

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

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

平成11年度研究報告書

平成12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

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

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

平成11年度研究報告書

平成12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	15
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
京都大医学部附属病院病理部	奥野 知子、北市 正則、山邊 博彦
浜松医大第二病理	馬場 聡
浜松医大第三内科	大野 竜三
新潟大医学部第二内科	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 アミロイド線維ならびに AL 蛋白の精製、及び電顕的・生化学的解析	25
新潟大医学部第二内科	下条 文武
福井医大第二病理	高橋 直生、長谷川 一浩、山口 格、 内木 宏延
試験管内 AL アミロイド線維伸長の反応速度論的解析	31
福井医大第二病理	内木 宏延、高橋 直生、長谷川 一浩、 山口 格
新潟大医学部第二内科	下条 文武
研究成果の刊行に関する一覧表	37

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	新潟大学医学部第二内科 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 11 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

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 内木宏延 福井医科大学病理学第二講座教授

研究要旨

全国より集積した全身性 AL アミロイドーシス剖検症例 8 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。次に、上記症例中 3 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、解析した。さらにこれらを用いて、蛍光色素チオフラビン T を用いたヒト AL アミロイド線維の分光蛍光定量法を確立し、同法により AL アミロイド線維の試験管内伸長が一次反応速度論モデル、つまりすでに存在する線維断端に、AL 蛋白が立体構造を変えながら次々に結合することにより起こるというモデルにより説明できることを明らかにした。

分担研究者

下条文武 新潟大学医学部第二内科教授
上田孝典 福井医科大学第一内科教授

A. 研究目的

全身性 AL アミロイドーシスは、日本における代表的アミロイドーシスであるが、他のアミロイドーシス同様、有効な治療法はおろか発症機構の詳細は解明されていない。われわれは本プロジェクトで、AL アミロイド線維形成・沈着機構の解明、及び沈着阻害剤開発のため、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確立を目指している。今年度は、以下の 3 項目を研究目的とした。(1) 全身性 AL アミロイドーシス剖検症例のさらなる集積を行う。(2) 上記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、電子顕微鏡を用いた形態的観察、及び Tricine-SDS-PAGE 法等による生化学的解析を行う。(3) 精製した AL アミロイド線維、及び AL 蛋白を用い、試験管内 AL

アミロイド線維伸長機構を反応速度論的に解析する。

B. 研究方法

症例の集積：

昨年度同様、全身性 AL アミロイドーシス症例の剖検があった場合、必要十分量のアミロイド沈着新鮮凍結臓器を採取・収集出来るように、全国の関連する病理医、及び臨床家に呼びかけた。

アミロイド線維、及び AL 蛋白の精製：

AL アミロイド線維は、解凍した新鮮凍結臓器から Pras 法で粗抽出後、 $10^5 \times g$ 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。単体 AL 蛋白は、精製されたアミロイド線維の一部を 6M 尿素で可溶化し、セファクリルゲルクロマトグラフィーで分子量別に分画した。得られた各画分に対し、非還元条件で Tricine-SDS-PAGE 法で電気泳動、及び抗 AL 抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った。

ALアミロイド線維分光蛍光定量法：

精製 AL アミロイド線維を、蛍光色素チオフラビン T (ThT) 溶液と混和し、極大励起・蛍光波長、及び至適 pH を分光蛍光度計を用いて測定した。

ALアミロイド線維伸長の反応速度論的解析：

ゲルクロマトグラフィーで得られた各 AL 蛋白画分を、超音波により断片化した精製 AL アミロイド線維と共に 37°C で反応させ、アミロイド線維伸長を、電子顕微鏡を用いた形態的観察、及び上記分光蛍光定量法によりモニターした。さらに、伸長反応の至適 pH、及び伸長初速度に及ぼすアミロイド線維の数濃度、あるいは AL 蛋白濃度の影響の検討も行った。

