

presenting as bilateral carpal tunnel syndrome. Amyloid: *J. Protein Folding Disord.* 9; 252-255, 2002.

2. 学会発表

1) Oguchi K, Takei Y, Hattori T, Ikeda S. Renal biopsy is useful to estimate the indication of liver transplantation in FAP patients. 5th International symposium on FAP & 4th international workshop on liver transplantation in FAP in Matsumoto 2002.

2) Takei Y, Hattori T, Ikeda S. Comparison of sural nerve findings before and after liver transplantation in FAP patients. 5th International symposium on FAP & 4th international workshop on liver transplantation in FAP in Matsumoto 2002.

3) Takei Y, Hattori T, Tokuda T, Ikeda S. Two cases with senile systemic transthyretin amyloidosis presenting as bilateral carpal tunnel syndrome. 5th International symposium on FAP & 4th international workshop on liver transplantation in FAP in Matsumoto 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1. 患者の臨床像

臨床ステージ	末梢神経障害が下肢に限局(ステージ I)							上下肢に及ぶ(ステージ II)			
症例	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
年齢	34	42	44	26	40	42	50	62	37	52	36
性別	女性	男性	女性	男性	女性	女性	女性	女性	男性	女性	女性
罹病期間(年)	2	2	2	3.5	4	4	6	2	5	5	6
臨床検査値											
血清アルブミン値 (g/dL)	4.6	4.3	4.6	4.6	3.8	3.5	4.2	3.4	4.5	3.8	4.1
BUN (mg/dL)	13	9	17	12	10	11	9	13	9	21	14
Cre (mg/dL)	0.8	0.7	0.6	0.7	0.6	0.9	0.6	0.51	0.7	1.8	0.9
Ccr(mL/s)	1.59	1.59	1.2	1.72	1.91	1.05	1.94	1.71	0.86	0.53	0.62
尿蛋白	(-)	(-)	(-)	(-)	(++)	(+)	(-)	(++)	(-)	(+++)	(+)
神経伝導速度 (m/s)											
MCV/SCV (尺骨神経)	51/58	63/44	69/55	59/52	60/60	55/66	59/71	49/53	27/44	55/57	56/50
MCV/SCV (脛骨神経)	46/50	40/35	45/44	48/43	58/43	66/44	39/46	(-)/(-)	(-)/(-)	35/40	33/32

表2. 結果

臨床ステージ	末梢神経障害が下肢に限局(ステージ I)							上下肢に及ぶ(ステージ II)			
症例	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
移植時年齢	34	42	44	26	40	42	50	62	37	52	36
臨床検査値											
Ccr(mL/s)	1.59	1.59	1.2	1.72	1.91	1.05	1.94	1.71	0.86	0.53	0.62
尿蛋白	(-)	(-)	(-)	(-)	(++)	(+)	(-)	(++)	(-)	(+++)	(+)
肝移植											
経過観察期間(月)	LRLT	APOLT	LRLT	LRLT	LRLT	LRLT	LRLT	施行せず	施行せず	施行せず	LRLT
	28	25	57	52	-	9	7	-	-	-	64
予後											
社会復帰	生存	生存	生存	生存	死亡	生存	生存	生存	生存	生存	生存
	working	working	working	working		自宅療養中	working	自宅療養	自宅療養	自宅療養	臥床状態
有髄神経密度(/mm ²)	1465	1914	5059	1958	1664	1563	493	施行せず	施行せず	施行せず	2162
アミロイド沈着割合											
系球体(%)	4	8	0	1	39	31	12	40	7	58	20
間質, 尿細管(%)	1	11	0	0	21	8	12	25	44	0.5	2
全体(%)	2	11	0	0.03	22	9	12	26	44	6.5	3.5

LRLT: 生体部分肝移植

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

肝腫瘍細胞株を用いた IL-6, IL-1, TNF α 刺激による SAA1 プロモーター発現機構の解析

分担研究者 吉崎和幸 大阪健康体育部健康医学第一部門

共同研究者 萩原圭祐**、西川哲平*、中原英子**、西本憲弘*、**

*大阪健康体育部健康医学第一部門、

**大阪大学医学系研究科分子病態医学専攻生理病態学

研究要旨 HepG2 細胞で行っていたリアルタイム定量的 PCR の系による SAA1 相乗効果発現の解析結果を、他の肝癌由来の細胞株を使い普遍的現象であることを確認すること、相乗効果発現において何故 IL-6 阻害が最も有効であるかを解析する為に、SAA1 プロモータールシフェラーゼアッセイの系を確立することを目的とした。リアルタイム定量的 PCR の系では、PLC/PRF/5 細胞は、HepG2 細胞と比較し、IL-1 β 刺激による反応性が弱かったが、Hep3B 細胞は HepG2 細胞とほぼ同様のパターンを示した。いずれの細胞も IL-6+IL-1 β +TNF α 刺激において、ヒト化抗 IL-6 レセプター抗体により、SAA1 の相乗効果発現が最も抑制され、昨年までの報告が普遍的現象であることが確認された。続いて、SAA1 プロモータールシフェラーゼベクターを作製した。Gene Bank 上の *Homo sapiens* SAA1 beta gene DNA 配列をもとに exon1 の一部+22 から上流-799 までの全長 821 塩基を、PCR クローニングにより回収し、PGL3 に組み込んで、発現ベクターを作製した。SAA1 プロモーターの発現は IL-6 刺激後 3 時間、IL-1 β , TNF α 刺激後 12~24 時間で最大値に達した。プロモーターレベルにおいても IL-6+IL-1 β , IL-6+TNF α 刺激では相乗効果を認めしたが、IL-1 β +TNF α 刺激では明らかな相乗効果を認めなかった。この結果は、臨床結果、リアルタイム定量的 PCR による mRNA の解析結果と一致し、今後のプロモーター解析は、直接的に病態解析へつながると考えられる。

A. 研究目的

昨年までに我々は、肝芽腫由来である HepG2 細胞を使い、リアルタイム定量的 PCR の系を用いて、IL-6, IL-1 β , 及び TNF α 三者のサイトカインによる SAA1 の相乗効果発現において、IL-6 の阻害が最も有効であることを報告した。1993 年 Woo らによる SAA2 プロモーター解析では、相乗効果の発現は、転写因子である NF κ B と NF IL6 の共同活性化作用によるものと報告されている。しかし、その仮説では、関節リウマチ患者においてヒト化抗 IL-6 レセプター抗体により血中 SAA レベルは正常化するが、IL-1、又は TNF α を阻害しても完全には正常化しないという臨床結果を、十分に説明することはできない。さらに、IL-6 シグナル伝達機構における JAK-STAT 系の関与も不明である。そ

こで、我々は、サイトカインによる SAA1 の相乗効果発現において、何故 IL-6 の抑制が最も有効となるかに焦点を当て、ルシフェラーゼアッセイを用いて SAA1 プロモーター解析を行うこととした。今年度は、(1) 昨年までの報告をその他の肝癌由来の細胞株を使って普遍的現象であることを確認 (2) SAA1 プロモータールシフェラーゼアッセイの系を確立することを目的とした。

B. 研究方法

1. リアルタイム定量的 PCR

1) 培養細胞・条件

PLC/PRF/5, Hep3B 細胞を、10% heat inactivated FCS, 50units/ml Penicillin, 50 μ g/ml Streptomycin, 2Mm L-glutamin 添加 Dulbecco's

modified Eagle's medium(DMEM)を用い、6 穴 plate に $5 \times 10^5/5\text{ml/well}$ で培養し、PLC/PRF/5 細胞は 48 時間、Hep3B 細胞は 72 時間培養後サブコンフルエントの状態ですイトカイン刺激を行った。

2) リアルタイム定量的 PCR

平成 12 年度、13 年度の報告書のとおりであるが、以下簡単に記載する。total RNA $2 \mu\text{g}$ を使って逆転写反応を行い cDNA を得た。逆転写酵素には MMLV、プライマーには oligo DT を用いた。Gene Amp 5700 Sequence Detection System を用い、蛍光色素には SYBR Green Dye を使った。インターナルコントロールには $\beta 2\text{m}$ を用いた。測定に用いた SAA1,2,4 の特異的プライマー、反応条件は平成 12 年度の報告書に示したとおりである。

