

型 TTR の比は 3 : 2 であった。手根管開放術で得られたアミロイドは、抗トランスサイレチン抗体に陽性であった。血清 TTR の一次構造解析ならびに遺伝子解析により、Thr60→Ala の型変異 TTR のヘテロ例であることを同定した。患者家族にも、この変異 TTR を検出した。

D. 考察

正中神経は厚く弾力に乏しい横手根靭帯と手根骨などで形成される狭い管である。その中を正中神経と腱が通る。アミロイド沈着のほか、炎症・腫瘍の圧迫で、正中神経麻痺が疼痛を伴って起こる。原発性アミロイドーシスや透析に関連したアミロイドーシスで、手根管症候群がおこることはよく知られている。本研究では TTR の遺伝子変異によりアミロイド沈着をきたし、両側性の手根管症候群をきたすことを示した。FAP の末梢神経障害は、一般に両下肢遠位部から初発することが多いが、本症例では両側正中神経障害で初発し、下肢症状は軽微であった。また FAP ではしばしば初期から心症状が前面的に現れることがあるが、本症例ではアミロイド心筋症は軽微であり、生命予後は良かった。

E. 結論

TTR 遺伝子のミスセンス変異の種類により、両側正中神経障害を呈する FAP を報告した。遺伝歴のない手根管症候群には、TTR 変異型アミロイドニューロパシーが原因となる例がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Adams D, Samuel D, Goulon-Goeau C, Nakazato M, Costa PM, Feray C, Plante V,

Ducot B, Ichai P, Lacroix C, Metral S, Bismuth H, Said G: The course and prognostic factors of familial amyloid polyneuropathy after liver transplantation. *Brain* 123: 1495-1504, 2000.

2) Saito F, Nakazato M, Akiyama H, Kitahara Y, Date Y, Horie T, Hisaki R, Imai S, Fujita H, Sato Y, Sugino K, Sakamaki T, Kinukawa N, Yagi H, Hoshii Y, Yutani C, Kanmatsuse K: A case of late onset cardiac amyloidosis with a new transthyretin variant (lysine 92). *Human Pathol.*, in press.

3) 平塚雄聡、中里雅光：アミロイドーシスとその診断・治療。総合臨床、49: 3115-3116, 2000.

4) 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。日本老年学会誌、印刷中。

5) 平塚雄聡、中里雅光：アミロイドーシス。看護のための最新医学講座 第7巻 代謝・内分泌疾患（編集：中尾一和）代謝 第三章 疾患編 C. 蛋白・アミノ酸代謝異常 中山書店

2. 学会発表

1) 中里雅光、伊達 紫、松倉 茂：軽微な末梢神経障害を呈した新たな変異トランスサイレチンによる FAP. 第41回日本神経学会総会、2000.

2) 伊達 紫、中里雅光、松倉 茂：トランスサイレチン変異による心アミロイドーシスの遺伝子解析と臨床像の特徴。第97回日本内科学会講演会、2000

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生科学研究費補助金 (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

FAP 患者に対する補助的同所性部分肝移植 (APOLT) 治療の有効性

分担研究者 池田修一 信州大学医学部第三内科
共同研究者 武井洋一、服部 健、徳田隆彦
信州大学医学部第三内科

研究要旨 従来の成人間の生体部分肝移植では、十分なグラフト容量を得ることができずに移植を断念する例がすくなく存在した。今回二名の FAP 患者の生体部分肝移植で APOLT を選択することにより、グラフト容量の問題を解決することができた。さらに二例目の APOLT に際しては、同時に進行期の肝細胞癌患者にドミノ移植を施行した。いずれの FAP 患者も、APOLT 後にグラフトが充分大きくなった時点で右葉を摘出した。血清 Met30TTR 濃度は APOLT 後は半減し、右葉摘出後には速やかに消失した。肝移植を施行した FAP 患者、ドミノ移植を受けた肝細胞癌患者ともに術後の経過は良好であった。APOLT と同時にドミノ移植の施行も可能であることが証明され、今後さらに生体部分肝移植の治療法の可能性を検討する予定である。

A. 研究目的

我々は、1993 年以来 15 名の FAP 患者に対し、生体部分肝移植を施行してきた。しかし、成人間の生体部分肝移植では、十分なグラフトを得ることができずに移植を断念する例も少なからずあった。今回、我々は補助的同所性部分肝移植 (APOLT) を施行することで、グラフト容量の問題を解決することを目的とする。

B. 方法

対象 患者①: 33 歳 FAP 女性 平成 7 年頃より胃部を中心とする上腹部の疼痛と不快感で発症。平成 9 年頃より、しばしば立ちくらみを自覚し、平成 10 年の胃内視鏡検査で大量の食物残渣を指摘。平成 11 年 1 月頃より便秘と軟便を繰り返すようになった。同年 5 月、Met30TTR 遺伝子が陽性で、同時に施行した腹壁脂肪吸引

生検でアミロイド沈着が証明され、FAP の発症が証明された。

患者①のドナー: 58 歳の実父。CT での肝容量測定によると、ドナーのグラフト肝容量は、レシピエント肝容量の 22% と小さく、従来の生体部分肝移植は困難であった。このため APOLT を前提に肝移植を施行した。

患者②: 42 歳 FAP 男性 平成 10 年から体重減少と下肢の易疲労感で発症し、平成 11 年 8 月から前脛骨部のしびれ、電撃痛を自覚し、さらに下痢も出現。平成 12 年 4 月に当院を受診し、直腸粘膜生検でアミロイド沈着を認め FAP と診断。

患者②のドナー: 44 歳の実姉。CT 上の肝容量測定では、グラフト容量はレシピエント標準肝容量の 31% であった。しかしレシピエントの体格が大きいことから、実際の移植では標準肝容量の 30% 以下と

