

る遺伝子群 (ATF-4, Calreticulin, CHOP, XBP-1) が発現しており、通常の培養状態でも小胞体ストレスが骨髄腫細胞に負荷されていることが示された (図3)。骨髄腫細胞株、患者骨髄腫細胞に小胞体ストレス誘導薬剤 (TG) を添加するとアポトーシスが誘導された (図4)。

#### D. 考察

今回の検討では、以下の点が確認された。1 : 骨髄腫細胞には血管新生促進因子 (VEGF, Angiopoietin) が発現しており、VEGF<sub>165</sub> の発現は予後不良因子である。2 : 一酸化窒素合成酵素阻害剤は、VEGF の産生を阻害することにより血管新生を抑制し、抗腫瘍効果を発揮する。3 : 骨髄腫細胞には小胞体ストレスが内在し、これを増強することでアポトーシスの誘導が可能である。以上より、骨髄腫細胞に対して、既存の抗癌剤による治療以外にも、一酸化窒素合成酵素阻害、小胞体ストレスを介した治療法の可能性が示された。

一般に、AL アミロイドーシスでは、臨床像からみて骨髄腫に比べて形質細胞の増殖能は低いと思われる。この説明として、アミロイド変成する M 蛋白が、その産生源である形質細胞に何らかの増殖抑制効果を与えている可能性があり、これが小胞体ストレスである可能性を今後検討したい。

#### E. 結論

AL アミロイドーシスは形質細胞が原因である。今後、AL アミロイドーシス患者由来形質細胞を用いて、形質細胞が血管新生促進因子を発現するか、小胞体ストレスの負荷が存在するか、小胞体ストレスの誘導に感受性を示すかを検討し、新規治療法への応用の可能性を探る予定である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Uneda S, Hata H, Matsuno F, Nagasaki A, Harada N, Mitsuuya Y, Matsuzaki H, Mitsuya H: A nitric oxide synthase inhibitor, NG-nitro-l-arginine-methyl-ester, exerts potent antiangiogenic effects on plasmacytoma in a newly established multiple myeloma sever combined immunodeficient mouse model. Br J Haematol 120: 396-404, 2003.

2) Uneda S, Matsuno F, Sonoki T, Taniguchi I, Kawano F, Hata H: Expressions of vascular endothrial growth factor and angiopoietin-2 in myeloma cells. Haematologica 88: 113-115, 2003.

3) Uneda S, Hata H, matsuno F, Harada N, Mitsuya Y, Kawano F, Mitsuya H: Macrophage inflammatory protein-1 alpha is produced by human multiple myeloma (MM) cells and its expression correlates with bone lesions in patients with MM. Br J Haematol 120: 53-55, 2003.

##### 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

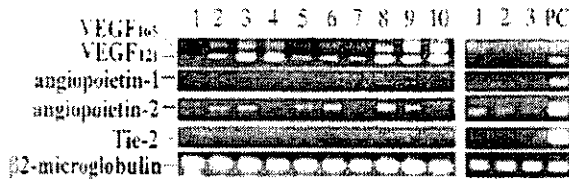


図 1：患者骨髄腫細胞における血管新生関連遺伝子の発現 (RT-PCR)。左 1-10：患者骨髄腫細胞、右 1-3：反応性形質細胞増加症由来形質細胞、PC：positive control (ヒト臍帯由来血管内皮細胞)

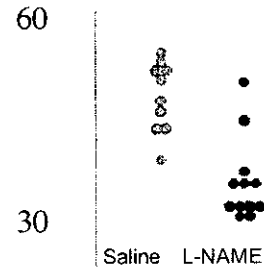


図 2c：L-NAME は腫瘍内 VEGF 濃度を減少させる。縦軸：腫瘍内 VEGF (pg/ml)

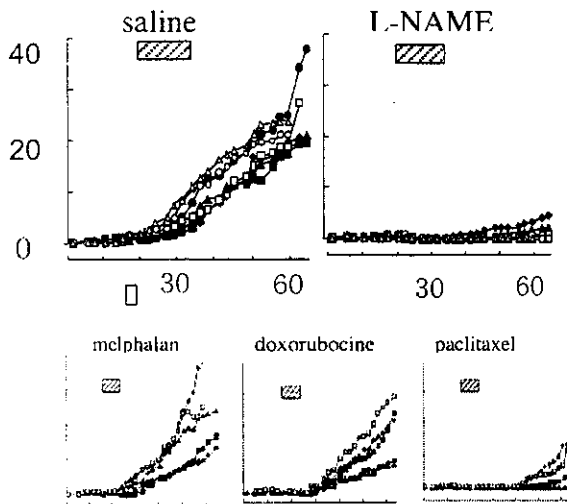


図 2 a：マウスモデルにおける L-NAME の抗腫瘍効果

縦軸：腫瘍容積 (X 10<sup>3</sup>ml) □ 横軸：移植後日数

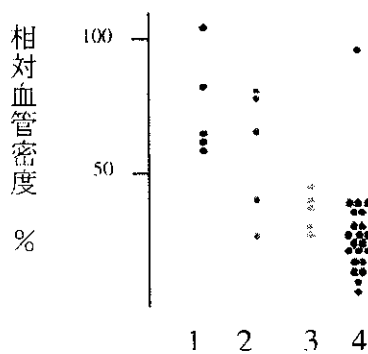


図 2 b：L-NAME の血管新生抑制効果

1: Doxorubicin, 2: Melphalan, 3: paclitaxel, 4: L-NAME

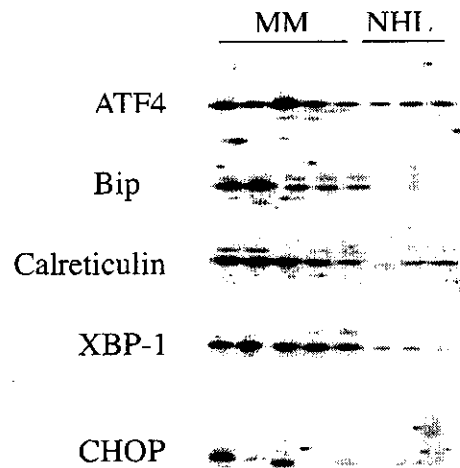


図 3：骨髄腫細胞株には小胞体ストレス関連遺伝子が発現している。Northern Blot による検討。MM: 骨髄腫細胞株、NHL:リンパ腫細胞株。

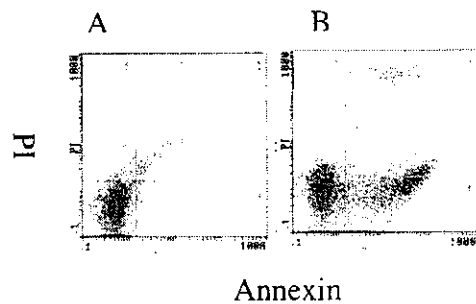


図 4：小胞体ストレス負荷は骨髄腫細胞へアポトーシスを誘導する。Annexin/PI 染色による。細胞：骨髄腫細胞株 KMS-12-PE。A:control, B: Thapsigargin 添加 24 時間後。

厚生労働科学研究費補助金 (特定疾患対策研究事業)  
 アミロイドーシスに関する調査研究 分担研究報告書

<分科会報告>

原発性 AL アミロイドーシスに対する自己末梢血幹細胞移植を併用した  
 メルファラン大量静注療法の治療指針

分担研究者 池田修一 信州大学医学部第三内科  
 今井浩三 札幌医科大学医学部第一内科  
 下条文武 新潟大学大学院医歯学総合研究科内部環境医学講座  
 腎・膠原病内科分野  
 麻奥英毅 広島赤十字・原爆病院輸血部  
 満屋裕明 熊本大学医学部第二内科  
 共同研究者 松田正之 信州大学医学部第三内科

研究要旨 原発性 AL アミロイドーシスに対して、欧米を中心に最近広く行なわれ始めている自己末梢血幹細胞移植 (auto-PBSCT) を併用したメルファラン大量静注療法を本邦でも普及させ患者の福音に資することを目的として、本療法の治療指針を作成した。本症は診断がついた時点ですでに高度の臓器障害が見られることが多く、欧米では治療死に至る症例もあるため、本邦で広く行なうのにあたって当面は適応患者の選択基準を厳格にすることにした。治療は 2 クールの VAD を用いた導入療法後、エトポシドを用いて末梢血幹細胞を採取し、最後にメルファラン大量静注 (140 mg/m<sup>2</sup>) と auto-PBSCT を施行する。治療期間は順調にいったら 6 か月を要する。本療法を施行した患者は全例について個人調査票を作成し、アミロイドーシス調査研究班としてその有用性と合併症について検討する。

