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（第三報）

分担研究者　石原得博　山口大学医学部構造制御病態学講座
共同研究者　星井嘉信*、崔丹*、河野裕夫*、横田忠明**
*山口大学医学部構造制御病態学講座
**社会保険小倉記念病院病理科

研究要旨　本年度は、新たに抗λ鎖 159-175 抗血清（免疫グロブリンλ鎖のN末端側から 159-175 番目に相当する合成ペプチドを抗原とする抗血清）について免疫組織化学的検討を加えた。Aλアミロイド沈着を伴う肝 16 例のホルマリン固定パラフィン切片を用い、抗λ鎖 159-175 抗血清と抗λ鎖 118-134 抗血清との染色性を比較した。血管型のアミロイドは抗λ鎖 159-175 抗血清では 1 例をのぞいて陽性反応が見られたが、非常に染色性が不均一で、抗λ鎖 118-134 抗血清よりも陽性部分が少ない傾向にあった。びまん型のアミロイドは、抗λ鎖 118-134 抗血清では Disse 腔に沈着したアミロイドの染色性が非常に不均一な症例が多かったが、抗λ鎖 159-175 抗血清では 1 例をのぞいて Disse 腔のアミロイドはほぼ均一に良好に染色された。抗λ鎖 118-134 抗血清の染色性が弱い場合（特に肝の Disse 腔に沈着したアミロイドの場合）、抗λ鎖 159-175 抗血清を用いることにより、アミロイドの免疫組織化学的なタイプ決定がより容易になることが示唆された。λ鎖定常領域抗血清による Aλアミロイドの染色性が不均一である原因として、沈着しているアミロイドのアミノ酸残基数が均一ではない可能性があるかもしれない。

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 1999 度から 2001 年度までの 3 年間で 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ホルマリン固定パラフィン切片への適用について検討を行った。本年度は新たに抗λ鎖 159-175 抗血清（免疫グロブリンλ鎖のN末端側から 159-175 番目に相当する合成ペプチドを抗原とする抗血清）について免疫組織化学的検討を行い、抗λ鎖 118-134 抗血清と染色性を比較した。

B. 研究方法

1)抗λ鎖 159-175 抗血清の作製：免疫グロブリンλ鎖のN末端側から 159-175 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Aλおよび抗Aκ抗体をはじめとする諸種のアミロイドに対する抗体を用いて1990年から2000年に行った免疫組織化学的検討で、これまでにAλ型と診断された全身性アミロイドーシス剖検例16例（血管型8例、びまん型8例）の肝組織および、陰性コントロールとしてAκおよびAAアミロイドーシス例の肝組織各2例のホルマリン固定パラフィン切片を用いた。切片を脱パラフィン後、非特異反応のブロックを行い、一次抗体として抗λ鎖118-134抗血清400倍、または抗λ鎖159-175抗血清100あるいは200倍を室温で30分間反応させた。二次抗体としてDAKO Envision+ポリマー試薬（ウサギ一次抗体用）を室温30分間反応させた後、DABにて5分間発色を行った。抗λ鎖159-175抗血清については全例Target retrieval solution (DAKO)を用いてオートクレーブ処理を行い、抗λ鎖118-134抗血清についても一部の症例は同様のオートクレーブ処理を行った。

C. 研究結果

抗λ鎖 118-134 抗血清は抗原賦活処理なしで Aλアミロイドーシス 16 例全例に陽性像がみられた。抗λ鎖 159-175 抗血清ではオートクレーブ処理を行うことにより 16 例のうち 15 例に多少なりとも陽性像がみられたが、1 例は明らかな陽性所見はみられなかった。Aκおよび AA アミロイドーシス例はいずれの抗血清でも明らかな陽性所見はみられなかった。

血管型のアミロイドは抗λ鎖 159-175 抗血清では非常に染色性が不均一な例が多く、症例によっては染色性が非常に弱いものもあり、前述のごとく 1 例は明らかな陽性所見が得られなかった。抗λ鎖 118-134 抗血清も、抗λ鎖 159-175 抗血清ほどではないが、部位によって染色性の強い部と弱い部がみられた。

びまん型のアミロイドは抗λ鎖118-134抗血清ではDisse腔に沈着したアミロイドの染色性が不均一な症例が多く、症例によっては同一切片内で、血管壁のアミロイドは良好に染色されるが、Disse腔のアミロイドは非常に染色性が弱いものがあった。このような症例はオートクレーブ処理を行っても、染色性がやや増強される程度で、やはり染色性は非常に不均一であった。抗λ鎖159-175抗血清は1例を除いてDisse腔のアミロイドが、ほぼ均一に良好に染色され、1例は他の症例に比べるとやや染色性が弱く、不均一であった。

D. 考察

今回の検討で、抗λ鎖 118-134 抗血清、抗λ鎖 159-175 抗血清とも、Aλアミロイドの染色性が不均一であるという現象がみられた。この原因としてはAλアミロイドではアミノ酸残基数の異なるアミロイド線維が不均一に混在して沈着している可能性が考えられるが、標本作製中の抗原性の低下による可能性も否定できない。血管型のAλアミロイドは抗λ鎖 118-134 抗血清のほうが抗λ鎖 159-175 抗血清よりも、染色される範囲が広く、かつよく染まる傾向にあった。肝のびまん型 Aλアミロイド沈着例はしばしば抗λ鎖 118-134 抗血清の染色性が不均一で弱く、抗λ鎖 159-175 抗血清で均一によく染まる場合があり、これらの抗血清の併用によって、アミロイドの免疫組織化学的な診断がより容易になることが示唆された。肝の Disse 腔に沈着したアミロイドが、症例によっては抗λ鎖 118-134 抗血清よりもより C 末端側を認識する抗λ鎖 159-175 抗血清とよく反応する原因については、今後さらに検討を加える必要があるが、Disse 腔に沈着したアミロイド中には定常領域の C 末端側のフラグメントがある程度含まれている可能性があるのかもしれない。

E. 結論

1999年度より本年度までの3年間で抗λ

鎖 118-134 抗血清、抗λ鎖 159-175 抗血清および抗κ鎖 118-134 抗血清を作製し、これらの抗血清がホルマリン固定パラフィン切片を用いた AL アミロイドーシスの免疫組織化学的診断に有用であることを示した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hoshii Y, Setoguchi M, Iwata T, Ueda J, Cui D, Kawano H, Gondo T, Takahashi M, Ishihara T. Useful polyclonal antibodies against synthetic peptides corresponding to immunoglobulin light chain constant region for immunohistochemical detection of immunoglobulin light chain amyloidosis. Pathol Int 2001;51:264-270.