なる危険性が大きいと考え、APOLT を念頭に生体部分肝移植を施行した。

さらに患者②では APOLT を施行した時に取り出した左葉を用いて、ドミノ移植を施行した。ドミノレシピエントは 64 歳、C 型肝炎、肝硬変から多発性の肝細胞癌の患者。1988 年から肝障害に対して内科的に治療していたが、1999 年 HCC を指摘され、TAE ならびに PEIT を施行。しかし 2000 年 1 月の時点で AFP の上昇と、その後腹水を認めており、7 月の肝動脈造影で 18 個の HCC が発見されている。しかし、他の臓器への転移もなく、ドミノ移植を希望したため、FAP ならびにドミノ移植について、十分なインフォームドコンセントを行い、ドミノ移植となった。

(倫理面への配慮) いずれの患者でも、肝移植およびドミノ移植に際して、十分なインフォームドコンセントが行われた。ドミノ移植を受ける肝細胞癌患者に対しては、アミロイドーシス発症の危険性とその症状について、十分なインフォームドコンセントを行った。その上で、信州大学倫理委員会で検討され、各々の患者について肝移植治療が承認された。

C. 結果

患者①：2000 年 2 月 15 日父親をドナーとして生体部分肝移植を施行。グラフトは予想どおり 230g と小さく、レシピエントの肝右葉を残して、移植手術を施行。APOLT 後、一ヶ月でグラフト容量は CT 上 390cm³、さらにその半月後 446cm³ と増大を認めたため、4 月 5 日に右葉摘出術となった。Total TTR に対する Met30TTR の比を経時的に追うと、APOLT により Met30TTR は術前の約半分に減少した。さらに右葉摘出後に速やかに消失した。患者は 8 月に退院し、現在は主婦として日常生活に復帰している。

患者②：9 月 5 日に肝移植を施行。ドナ

ーから取り出したグラフトの容量は予想どおり 390g と標準肝容量の 30% 弱であったため APOLT を選択した。APOLT 後の CT では、グラフトは徐々に増大し、10 月 27 日には 588cm³ まで増大した。一方で残存している右葉は CT 上低吸収域となり、脂肪化が進行した。11 月 7 日に患者の右葉を摘出したが、高度な脂肪肝を呈していた。Total TTR に対する Met30TTR の比の経時的変化は、一例目と同様に APOLT 後に Met30TTR は半減し、右葉摘出後に速やかに消失した。術後の全身状態は良好であり、2001 年 2 月に退院し、自宅療養中である。

ドミノ肝移植を施行した肝細胞癌患者（ドミノレシピエント）では、肝移植直後から Met30TTR は血清中に出現していた。ドミノレシピエントは術後経過も良好で、ドミノ移植 3 ヶ月後に退院し、在宅療養中である。

D. 考察

APOLT は患者の肝臓を左右に分割し左葉のみを摘出し、そこへグラフトを移植する治療である。従来、劇症肝炎や体質性黄疸などの治療のため、補助的に肝機能を助けるために施行されていた。FAP ではグラフトを左葉に移植し、右葉の門脈を結紮することで右葉の血流を低下させ、グラフトが増大した時点で、右葉を取り除く手術を施行する。信州大学で施行した 18 歳以上の生体部分肝移植症例は 50 例以上にのぼるが、グラフト容量は、レシピエントの標準肝容量の 30% 以上が必要である。従来の生体部分間の肝移植では、ドナーのグラフト容量が充分でないため、移植が断念される症例が少なからず認められたが、APOLT を選択することにより、ドナーのグラフト容量の問題が解決される。

Met30TTR は、APOLT 後に半減したが、

その後右葉摘出までは一定の濃度を保っていることから、残存している右葉の蛋白合成能が保たれていることを示している。将来、APOLT後に摘出した右葉を用いてのドミノ移植も検討する価値があると考えられ、その場合に右葉機能の指標としてMet30TTRの有用性が示唆される。今後さらに上に記したような、生体部分肝移植の治療法の可能性について、検討していく予定である。

E. 結論

1. FAPでは生体部分肝移植をAPOLTを施行することにより、グラフト容量の問題が解決された。2. APOLTによりMet30TTRは術前の半分となり、右葉摘出により消失した。3. APOLTと同時にドミノ移植の施行も可能であり、今後さらに生体部分肝移植の治療法の可能性を検討する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yazaki M, Takei Y, Katoh M, Ikeda S. Postmortem findings in two familial amyloidosis patients with transthyretin variant Asp38Ala. *Amyloid: Int J Exp Clin Invest* 7:270-277, 2000.
- 2) Hoshi K, Yoshida K, Nakamura A, Tada T, Tamaoka A, Ikeda S. Cessation of

cerebral hemorrhage recurrence associated with corticosteroid treatment in a patient with cerebral amyloid angiopathy.

Amyloid: Int J Exp Clin Invest 7:284-288, 2000.

3) Yazaki M, Tokuda T, Nakamura A, Higashikata T, Koyama J, Higuchi K, Harihara Y, Baba S, Kametani F, Ikeda S. Cardiac amyloid in patients with familial amyloid polyneuropathy consists of abundant wild-type transthyretin. *Biochem Biophys Res Commun* 274:702-706, 2000.

4) 池田修一. 遺伝性アミロイドーシス. 日本臨床. 領域別症候群シリーズ 29:514-523, 2000.

5) 池田修一. アミロイドーシスの診断基準・病型分類・重症度. 総合臨床 85:1498-1504, 2000.

6) 池田修一. 家族性アミロイドポリニューロパチーの発生機序と治療法. 医学のあゆみ 195:735-738, 2000.

