

- 4) Korenaga T, Yan J, Sawashita J, Matsusita T, Naiki H, Hosokawa M, Mori M, Higuchi K, Fu X. Transmission of amyloidosis in offspring of mice with AApoAII amyloidosis. *Am J Pathol*, 2006 (in press)
2. 学会発表
- 1) 付笑影、是永龍巳、Zhang Huanyu, 巖景民、澤下仁子、森政之、樋口京一：マウス老化アミロイドーシス；飼育室における伝播。日本基礎老化学会第 28 回大会、東京、6 月 16 日、2005 年
- 2) 巖景民、藤井健志、岸田秀之、細江和典、姚俊潔、澤下仁子、森政之、樋口京一：SAMP1 マウスを用いた還元型 Coenzyme Q10 の抗老化作用の解析。日本基礎老化学会第 28 回大会、東京、6 月 16 日、2005 年
- 3) 付笑影、是永龍巳、Zhang Huanyu, 巖景民、内木宏延、澤下仁子、森政之、樋口京一：マウス老化アミロイドーシス；飼育室における伝播の可能性。第 20 回老化促進モデル(SAM)研究協議会、東京、7 月 29 日、2005 年
- 4) 澤下仁子、亀谷富由樹、森政之、樋口京一：マウス老化アミロイドーシスにおけるアミロイド線維形成関連 apoA-II アミノ酸配列の解析。第 20 回老化促進モデル(SAM)研究協議会、東京、7 月 29 日、2005 年
- 5) 巖景民、藤井健志、岸田秀之、細江和典、姚俊潔、森政之、樋口京一：SAMP1 マウスを用いた還元型 Coenzyme Q10 の抗老化作用の解析。第 20 回老化促進モデル(SAM)研究協議会、東京、7 月 29 日、2005 年
- 6) Higuchi K : Transmission of mouse systemic amyloidosis. The 4th Asia-Pacific IAP Congress. Beijing China, August 26, 2005
- 7) Ge F, Yao J, Fu X, Guo Z, Zhang B, Yan J, Zhang H, Li G, Sawashita J, Mori M, Higuchi K: Mouse senile amyloidosis in the transgenic mice of apolipoprotein A-II (*Apoa2^c*). The 4th Asia-Pacific IAP Congress. Beijing China, August 24, 2005
- 8) Fu X, Korenaga T, Zhang H, Yan J, Naiki H, Sawashita J, Mori M, Higuchi K: Mouse senile amyloidosis: The possible transmission in the mouse room. 文化省特定領域「タンパク質の一生」国際会議、淡路市、10 月 30 日、2005 年
- 9) Yan J, Nakamura A, Guo Z, Fu X, Mori M, Higuchi K.: Initiation and fibrillization of AA amyloidosis by MRP-14 amyloid fibril. 文化省特定領域「タンパク質の一生」国際会議、淡路市、10 月 30 日、2005 年
- 10) Yan J, Ge F, Fu X, Guo Z, Zhang B, Yan J, Zhang H, Li G, Sawashita J, Mori M, Higuchi K: Mouse senile amyloidosis in the transgenic mice of apolipoprotein A-II (*Apoa2^c*). 文化省特定領域「タンパク質の一生」国際会議、淡路市、10 月 30 日、2005 年
- 11) Sawashita J, Mori M, Kamatani F, Higuchi K: Amyloid fibril formation by the two distinctive sequences of apolipoprotein A-II associated with the mouse senile amyloidosis. 文化省特定領域「タンパク質の一生」国際会議、淡路市、10 月 30 日、2005 年
- 12) 張蓓茹、付笑影、葛鳳霞、巖景民、張桓宇、澤下仁子、森政之、樋口京一：活性化 hHSF1 トランスジェニックマウスにおける AApoAII アミロイドーシスの抑制。第 10 回臨床ストレス蛋白質研究会、熊本、11 月 26 日、2005 年
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