A. 研究目的

原発性 AL アミロイドーシスは免疫グロブリンの light chain から形成されるアミロイド蛋白が全身の諸臓器に沈着し、心不全・腎不全・末梢神経障害・消化管機能不全などを呈して、診断からの平均余命が約 1 年から 2 年と予後不良な難治性疾患である。本症に対しては自己末梢血幹細胞移植 (autologous peripheral blood stem cell transplantation, auto PBSCT) を併用した melphalan 大量静注療法の有用性が最近注目されており、欧米ではすでに標準的治療になりつつある。本療法が本邦でも広く行なわれ患者の福音に資することを目的として、全国複数の施設で施行可能な共通の治療プロトコールを作成した。

原発性 AL アミロイドーシスの診断には、全身諸臓器に AL アミロイドの沈着を認めることと、原因となる基礎疾患あるいは共存する合併症がないことを証明することが必要である。

具体的には複数の臓器からの生検組織でアミロイドの沈着を確認し、かつ少なくとも一つの臓器ではそれが AL アミロイドであることを免疫組織学的に証明する。生検部位としては消化管 (胃・直腸) が簡便かつ有用である。免疫組織学的検討は山口大学第一病理に依頼する。

原因となる基礎疾患、特に多発性骨髄腫の有無を調べるために骨髄穿刺は必ず行なう。穿刺部位は可能な限り胸骨とし、形質細胞数の正確な算定には有核細胞数が 50,000/mm<sup>3</sup> 以上であることが望ましい。Kyle の monoclonal gammopathies with unknown significance (MGUS) の診断基準 (1992) を満たすことを確認する。

B. 治療指針

1. 診断

## 2. 適応基準

以下の11項目を全て満たす場合に本療法の適応とする。

- 1) 65歳以下
- 2) 血中あるいは尿中に免疫固定法でM蛋白を認める。
- 3) Performance status がgrade 2以下（起き上がっている時間が1日の50%以上）\*
- 4) 明らかな心不全徴候がない
- 5) 心臓超音波評価  
LVEF 45%（あるいは%FS 38%）以上  
PVF D/S 0.85以下  
TMF E/A 0.99以下
- 6) 収縮期血圧 90mmHg以上
- 7) 酸素飽和度 95%以上（room airにて）
- 8) 血清クレアチニン 2mg/dl以下
- 9) 血清ALP 正常値上限の3倍以下
- 10) 血清直接ビリルビン 2mg/dl以下
- 11) 治療に支障をきたすような慢性疾患（特に呼吸器および神経系の疾患、重度の糖尿病）がない。

\*South Western Oncology Group (SWOG) の performance statusによる。

## 3. 治療プロトコール (図1)

- 1) 導入療法  
VAD療法 (図2) を2クール施行する。
- 2) PBSCの採取  
Etoposideを投与後、G-CSFを使用してPBSCを採取する。臓器障害のためetoposideの投与が困難な場合にはG-CSFを単独で使用しても可とする。
- 3) Melphalan大量静注療法  
Day -3とday -2に2日間にわたって70 mg/m<sup>2</sup>/day ずつ（合計で140 mg/m<sup>2</sup>）を静注する。
- 4) Auto PBSC  
Melphalanの投与終了後48時間 (day 0)で施行する。
- 5) 後療法  
行なわない。

## 4. 治療前後での検査および評価

M蛋白産生能と全身の臓器機能について治療の前後で評価を行なう。M蛋白の産生能は骨髓中の形質細胞数、flow cytometryで検出される異常形質

細胞、血中・尿中におけるM蛋白（免疫固定法）とfree light chainについて検討する。

## 5. データ管理

本療法を行なった患者については全例で個人調査票を作成し、そのデータはアミロイドーシス調査研究班として信州大学第三内科で一括して管理する。個人調査票および治療と検査の詳細についてのプロトコールは、適応患者があった時点で信州大学第三内科から送付する。

（倫理面への配慮）

本療法施行前に学内の倫理委員会の承認を得る。患者には本疾患の予後、従来からの治療法、本療法で期待できる治療効果と合併症について説明し、書面で了解を得る。

## C. 健康危険情報

なし

## D. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Gono T, Matsuda M, Dohi N, Sekijima Y, Tada T, Sakashita K, Koike K, Kadosaka S, Ikeda S. Gastrointestinal lesions in primary AL amyloidosis. *Gastrointest Endosc* 56: 563, 2002
- 2) Gono T, Matsuda M, Dohi N, Hoshi K, Tada T, Sakashita K, Koike K, Aizawa M, Ikeda S. Nephrotic syndrome due to primary AL amyloidosis, successfully treated with VAD and subsequent high-dose melphalan followed by autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Intern Med* (in press)

### 2. 学会発表

なし

## E. 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

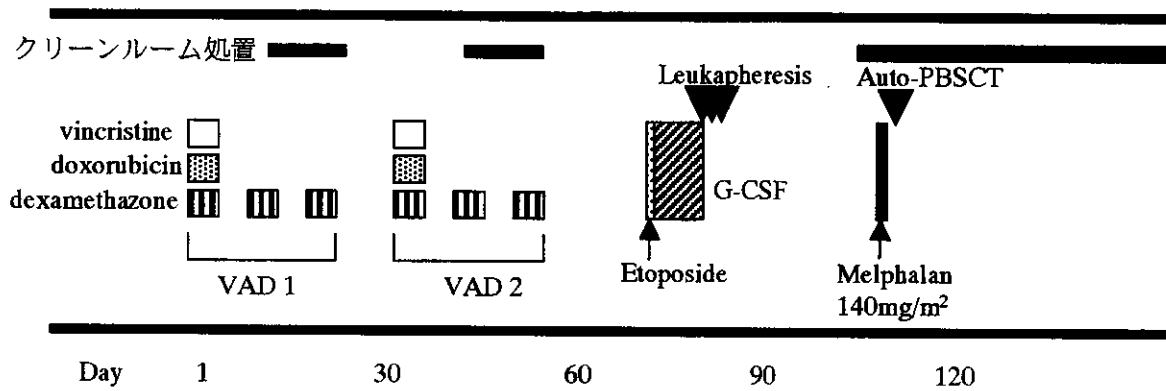


図1. 自己末梢血幹細胞移植を併用したメルファラン大量静注療法のプロトコール。治療開始前に全身精査期間が約1ヵ月、auto-PBSCT後のクリーンルーム期間が約1ヵ月。したがって全治療期間は順調に経過して約6ヵ月になる。幹細胞採取前のpretreatmentはetoposide 250mg/m<sup>2</sup>/day 4日。Melphalanは140mg/m<sup>2</sup>を2日間に分けて投与する。後療法は行なわない。

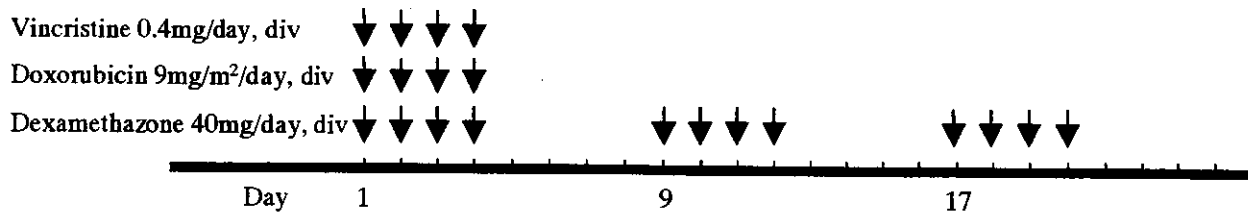


図2. VAD療法のプロトコール。1ヵ月で1クール。Day 14付近で白血球減少がピークに達する。感染症とglucocorticoid-induced fluid retentionに注意が必要。

厚生労働科学研究費補助金 (特定疾患対策研究事業)  
 アミロイドーシスに関する調査研究 分担研究報告書

メガリン発現細胞を用いた透析アミロイドーシスの予防療法を  
 開発するための基礎的検討

分担研究者 下条文武 新潟大学大学院医歯学総合研究科内部環境医学講座  
 共同研究者 斎藤亮彦 同上

研究要旨 透析アミロイドーシスは、長期透析患者において、尿毒素蛋白  $\beta_2$ -microglobulin ( $\beta_2$ -m)の蓄積によって発症する合併症である。エンドサイトーシス受容体メガリンは $\beta_2$ -mを結合することが知られているが、本研究において、私たちは、メガリン発現性ラット L2 細胞が、メガリン依存性に  $^{125}$ I 標識  $\beta_2$ -m の取り込み・代謝を行うことを見いだした。さらにその機能を腎不全時のアミロイドーシスの予防に応用するために、血管新生因子の徐放化とコラーゲン scaffold を用いた L2 細胞の皮下移植システムを開発した。ヌードマウスに L2 細胞を移植し両腎を摘出した後、 $^{125}$ I 標識  $\beta_2$ -m を腹腔内注射し、経時的に、移植細胞および各種臓器の取り込みと血中の標識  $\beta_2$ -m 濃度の推移を評価した。その結果、移植された L2 細胞腫は、肝、肺、心、骨格筋などの臓器・組織に比較して有意に標識  $\beta_2$ -m を取り込み、対照群に比較して、細胞移植群において、 $^{125}$ I 標識  $\beta_2$ -m の血中濃度は有意に低下することを見いだした。この結果は、メガリン発現細胞の皮下移植が、腎不全において  $\beta_2$ -m の除去に役立つ可能性を示している。

