

3, 6, 9, 12 ヶ月で屠殺し、全身の臓器を採取しアミロイドの沈着を検討した (図 1)。

アミロイド沈着の検出:各臓器のアミロイド沈着はコンゴ赤染色後の緑色偏光で確認した。各臓器切片をヒトβ2M 特異的抗体とマウス apoA-II 抗体で染色した。

(倫理面への配慮)

本研究は実験動物を用いた研究である。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た。実験計画書を信州大学医学部動物実験委員会に提出し、承認を得て、信州大学医学部動物実験に関する指針に沿って行った。

遺伝子組換え実験は信州大学遺伝子組換え実験等安全委員会の承認を得ている。

アミロイド線維による伝播に関しては、ヒトや正常マウスへの伝播/発症の危険は無いと考えられるが、アミロイド線維を扱う際は、手袋とマスクを着用し、使用した器具やアミロイド線維は焼却するか、1 N NaOH 中でオートクレーブ処理することになっている。

C. 研究結果

2種類の Tg マウス系統を樹立した。それぞれの系統とβ2M ノックアウトマウスを交配し、内在性β2M の影響を受けないヒトβ2M をもつマウス ($h\beta 2M Tg^+$, $m\beta 2M^{-/-}$)マウスが完成した。これらのマウスは正常に発育し、繁殖力にも問題はなく、安定して飼育されている。 $h\beta 2M$ mRNA はどちらの系統でも、肝、心、脳、腎など主要な臓器で発現が確認され、 $h\beta 2M$ タンパク質も検出された。これらの2系統では血清中のヒトβ2M 濃度が透析患者の数倍であることを確認した (系統1は 250 mg/l、系統2は 280 mg/l である)。

SPF 飼育条件下では、どちらの系統もアミロイド沈着や非線維性のヒトβ2M の沈着(non-fibrillar deposition)は、どの臓器においても観察されていない (投与後 12 ヶ月)。 $tA\beta 2M$ 線維を投与した Tg マウスは投与後 9 ヶ月まで到達したが、アミロイド沈着および non-fibrillar deposition は認められなかった。AApoAII 線維を投与した Tg マウスでは、投与後 6 ヶ月で四肢の皮膚に AApoAII ア

ミロイド沈着が促進された。免疫染色の解析では、AApoAII 沈着に接して $h\beta 2M$ 沈着を検出したが、コンゴレッド染色後の緑色偏光は観察されず、non-fibrillar deposition と考えられた (図 2)。

D. 考察

長期の人工透析患者では「透析アミロイドーシス」が問題となっている。ところが、適当なモデル動物が存在しないことが、透析アミロイドーシスの病態解明や、予防法、治療法の開発の障壁となっている。我々は、血中のβ2M 濃度と透析アミロイドーシスの発症が必ずしも相関せずに、発症時期には個人差が存在すること、透析アミロイドーシスの発症までに長期間要すること、試験管内でβ2M タンパク質モノマーからのアミロイド線維生成が困難であり、アミロイド線維添加により生成が促進されることなどから、アミロイドーシスの発症にはアミロイド線維による seeding 効果に関与すると考えた。我々が作製したモデルマウスでも十分に高い血清濃度が得られたにも関わらず、アミロイド沈着は現在まで観察されていない。AApoAII 投与マウスでのみ、non-fibrillar deposition が観察されたが、AApoAII が seed として作用したのか？アミロイド線維に移行するのか？今後さらに長期間の観察や、より詳細な検討が必要である。試験管内で形成した $tA\beta 2M$ 線維を投与した Tg マウスではアミロイド沈着および non-fibrillar deposition は認められなかった。これは生成されたアミロイド線維の in vivo での seed としての性質が弱いためのものか、今後生体より生成した線維の投与等の解析が必要である。

E. 結論

透析患者の数倍の血清ヒトβ2M 濃度を示す Tg マウスを作製し、アミロイド線維形成の解析に使用した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Zhang H, Sawashita J, Fu X, Korenaga T, Yan J,

Mori M, Higuchi K: Transmissibility of mouse AApoAII amyloid fibrils: inactivation by physical and chemical methods. *FASEB J* 20 (7): 1012-1014, 2006

2) 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* 168 (3): 898-906, 2006

3) Yan J, Fujii K, Yao J, Kishida H, Hosoe K, Sawashita J, Takeda T, Mori M, Higuchi K: Reduced coenzyme Q10 supplementation decelerates senescence in SAMP1 mice. *Exp Gerontol* 41 (2): 130-140, 2006

4) 樋口京一 アミロイドーシスの伝播 *細胞工学分学* 26 (2), 177-180, 2007

2. 学会発表

1) 張倍茹、付笑影、葛鳳霞、巖景民、姚俊潔、張桓宇、澤下仁子、森政之、中井彰、樋口京一：活性型 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 29 回日本基礎老化学会、長崎、6 月 16 日、2006 年

2) Fu X, Korenaga T, Zhang H, Yan J, Sawashita J, Mori M, Higuchi K. Mouse senile amyloidosis: Possible transmission in the mouse room. 2006 Conference of Korean Society for Gerontology and The 6th Korean-Japan Gerontologist joint Meeting. Chuncheon, Korea, June 22, 2006

3) 葛鳳霞、姚俊潔、付笑影、郭占軍、巖景民、張倍茹、張桓宇、澤下仁子、森政之、樋口京一：ApoA-II transgenic マウス (*Apoa2^c Tg*) の開発と

老化アミロイドーシス。第 21 回老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会、名古屋、7 月 27 日、2006 年

4) 張倍茹、宇根有美、亀谷富由樹、巖景民、葛鳳霞、姚俊潔、張桓宇、澤下仁子、森政之、中井彰、樋口京一、付笑影：チーターの AA アミロイドーシス。第 1 回臨床ストレス応答学会、京都、11 月 23 日、2006 年

5) Fu X, Korenaga T, Yan J, Ge F, Zhang B, Qian J, Naiki H, Sawashita J, Mori M, Higuchi K. Mouse senile amyloidosis: Possible horizontal transmission in the mouse room. XIth International Symposium on Amyloidosis. Woods Hole, USA, November 7, 2006

6) Higuchi K, Ge F, Fu X, Yao J, Guo Z, Yan J, Zhang B, Zhang H, Qian J, Sawashita J, Mori M. Amyloidosis in the transgenic mice of mouse amyloidogenic apolipoprotein A-II (*Apoa2^c*). XIth International Symposium on Amyloidosis. Woods Hole, USA, November 7, 2006

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

特になし

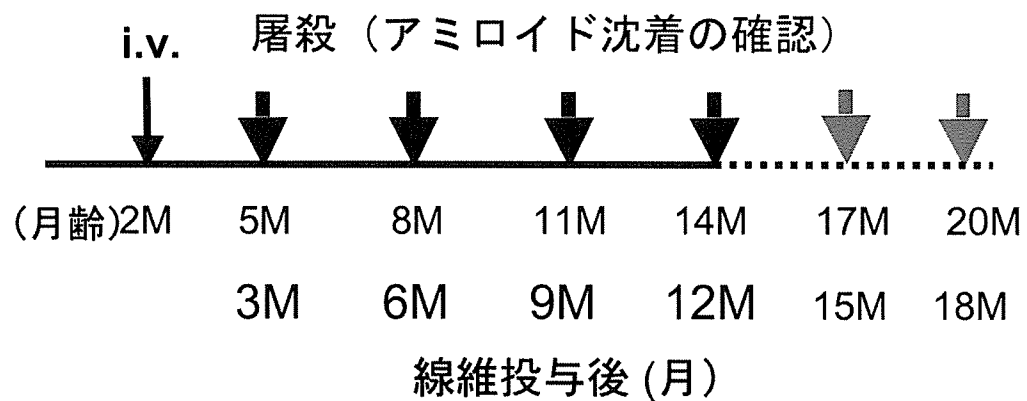


図 1 アミロイド線維投与実験のスケジュール。tAβ₂M 50 μg、或いは AApoAll 100 μg を2ヶ月齢の *mβ2M^{-/-}/hβ2M^{+/+}* マウスの尾静脈に投与し、その後、3,6,9,12 ヶ月で屠殺し、アミロイド沈着を確認した。

表1 アミロイド線維静脈投与による各実験群のアミロイド沈着

Genotype	Injection	Amyloid deposits			
		3M	6M	9M	12M *
<i>mβ2M^{-/-}/hβ2M^{+/+}</i>	DW	3(0)	3(0)	3(0)	3(0)**
<i>mβ2M^{-/-}/hβ2M^{+/+}</i>	tAβ ₂ M	5(0)	6(0)	2(0)	3(?)
<i>mβ2M^{-/-}/hβ2M^{+/+}</i>	AApoAll	4(4)	2(2)	3(?)	3(?)