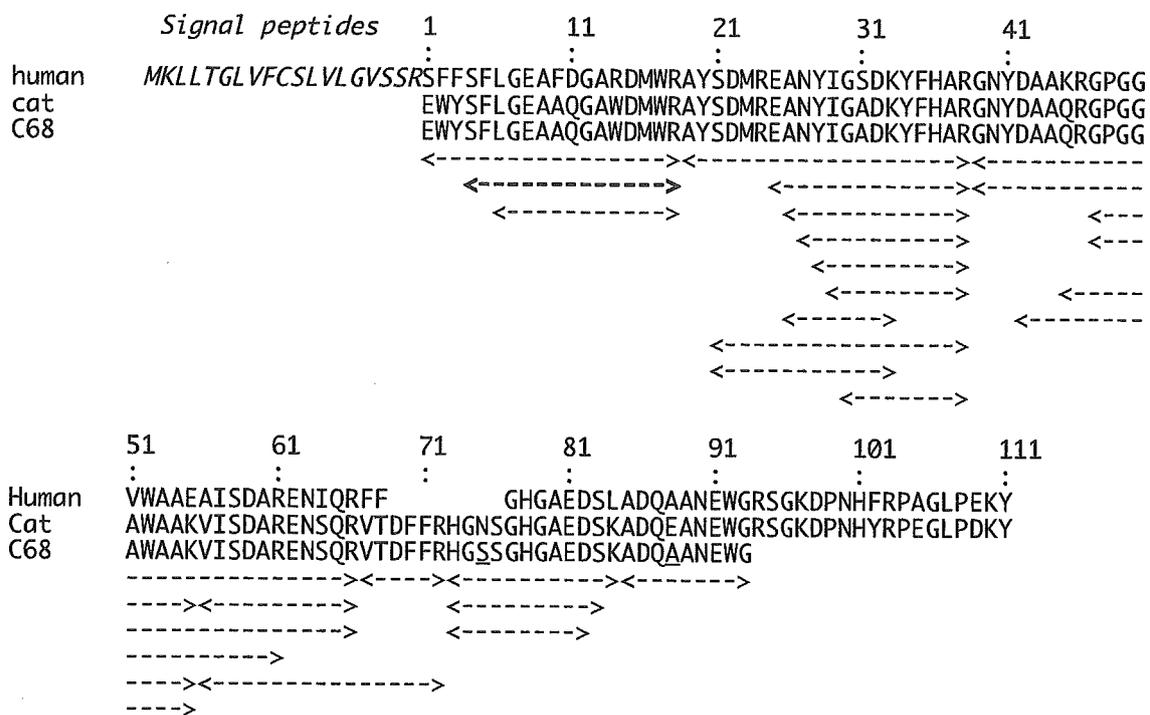


図1 チーターのAAタンパク質の一次構造。

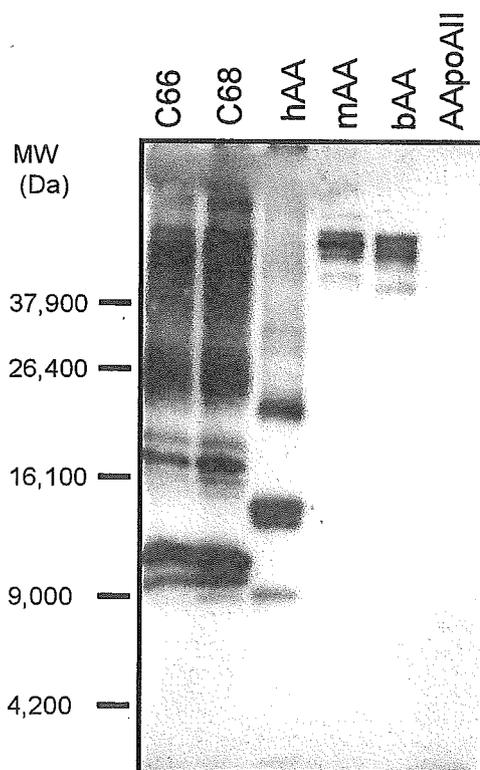


図2 抗チーターAA抗血清を用いたWestern blotting 解析。hAA; ヒトAA、mAA; マウスAA、bAA; ウシAA

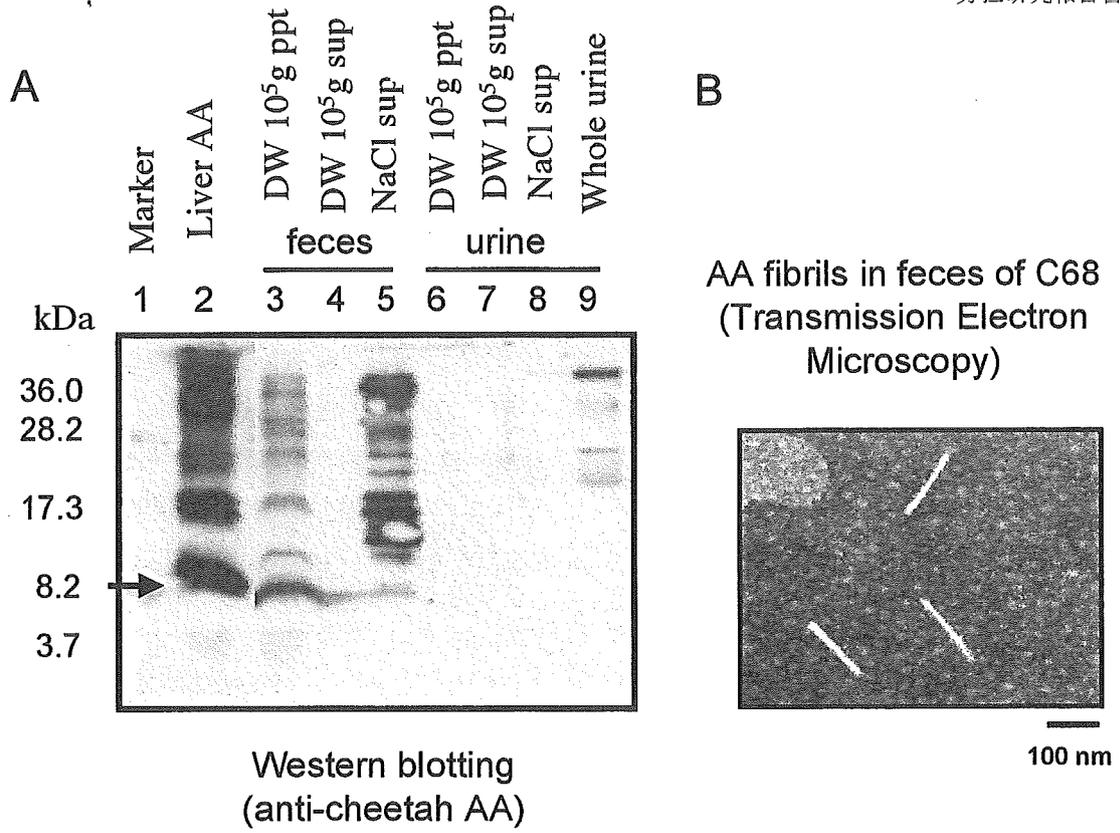


図3 チーター糞中のAAアミロイド線維。A, Western blotting解析、
B, 電子顕微鏡像

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)
 アミロイドーシスの画期的診断・治療法に関する研究 分担研究報告書

実験的 AA アミロイドーシスの発症における triptolide の効果

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 崔 丹*、星井嘉信*、河野裕夫*、権藤俊一**

*山口大学医学部構造制御病態学講座、**山口大学病院病理部

研究要旨 漢方薬 *Tripterygium wilfordii* Hook.f. の純品 triptolide を投与することによって実験的マウス AA アミロイドーシス発症を抑制することができるかどうかについて調べた。480、360 μ g/kg/day の triptolide (腹腔内または経口) を投与した群において、すべてのマウスにアミロイドの沈着がみられなかった。triptolide を投与した 5,24,48,72 時間および 7 日後、いずれの群においても、SAA の上昇が軽度であった。特に、triptolide 投与 7 日後、triptolide 投与群と対照群の血中 SAA の濃度が有意差を認めた。カゼインを 7 日間連日予備投与し、SAA 高値の状態では triptolide を投薬すれば、より効果的であった。triptolide の投与によって、血清サイトカイン、特に IL-6 が有意に抑制された。

A. 研究目的

AA アミロイドーシスは慢性炎症性疾患患者の合併症として発症することが知られているが、現段階では治療法として AA アミロイドーシスに対して、原疾患の治療以外に確立した治療法がなく、その開発が望まれている。一方、漢方薬 *Tripterygium wilfordii* Hook.f. (雷公藤) は中国では関節リウマチの治療薬として繁用されている。今回、我々は *Tripterygium wilfordii* Hook.f. の純品 triptolide を用いて、実験的マウス AA アミロイドーシスに対する抑制効果の有無について検討した。

B. 研究方法

1. 動物

7 週齢メス ICR マウスを使用し、一実験群を 10 匹とした。炎症刺激として 0.5ml 10%カゼインを連日皮下投与した。

2. 方法

①濃度依存性の triptolide のアミロイドーシス発症抑制効果：480、360、240、120 μ g/kg/day の triptolide をカゼインと同時にマウスに連日投与した。初日のみ AEF を投与した。8 日目にアミロイドの沈着を検討した。

②急性発症したアミロイドーシスにおける

triptolide の効果：480 μ g/kg/day triptolide(腹腔内または経口)とカゼインを連日投与した 7 日後、アミロイド沈着の有無を検討した。初日のみ AEF を投与した。また、triptolide 投与後の 5,24,48,72 時間および 7 日、採血を行い、血清 SAA 濃度を測定した。

③長期炎症による発症したアミロイドーシスにおける triptolide の効果：480 μ g/kg/day triptolide (腹腔内または経口)とカゼインを連日皮下投与した。投薬の 14,21,28 日後、採血し、投薬の 28 日後、アミロイド沈着の有無を検討した。

④SAA 高値の状態での triptolide 効果：カゼインを 7 日間連日予備投与した。採血した後、AEF、480 μ g/kg/day triptolide を腹腔内に投与し、以後、triptolide とカゼインを連日投与した。8 日目採血、アミロイド沈着の有無を検討した。

すべての実験群において、アミロイド沈着の有無を検討するために、マウスを屠殺した時、脾臓、肝臓、腎臓を摘出し、ホルマリン固定、パラフィン切片を作製し、HE、Congo red 染色を行った。Congo red 染色標本を偏光顕微鏡で観察した。Congo red 染色陰性例について、抗マウス AA 抗体を一次抗体として、免疫染色を行い、アミロイド沈着がないことを確認した。

⑤各実験群について、ELISA Kit (Biosource)を用

いて、血中の SAA と IL-6、IL-1 β および TNF- α の濃度を測定した。統計学的検討は t 検定を用いた。

(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、また実験、屠殺に際しては苦痛が最小限になるように配慮し、山口大学医学部動物実験委員会の承認の下に、山口大学医学部の動物実験に関する指針に沿って行った。

C. 研究結果

1. 濃度依存性の triptolide のアミロイドーシス発症抑制効果：

480、360 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ の triptolide を投与した群において、すべてのマウスにアミロイドの沈着がみられなかった。240 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ triptolide を投与した群では、10 匹中に 2 匹、120 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ triptolide を投与した群では、10 匹中に 4 匹のマウスにアミロイドの沈着がみられたが、どれも、ごく微量であった。しかし、triptolide のかわりに生食を投与した対照群のすべてのマウスに中等量から多量のアミロイド沈着がみられた。

各濃度の triptolide を投与した群の血清 SAA の上昇が軽度で、生食投与群と比較して、有意差を認めた ($P<0.001$, 表 I)。

2. triptolide の投与による血清 SAA 濃度の経時的な変化：

480 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ の triptolide と 10%カゼインを投与した 5,24,48,72 時間および 7 日後、いずれの群においても、SAA の上昇が軽度であった。特に、triptolide 投与 7 日後、triptolide 投与群と対照群の血中 SAA の濃度が有意差を認めた (Fig.1.)。

3. 長期炎症状態での triptolide の発症抑制効果：

480 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ の triptolide とカゼインを連日 28 日後、すべてのマウスにアミロイドーシスの発症を認めなかった。triptolide を投与している間に SAA の濃度が徐々に下がっていく傾向が見られ、屠殺時、triptolide 投与群の SAA は 51.13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となった。対照群において、すべての個体に多量のアミロイド沈着がみられた (Fig.2.)。

4. SAA 高値状態での triptolide の発症抑制効果：

一週間のカゼインの予備投与によって、血清

SAA の濃度は 4778.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ まで上昇したが、480 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ の triptolide を投与した一週間後、血清 SAA が 536.65 $\mu\text{g}/\text{ml}$ まで下がった。480 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ の triptolide を投与した群では、10 匹中 2 匹のみに微量のアミロイドの沈着が見られた。カゼインのみを投与した群のすべてのマウスに中等量から多量のアミロイドの沈着がみられた。5. triptolide 投与による血清サイトカインの経時的な変化：

