

平成 12 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、
山田正仁⁹、窪田哲朗¹⁰、下条文武¹¹、内木宏延¹²
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愛知がんセンター、⁹金沢大学医学部神経内科、
¹⁰東京医歯大医学部保健衛生学科、¹¹新潟大医学部第二内科、
¹²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 アミロイドーシス症例臓器あるいは患者尿を 3 年間で 13 例集積した。患者は女性 9 例、男性 4 例で平均年齢は 58.8 才、λ 型 7 例、κ 型 5 例、及び現在検討中 1 例であった。尿中 BJP は、症例 2、7、8 を除き全例に認められた。骨髓形質細胞比率は、症例 3、5、10 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、11 はネフローゼ症候群で、症例 9 は下肢のしびれ感を認めた。直接死因は、症例 8、10-12 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、9 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。また、症例 8 は腎不全、症例 10 は多臓器不全により死亡していた。症例 8、10-13 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、9 では腎に、症例 6、7、10、13 では肝に、症例 3、6-9 では脾に、症例 5 では舌・皮膚に、症例 9 では坐骨神経に、それぞれ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、及び沈着阻害剤の開発を目指し、以下の諸項目を計画した。

(1) 全身性 AL アミロイドーシス患者から得た AL 蛋白、及び臓器沈着 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、及び非ペプチド性重合阻害剤を探索する。

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、及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、及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 3 年目である今年度は、昨年度までに構築した全身性 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、浜松、東京、及び新潟の 8 施設より計 13 症例の新鮮凍結臓器もしくは凍結 BJP 尿の提供を受けている (表 1)。これら 13 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た。

C. 研究結果

まず、13 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。クレアチニンクリアランス、血中 γ -グロブリンレベ

ルは正常で、骨髄形質細胞比率の増加は認められなかった。心エコーにて左室壁の対称性肥大を認めたが、心機能はほぼ正常であった。胸部レ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 1~3 cm 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

(Ikeda S, Takabayashi Y, Maejima Y, Tachibana N, Ehara T, Nezu A, Hoshii Y.: Nodular lung disease with five year survival and unilateral pleural effusion in AL amyloidosis. Amyloid. 1999 Dec;6(4):292-6)

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 130/60 mmHg 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 6.0 g/dl ↓、 γ -グロブリン分画 7.4 % ↓、IgG 480 mg/dl ↓、IgA 267 mg/dl、IgM 64 mg/dl、CRP < 0.2、尿中 BJP (-)。血清免疫電気泳動、骨髄穿刺は施行されなかった。死亡 1 カ月半前の平成 10 年 8 月 16 日、意識消失発作を来し、著明なうっ血性心不全が確認された。9 月 21 日、突然、構語障害および左上下肢麻痺が出現、CT にて右中大脳動脈根部閉塞による右大脳半球の広範な脳梗塞を確認した。9 日後、心室細動が出現し死亡した。

主要剖検所見 : (1) 骨髄は脂肪組織比率の増加した軽度低形成性骨髄で、造血細胞は 3 系とも認められた。形質細胞比率は全体に低く、領域によりばらつきを認めるが、5~10%程度と推定された。内皮細胞の明瞭な毛細血管周囲に、形質細胞の比較的均質な集簇を認めた。これらの形質細胞は、偏心した比較的大型の核と豊富な好塩基性細胞質から成り、分化した車軸様核を持つ plasma cells も認められるが、幼若核を持つ 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 500 g で壁は硬く断面に光沢を認めた。左室肥大があり(左室壁厚 2.3 cm)、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 640/580 g でやや硬く弾力性があり、断面は充実性であった。組織学的に気管支~細気管支壁、末梢血管壁、及び肺胞壁に高度のアミロイド沈着を認めた。

(4) 肝(1000 g)、脾(100 g)、腎(100/150 g) 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に血栓が惹起され、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 3.5 g/dl、IgG ↓、IgA ↓、IgM ↑、骨髄形質細胞比率 9.4 % ($\lambda \gg \kappa$)、尿中 BJP 陰性。死亡 4 カ月前の 1998 年 5 月、浮腫高度、蛋白尿 10 g/dl 前後、血清総蛋白 3 g/dl、IgG ↓、 λ 型 M 蛋白