*アミロイド線維投与後の月齢

**使用匹数(アミロイド沈着匹数)

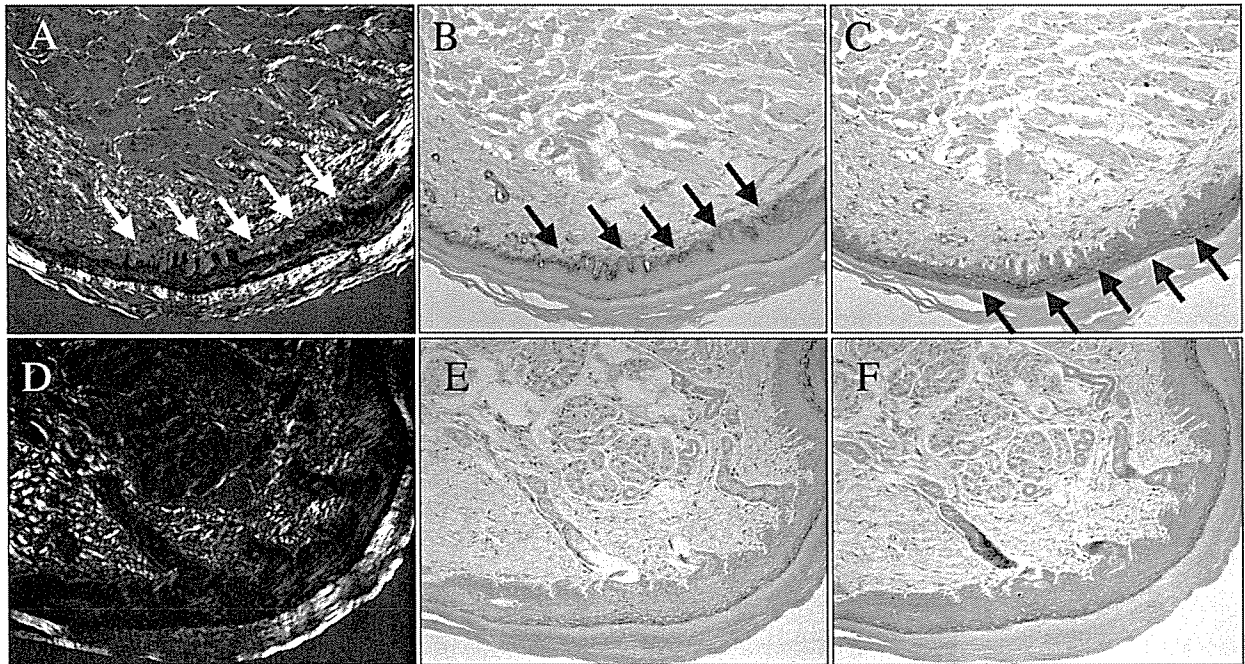


図2 アミロイド線維投与した6ヶ月後の前肢の皮膚。A, B, C, AApoAII 投与群。AApoAIIアミロイド沈着 (A, B 矢印) とnon-fibrillar h β 2Mの沈着 (C 矢印) が促進された。D, E, F, t β 2M 投与群。アミロイド沈着は促進されなかった。A, D, コンゴ赤染色。B, E, anti-apoA-II免疫染色。C, F, anti-human β 2M免疫染色。

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)
 アミロイドーシスに関する調査研究班 分担研究報告書

長期透析患者における透析アミロイドーシスの臨床病態

分担研究者 下条文武 新潟大学医学部第二内科

共同研究者 山本 卓*、風間順一郎**、西慎一***、丸山弘樹*、成田一衛*

*新潟大学医学部第二内科、**新潟大学医歯学総合病院集中治療部、

***新潟大学医歯学総合病院血液浄化療法部

研究要旨 透析アミロイドーシスは長期透析患者に高頻度に発症する透析合併症の1つであり、手根管症候群 (CTS) をはじめ様々な骨関節病変を呈する。今回我々は最近4年間、当院に入院歴のある維持透析患者366名についての透析アミロイドーシスの臨床病態について調査した。入院患者は年々増加傾向にあり、特に透析歴20年以上の長期透析患者の割合が増加した。透析期間別にみると透析歴が長期化するにしたがって患者数は減少したが、破壊性脊椎関節症 (DSA)の手術目的に入院する割合が増加した。DSAの手術目的に入院した患者は椎弓切除あるいは後方除圧固定術の手術を施行され、術後軽快する例が多かった。更に透析期間が長期化すると、CTS、DSA、アミロイド関節症のいずれかの手術の既往のある患者の割合が増加し、CTSをはじめ多彩な透析アミロイドーシスの病態を呈する例が多かった。今後、今まで以上に長期透析患者の増加、および透析導入時年齢の高齢化が予測され、本症の予防法および治療法の進歩が望まれる。

A. 研究目的

透析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深刻な合併症の1つである。また近年透析歴30年以上の長期透析患者が増加する傾向にある。透析液や透析膜の改善が進む一方で、長期透析患者の増加、および導入時年齢の高齢化が進んでいる。平成16年度、我々は透析歴30年以上の透析患者における透析アミロイドーシスの臨床病態について調査した。長期透析患者はCTSをはじめとする多彩な透析アミロイドーシスを発症していることが明らかになった。今回、我々は最近4年間、当院に紹介入院した維持透析患者についての透析アミロイドーシスの臨床病態について調査した。

B. 研究方法

平成15年から18年に当院に紹介入院した維持透析患者の年齢、透析歴、入院の目的となった疾患、透析アミロイドーシスの合併とその手術歴について調査した。更にDSAの手術目的に入院した

患者の臨床症状、手術方法、転帰について調査した。

(倫理面への配慮)

匿名性を確保した。

C. 研究結果

患者は366名で透析期間が0-4, 5-9, 10-14, 15-19, 20-24年, 25年以上の患者数はそれぞれ126, 65, 68, 38, 32, 37名であり、入院時年齢はそれぞれ58.6, 58.6, 55.3, 55.7, 56.1, 58.0歳であった。入院患者数は年々増加傾向にあり、そのなかで長期透析期間の患者の割合が大きくなる傾向があった。DSAの手術目的に入院した症例は0-4, 5-9, 10-14, 15-19, 20-24年, 25年以上の透析期間別でそれぞれ0, 1, 5, 2, 4, 9名、0, 1.5, 7.4, 5.3, 12.5, 24.3%と透析期間の長期化に伴い増加した (図)。CTS、DSA、アミロイド関節症の手術歴のある患者は0-4, 5-9, 10-14, 15-19, 20-24年, 25年以上の透析期間別でそれぞれ0, 1.5, 7.4, 13.1, 25.0, 67.5%であり、透析期間の長期化に伴い増加した。また透析歴25年以上の患者で

