

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

## 牛由来 AA アミロイドの子豚への投与試験

分担研究者 山田 学 (独) 動物衛生研究所 ウイルス病研究チーム

共同研究者 中村菊保\*、山本 佑\*、堀内雅之\*\*、古林与志安\*\*、松井高峯\*\*

\* (独) 動物衛生研究所 ウイルス病研究チーム

\*\* 帯広畜産大学 畜産学部病態獣医学講座

**研究要旨** 牛 AA アミロイド投与実験豚では、アミロイド投与 1 日目の 1 頭と 3 日目の 1 頭の、計 2 頭の肝臓のディッセ腔および腎糸球体にコンゴレッド染色で偏光を示す好酸性沈着物が軽度ではあるが観察された。しかし、4 日目以降ではアミロイドの沈着は認められなかったことから、豚では一過性に沈着したアミロイドは宿主反応によって除去されてしまい、アミロイド症発症には至らないことが示唆された。今回、免疫組織化学的検索によって、豚では肝臓に沈着したアミロイドの除去にクッパー細胞や伊東細胞が関与している可能性が示唆された。今回の結果から、アミロイド投与実験豚は沈着したアミロイドに対する宿主の除去機構検索のための実験モデルとして有用であることが示唆された。

### A. 研究目的

アミロイド症は、種々の異なる前駆蛋白がアミロイド線維となって沈着する疾患である。その発症機構についてはいくつかの共通因子があることが知られているが、研究のための動物モデルの不十分さの為に、その病態の詳細は不明である。本課題では、牛由来 AA アミロイドの子豚への投与試験を実施し、異種動物へのアミロイド症発症促進の可能性(Amyloid Enhancing Factor; AEF 効果)を検証すると共に、家畜のアミロイド症実験モデルの作出を試みる。また、アミロイド症の牛野外症例やアミロイド症実験モデルを組織学的に検索することにより、家畜のアミロイド症の病理発生を解析する。本年度は、アミロイド沈着がみられた個体の肝臓について、クッパー細胞、伊東細胞の関与について組織学的検討を行うことにより、アミロイド症の病理発生を解析した。

### B. 研究方法

あらかじめ硝酸銀によって皮膚に重度潰瘍を形成させた豚 20 頭にウシ由来アミロイドを投与し、FCA、硝酸銀およびカゼインによる炎症刺激を行い、アミロイドの誘発を試みた。炎症刺激 1 日目から 14 日目まで経時的に解剖し、病理組織

学的にアミロイド沈着の有無を検索した。

牛アミロイド症、実験的アミロイド投与豚のホルマリン固定パラフィン包埋材料について、クッパー細胞および伊東細胞に対するマーカー用いて、沈着したアミロイドに対する宿主生体反応について免疫組織化学的検索を実施した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、(独) 動物衛生研究所動物実験倫理委員会の規定に基づき実施した。

### C. 研究結果

牛 AA アミロイドの静脈内投与実験豚では、投与 1 日後の 1 頭および投与 3 日後の 1 頭の、計 2 頭の肝臓のディッセ腔および腎糸球体にコンゴレッド染色で偏光を示す好酸性沈着物が軽度ではあるが観察された。しかし投与 4 日目以降ではアミロイド沈着は認められなかった。

投与 1 日目から投与 14 日目の実験的アミロイド投与豚の肝臓についてクッパー細胞に対するマーカーである抗Lysozyme及び、活性化伊東細胞に対するマーカーである抗平滑筋アクチンを用いた免疫染色を実施したところ、投与 2 日目、3 日目の肝臓において、活性化伊東細胞の増生が顕著にみら

れた。経過と共に活性化伊東細胞は減数し、投与7日目以降では対照との差はほとんど認められなかった。クッパー細胞の増生も投与7日目までみられた。炎症刺激のみのアミロイド非投与群ではクッパー細胞の増数は多少みられたものの、アミロイド投与群と比べると軽度であった。アミロイド非投与群では、伊東細胞の活性化、増数は認められなかった。

牛アミロイド症野外症例の肝臓では、アミロイド沈着部位、その周囲においてクッパー細胞、活性化伊東細胞の反応はみられなかった。

#### D. 考察

牛 AA アミロイド投与実験豚ではアミロイド症発症促進はみられず、牛由来 AA アミロイドは豚に対しては AEF 効果を有しないことが示唆された。豚では、大容量のアミロイドを静脈内に投与すると、腎臓や肝臓に一過性にアミロイドの沈着がみられることが示唆された。しかし、4日目以降ではアミロイドの沈着は認められなかったことから、豚では一過性に沈着したアミロイドは宿主反応によって除去されてしまい、アミロイド症発症には至らないことが示唆された。今回、免疫組織化学的検索によって、豚では肝臓に沈着したアミロイドの除去にクッパー細胞や伊東細胞が関与している可能性が示唆された。今回の結果から、アミロイド投与実験豚は沈着したアミロイドに対する宿主の除去機構検索のための実験モデルとして有用であることが示唆された。

一方、牛アミロイド症野外症例の肝臓では、クッパー細胞や活性化伊東細胞による宿主反応は認められなかったことから、アミロイドを処理するクッパー細胞等の食細胞系の機能障害もアミロイド症発症要因の一つである可能性が示唆された。

アミロイドの治療ということを考えた時に、今

回の結果から、宿主の食細胞系の活性を高めることにより、沈着したアミロイドを除去するという選択肢もあることが示唆された。

#### E. 結論

牛 AA アミロイド投与実験豚ではアミロイド症発症促進はみられず、牛由来 AA アミロイドは豚に対しては AEF 効果を有しないことが示唆された。豚では肝臓に沈着したアミロイドの除去にクッパー細胞や伊東細胞が関与している可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Yamada M, Kotani Y, Nakamura K, Kobayashi Y, Horiuchi N, Doi T, Suzuki S, Sato N, Kanno T, Matsui T.: Immunohistochemical distribution of amyloid deposits in 25 cows diagnosed with systemic AA amyloidosis. J Vet Med Sci 68: 725-729, 2006.