血症（疑）、尿中λ型 BJP 陽性、骨髓形質細胞比率 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) 骨髓は軽度過形成性で、造血細胞は 3 系とも認められ、G/E は正常範囲であった。形質細胞比率は 20~30% と推定された。(2) 腎重量は 160/144 g 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 365 g 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 180 g 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(1800 g)、甲状腺(21 g)、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。骨髓穿刺にて明らかな形質細胞比率の増加は認められなかった。1997 年 10 月、血圧 88/52 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、骨髓穿刺にて形質細胞比率の増加を認め、多発性骨髓腫に続発した AL アミロイドーシスと診断された。punched out lesion は無く、M 蛋白血症(IgG-κ)、尿中κ型 BJP を認めた。MP 療法、COP 療法を施行するも効果無く、1997 年には、著明な舌腫大のため両側舌側面切除術を施行した。死亡 4 カ月前の 1998 年 9 月、両下腿、及び右前腕の浮腫が増強、全身皮膚硬化、顔面、手指、手掌への黄色アミロイド沈着、及び甲状腺機能低下症を認めた。血清 CRP 1.30、IgG 2280 mg/dl ↑、IgA 629 mg/dl ↑、IgM 221 mg/dl で、骨髓形質細胞比率は 13.6% であった。死亡 1 ヶ月前には両下腿浮腫、及び左足背膿瘍が出現、浸出液より E coli を認めた。1999 年 1 月 16 日、誘因無く心停止・呼吸停止を来し、死亡した。

主要剖検所見：(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し、腎不全、肝不全を併発したことと考えられる。

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 年から骨髓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 月に自己休業のため、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) 骨髓は軽度過形成性で、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。生化学的分析によりλと判定された。(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(75g)、副腎、及び腎 110/110 g 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) 骨髓は中等度過形成性で、形質細胞比率は 5~10%程度であつ

た。免疫染色にて $\lambda > \kappa$ 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～髓質小血管壁、及び髓質集合管周囲に中等度のアミロイドの沈着を認めた。(3) 脾では、赤脾髓脾索にびまん性にアミロイドの沈着を認めた。

(4) 肝では、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

症例 9 (東京医科歯科大学神経内科) :

臨床経過：患者は 49 才男性で、46 歳時、下肢遠位部のしびれ感で発症、ポリニューロパチー、洞不全症候群を認めた。血清 M 蛋白陰性、尿中 BJP- λ 陽性、皮膚、筋、消化管の生検でアミロイド沈着 (λ 陽性) を認め、AL アミロイドーシスと診断された。立ちくらみ、ふらつきは、DDD ペースメーカー挿入にて改善した。発症 12 ヶ月に、DEX・ α -IFN 療法を導入し、DEX 療法 1 クール目で尿中 BJP の陰性化が認められ、3 クール終了時、骨髓形質細胞比率は 7% から 1.5% に減少した。DEX 療法終了後、維持療法として α -IFN 療法を開始したが、3 ヶ月経過した時点で、自宅で突然死した。

考察：本症例は、心内膜下に高度のアミロイド沈着を認め、ペースング不全又は致死的不整脈による死亡と考えられた。

凍結保存臓器：腎、脾、坐骨神経、化学療法前 BJP 尿、化学療法終了時 BJP 尿

(山田正仁：厚生省 特定疾患事業アミロイドーシスに関する研究 平成 11 年度報告書；p86-91)

症例 10 (東京医科歯科大学神経内科) :

臨床経過：患者は 59 才男性で、51 歳時、右肋骨孤立性骨髓腫の診断にて肋骨切除術を受けた。その後経過観察されていたが、骨髓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、及び肝腫大が出現し急速に進行した。入院前、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、著明な肝腫大 (剣状突起下 10 cm 触知)、及び著明な黄疸 (総ビリルビン 11.6 mg/dl) を示した。単純写真、骨シンチ、及びガリウムシンチ上、全身に明らかな骨病変は認められなかった。しかし、骨髓形質細胞は 22% で異形性を認めた。血清 M 蛋白陰性、尿中 BJP- κ 陽性であった。肝生検にて Disse 腔を中心とした、著明なアミロイド沈着 (κ 陽性) を認めた。孤立性骨髓腫より移行した多発性骨髓腫による、肝障害を主徴とする AL アミロイドーシスと診断された。発症 9 ヶ月に DEX 療法開始し、開始と共に肝腫大は急速に改善、総ビリルビン及び ALP の著明な低下を認めた。しかし経過中肺炎を契機に心不全を来し、治療は 1 クールのみで中止になった。さらに感染症に伴い多臓器不全に陥り死亡した。

凍結保存臓器：化学療法前 BJP 尿

(山田正仁：厚生省 特定疾患事業アミロイドーシスに関する研究 平成 11 年度報告書；p86-91)

症例 11 (東京医科歯科大学神経内科) :

臨床経過：患者は 57 才女性で、55 歳時、下肢の浮腫、蛋白尿で発症した。血清 M 蛋白陰性、尿中 BJP- κ 陽性、アミロイド沈着は A κ 陽性で AL アミロイドーシスと診断された。ネフローゼに対し PSL 40 mg/日、引き続き MP 療法を 1 クール施行したが治療効果が認められず、発症後 18 か月に DEX 療法を開始した。3 クール施行後ステロイド精神病症状が出現し、治療を中止した。