C. 研究結果

(1) 昨年度、及び今年度で松本、京都、奈良、熊本、及び浜松の 6 施設より、計 8 症例の全身性 AL アミロイドーシス剖検症例新鮮凍結臓器を集積し、臨床的、病理学的に解析した。患者は女性 7 例、男性 1 例で平均年齢は 59.8 才、λ 型 6 例、κ 型 1 例、及び現在検討中 1 例であった。血清 M 蛋白、及び尿中 BJP は、症例 2、7 を除き全例に認められた。骨髄形質細胞比率は、症例 3、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。初発症状はうっ血性心不全症状が最も多く、労作時呼吸困難（症例 2、4、6）、全身浮腫（症例 7）を認めた。症例 3、8 はネフローゼ症候群で、症例 1 は胸水貯留に伴う呼吸困難で、症例 5 は巨舌・皮膚アミロイド症で発症していた。直接死因は症例 8 を除き心アミロイドーシスを基盤としており、症例 1、2 は左房内血栓に起因した脳梗塞により、症例 2、3、5、6 は心室細動等の不整脈により、症例 4 は慢性左心不全による肺うっ血ならびに続発性肺炎により、症

例 7 はうっ血性心不全による胸水貯留、呼吸不全により死亡していた。症例 8 は腎不全により死亡していた。症例 8 を除き全例とも臨床症状を反映して心に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、8 では腎に、症例 5 では舌・皮膚に、症例 6、7、8 では脾臓に高度のアミロイド沈着を認めた。今回、上記症例のうち 3 症例（症例 2：57 歳女性、症例 3：44 歳女性、症例 6：55 歳男性、いずれも IgG-λ 型）の新鮮凍結臓器（症例 2：肺、症例 3：脾、症例 6：脾）より AL アミロイド線維、及び AL 蛋白を精製した。

(2) 上記精製法により、電子顕微鏡による観察にて、幅約 10nm の典型的アミロイド線維を得た。Tricine-SDS-PAGE 法、及び抗ヒトλ抗体によるウエスタンブロッティングの結果、3 症例の AL アミロイド線維のいずれも、ほぼ完全なλ鎖、及びそれが限定分解されて出来たサイズの異なる数種の AL 蛋白から構成されていた。

(3) ALアミロイド線維分光蛍光定量法の至適条件：

症例	極大励起・ 蛍光波長	至適 pH	Kd 値
2	440-486 nm	8.5	1.0 μM
3	450-485	8.5	0.9
6	437-488	8.5	1.5

上記至適条件下で、5 μM の ThT に対し AL アミロイド線維濃度を変化させた場合、蛍光強度は線維濃度に比例して変化し、これより AL アミロイド線維定量のための標準曲線を作成した。

(4) ALアミロイド線維伸長の反応速度論的解析：

(i) 電子顕微鏡的観察により断片化アミロイド線維の明らかな伸長を確認した。(ii) 線維伸長の至適 pH は、症例 2、3、6 でそれぞれ pH 2.5、3.5、2.0 であった。(iii) λ鎖

が限定分解されて出来た低分子量 AL 蛋白を含む画分を断片化アミロイド線維と反応させた場合、線維伸長は容易に進行した。一方、ほぼ完全な λ 鎖を含む高分子量画分と反応させた場合、伸長は相対的に起こりにくかった。(iv) 反応速度論的解析は、いずれの症例も低分子量画分を用い至適 pH で行った。いずれも反応開始後蛍光はラグタイム無く増加し、やがて平衡に達した。個々の症例により平衡に達するまでの時間は異なった。従って、反応開始後蛍光が直線的に増加する範囲で伸長初速度を求めた。この結果、1) 伸長初速度は AL アミロイド線維の数濃度に比例し、2) 重合初速度は AL 蛋白濃度に比例し、3) 各 AL 蛋白濃度での伸長初速度は、重合初速度と脱重合速度(一定)の和で表された。