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

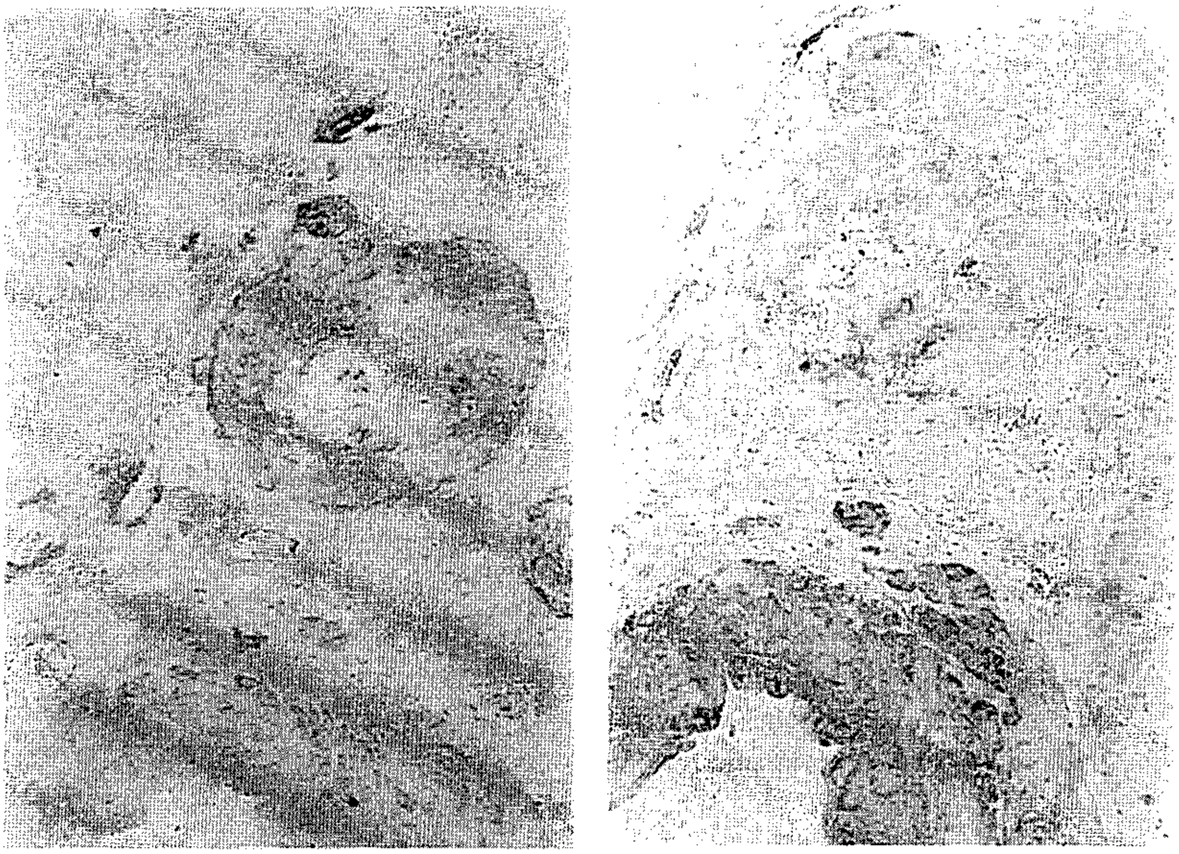
なし

2. 実用新案登録

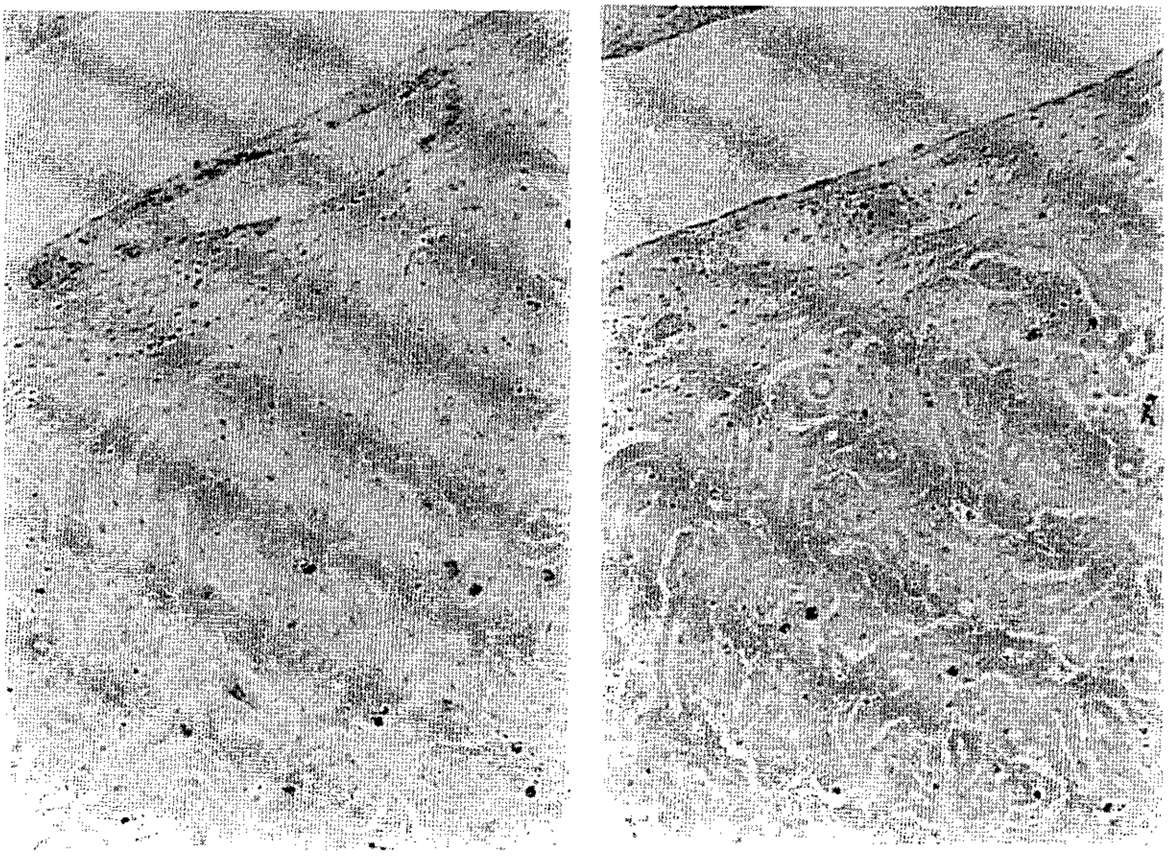
なし

3. その他

なし



(写真1)肝の血管型Aλアミロイドーシス例、左が抗λ鎖118-134抗血清、右が抗λ鎖159-175抗血清による染色。アミロイドは肝動脈および門脈壁に沈着しており、抗λ鎖118-134抗血清では、若干染色性が不均一ではあるが、アミロイドほぼ全体が陽性である。抗λ鎖159-175抗血清では門脈壁のアミロイドはよく染色されているが、肝動脈壁のアミロイドは、染色性が不均一で、染まっていない部分のほうが多い。



(写真2)肝のびまん型Aλアミロイドーシス例、左が抗λ鎖118-134抗血清、右が抗λ鎖159-175抗血清による染色。アミロイドは血管壁およびDisse腔にびまん性に沈着している。抗λ鎖118-134抗血清では血管壁のアミロイドはよく染色されているが、Disse腔のアミロイドは大部分は染色性が弱く、所々濃い部分が散見される。抗λ鎖159-175抗血清では、Disse腔のアミロイドがほぼ均一に良好に染色されているが、逆に血管壁の染色性はやや弱い。

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 アミロイドーシス発症に関する骨髄腫細胞の細胞生物学的研究
－SCID-hIL6 transgenic mice への患者骨髄腫細胞の移植生存系の確立－

分担研究者　河野 道生
山口大学・大学院医学研究科・生体シグナル解析医学講座
共同研究者　石川 秀明、津山　尚宏
山口大学・大学院医学研究科・生体シグナル解析医学講座