はCTSをはじめDSA、アミロイド関節症の合併が多く、多彩な病態を呈した。

DSAの手術目的に入院した患者は21名で病変部位は頸椎11名、腰椎10名であった。入院時年齢は60.0±8.8歳、透析歴は21.5±7.6年であった。臨床症状は歩行障害、手指巧緻障害、感覚障害を有する例が、また頸椎病変のある患者でそれぞれ10, 10, 8名と高率であり、腰椎病変のある患者でそれぞれ5, 1, 10名と感覚障害が主な症状であった。手術は後方除圧固定術が16名、椎弓切除術が4名に施行され、3名が症状の改善、13名が軽快した。

D. 考察

長期透析患者においてCTSをはじめとする透析アミロイドーシスの多彩な発症を認めた。またDSAは四肢の神経症状を呈しADLを著しく損なう疾患であるが整形外科的手術により軽快する例が多かった。DSAの手術目的に入院した症例は、他の患者と比較して年齢に大きな差がないことから透析期間の長期化が大きく関与しているものと考えられる。要因として長期にわたる β_2 -ミクログロブリンの蓄積や炎症反応の持続などが考えられるが、現時点で不明な点が多い。

E. 結論

長期透析患者において透析アミロイドーシスは高率に発症し、QOLを増悪する合併症の一つであった。本邦における長期透析患者の増加、および導入時年齢の高齢化は今後も続くと予測される。近年、透析膜や透析液などの透析医療の改善により透析アミロイドーシスの発症の減少、および軽症化が期待されるが、本症は患者のADLを著しく低下させるため、今後これまで以上の予防法および治療法の開発が重要になる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kazama JJ, Yamamoto S, Takahashi N, Ito Y, Maruyama H, Narita I, Gejyo F: A β_2 -m-amyloidosis and related bone diseases. *Journal of Bone and*

Mineral Metabolism 24: 182-184, 2006

2) Saito A, Gejyo F: Current clinical aspects of dialysis-related amyloidosis in chronic dialysis patients. *Therapeutic Apheresis and Dialysis* 10: 316-320, 2006

3) Ajiro J, Narita I, Sato F, Saga D, Hasegawa H, Kuroda T, Nakano M, Gejyo F: SAA1 gene polymorphisms and the risk of AA amyloidosis in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Modern Rheumatology* 16: 294-299, 2006

4) Kuroda T, Tanabe N, Sato H, Ajiro J, Wada Y, Murakami S, Hasegawa H, Sakatsume M, Nakano M, Gejyo F: Outcome of patients with reactive amyloidosis associated with rheumatoid arthritis in dialysis treatment. *Rheumatology International* 26:1147-1153, 2006

5) 山本卓、下条文武：透析アミロイドーシスの発症機序ー最近の知見ー. *HD Network* 15: 1-2, 2006

6) 西慎一、長谷川進、下条文武：透析アミロイド症ー整形外科的アプローチも含めて. *臨床透析* 22: 171-183, 2006

7) 西慎一、長谷川進、下条文武：アミロイド症の治療. (秋葉隆 編) 新しい診断とABC 38/腎4透析合併症. (最新医学社・大阪) 226-223, 2006

2. 学会発表

1)張仁美、中村元、川村和子、井口清太郎、後藤眞、西慎一、下条文武、原田隆：RA アミロイドーシス腎不全例に多発性仮性脾嚢胞を合併した一例.第36回日本腎臓学会東部学術大会. 横浜、11/3-11/4, 2006

2)黒田毅、佐藤弘恵、村上修一、中野正明、下条文武：ワークショップ・関節リウマチによる反応性アミロイドーシス症例の透析導入法の検討. 第50回日本リウマチ学会総会学術集会、第15回国際リウマチシンポジウム、長崎、4/3-4/4、2006

3) 伊藤竜、江部祐輔、田島俊児、成田淳一、森山寛史、中山秀章、寺田正樹、高田俊範、塚田弘樹、下条文武、各務博、吉澤弘久、長谷川隆志、鈴木榮一、橋本毅久、青木正、土田正則、梅津哉、丹呉益夫、瀬賀弘行、富樫清朋: 内部に石灰化を伴う嚢胞が多発し、検診発見された肺アミロイド

ーシスの1例. 第68回日本結核病学会・第57回
日本呼吸器学会・第42回日本呼吸器内視鏡学
会・第27回日本サルコイドーシス学会・2006年
春季合同北陸地方会、金沢、5/13-5/14, 2006

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

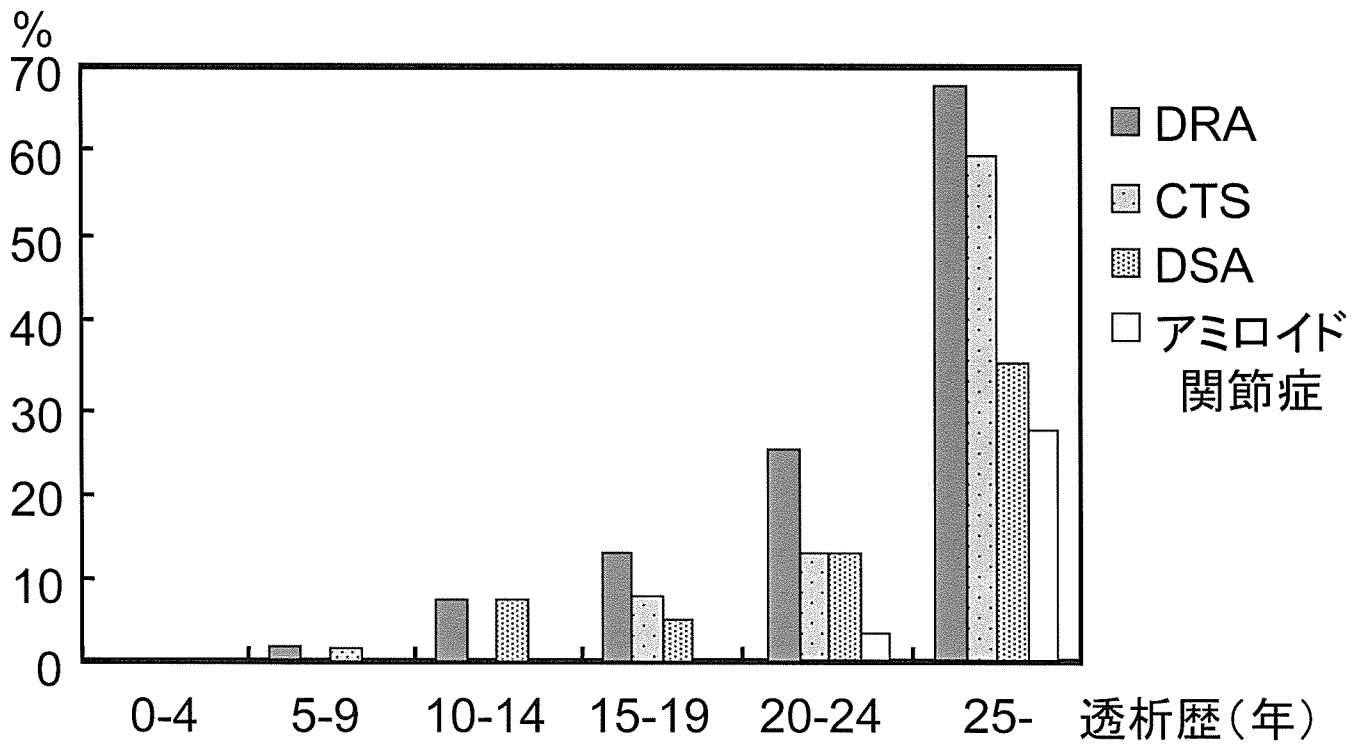


図: 2003-6年に当院に入院した維持透析患者の透析アミロイドーシスの合併
 DRA: 透析アミロイドーシス
 CTS: 手根管症候群
 DSA: 破壊性脊椎関節症
 CTS, DSA, アミロイド関節症の手術既往のある場合をDRA (+)とした。