##### 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。

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

## 牛由来 AA アミロイド投与による実験的ウサギ AA アミロイドーシス

分担研究者 松井高峯 帯広畜産大学畜産部獣医学科家畜病理学教室

共同研究者 堀内雅之\*、古林与志安\*、山田学\*\*

\*帯広畜産大学畜産学部獣医学科家畜病理学教室、\*\*動物衛生研究所

**研究要旨** マウス以外の動物種に対する牛由来アミロイドの発症促進効果の有無を検証するために、ウサギを用いて実験を行った。牛由来アミロイドとしてアミロイドーシスを発症した牛の腎臓からアミロイドを抽出・粗精製した。炎症刺激を加えた後アミロイドを投与し、1・3・6・9日後に剖検を行い、病理学的に検索した。結果、5回炎症刺激を与えて飛節潰瘍症を罹患していたウサギの脾臓と腎臓にアミロイドの沈着を確認した。牛由来 AA アミロイドはウサギに対して発症促進効果を有しているが、ウサギにおけるアミロイドーシス発症には飛節潰瘍症など単純な炎症刺激以外に必要な要因があると考えられた。

### A. 研究目的

BSEなどのプリオン病で原因とされている異常プリオンはアミロイドと呼ばれる一群の蛋白質に含まれる蛋白質である。近年異常プリオン以外のアミロイドにも同様のいわゆる“伝達性”を有するものがあるのではないかと提起されてきた。

AAアミロイドーシスはAAアミロイドと呼ばれるアミロイドが諸臓器に沈着することで起きる疾病であるが、そのAAアミロイド自体に発症促進効果 (AEF 効果) がマウスにおいて認められた。また、牛におけるAAアミロイドーシスは食肉となる骨格筋を含む諸臓器に沈着していることが近年明らかとなり、食肉検査場における調査でAAアミロイドーシスを疾病として有する牛が流通に乗っている事も明らかにされた。このことはマウスに対して AEF 効果を有する AA アミロイドを、食肉を介してヒトが摂取している可能性を示唆している。

現在牛由来 AA アミロイドの AEF 効果が確認されているのはマウスに対してのみである。そこで牛由来 AA アミロイドがマウス以外の動物に対してその AEF 効果を有するか検討するためにウサギを用いて実験を行った。

### B. 研究方法

#### 1. アミロイドの抽出

AA アミロイドーシスと病理学的に診断した牛の腎臓から水抽出法によって AA アミロイドを抽出・粗精製し、蒸留水中に湿重量 20mg/ml で溶解させ、ウシ由来アミロイドとして実験に用いた。

#### 2. 動物

予備実験にて高率でアミロイドを発症していた、足裏の壊死性皮膚炎である飛節潰瘍症 (SH) を罹患しているウサギと、飛節潰瘍症を罹患していない (non SH) 健康なウサギを用いて実験を行った。

#### 3. 炎症刺激

Freund's complete adjuvant (Calbiochem) と 200µg Lipopolysaccharide (LPS) (Wako)を用いて混濁液を作成し皮内投与することで炎症刺激を与えた。

#### 4. 実験プログラム

##### a. 耳静脈経由投与実験

実験はSH罹患ウサギに炎症刺激を5回与えた後アミロイドを投与したA群 (n=18)、SH罹患

ウサギに炎症刺激を 5 回与えるがアミロイドを投与しない B 群 (n=9)、SH を罹患していないウサギに炎症刺激を 5 回与えた後アミロイドを投与した C 群 (n=9)、SH 罹患ウサギに異なる回数  
の炎症刺激を与えた後アミロイドを投与した D 群 (n=15) に分けて行った (表 1)。D 群は更に 3 羽ずつ 5 つの小群 (D-0~D-4) に分け、D-0 は炎症刺激を与えずにアミロイドを投与したもの、D-1~D-4 はそれぞれ 1 回から 4 回炎症刺激を与えた後アミロイドを投与した。アミロイドの投与は最終炎症刺激時に耳静脈経由で 1m l 投与した。剖検はアミロイド投与後 A 群 1 (n=3)、3 (n=3)、6 (n=9)、8 (n=3) 日後に、B・C 群は 1・3・6 日後に 3 羽ずつ、D 群はそれぞれの小群ごとに 6 日後に 3 羽ずつ行った。(表 1)

#### b. 経口投与実験

SH 罹患ウサギに炎症刺激を 5 回与えた後胃内にカテーテルを挿入しアミロイドを 2m l 投与した。剖検はアミロイド投与後 1(n=1)、2(n=2)、4(n=2)、5(n=1)、6(n=1)、7(n=5)、10(n=2)、11(n=2) 日後に行った。

#### 5. 組織学的検索並びに免疫組織学的研究

麻酔下での剖検後、肉眼的に臓器を観察した後、脾臓と腎臓を常法にしたがって組織標本を作製し病理組織学的検索を行った。静脈内投与をおこなった、4. a に関してはコンゴレッド染色にて偏光顕微鏡下で観察を行い、抗ヒト AA マウスモノクローナル抗体 (Kyowa) を用いた免疫染色を行い観察した。

#### (倫理面への配慮)

実験に供したウサギの飼育状態が良好な環境になるように配慮した。また、実験・剖検に際しては苦痛が最小限になるように麻酔下で行った。実験は帯広畜産大学実験動物委員会の承認の下、実験動物取り扱い規定に沿って行った。

#### C. 研究結果

耳静脈経由投与実験では、A 群において全ての個体でアミロイドの沈着を確認し (表 1・2、

図 1、図 2-1)、D 群における炎症刺激を 4 回与えた個体 3 羽中 1 羽の脾臓にアミロイドの沈着を確認した (表 1)。沈着したアミロイドはコンゴレッド染色後偏光顕微鏡下での観察で緑色偏光を呈し、免疫染色で陽性像を示した (図 2-2)。

経口投与実験では全ての個体にアミロイドの沈着を確認した。

#### D. 考察

ウシ由来アミロイドはウサギに対して AEF 効果を示した。ウサギではアミロイド投与前に炎症刺激をある程度与えておく必要があるという点でマウスとは異なり、動物種により AA アミロイドーシスの発症条件に違いがある可能性が示唆された。これは今後他動物種におけるアミロイドの AEF 効果を検証する際有用となる。

今回行った実験では、アミロイド投与後 1 日後からアミロイドの沈着を確認することができた。アミロイドの沈着は一般的には緩やかに進行すると考えられているが、急速に起こりうるという事が示唆された。一方、アミロイド沈着の程度や分布に経時的な変化を捉えることができなかった。これは SH の程度や遺伝的背景などの個体差といった要因がある可能性がある。ウサギはマウスと異なり、生存中にある程度の量の血液を採取することができるという利点がある。血液生化学的研究は生前診断の開発につながる可能性があるため、今回発見したモデルは有用である。今後、自然発症した SH に依存しない、ウサギにおけるウシ由来アミロイド投与によるアミロイドーシス発症モデルを確立し、詳細な実験を行う必要がある。

#### E. 結論

牛由来 AA アミロイドは AEF 効果を有する。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・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

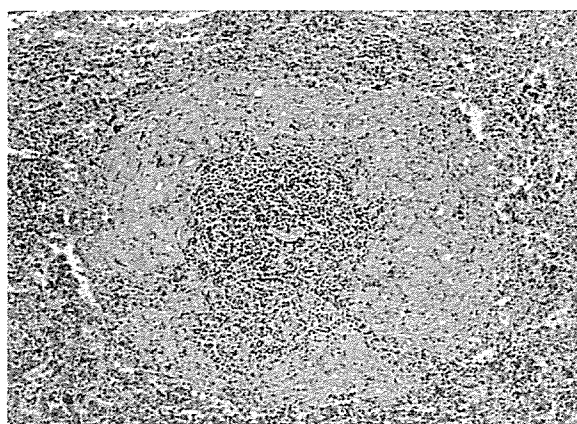
なし

図1 剖検時肉眼像



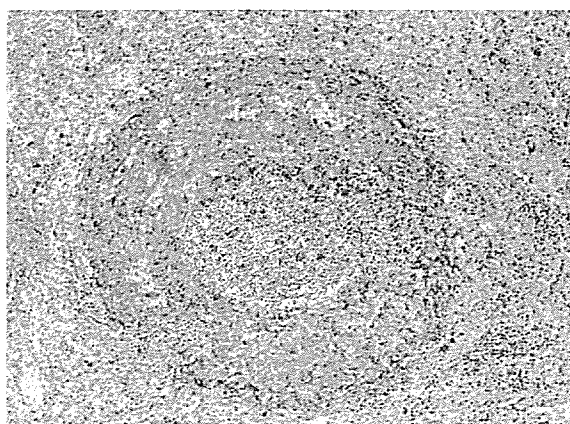
アミロイド投与後3日の剖検時肉眼像で、腎臓は左挿入図に比べ著しく肥大し表面が不整で褪色していた。脾臓も通常より著しくその大きさを増している。