研究要旨　AL アミロイドーシスを引き起こしやすい骨髄腫細胞はいかなる細胞であるか、あるいは生体側の要因がどのように関与しているのかを明らかにする目的で、AL アミロイドーシス合併した骨髄腫患者からの骨髄腫細胞を SCID-hIL6 transgenic mice (SCID-hIL6 Tg mice)腹腔内に移植生存させる系を確立した。これらマウス個体に骨髄腫細胞から産生されるM蛋白(Ig)が負荷された場合に実際にアミロイド沈着が誘導されるか否かを検討した。検討した AL アミロイドーシス合併した骨髄腫患者からの骨髄腫細胞において、いずれもマウスにアミロイド沈着を誘導することはできなかった。この結果は、単なる M 蛋白の負荷だけではアミロイド沈着を惹起できないことを示唆している。

A. 研究目的

AL アミロイドーシスのほとんどは骨髄腫に由来するものである。骨髄腫の早期からアミロイド沈着をきたす例と骨髄腫が進展した末期にアミロイドーシスが顕在化してくる症例とがある。いずれにせよ、AL アミロイドーシスを伴う骨髄腫細胞からは、結果としてアミロイド原性の M 蛋白が産生されていると考えられる。これまでにヒト骨髄腫細胞株を SCID-hIL6 transgenic mice へ移植できる系を確立しているので、AL アミロイドーシスを合併した骨髄腫患者からの骨髄腫細胞を SCID-hIL6 Tg mice 腹腔内に移植し、生存増殖させる系を確立し、それらのマウス個体にアミロイド沈着の誘導が実際に認められるか否かを検討した。

B. 研究方法

１．対象

骨髄腫と確定診断されている症例において、アミロイド沈着が証明された(上部消化管内視鏡検査、腹壁脂肪組織生検検査等により)症例 25 例につき検討した（表-1)。既治療例 16 例、未治療例が 9 例であった。M 蛋白のクラス別では、IgG　16 例、IgA　7 例、BJ 型　2 例であった。患者からの骨髄穿刺検査に対するインフォームド・コンセントを得た後、骨髄穿刺検査を施行して骨髄液を採取した。常法のごとく、骨髄液から骨髄単核球分画を精製し骨髄腫細胞分画として使用した。マウスへの移植前に細胞表面抗原の解析を抗 CD38 抗体による多重染色解析で行った。すでに昨年度報告しているごとく、SCID-hIL6 mice の腹腔内に骨髄腫細胞を agarose ge (Sea-Plaque(TAKARA)　(1.5%)とともに患者骨髄腫細胞を腹腔内に注射した。約 12 週後に腹腔内の agarose gel mass から細胞を回収して、抗 CD38, CD54, MPC-1, ある

いはCD45抗体で多重染色後フローサイトメーター（Epics Elite, Coulter）にて解析して、移植生存を確認した。摘出した agarose gel mass を組織学的に検索して、アミロイド沈着の有無を調べた。更に移植効率を高めるために、骨髄ストローマ細胞株 KM-102 あるいはKM-102 細胞株に cathepsin S 遺伝子を導入した KM-102-CS 細胞とともに、骨髄腫細胞株 U-266 あるいは患者骨髄腫細胞を腹腔内注射した。

C. 研究結果

アミロイドーシス合併骨髄腫患者 25 症例につき、骨髄中の骨髄腫細胞の表面抗原解析を行なった。アミロイドーシス非合併骨髄腫患者からのそれらと比して、特に未熟型あるいは成熟型骨髄腫細胞亜群の変異はなかった（図-1）。アミロイドーシス合併骨髄腫患者 25 症例の骨髄単核球分画をマウス腹腔内へ移植した。この内 9 症例で、移植後 8~12 週に移植生存が確認できた（表-1）。移植生存が確認できた症例は、移植前の骨髄単核球中の骨髄腫細胞比率が高いこと、未熟骨髄腫細胞 (MPC-1-)が多い症例であった。マウス腹腔内で生存した骨髄腫細胞は、MPC-1-CD45-の未熟骨髄腫細胞であった。これらの所見もアミロイドーシス非合併骨髄腫患者からの結果と差異はなかった。骨髄腫細胞の生存が確認できた例において、組織学的検索を行なったが、いずれにおいてもアミロイド沈着は認められなかった。そこで、マクロファージに発現する protease 中で cathepsin S に注目して、cathepsin S 遺伝子導入骨髄ストローマ細胞株 KM-102 と骨髄腫細胞との共移植を行った。現在、経過観察中である。

D. 考察

アミロイドーシス合併骨髄腫患者からの骨髄腫細胞は、非アミロイドーシス合併患者の骨髄腫細胞と比してその細胞亜群には特に大きな差異はない。このことは、単に骨髄腫細胞から産生される M 蛋白の量的負荷の強弱がアミロイド沈着の有無を規定する大きな要因ではないと考えられる。アミロイドーシス合併骨髄腫患者からの骨髄腫細胞を SCID-hIL6 mice の腹腔内に注射し、生存・増殖させることに成功したが、これらのマウスにアミロイド沈着を誘導することはできなかった。このことは、骨髄腫細胞は積極的にアミロイド原性の M 蛋白を産生していると思われるが、その M 蛋白だけの存在ではアミロイド沈着誘導の必要十分条件ではないことを示唆している。アミロイド原性の M 蛋白の負荷に加えて、生体側のアミロイド沈着を誘導しやすい要因が加わらないと起こらないものと思われる。従って、骨髄腫細胞を単に SCID-hIL6 mice の腹腔内に注射するがけではなく、生体側の反応を修飾し得る条件下で移植する系の検討が必要である。現在、マクロファージに発現する protease 中で cathepsin S に注目して、cathepsin S 遺伝子導入骨髄ストローマ細胞株 KM-102 と骨髄腫細胞との共移植により、アミロイド沈着が起こるか否かを現在検討している。

E. 結論

1. アミロイドーシス合併骨髄腫患者 25 例からの骨髄腫細胞の表面抗原解析を行ったが、非アミロイドーシス合併患者の骨髄腫細胞と比してその細胞亜群に大きな差異はなかった。
2. アミロイドーシス合併骨髄腫患者からの骨髄腫細胞を SCID-hIL6 mice の腹腔内に注射して、生存・増殖させ得る系を確立できた。
3. アミロイドーシス合併骨髄腫患者からの骨髄腫細胞を SCID-hIL6 mice の腹腔内に移植・生存させ長期に観察したが、いずれもアミロイド沈着は認められなかった。今後は、生体側の反応を修飾し得る条件下での検討が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ishikawa H, Tsuyama N, Abroun S, Liu S, Li F, Taniguchi O, Kawano MM: Requirement of src family kinase activity associated with CD45 for myeloma cell proliferation by interleukin-6. Blood (in press) 2002.
2) Ishikawa H, Mahmoud MS, Fujii R, Abroun S, Kawano MM: Proliferation of immature myeloma cells by interleukin-6 is associated with CD45 expression in human multiple myeloma. Leuk Lymphom 39: 51-55, 2000.