BJP が陰性化し、骨髓形質細胞比率も 2.6% から 1.0% へ減少したが、ネフローゼは進行した。

凍結保存臓器：化学療法前 BJP 尿

(山田正仁：厚生省 特定疾患事業アミロイドーシスに関する研究 平成 11 年度報告書；p86-91)

症例 12 (東京医科歯科大学神経内科)：

臨床経過：患者は 67 才女性で、1994 年春より甲状腺腫大を指摘され、易疲労感、動悸、嘔声が出現した。1995 年夏、口腔内乾燥感、労作時呼吸困難、1996 年からは両足のしびれが始まり上行し、同年 12 月入院時、甲状腺腫大、及び神経学的に嘔声と足首以下の全感覚障害、及びアキレス腱反射の減弱を認めた。検査所見では、 γ -GTP、ALP の上昇を認めた。血清 M 蛋白陰性、尿中 BJP- κ 陽性、骨髓形質細胞比率は正常範囲内で、心電図で V4-6 の ST 低下、心エコーにて軽度の求心性心肥大と拡張障害が疑われた。冠動脈造影は正常であったが、薬物負荷心筋シンチで前壁の集積低下を認めた。腓腹神経伝導検査で感覚神経の活動電位の振幅低下を認めた。自律神経機能検査は正常であった。腓腹神経生検にて、アミロイドは Ak 陽性に染色され、AL アミロイドーシスと診断された。診断後 MPC 療法を開始し、尿中 BJP は一時陰性化した。その後、MPC 療法継続にもかかわらず末梢神経障害が進行し、再び BJP を認めるようになった。

凍結保存臓器：化学療法前 BJP 尿

(山田正仁：厚生省 特定疾患事業アミロイドーシスに関する研究 平成 9 年度報告書；p177-180)

症例 13 (新潟大学医学部第 2 内科)：

臨床経過：患者は 55 歳男性で、1999 年 1 月ごろから腹部膨満感を自覚し、同年 5 月検診にて肝機能異常を指摘された。また 2 ヶ月で 9kg の体重減少を認めた。同年 6 月

著明な肝腫大を認め、新潟市民病院にて肝生検および尿免疫電気泳動を行い、AL アミロイドーシス (κ 型) と診断された。骨髓形質細胞比率は 6.2% であった。2000 年 2 月腹部膨満感著明となり、妻をドナーとする生体肝移植を希望した。またこの頃より、腎機能障害および蛋白尿を認めた。同年 6 月新潟大学第三内科入院時、肝を正中で 18cm、左右鎖骨中線上 14cm 触知した。また、両手掌紅班および起立性低血圧を認めた。入院時血液検査にて BUN 57 mg/dl、Cre 3.2 mg/dl、K 7.0 mEq/l、T-Bil 1.7 mg/dl、尿蛋白 0.7g/日 を認めた。6 月 13 日血液透析を導入、6 月 27 日妻をドナーとした生体肝移植を行った。同時に行った腎生検で、アミロイド沈着が認められた。術後、タクロリムス使用にて拒絶反応をコントロール中である。

臓器所見：摘出肝重量は 4023g であった。

凍結保存臓器：肝

(下条文武、伊藤聡ら：厚生省 特定疾患事業アミロイドーシスに関する研究 平成 12 年度報告書)

D. 考察

表 1 に、これまでに集積された AL アミロイドーシス 13 症例のまとめを示す。

患者は女性 9 例、男性 4 例で平均年齢は 58.8 才、 λ 型 7 例、 κ 型 5 例、及び現在検討中 1 例であった。尿中 BJP は、症例 2、7、8 を除き全例に認められた。骨髓形質細胞比率は、症例 3、5、10 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、11 はネフローゼ症候群で、症例 9 は下肢のしびれ感を認めた。直接死因は、症例 8、10-12 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、9 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。また、症例 8 は腎不全、症例 10 は多臓器不全により死亡していた。症例 8、10-13 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、9 では腎に、症例 6、7、10、13 では肝に、症例 3、6-9 では脾に、症例 5 では舌・皮膚に、症例 9 では坐骨神経に、それぞれ高度のアミロイド沈着を認めた。

E. 結論

平成 11 年度までに集積した全身性 AL アミロイドーシス剖検症例 8 例に加え、今年度は新たに 5 症例を追加集積した。後に下条、内木が報告する様に、上記の内 5 症例（症例 2、3、6、7、13）の新鮮凍結臓器より AL アミロイド線維、及び AL 蛋白を精製し、試験管内 AL アミロイド線維形成機構の反応速度論モデルを構築、線維伸長を阻害・促進する生体分子、及び線維伸長を阻害する有機化合物を探索した。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

高橋直生、長谷川一浩、山口 格、上田孝典、下条文武、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

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 12 年度研究報告会 2001 年 2 月 1-2 日 東京、同プログラム・抄録集 重点研究事業 1

