

種類ものポリフェノールがあり、未知の分子種も少なくない。

そこで、本研究では、アミロイドーシスの中で、脳に限局してアミロイドが沈着するAD、及び脳や骨を除く全身諸臓器にアミロイドが沈着する老化アミロイドーシスを取り上げ、その発症に対するブドウポリフェノールの抑制効果を実験動物で検証することを目的に遂行した。このため、ブドウで最もポリフェノール含有量が多い種子からポリフェノールを抽出し、ADモデルマウスである Tg2576、または老化アミロイドーシスモデルマウスである R1.P1-Apoa2^o に投与して、その酸化、小胞体ストレス抑制効果とアミロイド沈着抑制効果を *in vivo* で解析した。

B. 研究方法

ブドウ種子ポリフェノール(GSE : grape seed extract)の抽出

マスカット・ベリーA(MBA)及び、カベルネ・ソービニオン(CS)の種子 340 g をそれぞれ別々にワンダーブレンダーで粉末化した。その粉末に 50% EtOH を 1.0 L 加え、スターラーを用いて 25°C で 5 時間攪拌抽出をした。吸引ロートを用いてろ過(ADVANTEC 2C)を行い、抽出液と残渣を分けた。残渣に、さらに 50% EtOH を 1.0 L 加えて再度攪拌抽出をした。この操作を計 3 回行った。抽出液を集め脱アルコールのためロータリーエバポレーターを用いて濃縮し(約 3.0 L)、濃縮液にした。この濃縮液を種子 300 g 分と 40 g 分とに分けた。種子 40 g 分の濃縮液は凍結乾燥し、得られた粉末を 50% EtOH 画分とした。また種子 300 g 分の濃縮液に脱脂のため、等量の n-ヘキサンを加え、分液ロートを用いてヘキサン層と水層への分配を計 3 回行った。得られたヘキサン層を集め、濃縮し、ヘキサン画分とした。一方、残りの水層に等量の酢酸エチルを加え、得られた酢酸エチル層を合わせて、濃縮し、酢酸エチルを除去した後、凍結乾燥し、得られた粉末を酢酸エチル画分とした。さらに残った水層を凍結乾燥し、水層画分とした。尚、操作は全て遮光下で行った。

マウスの飼育・管理

マウスは、山梨大学総合分析実験センター動物

実験施設で飼育した。明期と暗期のサイクルは 12 : 12(6~18 時が明期)とした。室内の温度は、22±2°Cである。食餌と飲水は、マウスが自由に摂取できるようにした。週に 1 回、食餌、飲水を交換し、2 週間に 1 回飼育ケージの交換を行った。尚、動物実験は、動物実験専門委員会の承認を得て行った。

使用マウス

AD モデルマウス

アメリカ合衆国の Hsiao 博士から供与された AD モデルマウスである Tg2576 を用いた。このマウスは、スウェーデン型家族性 AD の原因遺伝子であるヒト変異アミロイド前駆体タンパク質 (APP) 遺伝子を、ハムスターのプリオンタンパク質遺伝子プロモーターの働きで、脳内で過剰に発現させたものである。脳内では、8~10 ヶ月齢から大脳皮質、海馬に Aβアミロイドの沈着が見られ、AD と同様に神経突起の変性、シナプスの減少などが見られる。

老化アミロイドーシスモデルマウス

信州大学の樋口京一博士が作製した老化アミロイドーシスモデルマウスである R1.P1-Apoa2^o を用いた。このマウスでは、血漿高密度リポタンパク (HDL) の一種であるアポリポタンパク質 A-II(apoA-II) が脳や骨を除く全身諸臓器に AApoAII アミロイドとして沈着する。微量 (10⁷ μg 以上) の AApoAII アミロイド線維の投与によって、より重篤なアミロイド沈着が惹起される。

マウスへの TCDD、GSE 及び AApoAII アミロイド線維の投与

ダイオキシシン (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin; TCDD)、GSE は、胃ゾンデを用いてマウスに強制経口投与した。マウスに投与する GSE には、MBA の酢酸エチル画分を用いた。GSE は、生理食塩水に懸濁した後、超音波で塊を処理した。TCDD はコーン油に溶解した。AApoAII アミロイド線維の投与は、尾静脈より行った。

投与量及び投与期間

A)投与量決定実験

ヒト *APP* 遺伝子を持たない対照 Tg2576 に TCDD 5 μ g/kg-体重を3日連続で投与した後、TCDD 3回目の投与の翌日を実験開始1日目とし、その日から GSE 25 mg/kg-体重(3日に1回)、または 50 mg/kg-体重(2日に1回)を1ヶ月間強制経口投与した。対照群には、生理食塩水を 10 μ L/g-体重、強制経口投与した。マウスは、各群5匹ずつ用いた。

B)Tg2576

8ヶ月齢の Tg2576 マウスに GSE 40 mg/kg-体重を2日に1回、14ヶ月齢まで6ヶ月間強制経口投与した。対照群には生理食塩水を 10 μ L/g-体重、強制経口投与した。マウスは、生理食塩水投与群5匹、GSE投与群5匹を用いた。

C)R1.P1-*Apoa2*^c

2~8ヶ月齢の R1.P1-*Apoa2*^c に 1 μ g の AApoAII アミロイド線維を投与した後、GSE 40 mg/kg-体重を、2日に1回、または、TCDD 5 μ g/kg-体重を2週間に1回、3日連続で、2ヶ月間、または5ヶ月間、強制経口投与した。対照群には 10 μ L/g-体重の生理食塩水を強制経口投与した。マウスは、2ヶ月間投与では、生理食塩水投与群5匹、GSE投与群7匹、TCDD投与群5匹を用いた。また、5ヶ月間投与では、生理食塩水投与群4匹、GSE投与群6匹、TCDD投与群5匹を用いた。

尿中 8-OHdG(8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン)量測定

1日尿は、夏目製作所製のマウス用メタボリックケージにて採取した。8-OHdG測定には、日本老化制御研究所製の New 8-OHdG Checkを用いた。

過酸化脂質量測定

血漿は腹部大静脈から 23 G の注射針でヘパリン採血を行った後、遠心分離(10000 rpm、10分、4°C)を行い、上清を採取した。測定にはチオバルビツール酸反応法を用いた。

肝臓中 GRP78(78kDa glucose-regulated protein)、

HO-1(heme oxygenase 1)、

CYP1A1(cytochrome P450 family 1 subfamily A

polypeptide 1) mRNA 量測定

肝臓から RNA を抽出した。その後、リアルタイム PCR 法により mRNA 量を解析した。対照ハウスキーピング遺伝子には *Cyclophilin A* を用いた。

免疫染色

未染色標本作製

脳：解剖時に、左脳を摘出後、即座に 4% PFA にて固定し、パラフィン包埋後、厚さ 5 μ m の切片を作成した。

全身：全身諸臓器摘出後、即座に 10% ホルマリンにて固定し、パラフィン包埋後、厚さ 4 μ m の切片を作成した。

染色操作

まず、未染色標本をキシレンに3回、各5分通して脱パラフィンを行い、その後、100%エタノール2回、90%エタノール1回、70%エタノール1回を各5分通して加水処理を行い、水道水で10分洗浄した。続いて、99%ギ酸に3分通し(A β のみ)、水道水で10分洗浄した(A β のみ)。3%過酸化水素水に10分通し、水道水で10分洗浄した。その後、ブロッキング液(5%ヤギ血清、3.8%ブロッカーエース)を切片上に満たし、1時間、室温にて反応させた。反応後、ブロッキング液を排出し、1次抗体液(抗 A β :4G8 1:1,000、抗 ApoAII: anti-ApoAII 1:3,000)を切片上に満たして1晩、4°Cで静置した。1晩反応後、まず、PBSTで3回、各5分洗浄し、切片上に2次抗体液(4G8:ピオチン標識した抗マウス IgG 1:4,000、anti-ApoAII:ピオチン標識した抗ウサギ IgG 1:1,000)を満たし、1時間、室温にて反応させた。反応後、PBSTで3回、各5分洗浄し、Vector社製の Vectastain ABC Elite kit にて、1時間、室温で反応させた。反応後、PBSTで3回、各5分洗浄し、DAB(3,3'-diaminobenzidine,tetrahydrochloride)液で10~15分反応させた。水道水で10分洗浄した後、ヘマトキシリンに1秒通し、水道水で10分洗浄した。その後、脱水のために、70%エタノール1分、80%エタノール1分、90%エタノール1分、100%エタノール1分、100%エタノール2分(各1回)、キシレン2分(3回)の順に通した。その後、