2. 学会発表

1) 河野道生:形質細胞の分化と腫瘍化ー骨髄腫細胞から学ぶものー. 総説講演. 第63回日本血液学会総会、名古屋、平成 13 年 4 月 20 日、2000.
2) Tsuyama N, Ishikawa H, Abroun S, Liu S,Li F, Kawano MM: The proliferation of MPC-1-CD49e-CD45+ immature myeloma cells are strictly controlled by IL-6 in the SCID-hIL6 Tg mice. The 43 annual meeting of American Society of Hematology, Orland, U.S.A., December 7-11, 2001.
3) Ishikawa H, Abroun S, Tsuyama N, Liu S, Li F, Kawano MM: Implication of an inhibitory role of STAT1 for myeloma cell proliferation. The 43 annual meeting of American Society of Hematology, Orland, U.S.A., December 7-11, 2001.
4) Abroun S, Ishikawa H, Tsuyama N, Liu S, Li F, Kawano MM: Insulin and IGF-1 are survival factors for myeloma cells in vitro. The 43 annual meeting of American Society of Hematology, Orland, U.S.A., December 7-11, 2001.

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

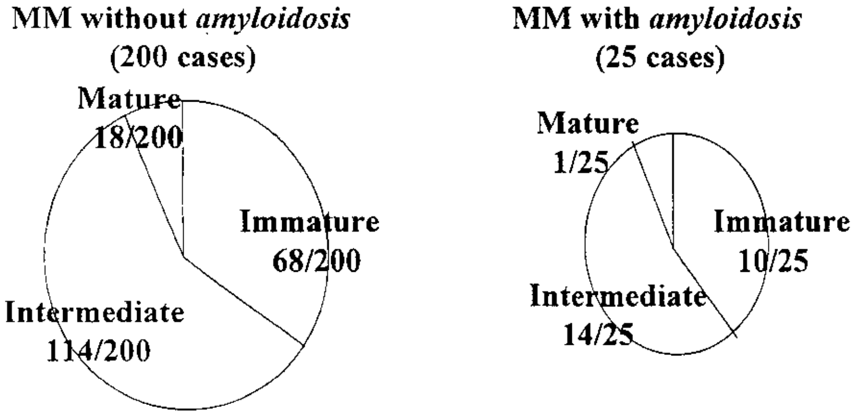
3. その他

なし

表1 Survival of Primary MM cells from Pt with amyloidosis in SCID-hIL6 Tg mice

Cases	BMMNC injected % plasma cells	% MPC-1- cells	myeloma cells in the pleural cavity	observed after i.p. injection
1. IgG-K, treated	0.9 %	0.2 %	0	12 W
2. IgG-L, treatd	3.0	1.4	0	13 W
3. IgG-L, nontreat	76.3	54.8	1,000, 12,850, 6,790	12 W
4. IgA-L, treated	13.2	3.0	0	12W
5. IgA-L, treated	6.3	2.3	0	12W
6. IgG-K, treated	52.1	34.6	2,250, 1,000, 1,000	11 W
7. IgA-L, nontreat	80.6	40.8	2,200,000, 3,400,000	11 W
8. IgG-K, nontreat	22.1	7.3	0, 0, 0	11 W
9. IgA-K, treated	15.4	2.5	0, 0, 0	12 W
10. IgG-L, nontreat	50.0	29.6	6,900, 2,800, 10,400	8 W
11. IgG-K, treated	1.3	0.0	0, 0	13 W
12. IgG-K, nontreat	67.2	6.8	0, 0	12 W
13. IgG-L, nontreat	22.0	17.4	3,000, 3,600, 2,00 0	8 W
14. IgG-L, treated	2.0	0.2	0, 0, 0	7 W
15. IgG-L, nontreat	60.0	12.2	2,000, 1,550, 1,250	8 W
16. IgG-L, treated	62.7	39.3	5, 000	8 W
17. IgA-L, nontreat	10.1	1.1	0	8 W
18. IgG-K, treated	66.6	1.6	0, 0	8 W
19. IgG-K, treated	1.0	0.1	0	8 W
20. IgG-L, nontreat	19.2	3.8	2,200	8 W
21. IgA-K, treated	2.0	1.3	0, 0, 0, 0	8 W
22. BJ-K, treated	10.0	0.4	0	8 W
23. IgA-L, treated	6.3	2.3	0	12 W
24. IgG-K, treated	4.3	2.4	0	8 W
25. BJ-L, treated	21.0	18.0	5,000	8 W

Myeloma Cases with dominant subpopulations



Immature myeloma cells: MPC-1-CD49e-CD45-/+
Intermediate myeloma cells: MPC-1+CD49e-CD45-/+
Mature myeloma cells: MPC-1+CD49e+CD45+

図1

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

多発性骨髄腫に伴うアミロイドーシスの臨床的検討
－アミロイド沈着の危険因子：アポリポ蛋白の検討－

分担研究者　麻奥英毅　　広島赤十字・原爆病院輸血部
共同研究者　田利　晶*、藤原　恵**、栗原寛治**
*広島赤十字・原爆病院　*第7内科、**同病理部

研究要旨　多発性骨髄腫患者におけるアミロイド沈着の危険因子を明らかにする目的で、骨髄腫の初診時各種血液生化学検査値、アポリポ蛋白値、血清M蛋白量及び遊離L鎖量とアミロイド沈着との関係について検討した。各種パラメータ毎の解析ではトリグリセライド値、BUN値、クレアチニン値、アポリポ蛋白E値がアミロイド沈着に相関を認めたが、多変量解析の結果BUN値とアポリポ蛋白E（アポE）値が危険因子として明らかになった。アポE≧4.5mg/dl、BUN≧19mg/dlをアミロイド危険因子群とすると68%にアミロイド沈着を認めた。

A. 研究目的

多発性骨髄腫においてアミロイドーシスは予後に関わる重大な併発症であるがその危険因子は明らかでない。アミロイドーシスに対する有効な治療法がないためか、症状が出現した後にアミロイドの存在が証明されることも多い。危険因子を明らかにすることで早期発見による早い（全身状態の良い）段階での治療できるようになり積極的な治療の検討が可能となる。以上より本研究は臨床的に有用なアミロイド沈着の危険因子を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

対象は多発性骨髄腫患者120例である。アミロイド沈着の確認は胃粘膜生検、腹壁脂肪生検、アミロイド沈着が疑われる病変部位の生検より得られた標本のコンゴーレッド染色によって行った。対象検査項目は骨髄腫の初診時の総蛋白、アルブミン、ZTT、総コレステロール、トリグリセライド、BUN、クレアチニン、CRP、アポリポ蛋白値、血清M蛋白量及び遊離L鎖量である。尚上記生検及び各検査については十分な説明を行い同意を得た上で行った。

解析はStatViewにて行った。有意差を認めた因子についての多変量解析はステップワイズ回帰分析を用いた。

C. 研究結果

多発性骨髄腫患者120例中47例にアミロイドの沈着を認めた。そのうち6例はアミロイドーシスの症状を認めた。各種パラメーターそれぞれにつきアミロイド沈着との相関を検討した結果トリグリセライド値($p=0.0267$)、BUN値($p=0.0114$)、クレアチニン値($p=0.0260$)、アポリポ蛋白E値($p=0.0256$)に相関を認めた。（表1）これらの因子について多変量解析を行ったところアポリポ蛋白E値（除外F値5.614）とBUN値（除外F値4.811）が有意な危険因子として挙がってきた。