カゼインと 480 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の triptolide 投与 5 時間後、血中 IL-6 濃度がピークに上昇し、その後徐々に正常値に復旧し、投与 13 時間後、ほぼ正常となった。しかし、対照群と比較して IL-6 の上昇が軽度で、9、11 時間の濃度変化において両群間に有意差を認めた ($P<0.01$, Fig.3.)。triptolide 投与後、IL-1 β および TNF- α の上昇を抑制されたが、対照群との間、統計学的に有意差を認めなかった (Fig.4,5.)。

D. 考察

今回の実験では、triptolide が濃度依存的に実験的マウス AA アミロイドーシスの発症を抑制することが明らかとなった。アミロイドーシスの発症が抑制できる量は 360 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ であった。投薬の濃度によって効果が異なることは漢方薬の特徴の一つと考えられる。腹腔内投与と経口投与両方ともアミロイドーシスの発症抑制効果を有した。健常状態での投薬と比較して、SAA 高値状態で triptolide を投与すれば、より効果的に SAA を抑制した。長時間 (4 週間) の triptolide の連続投与によって、SAA が正常に近いレベルまで下がった。triptolide の投与によって、血清サイトカイン、特に IL-6 を有意に抑制することで、SAA を有効に抑えられ、AA アミロイドーシスの発症を抑制することができると考えられる。従って、慢性炎症性疾患の治療薬として、特にアミロイドーシスの予防薬として優先的に triptolide 選択すべきである。

一方、4 週間の triptolide を連続投与しても、肝臓、腎臓では明らかな組織学的な病変が認められず、肝臓、腎臓障害など副作用が見られなかった。

E. 結論

①漢方薬 triptolide が実験的 AA アミロイドーシスの発症抑制に有効であった。②腹腔内投与にもかかわらず、経口投与でもアミロイドーシス発症抑制効果を認められた。③triptolide による血清 SAA およびサイトカインを抑制された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ono S, Cui D, Kunitsugu I, Hoshii Y, Kawano H, Takahashi M, Gondo T, Ishihara T. Acceleration of

murine amyloidosis by implantation of amyloid-containing grafts. *Amyloid: the journal of protein folding disorders*. 12(4): 226-232, 2005

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 I . triptolide の投与により、マウス AA アミロイド-シスの発症抑制効果：

腹腔内投与 triptolide の量	マウスアミロイド 発症頻度	アミロイド 沈着程度	血清 SAA 平均濃度
480 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$	0/10	0	*960.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$
360 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$	0/10	0	1094 $\mu\text{g}/\text{ml}$
240 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$	2/10	微量	1440 $\mu\text{g}/\text{ml}$
120 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$	6/10	微量	1798 $\mu\text{g}/\text{ml}$
生食	10/10	中等～多量	*5019.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$

P<0.001

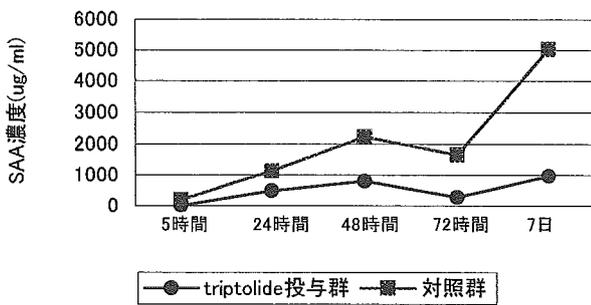


Fig. 1. triptolide の投与下の SAA 濃度の経時的変化

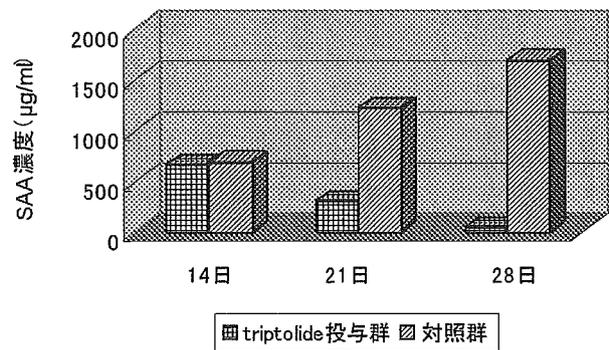


Fig. 2. triptolide の長期投与による血清 SAA の変化

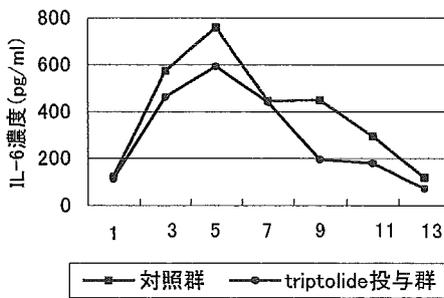


Fig. 3. IL-6 濃度変化。横軸は採血時間を示す

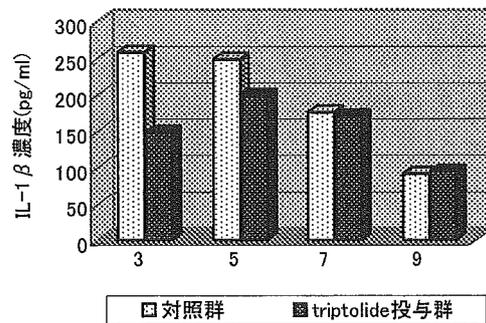


Fig. 4. IL-1 β 濃度変化。横軸は採血時間を示す

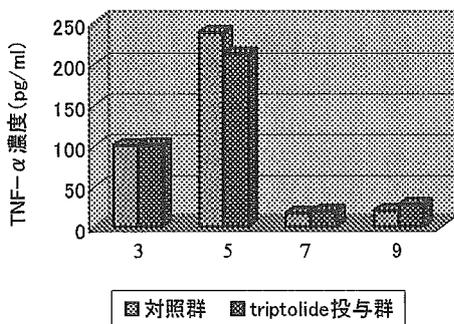


Fig. 5. TNF- α 濃度変化。横軸は採血時間を示す

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)

アミロイドーシスの画期的診断・治療法に関する研究班 分担研究報告書

AA アミロイドーシスの新たな治療法の考案

—AA アミロイドーシスの発症における T 細胞の役割からみた治療研究—

分担研究者 安東由喜雄 熊本大学大学院医学薬学研究部、病態情報解析学

共同研究者 植田光晴*、姫野真悟**、孫 統国**、金 在美**、斉藤 史織**、山下太郎*、
中村政明***

熊本大学大学院医学薬学研究部、*神経内科、**病態情報解析学、

***国立水俣病総合研究センター

研究要旨 AA アミロイドーシス惹起マウスに FK506 を連日投与し、脾臓におけるアミロイド沈着量の変化を検討した。また FK506 の投与時期を変え効果の違いを検討した。FK506 は用量依存性をもってマウス脾臓におけるアミロイド沈着を抑制した。しかし FK506 投与によって血清中の SAA、IL-1 β 、IL-6 レベルは変化を認めなかった。FK506 は炎症惹起後の 3 日間のみ投与でも、アミロイド沈着量を有意に減少させた。更に、先天的に T 細胞と B 細胞の機能が欠損している (severe combined immunodeficient) SCID マウスでは炎症を惹起すると血清 SAA レベルは CB-17 マウスと同程度まで上昇するが、アミロイド沈着量はわずかであった。AA アミロイドーシス形成には本アミロイドの前駆蛋白である SAA が著しく上昇することが必要条件であるが、十分条件となりえないことが知られており、他の因子の関与が不可欠と考えられる。本研究においては FK506 投与により血清 SAA レベルが減少することなくアミロイド形成の抑制を認めた。SCID マウスにおいても、血清 SAA レベルは正常マウスと同様に上昇するがアミロイド沈着量が減少する。このメカニズムは FK506 投与時と同様の機序によるものと考えられた。またアミロイド沈着部位に濾胞樹状細胞と一部の CD4 陽性 T 細胞が共存しており、本疾患の病態へこれらの細胞が関与している可能性が示唆された。本マウスモデルにおいて T 細胞は AA アミロイドーシスの形成に深くかかわっているものと考えられ、AA アミロイドーシスに対する新たな治療戦略の可能性が考えられた。

A. 研究目的

AA アミロイドーシス発症における T 細胞の関与を調べると共に、T 細胞の活性化抑制を主な作用とする免疫抑制剤 (FK506) の AA アミロイドーシスに対する治療効果を検討し、新たな治療戦略の可能性を考察した。