HISTOMOUNTにて封入を行った。

コンゴレッド染色

未染色標本作製

全身諸臓器摘出後、即座に10%ホルマリンにて固定し、パラフィン包埋後、厚さ4 μm の切片を作成し、染色した。

画像解析

脳内のA β アミロイド沈着程度の解析は、ImagePro^R PLUSを用いて行った。舌、肝臓、脾臓、胃、小腸、心臓、皮膚のAApoAIIアミロイド沈着程度の解析は、コンゴレッド染色後、偏光顕微鏡を用い、AApoAIIアミロイド沈着の程度を0~4段階で評価して、全臓器のアミロイド沈着程度の平均をAmyloid Indexとして表した。

統計分析

オーエムエス社製のStatcel2を用いた。酸化、小胞体ストレス程度、アミロイド沈着程度の比較解析にはt検定を用いた。生存率の比較解析にはロングラン検定を用いた。また、スミノルフの棄却検定法を用いて異常値分析を行った。有意水準5%以下の差異を統計的に有意とした。

(倫理面への配慮)

マウスの飼育およびマウスを用いた実験は、山梨大学の動物実験専門委員会の承認を得て行った。動物愛護の観点から倫理的に問題は無いと考えられる。

C. 研究結果

GSEの抽出及び組成

50% EtOHによる抽出ではMBA、CS両品種とも約9~18%のGSEを回収できた。その後の分配で調製した画分では、水層画分で抽出量が最も多かった。両品種の各画分とも酢酸エチル画分のポリフェノール含有率が最も高かった。また、ヘキサソール画分にはポリフェノールがほとんど含まれていなかった。さらに、各画分ともフラボノイドの占める割合がほぼ100%に近かった。

GSEの抗酸化活性

GSEの抗酸化活性の指標としてDPPHラジカル捕捉活性を測定し、各画分のDPPHラジカル捕捉活性(IC₅₀)を比較した。この結果、両品種とも酢酸エチル画分の活性が他の画分に比べて高く、また、純品のトロロックス、L-アスコルビン酸よりも高いことが分かった。

GSEの酸化、小胞体ストレス抑制効果

本実験は、2回に分けて行った。実験1では、GSE 25 mg/kg-体重を3日に1回、1ヶ月間強制経口投与した。実験2では、50 mg/kg-体重を2日に1回、1ヶ月間強制経口投与した。

実験1

尿中8-OHdG量は、GSE 25 mg/kg-体重投与によって、減少傾向が認められた($P < 0.1$)。

実験2

尿中8-OHdG量、血清中過酸化脂質量は、GSE 50 mg/kg-体重投与によって、減少傾向が認められた($P < 0.1$)。さらに、GRP78 mRNA量についてはGSE投与によって、統計的に有意に減少した($P < 0.05$)。

Tg2576を用いたAD発症抑制効果の解析

酸化、小胞体ストレス抑制効果

GSE投与によって、尿中8-OHdG量に有意な変化は認められなかった。血漿中過酸化脂質量は、GSE投与によって、減少傾向が認められた($P < 0.1$)。肝臓中HO-1、GRP78 mRNA量は、GSE投与によって、統計的に有意に減少した($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$)。以上の結果は、GSEがマウスの酸化、小胞体ストレスを抑制する事を示す。

脳内A β アミロイド沈着程度

大脳皮質中Amyloid plaque程度、血管周辺の沈着である大脳皮質中Amyloid angiopathy程度、海馬中のA β アミロイド沈着程度のいずれも未だ低く、GSE投与によって、減少傾向を認めたが、統計的に有意な差異は認められなかった。

R1.P1-Apoa2^cを用いた老化アミロイドーシス発症抑制効果の解析

酸化、小胞体ストレス抑制・惹起効果

5ヶ月間のGSE投与により、8-OHdG量に減少傾向を認めた($P < 0.1$)。一方、HO-1、GRP78 mRNA量は、対照群に比べ、統計的に有意に減少した($P < 0.05$)。TCDD投与群では、過酸化脂質量及びHO-1 mRNA量が、統計的に有意に増加していた($P < 0.05$)。

全身AApoAIIアミロイド沈着程度

生理食塩水投与群を対照として、GSE投与群、及びTCDD投与群と比較した所、AApoAIIアミロイド沈着程度に統計的に有意な差異は認められなかった。

D. 考察

アミロイドーシスの発症には、酸化、小胞体ストレスが関与する事が示唆されている。そこで、GSEの酸化、小胞体ストレスの抑制効果を解析し、これらストレスを抑制するGSE量を検討し、その量をアミロイドーシスモデルマウスに投与する投与量とした。TCDDはごく微量でマウスに酸化ストレスを惹起する事が報告されており、また我々は、TCDD投与によって、小胞体ストレスが惹起される事を見出した。そこで、本実験では、より明確にGSEのストレス抑制効果を検証するため、先ず、マウスに微量(5 μ g/kg-体重)のTCDDを投与して酸化、小胞体ストレスを惹起した後に、GSEを投与し、その酸化、小胞体ストレス抑制効果を解析した。酸化ストレスマーカーとして、尿中8-OHdG量、血清中過酸化脂質量、小胞体ストレスマーカーとして、肝臓中GRP78 mRNA量を測定した。この結果、GSE 25 mg/kg-体重または、50 mg/kg-体重をそれぞれ、3日もしくは2日に1回投与する事でストレスを抑制できる事を見出した。そこで、GSE 40 mg/kg-体重を2日に1回、アミロイドーシスモデルマウスに投与し、アミロイドーシス発症抑制効果を解析した。

ADのモデルマウスであるTg2576は、8~10ヶ月齢から脳内にA β アミロイドの沈着が認められるという報告から、8ヶ月齢から14ヶ月齢までのTg2576に投与を行った。14ヶ月齢のTg2576脳内のA β アミロイド沈着程度は、未だ低く、

GSE投与で減少していたが、統計的に有意な差異は認められなかった。一方、GSE投与によって有意に酸化、小胞体ストレスが抑制される事が見出された。Tg2576へのクルクミンや赤ワインの投与により、脳内A β アミロイド沈着程度が減少するという報告や、ブドウ種子にも多く含まれているフラボノイド型のポリフェノールが血液脳関門を通過するという報告がある。このため、もう少し長期間、すなわち、十分に脳内にA β アミロイドが沈着する月齢まで、GSEを継続して投与することにし、現在、実験を継続中である。

老化アミロイドーシスモデルマウスであるR1.P1-*Apoa2*^cはAApoAIIアミロイド線維(アミロイド核)の投与により、AApoAIIアミロイド伸張反応が促進され、全身緒臓器に沈着する。そこで、マウスにAApoAIIアミロイド線維を静注した後に、GSE、またはTCDDを2ヶ月間、または、5ヶ月間投与し、その効果を解析した。全身(舌、肝臓、脾臓、胃、小腸、心臓、皮膚)のAApoAIIアミロイド沈着程度については、先ず、2ヶ月間投与後解析した所、生理食塩水投与群と比較して、GSE投与群、TCDD投与群共に統計的に有意な差異を認めなかったため、投与を5ヶ月間まで継続した。しかし、5ヶ月間投与したマウスにおいても、生理食塩水投与群と比較して、GSE投与群、TCDD投与群共に統計的に有意な差異を認めなかった。GSE、またはTCDD投与による生体への酸化、小胞体ストレス抑制または惹起効果を認めたことから、*in vivo*では、アミロイド線維の伸長に、酸化、小胞体ストレスは関与しない事、GSE、TCDDは、R1.P1-*Apoa2*^cでのAApoAIIアミロイド沈着程度に影響しない事が示唆された。一方、本実験系では、AApoAIIアミロイド線維核を投与して、アミロイド線維の伸張反応を促進した。そこで今後は、アミロイド線維核を投与しない実験系で、アミロイド線維核形成に対するGSE、TCDDの影響を検討したい。

E. 結論

GSE及びTCDDは、疾患モデルマウスでの酸化、小胞体ストレス程度に影響したが、アミロイド沈着程度には統計的に有意な影響を与えなかった。今後、ADでは、さらに長期間の観察が必

要である。老化アミロイドーシスでは、アミロイド線維核形成に対するこれら因子の影響を、アミロイド線維核を投与しない実験系で解析することが必要と考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Wati H, Kawarabayashi T, Matsubara E, Kasai A, Hirasawa T, Kubota T, Harigaya Y, Shoji M, Maeda S: Transthyretin accelerates vascular A β deposition in a mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Pathology*, 2008 *in press*.