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)
アミロイドーシスに関する調査研究班 分担研究報告書

当院で手根管開放術を行った透析患者の背景の検討

分担研究者 高市憲明 虎の門病院腎センター

共同研究者 野村和史、乳原善文、喜多島出*、虎の門病院腎センター、*同整形外科

研究要旨 手根管症候群へ進行する症例の特徴を明らかにするため、1982年12月より2006年9月までに虎の門病院分院で施行された透析患者の初回手根管開放術症例110例の患者背景を検討した。患者背景は以下の通りであった。性別；男性48名、女性62名。透析導入時期；1966年12月～2001年6月。透析導入時年齢； 41.2 ± 12.2 (18~76)歳。手術までの透析期間； 17.5 ± 6.4 (4~35)年。原疾患；慢性腎炎58名、多発性嚢胞腎17名、糖尿病性腎症8名、妊娠腎3名、ループス腎炎3名、その他5名、不明18名。透析導入時の年齢が高齢 ($p < 0.001$)、および原疾患が糖尿病性腎症 ($p < 0.01$)であることが初回手根管開放術までの透析期間と有意に相関した。透析導入時期や性差では有意差は認められなかった。

A. 研究目的

透析アミロイドーシスは長期透析患者に高頻度に発症し、透析患者の血中で上昇している β 2-microglobulin(β 2MG)がアミロイド前駆蛋白となっている。 β 2MGは骨や靭帯によく沈着するため、代表的な病態として手根管症候群、ばね指、骨嚢胞、破壊性脊椎関節症がある。

また、透析アミロイドーシスの発症に影響を与える因子としては、透析膜(high flux膜)、透析液清浄化、透析方法(HD, HDF, etc)などの透析因子、患者の透析開始時年齢や透析継続期間などの患者因子が指摘されている。

本研究では、透析患者の手根管開放術症例を解析し、透析アミロイドーシスの代表的病態である手根管症候群へ進行する症例の特徴を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

当院で1982年12月～2006年9月に施行された手根管開放術190症例であった。そのうち、血液透析患者の初回手術である110症例の患者背景を検討した。

(倫理面への配慮)

後方視的・非介入的調査研究であり、患者情報を公表することもなく、倫理的に問題ないものとする。

C. 研究結果

110症例の性別は男性48名(43.6%)、女性62名(56.4%)、透析導入時の年齢は 41.2 ± 12.2 (18~76)歳、手根管開放術時の年齢は 60.1 ± 10.1 (37~84)歳、手術時の透析年数は 17.5 ± 6.4 年であった。原疾患は慢性腎炎58名、多発性嚢胞腎17名、糖尿病性腎症8名、妊娠腎3名、ループス腎炎3名、その他5名、不明18名であった。

透析導入から初回の手根管開放術までの年数は、透析導入時の年齢が高齢であるほど有意に短期間であった($p < 0.001$) (図1)。また、糖尿病性腎症を原疾患とする症例では 8.5 ± 5.8 年と、他の原疾患の症例に比べて有意に短期間であった($p < 0.01$) (図2)。性別は手根管開放術までの期間に影響しなかった(男性 17.0 ± 6.5 年、女性 18.0 ± 6.3 年 $p = 0.38$)。

透析導入年代が早期であるほど、手根管開放術までの期間が有意に長かった(表1)が、早期に導入された症例ほど若年であり、糖尿病が少ないことが明らかである。そのため、糖尿病症例を除外して多変量解析を行ったところ、透析導入年度と手根管開放術までの期間には有意差を認めなかった($p = 0.21$)。

D. 考察

透析アミロイドーシスは慢性腎不全で血中濃度が上昇する β 2-microglobulin(β 2MG)が前駆蛋白となる。 β 2MG は骨や靭帯によく沈着するため、代表的な病態として手根管症候群、ばね指、骨嚢胞、破壊性脊椎関節症を認める。日本では透析開始後 20 年で約半数の患者で手根管症候群を発症すると報告されており、長期透析患者に伴う合併症としては頻度が高く、重要な合併症の一つである。

手根管開放術を受けた患者は、男性 48 名、女性 62 名と女性の比率が 56.4%とやや高い結果であった。我が国の透析現況によると、2004 年末の透析患者は、男性 143,444 名、女性 93,076 名と女性の比率は 39.3%に過ぎない。すなわち透析患者において、女性は男性に比べて手根管症候群に罹患しやすいと思われる。透析患者の剖検例を解析した報告では、 β 2MG アミロイドの沈着に男女差はないとされている。それゆえに、透析特有の原因よりも性差による可能性が高い。一般的に、女性は男性に比べて約 2~3 倍手根管症候群に罹患しやすいと報告されている。その原因として、女性は男性に比べて手根管の断面積が狭いこと、女性は特に閉経期に浮腫を起こしやすく容易に手根管内圧が上昇する機序が想定されている。

透析導入年齢が高齢であることが、初回手根管開放術までの期間と有意に相関していた(図 1)。その機序は明らかでないが、加齢によりコラーゲンに advanced glycoxidation end products(AGE)の一種である pentosidine が増加すること、in vitro において AGE で修飾されたコラーゲンには β 2MG が結合しやすいことが想定されている。

また、糖尿病性腎症を原疾患とする症例では、他疾患の患者と比べて初回手根管開放術までの期間が約半分であった(図 2)。糖尿病性腎症による透析患者で β 2MG アミロイドの蓄積頻度が高いという報告は今までのところ見あたらない。だが、糖尿病患者では血中 AGE の血中濃度が高く、それゆえに AGE で修飾された β 2MG が多く手根管に沈着するという可能性はありうる。糖尿病性腎症の患者では糖尿病性神経症による末梢神経障害があり、手根管内圧の上昇に対して容易に正中神経が障害される可能性もある。非透析患者

でも、糖尿病患者は非糖尿病患者と比べて手根管症候群に罹患しやすく odds 比で 2.2 という報告がある。それに加えて、糖尿病性腎症による透析患者は透析導入後の 10 年生存率が約 20%と他疾患に比べて予後が不良であり、透析導入後長期間生存し手根管開放術を受ける症例が少ない可能性もある。

透析アミロイドの治療及び予防のために、様々な努力がなされてきた。 β 2MG より多く取り除くための high performance dialyser は 1980 年代中盤より使用されはじめ、現在では幅広く用いられている。また、逆濾過装置やエンドトキシンカットフィルターによる透析液の清浄化についても広く浸透している。それにもかかわらず、今回の我々の調査では、透析導入年代と手根管開放術までの期間には相関を認めなかった。その原因としては導入年代が進むにつれ導入後の生存期間が延長し、その結果透析アミロイドーシスを発症する患者が増加した可能性が考えられる。

E. 結論

透析患者において、手根管開放術を受けた患者は女性が多く、透析導入から初回手根管症候群手術まで期間には、透析導入時の年齢、原疾患(糖尿病性腎症)、が影響する。

透析導入年代が早期であるほど、手根管症候群の手術を受けるまでの期間は長期であったが、多変量解析では透析導入時期と手術までの期間には有意差は認めなかった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okuda I, Ubara Y, Takaichi K, Kitajima I, Motoi N, Hara S and Kokubo T: Genital β 2-microglobulin amyloidoma in a long-term dialysis patient. *Am J Kidney Dis* 2006;48:E35-E39
- 2) Ubara Y, Tagami T, Subabe T, Sogawa Y, Hoshino J, Higa Y, Nomura K, Sawa N, Katori H, Takemoto F, Hara S, Watanabe T, Ohashi K and Takaichi K: Systemic AA-amyloidosis related to