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

2. 学会発表
なし。

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生科学研究費補助金 (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

本邦における FAP 家系の地理的分布状況とその遺伝子変異の多様性

分担研究者 池田修一 信州大学医学部第三内科

共同研究者 中里雅光*、安東由喜夫**、祖父江 元***

*宮崎医科大学第三内科、**熊本大学医学部臨床検査医学、

***名古屋大学医学部神経内科

研究要旨 本邦における FAP の報告は年々増加傾向にあるが、その実態はきちんと把握されていない。そこで本研究では国内における FAP 家系の地理的分布状況、臨床像ならに遺伝子変異の種類を明らかにすることを目的とした。方法は過去に FAP を専門的に診療研究している信州大学、宮崎医科大学、熊本大学、名古屋大学において遺伝子異常が検索された FAP を対象として上記の点を調べた。結果は Met30TTR 型 FAP 家系は熊本県荒尾市、長野県上水内群小川村の二大集積地以外に約 40 家系が全国的に存在した。これらの孤立的に存在する家系では遺伝歴が不明瞭であり、また初発年齢が 50 歳以上と高齢発症であった。Non-Met30TTR 型 FAP 家系についてはその TTR 遺伝子異常の種類は 14 種類、家系は 22 家系であり、その地理的分布もやはり全国的であった。Non-Met30TTR 型 FAP 家系の臨床像の特徴は発病早期から心アミロイドーシスの症状が目立ちやすいことである。結論としてわが国では FAP は頻度の高い疾患であり、その遺伝子異常ならびに臨床像は多彩であると言える。

A. 研究目的

家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) は長い間集積地を持って発症する地域特異性の高い疾患であると認識されて来た。しかし過去十数年の間に遺伝子診断法が多用され、本疾患の報告は年々増加傾向にある。現在 FAP の発病に関連した transthyretin (TTR) 遺伝子の異常は 80 種類以上が知られており、世界的には民族の違いを問わず本疾患の発症が確認されている。また同時にこうした遺伝子異常に対応して FAP の臨床病理像も多様なことが指摘されている。そこで本研究ではわが国で従来報告されている FAP 家系の地理的

分布状況、遺伝子変異とそれに対応する臨床病理像を検討することを目的とした。

B. 研究方法

FAP の診療研究を専門的に実施している信州大学医学部第三内科、宮崎医科大学第三内科、熊本大学医学部臨床検査医学 (第一内科)、名古屋大学医学部神経内科の四施設において過去に検索し、TTR 遺伝子の異常を明らかにした FAP を対象とした。また一部の例は剖検所見も検討した。(倫理面への配慮)

遺伝子検査においては事前にその主旨と必要性を患者さんに説明して、了承を

得てから実施した。

C. 研究結果

Met30TTR 型 FAP 家系は熊本県荒尾市と長野県上水内郡小川村の二大集積地以外に約 40 家系が全国的に存在した。二大集積地の家系では遺伝歴が濃厚であり、初発年齢は 20-40 歳代、平均 34.2 歳であったが、その他の単発家系ではいずれも家系内発症者の数が少なく（遺伝歴が不明瞭）、初発年齢は 50-80 歳代、平均 62.7 歳であった。また高齢発症者ではアミロイド心による心不全が目立つ傾向にあった。一方、過去に見い出された non-Met30TTR 遺伝子の異常は 14 種類、22 家系であり、これらの FAP 家系の地理的分布も全国的であった。また個々の家系内での発症者は 1、2 名と少なく、集積地を作ることはなかった。多発神経炎、自律神経症状は Met30TTR 型 FAP とよく類似していたが、non-Met30TTR 型の臨床的特徴は発病早期から顕著な心アミロイドーシスを伴うことであった。すなわち胸部 X 線上の心陰影の拡大、心エコー上の心筋壁の肥厚とエコー輝度の上昇が見られた。剖検所見でも心重量の増加、心筋壁の肥厚に加えて心筋層全体に高度なアミロイド沈着が存在した。また Ala38TTR 型 FAP の患者では臨床的に FAP の一般的な症状に加えて、息切れの訴えが目立った。剖検所見では肺胞壁へび慢性的のアミロイド沈着が見られ、本所見が呼吸困難の原因であると考えられた。また 114Tyr→His の例は全身の皮膚にアミロイドから成る結節を主徴としており、多発神経炎症状、自律神経症状などは目立たなかった。また 58 Leu→Arg、114Tyr→His は手根管症候群で発病しており、114Tyr→Cys は眼球の硝子体混濁を高率に伴っていた。

D. 考察

FAP は遺伝性全身性アミロイドーシス一型であり、その大部分は TTR 遺伝子の異常が原因で起る。従来、本疾患は多発神経炎と自律神経障害を主徴とする疾患として画一的な概念で捉えられていた。しかし近年遺伝子診断の導入により、以前は原発性アミロイドーシス、原因不明の多発性神経炎、特発性心筋症と診断されていた疾患の中に FAP または本疾患に関連した TTR 由来のアミロイドーシスが多く含まれていることが明らかとなった。また同時にその臨床像が多彩であり、一部の患者では心アミロイドーシスのみが前景に立つ。また中枢神経系の障害が目立つ例もあり、これらは hereditary oculoleptomeningeal amyloidosis と呼ばれている。したがって最近はこうした多彩な病態を包括する意味で hereditary transthyretin amyloidosis という用語も使われている。

こうした世界的背景を基に、わが国で見出されている FAP 家系の実態調査を行ったが、その遺伝子異常、臨床病理像ともに変異に富んでいることが判明した。今回検討した例の一部は従来 Charcot - Marie - Tooth 病、chronic inflammatory demyelinating polyradiculo - neuropathy (CIDP) などと診断されていたようである。おそらく FAP はわが国では遺伝性ニューロパチーの中で最も頻度の高い群に入ると考えられる。今後は心病変、手根管症候群などを呈する病態の中にこうした遺伝性アミロイドーシス患者がどの程度含まれているのかをより正確に調査する必要がある。

E. 結論

わが国では FAP は頻度の高い疾患であり、またその遺伝子異常と臨床病理像は変化に富んでいると言える。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yazaki M, Takei Y, Katoh M, Ikeda S. Postmortem findings in two familial amyloidosis patients with transthyretin variant Asp38Ala. *Amyloid: Int J Exp Clin Invest* 7:270-277, 2000.
- 2) Hoshi K, Yoshida K, Nakamura A, Tada T, Tamaoka A, Ikeda S. Cessation of cerebral hemorrhage recurrence associated with corticosteroid treatment in a patient with cerebral amyloid angiopathy. *Amyloid: Int J Exp Clin Invest* 7:284-288, 2000.
- 3) Yazaki M, Tokuda T, Nakamura A, Higashikata T, Koyama J, Higuchi K, Harihara Y, Baba S, Kametani F, Ikeda S. Cardiac amyloid in patients with familial amyloid polyneuropathy consists of abundant wild-type transthyretin. *Biochem Biophys*

Res Commun 274:702-706, 2000.