2)前田秀一郎：遺伝性アミロイドーシス。「図説分子病態学 4 版」一瀬白帝、鈴木宏治編著、中外医学社、2008 年（印刷中）

2. 学会発表

1)川上佳紀、竹本恵子、久本雅嗣、奥田徹、樋口京一、前田秀一郎：ブドウ種子由来ポリフェノールのアミロイドーシス発症抑制効果の解析。第 30 回日本分子生物学会年会、横浜、2007.12.

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

分担研究者 工藤幸司 東北大学先進医工学研究機構高度情報通信分野

共同研究者 森雅憲^{***}、岡村信行^{**}、谷内一彦^{**}、古本祥三^{*}、樋口真人^{***}、星井嘉信^{****}、
 石原得博^{****}、山田正仁^{*****}

東北大学先進医工学研究機構・高度情報通信分野^{*}、東北大学医学系研究科・機能薬理学分野^{**}、放射線医学総合研究所分子イメージング研究センター分子生態研究チーム^{***}、山口大学医学部構造制御病態学講座(病理学第一講座)^{****}、金沢大学大学院脳老化・神経病態学(神経内科学)^{*****}

研究要旨 脾臓にアミロイドが蓄積するモデルマウスを用い、^[11C]BF-227 静脈内投与後の *in vivo* micro PET 画像および *ex vivo* オートラジオグラフィを観察した結果、両試験において^[11C]BF-227 はモデルマウス脾臓に高い集積を示すことが確かめられた。これまでの成果を踏まえて、アミロイドーシス診断における^[11C]BF-227 の有用性を検証するための探索的臨床研究実施課題を東北大学倫理委員会へ申請し承認されたことから、来年度以降は同課題を実施する予定である。

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。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プローブBF-227のアミロイドーシス診断への応用を最終目的として、本年度は脾臓にアミロイドが蓄積するモデルマウスを用い、^[11C]BF-227 静脈内投与後の *in vivo* micro PET 画像撮影および *ex vivo* オートラジオグラフィを観察した。また、併せてヒトアミロイドーシス診断における^[11C]BF-227 の有用性を検証する探索的臨床研究実施のため、課題名「アミロイドーシス患者におけるアミロイド蓄積の非侵襲的 PET 計測」を東北大学倫理委員会へ申請した。

B. 研究方法

1. アミロイドーシスモデルマウスにおける^[11C]BF-227 の *in vivo* micro PET 画像撮影および *ex vivo* オートラジオグラフィ
 実験開始時7週齢の雄性 C57BL/6J マウスを用

い、Freund's complete adjuvant を2週間間隔で2回皮下投与して作製したアミロイドーシスモデルを28週齢で試験に供した。約18.5MBq/100μLの^[11C]BF-227 をアミロイドーシスおよびコントロールマウスに、それぞれ150および200μLずつ静脈内投与し、*in vivo* PET 画像はイソフルラン吸入麻酔下に micro PET(Focus 220 animal scanner, Siemens Medical Solutions, USA)を用いて投与直後から30分間撮影し、また *ex vivo* オートラジオグラフィは^[11C]BF-227 投与30分後に断頭し、クリオスタット(Microm HM-550)にて作製した凍結切片をイメージングプレートに1時間コンタクトした後BAS5000(フジフィルム)にて解析した。

なお、動物モデル作製は東北大学にて、PET 画像撮影および *ex vivo* オートラジオグラフィは放射線医学総合研究所にて実施した。

2. 倫理委員会への申請

ヒトアミロイドーシス診断における^[11C]BF-227 の有用性を検証する探索的臨床研究実施のため、課題名「アミロイドーシス患者におけるアミロイド蓄積の非侵襲的PET計測」を2007

年12月20日東北大学倫理委員会へ申請した。

(倫理面への配慮)

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(S63.3.24)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. アミロイドーシスモデルマウスにおける¹¹C]BF-227のin vivo micro PET画像撮影およびex vivoオートラジオグラフィ

図1にmicro PETを用いたアミロイドモデルマウスにおける¹¹C]BF-227静脈内投与後のin vivoイメージング画像を示した。本試験に用いたモデルマウスにおいては脾臓にアミロイドが蓄積することが知られているが、同モデルマウス脾臓における¹¹C]BF-227の集積度は、コントロールマウス脾臓におけるそれに比し、明らかに高かった。

図2にアミロイドモデルマウスにおける¹¹C]BF-227静脈内投与30分後のex vivoオートラジオグラフィ画像を示した。アミロイドーシスモデルマウス脾臓における¹¹C]BF-227の集積度は、コントロールマウス脾臓におけるそれに比し、明らかに高かった。

2. 倫理委員会への申請

2008年1月21日に開催された東北大学倫理委員会ヒアリングにおいて、課題名「アミロイドーシス患者におけるアミロイド蓄積の非侵襲的PET計測」を実施することが承認された。

D. 考察

脾臓にアミロイドが蓄積するモデルマウスを用い、¹¹C]BF-227静脈内投与後のin vivo micro PET画像およびex vivoオートラジオグラフィを観察した結果、両試験において¹¹C]BF-227はモデルマウス脾臓に高い集積を示すことが確かめられた。

これまでの試験において非標識および¹¹C]標識BF-227はヒトアミロイドーシス標本およびアミロイドーシスモデルマウスにおいて、特異的選択的にアミロイド蛋白に結合することを報告し

てきたが、本年度のin vivo micro PETおよびex vivoオートラジオグラフィの成績は、さらにこれまでの報告を支持する結果であった。

これらを踏まえて、¹¹C]BF-227の有用性を検証するための探索的臨床研究実施課題を東北大学倫理委員会へ申請し承認されたことから、来年度以降は同課題を実施する予定である。

E. 結論

脾臓にアミロイドが蓄積するモデルマウスを用い、¹¹C]BF-227静脈内投与後のin vivo micro PET画像およびex vivoオートラジオグラフィを観察した結果、両試験において¹¹C]BF-227は脾臓に高い集積を示すことが確かめられた。これまでの成果を踏まえて、アミロイドーシス診断における¹¹C]BF-227の有用性を検証するための探索的臨床研究実施課題を東北大学倫理委員会へ申請し承認されたことから、来年度以降は同課題を実施する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1)Kudo Y, Okamura N, Furumoto S, Tashiro M, Furukawa K, Maruyama M, Itoh M, Iwata R, Yanai K, Arai H: 2-(2-[2-Dimethylamino- thiazol -5-yl] ethenyl) -6-(2- [fluoro]ethoxy) benzoxazole: A novel PET agent for in vivo detection of dense amyloid plaques in Alzheimer's disease patients. *J Nucl Med* 48:553-561, 2007.

2)Furumoto S, Okamura N, Iwata R, Yanai K, Arai H, Kudo Y:Recent advances in the development of amyloid imaging agents. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 7:1773-1789, 2007.

3)Okamura N, Furumoto S, Funaki Y, Suemoto T, Kato M, Ishikawa Y, Ito S, Akatsu H, Yamamoto T, Sawada S, Arai H, Kudo Y, Yanai K: Binding and safety profile of novel benzoxazole derivative for in vivo imaging of amyloid deposits in Alzheimer's disease. *Japan Geriatrics Society* 7: 393-400, 2007.

4)工藤幸司、古本祥三、岡村信行：アミロイドイ

イメージング「アミロイド画像化用プローブ」.日本臨床 66Suppl 1:300-306, 2008.

5)岡村信行、谷内一彦、古川勝敏、荒井啓行、工藤幸司: アミロイドイメージング「PET」.日本臨床.66Suppl 1:288-292, 2008.