MPO-ANCA microscopic polyangiitis: A case report. *Amyloid* 2006;13:178-183

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 透析導入時年齢と初回手根管開放術までの年数

手術までの年数

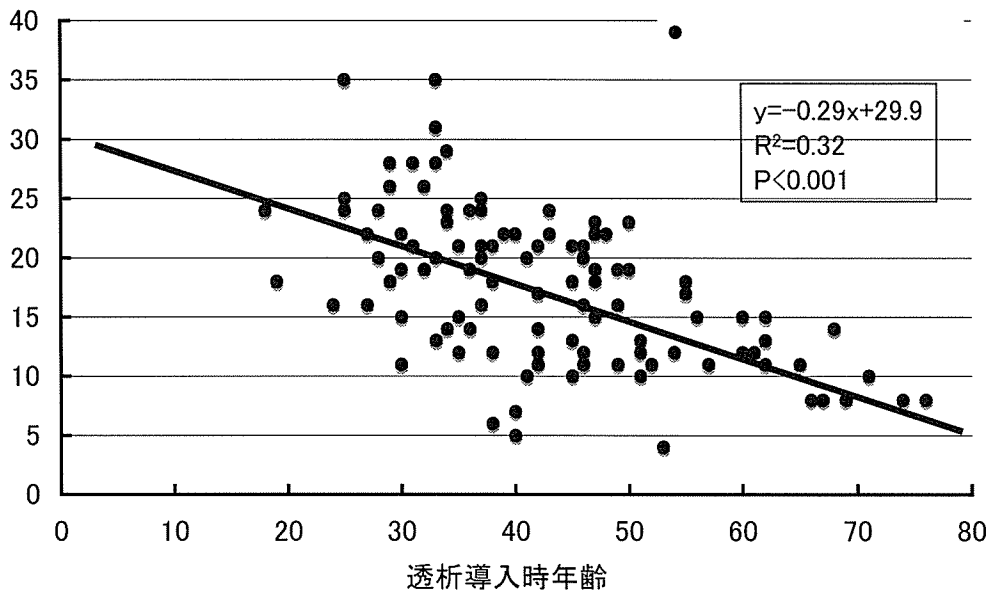
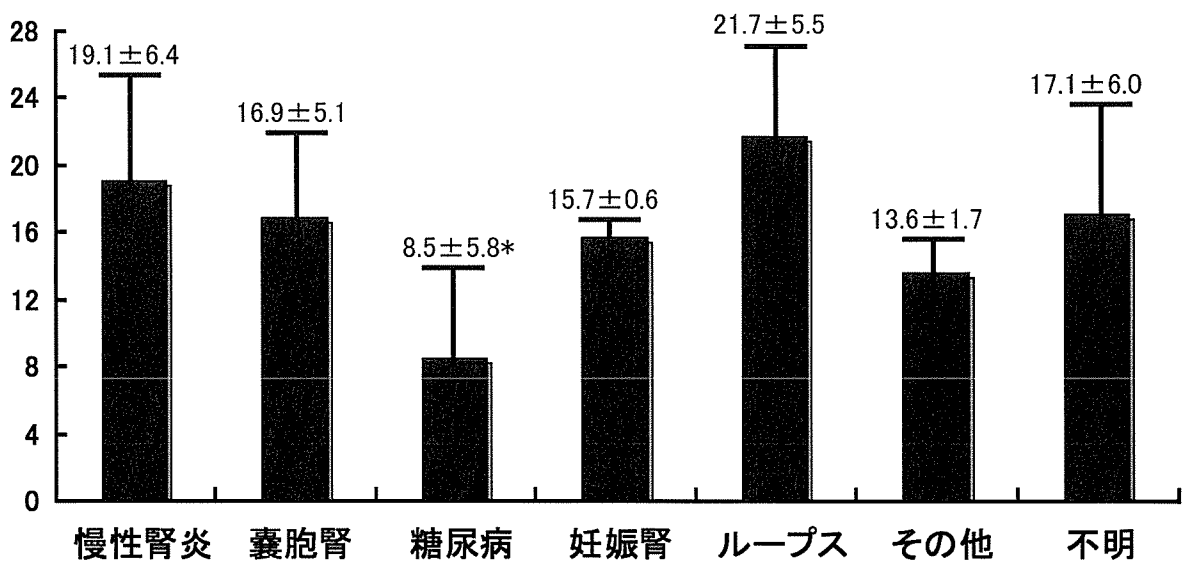


図2 原疾患と初回CTS手術までの年数

透析年数



* p < 0.01

表1 導入時期別初回手根管開放術患者背景

導入時期	患者数	男/女	DM	導入年齢	手術までの期間
~1970	11	4/7	0	34.5±10.6	23.4±7.4
1971~1975	17	8/9	1	36.2±9.5	19.4±6.5
1976~1980	33	15/18	0	40.9±11.1	18.3±5.7*
1981~1985	24	11/13	2	43.3±12.7	17.5±5.1*
1986~	25	10/15	5	52.3±10.7	12.4±4.7**

(1970以前の導入群に対して * p<0.05, **p<0.01)

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)
 アミロイドーシスに関する調査研究班 分担研究報告書

マウス老化アミロイドーシス関連タンパク質 apoA-II の アミロイド線維形成機構

分担研究者 樋口 京一 信州大学大学院医学研究科加齢生物学分野

共同研究者 澤下 仁子*、長谷川 一浩**、安原 (堤) しのぶ**、森 政之*、葛 鳳霞*、
 姚 俊潔*、内木 宏延**

*信州大学大学院医学研究科加齢生物学分野、

**福井大学医学部病因病態医学講座分子病理学領域

研究要旨 マウス老化アミロイドーシスの沈着タンパク質であるアポリポタンパク質 (apoA-II) の合成部分ペプチドを用い、様々な反応条件で重合反応を行った結果、N末とC末配列の相互作用によって2次構造が変化し、アミロイド線維が形成する可能性を示唆した。また、線維形成が困難な中性条件下であっても、グリコサミノグリカン (GAG) 等の生体内高分子が線維形成を促進すること、GAGは線維の安定化には寄与しないことも明らかにした。さらに、アミロイドーシス高発症マウスが有するC型apoA-IIと、非常に発症しにくいマウスが有するB型apoA-IIのアミノ酸組成の相違に着目しながら、中性条件下における重合反応を解析した結果、GAG等による線維形成促進効果、形成量や形態、分解過程について、少なくとも*in vitro*系ではB、C型間の相違がないことを明らかにした。

A. 研究目的

老化アミロイドーシスを高頻度に発症するマウスが有するC型apolipoprotein A-II (apoA-II)と、非常に発症しにくいマウスのB型apoA-II、中程度に発症するマウスのA型apoA-IIのアミノ酸組成の比較により、N末から5番目のアミノ酸 (グルタミン (Q)) がアミロイドーシスの発症に関与すると考えられてきた。しかし、apoA-IIの合成部分ペプチドを用いた*in vitro*実験により、線維形成にはN末とC末の両配列が必須であり、かつ、5番目のアミノ酸よりもB、C型共通の16番目のQが重要である可能性を示唆してきた(図1)。

本研究では、B型とC型 apoA-IIのアミノ酸組成の相違に着目しながら、溶液中でのN末、C末ペプチドの2次構造と相互作用を解析し、さらに、生体内高分子添加時の重合反応を検討することにより、アミロイド線維の形成機構の解明を試みた。

B. 研究方法

CD スペクトル解析 : apoA-II 部分合成ペプチド

(50 μ M、5 % HFIP)、50 mM バッファ (pH 2.5 - 7.0)、100 mM NaCl の混合溶液を調製し、調製直後のCD スペクトルを測定した。

アミノ酸配列の解析 : B型、C型 apoA-IIの共通配列であるN末ペプチド6/16と、その逆配列16/6を用い、それぞれをC末ペプチド48/65と共存させた溶液 (ペプチド 50 μ M、5 % DMSO、50 mM バッファ (pH 2.5)、100 mM NaCl) を調製し、37 $^{\circ}$ Cで振とう (300 rpm) した。チオフラビンT (ThT) を用い、その蛍光強度変化から重合反応頻度を解析し、また、3日後の反応生成物を電子顕微鏡観察した。