B. 研究方法

1. 動物

C3H/HeN、ICR、SCID、CB-17 マウスを用い、以下の 2 種類の方法により、主としてマウスの脾臓にアミロイドを惹起した。

(1) 2% 硝酸銀 0.4 ml をマウス背部皮下に、amyloid enhancing factor (AEF) 0.3 ml を腹腔内に

投与し、6 日後に屍殺しアミロイド沈着を評価した。

(2) フロイント完全アジュバンド (FCA) 1 ml と *Mycobacterium butyricum* 60 mg を溶解した PBS 1 ml を混和したエマルジョン 0.25 ml をマウス背部皮下に投与し、2 週間後に再度同じエマルジョンを 0.25 ml 背部皮下に投与し、さらに 2 週間後にマウスを屍殺し、各組織におけるアミロイド沈着量を評価した。

動物の飼育は熊本大学動物資源開発研究施設で行い、熊本大学動物実験における倫理基準に基づき動物実験を行った。

2. FK506 投与

マウス腹腔内に FK506 を 2-200 μ g/日、連日

投与した。

3. アミロイドの検出、及び免疫組織学的検討

アミロイドの検出はコンゴレッド染色を行い、偏光顕微鏡でアップルグリーンを呈することにより同定した。アミロイド沈着部位の面積を NIH image で定量化した。

抗 FDC-M1 抗体(BD Pharmingen, USA)、抗 CD4 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, USA)、抗 CD8 抗体 (Chemicon, USA)、抗 CD20 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, USA) を用い免疫組織学的検討を行った。発色は DAB Liquid System (DAKO, Denmark) を使用した。

4. 血中 SAA、サイトカインレベルの測定

血中 SAA、IL-1 β 、IL-2、IL-6、TNF- α の測定は enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Biosource International, USA) を用いて行った。

C. 研究結果

方法(1)によるアミロイド惹起マウスで、FK506は用量依存的に脾臓におけるアミロイド沈着を抑制した(図1)。しかしFK506投与によって血清中のSAA、IL-1 β 、IL-6レベルは変化を認めなかった。また、血中のIL-2、TNF- α は検出感度以下であった。FK506は硝酸銀とAEF投与当日から投与後2日までの3日間の投与のみでも、アミロイド沈着量を有意に減少させた。

またCB-17とSCIDマウスにおいて、方法(1)でアミロイド惹起すると、SCIDマウスの血清SAAレベルはCB-17マウスと同程度まで上昇するが、アミロイド沈着量は少なかった(図2)。

ICRマウスに、方法(2)でアミロイドを惹起すると、脾臓、肝臓、腎臓、十二指腸、心臓に、50%、43%、31%、31%、25%の発症率でアミロイド形成を認めたが、連日のFK506投与(200 μ g/日)群では、各臓器においてまったくアミロイド沈着を認めなかった。また、本アミロイド惹起マウスにおいても、FK506投与群の血中SAAレベルは、対照であるPBS投与群と比較して、有意な差を認めなかった。

アミロイド沈着を来たしたマウスの脾臓において、濾胞周囲にアミロイドを認めたが、免疫組織学的検討により、アミロイド沈着部位と濾胞樹状細胞の局在がほぼ一致し、CD4陽性T細胞の一部も

局在が一致することが判明した。また、CD20陽性であるB細胞はアミロイド沈着部位の外側に位置していた。

D. 考察

現在、AA アミロイドーシスに対する治療は、炎症を種々の薬剤で抑制することや、炎症性サイトカインの作用をブロックする製剤を用いることにより、本アミロイドーシスの前駆蛋白である SAA の産生、血中への分泌を抑制することが、主なターゲットとなっている。今回検討を行った FK506 投与では、血中 SAA や炎症性サイトカインのレベルを抑制することなく、アミロイド沈着を抑制することが判明し、従来の治療法と異なった機序でアミロイドを抑制している可能性が考えられた。

また、先天的に T 細胞と B 細胞の機能が欠如した SCID マウスはアミロイド惹起に対して抵抗性を持つことが判明したが、同系統で T 細胞と B 細胞の機能が正常である CB-17 マウスと比べ血中 SAA レベルに差は認められず、FK506 投与におけるアミロイド形成の抑制と同一の機序により、アミロイド抵抗性が生じた可能性が考えられた。

組織学的な検討で、アミロイドの局在と濾胞樹状細胞と一部の CD4 陽性 T 細胞の局在が一致することから、これらの細胞がアミロイド形成に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

アミロイド形成における T 細胞の役割は、直接的なものか、他の細胞を介した間接的なものかは、今回の検討からは不明であり、今後の検討課題である。

E. 結論

マウスモデルにおいて T 細胞は AA アミロイドーシスの形成に深くかかわっているものと考えられ、本研究で得られた知見から、AA アミロイドーシスに対する新たな治療戦略の可能性が考えられた。

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) 植田光晴、安東由喜雄、中村政明、山下太郎、姫野真悟、孫 続国、立石多貴子、内野 誠：
AA アミロイドーシスモデルマウスにおける T 細胞の病態への関与. 第 52 回日本臨床検査医学会総会、福岡、11 月 17 日～20 日、2005

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図1 FK506のアミロイド抑制効果に用量依存性を認めた