6)岡村信行、古本祥三、工藤幸司、谷内一彦:脳分子イメージング「アルツハイマー病」.日本臨床 65:320-326, 2007.

7)岡村信行、谷内一彦、工藤幸司:アミロイドイメージングの進歩. *Dementia Japan* 20: 216-225, 2007.

8)荒井啓行、工藤幸司:病理像を画像化する分子神経イメージング法による Alzheimer 病の早期診断 -日本での BF-227 の開発と臨床応用. *医学のあゆみ*. 220:404-408, 2007.

9)工藤幸司、古本祥三、岡村信行:アミロイド イメージングによるアルツハイマー病の診断.小川誠司、上野照剛 編集. *In* “非侵襲・可視化技術ハンドブック”.NTS 社 東京 562-56, 2007.

10)古本祥三、岡村信行、工藤幸司:アミロイドイメージングによるアルツハイマー病の早期診断.伊藤正敏 編集. *In* “臨床医のためのクリニカル PET—病期・病態診断のためのガイドブック—”.先端医療技術研究所 東京 205-210, 2007.

2. 学会発表

1)岡村信行、工藤幸司、荒井啓行、谷内一彦:アミロイド斑の生体イメージング、第 80 回 日本薬理学会年会、名古屋国際会議場、3月14日-16日、2007年.

2)伊藤啓、岡村信行、加藤元久、古本祥三、赤津裕康、山本孝之、荒井啓行、工藤幸司、谷内一彦:アルツハイマー病脳内のアミロイドを検出する 18F 標識新規 PET プローブ、第 80 回 日本薬理学会年会、名古屋国際会議場、3月14日-16日、2007年.

3)藤川陽介、岡村信行、古本祥三、星井嘉信、石原得博、山田正仁、工藤幸司、谷内一彦:アミロイドベータのリガンドである BF-227 による新たなアミロイドーシス探索法、第 80 回 日本薬理学会年会、名古屋国際会議場、3月14日-16日、2007年.

4)古本 祥三、渋間祐太郎、石川洋一、工藤幸司、岩田錬:生体 MMP_2 イメージングを目的とした フッ素 18 標識 MMP2 阻害剤の開発、日本薬学会 第 127 年会、富山国際会議場、3月28日-30日、2007年.

5)森雅憲、岡村信行、古本祥三、工藤幸司、谷内一彦:近赤外線蛍光イメージングによる脳内アミロイドの非侵襲的検出、第 58 回日本薬理学会北支部会、北海道大学学術交流会館、9月29日、2007年.

6)谷内一彦、岡村信行、工藤幸司、荒井啓行: [¹¹C]BF-227 を用いたアルツハイマー病におけるアミロイド斑の分子イメージング、第 50 回日本神経化学会、パシフィコ横浜、9月10日、2007年.

7)Okamura N, Kudo Y, Furumoto S, Furukawa K, Tashiro M, Kato M, Funaki Y, Yanai K, Arai H: Noninvasive detection of amyloid deposits in the patients with Alzheimer's disease using [¹¹C]BF-227 PET、第 26 回認知症学会学術集会・第 13 回国際老年精神医学会、大阪国際会議場、10月14日-18日、2007年.

8)古本祥三、渋間祐太郎、金田朋洋、石川洋一、工藤幸司、岩田錬:マトリックスメタロプロテアーゼ-2 のイメージングを目指した PET 用標識薬剤の開発、第 47 回日本核医学会核術総会、仙台国際センター、11月4日-6日、2007年.

9)岡村信行、谷内一彦、古本祥三、工藤幸司: [¹¹C]BF-227PET を用いた脳アミロイド斑の画像化、第 47 回日本核医学会核術総会、仙台国際センター、11月4日-6日、2007年.

10)古本祥三、本田芳雄、堀勝義、石川洋一、工藤幸司、岩田錬:血管標的薬剤 AVE8062 による誘発される腫瘍低酸素状態の評価、第 47 回日本核医学会核術総会、仙台国際センター、11月4日-6日、2007年.

11)田代学、岡村信行、熊谷和明、古本祥三、船木善仁、木村雄一、石渡喜一、岩田錬 工藤幸司、荒井啓行、谷内一彦: [¹¹C]BF-227PET を用いた脳内アミロイド蓄積に関する定量的検討、第 47 回日本核医学会核術総会、仙台国際センター、11月4日-6日、2007年.

12)Arai H, Okamura N, Tashiro M, Yanai K, Kudo Y: In Vivo Detection of Amyloid Deposits in

Normals, Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease Patients Using [11C]BF-227 and PET, Human Amyloid Imaging • Boston 2007, Boston Back Bay Hilton Hotel, 5月4日, 2007年.

13) Okamura N, Kudo Y, Furumoto S, Tashiro M, Furukawa K, Funaki Y, Kato M, Ito S, Ishikawa Y, Maruyama M, Arai H, Fukuda H, Iwata R, Itoh M, Yanai K: In vitro detection of amyloid deposits in Alzheimer's disease using [11C]BF-227 PET, Brain'07 & BrainPET'07, 大阪国際コンベンションセンター, 5月20日-24日, 2007年.

14) Tashiro M, Kumagai K, Okamura N, Furumoto S, Furukawa K, Funaki Y, Maruyama M, Kimura Y, Itoh M, Iwata R, Kudo Y, Arai H,

Yanai K: Quantitative analysis of detection of amyloid deposition in human brain using PET and a new imaging probe [11C]BF-227, Brain'07 & BrainPET'07, 大阪国際コンベンションセンター, 5月20日~24日, 2007年.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
下記参照
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

特許出願状況

	出願/登録の別	出願番号	発明の名称	出願日	出願人	発明者
1	未登録	PCT/JP2007/063350	ベンゾキサゾール誘導体	平成 19 年 7 月 4 日	東北大学	工藤幸司 古本祥三 岡村信行
2	未登録	特願 2007-176366	フッ素およびヒドロキシ基で置換されたアルコキシ基を有する PET プローブ	平成 19 年 7 月 4 日	東北大学	工藤幸司 古本祥三 岡村信行

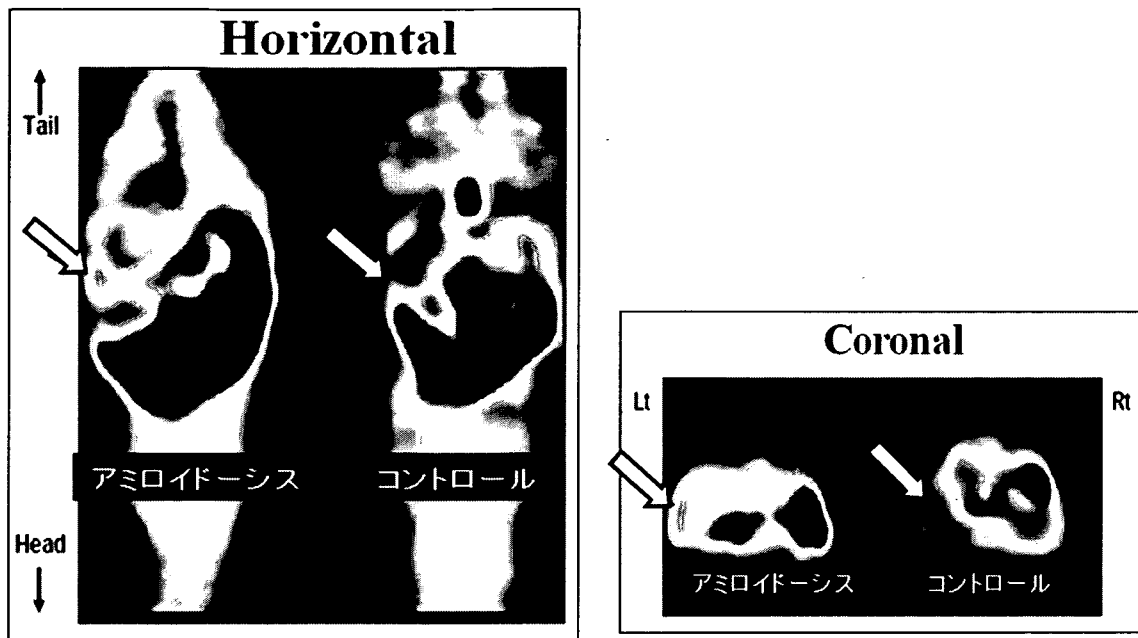


図 1、脾臓にアミロイド蛋白が蓄積するモデルマウスにおける $[^{11}\text{C}]\text{BF-227}$ の *in vivo* micro PET 画像 ($[^{11}\text{C}]\text{BF-227}$ 静脈内投与直後から 30 分後までの加算画像) 白抜き矢印は脾臓を示す。
 左は水平 (Horizontal) 断層画像、 Tai:尾側、 Head: 頭側、
 右は冠状 (Coronal) 断層画像、 Lt:左、 Rt: 右
 静脈内投与された $[^{11}\text{C}]\text{BF-227}$ はアミロイド蛋白が蓄積している脾臓に集積することが *in vivo* において確かめられた。