(5) 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。1) 透析アミロイドーシスでは、AGE 化などの修飾を受けていない β 2-ミクログロブリンのみで構成された純粋なアミロイド線維を得る手法を確立した。同線維が中性 pH 反応液中で、オリゴマー以下まで脱重合を起こすとともに、アミロイド関連共存蛋白であるアポリポ蛋白 E がその脱重合反応を濃度依存性に抑制することを明らかにした。2) アルツハイマー病では、試験管内で A β (1-42)と A β (1-40)が共存する場合、相互作用をした上で β アミロイド線維形成を行うことを明らかにした。

D. 考察

3 症例から精製された AL アミロイド線維の生化学的解析の結果、いずれのアミロイド線維もほぼ完全な λ 鎖を含む複数の λ 鎖フラグメントから構成されていた。これは、分子量の異なる複数の λ 鎖フラグメントが、アミロイド線維形成に不可欠の共通領域を介して1本のアミロイド線維を構成することを示唆している。しかし、各分子量の λ 鎖フラグメントが、それぞれ単一な蛋白組成のアミロイド線維を形成し、全体として蛋白組成の異なるアミロイド線維の集合が組織に沈着している可能性も否定できず、さらに検討を加える必要がある。

AL アミロイド線維に結合した ThT の極大励起・蛍光波長は、これまでに解析した種々のヒト、及びマウスアミロイド線維のそれとほぼ同じであった。また Kd 値は、AL アミロイド線維の場合 0.9~1.5 μ M と症例により異なっていた。これは ThT とアミロイド線維の結合部位の立体構造が異なっているためと考えられる。

線維伸長反応は、いずれの症例でも酸性域にそのピークを認めた。興味深いことに、 β 2-ミクログロブリン関連アミロイド線維の伸長速度も、同様に酸性域(pH2.5)で最大になる(Naiki & Gejyo, Methods Enzymol 309:305-317, 1999)。AL 蛋白、 β 2-ミクログロブリンは、いずれも免疫グロブリンスーパーファミリーに属しており、これら共通のドメイン構造を持つ前駆蛋白からのアミロイド線維形成には、共通する分子機構が存在すると推定される。

低分子量 AL 蛋白画分を含む線維伸長反応は、ほぼ完全な λ 鎖を含む高分子量 AL 蛋白画分に比べ相対的に起こり易かったが、これは高分子量画分内に共存する他の分子による阻害の可能性もあり、今後さらに精製された AL 蛋白を用いた検討が必要である。

AL アミロイド線維伸長は、反応速度論

的解析により、マウス老化アミロイド線維、アルツハイマー病 β アミロイド線維、及び β 2-ミクログロブリン関連アミロイド線維同様、一次反応速度論モデル、すなわち既に存在する線維断端に、前駆蛋白であるAL蛋白が立体構造を変化させながら次々に重合することにより起こる事が証明された。

E. 結論

全国より集積した全身性ALアミロイドーシス剖検症例8症例について臨床的、及び病理学的に解析し、来年度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。次に、上記症例中3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、ThTを用いた分光蛍光定量法により、ALアミロイド線維の試験管内伸長が一次反応速度論モデルにより説明できることを明らかにした。

次年度は、以下の3項目を研究目標とする。(1)重合核形成過程を含むALアミロイド線維形成の試験管内解析系を確立し、臨床例の集積により線維形成モデルを一般化する。(2)線維形成を阻害する生体分子、及び非ペプチド性重合阻害剤を探索する。

(3)AL蛋白の1次/2次構造と臨床的諸因子との相関解析を行う。

F. 研究発表

1. 論文発表

Cholesterol-dependent generation of a seeding amyloid β -protein in cell culture. Mizuno, T., Nakata, M., Naiki, H., Michikawa, M., Wang, R., Haass, C., Yanagisawa, K. **J. Biol. Chem.** 274:15110-15114, 1999

Kinetic analysis of amyloid fibril formation. Naiki, H., Gejyo, F. **Methods Enzymol.** 309:305-318, 1999

Modification of β 2-microglobulin with D-glucose or 3-deoxyglucosone inhibits $A\beta$ 2M amyloid fibril extension in vitro. Hashimoto, N., Naiki, H., Gejyo, F. **Amyloid** 6:256-264, 1999