生体内高分子添加時のアミロイド線維形成 : ヒアルロン酸、ヘパリン、コンドロイチン硫酸等のグリコサミノグリカン (GAG) やプロテオグリカンを合成ペプチド混合溶液 (ペプチド 50 μ M、5 % DMSO、50 mM バッファ (pH 7.0)、100 mM NaCl) に添加し、37 $^{\circ}$ Cで振とう (300 rpm) した。ThT を用いた蛍光強度変化から重合反応頻度を解析し、さらに、生成物の形態を電子顕微鏡観察した。

C. 研究結果

CD スペクトル解析: apoA-II の N 末 + C 末ペプチドを溶解した直後の CD スペクトルは、極微量しかアミロイド線維を形成しない pH 4.5 および 7.0 では非常に類似していたが、大量に線維を形成することが可能な pH 2.5 のスペクトルとは異なっていた。また、この pH 2.5 での N 末 + C 末ペプチドのスペクトルは、それぞれのペプチドの CD スペクトルから算出したスペクトル (merge) とも異なっていた。

アミノ酸配列の解析: N 末ペプチドの順配列 6/16 と C 末ペプチド 48/65 の重合反応とは異なり、N 末ペプチドの逆配列 16/6 を用いた重合反応では線維は形成しなかった(図 2)。

生体内高分子添加時のアミロイド線維形成: 各種 GAG やプロテオグリカンを用い、pH 7.0 にて N 末 + C 末ペプチドの重合反応を行った結果、無添加群と比較して GAG やプロテオグリカン添加群の ThT 蛍光強度は増大した。この増加パターンは添加した生体内高分子の種類によって異なっていたが、反応約 40 時間以降では全ての添加群の蛍光強度は無添加群と同レベルにまで減少していた。また、GAG 等による線維形成促進効果、形成量や形態、分解過程に B 型と C 型 apoA-II 間の相違はなかった(図 3)。

D. 考察

酸性条件下では、N 末と C 末ペプチドの両者が何らかの相互作用によって立体構造を変えることにより、線維形成が容易になることが考えられた。相互作用の分子機構の解明を目的として、逆配列を用いた重合反応を行った結果、線維が全く形成しなかったことより、線維形成には酸性下におけるアミノ酸のチャージ変化よりもアミノ酸配列が重要と考えられる。

中性条件下では、GAG やプロテオグリカンが線維形成を促進することを明らかにしたが、これらは線維の安定化には寄与していないと考えられた。さらに、線維形成量や形態、分解過程には B 型と C 型 apoA-II 間の相違がなかったことから、生体内で線維を形成し、その構造を保持するには、apoA-II 以外の因子の関与が必須であると考えられる。

今後は、apoA-II の多型とアミロイドーシス発症頻度との相関性をさらに追究し、アミロイド線維の形成過程、構造保持、沈着促進の各要素における関連因子の探索や作用機序の解明を行う予定である。

E. 結論

酸性条件下では、apoA-II の N 末、C 末の両アミノ酸配列の共存により 2 次構造が変化し、アミロイド線維の形成が促進すること、また、GAG やプロテオグリカンは線維形成促進効果を持つが、線維構造の安定性には寄与しないことが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Zhang H, Sawashita J, Fu X, Korenaga T, Yan J, Mori M, Higuchi K: Transmissibility of mouse AApoAII amyloid fibrils: inactivation by physical and chemical methods. *FASEB J* 20 (7): 1012-1014, 2006.
- 2) Korenaga T, Yan J, Sawashita J, Matsushita T, Naiki H, Hosokawa M, Mori M, Higuchi K, Fu X: Transmission of amyloidosis in offspring of mice with AApoAII amyloidosis. *Am J Pathol* 168 (3): 898-906, 2006.
- 3) Yan J, Fujii K, Yao J, Kishida H, Hosoe K, Sawashita J, Takeda T, Mori M, Higuchi K: Reduced coenzyme Q10 supplementation decelerates senescence in SAMP1 mice. *Exp Gerontol* 41 (2): 130-140, 2006.
- 4) 樋口 京一: アミロイドーシスの伝播。 *細胞工 学* 26 (2)、 177-180、2007.

2. 学会発表

- 1) 張 倍茹、付 笑影、葛 鳳霞、巖 景民、姚 俊潔、張 桓宇、澤下 仁子、森 政之、中井 彰、樋口 京一: 活性型 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 29 回日本基礎老化学会、長崎、6 月 16 日、2006 年。

2) Fu X, Korenaga T, Zhang H, Yan J, Sawashita J, Mori M, Higuchi K: Mouse senile amyloidosis: Possible transmission in the mouse room. 2006 Conference of Korean Society for Gerontology and The 6th Korean-Japan Gerontologist joint Meeting. Chuncheon, Korea, June 22, 2006.

3) 葛 鳳霞、姚 俊潔、付 笑影、郭 占軍、巖 景民、張 倍茹、張 桓宇、澤下 仁子、森 政之、樋口 京一: ApoA-II transgenic マウス (*Apoa2^c* Tg) の開発と老化アミロイドーシス。第 21 回老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会、名古屋、7 月 27 日、2006 年。

4) 張 倍茹、宇根 有美、亀谷 富由樹、巖 景民、葛 鳳霞、姚 俊潔、張 桓宇、澤下 仁子、森 政之、中井 彰、樋口 京一、付 笑影: チーターの AA アミロイドーシス。第 1 回臨床ストレス応答学会、京都、11 月 23 日、2006 年

5) Fu X, Korenaga T, Yan J, Ge F, Zhang B, Qian J, Naiki H, Sawashita J, Mori M, Higuchi K: Mouse

senile amyloidosis: Possible horizontal transmission in the mouse room. XIth International Symposium on Amyloidosis. Woods Hole, USA, November 7, 2006.

6) Higuchi K, Ge F, Fu X, Yao J, Guo Z, Yan J, Zhang B, Zhang H, Qian J, Sawashita J, Mori M: Amyloidosis in the transgenic mice of mouse amyloidogenic apolipoprotein A-II (*Apoa2^c*). XIth International Symposium on Amyloidosis. Woods Hole, USA, November 7, 2006

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

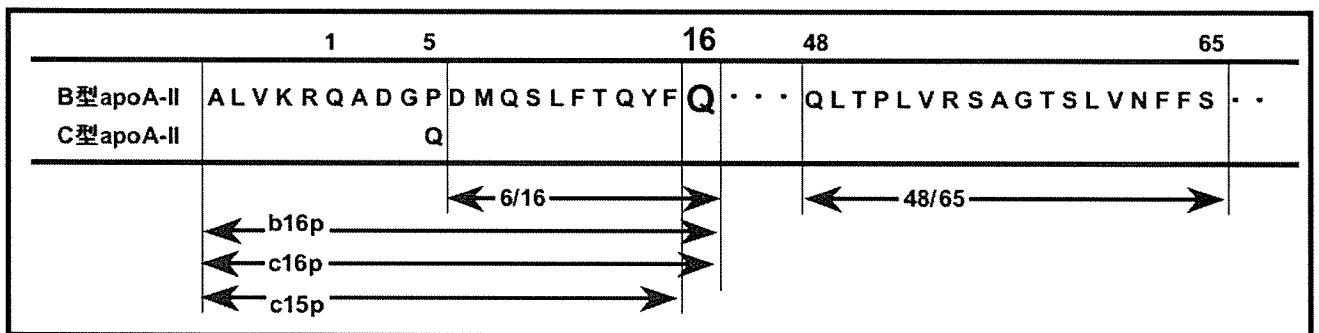
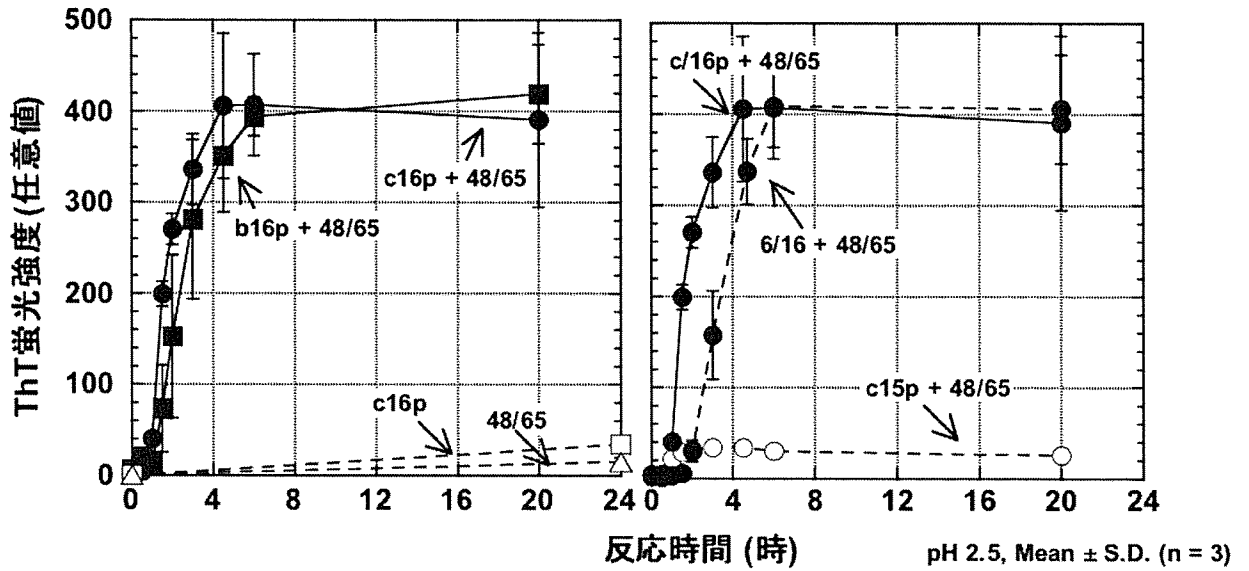