図2-1 脾臓H. E. 染色像



脾臓濾胞周囲にアミロイドが沈着しているのが観察された。

図2-2 脾臓免疫染色像



H. E. 染色像と同様に濾胞周囲に免疫染色陽性物質の沈着が観察された。これにより、沈着してる物質はAAアミロイドであると分かった。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

アミロイドーシスの画期的診断・治療法に関する研究班 分担研究報告書

## FITC 標識アミロイド線維および FITC 標識合成ペプチドの投与による 実験的 AA アミロイドーシスの発症促進効果についての検討

分担研究者 石原得博 山口大学大学院医学系研究科情報解析医学系学域病理形態分野

共同研究者 崔 丹\*、星井嘉信\*、河野裕夫\*、田中裕也\*\*、安武結香\*\*\*

\*山口大学大学院医学系研究科、\*\*同医学部四年生、\*\*\*同保健学科四年生

研究要旨 外来性に seed として投与したアミロイド線維のアミロイドーシスの発症での役割を検討する為に、マウス AA アミロイド線維または合成部分 AA ペプチドを FITC で標識しマウスに投与した。FITC 標識アミロイド線維の投与 7 日後、脾臓に中等量のアミロイドの沈着がみられ、アミロイド沈着に一致して抗 FITC 抗体の陽性反応が認められた。FITC 標識合成ペプチドは細線維構造を示すことを確認した後、マウスに投与した。FITC 標識合成ペプチドの投与 3 時間後で脾臓に FITC の集積があり、投与 7 日後では脾臓に少量のアミロイド沈着を認め、その中に FITC の共存を認めた。すなわち、外来性のアミロイド線維が、新たに沈着するアミロイドの seed となってアミロイドーシスが発症することが in vivo で確認できた。

### A. 研究目的

動物実験においては、外来性のアミロイド線維をマウスに導入することによってアミロイドーシスの発症が促進されることを報告している。しかし、投与したアミロイド線維が新たに沈着したアミロイド線維と共存するかどうかについては、まだ詳細に検討されていない。そこで今回、我々は FITC で標識したマウスの水抽出 AA アミロイド線維または FITC 標識合成部分 AA ペプチドをマウスに投与し、投与したアミロイド線維または合成ペプチドの局在を組織学的に検索した。

### 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 5 匹とした。

2. 方法：

1) マウス水抽出 AA アミロイド線維の FITC 標識：

型の如く水抽出したマウス AA アミロイド線維を 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> 溶液で懸濁し、FITC (DMSO で可溶性) 液と 3 : 1 で混合して、1 時間振盪させ、アミロイド線維に FITC を結合させた。アミロイド線維に結合していない FITC を取り除くた

めに、1 晩透析した。

2) FITC 標識合成部分 AA ペプチドの作製および形態の観察

マウス SAA1 の N-末端 1 ~ 15 のアミノ酸配列に相当する合成ペプチドを作製し、その N-末端を FITC で標識した (Sigma Genosys)。合成ペプチドは 4% アンモニア液で溶かし、10% 酢酸溶液で pH 7.2 になるように中和した。中和したものと、さらに 37°C で一週間または二週間 incubate した各ペプチドは、4% 酢酸ウラニルで negative staining 後、透過型電子顕微鏡で観察した。

3) マウスアミロイドーシスの惹起：

実験的マウス AA アミロイドーシスの発症炎症刺激としては、10% カゼイン 0.5 ml を連日皮下投与した。

炎症刺激とともに、1 日目に FITC 標識マウスアミロイド線維を 0.5ml 腹腔内に、または FITC 標識合成ペプチドを 0.1ml 静脈内に投与した。陰性対照として等量の FITC のみを投与した。

4) 投与したアミロイド線維または合成ペプチドの組織学的な検索：

初回投与の 3 時間、24 時間、7 日後にマウスを安楽死させた。すべての実験群において、マウス

屠殺時に脾臓、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た。

アミロイド沈着の有無を検索するために、HE、Congo red 染色を行い、Congo red 染色標本を偏光顕微鏡で観察した。

FITC を検出するために、抗 FITC 抗体 (Bio Genesis, HRP conjugated FITC×30) を用いて、免疫組織化学的検索を行った。

(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. FITCでのマウスアミロイド線維の標識の確認:

FITCでのアミロイド線維の標識効果を確認するために、SDS-PAGEにて、分子量を測定した (Image Analysis Software)。マウスアミロイド線維とFITCが複合体を形成しているものはアミロイド線維のみを泳動したものより移動度が遅いことが確認された。その差はFITC分子量(398.38)に相当するものであった。(Fig 1.)。

#### 2. FITC標識合成ペプチドによる線維形成の確認:

FITC標識合成部分AAペプチドを溶解した直後にも、細線維の形成が認められ(Fig 2a.)、37°Cで1週間incubateした後は、線維の密度が高くなり、線維も太くなった(Fig 2b.)。37°Cで2週間incubateすると、より短い線維構造を呈した(Fig 2c.)。

#### 3. FITC標識水抽出マウスAAアミロイド線維またはFITC標識合成部分AAペプチドの投与によるマウスAAアミロイドーシスの惹起:

FITC標識マウスアミロイド線維を0.5ml腹腔内に投与し、炎症刺激を連日7日間投与後屠殺したマウスの脾臓に、中等量のアミロイド線維の沈着が見られた。抗FITC抗体で免疫染色した結果、アミロイド沈着部位に一致して、斑状にFITCの陽性所見を認めた(Fig 3a.3b.)。炎症刺激を与え、FITCのみを投与したマウスには、アミロイドの沈着がみられず、脾臓においてFITCを検出しなかった。

一方、FITC標識合成ペプチドを投与したマウスにおいて、合成ペプチド投与3時間後、脾臓の濾胞

周辺帯にFITCの集積がみられた。24時間後、脾臓の濾胞周辺帯にFITCの集積が更に増えた(Fig 4a.4b.)。投与7日後には脾臓の濾胞周辺帯に少量のアミロイドの沈着が認められ、少量ながらFITCの共存も同じく検出された。