4) 池田修一. 遺伝性アミロイドーシス. 日本臨床. 領域別症候群シリーズ 29:514-523, 2000.

5) 池田修一. アミロイドーシスの診断基準・病型分類・重症度. *総合臨床* 85:1498-1504, 2000.

6) 池田修一. 家族性アミロイドポリニューロパチーの発生機序と治療法. *医学のあゆみ* 195:735-738, 2000.

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

2. 学会発表

なし。

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

厚生科学研究費補助金 (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

変異導入マウスを用いた遺伝性アミロイドーシス発症機構の解析

分担研究者 前田秀一郎 山梨医科大学第一生化

共同研究者 伊藤禎洋*、河野裕夫**、加藤靖子***、杉山仁視****、
久保田正春****、坂下直実*****、針谷康夫*****、大野伸一***、
神庭重信****、竹屋元裕*****、東海林幹夫*****、石原得博**
*山梨医科大学第一生化、**山口大学第一病理、
山梨医科大学第一解剖、*山梨医科大学精神神経科、
*****熊本大学第二病理、*****群馬大学神経内科

研究要旨 先に我々は、常染色体性優性の遺伝病、家族性アミロイドポリニューロパシー (Familial Amyloidotic Polyneuropathy; FAP)により近似した疾患モデルマウスの確立を目指し、標的遺伝子組換え法を用いて内在性のトランスサイレチン (*ttr*) 遺伝子に FAP の病因となる Met30 変異を持つマウス株を作製した。そこで、これらマウスでの *ttr* 遺伝子の発現やアミロイド沈着の有無を野生型マウスを対照として比較解析した。この結果、変異を導入した *ttr* 遺伝子は、正常 *ttr* 遺伝子と同様に発現していると考えられた。従ってこの方法は、種々の点変異をマウスの特定遺伝子に導入するための簡便法として有用と考えられる。また、生後 2 2～2 5 カ月齢の内在性の *ttr* 遺伝子の一方あるいは双方のアレルに Met30 変異を持つマウス各々 1 6 匹と対照野生型マウス 5 匹の種々の臓器のアミロイド沈着の有無を調べ、*ttr* 遺伝子の一方のアレルに Met30 変異を持つマウス 2 匹にのみ、心、肝、腎、胃、小腸、大腸、脾にアミロイド沈着を認めた。さらに、TTR や血清アミロイド P 成分 (SAP) が、遺伝性家族性アルツハイマー病の発症にどう関与するかを解析するために、家族性アルツハイマー病のトランスジェニックマウスモデル (APP トランスジェニックマウス) と我々が確立した無 TTR マウスあるいは無 SAP マウスとを交配させ、TTR 又は SAP 欠損 APP トランスジェニックマウスと対照野生型 APP トランスジェニックマウスとを多数確立した。

A. 研究目的

FAP では、血清蛋白質、TTR の 1 アミノ酸が置換した異型 TTR がアミロイドを形成して全身種々の臓器に沈着する。FAP の病因は、*ttr* 遺伝子上の点変異であることが明らかにされているが、発症機構は不明である。現在、FAP の治療法として、

TTR の主要産生臓器である患者の肝を切除し、正常肝を移植する方法が行なわれている。肝移植により症状の進行を止めることができ、現在、唯一の有効な治療法である。しかし、肝移植後に主要症状である神経障害がどれほど改善するかについては、今後、長期に亘る検討が必要と考えられる。

また、TTR は肝の他、脳の脈絡叢や眼の網膜などで合成されることから肝移植後に硝子体にアミロイドが沈着し、視力障害をきたす場合があること、移植は危険を伴い、ドナーの確保が難しく、多大の費用を要すること、さらに、世界で最も症例数の多い TTR Met30 に起因する FAP には有効だが、心にアミロイドが沈着する他の異型 TTR に起因する症例では、移植後に心へのアミロイド沈着が増加し続けた無効例が見出されていることなど問題点も多い。

そこで、FAP の治療法や発症を遅らせる手だてを開発するためには、実験操作の容易なマウスで疾患モデルを作り、発症に関与する因子を明らかにすることが必要と考えられる。先に我々は、FAP の病因である Met30 点変異を持つヒト *ttr* 遺伝子をマウス受精卵に注入する方法で、FAP のトランスジェニックマウスモデルを作製した。これらマウスでは、FAP 患者と同様の種々の臓器に、ヒト異型 TTR から成るアミロイドが沈着する。しかし、この方法ではマウス内在性の *ttr* 遺伝子の機能は正常のまま、FAP 患者に特徴的な末梢神経へのアミロイド沈着がなく、神経障害を認めない。

そこで本研究では、FAP により近似したモデルマウスの作製を目指す。

さらに TTR は、*in vitro* で A β アミロイドの沈着を抑制することが見出されているが、*in vivo* での証明はされていない。一方、Hsiao 博士から供与されたトランスジェニックマウスは、脳内 A β アミロイドの沈着と学習、記憶障害の双方を来すと報告されている。そこで無 TTR マウスと、この APP トランスジェニックマウスを用いて、TTR が、家族性アルツハイマー病の発症にどう関与するかを明らかにする。

B. 研究方法

1. 内在性の *ttr* 遺伝子の一方のアレルに Met30 変異を持つマウス株につき、正常

および変異 *ttr* 遺伝子由来の mRNA 量を RT-PCR 法を用いて比較する。また、内在性の *ttr* 遺伝子の一方あるいは双方のアレルに Met30 変異を持つマウス株における全 TTR mRNA 量を、ノーザンブロットハイブリダイゼーション法で野生型マウスと比較する。また、生後 22~25 カ月齢の内在性の *ttr* 遺伝子の一方あるいは双方のアレルに Met30 変異を持つマウス株におけるアミロイド沈着の有無を調べる。