A. 研究目的

透析アミロイドーシスを惹起する尿毒素蛋白  $\beta_2$ -microglobulin ( $\beta_2$ -m)を結合することが知られているメガリンが、その細胞取り込み・代謝(エンドサイトーシス)に関わる受容体であるか検討する。さらに、そのようなメガリンの機能を用いて、腎不全において蓄積する  $\beta_2$ -m を取り除くための細胞移植療法を開発する基礎的検討を行う。

B. 研究方法

1. 細胞取り込み・代謝実験

0.1%滅菌ゼラチンをコートした 12 穴カルチャープレートに、DMEM+10% FCS 培地を用いて、メガリン発現性ラット卵黄嚢由来 L2 細胞を confluent に培養した。培養上清を除去し、DMEM+0.1% BSA で洗浄した後、 $^{125}$ I 標識  $\beta_2$ -m (1.0  $\mu$ g/ml in DMEM+0.1% BSA) を添加し、37°C で 3 時間培養後、その細胞取り込み・代謝を評価した。その際、ポリクローナル抗メガリン抗体、およびメガリンのリガンド結合を特異的に抑制する蛋白 receptor associated protein (RAP)(GST 融合蛋白

として作成)により、 $\beta_2$ -m の取り込み・代謝が阻害されるか検討した。

2. L2 細胞移植

血管新生因子 basic fibroblast growth factor (bFGF)をゼラチンビーズに含浸させ、コラーゲンスポンジ (1×1×0.5 cm) をヌードマウスに皮下移植した。1 週間後、そのコラーゲンスポンジを scaffold (細胞生着のための足場) として L2 細胞 (5×10<sup>6</sup> 個) を注入し、細胞腫瘍を形成させた。2 週間後、移植細胞でのメガリンの発現を、ポリクローナル抗メガリン抗体を用いた免疫組織化学によって検討した。

3. L2 細胞移モデルにおける  $^{125}$ I 標識  $\beta_2$ -m のクリアランスの評価

上記のように L2 細胞移植を行って、2 週間後、背側から両腎を摘出し腎不全状態を作出した。 $^{125}$ I 標識  $\beta_2$ -m (2.8  $\mu$ g) を腹腔内注射し、3、6、12 時間後、麻酔下で左心室からの生理食塩水の環流にて屠殺し、移植細胞および各種臓器の取り

込みと血中の標識  $\beta_2\text{-m}$  濃度の推移を評価した。移植細胞腫では histoautoradiography によって細胞での  $^{125}\text{I}$  標識  $\beta_2\text{-m}$  の取り込みを評価した。

なお本研究における実験動物の扱いについては、十分な麻酔処置に基づき、愛護的に行った。

### C. 研究結果

L2 細胞を用いた *in vitro* アッセイにおいて、 $^{125}\text{I}$  標識  $\beta_2\text{-m}$  の取り込み・代謝は、抗メガリン抗体および RAP によって抑制された (図 1)。すなわち L2 細胞は、メガリン依存性に  $\beta_2\text{-m}$  を取り込み、代謝することが明らかになった。

そこで L2 細胞を上記の方法を用いてヌードマウスの皮下組織に移植した。なお上記の方法によらず、単に皮下に注入した場合は、L2 細胞の生着は不十分であった。移植された L2 細胞は、2 週間で約直径 3 cm 大の腫瘤を形成した。移植 L2 細胞は免疫組織化学的にメガリンを発現していることが示された。

L2 細胞を移植し 2 週間後、 $^{125}\text{I}$  標識  $\beta_2\text{-m}$  を腹腔内に注射したところ、移植細胞は histoautoradiography により、 $^{125}\text{I}$  標識  $\beta_2\text{-m}$  を取り込むことが示された (図 2)。さらに移植細胞腫は、肝、肺、心、骨格筋に比較して有意に  $^{125}\text{I}$  標識  $\beta_2\text{-m}$  を取り込むことが明らかになった (図 3)。また、対照群に比較して、細胞移植群では、 $^{125}\text{I}$  標識  $\beta_2\text{-m}$  の血中濃度が有意に低下した (図 4)。

### D. 考察

$\beta_2\text{-m}$  をはじめとする低分子量の尿毒素蛋白を除去することは、現在の透析療法の重要課題である。そのためにハイパーパフォーマンス透析膜や  $\beta_2\text{-m}$  吸着カラムなどが開発されているが、それらを用いる血液透析療法が間欠的治療である以上、尿毒素蛋白の除去は一時的なものであり、未だ不十分といわざるをえない。そこで、そのような透析療法の弱点を補う持続的な補助療法の開発が望まれる。

メガリンは LDL 受容体ファミリーに属し、近位尿細管上皮細胞の管腔側に豊富に発現する一種のスキャベンジャー受容体である。メガリンは糸球体を濾過する様々な低分子量蛋白を結合し、エンドサイトーシスによってそれらを細胞内に取

り込み、リソゾームに運搬して分解するという機能を有する。すなわち、腎不全患者で蓄積する様々な低分子量蛋白を除去するための一種の分子ツールとして、有望なものと考えられる。私たちは本研究において、メガリン発現細胞が腎不全状態の生体内で、 $\beta_2\text{-m}$  を代謝・除去し、透析アミロイドーシスを予防する治療に応用できる可能性をはじめて示した。本研究に用いたメガリン発現細胞は腫瘍細胞由来であり、直接臨床応用に結びつけることはできない。しかし今後、非腫瘍性で免疫原性が低く、メガリンをより発現する細胞を作成することによって、臨床応用性を高めることが可能となろう。また、細胞に対する血液供給を増加させる手技を開発することによって、さらにその効率を高めることも期待される。

本研究で開発された方法はまた、保存期腎不全患者の腎機能の温存にも役立つ可能性がある。なぜならば、保存期腎不全患者において、残存ネフロンには蛋白代謝の負荷がかかり、それがその障害を促進する一因になるからである。

今後は、本研究の結果を臨床に応用するための課題の克服に取り組む予定である。

### E. 結論

メガリン発現細胞の移植は、腎不全において、 $\beta_2\text{-m}$  を代謝・除去し、透析アミロイドーシスを予防する治療に応用できる可能性がある。

### F. 健康危険情報

なし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1) 斎藤 亮彦、下条 文武、田畑 泰彦: 血管新生因子の DDS を用いて細胞移植-腎の蛋白代謝機能を代謝する細胞移植療法の開発をめざして- 遺伝子医学、6(3): 59-62, 2002.

2) 斎藤 亮彦、竹田 徹朗、下条 文武: 近位尿細管における蛋白の再吸入-多機能エンドサイトーシス受容体 megalin および cubilin の役割- 腎と透析、53(5): 563-568, 2002.

#### 2. 学会発表

1) Akihiko Saito, Rhoji Nagai, Seiko Horiuchi, Fumitake Gejyo: Role of megalin in the endocytosis of advanced glycation endproducts (AGE). 11th International Congress on Nutrition and Metabolism in Renal Disease, Nagoya, 2002.3.31.

2) 斎藤 亮彦、風間 順一郎、飯野 則昭、長賢治、小山 裕子、田畑 泰彦、下条 文武: megalin 発現細胞の皮下移植による尿毒素蛋白代謝モデルの開発. 日本再生医療学会総会、京都、4月19日、2002年.

3) 斎藤 亮彦、風間 順一郎、飯野 則昭、張賢治、小山 裕子、竹田 徹朗、田畑 泰彦、下条 文武: メガリン発現細胞の皮下移植による

尿毒素蛋白代謝モデルの開発. 日本腎臓学会学術総会、大阪、5月25日、2002年.