### D. 考察

今回、我々は蛍光色素 FITC がアミノ基と容易に反応する性質を利用して、アミロイド線維の標識を試みた。SDS-PAGEにて標識効果を確認した。このFITC標識アミロイド線維をマウスに投与し、マウスの脾臓に新たにアミロイドの沈着を認め、アミロイドの中にFITCの共存を検出することができた。外来性に投与されたFITC標識アミロイド線維は新たにアミロイドが沈着した時、seedとして働くことを支持する所見である。

外来性の物質のseedの役割についてさらに検討するために、FITC標識合成部分AAペプチドを作製し、マウスアミロイドーシス発症における役割を調べた。合成ペプチドは細線維を形成し、この細線維をマウスに投与すれば、早くも3時間後に脾臓に集積した。投与7日後、脾臓に少量のアミロイド沈着を認め、その中にFITCの共存を認めた。外来性の線維構造を示す合成ペプチドがマウスのアミロイドーシスの発症を促進し、アミロイドの沈着の核としてアミロイドーシスの促進の主役を果たしたと思われる。

### E. 結論

新たにアミロイドが沈着するとき、外来性のアミロイド線維または線維構造を示す合成ペプチドが核となりアミロイドーシスの発症を促進したと考えられる。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Hoshii Y, Kiyama M, Cui D, Kawano H, Ishihara T. Immunohistochemical study of immunoglobulin light chain amyloidosis with antibodies to the immunoglobulin light chain



variable region. *Pathol Int.*2006;56:324-330.

- 2) Omoto M, Yokota T, Cui D, Hoshii Y, Kawano H, Gondo T, Ishihara T, Kanda T. Inactivation of amyloid-enhancing factor (AEF) study on experimental murine AA amyloidosis. *Medical Molecular Morphology*.2007; 40:in press.
- 3) 石原得博 アミロイドーシスの分類.腎と透析. 2007;62:印刷中.
- 4) 星井嘉信、石原得博.アミロイドーシス.病理と臨床（臨時増刊号）. 2007;25:印刷中.

## 2. 学会発表

- 1) 崔 丹、星井嘉信、河野裕夫、権藤俊一、瀬

戸口美保子、石原得博. 実験的 AA アミロイドーシスの発症抑制における triptolide の効果-2.第95回日本病理学会総会。東京。2006年4月30日～5月2日開催

## 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

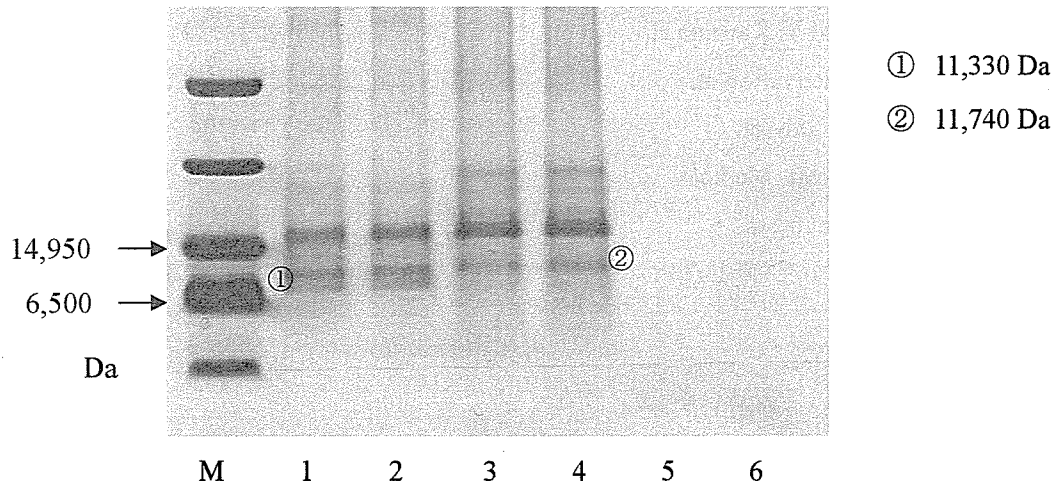


Fig 1. SDS-PAGE。 Lane M は標準分子量、Lane1,2 はマウスアミロイド線維、Lane3,4 は FITC 標識マウスアミロイド線維 Lane5,6 は FITC のみ。

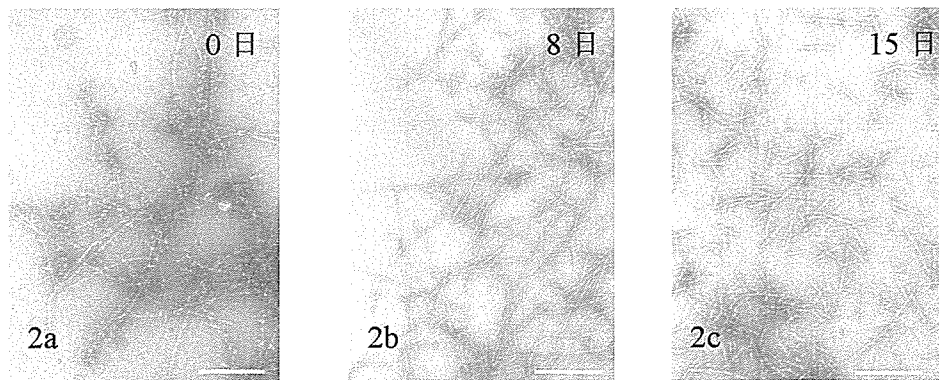


Fig 2. negative staining の結果。スケールバーは 200nm。

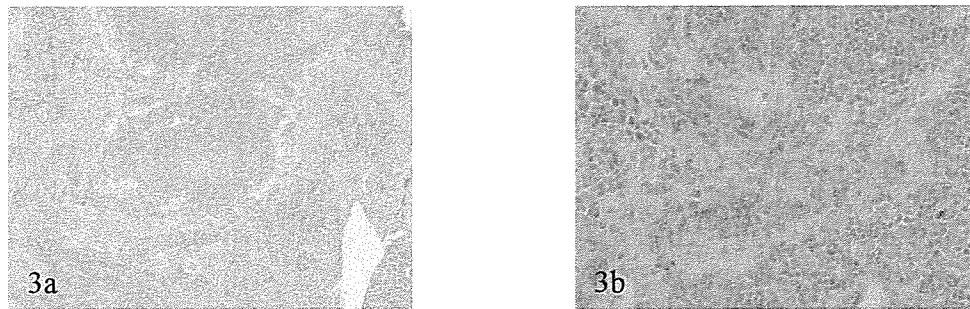


Fig 3. FITC 標識抽出アミロイド線維投与 7 日後のマウス脾臓。抗 FITC 抗体による免疫染色。

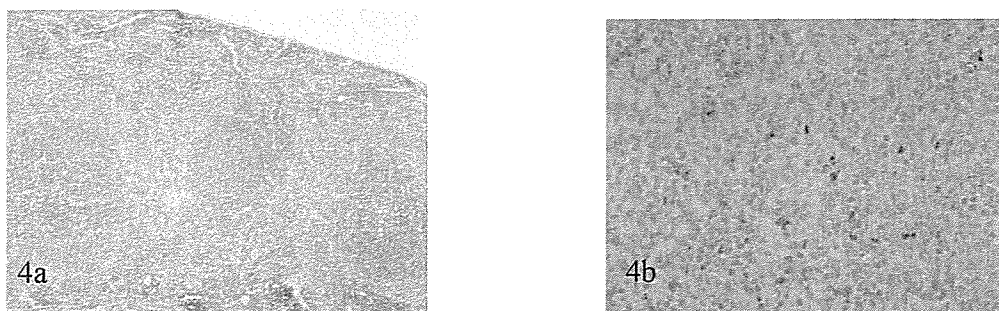


Fig 4. FITC 標識合成ペプチド投与 3 時間(4a.)と 24 時間後(4b.)の脾臓。抗 FITC 抗体による免疫染色。

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)  
 アミロイドーシスの画期的診断・治療法に関する研究班 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に対する  
 生物学的製剤の治療効果の検討