2. APP トランスジェニックマウスと我々が確立した無 TTR マウスあるいは無 SAP マウスとを交配させ、TTR 又は SAP 欠損 APP トランスジェニックマウスと対照野生型 APP トランスジェニックマウスとを多数同定、飼育し、脳内 A β アミロイド沈着の開始時期や程度を、月齢を追って比較解析する。

C. 研究結果

1. 内在性の *ttr* 遺伝子の一方のアレルに Met30 変異を持つマウス株の肝及び脳由来の全 mRNA 中の正常及び変異 TTR mRNA の量比を調べるため、マウス TTR mRNA の全翻訳領域と 5'-及び 3'-非領域領域の一部を含む 476 塩基長の断片を RT-PCR 法を用いて増幅した。得られた cDNA を制限酵素 *Bal I* で切断すると、正常 mRNA 由来の断片は、388 塩基対と 88 塩基対の 2 断片に、変異 mRNA 由来の断片は、217 塩基対、171 塩基対と 88 塩基対の 3 断片に切断される。この解析結果から、肝及び脳由来の全 mRNA 中には、正常および変異 TTR mRNA がほぼ等量存在していることが明らかとなった。また、内在性の *ttr* 遺伝子の一方あるいは双方のアレルに Met30 変異を持つマウスの肝における全 TTR mRNA 量は、野生型マウスとほぼ等量であった。これらの結果から、変異を導入した *ttr* 遺伝子は、正常

ttr 遺伝子と同様に発現していると考えられる。また、生後 22~25 カ月齢の内在性の *ttr* 遺伝子の一方あるいは双方のアレルに Met30 変異を持つマウス各々 16 匹と対照野生型マウス 5 匹の種々の臓器のアミロイド沈着の有無を調べ、*ttr* 遺伝子の一方のアレルに Met30 変異を持つマウス 2 匹にのみ、心、肝、腎、胃、小腸、大腸、脾にアミロイド沈着を認めた。

2. *sap* あるいは、*ttr* 遺伝子の一方のアレルに挿入変異をもつ APP トランスジェニックマウスと *sap* あるいは、*ttr* 遺伝子の一方のアレルに挿入変異をもつマウスとの交配により、多くの仔マウスを得た。そこで現在この中から、TTR 又は SAP 欠損 APP トランスジェニックマウスと対照野生型 APP トランスジェニックマウスとを同定している。

D. 考察

1. 我々が新たに開発した標的遺伝子組換え法で点変異を導入したマウス *ttr* 遺伝子は、正常 *ttr* 遺伝子と同様に発現していた。従ってこの方法は、種々の点変異をマウスの特定遺伝子に導入するための簡便法として有用と考えられる。今後、このアミロイドの主成分を免疫組織化学的に調べる計画である。なお、先に我々は、FAP の病因となるヒト異型 TTR を合成するトランスジェニックマウス株を確立している。このマウス株でのアミロイド沈着の開始時期や程度が内在性の TTR に Met30 変異をもつマウス株と異なれば、マウスとヒトの TTR Met30 タンパク質の構造やアミロイド形成能の比較解析を進め、アミロイド形成機構を明らかにしたいと考えている。

2. 現在、TTR 又は SAP 欠損 APP トランスジェニックマウスの多くは、4 カ月齢に達している。今後これらマウスと対照野生型 APP トランスジェニックマウスとを多数同定、

飼育し、脳内 A β アミロイド沈着の開始時期や程度を、月齢を追って比較解析する計画である。

E. 結論

生後 22~25 カ月齢の内在性の *ttr* 遺伝子の一方のアレルに Met30 変異を持つマウス 16 匹中 2 匹に、心、肝、腎、胃、小腸、大腸、脾にアミロイド沈着を認めた。今後、これら内在性の TTR に Met30 変異をもつマウス株と FAP の病因となるヒト異型 TTR を合成するトランスジェニックマウス株とで、アミロイド沈着の開始時期や程度を比較解析する計画である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Maeda S, Yamamura K, Shimada, K.: (in French) Modèles des souris transgéniques avec la mutation Met 30 de la transthyréline associée à la polyneuropathie. Amyloïde familiale (in English: Mouse models of transthyretin Met 30-associated familial amyloidotic polyneuropathy). Les Amyloses. In Grateau G, Benson MD, Delpech, M. (eds.) (Paris: Medecine-Sciences Flammarion) pp145-151, 2000.
- 2) Usui I, Kawano H, Ito S, Hamada Y, Ishihara T, Maeda S: Homozygous serum amyloid P component-deficiency does not enhance regression of AA amyloid deposits. Amyloid: Int J Protein Folding Dis 8 in press
- 3) Aida K, Ikegishi Y, Chen J, Tawata M, Ito S, Maeda S, Onaya T: Disruption of aldose reductase gene (*Akr1b1*) causes defect in urinary concentrating ability and divalent cation homeostasis. Biochem Biophys Res

Commun 277(2): 281-286,2000

2. 学会発表

1) 前田秀一郎、魏 嵐、伊藤禎洋、岡田芳家、杉山仁視、丹羽政信、久保田正春、神庭重信：遺伝子改変マウスを用いたトランスサイレチンの脳神経系における機能解析。第45回日本人類遺伝学会、福岡、10月26日、2000年。

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生科学研究費補助金 (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 札幌医科大学医学部第一内科
 共同研究者 大野聡子*、吉本 満*、伊東文生*、続 佳代**
 札幌医科大学医学部、*第一内科、**同神経精神科

研究要旨 ALアミロイドーシスの単クローン性L鎖に対する治療を目指し、臨床材料からの単クローン性L鎖の同定を試みた。また、アンチセンスDNAによるL鎖産生抑制について検討した。

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、塩基配列からλ鎖V領域のものと同定された。同様に多発性骨髓腫患者(IgG、λ型)では、9クローンのうち7クローンの配列が一致しており、単クローン性L鎖の同定が可能であった。RPMI8226のVλ cDNAを基にしてアンチセンスRNA発現ベクターを構築し、細胞に導入した。導入後λ鎖の産生が低下しており、アンチセンスDNAによる抑制が示唆された。