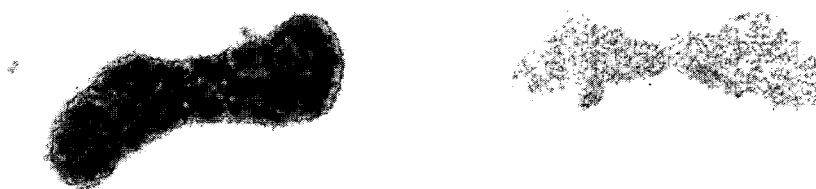


図 2. 脾臓にアミロイド蛋白が蓄積するモデルマウスにおける $[^{11}\text{C}]\text{BF-227}$ の *ex vivo* オートラジオグラフィ ($[^{11}\text{C}]\text{BF-227}$ 静脈内投与 30 分後)
 左: アミロイドーシスモデルマウス脾臓、 右: コントロールマウス脾臓

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

大腿の陳旧性血腫様病変に伴うアミロイドーシス

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 星井嘉信*、伊東和恵*、崔丹*、河野裕夫*、平田健**

*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

**光市立光総合病院外科

研究要旨 大腿の陳旧性血腫様病変に伴うアミロイドーシスは、これまで文献的報告がほとんどなされておらず、その特徴、性状は十分解析されていない。今回我々が経験した症例は 62 歳、男性で、左大腿皮下に厚い線維性被膜を有する嚢胞状病変が存在し、外科的に摘出された。線維性被膜部分にはコンゴレッドで濃染するアミロイド沈着がみられ、内部に存在した粥状物質も広範囲にコンゴレッド弱陽性であった。また病変内には孤在性あるいは集簇性にコンゴレッド陽性の組織球がみられた。本症例を含めて 2001 年以降に我々が経験した 7 例の類似症例は、いずれも男性で平均年齢 62.4 歳であり、免疫組織化学的にアミロイドのタイプを同定しえなかった。大腿の陳旧性血腫様病変に伴うアミロイドーシスは比較的多量にアミロイド沈着があるにもかかわらず、これまで気づかれていなかった可能性がある。

A. 研究目的

大腿の陳旧性血腫様病変に伴うアミロイドーシスは、これまで文献的報告がほとんどなされておらず、その特徴、性状は十分解析されていない。我々の施設では他施設からのコンサルテーション例を含めて 2001 年以降 7 例の大腿の陳旧性血腫様病変に伴うアミロイドーシスを経験している。今回は本年度経験した症例を中心に、その病理学的特徴について報告する。

B. 研究方法

本年度経験した症例は 62 歳、男性。以前より左大腿に皮下腫瘤を認めていた。病変の発症時期は患者が記憶しておらず、不明である。透析歴はなく、全身性アミロイドーシスを疑わせる症状は特になかった。術前的大腿部 CT では、左大腿部外側皮下に径約 4cm 程度の腫瘤がみられ、辺縁は平滑、内部は均一であった。軟部腫瘍あるいは陳旧性血腫が疑われ、外科的に切除された。腫瘤は肉眼的に厚い線維性被膜を有し、嚢胞状で、内部に粥状物質を入れていた。

術前臨床検査データ(異常値のみ): A/G 比 2.2 (1.3-2.0), LDH 222(106-211), AST(GOT) 34(12-33),

Glu 166(70-110), BUN 20.5(8.0-20.0), TGL 164(40-150), Plt 14.3(15.0-40.0), PT 9.7(10.0-12.0)。

まず摘出された組織よりホルマリン固定パラフィン切片を作製し、通常の病理組織学的検討を行った。線維性被膜部分に好酸性硝子様物質の沈着を認めたため、コンゴレッド染色を行い、アミロイドであることが確定した後、抗 L 鎖定常領域抗体、抗 AA 抗体、抗トランスサイレチン(TTR)115-124 抗体、抗 $\beta 2$ ミクログロブリン抗体を一次抗体とする免疫組織化学的検討を行った。またホルマリン固定組織を細切後、エポン包埋超薄切片を作製し、透過型電子顕微鏡にて観察を行った。

(倫理面への配慮)

個人が特定されることのないよう配慮した。

C. 研究結果

組織学的に、腫瘤の線維性被膜部分は硝子化した結合織よりなっており、HE染色では大小不規則な形状分布で好酸性物質の沈着がみられた。この沈着物はコンゴレッド染色で濃染し、アミロイドであることが証明された(図1a)。嚢胞内部の粥状

物質も、コンゴレッド染色で広範囲に弱陽性となった。また病変内に、細胞質が顆粒状でコンゴレッド陽性の組織球が孤在性あるいは集簇性に存在した(図2a)。

免疫組織化学的に本症例のアミロイドは部分的に抗TTR115-124で陽性となったが(図1b)、アミロイドの大部分は抗L鎖定常領域抗体、抗AA抗体、抗TTR115-124抗体、抗 β 2ミクログロブリン抗体で染まらなかった。

ホルマリン固定標本から作製した透過電顕標本では、細胞外にアミロイド線維の沈着がみられると共に、コンゴレッド染色陽性であった組織球については細胞質内に小型球状物質が充満しており、球状物質間にはアミロイドと考えられる細線維が存在していた(図2b)。

D. 考察

表1に2001年以降経験した7例の大腿の陳旧性血腫様病変に伴うアミロイドーシスを示す。年齢は50歳から85歳、平均62.4歳であり、いずれも男性で、一人を除いて左大腿に病変が存在した。形態学的にはいずれも嚢胞状部分を有する病変で、免疫組織化学的にアミロイドがある抗体で部分的に染まる例は存在したが、アミロイド全体がなんらかの抗体で染まる例はなく、いずれもアミロイドのタイプは同定しえなかった。

7例の病変の本体については chronic expanding hematoma あるいは ancient hematoma とよばれる陳旧性血腫様病変が示唆されるが、この陳旧性血腫様病変に伴うアミロイド沈着に関する英文の文献的報告は、Matsuba らによって報告された、表1の7例中に含まれる1例のみではないかと思われる。また他の1例については内村らにより日本語にて症例報告されており、いずれも限局性アミロイドと推定されている。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(病理学第一講座)の関連施設のみで2001年以降4例を経験しており、本病変には比較的多量にアミロイド沈着があるにもかかわらず、これまで気づかれていなかった可能性がある。今後このような病変をみた場合には、コンゴレッド染色を行い、アミロイド沈着の有無を確認する必要があると考える。

本年度経験した症例は、アミロイドが部分的にTTR115-124で陽性となったが、この抗TTR115-124はATTRアミロイドとは良好に反応し、血清成分との反応が弱いという特徴を有しており、単にアミロイドへの血清成分のしみこみを検出したものではないことが示唆される。しかしながら通常ATTRアミロイドでは抗TTR115-124でアミロイドほぼ全体が良好に染色されるので、本症例のアミロイドの主体がATTRアミロイドであるとは考えにくい。

また本年度経験した症例では、細胞質がコンゴレッド陽性の組織球が孤在性あるいは集簇性に病変内に存在し、電顕的に細胞質内にアミロイドと考えられる細線維がみられた。このアミロイドが細胞質内で形成されたものか、細胞外のアミロイドが貪食されたものかについては、組織が電顕用に固定されたものではなく、固定状態があまりよくないこともあり、今回の検討では不明であった。なおこのコンゴレッド陽性の組織球は本症例以外にも存在した。