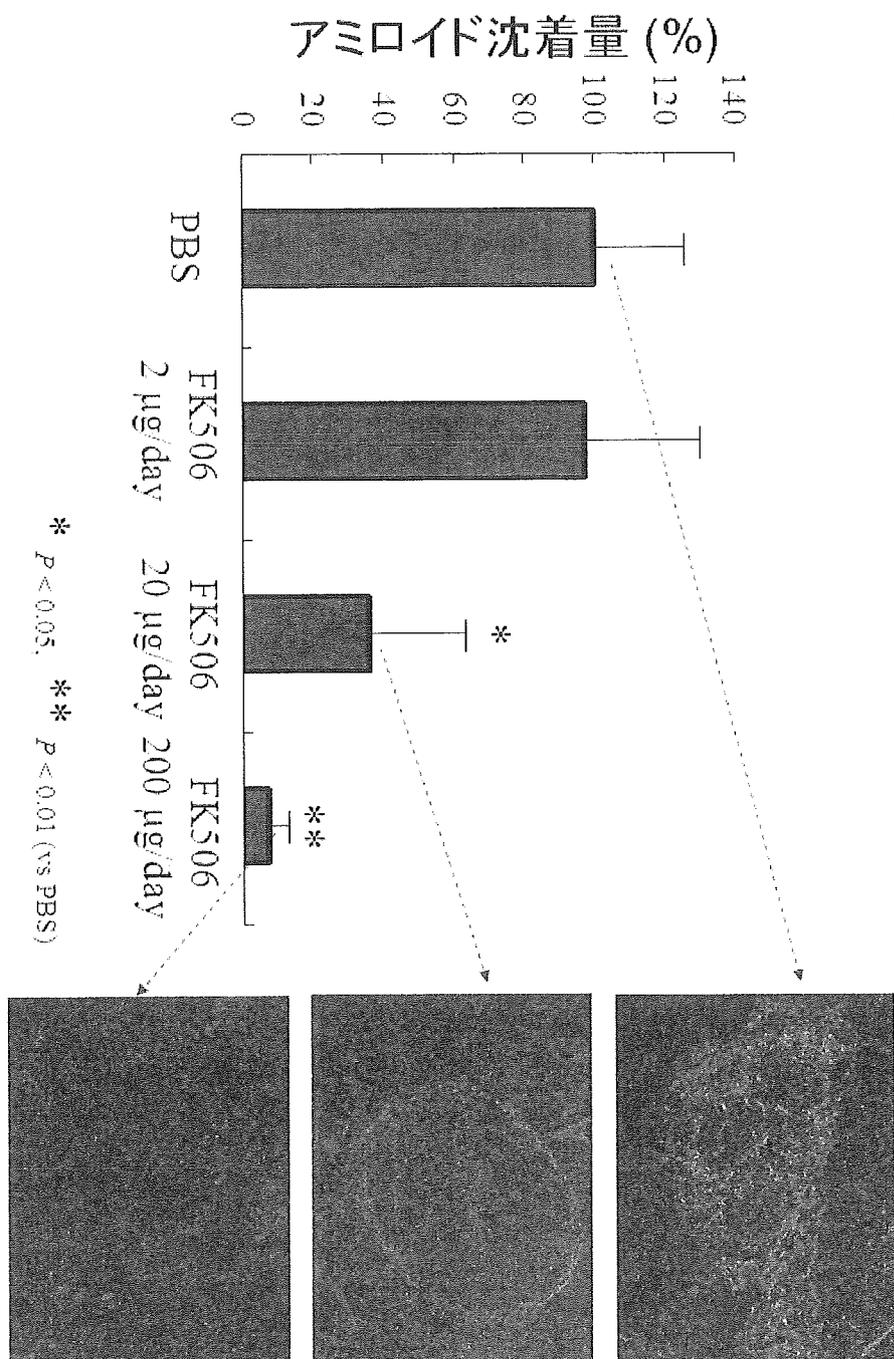
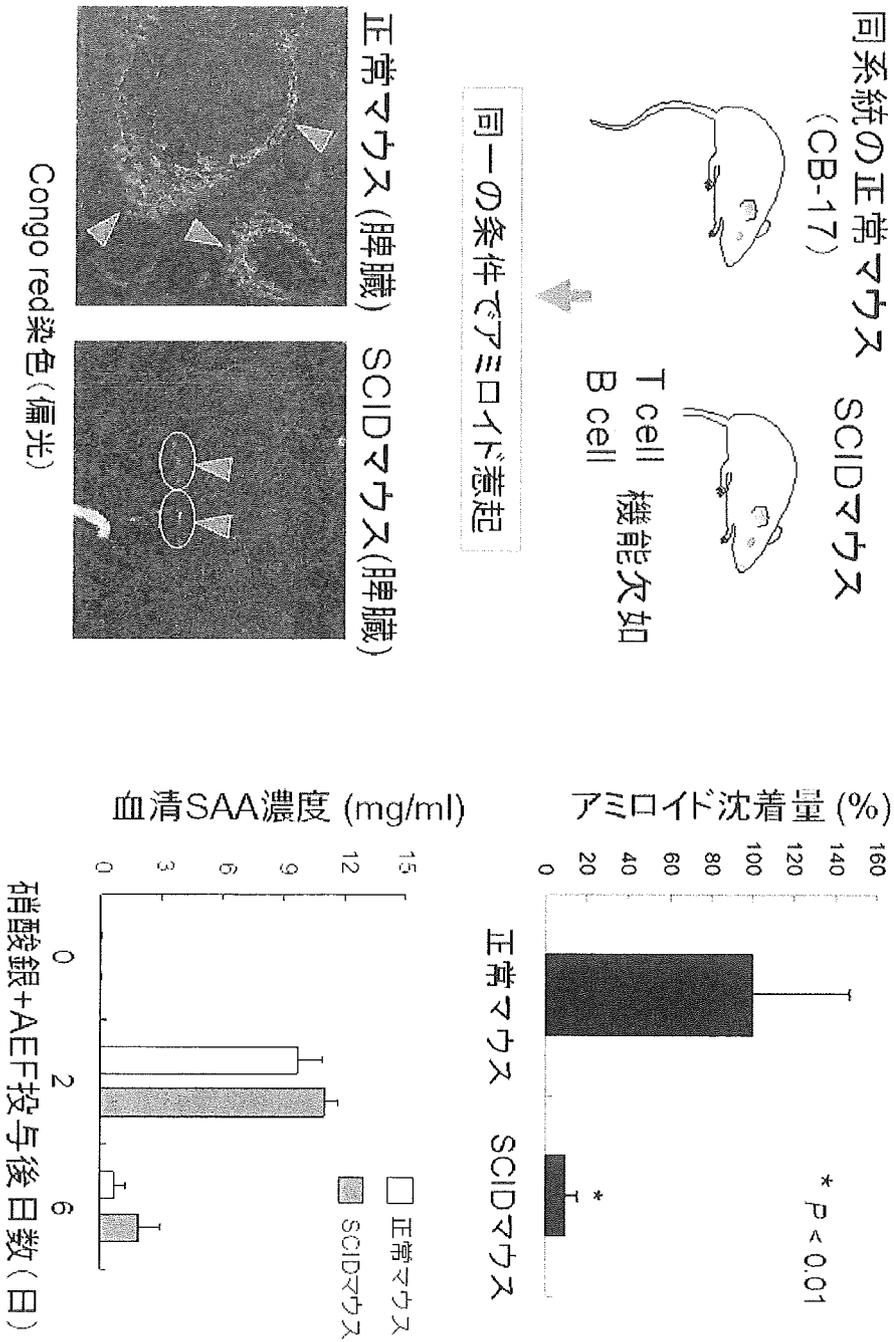


図2 免疫不全マウス (SCIDマウス) でアミロイド惹起



厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)

アミロイドーシスの画期的診断・治療法に関する研究 分担研究報告書

関節リウマチによる反応性アミロイドーシス合併例の透析導入法の検討

分担研究者 中野正明 新潟大学医学部保健学科

共同研究者 黒田 毅、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・膠原病内科学分野

研究要旨 アミロイドーシスを合併した RA 症例で血液透析に導入された 51 症例対象に透析導入法を検討した。性別は男性 7 例、女性 44 例。RA 発症年齢は 44.5 ± 11.1 歳、アミロイドーシス発症年齢は 60.8 ± 9.5 歳、透析導入年齢は 63.6 ± 9.0 歳であった。血液透析に導入された 51 症例全体の透析導入時のデータと予後をレトロスペクティブに検討した結果、緊急導入した症例が予定導入に比べて有意に予後が悪かった。患者背景の検討では、透析開始時期を決める特異点がなかったため、4 分法で各種パラメーターを検討した。25%tile の値では Ccr 10 ml/min, 血清 Cr 値 2.5 mg/dl であったため、これを基準に血液透析導入のプログラムを作成し 12 症例をプログラムに基づいて透析に導入した(基準導入)。生命予後をプロスペクティブに検討した結果、生命予後の解析で基準導入の予後は緊急導入に比べて有意に改善していた。また基準導入と予定導入には有意差を認めなかった。また透析導入時の、心不全や、Vascular access の不良等は認めず、このプログラムを透析導入時に使用することは有用であった。

A. 研究目的

反応性全身性 AA アミロイドーシス(アミロイドーシス)は進行期の関節リウマチ(RA)における最も重要な合併症の一つであり、腎障害進行例では、その予後は極めて不良である。特に透析導入例では導入時の早期死亡が予後を悪化させることが多い。我々は、アミロイドーシス症例データをもとに腎不全例の血液透析導入法についてプログラム化を行い予後を検討した。

B. 研究方法

1. 対象

アミロイドーシスを合併した RA 症例で血液透析に導入された 51 症例対象とした。性別は男性 7 例、女性 44 例。RA 発症年齢は 44.5 ± 11.1 歳、アミロイドーシス発症年齢は 60.8 ± 9.5 歳、RA 発症からアミロイドーシス発症期間は 16.2 ± 9.5 、透析導入年齢は 63.6 ± 9.0 歳であった。RA の診断は 1988 年の ARA の分類基準に基づいて行い、アミロイドーシスは、胃・十二指腸粘膜生検、腎生検をはじめとする各種生検でフェノールコンゴールレッド染色にてアミロイド沈着で診断した。

2. 方法

血液透析に導入された 51 症例の透析導入時の血液、尿、生化学データ、透析導入の状況、死亡年齢を含めた予後をレトロスペクティブに検討した。また、血液透析導入のプログラムを作成し 12 症例をプログラムに基づいて透析に導入し、生命予後をプロスペクティブに検討した。

C. 研究結果

透析導入後の全体の累積生存率 75% 生存期間は 38 日、50% 生存期間は 251 日であった(図 1)。アミロイドーシス症例の 43 例の死因の検討では、主な死因は心不全が 23 例と最も多く、消化管出血 4 例、消化管穿孔 2 例、シャント感染 2 例であった。透析導入例を予定導入と緊急導入の 2 群に分けて生存率を検討した。予定導入は 31 例、緊急導入は 20 例であり、緊急導入では有意に生存率が低下しており ($P=0.0003$)、特に緊急透析の透析開始時の早期死亡が予後を悪化させていた(図 2)。緊急透析導入時の死亡を減少させることが透析の予後を改善すると考え、各種透析導入時のパラメーターを検討した。4 分法での透析導入時の各種パラメーターの検討では、緊急導入症例で、25 パーセントイルの血清クレアチニン(Cr)値は