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腎・膠原病内科学分野

研究要旨 関節リウマチに反応性アミロイドーシスを合併した9例(男性2例、女性7例)に対し生物学的製剤(インフリキシマブ、エタネルセプト)を使用して腎機能を含めた臨床効果を検討した。使用期間は3から23ヶ月(12.2±6.7)であった。使用前後でクレアチニン・クリアランスの増悪症例は1例のみで8例は不変又は改善していた。尿蛋白の著明に減少した症例も認められた。胃・十二指腸粘膜生検ではアミロイドの沈着が著明に減少している症例も認められた。有害事象は帯状疱疹と下肢蜂窩織炎の2例2事象であったが軽症であった。今後生物学的製剤の一つであるエタネルセプトはAAアミロイドーシス症例による末期腎不全症例にも安全に使用できるため、積極的に用いられるべきであると考えられた。

A. 研究目的

関節リウマチ(RA)は、関節のみならず多彩な関節外症状を来す疾患であり反応性AAアミロイドーシスは進行期のRAの重要な合併症の一つであり、その予後は不良である。一方、RAの治療戦略は従来のピラミッド方式の治療戦略からアメリカリウマチ学会が2002年に発表した新たなガイドラインによる治療が主流となってきた。これによれば、RAと診断された症例には早期に抗リウマチ薬を開始し、無効の場合はメトトレキサートを使用し更に無効の場合は生物学的製剤を使用することが推奨されている。アミロイドの生成機序に関しては、関節炎の局所で産生されるIL-6、TNF- $\alpha$ 等の炎症性サイトカインが血液を介して肝臓に運ばれSAAをはじめとする炎症性の蛋白が生成される。SAAが長期間、高濃度で存在するため重合が起こり組織に沈着し、機能障害が起こると考えられている。生物学的製剤はこれらの炎症性サイトカインを阻害し肝臓における炎症性の蛋白を抑えるためSAAの産生が抑えられ組織の沈着が抑制され、さらに組織のturn overにより末梢の組織からアミロイドが減少する効果も期待されている。生物学的製剤がSAAの産

生を強力に抑制するため、RAの反応性アミロイドーシス症例に生物学的製剤であるインフリキシマブおよびエタネルセプトを使用し腎機能に対する治療効果を検討した。

B. 研究方法

対象と方法

アミロイドーシスを合併したRA症例9例を対象に、当該研究の説明、匿名性の確保等を説明し、インフォームドコンセントを得た後、インフリキシマブまたはエタネルセプトで治療を行い、使用前後の胃生検でのアミロイドの沈着、炎症反応、腎機能、蛋白尿等の臨床的パラメーターを検討した。

(倫理面への配慮)

患者データの使用については患者より同意を得て行った。また本研究は、新潟大学倫理委員会の許可を得て行い、問題はないと考える。

C. 研究結果

患者背景

患者背景は男性2例、女性7例であり、対象者の年齢は59±10歳、RA発症年齢は41.6±13.1歳、

アミロイドーシス発症年齢は  $58.8 \pm 10.4$  歳、RA 発症から  $14.3 \pm 9.8$  歳でアミロイドーシスを発症していた。Stage は全例 IV、Class は全例 2 であり、進行例に使われていた。生物学的製剤は 2 例がインフリキシマブを使用され、他の 7 例がエタネルセプトを使用された。アミロイドーシスは全例が胃生検により診断された。MTX はレミケード使用の 2 例に、エンブレル使用の 1 例に使用されていた。表 1 に全例の使用前後のデータを示した。使用期間は 3 から 23 ヶ月 ( $12.2 \pm 6.7$ ) でした。全例で生物学的製剤導入後の CRP は著明に抑制されており SAA も概ね  $20\text{mg/ml}$  未満に抑制されていた。症例 2、6 はシクロホスファミドからの切り替え症例で開始前の CRP が低い SAA は抑えられ抑制されていなかった。腎機能をクレアチニン・クリアランス (Ccr) で評価した。改善または正常範囲で推移した症例は 9 例中 5 例であり、ほぼ不変であった症例は 2 例、悪化した症例が 1 例であった。また、1 例は期間が短いため未評価である。悪化した症例 6 は下肢の蜂窩織炎を起こしたため腎機能障害が進行し一時 Ccr で  $10\text{ml/min}$  未満となったため血液透析に導入した。また、症例 1、2、3 は蛋白尿の減少を認めており、症例 3 はネフローゼ症候群から離脱した。その他はほぼ不変と考えられた。症例 6 は蜂窩織炎の極期にデータを取っているため今後再検予定である。使用期間が最も長い症例 4 の胃・十二指腸粘膜生検では図 1 のように開始前は血管を中心にすべての標本に Congo-red 陽性のアミロイドの沈着が血管周囲にかなり認められるが、2 年後の再検では、ほとんど認められなかった。症例 2 でも、前後で減少傾向を認めた。有害事象としては全経過中 2 例 2 事象が認められ、症例 1 は帯状疱疹で入院した。前述した症例 6 は下肢蜂窩織炎で入院し腎機能悪化のため血液透析に導入され現在週 1 回の血液透析を施行中である。

#### D. 考察

RA のアミロイドーシスに対する生物学的製剤の治療に関しては大規模試験の報告はないが、Gottenberg らはリウマチ性疾患による AA アミロイドーシスの 15 症例に抗 TNF- $\alpha$  療法(インフリキシマブ 10 例、エタネルセプト 4 例、両方 1 例)

を行い蛋白尿が低下し、糸球体濾過率(GFR)が改善したと報告している。このうち RA は 5 例であり、インフリキシマブは 3 例、エタネルセプトは 2 例であった。5 例のうち蛋白尿減少が 3 例、増加が 2 例で RA 症例の GFR に関しての記載はない。また、インフリキシマブに関しては Elkayam らが蛋白尿が減少したが Ccr は不変の 1 例を報告した。エタネルセプトに関しては Smith らがネフローゼに対する治療効果を報告しており蛋白尿は著明に減少したが、Ccr は不変の 1 例を報告した。また、胃生検に関しては Okuda らは JIA 症例に、トシリズマブ (抗 IL-6 受容体抗体) を使用し胃生検でアミロイドの消失を報告した。従来の治療では、アミロイドーシスの腎病変の進行を止めることは非常に難しく、経時的には徐々に進行することが知られている。今回の我々の検討では、蛋白尿減少効果と Ccr の低下を抑制する効果が認められたため、アミロイドーシス症例には生物学的製剤を導入すべきであると考えられた。