E. 結論

大腿の陳旧性血腫様病変に伴うアミロイドーシス7例について、本年度経験した症例を中心に報告した。dystrophicな限局性アミロイドーシスが疑われるが、アミロイドのタイプは現在のところ同定しえていない。今後このような病変をみた場合には、コンゴレッド染色を行い、アミロイド沈着の有無を確認する必要があると考える。

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

表1. 2001年以降経験した7症例の大腿の陳旧性血腫様病変に伴うアミロイドーシス

	年齢	性別	部位	IHC(λ,κ,AA,TTR,β2M)
1	62	男性	左大腿	TTR#: 一部弱陽性
2	66	男性	右大腿	κ,TTR*,β2M: 一部弱陽性
3	53	男性	左大腿	κ,TTR*,β2M: 微
4	71	男性	左大腿	TTR*: 一部弱陽性
5	50	男性	左大腿	TTR#: ごく一部弱陽性
6	85	男性	左大腿	いずれも陰性
7	50	男性	左大腿	κ,TTR#: 微
平均	62.4			TTR#: TTR115-124, TTR*: DAKO TTR

1: 本年度経験した症例

図1. 線維性被膜部分に沈着したアミロイド

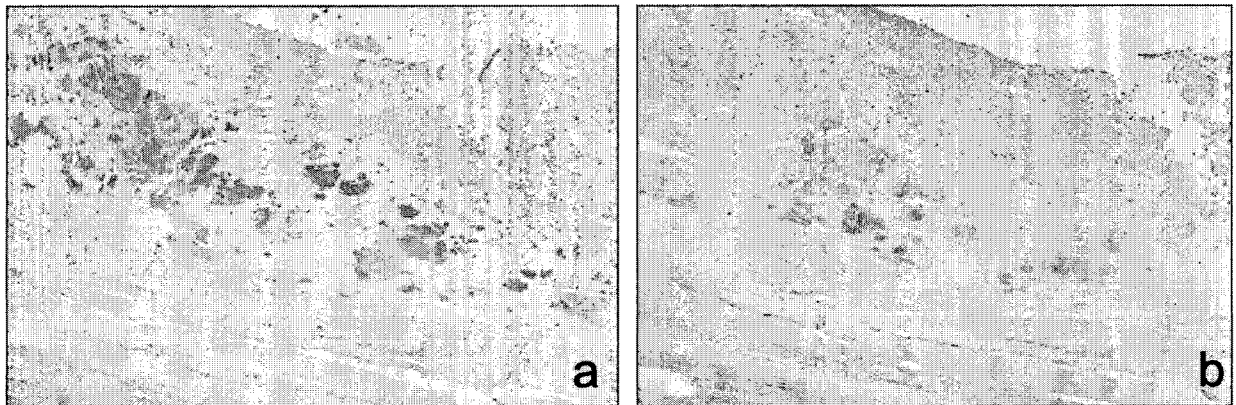
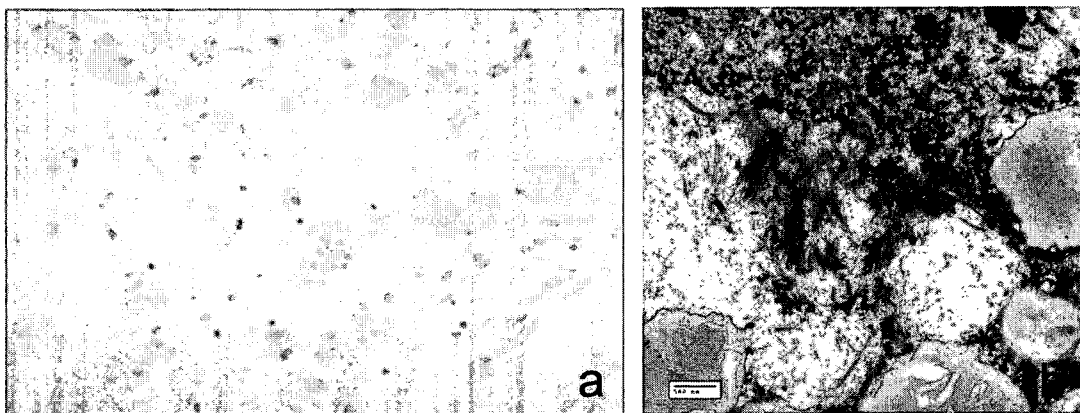


図2. コンゴレッド陽性の組織球



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

我が国における家族性アミロイドーシスの疫学 - 新規集積地の同定とその臨床的特徴 -

分担研究者 山田正仁 金沢大学大学院脳老化・神経病態学 (神経内科)

共同研究者 本崎裕子*、小野賢二郎*、島啓介*、森永章義*、町谷知彦*、**、野崎一朗*、
 浜口歩*、柳瀬大亮*、**、石田千穂*、坂尻顕一***

*金沢大学大学院脳老化・神経病態学 (神経内科)、

公立能登総合病院、*石川県立中央病院

研究要旨 我々は、臨床調査個人票に基づき、アミロイドーシスの疫学について調査した。その結果、家族性アミロイドーシスの県別有病率は、2003-2005 年を通じ、常に長野県(11-15.5 : 人口 100 万対)、熊本県(10.1-10.3)、石川県(3.5-4.2)の順に高く、石川県は、長野県、熊本県に次ぐ家族性アミロイドーシスの集積地であると考えられた。このことから、石川県における家族性アミロイドーシスについて調査した結果、11 家系 28 例のトランスサイレチン(TTR)型家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)を認め、そのうち 10 家系 26 例で Val30Met 変異を認めた。石川県における TTR 型 FAP Val30Met 変異例は、高齢発症で、家族歴を高率に認める点が特徴と考えられ、日本における他の集積地 (長野県、熊本県) や、非集積地の臨床的特徴のいずれとも異なった。我が国の TTR 型 FAP Val30Met 変異には、(i) early-onset and endemic type (長野・熊本県)、(ii) late-onset and endemic type (石川県)、(iii) non-endemic type の 3 病型が存在する。

A. 研究目的

我々は、平成 18 年度のアミロイドーシスに関する調査研究班合同研究報告会において、臨床調査個人票に基づくアミロイドーシスの疫学について調査し報告した。そのデータに基づき、家族性アミロイドーシスの新規集積地を同定し、その臨床的特徴を明らかにする。

B. 研究方法

I. 家族性アミロイドーシスの全国及び都道府県別有病率

厚生労働省から使用の許可を得て入手した 2003-2005 年度のアミロイドーシス臨床調査個人票データ及び公表された特定疾患受給者証交付数を用いた。全国及び都道府県別の家族性アミロイドーシスによる特定疾患受給者数を算出後、臨床調査個人票入手率にて補正し、全国及び都道府県別有病率を算出した。

II. 石川県における家族性アミロイドーシスの臨

床的特徴

I の結果、石川県が長野県、熊本県に次ぐ家族性アミロイドーシスの集積地と同定された。このため、石川県における家族性アミロイドーシス患者、すなわち 2000 年以降に当院にて遺伝子検査を行った家族性アミロイドーシス患者及び文献報告例の臨床的特徴について調査した。

(倫理面への配慮)

本研究で使用する臨床調査個人票のデータは匿名化されており個人を識別するデータはない。

C. 研究結果

I. 家族性アミロイドーシスの全国及び都道府県別有病率

2003-2005 年度における全国の家族性アミロイドーシスの有病率は 0.87-1.1(人口 100 万対)であった。県別有病率 (人口 100 万対) は、

2003-2005年を通じて、常に長野県(11-15.5)、熊本県(10.1-10.3)、石川県(3.5-4.2)の順に高かった。

II. 当院にて遺伝子検査をされた9家系20例、文献報告例2家系8例、計11家系28例の家族性アミロイドーシスを調査した。すべてトランスサイレチン(TTR)アミロイドーシスで、ポリニューロパチーを呈した(TTR型FAP)。変異はVal30Met変異10家系26例、Leu58Arg変異1家系2例であった。Val30Met変異例は、男女比1.2:1、家族歴を有する率70.0%、平均発症年齢62.9歳であった。同一のN市出身家系を5家系認めた。また、ホモ接合体を有する症例が4例存在した。臨床症状では、神経障害については、多発ニューロパチー61.5%、自律神経障害64.5%、多発単ニューロパチー3.8%（重複例あり）を認め、他の臓器障害では心障害46.2%、硝子体混濁7.7%、甲状腺機能低下3.8%（重複例あり）を認めた。死亡例7例で、平均経過年数は8.4年、主な死因は心不全42.9%、気管支肺炎14.3%であった。