Interaction between $A\beta$ (1-42) and $A\beta$ (1-40) in Alzheimer's β -amyloid fibril formation in vitro. Hasegawa, K., Yamaguchi, I., Omata, S., Gejyo, F., Naiki, H. **Biochemistry** 38:15514-15521, 1999

2. 学会発表

長谷川一浩、小俣三郎、内木宏延：アルツハイマー病 β アミロイド線維の試験管内伸長反応における β ペプチド1-42と1-40の相互作用の検討。第88回日本病理学会総会。1999、4月6-8日、東京。

長谷川一浩、内木宏延：アルツハイマー病 β アミロイド線維の試験管内形成反応における β ペプチド1-42と1-40の相互作用。日本基礎老化学会第22回大会。1999、6月16-18日、京都。

内木宏延：アミロイド線維形成機構の反応速度論的解析。第42回日本神経化学学会大会。1999、9月15-17日、広島。

長谷川一浩、小俣三郎、内木宏延：アルツハイマー病 β アミロイド線維の試験管内伸長反応における β ペプチド1-42と1-40の相互作用解析。第37回日本生物物理学会総会。1999、10月2-5日、和光。

内木宏延：アミロイド線維形成機構の反応速度論的解析—アルツハイマー病 β アミロイドを中心に。大阪大学蛋白質研究所セミナー タンパク質のフォールディング問題—その物理学的基礎と生物学的意義。1999、

11月25-26日、大阪.

高橋直生、長谷川一浩、山口 格、下条文武、上田孝典、内木宏延：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 II—試験管内線維伸長の反応速度論的解析—。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平成11年度研究報告会。2000、2月3-4日、東京。

山口 格、長谷川一浩、高橋直生、下条文武、内木宏延： $\beta 2$ -ミクログロブリン関連アミロイド線維 (fA β 2M) の中性 pH 反応液における脱重合反応とアポリポプロテイン E (ApoE) の fA β 2M 安定化作用。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平成11年度研究報告会。2000、2月3-4日、東京。

長谷川一浩、山口 格、下条文武、内木宏延：アルツハイマー病 β アミロイド線維の試験管内形成反応における β ペプチド 1-42 と 1-40 の相互作用。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平成11年度研究報告会。2000、2月3-4日、東京。

平成 11 年 度
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

分担研究者 上田孝典 福井医大第一内科教授

研究協力者 池田修一¹、宮川文²、弓場吉哲²、藤田葉子³、若田 泰³、
寺崎久泰⁴、安東由喜雄⁴、星井嘉信⁵、河野裕夫⁵、石原得博⁵、
奥野知子⁶、北市正則⁶、山邊博彦⁶、馬場 聡⁷、大野竜三⁸、
下条文武⁹、内木宏延¹⁰

¹信州大医学部第三内科、²天理よろづ相談所病院病理、

³京都民医連中央病院病理、⁴熊本大医学部第一内科、

⁵山口大医学部第一病理、⁶京都大医学部附属病院病理部、

⁷浜松医大第二病理、⁸浜松医大第三内科、

⁹新潟大医学部第二内科、¹⁰福井医大第二病理

研究要旨

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を確立するため、全身性 AL アミロイドーシス剖検症例を 2 年間で 8 例集積した。患者は女性 7 例、男性 1 例で平均年齢は 59.8 才、λ 型 6 例、κ 型 1 例、及び現在検討中 1 例であった。血清 M 蛋白、及び尿中 BJP は、症例 2、7 を除き全例に認められた。骨髓形質細胞比率は、症例 3、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。初発症状はうっ血性心不全症状が最も多く、労作時呼吸困難（症例 2、4、6）、全身浮腫（症例 7）を認めた。症例 3、8 はネフローゼ症候群で、症例 1 は胸水貯留に伴う呼吸困難で、症例 5 は巨舌・皮膚アミロイド症で発症していた。直接死因は症例 8 を除き心アミロイドーシスを基盤としており、症例 1、2 は左房内血栓に起因した脳梗塞により、症例 2、3、5、6 は心室細動等の不整脈により、症例 4 は慢性左心不全による肺うっ血ならびに続発性肺炎により、症例 7 はうっ血性心不全による胸水貯留、呼吸不全により死亡していた。症例 8 は腎不全により死亡していた。症例 8 を除き全例とも臨床症状を反映して心に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、8 では腎に、症例 5 では舌・皮膚に、症例 6、7、8 では脾臓に高度のアミロイド沈着を認めた。