#### E. 結論

RA による AA アミロイドーシス症例 9 例に生物学的製剤を導入し、Ccr は使用前後で 8 例が改善例又は不変例であった。一部の症例で著明な蛋白尿の減少効果を認めた。胃生検では使用前後で 2 例に明らかにアミロイドの減少を認めた。末期腎不全では RA の治療薬の選択に苦慮する場合も多いがエタネルセプトは安全に使用できた。今後生物学的製剤は AA アミロイドーシス症例に積極的に用いられるべきであると考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 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 25(4): 498- 505, 2006
- 2) 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. *Rheumatol Int* 26(12): 1147- 1153, 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. *Mod Rheumatol* 16(5) : 294-299, 2006

4)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 37(1):10-11,2006

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1 症例データ

No	Age	Sex	製剤	期間 (months)	MTX	使用前						使用后							
						胃生検	CRP (mg/dl)	SAA ( $\mu$ g/ml)	TP (g/dl)	Cr (mg/dl)	Ccr (ml/min)	U-P (g/day)	胃生検	CRP (mg/dl)	SAA ( $\mu$ g/ml)	TP (g/dl)	Cr (mg/dl)	Ccr (ml/min)	U-P (g/day)
1.	58	M	E	15	(-)	(+)	2.5	52	6.5	2.0	26.4	1.8	(+)	0.6	52.8	6.9	1.8	26.1	0.41
2.	37	M	E	12	(-)	(+)	0.2	30	5.8	1.2	54.5	2.8	(+)	0	11.4	5.8	1.3	61.9	2.43
3.	55	F	I	15	(+)	(+)	2.3	177	6.5	0.7	54.0	4.0	(+)	0	8.6	6.9	0.7	58.5	0.76
4.	56	F	I	23	(+)	(+)	4.1	590	6.8	0.5	113.8	0.1	(+)	0	11.9	6.5	0.4	120	0
5.	63	F	E	11	(-)	(+)	0.8	162	7.2	1.6	22.4	0.1	(+)	0	20.3	6.5	2.1	20.1	0.27
6.	68	F	E	8	(-)	(+)	0.4	44	6.5	2.1	18.5	0.3	(+)	0	13.0	6.4	2.4	12.6	5.1
7.	70	F	E	3	(-)	(+)	2.2	180	5.8	0.7	42.4	0.3	ND	0.7	38.0	5.9	0.7	47.6	0.4
8.	67	F	E	4	(-)	(+)	1.2	ND	5.8	0.4	81.3	0.8	ND	0.0	ND	7.7	0.5	ND	ND
9.	55	F	E	19	(+)	(+)	0.7	ND	5.1	0.4	107.0	2.1	ND	0.2	ND	6.0	0.6	92.0	0.23

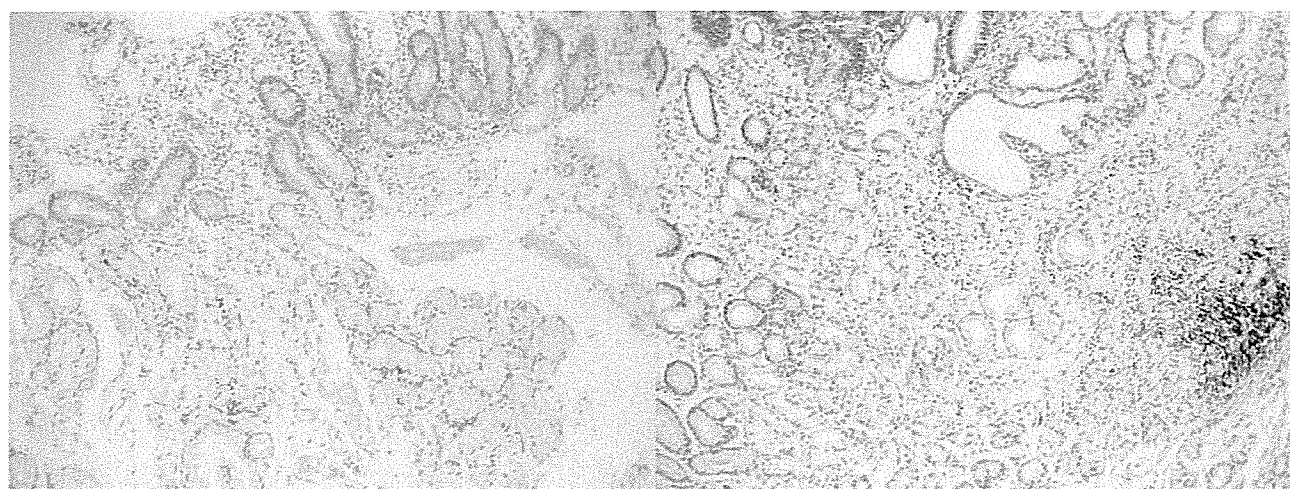
E:Etanercept, I:Infliximab

腎機能障害があるが不変と考えられる症例:症例1,5

腎機能が改善した症例または正常範囲である症例:症例2,3,4,7,9,

腎機能悪化例:症例6

図1 症例4 胃・十二指腸粘膜生検



生物学的製剤開始前

2年後

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

本邦における家族性地中海熱 全国調査結果(一次調査)

分担研究者 松田正之 信州大学医学部内科学 (脳神経内科、リウマチ・膠原病内科)

共同研究者 矢崎正英、土屋彩子、中村昭則、池田修一

信州大学医学部内科学 (脳神経内科、リウマチ・膠原病内科)

研究要旨 今回我々は、本邦における家族性地中海熱患者の実態(症例数、臨床像、MEFV 遺伝子異常)を把握するために、全国調査(アンケート調査)を施行した。アンケート調査は、全国の内科系・小児科系病院 1850 科に対し、遺伝子診断で確定した FMF 患者あるいは、臨床的に FMF が疑われる患者の症例数について、郵送にてアンケート用紙を配布した。アンケート用紙を送付した 1850 科中、686 科より回答があった(37.1%)。臨床的に FMF が疑われる患者数は 59 例で、MEFV 遺伝子異常が確定している患者数は 53 例であった。FMF に反応性アミロイドーシスを併発している患者は 2 例であった。現在、患者を有する施設に対して、患者の臨床像、遺伝子変異の種類などの二次調査について計画中である。本邦においても、FMF 患者は多数存在するものと推察され、本邦患者と地中海地方における患者との臨床像の異同や MEFV 遺伝子変異の種類の違いなど、今後明らかにする必要がある。また未治療では、反応性アミロイドーシスを誘発する可能性があり、全国の内科系・小児科系の医師に、本症に対する認知度を更に上げる必要がある。

