌酵素そのものである