4) 斎藤 亮彦、風間 順一郎、竹田 徹朗、下条 文武、田畑 泰彦: メガリン発現細胞移植による尿毒素蛋白代謝療法を開発する試み. 日本人工臓器学会、札幌、10月2日、2002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。



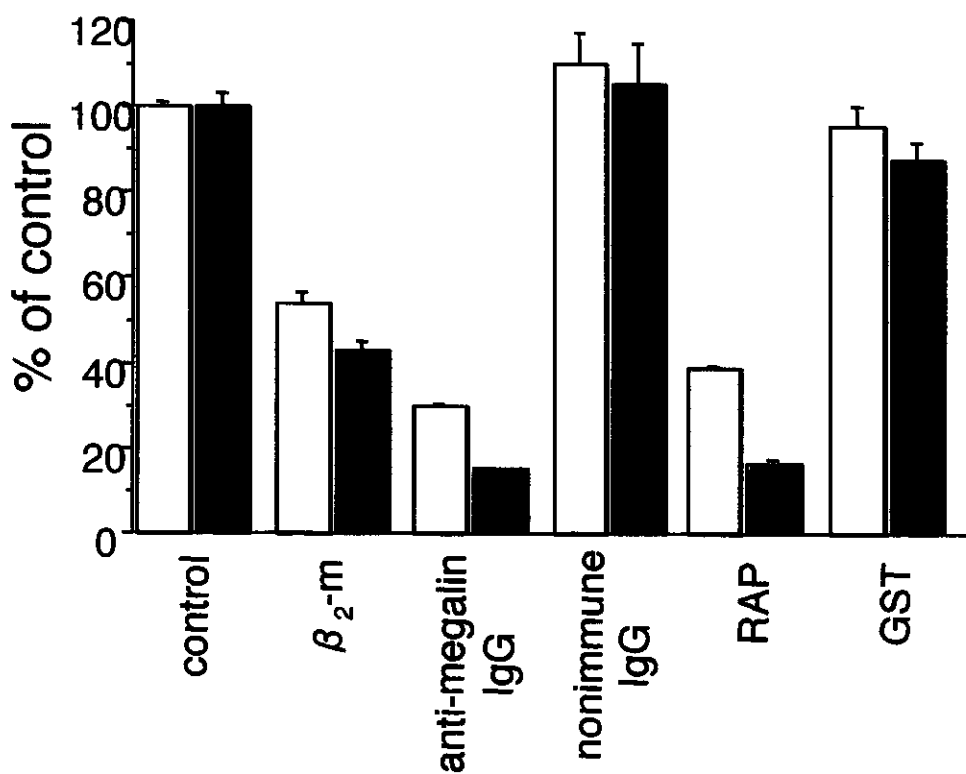


図1.  $^{125}\text{I}$ 標識  $\beta_2$ -mを用いたL2細胞の取り込み(cell association □)および代謝(degradation ■)

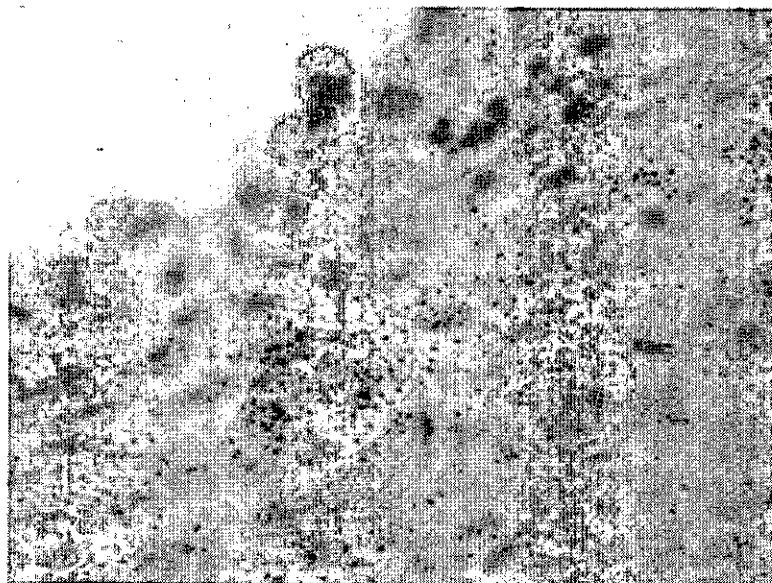


図2.  $^{125}\text{I}$ 標識  $\beta_2$ -m注射後の移植細胞組織でのhistoautoradiography

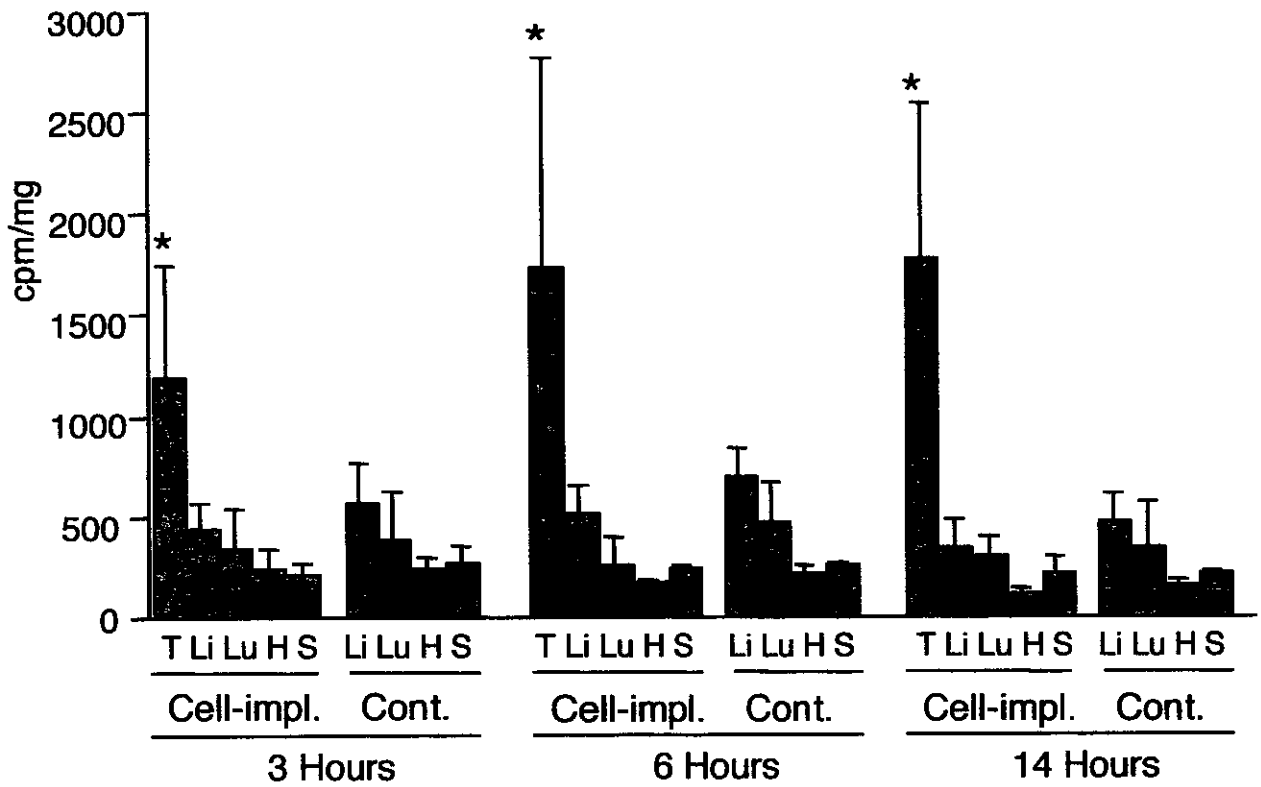


図3.  $^{125}\text{I}$ 標識  $\beta_2\text{-m}$ 注射後のL2細胞移植群(Cell-impl.)、非移植群(Cont.)での移植細胞腫(T)、肝(Li)、肺(Lu)、心(H)、骨格筋(S)の放射線取り込み。\*  $p < 0.01$

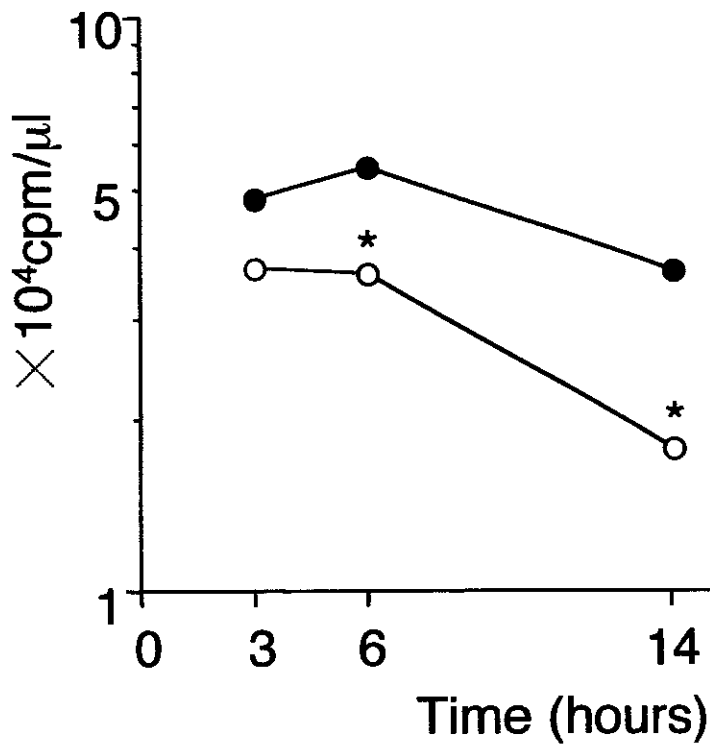


図4.  $^{125}\text{I}$ 標識  $\beta_2\text{-m}$ 注射後のL2細胞移植群(○)、非移植群(●)における血液中 $^{125}\text{I}$ 標識  $\beta_2\text{-m}$ 濃度の推移。\*  $p < 0.01$