2. SAA1 プロモータールシフェラーゼアッセイ

1) SAA1 プロモータールシフェラーゼベクターの作製。

Gene Bank 上の *Homo sapiens* SAA1 beta gene DNA 配列をもとに exon1 の一部+22 から上流-799 までの全長 821 塩基を、PCR クローニングにより回収し、PGL3 ベクターに組み込み、発現ベクターを作製した。

2) ルシフェラーゼアッセイ

HepG2 細胞を、前述の培養液を用い、 $2 \times 10^5/3\text{ml/well}$ で 6 穴プレートで培養し、24 時間後にトランスフェクションを行った。トランスフェクションには Fugen6 を用い、インターナルコントロールである pRL-TK ベクターを同時にコトランスフェクションした。72 時間後に IL-6 10ng/ml 、IL-1 β 0.1ng/ml 、TNF α 10ng/ml 刺激をそれぞれ行い、刺激後 1, 3, 6, 12, 24 時間にサンプルを、Passive Lysate Buffer を用いて回収し、凍結融解した後に、アッセイを行った。無刺激コントロールサンプルでの発現量を 1 として相対的な発現量を比較検討した。すべてのアッセイは triplicate で行った。IL-6+IL-1 β 、IL-6+TNF α 、IL-1 β +TNF α の組み合わせでの経時的変化も検討を行った。

C. 研究結果

1.リアルタイム定量的 PCR

PLC/PRF/5 細胞では、HepG2 細胞と比較し、IL-1 β 刺激による反応性が弱く、IL-6+IL-1 β 刺激による相乗効果はみられなかった。しかし、TNF

α 刺激による反応性は認められ、IL-6+TNF α の刺激による相乗効果も認められた。(図 1) Hep3B 細胞は HepG2 細胞とほぼ同様のパターンを示した。(図 3) いずれの細胞も IL-6+IL-1 β +TNF α の刺激において、ヒト化 抗 IL-6 レセプター抗体で相乗効果が最も抑制された。(図 2,4)

2. SAA1 プロモータールシフェラーゼアッセイ
SAA1 プロモーターの発現は IL-6 刺激後 3 時間で 2.6 倍、IL-1 β 刺激後 12 時間で 1.9 倍、TNF α 刺激後 24 時間で 2.9 倍と最大値に達した。(図 5) サイトカインの組み合わせによる相乗効果の検討では、IL-6+IL-1 β 刺激後 3 時間で 17.6 倍、IL-6+TNF α 刺激後 3 時間で 14.1 倍と相乗効果を認めた。しかし、IL-1 β +TNF α の組み合わせでは、刺激後 24 時間でも 3.3 倍と明らかな相乗効果を認めなかった。

(図 6)

D. 考察

リアルタイム定量的 PCR の系による PLC/PRF/5 細胞、Hep3B 細胞の結果と前回までの HepG2 細胞での結果を、表にまとめた。(Table 1,2) サイトカインによる反応性に若干の違いはあるものの、すべての細胞株で IL-6+IL-1 β +TNF α の刺激において、ヒト化 抗 IL-6 レセプター抗体で相乗効果が最も抑制された。mRNA レベルでのこの解析結果は、ヒト化 抗 IL-6 レセプター抗体を関節リウマチ患者に用いた臨床結果とよく一致している。さらに興味深い点は、プロモーターレベルにおいても、IL-1 β +TNF α の組み合わせでは相乗効果がみられず、相乗効果発現に IL-6 が必要な点である。つまり、今後このプロモーター解析をすすめていくことは、臨床の病態解明に直結すると考えられ、病態のさらなる理解にとどまらず、新しい治療戦略につながる可能性があると思われる。ただし、今回の SAA1 プロモータールシフェラーゼアッセイの系における相乗効果の発現結果は、従来の NF κ B と NF-IL6 による共同活性作用の存在を確認したレベルにとどまっている。今後それぞれの結合部位のミュータントの作製、各転写因子の発現ベクターによる検討を行う予定である。

E. 結論

リアルタイム定量的 PCR の系において IL-6, IL-1 β , 及び TNF α 刺激による SAA1 の相乗効果発現において、IL-6 の抑制が最も有効であることが確認された。SAA1 プロモータールシフェラーゼアッセイの系から、相乗効果の発現に、少なくとも NF κ B と NF-IL6 による共同活性作用の存在が、示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mihara M, Nishimoto N, Yoshizaki K, Suzuki T: Influences of anti-mouse IL-6 receptor antibody on immune responses in mice. *Immunol. Lett.* **84**:223-229, 2002.
- 2) Okazaki M, Yamada Y, Nishimoto N, Yoshizaki K, Mihara M: Characterization of anti-mouse IL-6 receptor antibody. *Immunol. Lett.* **84**:231-240, 2002.
- 3) Choy EH, Isenberg DA, Garrood T, Farrow S, Ioannou Y, Bird H, Cheung N, Williams B, Price R, Yoshizaki K, Nishimoto N, Kishimoto T: Panay GS. Therapeutic benefit of blocking interleukin-6 activity with an anti-interleukin 6 receptor monoclonal antibody in rheumatoid arthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Arthritis Rheum.* **46**:3143-3150, 2002.
- 4) Iwamoto M, Nara H, Hirata D, Minota S, Nishimoto N, Yoshizaki K: Humanized monoclonal anti-interleukin 6 receptor antibody for treatment of intractable adult-onset Still's disease. *Arthritis Rheum.* **46**:3388-3389, 2002.
- 5) Nishimoto N, Yoshizaki K, Maeda, K, Kuritani T, Deguchi H, Sato B, Imai N, Kakehi T, Takagi N, Suemura M, Kishimoto T: Toxicity, pharmacokinetics, and dose finding study of repetitive treatment with humanized anti-interleukin 6 receptor antibody, MRA, in rheumatoid arthritis - a phase I/II clinical study of MRA for rheumatoid arthritis in Japan-. *J. Rheum.* 2003 (in press).
- 6) Katsume A, Saito H, Yamada Y, Yorozu K, Ueda O, Akamatsu K, Nishimoto N, Kishimoto T, Yoshizaki K, Ohsugi Y: Anti-Interleukin 6 (IL-6) Receptor Antibody Suppresses Castleman's Disease Like Symptoms Emerged in IL-6 Transgenic Mice. *Cytokine* 2003 (in press).
- 7) Gejima R, Tanaka K, Nakashima T, Hashiguchi S, Ito Y, Yoshizaki K, Sugimura K: Human single-chain Fv (scFv) antibody specific to human IL-6 with the inhibitory activity on IL-6-signaling. *Human Antibody* 2003 (in press).
- 8) Goya S, Matsuoka H, Mori M, Morishita H, Kida H, Kobashi Y, Kato T, Taguchi Y, Osaki T, Tachibana I, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kawase I, Hayashi S: Sustained interleukin-6 signaling leads to the development of lymphoid organ-like structures in the lung. *J. Pathol.* 2003 (in press).
- 9) Nakahara H, Song J, Sugimoto M, Hagihara K, Kishimoto T, Yoshizaki K, Nishimoto N: Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy reduces vascular endothelial growth factor (VEGF) production in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003 (in press).
- 10) Yoshizaki K, Nishimoto N, Kishimoto T: IL-6 blocking therapy with humanized anti-IL-6 receptor antibody (MRA) in rheumatoid arthritis. *Rheuma21st.com* (web journal) <http://www.rheuma21st.com>. 2002.
- 11) Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T: Interleukin-6. In: *Smolen J, Lipsky P, eds. Targeted Therapy in Rheumatology. London: Martin Dunitz;* p.231-241, 2003.

2. 学会発表

- 1) Nishimoto N, Maeda K, Kuritani T, Deguchi H, Sato B, Imai N, Kakehi T, Suemura M, Kishimoto T, Yoshizaki K: Safety and efficacy of repetitive treatment with humanized anti-interleukin-6 receptor antibody in rheumatoid arthritis. 6th International Symposium on the Immunotherapy. Limassol, Cyprus. 05.15-19, 2002.
- 2) Yoshizaki K, Nishimoto N, Kishimoto T: New therapeutic strategy by the way of interleukin 6 (IL-6) blocking with humanized anti IL-6 receptro

monoclonal antibody in rheumatoid arthritis, a hyper IL-6 syndrome. 26th International Congress of Internal Medicine. Kyoto, Japan. 05.27, 2002.