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。治療は主として異常形質細胞クローンに対する化学療法が行われており、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ヶ月程度とされる。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[Blood 91:3662-70, 1998]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、Frame work (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。また、このようにして決定した骨髓腫細胞株RPMI8226のλ鎖V領域

の塩基配列をもとに、アンチセンス DNA を作製して培養細胞に導入し、λ鎖産生量への影響を検討した。

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、末梢血から total RNA を抽出し、RT-PCR を行った。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(表1)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 に組み込み、サブクローニングして、塩基配列を決定した。

3)RPMI8226 より上記の方法でクローニングした Vλ cDNA を、発現ベクター pCDNA3.1 に逆方向に挿入し、Vλ に対するアンチセンス RNA 発現ベクターを作製した。これを lipofection 法で培養細胞に導入した。前後で経時的にメディアウムを交換し、培養上清中のλ鎖濃度を ELISA で測定した。

C. 研究結果

1) 骨髄腫細胞株 RPMI8226 から total RNA を抽出して RT-PCR を行い、Vλ の増幅産物の塩基長として矛盾ない約 330bp のバンドを得た。回収して塩基配列を決定すると、FR1~4、CDR1~3 の構造を備えた Vλ の配列が得られた(図1)。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、バンドは認められなかった。

2) 骨髄腫患者の骨髄液、及び末梢血を材料に RT-PCR を行い、1)と同様に約 330 bp のサイズのバンドを得た。これを回収してサブクローニングした。骨髄液から得た 9

クローンについて塩基配列を決定したところ、9クローン中7クローンの配列が一致していた(図2A)。したがって、この配列が単クローン性 L 鎖に相当すると思われる。また、末梢血から得た 9クローンについて解析すると、9クローン中5クローンの配列が一致していた(図2B)。この5クローンの塩基配列は、上記で示された単クローン性 L 鎖の配列と FR1 と FR4 のプライマー部位を除いて完全に一致していた。

3)RPMI8226 の Vλ cDNA を基に作製したアンチセンス RNA 発現ベクターを、lipofection 法により培養 RPMI8226 に導入した。コントロールとして pCDNA3.1 を同様に用いた。導入前の上清中のλ鎖濃度を 100%として、その後のλ鎖濃度をプロットした(図3)。図に示すように、pCDNA3.1 群にくらべ、アンチセンス群ではλ鎖産生が抑制されていた。

D. 考察

今回の検討で、PCR 法によって簡便に、単クローン性 L 鎖を同定することが可能であることが示された。骨髄腫患者の骨髄液や末梢血などの臨床材料からも、単クローン性 L 鎖を同定することが可能であった。これによって、個々の患者毎に単クローン性 L 鎖を同定し、アンチセンス DNA を作製、導入するなどの応用が考えられる。そこで我々は、骨髄腫細胞株の Vλ cDNA を基にしてアンチセンス発現ベクターを構築し、細胞に導入してλ産生への影響を検討した。その結果、コントロールにくらべて L 鎖の産生量が減少しており、アンチセンスによるλ鎖産生の抑制が考えられた。今後はさらに、in vivo での検討や、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた治療への応用など進めてゆく予定である。

E. 結論

RT-PCR 法により、V λ 鎖のクローニングが可能であった。これにより、骨髄液や末梢血などの臨床材料で単クローン性 L 鎖の一次構造を決めることができた。また骨髄腫細胞株の L 鎖の cDNA を基にアンチセンス RNA 発現ベクターを作製し、細胞に導入したところ、L 産生の抑制が観察された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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* 55A, M265-M264, 2000.
 - 5) Tsuzuki K, Fukatsu R, Yamaguchi H, Tateno M, Imai K, Fuii 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* 280, 171-174, 2000.

2. 学会発表

- 1) 大野聡子、吉本満、石田禎夫、伊東文生、今井浩三：AL アミロイドーシスに対する遺伝子治療の開発。第 25 回 日本骨髄腫研究会総会、東京、2000 年。

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生科学研究費補助金 (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伴うニューロパチーの病態と診断： 家族性アミロイドポリニューロパチーとの比較

分担研究者 山田正仁 金沢大学医学部神経内科

共同研究者 坂本昌己*、入岡 隆*、神田隆*、水澤英洋*、大橋健一**

*東京医科歯科大学大学院脳神経機能病態学 (神経内科)、

**同 病理 (現・都立駒込病院病理)

研究要旨 ニューロパチーを初発症状とする AL アミロイドーシスは診断が遅れる傾向にある。その病態と診断のポイントを明らかにする目的で、AL5 例、FAP6 例を対象に、臨床症候、各種検査所見、アミロイド蛋白、トランスサイレチン (TTR) 遺伝子、末梢神経系病変を検討した。AL アミロイドーシスに伴うニューロパチーの病態には多様性があり、ポリニューロパチーの神経線維脱落パターンにも小径優位型と大径優位型とがみられた。FAP の病態にも多様性があり高齢発症 FAP では孤発例も多いことから、臨床的には両者の鑑別が困難な場合があった。高齢者は M 蛋白を偶発的に有する場合があり、M 蛋白陽性のアミロイドーシス孤発例であっても FAP の場合があることから、TTR の検索は必須である。AL ポリニューロパチーでは、FAP と同様に、アミロイド沈着は末梢神経近位部および神経節に優位であり、それが病態形成上中心的な役割を果たしていると考えられた。遠位部である腓腹神経の生検ではアミロイド沈着を欠く場合があり、診断上注意が必要である

A. 研究目的

AL アミロイドーシスに伴うニューロパチーについては病態の理解が不十分であり、ニューロパチーを初発症状とする場合、AL アミロイドーシスの診断が遅れる傾向にある。本研究では AL 型のニューロパチーの病態と診断のポイントを明らかにし、FAP との鑑別について検討する。