図1 マウスapoA-IIペプチドと用いたアミロイド線維の形成は、B型とC型に共通の16番目のGlnが重要である可能性を見いだした

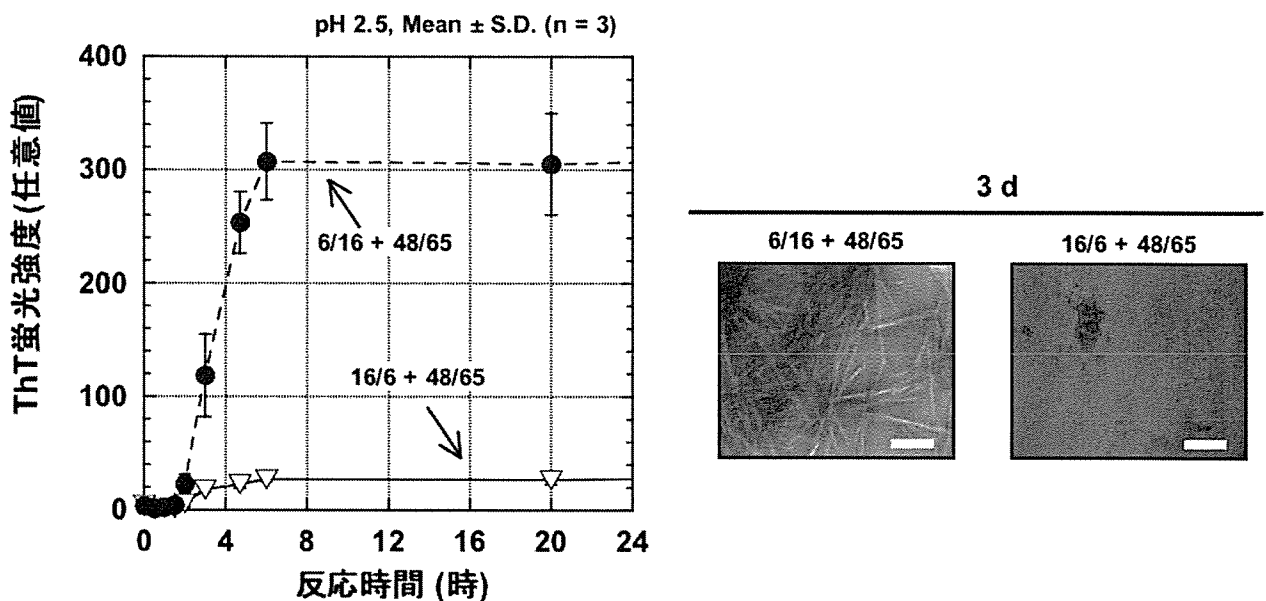


図2 pH 2.5におけるアミロイド線維の形成はアミノ酸配列に依存することが示唆された

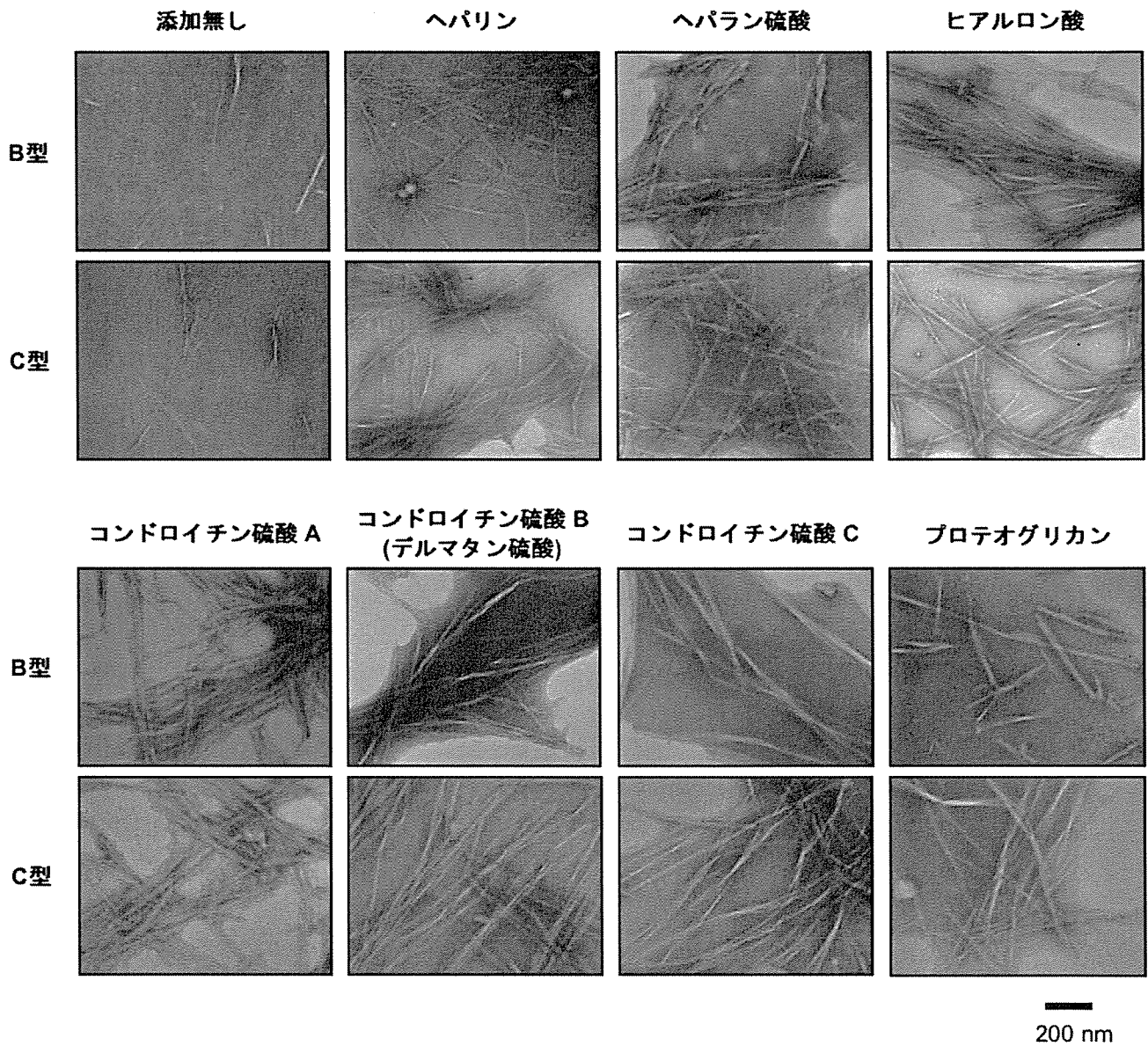


図3 中性条件で形成したアミロイド線維の形態にはB型とC型間の相違はなかった

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)
 アミロイドーシスに関する調査研究班 分担研究報告書