3) Yoshizaki K: Role of IL-6 on the pathogenesis of rheumatoid arthritis. 18th International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Kyoto, Japan. 10.20-25, 2002.

4) Nishimoto N, Yoshizaki K, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Hashimoto J, Azuma J, Kishimoto T: A multi-center, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of humanized anti-interleukin-6 (IL-6) receptor monoclonal antibody (MRA) in rheumatoid arthritis (RA). 66th National Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology. New Orleans, USA. 10.25-29, 2002.

5) Nishimoto N, Nakahara H, Yoshizaki K: Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy normalized serum vascular endothelial growth factor (VEGF) in patients with rheumatoid arthritis (RA). 66th National Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology. New Orleans, USA. 10.25-29, 2002.

6) Nishimoto N, Kanakura Y, Aozasa K, Johkoh T, Nakano N, Nakamura M, Ikeda Y, Sasaki T, Nishioka K, Hara M, Taguchi H, Kimura Y, Kato Y, Kishimoto T, Yoshizaki K: Improvement of wasting by treatment with a humanized anti-interleukin-6 receptor (IL-6R) monoclonal antibody, MRA in multicentric Castleman's disease, a phase II clinical trial of 28 patients. 44th Annual Meeting of the American Society of Hematologists. Philadelphia, USA. 12.06-10, 2002.

7) Yoshizaki K, Kanakura Y, Aozasa K, Johkoh T, Nakamura M, Kodama F, Kumagai S, Asaoku H,

Kishimoto T, Nishimoto N: A dose finding study of a humanized anti-interleukin-6 receptor (IL-6R) monoclonal antibody, MRA in multicentric Castleman's disease. 44th Annual Meeting of the American Society of Hematologists. Philadelphia, USA. 12.06-10, 2002.

8) 吉崎和幸, 三原昌彦, 椎名雅史, 赤松健一, 萩原圭祐, 西本憲弘: IL-6 阻害による AA アミロイドーシスマウスの発症抑制ならびに病態改善. 第46回日本リウマチ学会, 神戸, 4月. 22-24日, 2002.

9) 萩原圭祐, 中原英子, 西本憲弘, 吉崎和幸: リアルタイム定量的PCRを用いたSAAアイソフォームmRNA発現の解析とヒト型化抗IL-6レセプター抗体による抑制効果の検討. 第46回日本リウマチ学会, 神戸, 4月. 22-24日, 2002.

10) 西本憲弘, 中原英子, 萩原圭祐, 吉崎和幸: 多剤抵抗性RA、アミロイドーシス合併RAに対するヒト型化抗IL-6レセプター抗体治療. 第46回日本リウマチ学会, 神戸, 4月. 22-24日, 2002.

11) 吉崎和幸: IL-6阻害療法による関節リウマチの病態解析. 第30回日本臨床免疫学会, 東京, 12月. 03-04日, 2002.

12) 吉崎和幸: 炎症性サイトカインとくにIL-6の病態意義とその作用阻害によるインパクト. 第23回日本臨床薬理学会, 大阪, 12月. 10-11日, 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