2.5 mg/dl であり、クレアチニンクリアランス(Ccr)は 9.7 ml/min であった (表 1)。以上のようなデータを踏まえた上で、緊急導入を避けるため血清 Cr 値 2.5 mg/dl を透析導入の指標として、プログラムを作成しプロスペクティブに本方法による導入法の予後を検討した。プログラムは、外来での血清 Cr 値が 2.0 mg/dl 以上で Ccr を測定する。経験的にこの時期の Ccr は 15-20 ml/分であるが、入院後内シャントをはじめとする Vascular access を作成し一時退院とする。その後、血清 Cr 値が 2.5 mg/dl で入院として、Ccr が 10 ml/min 未満か、Ccr が 10 ml/min 以上でも胸水、肺鬱血、心拡大を認めたら透析に導入するものである(図 3)。12 症例に関してこの導入プログラムを使用したのが、患者背景は先に示した 51 例の透析症例のサブ解析であり全例の背景とは著変を認めなかった。2006 年 1 月末現在のプログラム導入による生存例は 6 例、死亡例は 6 例である。透析導入時のデータは、血清 Cr 値は 2.9 mg/dl であり、Ccr は 10.7 ml/min であった。入院時に胸水等を伴う症例が多く、これらの症例は速やかに導入した。透析導入症例群の生命予後の検討では、プログラムによる基準導入は緊急導入に比べて有意に予後が改善しており(P=0.001)、基準導入と予定導入の間には有意差を認めなかった(図 4)。観察期間の延長により、さらに、基準導入の予後の改善が予想される。

D. 考察

オランダの RA の透析患者の検討では透析導入後の RA 患者の予後はアミロイドーシスがあると、極めて悪いと報告している。また、フィンランドの 1989 年の RA 症例アミロイドーシスの透析導入後の予後は 1 年生存率が 82%、5 年生存率が 47%であると報告し、非常に予後が不良であると報告している。我々も、アミロイドーシス診断後、年間 14.8%の症例で透析に導入され、また透析導入時の早期死亡が予後を悪化させると報告した。一方、対象が RA アミロイドーシスではないが、透析のプログラム導入も少数例の報告がある。イギリスの Caskey らは透析を導入した 262 例についてプログラムによる基準導入と緊急導入について検討し精神面での QOL が改善すると報告している。イタリアの Ravani らは 229 例にプログラムによる基準導入、緊急導入の検討を行い、基

準導入は感染、Vascular access に問題が無く、予後が改善したと報告した。彼らは体内環境が良いうちに透析に導入したため、予後が改善したと考察している。心不全等の合併症が出現してからでは、改善が難しくまた、血圧の低下により Vascular access が不良となり早期死亡の原因となるため、我々はプログラム化を提唱したが、本方法で、これらのトラブルを避けるという目的は達成されたと考えられる。

E. 結論

透析導入時のトラブルを避けるため、Ccr 10 ml/min、血清 Cr 値 2.5 mg/dl 程度で血液透析に導入するプログラムを作成し 12 例の導入をプロスペクティブに行った。生命予後の解析で予後は緊急導入に比べて有意に改善していた。また透析導入時の、心不全や、Vascular access の不良等は認めず透析導入時にこのプログラムを使用することは有用であった。今後臨床の場で積極的に用いられるべきである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kuroda T, Tanabe N, Harada T, Murakami S, Hasegawa H, Sakatsume M, Nakano M, Gejyo F. Long term mortality outcome in patients with reactive amyloidosis associated with rheumatoid arthritis. Clin Rheumatol (in Press)

2) 黒田毅、佐藤弘恵、長谷川尚、中野正明、下条文武。アミロイドーシス合併関節リウマチの診療。中部リウマチ (印刷中)

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

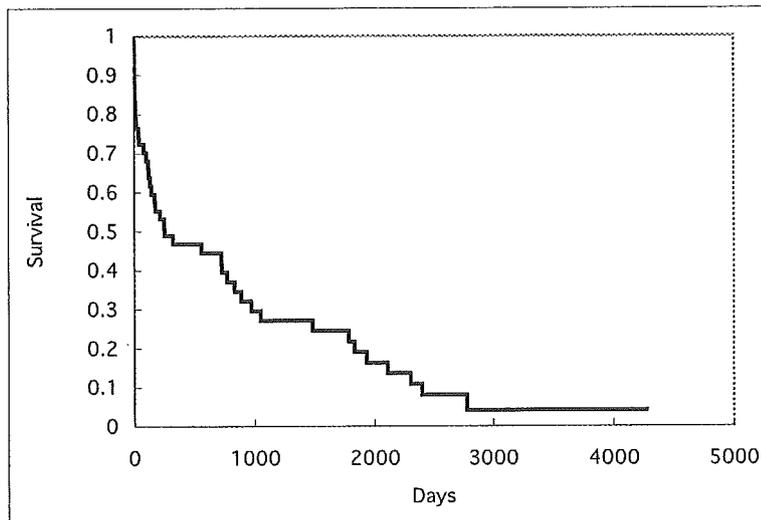


図 1. 透析導入後の生存率

全51例の75%生存は38日、50%は生存251日であった。

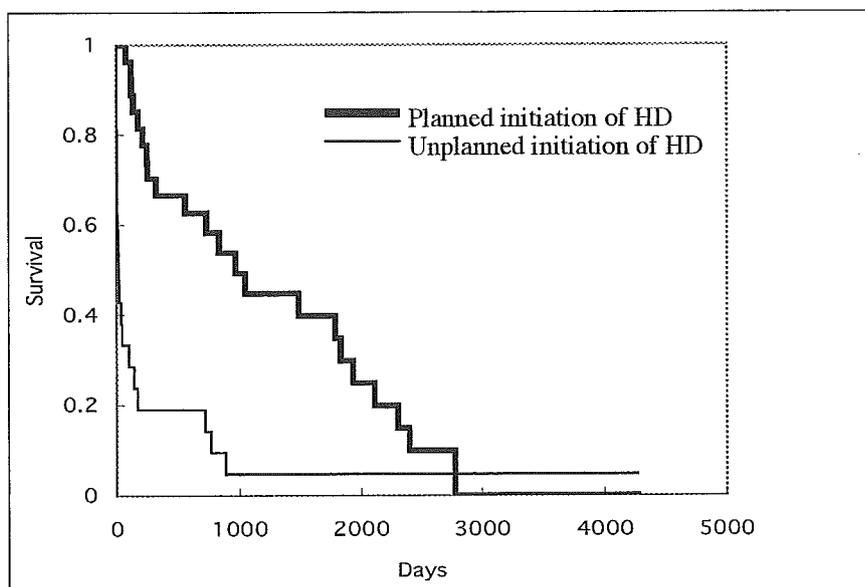


図 2. 緊急導入と予定導入の生存率の比較

緊急導入31例、予定導入20例。

緊急導入は有意に予後を悪化させていた (P=0.0003)。

表 1. 緊急透析導入症例のパーセンタイル別導入時血液データ

Parameter	BUN (mg/dl)	Cr (mg/dl)	T.P (mg/dl)	Alb(mg/dl)	Ccr (ml/min)
Percentile					
25%tile	54.0	2.5	6.1	3.5	9.7
50%tile	79.4	4.1	5.4	2.9	4.7
75%tile	109.5	6.4	4.8	2.4	3.5