アミロイドーシス特有の病理像を認識するプローブの探索 (2)

分担研究者 工藤幸司 東北大学先進医工学研究機構高度通信分野

共同研究者 藤川陽介* 伊藤啓* 岡村信行*、谷内一彦*、古本祥三**、星井嘉信***、石原得博*
 、山田正仁**

*東北大学医学系研究科機能薬理学分野、**東北大学先進医工学研究機構、***山口大学医学部構造制御病態学講座、****金沢大学大学院医学系研究科脳老化・神経病態学

研究要旨 アミロイドーシスモデルマウスを用い、同モデルマウス腎臓および脾臓におけるアミロイド蛋白と非標識 BF-227 および標識 (^{11}C) BF-227 との結合性を *in vitro* で検討した。BF-227 は同モデルマウス腎臓の糸球体に蓄積したアミロイド蛋白を特異的に染色し、また同モデルマウス脾臓におけるオートラジオグラフィにおいては ^{11}C BF-227 はアミロイド蛋白に特異的に結合した。昨年度の成果と併せると、プローブ ^{11}C BF-227 はアミロイドーシス診断用ツールとして高い有用性を有することが示唆された。

A. 研究目的

アミロイドーシス患者における病理像としてのアミロイドの蓄積量およびその空間的分布をインビボで評価することが可能となれば、アミロイドーシスの新たな客観的診断法となる可能性が高い。本研究では分担研究者(工藤)らによって開発された β シート構造を認識するPETプローブ ^{11}C BF-227のヒトアミロイドーシス診断への応用を最終目的として、昨年度は主としてヒトアミロイドーシス標本におけるBF-227による染色性を検討したが、引き続き本年度は主として動物モデルにおけるアミロイド蛋白と非標識BF-227および標識(^{11}C)BF-227との結合性を*in vitro*で検討したので報告する。

B. 研究方法

山口大学 星井、石原先生より提供いただいたM. Butyricumと Freund's Complete Adjuvantとの混和エマルジョンを皮下投与して作製したアミロイドAモデルマウスを用いた。

1) モデルマウスから抽出した腎臓におけるアミロイドとBF-227の結合性(*in vitro*)

頸椎脱臼したモデルマウスから腎臓を抽出し、10%中性緩衝ホルマリン液および20%シューク

ロースにそれぞれ約24および12時間浸漬させた。粉末ドライアイスにて標本を凍結後、クリオスタットにて薄切し100 μM BF-227(50%エタノールにて溶解)にて10分間染色後、5回水洗し蛍光顕微鏡で観察した。

併せて隣接切片を用いて抗Serum Amyloid A抗体による免疫染色を行った。

2) モデルマウスから抽出した脾臓におけるアミロイドと ^{11}C BF-227の結合性(*in vitro*オートラジオグラフィでの検証)

頸椎脱臼したコントロールおよびモデルマウスから脾臓を抽出し、10%中性緩衝ホルマリン液および20%シュークロースにそれぞれ約24および12時間浸漬させた。粉末ドライアイスにて標本を凍結後、クリオスタットにて薄切し東北大学サクロロンRIセンターにて標識合成した ^{11}C BF-227を滴下し、20分間インキュベートした。90%および70%エタノール、PBSにて洗浄後、イメージングプレートにセットし24時間後にBAS5000を用いて放射能の集積を画像化した。また、同一切片をコンゴレッド染色し、偏光顕微鏡下にアミロイドの蓄積を確認した。

(倫理面への配慮)

アミロイドーシス患者様標本を使用する場合、ヘルシンキ宣言を基準として倫理面に配慮し、標本提供許である山口大学医学部倫理委員会の承認を得た上で使用する。動物実験においては、東北大学における動物実験に関する指針 (S 63.3.24) に従い、十分なる愛護精神をもってできるだけ動物に苦痛を与えぬように配慮する。

C. 研究結果

1) モデルマウスから摘出した腎臓におけるアミロイドと BF-227 の結合性(in vitro)

アミロイド A モデルマウスから摘出した腎臓標本切片において BF-227 は糸球体を特異的に染色し、その染色像は隣接切片における坑 Serum Amyloid A 抗体による免疫染色のそれとほとんど一致した (図 1)

2) モデルマウスから摘出した脾臓におけるアミロイドと [¹¹C]BF-227 の結合性 (in vitro オートラジオグラフィでの検証)

コントロールマウス脾臓標本における [¹¹C]BF-227 のオートラジオグラフィにおいては、ほとんど放射能の集積は見られず、また同一切片のコンゴレッド染色においてもアミロイドとの結合像は観察されなかった (図2)。

一方、アミロイドーシスモデルマウス脾臓標本における [¹¹C]BF-227 のオートラジオグラフィにおいては、白脾髄を除く脾臓全体に放射能の蓄積がみられ、また同一切片のコンゴレッド染色においてもオートラジオグラフィ像とほぼ同様のアミロイドとの結合像が観察された (図3)。

D. 考察

アミロイドーシスモデルマウスを用い、同モデルマウス腎臓および脾臓におけるアミロイド蛋白と非標識 BF-227 および標識 ([¹¹C]) BF-227 との結合性を in vitro で検討した。

ヒトアミロイドーシスにおいてはしばしば腎糸球体においてアミロイド蛋白が集積することが知られているが、今回のモデルマウス標本においても腎糸球体においてアミロイド蛋白の蓄積が見られ、同蛋白は BF-227 によって特異的

に染色されることが確認された。

モデルマウスの脾臓切片におけるアミロイド蛋白の局在を [¹¹C]BF-227 のオートラジオグラフィと同一切片のコンゴレッド染色で比較した結果、両画像のパターンがほとんど一致したことから、 [¹¹C]BF-227 はモデルマウス脾臓標本のアミロイド蛋白に選択的に結合していることが示唆された。

前年度の研究において BF-227 はヒトアミロイドーシス標本のアミロイド蛋白に特異的に結合することが示されたが、今回の結果を併せるとプローブ [¹¹C]BF-227 はアミロイドーシス診断用ツールとして高い有用性を有することが示唆された。

E. 結論

アミロイドーシスモデルマウスを用い、同モデルマウス腎臓および脾臓におけるアミロイド蛋白と非標識 BF-227 および標識 ([¹¹C]) BF-227 との結合性を in vitro で検討した。BF-227 は同モデルマウス腎臓の糸球体に蓄積したアミロイド蛋白を特異的に染色し、また同モデルマウス脾臓における [¹¹C]BF-227 オートラジオグラフィではアミロイド蛋白に結合した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kudo Y : Development of amyloid imaging PET probes for an early diagnosis of Alzheimer's disease. *Minimally Invasive Therapy and Applied Thechnology*. 15: 209-213. 2006
- 2) Ishikawa K, Kudo Y, Nishida N, Suemoto T, Sawada T, Iwaki T, Doh-ura K: Styrylbenzoxazole derivatives for imaging of prion plaques and treatment of transmissible spongiform encephalopathies. *J Neurochem*. 99: 198-205. 2006
- 3) Fujiwara H, Iwasaki K, Furukawa K, Seki T, He M, Maruyama M, Tomita N, Kudo Y, Higuchi M, Saido TC, Maeda S, Takashima A, Hara M, Ohizumi Y, Arai H : *Uncaria rhynchophylla*, a Chinese