厚生労働科学研究費補助金 (特定疾患対策研究事業)  
 アミロイドーシスに関する調査研究 分担研究報告書

## β2-ミクログロブリンのフォールディングとアミロイド線維形成

分担研究者 内木宏延 福井医科大学医学部第2病理

共同研究者 後藤 祐児\*、星野 大\*、長谷川 一浩\*\*

\*大阪大学蛋白質研究所、\*\*福井医科大学第2病理

**研究要旨** 蛋白質の天然構造がこわれたり、まちがったフォールディングが原因で病気が引き起こされる例が見つかり、フォールディング病と呼ばれる。これらの代表的なものにアミロイドーシスがある。β2-ミクログロブリン(β2-m)は、長期血液透析患者において、しばしばアミロイド線維を形成し障害をおこす。β2-mは99アミノ酸残基から構成される小さな蛋白質であり、蛋白質の立体構造解析を行うことが比較的容易と期待される。そこで酵母で発現したヒトβ2-mを用いてアミロイド線維の構造物性を、核磁気共鳴スペクトルを用いて研究した。その結果、アミロイド線維では、N末端、C末端を除く広範囲の領域がβシートを形成しており、極めて剛直な構造となっていることが示された。

### A. 研究目的

アミロイド線維は、蛋白質科学において大きなトピックスとなっている。蛋白質には遺伝子配列によって規定される唯一の機能的立体構造(天然構造)があると考えられてきた。しかし今日、蛋白質の立体構造は従来考えられてきた以上に“動的”であることがわかっている。その代表がアミロイド線維である。アミロイドは、プリオン蛋白質、アルツハイマーAβペプチドをはじめ数多くの蛋白質やペプチドで知られており、それらが関係する疾病の原因と考えられている。更にアミロイドは、病気とは全く関係のない蛋白質でも形成されることがわかってきた。そこで、アミロイド線維形成の分子機構を解明すれば、「関係する疾病の理解・治療に止まらず、蛋白質の構造安定性やフォールディング機構の理解、蛋白質デザイン、蛋白質を材料としたナノテクノロジーの開発などの観点からも極めて斬新な分野を開拓できる」と期待できる。本研究の目的は、「透析アミロイドーシスの原因蛋白質であるβ2ミクログロブリンを用いて、アミロイド線維形成の分子機構を、蛋白質の立体構造に基づいて原子レベルで理解する」ことである。

### B. 研究方法

メタノール資化酵母 *Pichia pastoris* を用いてヒトβ2-m発現系を構築し、発現β2-mを用いて、伸長反応によってアミロイド線維を作成した。倫理面への配慮:本研究はリコンビナント蛋白質を使用しており、倫理面の問題はないと考える。

### C. 研究結果

アミロイド線維は結晶にならず、高分子量のため溶液NMRも使えない。ジメチルスルフォキシド(DMSO)によるアミロイド線維溶解と溶液NMRを組み合わせることによって、アミロイド線維の構造を解析することを考案した。

まず、アミロイド線維の重水素交換反応を行う。次にアミロイド線維を遠心分離回収し、凍結乾燥する。その後、高濃度のDMSOによってアミロイド線維を溶かす。DMSOは蛋白質のアミドプロトンと交換する水素原子を含まないので、重水素交換反応を停止する作用ももつ。DMSOに溶解後、NMRスペクトルを測定することにより、重水素交換反応の程度を調べることができる。

実験の結果、N末端、C末端を除く広範囲のアミド水素が交換から強く保護されていた。他方、天然状態では主にβシートのコア領域だけが交換から保護されていた。アミド水素が重水素交換から保護される主要な原因は、水素結合の形成で

ある。アミロイド線維では、天然構造のループ領域も  $\beta$  シートを形成して、その結果硬い構造となっている可能性が高い。

#### D. 考察

以上より、アミロイド線維は次のような機構で形成されると考えられる。 $\beta$  2 ミクログロブリンのアミロイド線維形成の最小単位は 20 残基程度のペプチド内にある。しかし、天然構造ではこの領域は蛋白質内部に隠されており、アミロイドの形成は起こらない。何らかの原因で蛋白質が変性し、最小領域を露出することが反応の引き金となる。最小領域同士が分子間で相補的に相互作用し、 $\beta$  シートを形成する。それ以外の領域も付随して  $\beta$  シートを形成する。この結果できあがる水素結合ネットワークが、極めて剛直で安定なアミロイド線維を作り上げるのであろう。

#### E. 結論

アミロイド線維は幅が 15 nm、長さが 1-2  $\mu$ m の均質な針状構造をしている。やわらかさの強調されることの多い蛋白質が、ほとんど湾曲のない幅のそろった棒状構造をつくるのは蛋白質物性の視点からは驚きである。アミロイド線維の重水素交換反応より、アミロイド線維では、天然構造のループ領域も  $\beta$  シートを形成しており、その結果、剛直構造となっている可能性が示された。アミロイド線維の剛直で均質な構造物性が、アミロイド線維の関わる疾病の原因となっていることが考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Ohhashi, Y., Hagihara, Y., Kozhukh, G., Hoshino, M., Hasegawa, K., Yamaguchi, I., Naiki, H. & Goto, Y. The intrachain disulfide bond of  $\beta$ 2-microglobulin is inessential for the immunoglobulin fold at neutral pH but essential for amyloid fibril formation at acidic pH. *J. Biochem.* 131 (1), 45 - 52 (2002).
- 2) Kozhukh, G., Hagihara, Y., Kawakami, T.,

Hasegawa, K., Naiki, H. & Goto, Y. Investigation of a peptide responsible for amyloid fibril formation of  $\beta$ 2-microglobulin by Acromobacter protease I. *J. Biol. Chem.* 277 (2), 1310-1315 (2002).

3) Martsev, S. P., Dubnovitsky, A. P., Vlasov, A. P., Hoshino, M., Hasegawa, K., Naiki, H. & Goto, Y. Amyloid fibril formation of mouse VL domain under acidic pH. *Biochemistry* 41(10), 3389-3395 (2002).

4) Hoshino, M., Katou, H., Hagihara, Y., Hasegawa, K., Naiki, H. & Goto, Y. Mapping the core of the  $\beta$ 2-microglobulin amyloid fibril by H/D exchange. *Nature Struct. Biol.* 9 (5), 332-336 (2002).

5) Katou, H., Kanno, T., Hoshino, M., Hagihara, Y., Tanaka, H., Kawai, T., Hasegawa, K., Naiki, H. & Goto, Y. The role of disulfide bond in the amyloidogenic state of  $\beta$ 2-microglobulin studied by heteronuclear NMR. *Protein Sci.* 11 (9), 2218-2229 (2002).

6) Hong, D.-P., Gozu, M., Hasegawa, K., Naiki, H. & Goto, Y. Conformation of  $\beta$ 2-microglobulin amyloid fibrils analyzed by reduction of the disulfide bond. *J. Biol. Chem.* 277 (24), 21554-21560 (2002).

7) 後藤祐児・星野大.  $\beta$  2 ミクログロブリンのアミロイド線維形成. *蛋白質核酸酵素* 47 (6), 663-669 (2002).

##### 2. 学会発表

- 1) 後藤祐児:  $\beta$  2 ミクログロブリンのアミロイド線維の形成と溶解. 生化学会シンポジウム「タンパク質の構造・機能発現の品質管理—凝集と再生」、京都、2002年10月16日、*生化学*. 74(8)、664.
- 2) Folding and amyloid fibril formation of  $\beta$ 2-microglobulin. Yuji Goto, 2nd KIAS Conference on Protein Structure and Function: Structure and Mechanism in Protein Science. Sept. 26, 2002, Korea Institute for Advanced Study, Seoul.