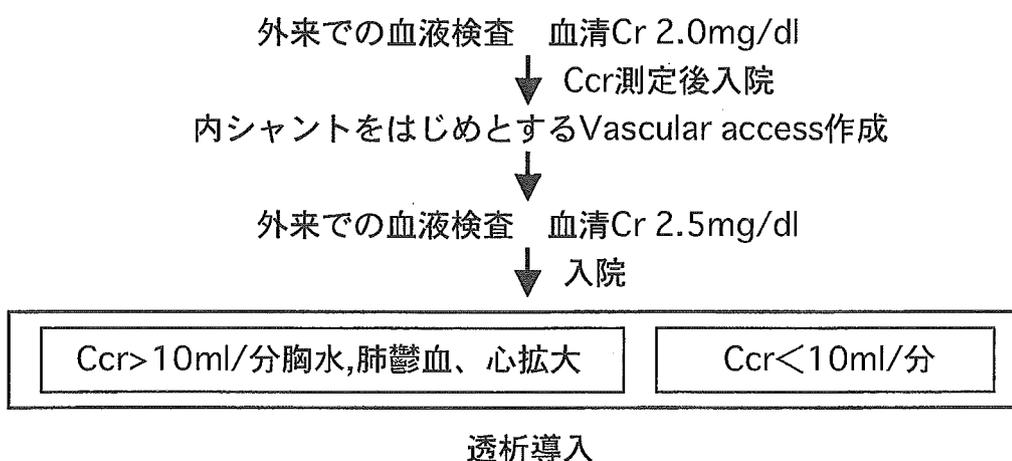


図 3. アミロイドーシスによる腎不全症例に対する透析導入プログラム

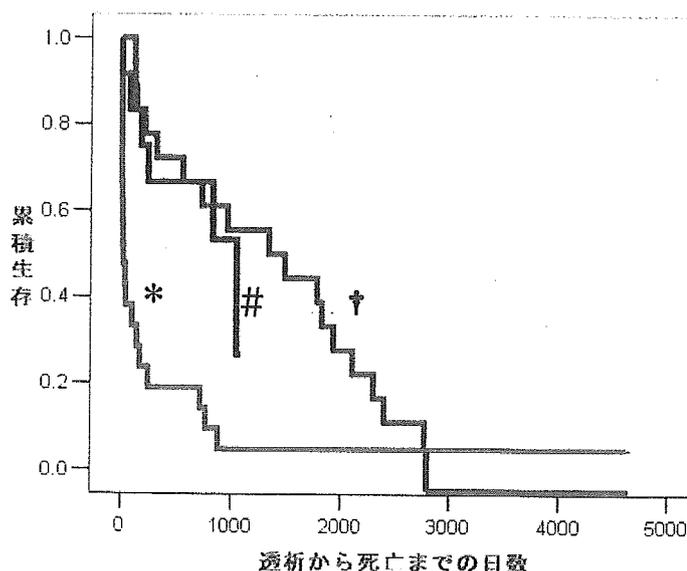


図 4. アミロイドーシスによる透析症例の累積生存曲線

†:予定導入、*:緊急導入、#:基準導入。
 * vs †:P=0.001、* vs #:P=0.003、# vs †:N.S.

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)
 アミロイドーシスの画期的診断・治療法に関する研究班 分担研究報告書

チーター(*Acinonyx jubatus*)由来アミロイドの伝達性に関する研究

分担研究者 宇根有美 麻布大学獣医学部獣医学科病理学研究室
 研究協力者 石原得博*、河野裕夫*、崔 丹*、伊藤亜紀子**、深野百合子**、
 小林 亮介**

* 山口大学医学部構造制御病態学講座、** 麻布大学獣医学部獣医学科病理学研究室

研究要旨 チーターの重要な死因であるアミロイド症の発生メカニズムを解明するために、チーター由来アミロイドの伝達性について検討した。アミロイド症により死亡したチーターの肝臓より、Pras の変法 (NaCl 回収法) を用いてアミロイド線維を抽出、10%カゼインで炎症刺激を行ったモルモットにアミロイド線維湿重量 50mg/匹を腹腔内接種し、4 週、8 週、12 週目に安楽死した。また、1%硝酸銀 1ml または Freund's complete adjuvant と 10%カゼインを等量混合した溶液 2ml で炎症刺激を行った猫に、チーターの肝臓から抽出したアミロイド線維を湿重量 10、100、1000mg/匹、肝臓乳剤 3、5g/匹を腹腔内または静脈内に接種し、1~2 週間観察した後、安楽死した。この結果、いずれの実験においても、病理組織学検査にてアミロイドの沈着は見られなかった。チーターのアミロイド症の病理発生を解明するための 1 つとして、Amyloid enhancing factor (AEF) 効果を検討したが、チーター由来アミロイドの伝達性は低いと考えられた。

A. 研究目的

チーターは絶滅危惧種に指定され、世界的規模で保護が行われている。しかしながら、目立った個体数の増加はなく、国内ではむしろ減少しており、1994 年 90 頭を越えていた飼育数が、2003 年には 50 頭を切った。チーターを絶滅の危機から救うためには、チーターの死因として重要なアミロイド症の病理発生を解明する必要があり、今日まで日本動物園水族館協会種の保存委員会の協力を得て、死亡したチーターについて疫学のおよび病理学的に解析してきた。その結果、多頭飼育をしている飼育施設由来チーターの平均寿命は短く、アミロイドの沈着も高度で、何らかの環境因子が関与していることが明らかとなった。また、炎症刺激下の ICR マウスに、チーター由来アミロイドを腹腔内接種すると、伝達することが証明された。しかし、経口投与ではチーター由来アミロイドの伝達性は証明されず、対照として行ったウシやマウスのアミロイドを用いたマウスアミロイド伝達実験結果と比較すると、チーターのアミロイドは AEF 効果を持っているものの、他の動物に比較し

てその効果は低いと推察された。一方、モルモットでは、週 2 回、2 ヶ月カゼイン接種でアミロイド誘発が可能であり、呼吸器系炎症に随伴して、しばしば高度のアミロイド沈着が観察されることが報告されている (図 1)。また、猫では難治性口内炎や上部気道感染症に関連するアミロイド症例が多く (図 2)、さらに猫とチーターとは同じ科に属する。以上のことから、我々は、猫およびモルモットを用いて、チーター由来アミロイドの伝達性についてさらに検討した。

B. 研究方法

- 1) 接種材料: アミロイド症により死亡したチーター C-68 ビヨンデイ (図 3)、雄、4 歳 (Ex030810) の肝臓を用いた。肝臓のアミロイド指数は 3 (指数は 0~3 で表記し、3 は沈着高度)。
- 2) 使用動物: モルモット (ハートレイ) 雄 6 匹と、猫 (SPF) 雄 6 匹、雌 12 匹。
- 3) アミロイド抽出方法: Pras 法 変法 (NaCl

回収法)

ホモジナイズした肝臓を蒸留水に懸濁し、これに NaCl を加えてアミロイド線維を析出させ、回収する方法。

4) 投与方法：モルモットは腹腔内接種。猫は腹腔内接種と静脈内接種。各々の接種方法は常法に従って行った。

5) 炎症刺激

モルモットは 10%カゼイン (SIGMA) を 1~2ml、猫は 1%硝酸銀 1ml か Freund's complete adjuvant (DIFCO) と 10%カゼイン (SIGMA) の混合液 2ml を背部に皮下注射して炎症刺激を行った。

6) 実験プログラム

モルモット 6 匹をアミロイド接種群 3 匹、対照群 3 匹に分け、10%カゼイン溶液 (SIGMA) 1~2ml を 1 日おきに皮下注射した。実験開始 3 日後に、接種群 3 匹にチーター由来アミロイド 50mg/匹を腹腔内接種した。4 週、8 週、12 週目に接種群と対照群から各々一匹ずつ安楽死し、病理組織検査にてアミロイド沈着状況を調査した。猫 (SPF) は 18 匹を 8 グループに分け、刺激の回数、接種材料、接種時期、接種量、投与経路を変えて (表 1) 1~2 週間観察した後、安楽死し、病理組織検査にてアミロイド沈着状況を調べた。AA アミロイドーシスにおいて臓器へのアミロイド沈着に先立ち、血清アミロイド A (SAA) 値が上昇することが報告されているため、その測定も行なった。SAA 測定は、動物用 SAA エライザキット (バイオソースインターナショナル社製) を使用した。

C&D. 研究結果および考察

モルモットおよび猫のいずれの実験においても、アミロイドの沈着は観察されなかった。モルモット

トにおいてはカゼインによるアナフィラキシー反応と考えられる症状で 2 匹が計画より早期に死亡した。猫を用いた実験のうち、10%カゼイン溶液と Freund Adjuvant を炎症刺激として用いた場合、全ての症例で SAA 値の強い上昇がみられ、一部の個体を除いて観察期間中高値が継続していた。以上の結果より、チーターのアミロイドはマウスや牛のそれに比較していずれの動物に対しても AEF 効果が低いと考えられた (グラフ 1)。

E. 結論

チーターのアミロイド症の病理発生を解明するために、猫およびモルモットに対する AEF 効果を検討したが、チーターのアミロイドの伝達性は低いと考えられた。

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) 伊藤亜紀子、小座間裕紀、碓井真紀、宇根有美、野村靖夫：チーター由来 *Helicobacter heilmannii* のマウス胃炎誘発と血中抗 HS70 抗体の推移. 第 139 回日本獣医学会、理化学研究所、和光市民文化センター、3 月 29~31 日、2005 年。