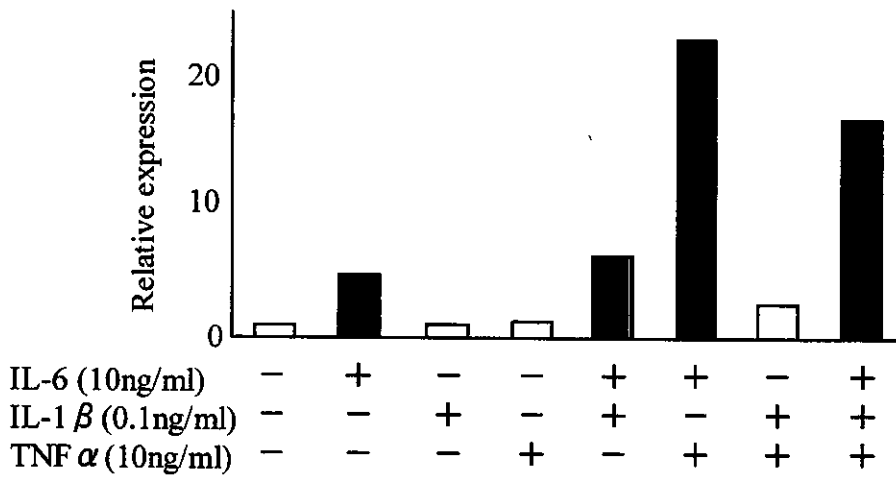


図1. PLC/PRF/5細胞におけるSAA1 発現誘導におけるIL-6,IL-1,TNFαの相乗効果

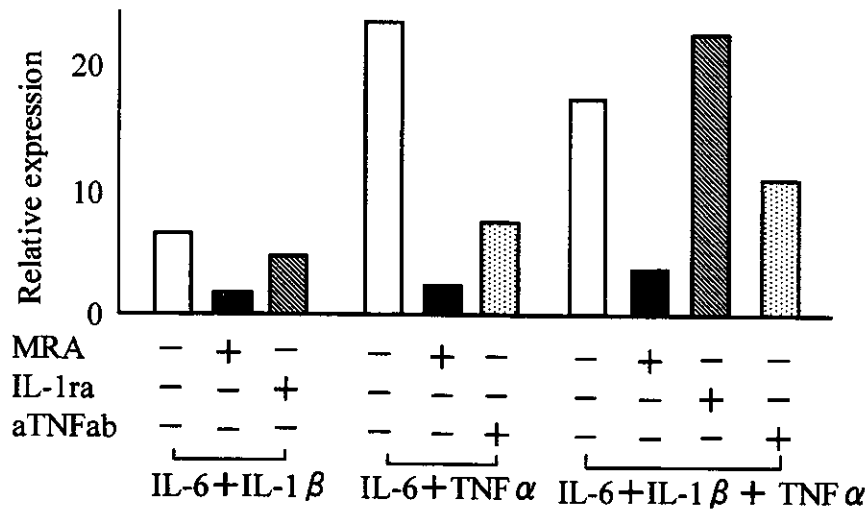


図2. PLC/PRF/5細胞におけるサイトカイン誘導SAA1発現に対するヒト化抗IL-6レセプター抗体、IL-1ra、抗TNFα抗体による抑制効果

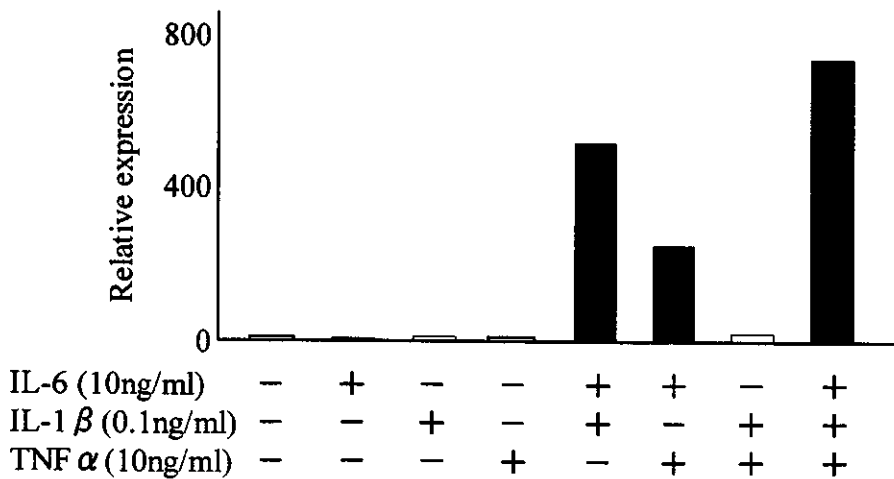


図3. Hep3B細胞におけるSAA1 発現誘導におけるIL-6,IL-1,TNFαの相乗効果

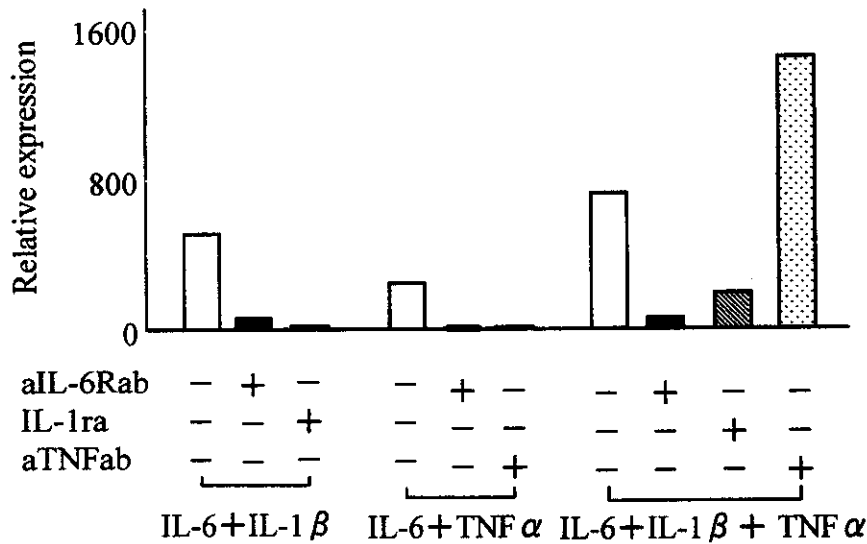


図4. Hep3B細胞におけるサイトカイン誘導SAA1発現に対するヒト化抗IL-6レセプター抗体、IL-1ra、抗TNFα抗体による抑制効果

	HepG2 hepatoblastoma	Hep3B hepatoma	PLC/PRF/5 hepatoma
HBs Ag	-	+	+
IL-6	+	+	+
IL-1β	+	+	-
TNFα	-	-	±
IL-6 +IL-1β	+++	+++	-
IL-6 +TNFα	++	++	++
IL-1β + TNFα	-	-	-
IL-6+IL-1β +TNFα	+++	+++	++

Table1. SAA1 mRNA発現における肝腫瘍細胞株のサイトカインに対する反応性

	HepG2	Hep3B	PLC/PRF/5	RA patients
aIL-6R ab	++	++	++	++
IL-1 ra	+	+	-	±
aTNFα ab	-	-	+	+

*IL-6+IL-1β + TNFα 刺激下

Table2. 肝腫瘍細胞株のSAA1 mRNA相乗効果発現におけるヒト化抗IL-6レセプター抗体、IL-1ra、抗TNFα抗体による抑制効果

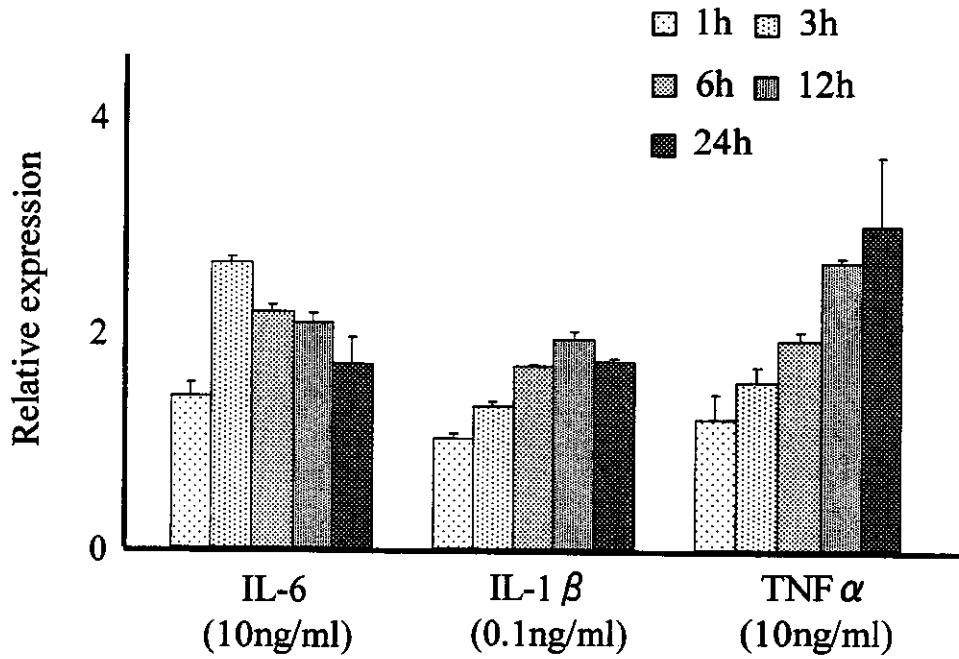


図5. IL-6,IL-1,TNFαによるSAA1発現誘導の経時的変化

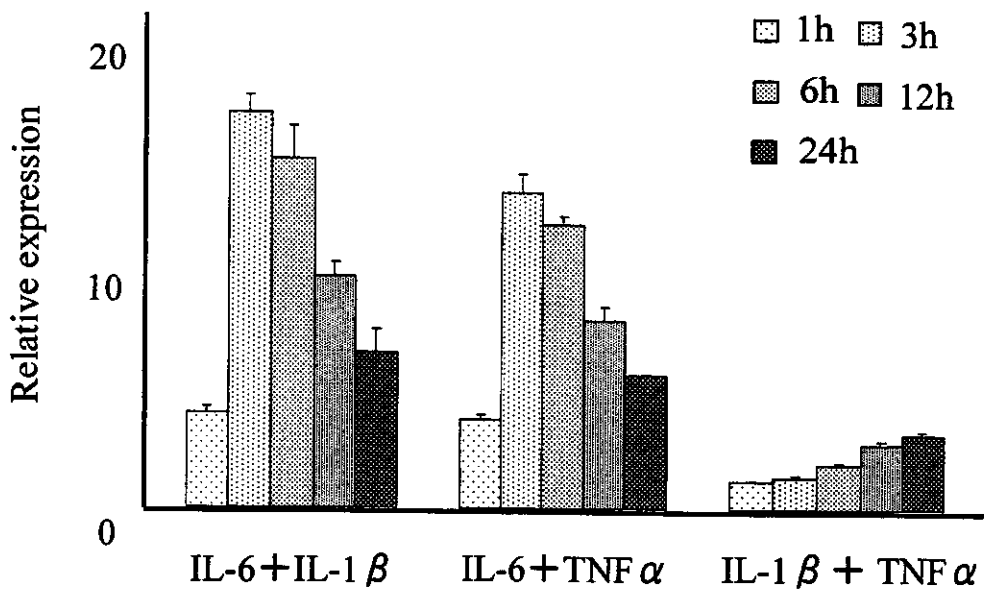


図6. IL-6+IL-1β, IL-6+TNFα, IL-1β+TNFαによるSAA1発現誘導の経時的変化

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

マウス AA アミロイドーシスにおける AEF (amyloid enhancing factors)の解析

分担研究者 樋口 京一 信州大学医学部附属加齢適応研究センター 脈管病態分野
 共同研究者 付笑影¹、中村明宏¹、是永龍巳¹、郭占軍¹、嚴景民¹、

澤下仁子¹、森政之¹、河野裕夫²、石原得博²、横田忠明³、
 松下隆壽⁴、河田康志⁵

¹信州大学医学部附属加齢適応研究センター脈管病態分野、

²山口大学医学部第一病理、³小倉記念病院病理科、

⁴京都大学再生医科学研究所技術部、⁵鳥取大学工学部生物応用工学科

研究要旨 マウス AApoAII アミロイドーシスを用いて、アミロイドーシスの発症を促進する因子の一つとして「病的タンパク質構造 (アミロイド線維) の伝播」について検討を加えてきた。本年度はマウス AA アミロイドーシスにおけるアミロイドーシス発症促進因子(Amyloidosis Enhancing Factor)について、1) アミロイド線維が AEF 活性を持つ。2) アミロイド線維以外の AEF 活性物質が存在する。の 2 つの観点より、解析を試みた。C57BL/6 マウスに 1.0% 硝酸銀水溶液の皮下投与によって炎症を惹起すると同時に各種アミロイド線維を投与し、10 日後に屠殺して AA アミロイド沈着を調べた。AA アミロイド沈着はどのアミロイド線維投与でも認められ、投与線維とアミロイド蛋白質の一時構造が一致した場合に最も強い AA アミロイド沈着が観察された。また横田らが作成した抗マウス neutrophil 由来 AEF 抗体 (Acta Pathol Jpn., 41:798, 1991)に反応する 15 kDa の蛋白質を、硝酸銀処理したマウス脾臓蛋白質の 2 次元電気泳動で分離し、トリプシン分解後質量分析を行い同定を試みた。マウス AEF 抗体に反応する主要な蛋白質は MRP-14 (Migration inhibitory factor-Related Protein-14)であることが判明した。