表1 AL アミロイドーシス 13 症例のまとめ

症例	年齢・性	主症状	血清 M 蛋白	尿中 M 蛋白	骨髓形質細胞比率	直接死因	主要沈着臓器
1	67 女	労作時呼吸困難 (右胸水)	IgG-λ	BJP (+)	明かな増加(-)	心壁在血栓→脳梗塞	心、肺 (アミロイド結節+肺門部気管支壁)
2	57 女	労作時呼吸困難 (うっ血性心不全)	N.D. ¹	BJP (-)	5-10% ² (λ陽性)	心壁在血栓→脳梗塞、心室細動	心、肺 (びまん性)
3	44 女	ネフローゼ症候群、 うっ血性心不全	IgG-λ	BJP-λ	15.8%	心室頻拍	腎、心、脾
4	56 女	労作時呼吸困難 (うっ血性心不全)	IgG-λ	BJP-λ	明かな増加(-)	肺うっ血+肺炎 (うっ血性心不全)	心
5	46 女	巨舌、 皮膚アミロイド症	IgG-κ	BJP-κ	13.6%	突然の心停止	心、舌、皮膚
6	55 男	労作時呼吸困難 (うっ血性心不全)	IgG-λ疑い	BJP-λ	5% ²	心室頻拍	心、肝、脾
7	68 女	全身浮腫 (うっ血性心不全)	わずかに疑 われる	N.D. ¹	5% ²	胸水貯留 (うっ血性心不全)	心、肝、脾
8	85 女	ネフローゼ症候群	IgG-λ	BJP (-)	5-10% ² (λ陽性)	腎不全、うっ血性心不全	腎、脾
9	49 男	下肢しびれ感	(-)	BJP-λ ³	7%	ペーシング不全又は 致死的不整脈	心、腎、脾、坐骨神経
10	59 男	肝機能障害	(-)	BJP-κ ³	22%	多臓器不全	肝
11	57 女	ネフローゼ症候群	(-)	BJP-κ ³	2.6%	不明	不明
12	67 女	動悸、嘔声、口渇	(-)	BJP-κ ³	明かな増加(-)	不明	不明
13	55 男	腹部膨満感	N.D.	BJP-κ	6.2%	生存中	生体肝移植摘出肝

¹免疫電気泳動施行せず。

²剖検時採取した骨髓より推定。

³ BJP 尿を凍結保存。

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

分担研究者 下条文武¹ 新潟大学医学部第二内科教授

研究協力者 高橋直生^{1,2}、長谷川一浩²、山口 格²、内木宏延²

¹新潟大学医学部第二内科、²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を反応速度論的に解析する実験系を確立するため、4 例の全身性 AL アミロイドーシス剖検例（症例 2：57 歳女性、症例 3：44 歳女性、症例 6：55 歳男性、症例 7：68 歳女性、いずれもλ型）並びに生体肝移植症例（症例 13：55 歳男性、κ型）の新鮮凍結臓器（症例 2：肺、症例 3：脾、症例 6：脾、症例 7：脾、症例 13：摘出肝）を用いて、Pras 法、 $10^6 \times g$ 超遠心、及び 50-60%不連続ショ糖密度勾配超遠心により AL アミロイド線維を精製した。還元条件下に Tricine-SDS-PAGE 法を行い、各精製 AL アミロイド線維溶液中に複数のバンドを認めた。ウェスタンブロッティングを行い、各症例とも 57 kDa 以外のバンドは抗ヒトλ・κ抗体で陽性に染色された。次に、精製 AL アミロイド線維の一部を 6 M 尿素で可溶化後、ゲルろ過で分子量別に分画し単体 AL 蛋白を得た。また症例 2、7 では、精製線維の一部を 8 M グアニジン塩酸で可溶化後、HPLC を用いた陽イオン交換クロマトグラフィーおよびゲルろ過クロマトグラフィーにより、高純度 AL 蛋白を得た。症例 2、7 の高純度 AL 蛋白のアミノ酸一次配列を解析したところ、いずれもλ鎖可変領域 N 末端に一致した。さらに、症例 2 の高純度 AL 蛋白の二次構造を遠紫外域 CD スペクトルで解析したところ、中性 pH 域で既にかなりランダムな構造を取っており、pH を変化させても明らかな構造変化を認めなかった。

A. 研究目的

全身性 AL アミロイドーシスは、日本における代表的アミロイドーシスであるが、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、全身性 AL アミロイドーシス患者から得た AL 蛋白、及び臓器沈着 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機構の反応速度論モデルの確立を目指した。今回、4 例の全身性 AL アミロイドーシス剖検例並びに 1 例の生体肝移植症例の新鮮凍結臓器より AL アミロイド線維を精製し、