#### 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

厚生労働科学研究費補助金 (特定疾患対策研究事業)

アミロイドーシスに関する調査研究 分担研究報告書

## 中性 pH での $\beta 2$ -ミクログロブリン関連アミロイド線維伸長に及ぼすトリフルオロエタノールとグリコサミノグリカンの影響

分担研究者 内木宏延 福井医科大学第 2 病理

共同研究者 山本 卓<sup>1),2)</sup>、山口 格<sup>1)</sup>、長谷川一浩<sup>1)</sup>、後藤祐児<sup>3)</sup>、下条文武<sup>2)</sup><sup>1)</sup>福井医科大学第 2 病理、<sup>2)</sup>新潟大学大学院医歯学総合研究科 内部環境医学講座 腎・膠原病内科学分野、<sup>3)</sup>大阪大学蛋白質研究所

**研究要旨** 我々は、トリフルオロエタノール (TFE) を用いた、中性 pH での  $\beta 2$ -m 関連アミロイド線維の伸長反応系を開発し、骨関節組織内に豊富に存在するグリコサミノグリカン (GAG) や透析医療で抗凝固剤として頻用されるヘパリンのアミロイド線維伸長反応に及ぼす影響を、重合核依存性重合モデルに基づいた試験管内線維伸長反応系、および脱重合反応系を用いて評価した。その結果、TFE による  $\beta 2$ -m の立体構造変化と、線維構造の安定化作用により、中性 pH での線維伸長反応が促進された。また TFE を用いた中性 pH での線維伸長反応は、ヘパリンをはじめとする数種の GAG により増強され、それらの線維への結合を確認した。以上から、GAG は患者組織における線維沈着を促進している一因であることが示唆された。

### A. 研究目的

$\beta 2$ -ミクログロブリン ( $\beta 2$ -m) 関連アミロイドーシスは、長期透析患者の全身組織、特に骨関節組織に高率に発症する。透析患者における  $\beta 2$ -m 関連アミロイド線維の最初期沈着部位は、軟骨組織であり、その細胞外マトリックスには 2 型コラーゲンの他、各種のプロテオグリカンや、ヒアルロン酸および、プロテオグリカンの成分である各種のグリコサミノグリカン (GAG) が豊富に含まれている。それらの細胞外マトリックスがアミロイド線維の形成に関与し、 $\beta 2$ -m 関連アミロイドーシスの発症、進展に影響を及ぼしている可能性が考えられる。

我々は、アミロイドーシスの発症、進展に関与する分子機構を、重合核依存性重合モデルに基づいた試験管内アミロイド線維形成反応を用いて明らかにすることを目指している。我々はこれまで  $\beta 2$ -m 関連アミロイド線維は、酸性 pH で速やかに伸長するが、中性 pH では伸長せず、むしろ脱重合することを示した。また昨年度、我々は  $\beta 2$ -m 関連アミロイドーシスにおける GAG およびブ

ロテオグリカンの影響について検討し、それらは酸性 pH で線維形成反応を促進し、中性 pH での脱重合反応を抑制することを報告した。

今回、我々はトリフルオロエタノール (TFE) を用いて、中性 pH での  $\beta 2$ -m 関連アミロイド線維伸長反応系を開発し、それを用いて様々な GAG の線維伸長反応に及ぼす影響を検討した。

### B. 研究方法

中性 pH での試験管内アミロイド線維伸長過程に及ぼす TFE の効果の解析: シードとして、純粋な  $\beta 2$ -m アミロイド線維とヘパリンで安定化した  $\beta 2$ -m アミロイド線維 (ヘパリン安定化シード) を用いた。

中性 pH での  $\beta 2$ -m アミロイド線維伸長反応を検討するため、 $30 \mu\text{g/ml}$  ヘパリン安定化シードあるいは純粋なシード、 $25 \mu\text{M}$  リコンビナント  $\beta 2$ -m (r- $\beta 2$ -m)、 $50\text{mM}$  phosphate- $100\text{mM}$  NaCl (pH 7.5) を含む反応溶液に 20% TFE を添加し、 $37^\circ\text{C}$  で 48 時間インキュベートし、チオフラビン T (ThT) 蛍光値を測定した (図 1)。また 48 時間

後の反応溶液を電子顕微鏡で観察した。

TFEによる $\beta 2$ -mの立体構造変化に対する効果を解析するため、25°CでCDスペクトルを測定した。

TFEによる $\beta 2$ -mアミロイド線維の安定化に対する効果を解析するため、300  $\mu$ g/ml  $\beta 2$ -mアミロイド線維、50mM phosphate-100mM NaCl (pH 7.5)を含む反応溶液に20% TFEを添加し、37°Cで24時間インキュベートし、ThT 蛍光値を測定した。中性 pHでの試験管内アミロイド線維伸長過程に及ぼす GAGの効果の解析：30  $\mu$ g/ml ヘパリン安定化シード、25  $\mu$ M r- $\beta 2$ -m、20% TFE、50mM phosphate-100mM NaCl (pH 7.5)を含む反応溶液に100  $\mu$ g/ml各種 GAGあるいは0-200  $\mu$ g/mlヘパリンを添加し、37°Cで48時間インキュベートし、ThT 蛍光値を測定した(図2、3)。またヘパリンを添加した際、48時間後の反応溶液を遠心し、沈殿したアミロイド線維に結合したヘパリンをジメチルメチレンブルー色素結合法により定量した(図3)。尚、GAGとしてヘパリン、ヘパラン硫酸(HS)、コンドロイチン硫酸A(CSA)、コンドロイチン硫酸C(CSC)、デルマトン硫酸(DS)、ケラタン硫酸(KS)、およびヒアルロン酸(HA)の7種類を用いた。

倫理面への配慮：本研究はリコンビナント蛋白質を使用しており、倫理面の問題はないと考える。

### C. 研究結果

線維伸長過程に及ぼす TFE の効果の解析：20% TFEを添加すると、ヘパリン安定化シードあるいは純粋なシードを用いた場合いずれも ThT 蛍光値の増加を認め、ヘパリン安定化シードを用いた場合にその反応は大きく現れた(図1)。また電子顕微鏡により典型的なアミロイド線維が観察された。

CDスペクトルにおいて0-15% TFEは $\beta 2$ -mの立体構造を変化させないが、20% TFEは近紫外域CDを変化させ、更に25-30% TFEは遠紫外域CDも変化させた。

20% TFEは中性 pHでの $\beta 2$ -mアミロイド線維の24時間後のThT 蛍光値の減少を抑止した。

線維伸長過程に及ぼす GAG の効果の解析：100  $\mu$ g/mlヘパリン、HS、CSA、CSCおよびDSは、

GAGを添加しない場合と比較して、それぞれThT 蛍光値の増加を増強し、ヘパリンの効果が最も優れていた(図2)。また、電子顕微鏡により典型的なアミロイド線維が観察された。0-200  $\mu$ g/mlヘパリンを添加すると、添加したヘパリンの濃度に依存して、ThT 蛍光値は増加した(図3)。また線維の伸長とともに、ヘパリンの線維への結合の増加を認めた(図3)。

### D. 考察

TFEは一般に疎水性反応を弱め、水素結合を強める作用があり、また様々な蛋白質の立体構造を変化させることが知られている。以上のTFEの作用により、中性 pHで $\beta 2$ -mアミロイド線維伸長反応が起こると考えられた。

中性 pHでヘパリンをはじめとする数種のGAGがTFEによって伸長した線維に結合することにより線維構造を安定化させ、線維伸長反応を増強すると考えられた。

$\beta 2$ -mアミロイド線維の最初期沈着部位である関節軟骨にはGAGが豊富に含まれている。今回の研究結果から、GAGがアミロイド線維の患者組織への沈着を促進する一因であることが示唆される。

### E. 結論

TFEを用いた中性 pHでの $\beta 2$ -m関連アミロイド線維伸長反応系を開発した。ヘパリンをはじめとする数種のGAGは伸長した線維に結合することにより線維構造を安定化させ、線維伸長反応を増強した。

### F. 健康危険情報

なし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Hoshino M, Katou H, Hagihara Y, Hasegawa K, Naiki H, Goto, Y: Mapping the core of the  $\beta_2$ -microglobulin amyloid fibril by H/D exchange. Nat. Struct. Biol. 9: 332-336, 2002.
- 2) Hong D, Gozu M, Hasegawa K, Naiki H, Goto, Y: Conformation of  $\beta_2$ -microglobulin amyloid fibrils

analyzed by reduction of the disulfide bond. *J. Biol. Chem.* 277: 21554-21560, 2002.

3) Katou H, Kanno T, Hoshino M, Hagihara Y, Tanaka H, Kawai T, Hasegawa K, Naiki H, Goto Y: The role of disulfide bond in the amyloidogenic state of  $\beta$ 2-microglobulin studied by heteronuclear NMR. *Protein Sci.* 11: 2218-2229, 2002.

## 2. 学会発表

1) 星野大、加藤秀典、大橋祐美子、萩原義久、菅野誉士、川合知二、長谷川一浩、内木宏延、後藤祐児：多次元 NMR による  $\beta$  2 ミクログロブリンのアミロイド線維形成機構の解析。第 2 回日本蛋白質科学会年会、名古屋、2002 年 6 月 13-15 日。同要旨集。15.

2) 伴匡人、浜田大三、萩原義久、長谷川一浩、

内木宏延、後藤祐児：全反射顕微鏡による  $\beta$  2 ミクログロブリンアミロイド線維の伸長観察。第 2 回日本蛋白質科学会年会、名古屋、2002 年 6 月 13-15 日。同要旨集。84.