D. 考察

石川県は、家族性アミロイドーシスの県別有病率が、2003-2005年を通じ、長野県、熊本県に次いで第三位であり、新規の家族性アミロイドーシス集積地と考えられた。

石川県におけるTTR型FAP Val30Met変異例は、高齢発症で、家族歴を高率に認める点が特徴と考えられた。これは、日本における他の集積地（長野県、熊本県）の臨床的特徴（若年発症、家族歴が高率、重篤な臨床症状）や、非集積地の臨床的特徴（高齢発症、家族歴が低率、比較的軽い臨床症状）のいずれとも異なる。海外の集積地と比較すると、スウェーデンにおけるTTR型FAPの臨床的特徴と類似している。今回の調査では、発症年齢の明らかな親子症例が乏しく、促進現象の有無は明らかではなかったが、石川県においても促進現象が存在すると仮定すると、今後、世代を経た後、若年発症例が増加し、長野県、熊本県と同様の臨床的特徴を有するようになる可能性が考えられる。それに対し、現在の集積地は、症例が若年化するに従い、子孫が減少し、消滅していく可能性がある。このことから、非集積地の高

齢発症例が集積した後、石川県のような高齢発症の集積地を形成し、その後若年化し、消滅していくという仮説が考えられる。

また、TTR Leu58Arg変異家系内では、手根管症候群から発症し眼症状を呈した例と、運動神経障害から発症したポリニューロパチー症例を認め、異なった表現型を呈した。ポリニューロパチー例の剖検で、全身諸臓器、特に心臓、硬膜、末梢神経に著明なTTRアミロイドの沈着を認めた。

E. 結論

石川県は、家族性アミロイドーシス(TTR型FAP)の新規集積地と考えられた。我が国のTTR Val30Met変異を伴うFAPには、(i) early-onset and endemic type (長野・熊本県)、(ii) late-onset and endemic type (石川県)、(iii) non-endemic typeの3病型が存在する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Motozaki Y, Sugiyama Y, Ishida C, Komai K, Matsubara S, Yamada M: Phenotypic heterogeneity in a family with FAP due to a TTR Leu58Arg mutation: a clinicopathologic study. *J Neurol Sci* 15:236-239, 2007.

2) 山田正仁：原発性（AL）アミロイドーシスに伴うニューロパチーをどう治療するか。岡本幸市、棚橋紀夫、水澤英洋（編）EBM 神経疾患の治療 2007-2008. 中外医学社、東京、pp360-364, 2007.

2. 学会発表

1) 本崎裕子：臨床調査個人票に基づくアミロイドーシスの疫学調査。第48回日本神経学会総会、愛知、2007.5.18.

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)
 アミロイドーシスに関する調査研究班 分担研究報告書

FAP 患者における腹壁および胃アミロイドの 野生型：変異型 TTR の年齢別比率の検討

分担研究者 池田修一 信州大学医学部脳神経内科、リウマチ・膠原病内科
 共同研究者 土屋彩子*、矢崎正英*、亀谷富由樹**、武井洋一*、関島良樹*
 *信州大学医学部内科 (脳神経内科、リウマチ・膠原病内科)、
 **東京都精神医学総合研究所

研究要旨 未治療の Val30Met 型家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)患者 44 名の腹壁脂肪吸引生検と 13 名の胃生検について、Congo red 染色で組織学的にアミロイド沈着を確認後、アミロイド線維蛋白を抽出し、質量分析計(LC-MS/MS)により野生型トランスサイレチン(TTR)(V30)と変異型 TTR(M30)の構成比を検索した。さらに、野生型 TTR の比率について、生検時の年齢との関係、臓器間での違いについて検討した。生検時年齢が高くなるにしたがって、腹壁脂肪では野生型 TTR の比率が高くなる傾向がみられた。臨床症状が大きく異なることが報告されている 50 歳前後で比較すると、有意差を持って 50 歳以上の群で野生型 TTR の比率が高かった。胃では年齢による一定の傾向は得られなかったが、腹壁脂肪に比し野生型 TTR の比率は少ない傾向にあった。FAP 患者のアミロイド沈着には、変異型 TTR に加えて野生型 TTR も関与している。アミロイド形成における野生型 TTR の関与は、臓器によって異なる可能性があり、どのようなファクターが関わっているか検討していく必要がある。

A. 研究目的

Systemic senile amyloidosis (SSA)では、加齢とともに変異型 TTR がアミロイド線維を形成していくことが知られている。一方、変異型 TTR によって起こる FAP において、我々は加齢とともに野生型 TTR の関与が大きくなっていく可能性について、昨年度報告したが、他臓器での検討は不十分であった。今回我々は、Val30Met 型 FAP 患者の腹壁脂肪および胃の沈着アミロイドにおける、野生型 TTR の関与について、年齢との関係や臓器間での違いについて検討した。

B. 研究方法

対象は、肝移植や diflunisal 内服など、FAP に対する直接的な治療を行っていない、Val30Met 型 FAP 患者 47 名。男:女 = 28:19、この内 44 名に腹壁脂肪吸引生検を、13 名に胃生検を行った。腹壁脂肪生検時年齢 24-83 (50.7±17.5)歳、発症から生検までの罹病期間は 1-15(4.0±3.2)年であった。胃生検時年齢 26-77(46.8±16.9)歳、発症から

生検までの罹病期間は 1-9(4.0±2.8)年であった。

腹壁脂肪は吸引生検のスミア標本を、胃粘膜は内視鏡的に生検し固定した標本をそれぞれ Alkaline Congo red 染色で観察しアミロイド沈着を確認した(図 1 A)。腹壁脂肪はスライドガラスから検体を剥離回収、胃粘膜は未固定の凍結標本をホモジナイズし、それぞれ 6M 塩酸グアニジンにて可溶化した。透析脱塩後、得られた検体を SDS-PAGE 解析し、抗 TTR 抗体を用いて行った western blot の結果を参考に染色後のゲルから 15kD 付近の TTR の単量体バンドを切り出した(図 1 B)。トリプシンによるゲル内酵素処理後、質量分析計(liquid chromatography-ion trap mass spectrometry: LC-MS/MS)により野生型 TTR(V30)と変異型 TTR(M30)の構成比を検索した。(図 1 C)

さらに、野生型 TTR の比率について、生検時年齢との関係、臓器間での違いなどを検討した

(倫理面への配慮)

各患者にはインフォームドコンセントを得て、生検を行った。

C. 研究結果

生検時年齢が高くなるにしたがって、腹壁脂肪では野生型TTRの比率が高くなる傾向がみられた(図2 A)。Val30Met型FAP患者の全国調査では、若年発症(50歳未満)群と高齢発症(50歳以上)群で地理的分布の違いの他、臨床症状も大きく異なることが報告されている(Koike H et al. Arch Neurol 59 2002)。このため今回の結果を生検時年齢50歳前後で比較したところ、有意差を持って50歳以上の群で野生型TTRの比率が高いことが明らかとなった(図2 B)。胃粘膜では、年齢による一定の傾向はなかった(図3 A)。腹壁脂肪と胃粘膜を比較すると、腹壁脂肪は殆どが野生型TTRである症例が複数あるのに対し、胃粘膜では野生型TTRは最高でも55%にとどまり、全体の比較でも腹壁脂肪の方が有意に野生型TTRの比率が高かった(図3 B)。

D. 考察

変異のない変異型 TTR もアミロイド惹起性を有し線維形成をすることが知られている。野生型 TTR に起因する SSA の発症年齢は比較的高齢とされているが、FAP 患者では変異型 TTR の沈着に伴い、より若い年齢から野生型 TTR の沈着も始まっていると予想される。FAP 患者のアミロイド沈着には、変異型 TTR に加え野生型 TTR も少なからず関与していると考えられる。