電顕を用いた形態的観察、及び Tricine-SDS-PAGE 法等による生化学的解析を行った。また、通常のゲルろ過クロマトグラフィーあるいは HPLC で AL 蛋白を精製し、一次・二次構造解析を含めた種々の生化学的解析を行った。

B. 研究方法

症例提示：

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130/60 mmHg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6.0 g/dl↓、γ-グロブリン分画7.4%↓、IgG 480 mg/dl↓、IgA 267 mg/dl、IgM 64 mg/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500 gで壁は硬く剖面に光沢を認めた。左室肥大があり(左室壁厚2.3 cm)、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640/580 gでやや硬く弾力性

があり、剖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(1000 g)、脾(100 g)、腎(100/150 g)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に血栓が惹起され、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3.5 g/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10 g/dl前後、血清総蛋白3 g/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。形質細胞比率は20~30%と推定された。(2) 腎重量は160/144 g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 365 g 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 180 g 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(1800 g)、甲状腺(21 g)、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 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し、腎不全、肝不全を併発したと考えられる。

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月に自己休業のため、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。生化学的分析によりλと判定された。(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) 脾(75g)、副腎、及び腎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13（新潟大学医学部第2内科）：

臨床経過：患者は55歳男性で、1999年1月ごろから腹部膨満感を自覚し、同年5月検診にて肝機能異常を指摘された。また2ヶ月で9kgの体重減少を認めた。同年6月著明な肝腫大を認め、新潟市民病院にて肝生検および尿免疫電気泳動を行い、ALアミロイドーシス(κ型)と診断された。骨髓形質細胞比率は6.2%であった。2000年2月腹部膨満感著明となり、妻をドナーとする生体肝移植を希望した。またこの頃より、腎機能障害および蛋白尿を認めた。同年6月新潟大学第三内科入院時、肝を正中で18cm、左右鎖骨中線上14cm触知した。

また、両手掌紅班および起立性低血圧を認めた。入院時血液検査にて BUN 57 mg/dl、Cre 3.2 mg/dl、K 7.0 mEq/l、T-Bil 1.7 mg/dl、尿蛋白 0.7g/日を認めた。6月13日血液透析を導入、6月27日妻をドナーとした生体肝移植を行った。同時に行った腎生検で、アミロイド沈着が認められた。術後、タクロリムス使用にて拒絶反応をコントロール中である。

臓器所見：摘出肝重量は 4023g であった。

凍結保存臓器：肝

(下条文武、伊藤聡ら：厚生省 特定疾患事業アミロイドーシスに関する研究 平成12年度報告書)

ALアミロイド線維の精製：

上記症例の新鮮凍結組織（症例2：肺、症例3：脾、症例6：脾、症例7：脾、症例13：摘出肝）を解凍、はさみにて小片に切断後、Pras法にて粗抽出し、さらに $10^5 \times g$ 超遠心、及び50-60%不連続シヨ糖密度勾配超遠心によりALアミロイド線維を精製した(Naiki & Gejyo. Methods Enzymol 309:305-317, 1999)。

AL蛋白の精製：

精製ALアミロイド線維の一部を可溶化バッファー（6 M 尿素, 20 mM Tris-HCl, pH 8.2, 5 mM EDTA, protease inhibitor cocktail）中、4°Cで24~36時間可溶化後、ゲルろ過クロマトグラフィー（Pharmacia HiPrep™ Sephacryl S-200、カラムサイズ：1.6×60 cm、溶出バッファー：6 M 尿素, 20 mM Tris-HCl, pH 8.2, 5 mM EDTA, 100 mM NaCl, 4°C）で分子量別に単体AL蛋白を分画、精製した。

AL蛋白の高純度精製：

中性pH域でも十分な線維伸長を認めた症例2、7については、HPLCによる高純度精製を行った。精製線維の一部を8 M グアニジン塩酸で可溶化、6 M 尿素への脱塩置換後、陽イオン交換クロマトグラフィ

ーを行い（Pharmacia Hitrap SP：1.6×2.5 cm、溶出バッファー：6 M 尿素, 50 mM MES-NaOH, pH 5.8, 0-1 M NaCl linear gradient, 4°C）、カラム素通り画分をゲルろ過クロマトグラフィー（Pharmacia Superose 12：1.0×30 cm、溶出バッファー：6 M 尿素, 20 mM Tris-HCl, pH 8.2, 5 mM EDTA, 100 mM NaCl, 4°C）で分子量別に分画した。

ALアミロイド線維の電顕的解析：

精製ALアミロイド線維の形態は、1% 燐タングステン酸（pH 7.0）でネガティブ染色後、透過電顕（Hitachi H-7000）にて観察した。加速電圧は75 kVであった。