A. 研究目的

家族性地中海熱(FMF)は、地中海沿岸地方に主に見られる周期性発熱症であり、適切な治療が施されない場合、反応性アミロイドーシスに進展する。本邦においても 2002 年に MEFV 遺伝子異常を有した症例が報告され、以後症例が蓄積されつつあるが、未だ本症に対する認知度は低い状態である。今回我々は、本邦における家族性地中海熱患者の実態(症例数、臨床像、MEFV 遺伝子異常)を把握するために、全国調査(アンケート調査)を施行した。

B. 研究方法

アンケート調査は、全国の内科系・小児科系病院 1850 科に対し、遺伝子診断で確定した FMF 患者あるいは、臨床的に FMF が疑われる患者の症例数について、郵送にてアンケート用紙を配布した。アンケート内容は以下の通りである。

FMFに関するアンケート

1. 過去10年間(平成8年以降)に、FMFと考えられる患者さんを経験したことがありますでしょうか。
2. 質問1で「はい」とお答え頂いた場合に、MEFV遺伝子の異常が確認された症例はありましたでしょうか。
3. 質問1で「はい」とお答え頂いた場合に、アミロイドーシスを合併した症例はありましたでしょうか。
4. 基礎疾患が不明である反応性AAアミロイドーシスを呈した症例はありましたでしょうか。

(倫理面への配慮)

今回全国調査をするにあたり、アンケート調査内容については、信州大学倫理委員会の審議を受け承認された。

C. 研究結果

1) 全国調査結果

アンケート用紙を送付した 1850 科中、686 科より回答があった(37.1%)。臨床的に FMF が疑わ

れる患者数は 59 例で、MEFV 遺伝子異常が確定している患者数は 53 例であった。FMF に反応性アミロイドーシスを併発している患者は 2 例であった。現在、患者を有する施設に対して、患者の臨床像、遺伝子変異の種類などの二次調査について計画中である。

表 アンケート結果

	内科	小児科	計
送付数	1338	512	1850
回答(率%)	433(32.3)	253(49.4)	686(37.1)
臨床的FMF経験施設	19	12	31
臨床的FMF経験患者数	33	26	59
遺伝子変異確定患者経験施設	10	9	19
遺伝子変異確定患者数	34	19	53
AAアミロイドーシス合併例	2	0	2
原因不明アミロイドーシス患者	29	0	29

2) 当科における診断例

現在当科では、周期性発熱症の患者では積極的に MEFV 遺伝子解析を施行しており、これまでに 13 例の遺伝子異常の確定した FMF 症例を経験している。遺伝子異常は M694I と E148Q の頻度が圧倒的に多く、最も重症型と考えられている M694V は認めていない。

現在までに当科で診断したFMF

性	年齢	発症年齢	遺伝子変異	発熱	胸痛	腹痛	関節痛	頻度	備考
1. F	34	20	E148Q/M694I	+	+	+	+	1-4回/月	月様に同期
2. F	37	28	M694I hetero	+	+	+	-	?	子宮摘出後の頻回発作
3. M	57	?	M694I hetero	+	-	-	-	?	劇痛治癒遅延
4. M	25	20	E148Q homo	+	+	+	+	1回/2-3月	
5. M	23	15	E148Q/M694I	+	+	+	-	1回/月	Behcet病と診断
6. M	24	18	E148Q homo	+	+	+	+	1回/2月	
7. M	15	13	E148Q/M694I	+	+	-	-	1回/月	
8. F	40	14	E148Q/M694I	-	+	-	-	1回/月	月様に同期
9. M	20	12	E148Q/M694I	+	+	+	+	4回/月	
10. M	51	46	E148Q/M694I	+	-	+	+	1回/月	
11. F	37	37	E148Q homo	+	-	-	-	1回/月	
12. M	19	19	E148Q/P369S	+	-	-	-		R408Q、一週間以上の発熱リンパ新種芽
13. M	29	28	E148Q/R202Q	+	-	-	-	1回/月	Behcet病と診断

D. 考察

本邦においても、FMF 患者は多数存在するものと推察され、本邦患者と地中海地方における患者との臨床像の異同や MEFV 遺伝子変異の種類などの異同など、今後明らかにする必要がある。また未治療では、反応性アミロイドーシスを誘発する可能性があり、全国の内科系・小児科系の医師に、本症に対する認知度を更にする必要がある。

E. 結論

FMF は決して稀な病気ではなく、またコルヒチン投与によりアミロイドーシスへの進展を抑制できるので、原因不明の周期性発熱症の患者には、必ず本疾患を疑い検索する必要がある。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
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  
特記事項なし



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

胸部アミロイドーシス SPECT 検査用製剤-  
<sup>99m</sup>Tc-Aprotinin の合成およびイメージング

分担研究者 松田博史 埼玉医科大学病院核医学診療科

共同研究者 今林悦子\*、久慈一英\* 埼玉医科大学病院、\*核医学診療科

**研究要旨** Aprotinin（トラジロール®）を<sup>99m</sup>Tcで標識した核医学製剤による胸部アミロイドーシスの高い診断精度が海外では報告されているが本邦での報告はまだない。今回われわれはすでに作製法が報告されている、<sup>99m</sup>Tc 標識用 KIT を作製し、<sup>99m</sup>Tc-Aprotinin の合成に成功した。標識率と安全性を確認後、分担研究者に投与した。経時的撮像にて従来の報告どおりの分布を確認した。至適撮像時間である投与後 90 分の画像では、心・大血管内への血液プール像や心筋への生理的集積は見られず、胸部や頸部など腹部以外のアミロイド沈着への特異的な集積が期待される結果であった。

**A. 研究目的**

全身アミロイドーシス診断のための核医学製剤の中で、薬剤供給による検査が可能で、特異性がすでに海外で報告されている製剤<sup>(1,2)</sup>である、<sup>99m</sup>Tc-Aprotinin の合成を本邦にて行い、安全性と品質の評価を行い、分担研究者への投与による分布・動態を確認する。なお、副作用については、ヨーロッパで以前、腎皮質の核医学検査用製剤として販売<sup>(3,4)</sup>されていた時の報告によると、1700 人への投与では発現はなかった<sup>(1)</sup>。

**B. 研究方法**

1. 対象

分担研究者

2. 方法

<sup>99m</sup>Tc 標識用 Aprotinin の KIT は、無菌的に合成する必要があるため、ヒトに投与可能な放射性同位元素を用いた薬剤の合成が許可されている PET センターの hot laboratory にて専門薬剤師が作製した。さらに、無菌性を高めるために、作業は laboratory 内に設置したグローブボックス内で行った。合成法<sup>(5)</sup>の概要を下記に記す。

1) 窒素飽和蒸留水による NaOH、リン酸 2 水素ナトリウム、グリシンの溶解液をそれぞれ混和しさらに窒素を吹き込む。

2) テクネピロリン酸キットに窒素飽和水で

希釈した塩酸加え溶解する。

3) 1) と 2)、トラジロール 5 万単位を混合。

4) 無菌ろ過を行い管瓶に分注し、栓をする。

5) エタノールとドライアイスにて急速に凍結し、凍結保存とする。文献的には-20℃にて 6 ヶ月保存可能。

なお、1 バイアルあたりのアプロチニン量は 2272 単位となる。

作製後、pH 測定（pH の文献値：9.3）、エンドトキシン試験、7 日間の無菌試験による品質検定を行い、安全性を確認した。さらに、<sup>99m</sup>Tc の標識率の測定を行い、90%以上の標識率の得られた KIT のみ使用することとした。