3) 内木宏延：透析アミロイドーシス発症の分子機構。第 17 回高知腎疾患懇話会、高知、2002 年 9 月 12 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。

図1.  $\beta$ 2-mアミロイド線維伸長反応に対するTFEの効果

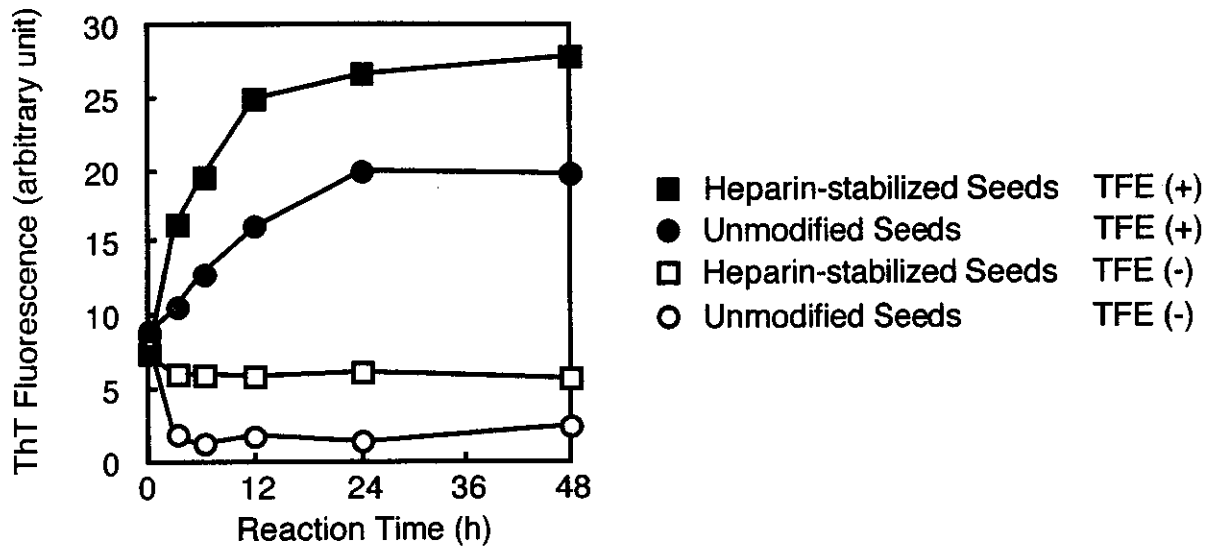


図2.  $\beta$ 2-mアミロイド線維伸長反応に対するGAGの効果

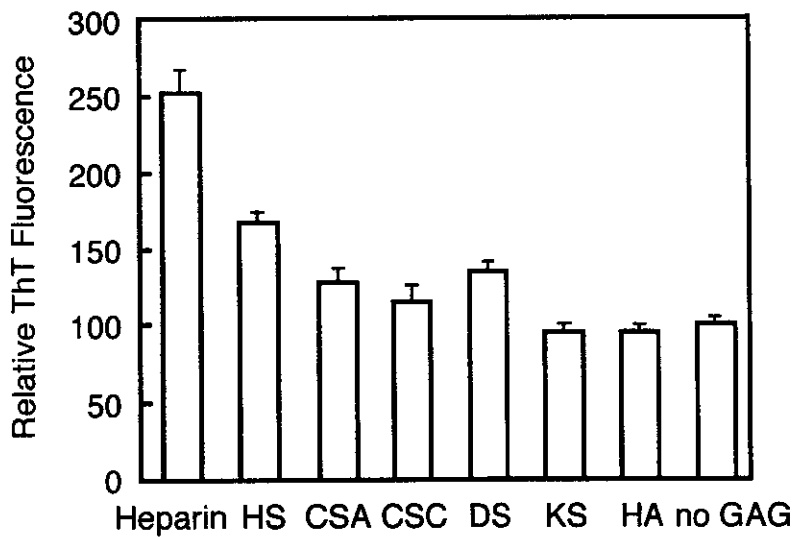
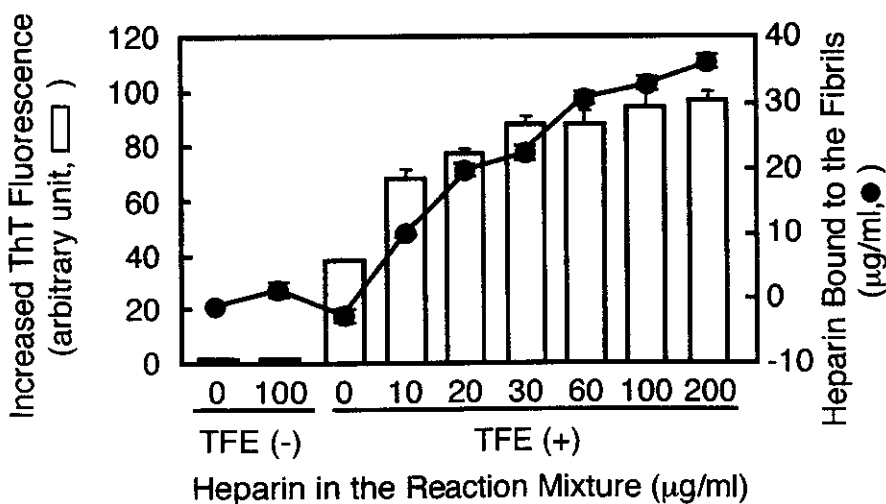


図3.  $\beta$ 2-mアミロイド線維伸長反応に対するヘパリンの効果





厚生労働科学研究費補助金 (特定疾患対策研究事業)  
 アミロイドーシスに関する調査研究 分担研究報告書

## 透析アミロイドーシスにおける病勢、治療の指標 — MMP-3 の有用性 —

分担研究者 原 茂子 虎の門病院 腎センター内科  
 共同研究者 乳原善文、田上哲夫、香取秀幸  
 虎の門病院 腎センター内科

**研究要旨** 透析アミロイドーシスは  $\beta 2$ -microglobulin(B2M)から構成されるアミロイドであるが、血中 B2M はその病勢および治療の指標とはなりえていない。また適切な指標は現在まであきらかにされていない。骨関節レントゲン所見、自覚症状に依存しているために、薬剤、吸着カラムなどの内科的治療の確立に際しては、指標がないため客観性がない現状であり、マーカーをあきらかにすることは必須である。MMP-3 (値はリウマチにおける骨関節破壊のマーカーとして最近その意義が認められている。そこで透析アミロイドーシスにおける病勢と血清 MMP-3 値との関連性を解析し、昨年度にひきつづき今回は多数例において透析アミロイドーシスによる骨関節病変の有無およびその程度との関連性および治療の指標となりうるかを検討した。

MMP-3 値は血中 B2M 値、血清 Creatinine (Cr)、iPTH (副甲状腺ホルモン) 値など腎不全因子とに相関はなく、透析期間との相関を認め、長期化に伴い有意に高値を示した。透析アミロイドーシスの病態を CTS 手術歴、骨嚢胞、破壊性脊椎症の有無とでスコア化 (病態の有無により 0-3 まで) すると、スコアの高値化とともに MMP-3 が高値を示した。さらに骨嚢胞の有無とその程度の評価点 (0-6 点) と MMP-3 値とに有意な正相関を認めた。治療として、アミロイドーシス合併例への B2M 吸着療法施行例では、非併用例に比し MMP-3 値は有意に低値を示した。MMP-3 値は透析アミロイドーシスの病勢治療の評価で唯一の指標となる。またアミロイドーシス発症予防のためには治療指標として MMP-3 値を低値化することが重要であり、透析導入早期より吸着療法を併用することにより、アミロイドーシスの発症が抑制されうると推察された。

### A. 研究目的

透析アミロイドーシスは透析期間の長期化に伴いその合併は高頻度を示す。透析例でみられるアミロイドは  $\beta 2$  ミクログロブリン (B2M) から構成されるが、血中の  $\beta 2$  ミクログロブリン値は透析アミロイドーシスによる手根管症候群、破壊性脊椎症、骨嚢胞などの病勢、活動性など病態や、その治療による病勢の変化の指標としての意義はみられていない。そのために適切な指標がなく、病勢は骨嚢胞による痛みなどの自覚症状、レントゲンによる所見のみであり、適切な血中マーカーがないのが現状である。そのために薬剤などによる治療効果は臨床症状に依存しているために客観性が乏しい。本研究では、透析アミロイドーシ

スの病態、病勢を示すマーカーをあきらかにすることである。これらのマーカーをあきらかにすることにより、治療による改善の有無など客観的に評価が可能である。

透析アミロイドーシスによる骨関節破壊は、関節滑膜における慢性炎症と進行性破壊性骨関節病変である。滑膜のアミロイド沈着部では各種の MMPs (matrix metal oproteinases) は細胞外マトリックスの破壊により産生されるもので関節破壊を反映するとの報告が散見される。さらに透析アミロイドーシス例での滑膜には、MMP s (MMP-1, MMP-3, MMP-9) の発現が認められている。そこで血清 MMP-3 を測定して透析アミロイドーシスの有無とその病態、および  $\beta 2$  ミクログ