B. 研究方法

AL 5 例 (47-67 歳)、FAP 6 例 (40-71 歳) の臨床症候、各種検査所見、アミロイド蛋白、トランスサイレチン (TTR) 遺伝

子、末梢神経系病変を検討した。

C. 研究結果

(1) AL

1. AL 5 例は A κ 型 3 例、A λ 型 2 例からなり、ニューロパチーは、ポリニューロパチーが 2 例、自律神経障害 (起立性低血圧/直腸膀胱障害) が 2 例、手根管症候群が 2 例にみられた。

2. ポリニューロパチーを主徴とした 2 例には、FAP 様の解離性感覚障害と自律神経障害を示す例と、全感覚障害を示し自律神経症状を欠く例とがあった。腓腹神経生検

では、両例共に軸索変性所見を認めたが、1例はアミロイド沈着を欠き、1例は軽度の血管壁への沈着を認めるのみであった。解離性感覚障害と自律神経症状を示した例が小径線維優位の有髄線維脱落（密度 $1,912/\text{mm}^2$ ）と無髄線維の明らかな脱落（密度 $8,170/\text{mm}^2$ ）を示したのに対し、全感覚障害を示し自律神経症状を欠く例は大径線維優位の有髄線維脱落（密度 $2,184/\text{mm}^2$ ）と無髄線維が比較的良く残存する所見（密度 $18,190/\text{mm}^2$ ）を示し、臨床像の違いとよく合致していた。

3. 剖検にてポリニューロパチー2例の末梢神経系病変を系統的に観察した。解離性感覚障害と自律神経症状を呈した例では、アミロイド沈着は末梢神経の血管壁、神経内膜、神経周膜下にみられ、近位でより高度であり、遠位では軽度であった。一方、有髄線維の脱落は遠位に行くほど小径優位でより高度となった。脊髄後根神経節には中等度のアミロイド沈着を認めたが、脊髄前根および後根におけるアミロイド沈着はごく軽度であった。交感神経節に顕著なアミロイド沈着を認めた。一方、全感覚障害を呈した例では、やはり末梢神経近位部優位にアミロイド沈着を認めたが、沈着は血管壁およびその周囲にほぼ限局していた。神経節におけるアミロイド沈着も血管壁にのみみられた。

(2) FAP

1. FAP 6例はすべて TTR Met30 変異を有し、全例がポリニューロパチーを主徴とし、手根管症候群も2例にみられた。
2. 60歳未満で発症した3例がすべて家族歴を有し、ほぼ典型的な I 型 FAP の像を呈していたのに対し、発症年齢が60歳以降の高齢発症群3例では、2例は家族歴を欠き、3例とも初診時から全感覚障害を示し自律神経障害が軽かった。
3. 69歳発症の孤発例(Yamada et al. 1999) は、両足首以下の全感覚低下を示し、軽度

の便秘以外に自律神経症状はなかった。腓腹神経生検でアミロイド沈着を認め、Bence-Jones 蛋白が陽性であったことから、当初 AL アミロイドーシスが疑われた。しかし、アミロイドは免疫組織化学的に TTR 陽性で、TTR 遺伝子検索にて TTR Met30 変異を認め、最終的に FAP と診断された。

D. 考察

AL アミロイドーシスに伴うニューロパチーの病態には多様性があり、ポリニューロパチーの神経線維脱落パターンにも小径優位型と大径優位型が認められた。Yamada ら (1984) はアミロイドポリニューロパチー剖検例の末梢神経病変の検討で、神経内膜アミロイド沈着—小径有髄線維および無髄線維脱落 (I 型)、神経栄養血管アミロイド沈着—大径有髄線維脱落 (II 型)、および両者の混在 (III 型) の3種の病変を記載した。今回、腓腹神経生検における神経線維の脱落パターンは、剖検における末梢神経へのアミロイド沈着パターンの所見と同様の関連を示していた。

また、本研究において初めて、AL アミロイドーシスに伴うポリニューロパチーの末梢神経系全長に渡って、アミロイド沈着の分布を検索し得た。FAP における報告と同様に、末梢神経近位部および神経節にアミロイド沈着は強く、それが病態形成上中心的な役割を果たしていると考えられる。遠位部である腓腹神経の生検ではアミロイド沈着を欠く場合があり、診断上注意が必要である。

FAP の検討では、FAP の病態にもかなり多様性があり、特に高齢発症では孤発例も多いことから、臨床的には AL と FAP の鑑別が困難な場合がある。高齢者は M 蛋白を偶発的に有する場合があり、M 蛋白陽性のアミロイドーシス孤発例であっても FAP の例があることが本研究で示された。ニューロパチーを呈するアミロイドー

シスの全てにおいて TTR の検索は必須である。

E. 結論

1. AL アミロイドーシスに伴うニューロパチーの病態には多様性があり、ポリニューロパチーの神経線維脱落パターンにも小径優位型と大径優位型とがある。FAP の病態にも多様性があり高齢発症では孤発例も多いことから、臨床的には両者の鑑別が困難な場合がある。高齢者は M 蛋白を偶発的に有する場合があり、M 蛋白陽性のアミロイドーシス孤発例であっても FAP の可能性があり、TTR の検索が必須である。

2. AL 型ポリニューロパチーでは、FAP における報告と同様に、末梢神経近位部および神経節におけるアミロイド沈着が病態形成上中心的な役割を果たしていると考えられる。遠位部である腓腹神経生検ではアミロイド沈着を欠く場合があり、診断上注意が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Sodeyama N, Yamada M, Itoh Y, Suematsu N, Matsushita Y, Otomo E, Mizusawa H. Alpha2-macroglobulin polymorphism is not associated with AD or AD type neuropathology in Japanese. *Neurology* 54:443-446, 2000.

2) Orimo S, Ozawa E, Uematsu M, Yoshida E, Hino H, Yamada M, Okeda R, Mizusawa H. A case of Creutzfeldt-Jakob disease presenting with auditory agnosia as an initial manifestation. *Eur Neurol* 44:256-258, 2000.

3) Yamada M, Itoh Y, Sodeyama N, Suematsu N, Otomo E, Matsushita M, Mizusawa H.