ApoE>4.5mg/dl、BUN>19mg/dlをrisk groupとして設定すると非risk groupに比し有意に高率にアミロイドの沈着を認めた。（68%vs

33%）（表 2）

D. 考察

多発性骨髄腫においてアミロイドーシス合併は予後を左右する重要な因子であるが、どのような症例にアミロイドーシスが発症するのか明らかでない。従来よりアミロイドーシスは病期に関わりなく発症し BJP タイプ、λタイプに発症しやすい傾向は指摘されていたが、実際はそれ以外の例にも多く認める。平成 10 年度研究報告において、病期、BJP の有無、L 鎖の型は有意な危険因子とはならないことを報告した。一方アミロイドーシス治療において既に沈着したアミロイドを改善する有効な治療法は現時点ではない。骨髄腫が腫瘍であることを考えると腫瘍細胞を根絶しアミロイド原性蛋白を消失させることが根本的治療であることは明らかである。近年多発性骨髄腫に対し自家末梢血幹細胞移植（PBSCT）が行われ約 40%に長期緩解が得られた事からアミロイドーシス患者に対しても PBSCT が試みられるようになり予後の改善が期待される。しかしアミロイド沈着による臓器障害のため PBSCT 治療関連死がその場合の大きな問題である。多発性骨髄腫においてアミロイド沈着の危険因子を明らかにする事は治療選択の上で重要である。つまりアミロイドーシス危険群を特定し早期から厳重な観察が可能となることでアミロイドによる重篤な臓器障害が発症する前に積極的な治療を選択できるようになる。また現在 MGUS や病期 I の骨髄腫に対しては無治療観察が基本であるがこのような患者においてもアミロイド沈着、進行が早期に発見できれば早い段階での治療開始の指標となる。

今回 120 例の多発性骨髄腫患者を対象にアミロイド沈着危険因子を検討した結果、apoE と BUN が危険因子として明らかになり、apoE 高値 BUN 高値例において高率にアミロイド沈着が認められた。しかし既にアミロイドーシス症状を発症している 6 例についてのみ検討すると apoE 値はむしろ低値であった。一方 BUN 値は症状のないアミロイド沈着例に比し高値であった。（図 1）アミロイドーシス進行による臓器障害の結果がこれらの値に反映しているのではないかと思われる。ApoE はアミロイドのタイプに関わらずアミロイド沈着部に存在することが石原らによって示されており直接的ではないにしろアミロイド沈着に深く関与している可能性がある。今回血清 apoE 値が独立した危険因子であったことは興味深い結果である。

アミロイド原性蛋白と考えられる M 蛋白は今回の検討では有意な因子とはならなかった。しかし今回の検討は初診時ワンポイントの検査値によるものであり病期 II 以上の例は全例治療が行われており、多くの例では M 蛋白は速やかに減少している。このような経時的な要素を考慮する必要がある。この点については平成 11 年度アミロイドーシスに関する研究報告において遊離 L 鎖についての検討を報告したがここで改めて要点を記する。λ型骨髄腫において病初期からアミロイド沈着を認めた例は遊離λ値が極めて高値（平均 80.0mg/dl）であり全例 BJP 陽性であった。また骨髄腫罹病期間が 12 ヶ月以上の例においてアミロイド沈着例は非沈着例に比べ有意に遊離λ値が高値であった。（平均 36.9mg/dl vs 14.1mg/dl）つまり遊離λの量的負荷がアミロイド沈着の 1 要因である可能性がある。

今後多発性骨髄腫において apoE>4.5mg/dl、BUN>19mg/dl 例はアミロイド沈着危険群と考え特にλ型骨髄腫においては血中遊離λを参考に積極的にアミロイドの検査を行うべきである。

E. 結論

多発性骨髄腫においてアポリポ蛋白 E、BUN がアミロイド沈着の危険因子である。ApoE >4.5mg/dl、BUN>19mg/dl 例の 68%にア

ミロイド沈着を認め、アミロイド沈着 high risk 群と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 麻奥英毅、新美寛正、佐々木絢子、野村明子、加川大三郎、岩戸康治、許泰一：多発性骨髄腫に対する多剤併用大量化学療法を前処置とした PBSCT の検討. 第 24 回日本造血細胞移植学会総会、札幌市、12 月 20 日、平成 13 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

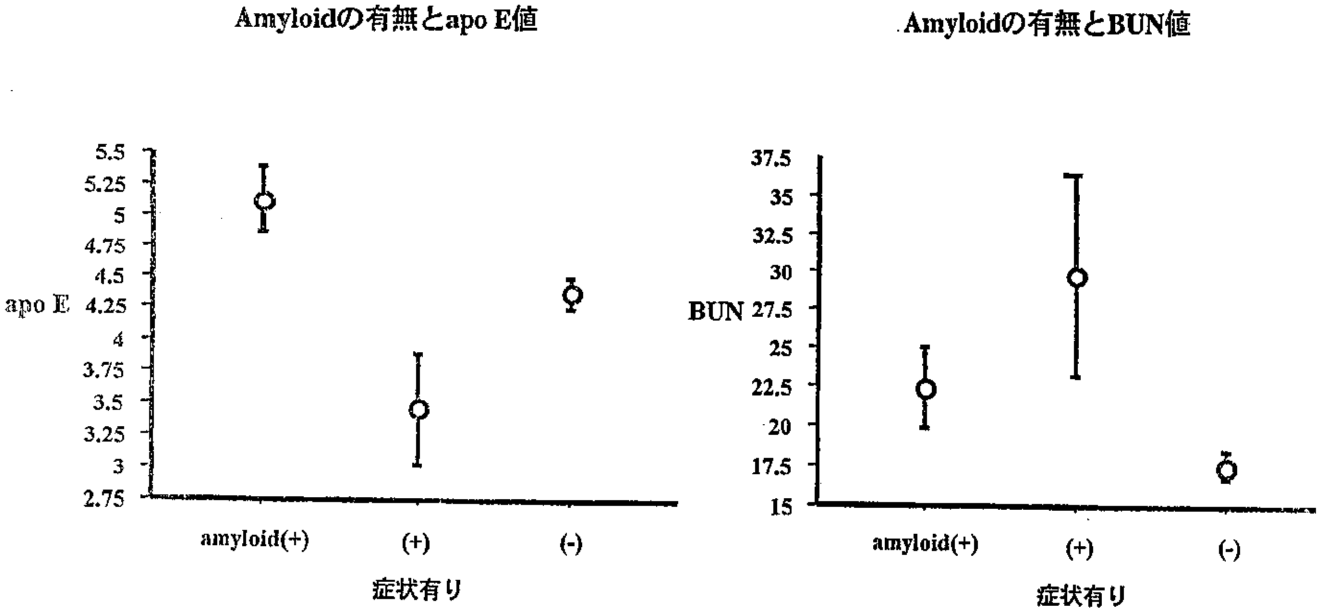
表1. アミロイド沈着危険因子単変量解析結果

因子	amyloid+ 平均値	amyloid- 平均値		p値	
TP	8.33	8.23	g/dl	0.5140	
Alb	3.68	4.28	g/dl	0.3107	
ZTT	36.58	26.60	U	0.0867	
Cho	172.38	171.93	mg/dl	0.7057	
TG	161.12	127.24	mg/dl	0.0285	*
BUN	23.21	17.95	mg/dl	0.0070	*
Cr	1.43	0.93	mg/dl	0.0220	*
CRP	0.58	1.12	mg/dl	0.2527	
apoA1	123.51	132.71	mg/dl	0.0927	
apoA II	24.67	26.06	mg/dl	0.2772	
apoB	95.10	91.34	mg/dl	0.8008	
apoC II	4.24	4.21	mg/dl	0.7202	
apoC III	9.20	9.27	mg/dl	0.7962	
apoE	4.93	4.44	mg/dl	0.0197	*
apoA II /A I	0.20	0.20		0.8450	
血清κ値	346.41	545.65	mg/dl	0.0592	
血清λ値	308.65	304.81	mg/dl	0.9536	
遊離κ値	8.41	8.72	mg/dl	0.4117	
遊離λ値	33.19	27.47	mg/dl	0.4283	