A. 研究目的

アミロイドーシスの発症を開始する要因を明らかにする事はアミロイドーシス発症の個人差や予防法を考えるために重要である。Amyloid enhancing factor (AEF)は実験的(AA)アミロイドーシスの発症までの期間 (前アミロイド期) を著しく短縮させる作用をもつ蛋白性因子の総称で、脾臓、肝臓抽出物、好中球に存在することが報告されているがその実体は明らかになっていない。最近 Westermarck らは AA アミロイド線維そのものが AEF 活性を持ち、アミロイド線維による伝播が成り立つ事を明らかにし¹⁾、石原らも同様な結果を得ている²⁾。一方で AA 線維以外の蛋白質の関与が示唆されており、横田らは好中球より分離した粗 AEF について報告している³⁾。今回、各種アミロイド線維の AEF 活性の解析と、横田らの

抗 AEF 血清を用いた AEF 蛋白質の同定を試みて、マウス AA アミロイドーシスにおける AEF の実体に迫ろうとした。

B. 研究方法

1) 各種アミロイド線維の AEF 活性の解析: ヒト AA (甲状腺), ATTR (Met30Val, 心臓), AL (脾臓)、及びマウス AA (肝臓), マウス C 型 AApoAII (AApoAII(C); 肝臓)、マウス A 型 AApoAII (AApoAII(A); 小腸)の各種アミロイド線維を Pras らの方法で、水抽出分画として分離・精製した。また recombinant ヒト α -synuclein, 大腸菌 GroES、及び lysozyme 標品からアミロイド線維を試験管内で作成した。2 ヶ月齢 C57BL/6 マウスに 1.0 % 硝酸銀水溶液 (500 μ l)を皮下投与し、同時に各アミロイド線維 (0.1 mg)を尾静

脈に投与した。10日後に屠殺し、全身のAA沈着を調べた。アミロイド沈着レベルの指標であるAmyloid Index (肝、脾、心、胃、皮膚、舌、小腸のアミロイド沈着の評点の平均値)を求めた。

2) 抗 AEF 抗血清反応蛋白質の同定: AgNO₃を皮下投与し急性炎症を起こしたマウスの脾臓の細胞質蛋白質を2次元電気泳動で分離した後、Western blotを行い、横田らの抗 AEF 血清と反応するスポットをゲルより切り出した。ゲル中でトリプシン消化を行い、マスペプチドマッピングを行って AEF 候補蛋白質を同定した。

(倫理面への配慮)

実験に供したマウスの飼育状態が良好な環境になるように、また屠殺に際しては苦痛が最小限になるように配慮し、それぞれ信州大学医学部附属動物実験施設の動物実験に関する指針に沿って行った。

C. 研究結果

AEF としてのアミロイド線維: 2ヶ月齢 C57BL/6 雄マウスへ AgNO₃ と同時に投与した全てのアミロイド線維は AA アミロイド沈着を誘発した(表 1)。AA アミロイドの沈着は脾臓、小腸粘膜固有層、胃腺上皮、心臓に認められた。沈着程度はマウス AA > ヒト AA > AApoAII (C) > AL > AApoAII (B) > ATTR の順に強かった。recombinant あるいは精製標品蛋白質から作成したアミロイド線維でも AA アミロイドの沈着が認められたが、沈着程度は比較的軽微であった。

マウス AA を各マウス系統に投与した結果、AA 沈着は系統ごとに異なり (C57BL = SAMR > SAMR1C > A/J)、アミロイド線維以外の要因の関与が示唆された。

抗 AEF 血清反応蛋白質の同定: Pras らの方法で抽出した粗マウス AA アミロイド線維画分には横田らの抗 AEF 血清と反応する約 15 Kda の蛋白質が存在した。この蛋白質は AgNO₃ 刺激後 10 日の脾臓で大きく増加することが判った。AgNO₃ 投与 10 日後と投与前の脾臓の細胞質蛋白質を2次元電気泳動で比較し、炎症刺激後増大し、抗 AEF 血清と反応する 15 KDa の蛋白質のスポットを同定した (3つ)。それぞれのスポットを切り出

して、ゲル中で trypsin で分解したのち、質量分析器 (MALDI/TOF) で分解ペプチドの質量を決定した。データベースとの比較により 3 つのスポットの内の 2 つは Mouse Calgranulin B (Migration inhibitory factor-related protein; MRP-14) であることが明らかになった。

D. 考察

昨年度の報告では、種々のヒト及びマウスアミロイド線維の投与がマウス AApoAII 沈着の促進を示すこと、すなわちアミロイド線維の種類を越えた、タンパク質の共通構造によるアミロイドーシスの誘発 (伝播) が起こる事を示した。本年度はマウス AA アミロイドーシスでも同様に、各種アミロイド線維の投与がアミロイド沈着を促進した。このことは各アミロイド線維にはアミロイド線維に共通した構造と各線維に個性的な構造が存在し、この共通構造と特異的構造の総合として AEF 活性を発揮すると考えられる。組織から抽出したアミロイド線維には、様々な夾雑物が混入しているため、これらの物質が AEF 活性を持つ可能性は否定できない。本年度の研究では recombinant 蛋白質 (α-synuclein, lysozyme, GroES) から作成したアミロイド線維を用いて、他の夾雑物の混入の可能性を除去した。アミロイド沈着程度は減少したが、AEF 効果は認められた。

マウス脾臓において、AgNO₃ 刺激後に増加し、抗粗 AEF 血清と反応する分子量約 15 kDa の蛋白質は、MIF related protein (MRP) 14 であることが判明した。MRP14 は S-100 ファミリー蛋白質に属し、カルシウム結合蛋白質としてさまざまな細胞で発現する蛋白質である。抗 MRP14 抗体は粗製 AEF の 14K の蛋白質を沈降した。しかし可溶性の MRP14 では AEF 活性は検出できず、MRP-14 自身の構造変化が必要であると考えている。

E. 結論

実験的 AA アミロイドーシスでは各種アミロイド線維が AEF 活性を持つことが確認された。アミロイド線維以外の AEF 候補として MRP14 が同定されたが、更なる検討が必要である。

参考文献

1) Lundmark K, Westermark GT, Nystrom S,

Murphy CL, Solomon A, Westermarck P.
Transmissibility of systemic amyloidosis by a prion-like mechanism. Proc Natl Acad Sci USA. 99: 6979-6984. 2002.

- 2) Cui D, Kawano H, Takahashi M, Hoshii Y, Setoguchi M, Gondo T, Ishihara T. Acceleration of murine AA amyloidosis by oral administration of amyloid fibrils extracted from different species. Pathol Int. 52:40-45, 2002
- 3) Yokota T, Takahashi M, Ishihara T, Yamashita Y, Gondo T, Kawamura S, Hoshii Y, Koga M, Iwata T, Uchino F. Amyloid enhancing factor (AEF). Isolation and biochemical and pathological characteristics. Acta Pathol Jpn. 41:798-805. 1991

F. 健康危険情報

AA アミロイドーシスの発症促進にアミロイド線維様物質が関与する可能性が考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表 (原書)

- 1) Xing Y, Nakamura A, Korenaga T, Guo Z, Yao J, Fu X, Matsushita T, Kogishi K, Hosokawa M, Kametani F, Mori M, Higuchi K. Induction of protein conformational change in mouse senile amyloidosis. J. Biol. Chem. 277: 33164-33169, 2002.
- 2) Xing Y, Higuchi K. Amyloid Fibril Proteins. Mech Ageing Dev. 123: 1625-1636, 2002
- 3) Umezawa M, Tatematsu, K, Tatsumi Korenaga T, Fu X, Matsushita T, Okuyama H, Hosokawa M, Takeda T, Higuchi K. Dietary fat modulation of ApoA-II metabolism and prevention of senile amyloidosis in the senescence accelerated mouse (SAMP1). J Lipid Res.2003 (in press)