胃粘膜に比し、腹壁脂肪にはより野生型 TTR

が沈着しやすい性質があることが予測され、FAP 患者の臓器間で野生型 TTR の親和性に違いがあることが伺えた。

E. 結論

Val30Met TTR 型 FAP 患者における腹壁脂肪沈着アミロイドは、加齢とともに野生型 TTR の占める割合が高くなっていく。胃粘膜ではこの傾向がはっきりせず、全体に腹壁脂肪に比し野生型 TTR の比率は低かった。野生型 TTR の関与については、臓器により異なる可能性がある。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表
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

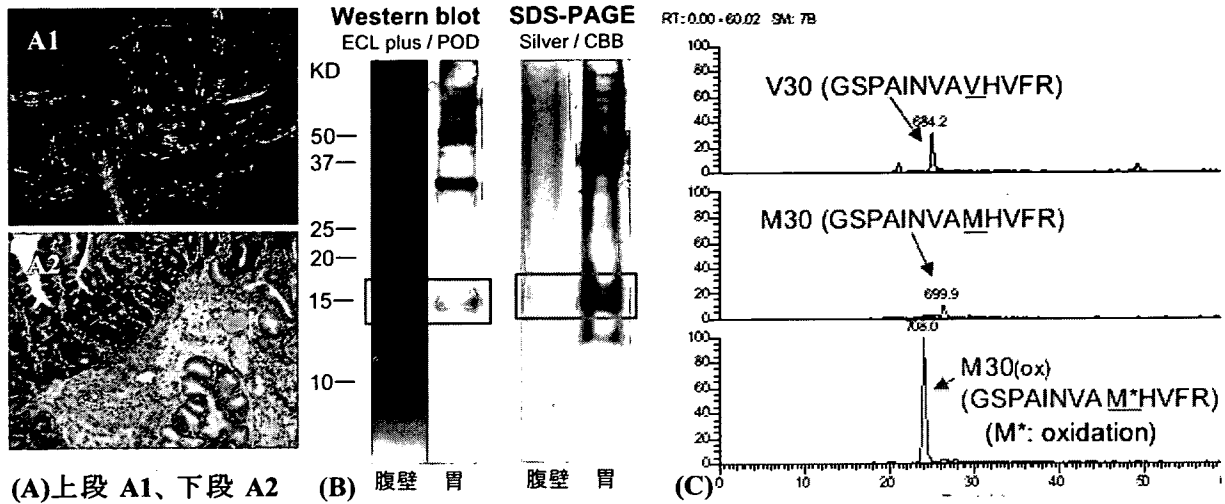


図 1: 症例(32歳男性。発症後4年)の解析例。(A1)腹壁脂肪吸引生検、(A2)胃生検(Congo red 染色) でアミロイド沈着を認める。(B)SDS-PAGE、western blot。15kD 付近に TTR の単量体バンドあり(四角)。(C)腹壁脂肪の LC-MS/MS。V30 と M30, M30(ox)のピークの面積比から、構成比(野生型 TTR:変異型 TTR=21:79)を求めた。

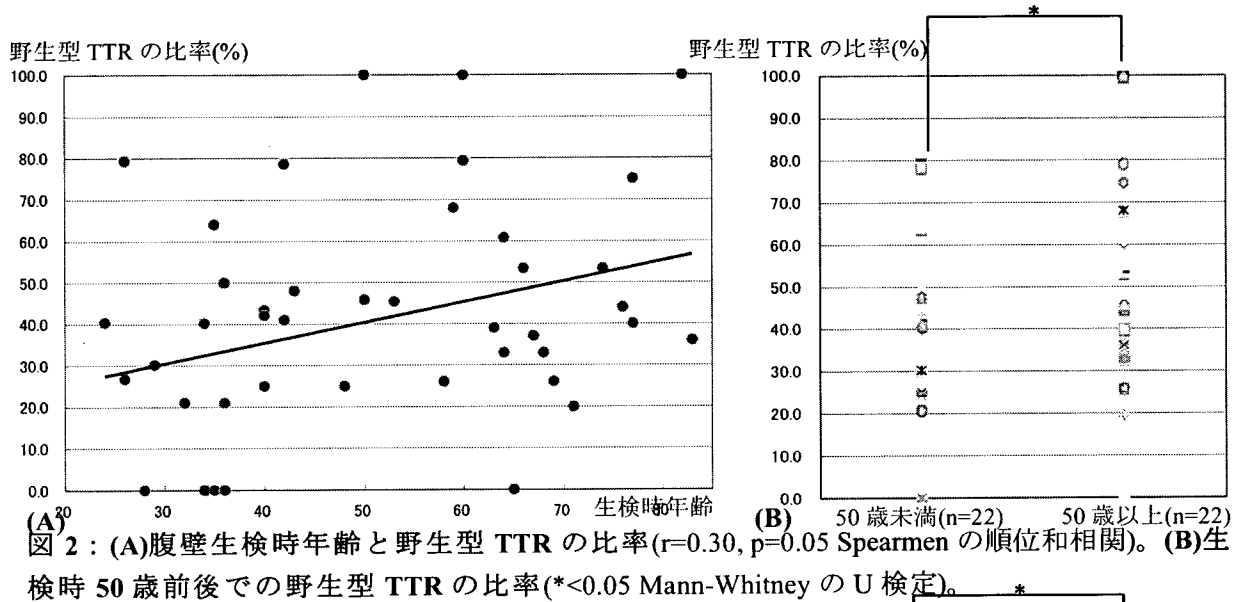


図 2: (A)腹壁生検時年齢と野生型 TTR の比率($r=0.30$, $p=0.05$ Spearman の順位相関)。(B)生検時 50 歳前後での野生型 TTR の比率(* <0.05 Mann-Whitney の U 検定)。

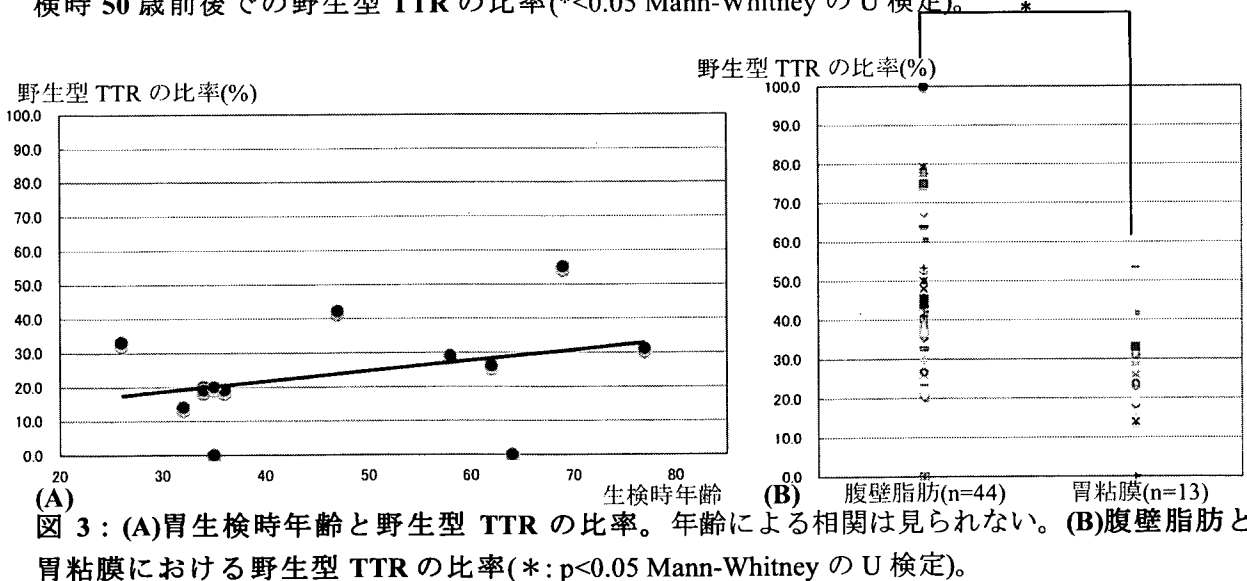


図 3: (A)胃生検時年齢と野生型 TTR の比率。年齢による相関は見られない。(B)腹壁脂肪と胃粘膜における野生型 TTR の比率(*: $p<0.05$ Mann-Whitney の U 検定)。