A. 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代表例であ

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、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2年目である平成11年度は、昨年度に構築した全身性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駆使し、さらに症例を

集積することを研究目的とした。

B. 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な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、熊本、及び浜松の6施設より計8症例の新鮮凍結臓器の提供を受けている(表1)。これら8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。

C. 研究結果

まず、8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)：

臨床経過：患者は67才女性で、63才時より胸部レントゲン上異常結節陰影を、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(96/65 mmHg)、軽度の巨舌を認め、M蛋白血症(IgG- λ 型)、尿中Bence Jones蛋白(BJP)を認めた。クレアチンクリアランス、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。胸部レントゲン上大量の右

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、少量のプレドニゾロン投与により、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：(1) 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。(2) 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%↓、IgG480mg/dl↓、IgA267mg/dl、IgM64mg/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、幼若核を持つ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で壁は硬く割面に光沢を認めた。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、割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在血栓が惹起され、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/dl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 3733 mg/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。骨髄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 88/52 mmHg、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 70.5 mmHg、血清 CRP 0.25、IgG 3110 mg/dl ↑、IgA 211 mg/dl、IgM 79 mg/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 440 g 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 330/510 g 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、骨髄穿刺にて形質細胞比率の増加を認め、多発性骨髄腫に続発した 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 2280 mg/dl ↑、IgA 629 mg/dl ↑、IgM 221 mg/dl で、骨髄形質細胞比率は 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：(1) 心重量は 250 g 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。

(2) 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。(3) その他、肝(980 g)、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。

(4) 肺重量は 645/640 g 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

症例 6 (京大医学部附属病院病理部)：

臨床経過：患者は 55 歳男性で、死亡 10 か月前の 1998 年 8 月、ドックにて心電図異常を指摘された。その後は、無症状で経過。1999 年 2 月呼吸困難感が出現し、関西医科大学で心カテーテル検査を施行され、左室求心性肥大を指摘された。3 月より胸水増加と呼吸困難感増悪し、心エコー上著明な拡張能低下と尿中 BJP (λ型 M 蛋白) 陽性より、同年 4 月心アミロイドーシスと診断された。5 月 12 日京都大学第三内科へ転院時、血圧 92/63mmHg、両側肺野に湿性ラ音を認め、心収縮期雑音、両下肢浮腫、肝腫大を認めた。心胸郭比の拡大(65%)、肺うっ血、両側胸水を認め、心電図で不完全右脚ブロックを認めた。血清総蛋白 6.1g/dl、Alb 3.5 g/dl、BUN 27 ↑、Cre 1.3 ↑、γ-GTP 626IU/L ↑、ALP 1108 IU/L ↑、尿蛋白定性 3+であった。転院後、心不全に対し利尿剤・カテコラミン・血管拡張

薬を併用したが症状の改善は認められず、5 月 22 日より、心室頻拍・心房細動・洞停止に対し抗不整脈薬も使用した。6 月 2 日血圧低下・心停止を契機に腎不全・肝機能障害出現し、無尿になったため腹膜透析・血液透析を施行した。6 月 3 日ペースメーカー挿入。6 月 14 日腹壁脂肪織ならびに直腸生検を施行し、いずれもアミロイドの沈着を確認した。6 月 17 日再度心停止を来し、翌 18 日死亡した。