(総説)

- 1) 森 政之、樋口京一。老化疾患モデル - マウス。現代医療 Vol. 34 pp. 37-42. 2002
 - 2) 森 政之、樋口京一。老化疾患モデルマウス Molecular Medicine 39. pp. 528-533, 2002
2. 学会発表
- 1) 樋口京一。基礎老化と疾患 (アミロイドーシ

ス) との狭間で。教育講演 1『老化研究の方向を説く』日本基礎老化学会第 25 回大会 (2002.5.18 つくば)

- 2) 樋口京一。アミロイド蛋白質 apoA-II の線維構造への変換と伝播。ワークショップ「蛋白質の品質管理とその破綻」第 55 回日本細胞生物学会大会。(2002.5.21 横浜)
- 3) Higuchi K. Mouse apoA-II amyloidosis: genetics, epigenetics and transmission. (Keynote Lecture) The 5th International Symposium on Familial Amyloidotic Polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders. (2002.9.26 Matsumoto)
- 4) 付笑影、是永龍巳、松下隆壽、細川昌則、馬場聡、内木宏延、徳田隆彦、池田修一、河田康志、石原得博、森政之、樋口京一。種を越えたアミロイドーシス誘発の可能性; マウスモデルを用いた解析 II。第 91 回日本病理学会総会 (2002.3.27 横浜)
- 5) 付笑影、森政之、是永龍巳、松下隆壽、細川昌則、馬場聡、内木宏延、石原得博、河田康志、池田修一、樋口京一。種を越えたアミロイドーシス誘発の可能性 2 ; AA アミロイドーシスモデルを用いた解析。日本基礎老化学会第 25 回大会 (2002.5.18 つくば)
- 6) 是永龍巳、付笑影、森政之、松下隆壽、細川昌則、樋口京一。母子間垂直伝播によるマウス老化アミロイドーシス発症の可能性。日本基礎老化学会第 25 回大会 (2002.5.18 つくば)
- 7) 姚俊潔、森政之、酒井潤、広瀬国孝、羽田亮介、千葉卓哉、樋口京一。SAGE 法によるマウス精巢での遺伝子発現プロファイルの加齢変化の解析。日本基礎老化学会第 25 回大会 (2002.5.18 つくば)

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 各種アミロイド線維によるマウス AA アミロイドーシスの促進

Amyloid Fibrils	Source	Mice*	AI**
AA	Mouse (Liver)	9(9)	1.7
AApoAII(C)	Mouse (Liver)	9(9)	1.0
AApoAII(A)	Mouse (Intestine)	3(9)	0.2
AA	Human (Thyroid)	9(10)	1.5
AL(λ)	Human (Spleen)	4(4)	0.8
ATTR(Met30Val)	Human (Heart)	3(5)	0.1
A- α -synuclein	Human (Recombinant)	4(10)	0.6
A-GroES	E-coli (Recombinant)	9(10)	0.4
A-Lysozyme	Human	10(10)	0.6
DW		0(3)	0

*AA アミロイド沈着が確認されたマウス匹数 () の数字は使用した雄マウスの匹数。

*amyloid index (Xing et al, J. Biol Chem 2002)

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

関節リウマチ (RA) における関節機能再建手術後の炎症マーカーの推移

分担研究者 高杉潔 道後温泉病院リウマチセンター

共同研究者 奥田恭章 道後温泉病院リウマチセンター

研究要旨 SAA の上昇は、AA アミロイドーシス進行の危険因子と考えられるが、今回、関節機能再建術による手術侵襲により CRP 及び SAA がどのように推移するか検討した。対象は、RA の全人工膝関節置換術 (TKA) 9 例、全人工股関節置換術 (THA) 7 例。このうち、THA の 4 例は AA アミロイド合併症例である。さらに、変形性関節症 (OA) の TKA 1 例、THA 1 例、RA の関節鏡視下滑膜切除術 (SS) 1 例、足趾形成術 (TP) 1 例を調査した。これらの症例に対して手術前後の CRP 及び SAA を経時的に測定した。

RA の TKA, THA においては、CRP のピーク (maxCRP) は、全例術後 2 日目 (平均 $13.52 \pm 5.83 \text{mg/dl}$ 、 $2.93\text{-}23.81$) であり、上昇比は平均 10.53 倍 ($1.51\text{-}40.54$ 倍) であった。SAA のピーク (maxSAA) も、16 例中 14 例が術後 2 日目で、このうち 9 例は 3 倍希釈の最高値 $1290.3 \mu\text{g/ml}$ 以上であった。術後 7 日目には、CRP、SAA ともに手術前値に回復した。AA アミロイド合併 4 例中 2 例に消化器症状が生じ、長期間持続した。OA の TKA 及び THA 例も、術後 2 日目の CRP は、 0.04mg/dl から 17.57mg/dl へ、 0.06mg/dl から 14.57mg/dl へと著明に上昇を示した。maxSAA は、2 例とも $1290.3 \mu\text{g/ml}$ 以上であった。一方、RA の SS 例及び TP 例は、CRP 及び SAA の変動は軽微であった。今回の検討により RA の TKA, THA においては、CRP、SAA は術後 2 日目にピークとなり、術後 7 日目に前値にほぼ回復することが明らかとなった。SAA においてもピーク値は高く、SAA の負荷が短期間にせよかなり大きいことは手術による循環動態の変動と相まって、アミロイド症状の出現、悪化、進行に十分注意することが必要であると考えられた。実際、今回の検討中 AA アミロイド合併の 2 症例において腹部症状を来し、遷延化を認めた。一方、基礎疾患 (RA、OA) に関係なく、手術侵襲により炎症マーカーは著増を示すこと、minor surgery においては炎症マーカーの上昇はほとんど生じないことも明らかとなった。以上より、大関節の機能再建術は SAA 等の炎症マーカーが著増を来すため、AA アミロイドーシス合併 RA においては周術期における十分な注意が必要であると考えられる。

A. 研究目的

AA アミロイドーシスは、RA における進行期合併症であることから、関節破壊、ADL 低下に対して人工関節置換術をはじめとする関節機能再建術がしばしば適応となる。一方、手術後にアミロイド症状の出現や悪化、進行が時に見られることがあり、術後管理の重要性が指摘されている。SAA の上昇は、AA アミロイドーシス進行の危険因子と考えられるが、今回、関節機能再建術による手術侵襲により CRP 及び SAA がどのように推移するか検討した。

B. 研究方法

対象：1. RA major surgery 群：RA の全人工膝関節置換術 (TKA) 9 例、全人工股関節置換術 (THA) 7 例。このうち、THA の 4 例は AA アミロイド合併症例である。2. 変形性関節症 (OA) major surgery 群：OA の TKA 1 例、THA 1 例。3. RA minor surgery 群：RA の関節鏡視下滑膜切除術 (SS) 1 例、足趾形成術 (TP) 1 例。方法：手術前、手術直後、手術後 1 日、同 2 日、同 3 日、同 7 日、同 14 日の CRP 及び SAA を測定した。また、それぞれの手術時における出血量、手術時間を調査した。なお、RA 症例は全例に術前にステロイドカバーとしてハ

イドロコチゾン 100mg の投与を行った。

C. 研究結果

1. RA major surgery 群：① 手術前と手術直後では CRP, SAA とともにほとんど変動を認めなかった。② CRP のピーク (maxCRP) は、全例術後 2 日目 (平均 $13.52 \pm 5.83 \text{mg/dl}$, 2.93-23.81) であった (図 1)。上昇比は平均 10.53 倍 (1.51-40.54 倍) であった (図 2)。SAA のピーク (maxSAA) も、16 例中 14 例が術後 2 日目で、このうち 9 例は 3 倍希釈の最高値 $1290.3 \mu\text{g/ml}$ 以上であった (図 3)。③ 術後 7 日目には、CRP、SAA とともに手術前値に回復した。④ AA アミロイド合併 4 例中 2 例に消化器症状が生じ、長期間持続した。1 例は、腹痛、腹部膨満感、もう 1 例は食欲不振、腹部不快が術後約 4 週間にわたり持続した。⑤ 出血量及び手術時間と maxCRP との間に相関は認めなかった。⑥ TKA は THA に較べて有意に maxCRP の上昇を認めた。2. OA major surgery 群：それぞれ、術前、術後 2 日目 CRP は、 0.04mg/dl から 17.57mg/dl へ、 0.06mg/dl から 14.57mg/dl へと著明に上昇を示した。maxSAA は、2 例とも $1290.3 \mu\text{g/ml}$ 以上であった。3. RA minor surgery 群：SS 例は、術後 2 日目に SAA は、もつとも低下し、術後 14 日目にはほぼ前値にもどった (それぞれ、 $430.1 \mu\text{g/ml}$ 、 $53.56 \mu\text{g/ml}$ 、 $410.27 \mu\text{g/ml}$)。TP 例においても術前、術後 2 日目、術後 14 日目と SAA の上昇は認めなかった (それぞれ、 $316.6 \mu\text{g/ml}$ 、 $226.28 \mu\text{g/ml}$ 、 $147.53 \mu\text{g/ml}$)。