使用時は、凍結した KIT を核医学検査室にて常温で融解し、<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub> と混和して標識を行う。今回は、高い標識率が確認されている混和後 25 分後に 740MBq を経静脈的に分担研究者に投与した。90 分後の撮像が至適とされているが、薬剤動態確認のため、10 分、90 分、120 分、180 分、24 時間後に全身前後像を、30 分後と 90 分後に胸部 SPECT 撮像を行った。

（倫理面への配慮）

分担研究者のみを対象とした。

**C. 研究結果**

$^{99m}\text{Tc}$  標識用 Aprotinin の KIT の合成は二回行った。いずれの KIT も、無菌試験、エンドトキシン試験、pH 試験には問題なかった。標識率は1回目に合成した KIT では80%程度と不十分で、使用できなかった。2回目の合成では、窒素飽和水の作製を徹底することと、グローブボックス内の窒素濃度を上昇させることにより、酸素濃度を低下させ KIT 中の Sn の活性を保つようにした。また、さらに凍結を急速に行う工夫をし、2回目の合成では98.75%と高い標識率が得られた。この製剤を分担研究者に投与し、撮像を行った(図1)。10分後の全身像では心血管に血液プール像があり、30分後の胸部 SPECT 画像でも淡く残存していた。90分後の撮像では心への集積は認められず、SPECT 撮像でも胸郭内に異常集積は指摘できなかった(図2)。生理的集積については、肝、脾、腎に10分後より24時間後まで持続する強い集積が認められた。腸管には10分後に血流と思われる集積が認められ、90分後には一度集積が軽減し、その後120分後より再び生理的集積と思われる集積が増強した。骨には淡い集積が持続して認められた。また膝関節部に90分後より淡い集積増加が見られた。

#### D. 考察

1 回目の合成時の標識率不良に対し、2 回目の合成では、KIT 中の Sn の活性が保たれ、標識率が改善したものと考えられる。撮像した画像の経時的変化はすでに報告されている分布、動態と一致するものであり<sup>(6)</sup>、 $^{99m}\text{Tc}$ -Aprotinin の合成に成功したと考えられた。至適撮像時間は静注後 90 分であることも確認された。胸部に関してはこれまでの報告どおり、生理的集積もなく特異性が期待できる結果であった。

#### E. 結論

$^{99m}\text{Tc}$ -Aprotinin 用の KIT は安全に合成、凍結保存が可能であることが確認された。胸部への生理的集積がないことから、文献どおり胸部アミロイドーシスへの特異的な集積が期待される。治療法の進歩が著しい心アミロイドーシスのスクリーニング検査として用いることによって、早期診断が可能となれば、患者予後の改善につながると考えられる。

また、他には頸部(舌、甲状腺)やリンパ節への有用性も報告されており、実験的な報告では<sup>(7)</sup>、insulin、transthyretin、 $\beta$ -amyloid peptid、免疫グロブリン由来のアミロイド繊維に比較的特異的に結合することが確認されている。今後は、関節部を含め腹部以外の多数のアミロイドーシス疾患群での診断について、有用性の確認を行う。

1. Aprile C, Marinone G, Saponaro R, Bonino C, Merlini G. Cardiac and pleuropulmonary AL amyloid imaging with technetium-99m labelled aprotinin. *Eur J Nucl Med* 22:1393-401,1995
2. Schaadt BK, Hendel HW, Gimsing P, Jonsson V, Pedersen H, Hesse B.  $^{99m}\text{Tc}$ -aprotinin scintigraphy in amyloidosis. *J Nucl Med* 44:177-183,2003
3. Bianchi C, Donadio C, Tramonti G, Lorusso P, Bellitto L, Lunghi F.  $^{99m}\text{Tc}$ -aprotinin: a new tracer for kidney morphology and function. *Eur J Nucl Med* 9:257-260,1984
4. Aprile C, Saponaro R, Villa G, Carena M, Lunghi F, Solerte SB, Salvadeo A. Assessment of split renal function with  $^{99m}\text{Tc}$ -aprotinin. *Eur J Nucl Med* 12:37-40, 1986
5. Smyth DR, Tsopelas C. An improved ( $^{99m}\text{Tc}$ -aprotinin kit formulation: quality control analysis of radiotracer stability and cold kit shelf life. *Nucl Med Biol* 32:885-9, 2005
6. Sojan SM, Smyth DR, Tsopelas C, Mudge D, Collins PJ, Chatterton BE. Pharmacokinetics and normal scintigraphic appearance of  $^{99m}\text{Tc}$  aprotinin. *Nucl Med Commun* 26:535-539, 2005
7. Carbo I, Pereira PJB, Damas AM, Saraiva MJ. Aprotinin binding to amyloid fibrils. *Eur J Biochem* 267: 2307-2311, 2000

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

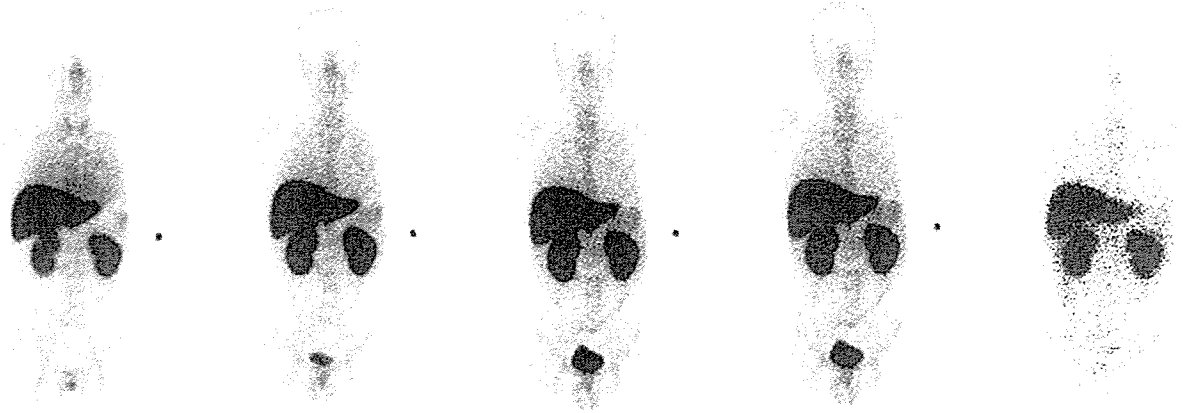
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

図1 全身前面像



a. 10分後

b. 90分後

c. 120分後

d. 180分後

e. 24時間後

図2 胸部 SPECT 冠状断像



a. 30分後

b. 90分後

30分後、心に淡い血液プール像の残存を認める (a 丸囲み)。90分後には消失している (b 丸囲み)。