主要剖検所見：(1) 骨髄は正形成性で造血細胞は 3 系とも認められ、G/E はほぼ正常範囲であった。形質細胞比率は約 5%で、小増殖巣を散在性に認めた。免疫染色にて抗λ抗体陽性細胞が抗κ抗体陽性細胞に比べ有意に多く認められ、前者の胞体内には抗λ抗体陽性の硝子様沈着物を認めた。

(2) 脾重量は 252g で、白脾髄、及び赤脾髄脾索に高度のアミロイド沈着を認めた。

(3) 心重量は 426g で、高度の求心性左室肥大(左室壁厚 1.8cm)、及び両心房内に血栓を認めた。組織学的に、血管周囲、及び心筋線維間質に高度のアミロイド沈着を認めた。(4) 肝重量は 1356g で、小葉中心静脈を中心とする類洞内、及びグリソン鞘域血管壁に中等度のアミロイド沈着を認めた。毛細胆管～介在部に中等度の胆汁うっ滞を認めた。(5) 舌、副腎皮質、及び甲状腺に中等度のアミロイド沈着を認めた。

(6) 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、剖検により心室壁血管周囲、及び心筋線維間質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、洞停止、及び心室性頻拍

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うっ血性心不全・心室頻拍より循環不全を来とし、腎不全、肝不全を併発したとと考えられる。

凍結保存臓器：心、肝、脾

症例 7 (浜松医科大学第二病理・第三内科)：

臨床経過：患者は 68 才女性で、1984 年から骨髄異形成症候群の診断で経過観察されていたが、死亡約 1 年 7 ヶ月前の 1998 年 2 月に全身浮腫が出現、利尿剤が開始された。同年 10 月にも浮腫増強、及び胸水出現により利尿剤の増量がなされた。11 月より軽度の息切れと喀痰の増加を認め、12 月に自己休薬のため、体重増加、及び浮腫増強を認めた。12 月 4 日近医受診し、両側胸水、及び心胸郭比の増大を指摘され、心不全の精査加療目的に浜松医科大学第三内科に紹介入院した。心電図と心エコーの解離より拘束性心筋障害が疑われ、胃十二指腸粘膜生検、腹部脂肪組織生検よりアミロイドーシスと診断された。組織沈着アミロイドは、過マンガン酸カリウム消化試験抵抗性で、抗 AA、抗 TTR 抗体陰性であり、AL アミロイドーシスと診断された。血清 M 蛋白はわずかに疑われる程度であった。心不全は利尿剤増量でコントロールされ、MP 療法+DMSO 内服で、外来経過観察された。その後胸水貯留が認められたが、1999 年 5 月 27 日より DMSO 内服中止と利尿剤増量にて改善した。同年 6 月 12 日意識混濁を認め、6 月 14 日緊急入院時、アンモニア 158.8 と高アンモニア血症を認めた。アミノレバンで高アンモニア血症は改善した。

入院時身体所見では、貧血と第 2 肋間に心収縮期雑音を認め、血液検査にて BUN 40 mg/dl ↑、Cre 1.18 mg/dl ↑、総ビリルビン 2.4 mg/dl ↑ (間接優位)、LDH 450 ↑、GOT 43 ↑、GPT 32 ↑、ALP 438 ↑、 γ -GTP 140 ↑、血清総蛋白 6.3 g/dl、Alb 3.7 g/dl、尿蛋白定性(-)であった。その後、腹部 CT にて脾腫と脾・胃・腎シャント、心エコーにて心室壁の顆粒状変化が確認された。一時小康状態になり外泊したが、帰院時再び意識混濁出現し、DIC 発症と共に胸水増加、及び全身浮腫著明になり、利尿剤増量にも反応なく、9 月 4 日呼吸不全により死亡した。