D. 考察

今回の検討により RA major surgery においては、CRP、SAA は術後 2 日目にピークとなり、術後 7 日目に前値にほぼ回復することが明らかとなった。SAA においてはピーク値は高く、major surgery 時に SAA の負荷が短期間にせよかなり大きいことは手術による循環動態の変動と相まって、アミロ

イド症状の出現、悪化、進行に十分注意することが必要であると考えられた。実際、今回の検討中 AA アミロイド合併の 2 症例において腹部症状を来し、遷延化を認めた。一方、基礎疾患 (RA、OA) に関係なく、手術侵襲により炎症マーカーは著増を示すこと、minor surgery においては炎症マーカーの上昇はほとんど生じないことも明らかとなった。

E. 結論

大関節の機能再建術は SAA 等の炎症マーカーの著増を来すため、AA アミロイドーシス合併 RA においては周術期における十分な注意が必要であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 奥田恭章、高杉潔：アミロイドーシスの診療。リウマチ科 27:933-938、2002.

2. 学会発表

1) 奥田恭章、山田俊幸、高杉潔、武田政寛、難波滋、大西誠：本邦、Caucasian に共通な AA アミロイドーシス危険因子としての SAA1、-13T アリル。日本リウマチ学会総会、神戸、4/22 - 4/24、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

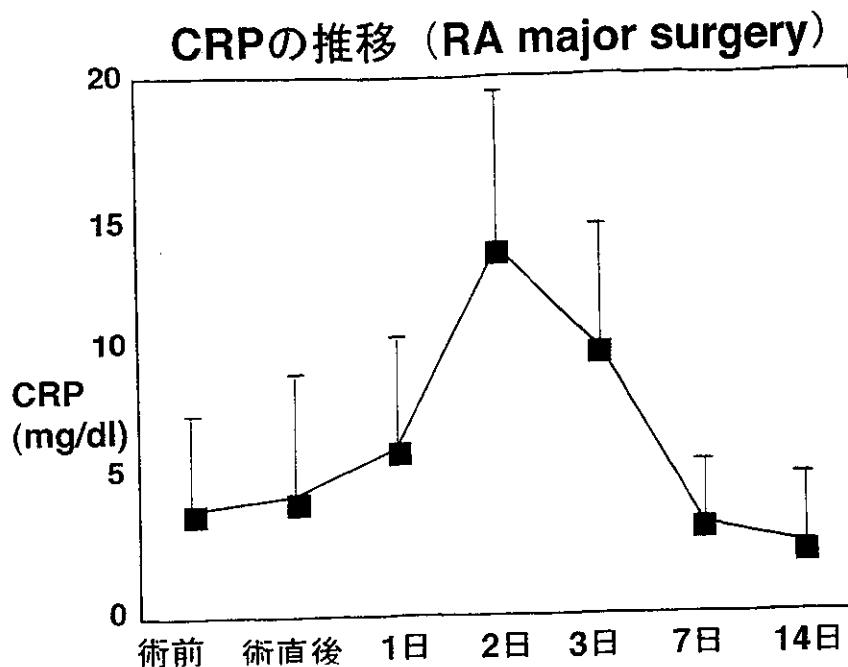


図1 RA major surgery 群における術前後 CRP の推移 (手術前から 14 日目まで)
 CRP のピーク (maxCRP) は、全例術後 2 日目 (平均 $13.52 \pm 5.83 \text{ mg/dl}$, 2.93 - 23.81) であった。術後 7 日目には、CRP は手術前値に回復した。

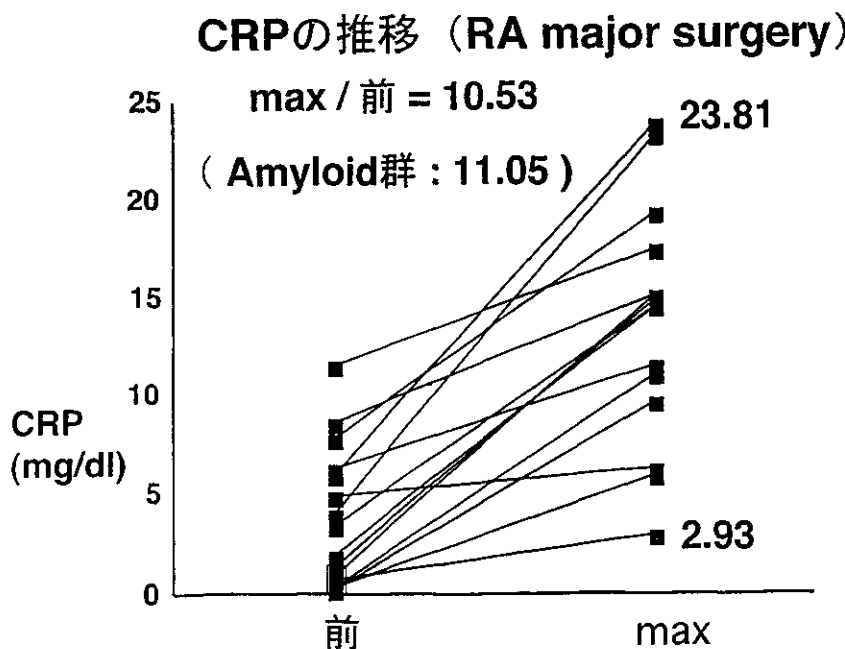


図2. RA major surgery 群における術前後 CRP の推移 (maxCRP 値/前値)
 上昇比は、平均 10.53 倍 (1.51 - 40.54 倍) であった。AA アミロイド合併の 4 例の平均は 11.05 であった。

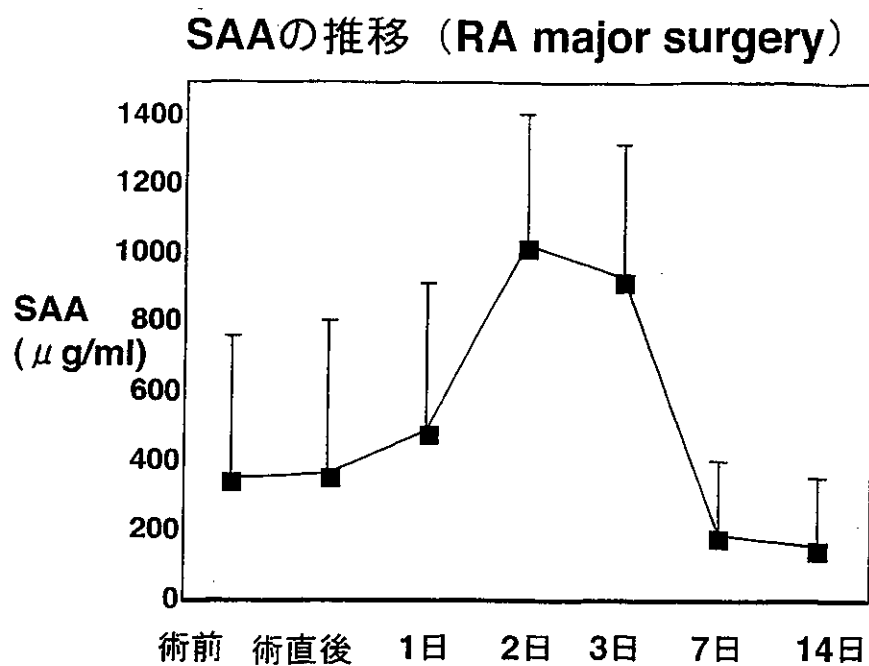


図3. RA major surgery 群における術前後 SAA の推移 (手術前から 14 日目まで)
 SAA のピーク (maxSAA) は、16 例中 14 例が術後 2 日目で、このうち 9 例は 3 倍希
 釈の最高値 1290.3 μ g/ml 以上であった。術後 7 日目には、SAA は手術前値に回復した。