ALアミロイド線維、及びAL蛋白の電気泳動、及びウェスタンブロッティングによる解析：

精製ALアミロイド線維、及びAL蛋白の蛋白組成は、還元条件下あるいは非還元条件下にTricine-SDS-PAGE法により解析した(Schägger & Jagow. Anal Biochem 166:368-379, 1987)。ウェスタンブロッティングは定法に従い、PVDF膜（ミリポア社）に転写した蛋白バンドを、抗 κ 、抗 λ 、抗apoE、及び抗SAPの各抗体を用いて検出した。

高純度AL蛋白のアミノ酸一次配列、及び二次構造の解析：

症例2、7の高純度精製AL蛋白を電気泳動後PVDF膜に転写し、CBB染色後主要バンドを切り出し、エドマン分解を用いたアミノ酸一次配列の解析を行った。また症例2の高純度精製AL蛋白を用い、遠紫外域CDスペクトルを測定した。

C. 研究結果

(i) 電子顕微鏡を用いた形態学的観察により、症例3で、若干の無構造な不純物を認めるものの、幅約10 nm、らせん構造を持つALアミロイド線維を確認した（図1）。データは示さないが、症例2、6、7、13で

も同様な AL アミロイド線維を得た。



図1 精製 AL アミロイド線維の電顕像 (症例3)。基準線は 100nm を示す。

(ii) 還元条件下に Tricine-SDS-PAGE 法を行い、各精製 AL アミロイド線維溶液中に、各症例とも複数のバンドを認めた。ウェスタンブロッティングを行い、各症例とも 57 kDa 以外のバンドは、抗ヒトλ・κ抗体で陽性に染色された。(iii) 図2に、症例2における Sephacryl ゲルろ過クロマトグラフィーパターン、及び No.6-9 フラクシヨンの非還元条件下 Tricine-SDS-PAGE ならびに抗ヒトλ抗体を用いたウェスタンブロッティングの結果を示す。No.6、7のフラクシヨンは、ほぼ完全なλ鎖、及び複数の高分子λ鎖フラグメント、No.8、9のフラクシヨンは、複数の低分子λ鎖フラグメントで構成されていた。症例2と同様、症例3、6、7、及び13でも、各フラクシヨとも複数のλ・κ鎖フラグメントのバンドを認めた。しかしバンドの数、及び分子量は、症例ごとに異なっていた。また、HPLCに