主要剖検所見：(1) 骨髄は軽度過形成性で、形質細胞比率は 5% 程度であった。免疫染色にて κ 陽性細胞、あるいは λ 陽性細胞のいずれかが正常に比べ有意に多いとは言えず、病理組織所見からの κ ・ λ の判断は困難であった。今後、生化学的分析により判定する予定である。(2) 心重量は 505g で、両心室壁の求心性肥大を認めた。組織学的に、心筋線維束間、心内膜、弁、及び、心外膜下脂肪組織の血管壁に高度のアミロイド沈着を認めた。(3) 肝重量は 595g で、両葉とも萎縮し、肝硬変様の小結節、及び菲薄な線維性隔壁を認め、線維性隔壁及び小葉間血管壁に中等度のアミロイド沈着を認めた。(4) 脾重量は 165g で、濾胞周囲及び脾柱などに高度のアミロイド沈着を認めた。(5) 膵臓(75g)、副腎、及び腎臓(110/110g)に中等度アミロイド沈着を認めた。(6) その他、肺、皮膚、消化管等に軽度の沈着を認めた。

考察：本症例は、剖検により心に高度のア

ミロイド沈着を認め、これが生前認められたうっ血性心不全、及び呼吸不全を引き起こしたと考えられる。肝硬変と脾・胃・腎シャントに伴う高アンモニア血症が意識障害の原因になったと考えられる。直接死因として、心アミロイドーシスによるうっ血性心不全から胸水貯留を来し、呼吸不全に至ったと考えられる。

凍結保存臓器：心、肝、脾

症例 8 (浜松医科大学第二病理) :

臨床経過：患者は 85 才女性で、1995 年、M 蛋白血症(IgG-λ型)、及びネフローゼ症候群を指摘された。1998 年貧血精査で入院した際、胃粘膜生検でアミロイドーシスと診断された。1999 年より MP 療法を施行されたが、腎不全、およびうっ血性心不全が進行し、2000 年 1 月 25 日、腎不全、及びうっ血性心不全にて死亡した。

主要剖検所見：(1) 骨髄は中等度過形成性で、形質細胞比率は 5~10%程度であった。免疫染色にてλ>>κ陽性細胞であり、一部の血管周囲にλ陽性細胞の小集簇を認めた。

(2) 腎皮質のほとんど全ての糸球体にびまん性にアミロイドの沈着を認め、輸入細動脈壁、皮質~髄質小血管壁、及び髄質集合管周囲に中等度のアミロイドの沈着を認めた。(3) 脾臓では、赤脾髄脾索にびまん性にアミロイドの沈着を認めた。(4) 肝臓では、グリソン鞘血管壁、及び中心静脈壁にアミロイドの沈着を認めた。他の組織所見は、現在検索中である。

考察：本症例は、剖検により腎に高度のアミロイド沈着を認め、これがネフローゼ症候群、及び腎不全を引き起こしたと考えら

れた。直接死因は、腎不全、及びうっ血性心不全と考えられた。

凍結保存臓器：腎、脾

D. 考察

8 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 8 症例のまとめを示す。

患者は女性 7 例、男性 1 例で平均年齢は 59.8 才、λ型 6 例、κ型 1 例、及び現在検討中 1 例であった。血清 M 蛋白、及び尿中 BJP は、症例 2、7 を除き全例に認められた。骨髄形質細胞比率は、症例 3、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。初発症状はうっ血性心不全症状が最も多く、労作時呼吸困難(症例 2、4、6)、全身浮腫(症例 7)を認めた。症例 3、8 はネフローゼ症候群で、症例 1 は胸水貯留に伴う呼吸困難で、症例 5 は巨舌・皮膚アミロイド症で発症していた。直接死因は症例 8 を除き心アミロイドーシスを基盤としており、症例 1、2 は左房内血栓に起因した脳梗塞により、症例 2、3、5、6 は心室細動等の不整脈により、症例 4 は慢性左心不全による肺うっ血ならびに続発性肺炎により、症例 7 はうっ血性心不全による胸水貯留、呼吸不全により死亡していた。症例 8 は腎不全により死亡していた。症例 8 を除き全例とも臨床症状を反映して心に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、8 では腎に、症例 5 では舌・皮膚に、症例 6、7、8 では脾臓に高度のアミロイド沈着を認めた。