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

アミロイド成分抗体の in vivo 応用

分担研究者 高杉潔 道後温泉病院リウマチセンター

共同研究者 山田俊幸*、奥田恭章**

*順天堂大学臨床病理、**道後温泉病院リウマチセンター

研究要旨 アミロイド成分に対する抗体の臨床応用を目指し、動物実験系を構築した。マウス AA アミロイドーシスモデルと抗体の組み合わせ 2 系列 (①ICR マウス:モノクロナル抗マウス SAA 抗体、②マウスアポEノックアウト/ヒトアポE発現マウス:モノクロナル抗ヒトアポE抗体)につき、投与された抗体がアミロイド組織へ到達することが免疫組織化学的に確認された。また系列①については抗体の血中クリアランスが正常マウスのそれより亢進していた。これらのことはアミロイド沈着のイメージングや、代謝的診断の足がかりとなるものであり、このモデルを使って更に検討を進めていきたい。

A. 研究目的

アミロイドーシスの治療が種々試みられるようになり、その効果としてアミロイド沈着量の変化を把握する必要が生じている。生検組織診は勿論重要であるが、採取部位の沈着が必ずしも全体を代表していない、頻回の施行が困難であるなどの問題がある。西欧では SAP のシンチグラフィが行われているが、その信頼性はともかく、本邦では現在、施行不可能である。本研究ではアミロイド成分に対する抗体を生体内応用することを目指し、モデルとなる動物実験系を構築することを目的とした。

B. 研究方法

(1) マウス

ICR マウス、雌 10 週例前後 (系列①) と三菱生命研、藤田博士より供与されたマウスアポリポ蛋白 E ノックアウト/ヒトアポ E2 トランジェニックマウス (以下アポ E ノックインマウス)、雌 3 月齢 (系列②) を使用した。アミロイドーシスは、AEF 投与と硝酸銀皮下注法で誘導した。

(2) 抗体

以下の 2 種のモノクロナル抗体を樹立、使用した。①クローン M10: ラットにマウス SAA を免疫して作製したキメラ抗マウス SAA 抗体で抗原性はラット。イムノプロットの結果から SAA 分子の

C 末端側 1/3 近辺を認識すると想定。②クローン YK-2: マウスにヒト AA アミロイド粗精製物を免疫して作製。エピトープ解析から、アポ E の 220 位を認識することが判明。

(3) 検討内容

マウスにアミロイドーシスを誘導し、その刺激を止めた後 2 週以上経過したマウスを使用。適量の抗体 (系列①は M10、系列②は YK-2) を静注し、2 日後に屠殺。各臓器の切片でラット免疫グロブリン (系列①)、またはマウス免疫グロブリン (系列②) を免疫組織化学的に検出した。系列①においては抗体をビオチン化して投与し、経時的に採血し、ビオチンをアビジンペルオキシダーゼで定量することで抗体の残存を検討した。

C. 研究結果

(1) アポ E ノックインマウスにおけるアミロイド誘導

予備実験として、3 種のヒトアポ E (E2、E3、E4) ノックインマウスに上述の方法でアミロイドーシスを惹起し、2 週後の脾切片を調べたところ、E2 マウスのみアミロイド陽性であった。各マウスの血清でヒトアポ E を定量したところ、E2 は 1~2mg/dl、他は感度以下であった。

(2) 検討成績

両系列で静注された抗体は各組織のアミロイ

ド沈着に検出された。静注された抗体は各組織のアミロイド沈着に検出された (図 1)。対象マウスに投与しても、臓器には抗体は検出されず、アミロイドマウスに非免疫の免疫グロブリンを投与しても抗体は検出されなかった。系列①においてアミロイド担マウスでの抗体の血中クリアランスは正常マウスのそれより亢進していた (図 2)。

D. 考察

アポ E 濃度の低いマウスでアミロイド誘導困難であったことは、アポ E ノックアウトマウスではアミロイド難誘導性であるとした既報に合致するものであった。両系列とも抗体のアミロイドへの到達が確認され、今後、アイソトープ標識による組織への集積、体表診断へと研究を進展させる足がかりとなった。特に系列②のアポ E は全てのタイプのアミロイド沈着に存在することから、他タイプへの応用も期待される。抗体のクリアランスも診断に使える可能性が示されたが、抗体分子の修飾など検討すべき点は多いと考える。また抗体によるアミロイド吸収促進という治療への応用性も将来検討したい。

E. 結論

AA アミロイドーシスモデルにおいて、SAA、apoE をターゲットにそれぞれに対するモノクロナル抗体が *in vivo* でアミロイドに結合することが示された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yamada T, Mukaiyama I, Miyake N, Igari J.

Measurement of cystatin C in cerebrospinal fluid. *Rinsho Byori* 50:613-617, 2002

2) Murai T, Yamada T, Miida T, Arai K, Endo N, Hanyu T. Fenofibrate inhibits reactive amyloidosis in mice. *Arthritis Rheum* 46:1683-1688, 2002

3) Fukushima K, Ogawa H, Kitayama T, Yamada T, Naito H, Funayama Y, Matsuno S, Sasaki I. Epithelial induction of serum amyloid A in experimental mucosal inflammation. *Dig Dis Sci* 47:1438-46, 2002

2. 学会発表

1) 山田俊幸. 抗体によるアミロイドターゲティング. 第 46 回日本リウマチ学会総会. 神戸. 2002 年 4 月 23 日 (リウマチ 42:324, 2002)

2) 山田俊幸、猪狩淳、奥田恭章、高杉潔: 日本人、Caucasian に共通な AA アミロイドーシス危険因子としての SAA1, -13T アリル. 第 49 回日本臨床検査医学会総会. 大阪. 2002 年 11 月 24 日. (臨床病理 50 補: 173, 2002)

3) 山田俊幸、三宅紀子、猪狩淳、来栖厚、山崎滋孝、岸川匡彦、星井嘉信、櫻林郁之介. 診断に苦慮した全身性アミロイドーシスの一例. 第 49 回日本臨床検査医学会総会. 大阪. 2002 年 11 月 22 日. (臨床病理 50 補: 143, 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



図1 抗体のアミロイド組織への到達

アミロイドーシス惹起マウスに抗体 M10 を投与、2日後の切片（左から脾、肝、腎）でラット免疫グロブリンを免疫組織化学的に検出した。

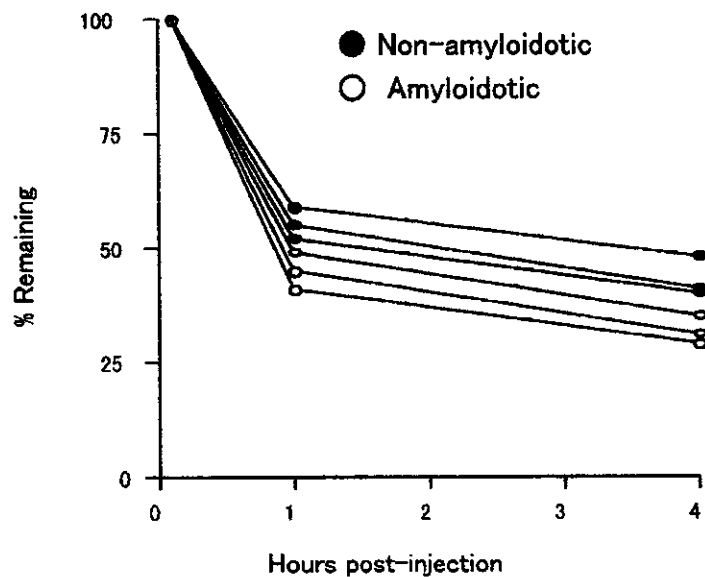


図2 抗 SAA 抗体の血中クリアランス

アミロイド陽性マウスと対象マウスにビオチン化 M10 を投与、抗体の残存の経時変化を検討。