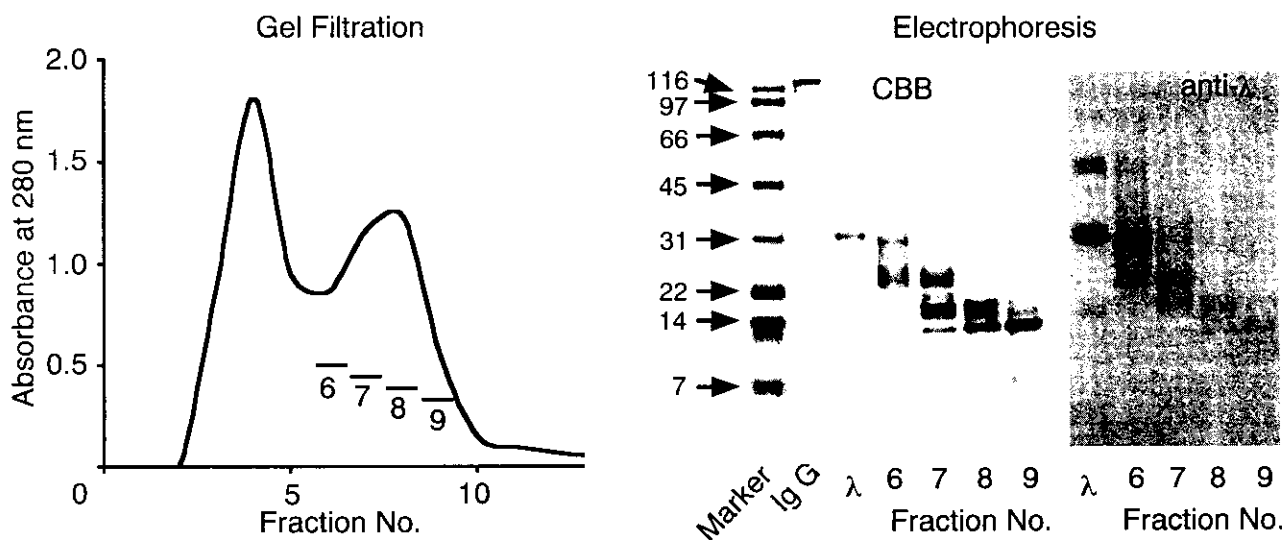


図2 症例2におけるゲルろ過クロマトグラフィーパターン、及び No. 6-9 フラクシヨンの電気泳動ならびに抗ヒトλ抗体を用いたウェスタンブロッティングの結果

よる高純度精製 AL 蛋白も、やはり限定分解されて出来た数種の AL 蛋白の一部から構成されていた。ウェスタンブロッティングの結果、Sephacryl ゲルろ過精製 AL 蛋白溶液中に共存していた apoE は、HPLC 精製によりほぼ除去できた。(iv) 症例 2 における高純度精製 AL 蛋白の主要な二つのバンドのアミノ酸配列を決定したところ、それぞれの N 末端は完全に一致し、シーケンスライブラリーから λ 鎖可変領域 N 末端に一致した。また症例 7 についても同様に解析し、やはり λ 鎖可変領域 N 末端に一致した。(v) 症例 2 の高純度 AL 蛋白の二次構造を遠紫外域 CD スペクトルで解析したところ、中性 pH 域で既にかなりランダムな構造を取っており、pH を 2.5 まで変化させても明らかな構造変化を認めなかった。

D. 考察

各症例から精製された AL アミロイド線維の電気泳動、及びウェスタンブロッティングの結果、いずれのアミロイド線維もほぼ完全な $\lambda \cdot \kappa$ 鎖を含む複数のフラグメントから構成され、しかも症例ごとに各フラグメントの分子量が異なっていた。一般に AL アミロイドーシスは、腫瘍性形質細胞の分泌するモノクローナルな軽鎖が蛋白分解酵素による限定分解を受けた後にアミロイド線維に重合し、組織に沈着するとされている。上記結果は、AL 蛋白の一次構造が症例ごとに異なっているため、蛋白分解酵素による限定分解に多様性が生じたことを示唆している。さらに上記結果は、分子量の異なる複数の $\lambda \cdot \kappa$ 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（おそらく可変領域の一部）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おり大変興味深い。それを裏付けるように、解析した AL 蛋白のアミノ酸配列は、いずれも免疫グロブリン λ 鎖可変領域 N 末端に一致した。しかし、各分子量の $\lambda \cdot \kappa$

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。

E. 結論

全身性 AL アミロイドーシス剖検症例の新鮮凍結臓器より、AL アミロイド線維、及び AL 蛋白を精製し、AL 蛋白の一次・二次構造解析を含めた種々の生化学的解析を行った。後に内木が報告する様に、精製 AL アミロイド線維、及び AL 蛋白を用いて、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構築、線維伸長を阻害・促進する生体分子、及び線維伸長を阻害する有機化合物を探索した。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

高橋直生、長谷川一浩、山口 格、上田孝典、下条文武、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

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 12 年度研究報告会 2001 年 2 月 1-2 日 東京、同プログラム・抄録集 重点研究事業 1

試験管内 AL アミロイド線維伸長の反応速度論的解析、及び線維伸長に影響を及ぼす種々の生体分子ならびに有機化合物の探索

分担研究者 内木宏延 福井医科大学病理学第二講座教授

研究協力者 高橋直生^{1,2}、長谷川一浩¹、山口 格¹、下条文武²

¹福井医大第二病理、²新潟大学第二内科

研究要旨

4例の全身性ALアミロイドーシス剖検例（いずれもλ型）並びに1例の生体肝移植症例（κ型）の新鮮凍結臓器よりALアミロイド線維およびAL蛋白を精製し、分光蛍光定量法を駆使して試験管内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、これを用いて線維伸長に及ぼす種々の生体分子および有機化合物の影響を解析した。(i) 線維伸長反応の至適pHは、ほとんどの症例で酸性域（症例2：pH 2.5、症例3：pH 3.5、症例6：pH 2.0、症例13：pH 2.5）にあったが、症例7では中性域（pH 7.5-8.0）にあった。また、症例2、7は酸性域、中性域に二峰性のピークを示し、症例2は中性域でも線維伸長を認めた。さらに、ほぼ完全な軽鎖に比べ、そのフラグメントである低分子量AL蛋白を用いた方が反応が起こりやすかった。(ii) 上記全症例において、低分子量AL蛋白を用いた線維伸長反応が普遍的に一次反応速度論モデルに従う事を証明した。(iii) 電顕観察により、症例2、7以外の3症例においても、中性pH域で線維伸長が起こることを確認した。(iv) 症例2、7において、低分子量AL蛋白単独でインキューベートする事で線維形成が起こることを確認した。(v) ALアミロイド線維伸長は、アミロイド共存分子のアポE、α₁-ミクログロブリン、及びフィブロンネクチンにより阻害され、デルマトン硫酸により促進された。また、抗酸化剤NDGAが線維伸長を阻害した。

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来た。今年度は、昨年3例に加え、2例の全身性ALアミロイドーシス症例の新鮮凍結臓器より精製したALアミロイド線維およびAL蛋白を用い、線維伸長の一次反応速度論モデルを普遍化し、中性pH域における線維伸長反応を重点的に解析した。さらに、この反応に及ぼ