Senile dementia of the neurofibrillary tangle type: a comparison with Alzheimer's disease. *Dementia Geriat Cog Disord* 12:117-126, 2001.

4) Kimura K, Nonaka A, Tashiro H, Yaginuma M, Shimokawa R, Okeda R, Yamada M. Atypical form of dural graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease: report of a postmortem case with review of the literature. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* (In Press).

5) Irioka T, Yamada M, Yamawaki M, Saito H, Mizusawa H, Miura H. Acute autonomic and sensory neuropathy after interferon alpha-2b therapy for chronic hepatitis C. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* (In Press).

2. 学会発表

1) Yamada M, Itoh Y, Shiraishi A, Inaba A, Wada Y, Okeda R, Sumematsu N, Kitamoto T, Otomo E, Matsushita M, Mizusawa H. An inherited prion disease with a PrP P105L mutation: report of two families showing clinicopathological and PrP heterogeneity. The XIVth International Congress of Neuropathology, Birmingham, UK, September, 2000. (Abstract: *Brain Pathol* 10:671, 2000)

2) Kanda T, Ohkoshi N, Hayashi M, Yamada M, Mizusawa H. Changes of unmyelinated fibers in pure autonomic failure, pandysautonomia, and acute sensory and autonomic neuropathy. The XIVth International Congress of Neuropathology, Birmingham, UK, September, 2000. (Abstract: *Brain Pathol* 10:549-550, 2000)

3) 坂本昌己、山田正仁、入岡 隆、神田隆、水澤英洋。AL アミロイドーシスに対する大量デキサメサゾン・ α -インターフェロン療法の経験。第 41 回日本神経学会総会。松本。2000 年 5 月 24-26 日。

4) 南里和紀、内海裕也、関根成郎、松村敦、向後かずさ、林 徹、豊田充康、山田

正仁。トランスサイレチン遺伝子 107Ile Val 変異を示した家族性アミロイドポリニューロパチーII 型の一例。第 41 回日本神経学会総会。松本。2000年5月24-26日。

5) 白石 淳、山田正仁、水澤英洋。プリオン蛋白(PrP)遺伝子コドン105変異に伴う Gerstmann-Straussler-Scheinker 病(GSS105)の精神症状の検討。第 41 回日本神経学会総会。松本。2000年5月24-26日。

6) 袖山信幸、山田正仁、水澤英洋、伊藤嘉憲、大友英一、末松直美、松下正明。 α 2-マクログロブリン遺伝子多型とアルツハイマー病およびアルツハイマー型病理変化との関連。第 41 回日本神経学会総会。松本。2000年5月24-26日。

7) 山田正仁、西田陽一郎、原 健、水澤英洋、下川怜子、桶田理喜、伊藤嘉憲、市岡 修、末松直美、木村京子、野中暁子、柳沼将公、北本哲之、松下正明。硬膜移植後の Creutzfeldt-Jakob 病: 中枢神経系および非神経系組織におけるプリオン蛋白の検討。第 41 回日本神経学会総会。松本。2000年5月24-26日。

8) 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の海馬病変: アルツハイマー病との比較。第 41 回日本神経病理学会学術研究会。米子。2000年6

月1-3日。

9) 神田 隆、叶内 匡、三浦義治、入岡隆、山田正仁、水澤英洋。Acute sensory and autonomic neuropathy にみられる無髄線維の病理学的変化。第 41 回日本神経病理学会学術研究会。米子。2000年6月1-3日。

10) 前島友紀、神田 隆、山田正仁、宮本和人、水谷俊雄、水澤英洋。慢性炎症性脱髄性多発根神経炎(CIDP)の1剖検例。第 41 回日本神経病理学会学術研究会。米子。2000年6月1-3日。

11) 山田正仁、伊藤嘉憲、大友英一、水澤英洋、桶田理喜、松下正明。プリオン蛋白斑の形成機序に関する検討。日本痴呆学会。かずさアカデミアパーク。2000年9月29-29日。

12) 石田和之、竹内博明、高橋良輔、吉村和法、山田正仁、水澤英洋。末梢神経障害を呈するリンパ腫患者血清の自己抗体が認識する抗原の検討。日本分子生物学会。神戸、2000年12月13-16日。

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生科学研究費補助金 (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 (第二報)

分担研究者 石原得博 山口大学医学部病理学第一講座

共同研究者 星井嘉信*、岩田隆子**、瀬戸口美保子***、河野裕夫*

山口大学医学部、*病理学第一講座、**同保健学科、

***同付属病院病理部

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について検討を行っている。今年度は抗 κ 鎖定常領域抗血清を新たに作製し、昨年度作製した抗 λ 鎖定常領域抗血清とともに、症例数を増やして検討を行った。抗 λ 鎖定常領域抗血清は 24 例中 23 例の A λ 型アミロイドーシスが陽性であったが、A κ 型アミロイドーシスはいずれも陰性であり、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 10 例中 9 例の A κ 型アミロイドーシスが陽性であったが、A λ 型アミロイドーシスはいずれも陰性であった。また本年度作製した抗 κ 鎖定常領域抗血清は賦活処理を必要とせず、アミロイド以外の線維性結合織は染まらなかった。なお、いずれの抗血清でも染まらない症例が 3 例みられたが、これらは定常領域部分をほとんどあるいは全く有していない AL アミロイドーシスの可能性が示唆される。

A. 研究目的

AL アミロイドーシスは市販の抗 L 鎖抗体では明瞭に染色されず、一般施設では免疫組織化学的診断が困難な場合がしばしばある。そこで我々は昨年度から 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について検討を行っている。昨年度作製した抗 κ 鎖定常領域抗血清は、非常に強い賦活処理が必要で、また線維性結合織も染まる難点があったので、今年度は新たに抗 κ 鎖定常領域抗血清を作製し、症例数を増やして検討を行った。

B. 研究方法

- 1)抗体作製: 抗 λ 鎖定常領域抗血清は昨年度報告したとおりである。抗 κ 鎖定常領域抗血清については免疫グロブリン 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 A λ および抗 A κ 抗体をはじめとする