表2. riskによるamyloid沈着例頻度

risk		N	amyloid(+)	%
ApoE≧4.5	BUN≧19	22	15	68
ApoE≧4.5	BUN<19	36	12	33
ApoE<4.5	BUN≧19	20	6	30
ApoE<4.5	BUN<19	42	14	33

図1



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

心アミロイドーシスにおける洞房および房室結節への アミロイド沈着について

分担研究者　由谷親夫　　国立循環器病センター　臨床検査部病理
共同研究者　山路國弘，池田善彦
　　　　　　国立循環器病センター　臨床検査部病理

研究要旨　心電図やその他の電気生理学的検査を含めた臨床所見と対比させながら、心アミロイドーシスにおける洞房および房室結節へのアミロイド沈着の分布と局在に関してモルフォメトリーで検討した。対象は 1977 年 8 月から 1999 年 7 月まで、当センターで剖検されたアミロイドーシス例 23 例のうち、洞房および房室結節を検討し得た 17 例である。各標本において、両結節を 200 倍で観察し、5 視野を選択した。選択された 5 視野の総面積に対するアミロイドの沈着部位の面積率 (%D) は、画像解析装置を用いて算出した。結果は、心アミロイドーシスにおける不整脈や刺激伝導障害は、両結節へのアミロイド沈着の分布と局在に明確な関係が認められなかった。しかし、洞房結節に約 40～60%以上のアミロイドの沈着があれば洞機能不全症候群を発症し、房室結節に約 50～60%以上のアミロイドの沈着があれば房室ブロックを発症する可能性が示唆された。

A. 研究目的

免疫グロブリン性 (AL) アミロイドーシスは、アミロイドの中でも中心的な臨床病型であり、原発性と骨髄腫に伴う型の両方を含んでいる。AL アミロイドーシスの予後は反応性アミロイドーシスより悪く、多発性骨髄腫に伴う際にはさらに予後が悪い。しかも死因の 50%は心臓へのアミロイド沈着によるものである。心アミロイドーシスでは、不整脈や刺激伝導障害の頻度が高く、心不全や突然死を惹起しやすいことが知られている。これまで、心アミロイドーシスの刺激伝導系の病理組織学的検討はいくつか報告があるが、広範囲にアミロイドの沈着を認めるとするものから、比較的軽微であるという報告もあり、不整脈や刺激伝導障害がアミロイド沈着の結果か否かも明確でない。そこでわれわれの施設では、心電図やその他の電気生理学的検査を含めた臨床所見と対比させながら、心アミロイドーシスにおける洞房および房室結節へのアミロイド沈着の分布と局在に関してモルフォメトリーで検討した。

B. 研究方法

1. 対象

対象は 1977 年 8 月から 1999 年 7 月まで、当センターで剖検されたアミロイドーシス例 23 例のうち、洞房および房室結節を検討し得た 17 例である。平均年齢は、65.4±11.1 歳である。性別は、男性 12 例、女性 5 例である。17 例のうち不整脈や刺激伝導障害が認められない 4 例を対照 (C) 群とし、他の 13 例を不整脈 (AR) 群とした。AR 群 13 例を 1) 洞機能不全症候群 (SSS) 群 3 例、2) 房室ブロック (AV) 群 3 例、3) 脚ブロック群 9 例、4) 心房細動群 7 例、および 5) 心室頻拍

または心室細動群 4 例、の 5 群に重複を許して分類した。また、病理診断に基づいて、1) 免疫グロブリン性 (AL) アミロイドーシス 14 例(ALλ 群 11 例、ALκ 群 3 例)、2) 反応性 AA アミロイドーシス 3 例 (AA 群) に分類した。

2. 洞房および房室結節の切り出し

洞房結節は上大静脈と右心房接合部側面の分界溝に位置する。上大静脈から下大静脈にかけて割を入れる。上大静脈から分界溝をはさんで右心耳方向に長方形の組織片を切り出す。分界溝に対して垂直に約 5mm の幅で割を入れ、4〜6 個の短冊状の組織片を作製する。

房室結節は心房中隔基部にあり、Koch の三角の頂点にある。Eustachian valve と Tebesian valve の交点を左端とし、三尖弁後尖から卵円窩に向けて割を入れる。房室中隔膜性部より約 1cm 右側を右端として、三尖弁中隔尖から上方に向けて割を入れる。上端は卵円窩の下縁、下端は心室中隔膜性部から約 1 cm 下方として長方形の組織片を切り出す。心臓の長軸に沿って約 5mm の幅で割を入れ, 4〜6 個の短冊状の組織片を作製する。

各組織片に Hematoxylin and Eosin (HE) 染色を施行し、各結節が最も広範囲に認められる切片に対して、特殊染色（Masson trichrome (MT) 染色、Elastica Van Gieson (EVG)染色、および Congo red (CR) 染色）を施行した。

3. アミロイドの沈着部位の面積率 (%D)

HE および EVG 染色標本で両結節を同定し、CR 染色標本でアミロイドの沈着を確認した後、MT 染色標本で、両結節を 200 倍で観察し、5 視野を選択した。選択された 5 視野の総面積に対するアミロイドの沈着部位の面積率 (%D) は、画像解析装置を用いて算出した。そして、C 群と AR 群全体および AR 群各群の%D について比較した。また、ALλ 群、ALκ 群、および AA 群の各群の%D についても比較した。

C. 研究結果

1. 両結節の%D は、C 群と AR 群全体との間に差がなかった。

2. 洞房結節では、AV 群のみ C 群に比して%D が有意に大きかった($p < 0.05$)が、房室結節では、%D は C 群と AR 群各群との間に差がなかった。

3. 洞房結節では、%D は C 群と SSS 群の間に有意差は認められなかったが、SSS 群の方が C 群よりもアミロイドの沈着が高度である傾向が認められた（表 1)。また、房室結節では、%D は C 群と AV 群の間に有意差は認められなかったが、AV 群の方が C 群よりもアミロイドの沈着が高度である傾向が認められた（表 2)。

4. 両結節の%D は、ALλ 群、ALκ 群、および AA 群の間に有意差が認められなかったが、AL 群の方が AA 群よりもアミロイドの沈着が高度である傾向が認められた。

D. 考察

洞房および房室結節のアミロイドの沈着部位の面積率は、対照群と不整脈群全体との間に差がなかったことや、洞房結節では、房室ブロック群のみ対照群に比してアミロイドの沈着部位の面積率が有意に大きかったが、房室結節では、対照群と不整脈群各群との間に差がなかったことから、心アミロイドーシスにおける不整脈や刺激伝導障害と、洞房および房室結節へのアミロイド沈着の分布と局在に明確な関係が認められなかった。これは、対照群および不整脈群各群の症例数が小さかったために有意差が出なかったためと考えられる。