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

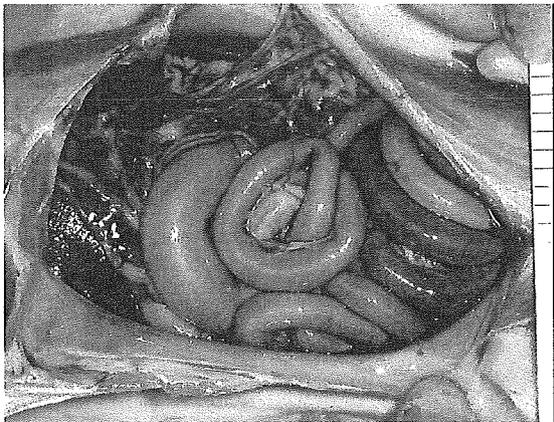


図 1. 腹腔内出血、肝臓腫大

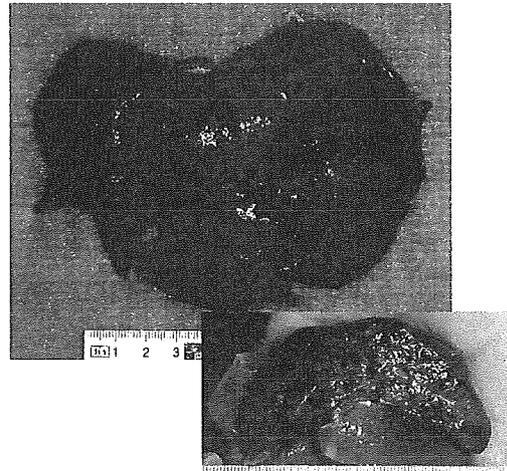


図 1-2. 肝臓：退色が見られ、全葉は互いに膠着し、血餅が多量に付着（外側右葉多量）。小葉不明瞭で質脆弱。内側右葉，外側右葉実質内出血あり（外側右葉は出血高度で腫大もあり）。剖面は

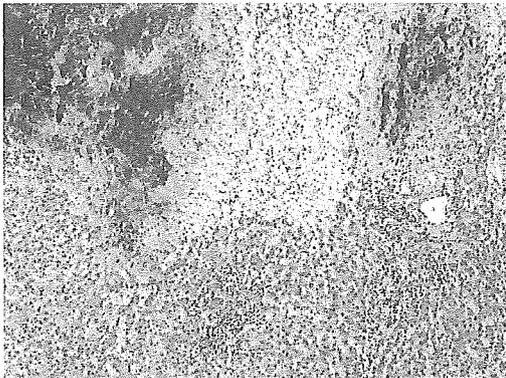


図 1-3. 肝臓 左：HE 染色、右：Congo Red 染色 蛍光顕微鏡下

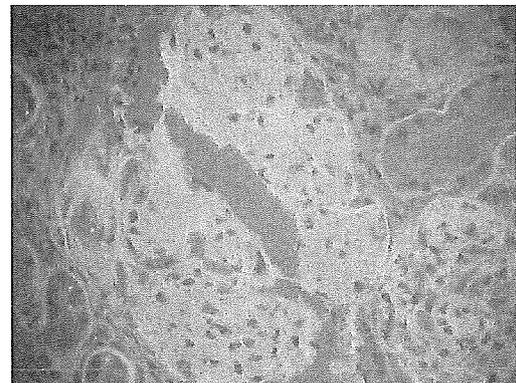
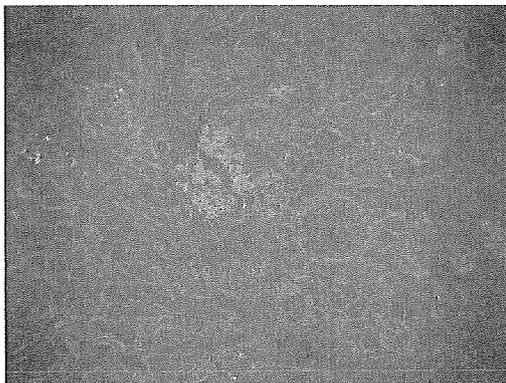


図 1-3. 図 4. 腎臓：皮質、Congo Red 染色（蛍光顕微鏡下）、糸球体のメサギウム基質へのアミロイド沈着

モルモット 写真

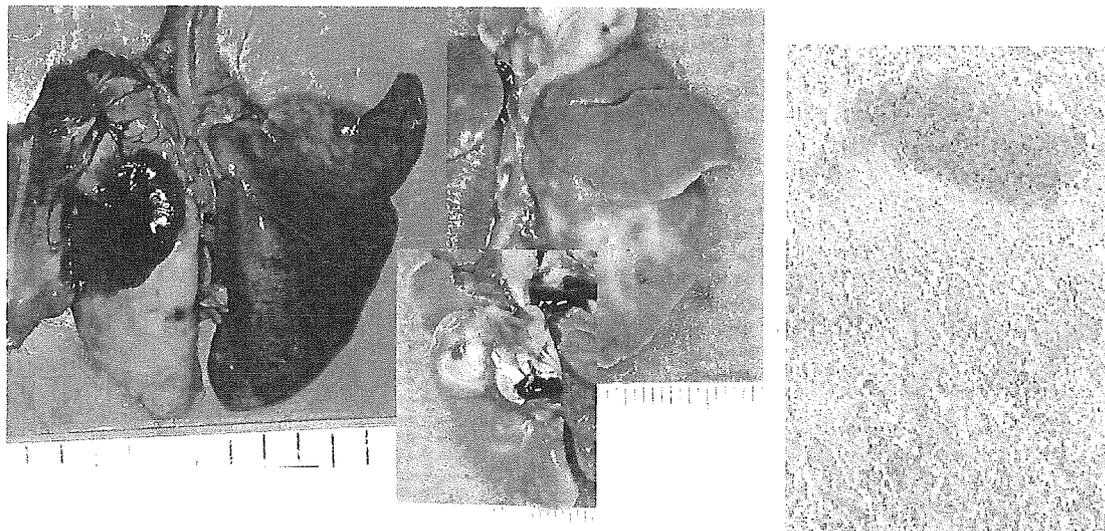


図 2-1. 肺 左：退縮不全で、全葉にわたって水腫。左肺全葉には重篤な肺炎病巣（赤色）、右後葉にやや白色かかった硬化性の不整脈の肺炎病巣。

中央：右後葉縦隔面、大豆大の膿瘍（黄色の結節）

図 2-2. 肺：肺炎、左方に偽好酸球の破砕物の集塊（膿）、周囲に結合組織の増生がみられる。周辺の組織で肺胞壁の肥厚、線維素析出、炎性充血あり。H.E 染色。

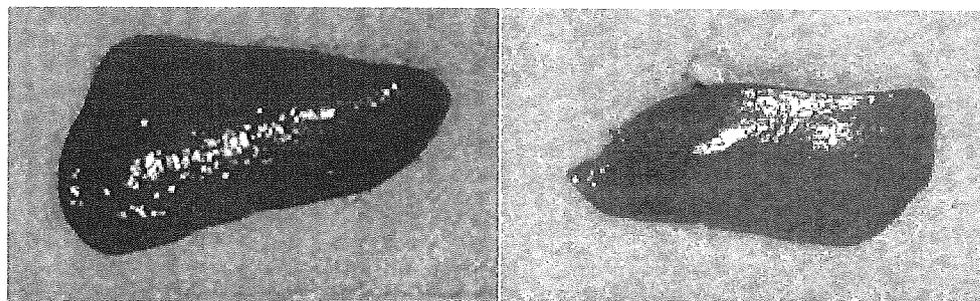


図 2. 脾腫大。濾胞、脾材不明瞭。

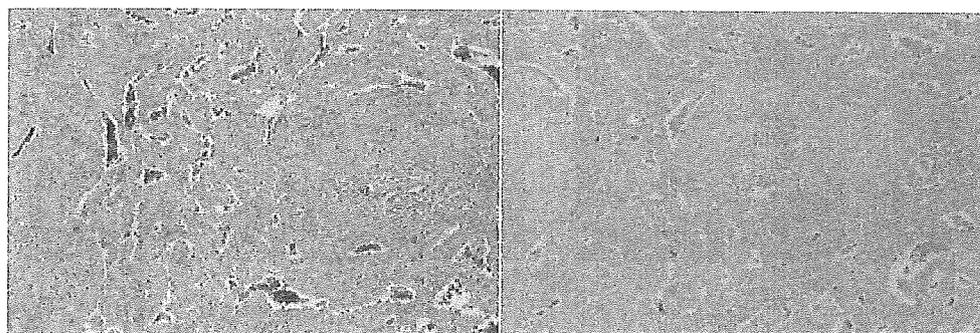


図 4. 腎臓：軽度～中程度に瀰漫性の鬱血。赤脾髄にアミロイドが沈着（ハム脾）。白脾髄（濾胞）が圧排され、沈着が高度な検体では消失。