す種々の生体分子、及び有機化合物の影響を検討した。

B. 研究方法

ALアミロイド線維、及びAL蛋白の精製：

4例の全身性ALアミロイドーシス剖検例（症例2：57歳女性、症例3：44歳女性、症例6：55歳男性、症例7：68歳女性、いずれもλ型）並びに生体肝移植症例（症例13：55歳男性、κ型）の新鮮凍結臓器（症例2：肺、症例3：脾、症例6：脾、症例7：脾、症例13：摘出肝）よりALアミロイド線維、及びAL蛋白を分画、精製した（下条文武ら、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、本研究報告書）。

AL アミロイド線維伸長の反応速度論的解析:

(i) 各症例より得られた精製 AL 蛋白画分を、単独で、あるいは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 で反応させた (Naiki & Gejyo. Methods Enzymol 309:305-317, 1999)。反応溶液は容量 30~50 μ l で 60~100 μ g/ml の AL アミロイド線維、30 μ M AL 蛋白、50 mM バッファー (pH 1.5~9.0)、100 mM NaCl、及び 0.3~0.5 M 尿素を含んでいた。(ii) アミロイド線維形成・伸長を、電顕観察、及びチオフラビン T (ThT) を用いた分光蛍光定量法により評価した (Naiki & Gejyo. Methods Enzymol 309:305-317, 1999)。(iii) 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。

線維伸長反応に及ぼす各種生体分子ならびに有機化合物の影響解析:

中性 pH 域でも十分な線維伸長を認めた症例 2、7 の pH7.5 における伸長反応溶液

に、種々のアミロイド共存分子 (アポ E、SAP、フィブロネクチン、 α_2 -マクログロブリン、 α_1 -アンチキモトリプシン、アプロチニン、デコリン、ヘパラン硫酸、及びデルマトン硫酸)、血清蛋白 (α_1 -ミクログロブリン)、及び有機化合物

(nordihydroguaiaretic acid (NDGA)、リファンピシン、デキサメサゾン、ドキシソルピシン、及び高濃度の DMSO) を加え、反応開始 6 ならびに 24 時間後の電顕像、及び ThT 蛍光量を評価した。

C. 研究結果

線維伸長の反応速度論的解析:

(i) 電顕観察により、伸長反応の至適 pH において断片化アミロイド線維の明らかな伸長を確認した。さらに、全ての症例で中性 pH 域における線維伸長を確認した。(ii) 図 1 は、症例 2 より得られた異なる分子量の AL 蛋白画分と断片化アミロイド線維による伸長反応の pH 依存性を示す。酸性・中性 pH 域に二峰性のピークを認めた。

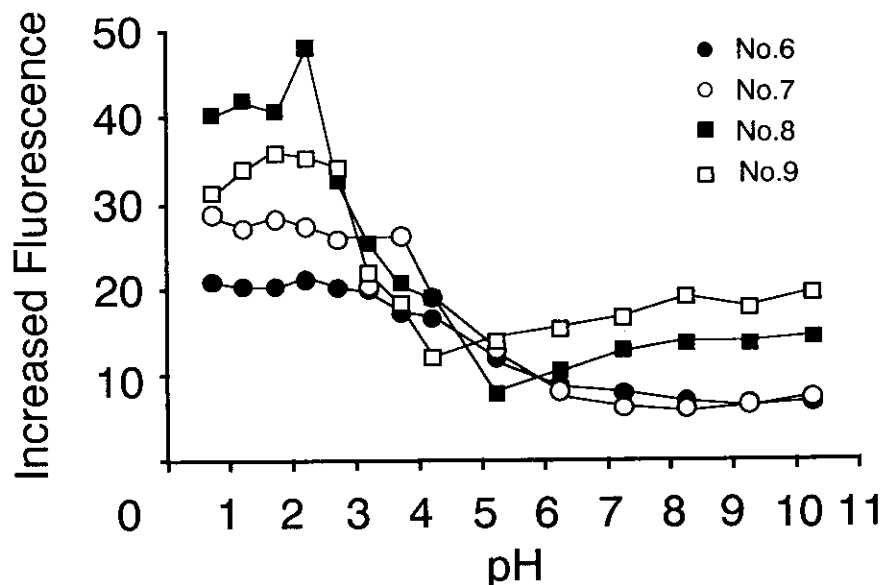


図 1 異なる分子量の AL 蛋白画分と断片化アミロイド線維による伸長反応の pH 依存性 (症例 2)。反応は 24 時間行った。フラクション番号は通常の低圧ゲルろ過で得られた画分を示す (下条文武ら、新鮮凍結臓器からの AL アミロイド線維ならびに AL 蛋白の精製、及び電顕的・生化学的解析、本研究報告書)