一方、洞房結節では、アミロイドの沈着部位の面積率は対照群と SSS 群の間に有意差は認められなかったが、SSS 群の方が対照群よりもアミロイドの沈着が高度である傾向が認められた。また、房室結節では、アミロイドの沈着部位の面積率は対照群と房室ブロック群の間に有意差は認められなかった

が、房室ブロック群の方が対照群よりもアミロイドの沈着が高度である傾向が認められた。このことから、洞房結節へのアミロイド沈着がSSS、そして房室結節へのアミロイド沈着が房室ブロックの発症にある程度寄与している可能性があると考えられる。

また、洞房および房室結節のアミロイドの沈着部位の面積率は、免疫グロブリン性アミロイドーシス（ALλ型）、免疫グロブリン性アミロイドーシス（ALκ型）、および反応性AAアミロイドーシスの間に有意差が認められなかったが、これも各群の症例数が小さかったために有意差が出なかったものと考えられる。しかし、免疫グロブリン性アミロイドーシスの方が反応性AAアミロイドーシスよりもアミロイドの沈着が高度である傾向が認められた。このことは、免疫グロブリン性アミロイドーシスの方がアミロイドの沈着が高度であるという一般的な傾向と一致していると思われる。

E. 結論

心アミロイドーシスにおける不整脈や刺激伝導障害は，洞房および房室結節へのアミロイド沈着の分布と局在に明確な関係が認められなかった。しかし、洞房結節に約40～60%以上のアミロイドの沈着があれば洞機能不全症候群を発症し、房室結節に約50～60%以上のアミロイドの沈着があれば房室ブロックを発症する可能性が示唆された。さらに、洞房および房室結節においても免疫グロブリン性アミロイドーシスの方がアミロイドの沈着が高度であるという一般的な傾向が認められた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
   なし
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

表1

洞房結節におけるSSS群と対照群のアミロイド沈着部位の面積率(%D)の比較

SSS群(%)	対照群(%)
54.6	33.9
69.9	25.6
54.3	42.7
	24.7
59.6±9.0	31.7±8.4

表2

房室結節における房室ブロック群と対照群のアミロイド沈着部位の面積率(%D)の比較

房室ブロック群(%)	対照群(%)
79.9	51.9
50.7	44.7
45.3	57.1
	21.1
58.6±18.6	43.7±15.9

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

原発性 AL アミロイドーシスにおける自己末梢血幹細胞移植を併用した melphalan 大量療法の一経験

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 松田正之*、五野貴久*、土肥尚子*、関島良樹*、多田剛**、
坂下一夫***、小池健一***
信州大学医学部、*第三内科、**脳神経外科、***小児科

研究要旨　消化管出血を主症状とし、VAD（vincristine, doxorubicin, dexamethazone）療法を 2 クール施行後に自己末梢血幹細胞移植（auto-PBSCT）を併用した melphalan 大量療法を行なって良好な治療効果が得られた原発性 AL アミロイドーシスの 1 例について報告した．本例では上部消化管内視鏡検査で胃から十二指腸にかけて易出血性の隆起性粘膜病変を多数認めたが、本治療施行後 3 か月には尿中 M 蛋白の消失とともに消化管病変の著明な改善が認められた．Auto-PBSCT を併用した melphalan 大量投与を含む強力な化学療法は、骨髄内の異常形質細胞を根絶して AL アミロイドの前駆物質である M 蛋白の産生を抑制することで本症の予後を改善させうると考えられており、患者の状態が許せば本邦でも今後積極的に考慮すべき治療である．

A. 研究目的

原発性 AL アミロイドーシスは確定診断からの平均余命が約 1 年と予後不良な難治性疾患である．最近欧米では本疾患に対して自己末梢血幹細胞移植（auto-PBSCT）を併用した melphalan 大量療法が行なわれ、良好な結果が報告されている．本症ではアミロイド沈着による臓器障害のため本療法のような強力な治療に耐えられうるか否かが各症例で問題となり、本邦ではまだ一般的治療には至っていないのが現状である．我々は消化管出血を主症状とし、auto-PBSCT を併用した melphalan 大量静注を含む強力な化学療法を本邦で初めて行ない、良好な結果が得られた症例を経験したので、その臨床経過について報告する．

B. 研究方法

1. 化学療法までの臨床経過

患者は 51 歳男性．2000 年 5 月頃から交代性の下痢と便秘が出現．9 月には Hgb 6.2 g/dl と著明な貧血を指摘されて近医に入院した．上部内視鏡検査で胃から十二指腸全域に易出血性の隆起性粘膜病変が多数認められ（Fig. 1A, B）、同部からの生検で AL アミロイドの沈着が確認された．小腸造影検査では回腸末端まで同様の粘膜病変が多発していた．尿中 Bence Jones 蛋白が陽性で血中 M 蛋白（IgG κ type）を認め（Fig. 2）、骨髄に形質細胞の異常増殖が見られなかったことから、原発性 AL アミロイドーシスと診断された．諸検査では他臓器へのアミロイドの明らかな沈着は認められなかった．10 月に精査治療目的で当科紹介となり第一回入院．腹壁脂肪吸引生検でアミロイドの沈着を認めた．H2 blocker の内服で貧血の進行は停止したが、便潜血陽

性は持続した. 2001 年 4 月、化学療法目的で当科に第二回入院となった.

2. 当科入院後の化学療法

学内倫理委員会の認可と患者からの informed consent を得た後、4 月下旬から VAD 療法 (vincristine, doxorubicin, dexamethazone) を 2 クール施行. 7 月中旬に cyclophosphamide (2 g/m^2)を投与後、G-CSF を使用して末梢血から造血幹細胞を採取した. 8 月末に melphalan (140 mg/m^2)を 2 日間に分けて投与し、その 72 時間後に幹細胞移植を施行した.

C. 研究結果

Melphalan 投与後 3 か月の上部消化管内視鏡検査で胃十二指腸全域にわたる易出血性粘膜病変の著明な改善が認められた (Fig. 1C, D). 免疫固定法で血中 M 蛋白は melphalan 投与後 3 か月の時点で軽度ながら残存しているものの、尿中 Bence Jones 蛋白は陰性化した (Fig. 2). VAD 療法施行後に一過性のカリニ肺炎を併発した他には、経過中に重篤な合併症は見られなかった. 12 月末に退院し、現在外来にて経過を観察中である.

D. 考察

原発性アミロイドーシスの治療には従来から melphalan と prednisolone の長期間歇経口投与 (MP 療法) や colchicine が用いられてきたが、生命予後を改善させるほどの十分な臨床効果は得られていない. 大多数の症例で血中あるいは尿中に M 蛋白が認められることから、本症の基礎的病態は骨髄中の B 細胞異常 (B cell dyscrasia) にあると考えられており、それを目標とした強力な化学療法が種々考案されている. その中で現在最も期待されている治療が auto-PBSCT を併用した melphalan 大量療法である. 本法は 140~200mg/m^2 の大量 melphalan の静脈内投与によって異常形質細胞を根絶し、その後であらかじめ採取しておいた自己末梢血幹細胞を輸注して骨髄の再構築をはかる治療法である. 欧米ではすでに 200 例以上に本治療が行なわれ、完全寛解率が約 50%と良好な結果が報告されている. しかし本治療では melphalan の毒性による口内炎などの副作用や高度の骨髄抑制による感染症などの重篤な合併症に加えて、アミロイド沈着に起因する臓器機能障害があるため本症進行例ではかえって予後を悪くしてしまう可能性があり、本邦ではまだ一般的治療とはなっていない.