ロブリン吸着カラム併用療法による治療例でのそれらの推移を対比した。

## B. 研究方法

対象は維持透析例 74 例（男 38、女 36）で、透析期間は 1 年から 34.8 年、平均 13.3 年。平均年齢 52.2 歳である。透析療法時に B2M 吸着器併用を施行した症例は 8 例でいずれも透析アミロイドーシスコアはスコア 3 を示しさらに骨嚢胞は 6 点をしめしていた。平均透析期間は 22.5 年であった。

透析開始時に MMP-3 を測定し、透析期間別（10 年未満、10 年以上 20 年未満群、20 年以上群）および吸着療法群と非併用群との対比、透析アミロイドーシスの病態、および腎不全による尿素窒素、クレアチニン、iPTH (intact 副甲状腺ホルモン)、CRP とも対比検討した。

透析アミロイドーシスの病態としては 1)CTS(手根管症候群)開放術歴の有無、2)X-P、CT、MRI による破壊性脊椎症の有無、3)骨嚢胞の有無(関節部位として両手関節、両上腕骨頭、両大腿骨頭で左右あわせて 6 関節のうち 1 関節以上の骨嚢胞を認める)でそれらのアミロイドーシスコア 3 項目の有無からアミロイドスコアを算出した。Score 0: アミロイドーシスの病態合併がまったくみられないもの。Score 1: 1 項目をみたすもの。Score 2: 2 項目を有するもの。Score 3: 3 項目を有するもの。

骨嚢胞 Score では、関節部位として両手関節、両上腕骨頭、両大腿骨頭で左右あわせて 6 関節 X-P でいずれの関節にも骨嚢胞ないものを 0 点から 6 関節での骨嚢胞を有するものを 6 点で、傷害関節数をしめした。透析アミロイドーシスコア病態 Score、および骨嚢胞点数と血清 MMP-3 値を対比した。さらに  $\beta 2$  ミクログロブリン吸着カラム併用透析の 8 例では治療による推移を MMP-3 値で検討した。なお血清 MMP-3 は富士薬品工業で開発されたワンステップ酵素抗体法キットを用いて測定した。

## C. 研究結果

血清 MMP-3 値は血清 UN、Cr、 $\beta 2$  ミクログロブリンとで相関はみられなかった。さらに iPTH 値、

CRP とも相関はみられなかった。MMP-3 値は透析期間と関連し、長期化とともに高値を示し、10 年未満では  $226 \pm 99 \text{ ng/ml}$  であり、10 年以上 20 年未満例では  $321 \pm 346 \text{ ng/ml}$ 。20 年以上例では  $335 \pm 157 \text{ ng/ml}$  で 10 年未満例に比し、20 年以上例では有意に高値をしめした。また吸着療法併用例では 10 年未満例より有意に MMP-3 は低値を示した(表 1)。透析アミロイドーシスコアと血清 MMP-3 濃度との対比検討では表 2 に示すように、Score 0 群では  $206.1 \pm 94.7 \text{ ng/ml}$  であり、Score 1 群で  $252.0 \pm 82.3 \text{ ng/ml}$ 、2 群では  $467.0 \pm 400.7 \text{ ng/ml}$ 、3 群では  $354.7 \pm 244.6 \text{ ng/ml}$  で、0 群に比し、2 群、3 群では有意に高値を示している。吸着例では低値を示している(表 2)。

透析アミロイドーシスコア骨嚢胞点数と MMP-3 値との対比では表 3 に示されるが、骨嚢胞に認められない Score 0 では MMP-3 値は  $215.0 \pm 96.7 \text{ ng/ml}$  であり、Score 1-3 群では  $395.6 \pm 334.0 \text{ ng/ml}$  であり、骨嚢胞のない群に比し高値を示している。有意差はみられていないが、吸着療法併用透析例では、骨嚢胞のみられていない群に比し低値を示している。吸着カラム併用透析例では、MMP-3 値はカラム非併用透析例に比し低値をしめした。

吸着カラム併用による MMP-3 は吸着療法前後で対比すると吸着療法後の MMP-3 は低値であるが、明らかな差はない。吸着療法併用例ではは MMP-3 低下率は併用例では非併用例に比し高値を示している(表 4)

吸着療法併用で、MMP-3 が低値に維持されている。

## D. 考察

透析アミロイドーシスは、経年的にその頻度は高値を示している。当院での 10 年以上の維持透析施行の 76 例で、透析期間別にその頻度をみた成績では手根管症候群により開放術施行は 10-14 年の 20 例で 10.0%、15-20 年の 35 例では 17.1%、20-24 年の 14 例では 35.7%、25 年以上の 7 例では 42.9%である。破壊性脊椎症は、10-14 年では 25%、15-19 年 40%、20-24 年では 28%、25 年以上では 57%である。骨嚢胞は嚢胞の部位によりことなるが、15-19 年では 51.4%であり、25 年以上例では 71.4%であり、透析期間の長期化とともに

に骨嚢胞は高頻度となっている。

MMP-3 は関節破壊の過程で軟骨破壊の key enzyme である。透析アミロイドーシスにおける骨関節破壊の過程は、慢性関節リウマチにきわめて類似している。透析アミロイドーシスでの骨関節破壊のメカニズムとしては、アミロイド沈着に伴い IL-1 $\beta$  や TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインにより活性化された軟骨細胞が産生した各種 MMPs を介して骨破壊へと進展する。

骨関節破壊のマーカーである血清 MMP-3 値は透析期間とともに高値を示している。さらに透析アミロイドーシスの指標としてのスコアと相関がみられたことは、MMP-3 値が透析アミロイドーシスの病勢の指標として有用である。さらに、治療として  $\beta$ 2M 吸着療法併用による、鎮痛効果の有無に関しては臨床症状のみで評価されていたが、自覚症状のみでは、客観性は乏しいが、MMP-3 値測定にて、吸着療法併用例では持続低値を示し、透析アミロイドーシスの病勢、治療指標として有用である。

## E. 結論

1)透析アミロイドーシスの病勢、治療効果の指標はいままで血液検査による客観的なものはなかった。MMP-3 は透析期間とともに高値を示し、アミロイドーシスによる病態とその進展度と有意な関連がみとめられた。

2)治療の指標として MMP-3 を低値に維持管理することが重要である。治療との関連では吸着カ

ラム併用に伴い MMP-3 が低値を示していることから、透析導入早期から、吸着カラム併用療法で MMP-3 を低値に維持管理する着ことが、透析アミロイドーシス予防には必須と考えられる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) 原 茂子:透析アミロイドーシスの治療対策 腎と骨代謝 14(1)59-66,2001

2) 原 茂子、伏見智久:透析アミロイドーシス腎疾患最近の治療 2002-2004. 270-271. 飯野、槇野、二瓶編 南江堂 2002

### 2. 学会発表

1) Shigeko Hara, Yoshihumi Ubara, Tetsuo Tgami et al: Matrix Metalloproteinases-3 in Hemodialysis-Related Amyloidosis. The Association of Nephrology Renal Week Philadelphia Pennsylvania, USA, 2002

## 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

表一1 透析期間の長期化とともに MMP-3 は高値を示し吸着療法併用例では低値を示す

Comparison of serum MMP-3 levels and duration and with and without B2M adsorption column

Duration and Therapy	Number of cases	MMP-3 levels (ng/ml)
Hemodialysis		
~ 10 years	36	226 ± 99 <sup>(1)</sup>
~ 20 years	17	321 ± 346
20 years ~	13	335 ± 157 <sup>(2)</sup>
Hemodialysis with B2M adsorption column	8 (透析期間平均22.5年)	161 ± 51 <sup>(3)</sup>

(1)Vs (2) p=0.005648 (2)Vs (3) : p=0.00729

表一2 透析アミロイドーシスの合併症レベルスコアが高値群では合併のないスコア0に比し高値を示し吸着剤併用例では低値である。

Score of dialysis related amyloidosis and MMP-3

Score	cases	MMP-3 levels(ng/ml)
0	n: 35	206.1 ± 94.7 *
1	n:11	252.0 ± 82.3
2	n:10	467.0 ± 400.7 **
3	n:4	354.7 ± 244.6 ***
Adsorption therapy	n:8	161.0 ± 51.8

One positive sign among the operation for CTS, DSA and bone cyst is defined as score1, and two signs is score 2, and three sign is score3. Among 8cases treated with adsorption, 3cases show score 2 and 5cases show score3. \*Vs \*\* p=0.00058 \*Vs\*\*\*p=0.0185