我々は今回、消化管出血を主症状とする原発性 AL アミロイドーシスの患者に対し、本邦で初めて auto-PBSCT を併用した melphalan 大量療法を施行した. 3 か月を経過して M 蛋白は血中で微量ながら残存しているものの尿中では消失しており、便潜血は陰性化して内視鏡検査では消化管病変の明らかな改善が認められている. 本患者の治療にあたっては melphalan の投与量と前治療の点で欧米で行なわれている手法に若干の工夫を加えた. まず melphalan の投与量については、肝臓・心臓・腎臓などの重要臓器に明らかな機能障害はなかったものの高度の消化管病変を本患者が有していたことから、欧米で通常用いられている 200 mg/m^2 では出血の危険性が高いと判断し、骨髄を確実に廃絶させられうる最低量として 140 mg/m^2 を用いた. また欧米からの報告では本治療によって寛解状態に至ってから再発する症例があるため、患者から造血幹細胞を採取する前に VAD 療法 (vincristine, doxorubicin, dexamethazone) を 2 クール施行した. VAD 療法は多発性骨髄腫に対して開発された化学療法で、最近は原発性 AL アミロイドーシスに対しても用いられ良好な結果が報告されている. アルキル化薬を含まないため造血幹細胞の採取に悪影響を及ぼすことがなく、骨髄内の異常形質細胞に対する効果は MP 療法より強力であるとされている. Melphalan 大量療法前に VAD 療法を行ない骨髄内の異常形質細胞を減らしておくことで、auto-PBSCT 後の再発率を減らしうることが期待され、今後症例を増やして検

討していきたいと考えている.

E. 結論

原発性 AL アミロイドーシスにおける自己末梢血幹細胞移植を併用した melphalan 大量投与を含む強力な化学療法は、本症による臓器障害を悪化させる危険性はあるものの患者を選べば有用で、今後本邦でも積極的に考慮されるべきである.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) Mochizuki H, kamakura K, Masaki T, Hirata A, Tokuda T, Yazaki M, Motoyoshi K, Ikeda S: Nodular cutaneous amyloydosis and carpal tunnel syndrome due to amyloidogenic transthyretin His 114 variant. Amyloid:J.Protein Folding Disord 8:105-110, 2001
2) Owa M, Sakurai S, Sato S, Takei Y, Katsuyama Y, Ohata S, Kawasaki S, Ikeda S: Tacrolimus related brady and tachyarrhythmias in a familial amyloid polyneuropathy patient who underwent partial liver transplantation. Jpn J Pharm Health Care Sci 27:495-498, 2001
3) Sekijima Y, Tokuda T, Kametani F, Tanaka K, Maruyama K, Ikeda S: Serum transthyretin monomer in patients with familial amyloid polyneuropathy. Amyloid:J.Protein Folding Disord 8:257-262 2001
4) Tokuda T, Tamaoka A, Matsuno S, Sakurai S, Shimada H, Morita H, Ikeda S: Plasma levels of amyloid b nproteins did not differ between subjects taking statins and those not taking statins. Ann Neurol 49:546-547, 2001
5) 池田修一：家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP) －その発生機序と新しい治療－. 脳の科学 23:637-646, 2001
6) 池田修一：遺伝性ニューロパチー アミロイドポリニューロパチー. 内科 87:701-707, 2001
7) 池田修一：家族性アミロイドーシスとアフェレシス、肝移植. 日本アフェレシス学会雑誌 20:152-158, 2001
8) 池田修一：代謝性疾患の肝移植と QOL. 肝臓 42:76-32, 2001
9) 池田修一：家族性アミロイドポリニューロパチー. 神経治療学 18:107-115, 2001
10) 関島良樹, 池田修一：アルツハイマー病原因と危険因子. からだの科学 218:41-47, 2001
11) 関島良樹, 池田修一：アルツハイマー病の危険因子とその予防. CLINICIAN 498:18-24, 2001
12) 高津亜希子, 金井 誠, 北 直子, 小原みほ子, 長谷川晶子芦田 敬, 千須和寿直, 川崎誠治, 池田修一, 小西郁生：Castleman リンパ腫による続発性アミロイドーシス合併妊娠. 日本産科婦人科学会 関東連合地方部会会報 38:371-376, 2001
13) 徳田隆彦：アルツハイマー型痴呆とアポリポ蛋白 E. 総合臨床 51:11-18, 2001
14) 松田正之, 池田修一：免疫とアミロイドーシス －AL および AA アミロイドーシスについて－. 日本臨床免疫学会会誌 24:319-326, 2001
15) 池田修一：家族性アミロイドニューロパチー(FAP). 市田文弘, 市田隆文編、臨床肝臓病[改訂版 3 版]. pp303-307、日本メディカルセンター、東京、2001
16) 池田修一：脳アミロイドアンギオパチー. 東儀英夫編､別冊 医学のあゆみ 脳血管障害 －臨床と研究の最前線. pp70-73、医歯薬出版、東京、2001
17) 関島良樹, 池田修一：アルツハイマー病原因と危険因子. 黒田敏正編、からだの科学. pp41-47、日本評論社、東京、2001

2. 学会発表

口頭発表

1) 池田修一：家族性アミロイドニューロパチー：肝移植後の末梢神経病変．第 12 回日本末梢神経学術集会、大阪、8 月 25 日、2001
2) 小林佐千夫，森田　洋，橋本隆男，武井洋一，池田修一：家族性アミロイドポリニューロパチー（FAP）に対する肝移植の治療効果に関する神経生理学的検討．第 42 回日本神経学会総会、東京、5 月 11 ～13 日、2001
3) 徳田隆彦，大出貴士，池田修一，中村明宏，樋口京一：トランスサイレチンアミロイドに共沈着するアポリポ蛋白 E の主体はその C 末端断片ペプチドである．第 42 回日本神経学会総会、東京、5 月 11～13 日、2001
4) 服部　健，武井洋一，徳田隆彦，池田修一，中里雅光，安東由喜雄，祖父江　元：本邦における non-Met30 型 FAP の臨床病理像．第 42 回日本神経学会総会、東京、5 月 11～13 日、2001
5) 関島良樹，徳田隆彦，池田修一，亀谷富由樹，田中喜久子，泉山洋子，有馬邦正：トランスサイレチン（TTR）部分ペプチドの TTR アミロイド線維形成抑制効果に関する検討．第 42 回日本神経学会総会、東京、5 月 11～13 日、2001
6) 大出貴士，徳田隆彦，池田修一，高橋均：中枢神経系血管炎を伴う脳アミロイドアンギオパチーの臨床病理学的検討．第 42 回日本神経学会総会、東京、5 月 11 ～13 日、2001
7) 池田修一，矢崎正英，武井洋一：成人型シトルリン血症の臨床像と肝移植の治療効果．第 42 回日本神経学会総会、東京、5 月 11～13 日、2001

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