

ける移動度が異なっていた。SDS-PAGEでは、コントロールのA β と同様の泳動像を示した。これらのバンドを質量分析器で解析するとオリゴマーを生じたA β には化学的な修飾は全く存在せず、またオリゴマー中にもコラーゲンの混入等は観察されなかった。

以上のことからコラーゲンには、アミロイドのオリゴマーを吸着させやすい性質があり、さらに一部のアミロイドオリゴマーに構造変化を起こさせる作用があると推定された。

D. 考察

アミロイドタンパク質が形成する可溶性のオリゴマーは SDS によって容易に通常の分子にかい離することが明らかとなった。これらのオリゴマーは化学的には元のタンパク質と全く変わらず、構造の変化のみでオリゴマーを形成していると考えられた。さらに、コラーゲンには各種アミロイドオリゴマーを優先的に吸着する性質があることが推定され、また、コラーゲン上では一部アミロイドオリゴマーが安定化し、さらに構造変化を起こさせる環境であることが推定された。

このコラーゲンの性質を利用すると、アミロイドオリゴマーの除去に利用できると考えられ、アミロイド症の予防治療に応用できる可能性がある。この点に関しては今後さらに検討したい。

E. 結論

A β ペプチド、TTR が形成する可溶性のオリゴマーを Native-PAGE、SDS-PAGE、質量分析器を用いて解析した。これらのオリゴマーは化学的には元のタンパク質と全く変わらず、構造の変化のみでオリゴマーを形成していた。コラーゲンにはアミロイドオリゴマーを吸着する性質があった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kume H, Kametani F: Abeta11-40/42 production without gamma-secretase epsilon- site cleavage. *Bioche Biophys Res Commun* 349: 1356-1360, 2006.
- 2) Murayama KS, Kametani F, Tabira T, Araki W: A novel monoclonal antibody specific for the amino-truncated beta-amyloid Abeta 5-40/42 produced from caspase-cleaved amyloid precursor protein. *J Neurosci Methods* 161: 244-249, 2007 .
- 3) Progressive wild-type transthyretin deposition after liver transplantation preferentially occurs onto myocardium in FAP patients. *Am J Transplat* 7: 235-242, 2007.
- 4) Kametani F: epsilon-Secretase: Reduction of amyloid precursor protein epsilon-site cleavage in Alzheimer's disease. *Curr Alz Res*: (in press)
- 5) Tsuchiya A, Yazaki M, Kametani F, Takei Y, Ikeda S: Marked regression of abdominal fat amyloid in patients with FAP during long-term follow-up after liver-transplant. *Liver Transplant*: (in press)

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

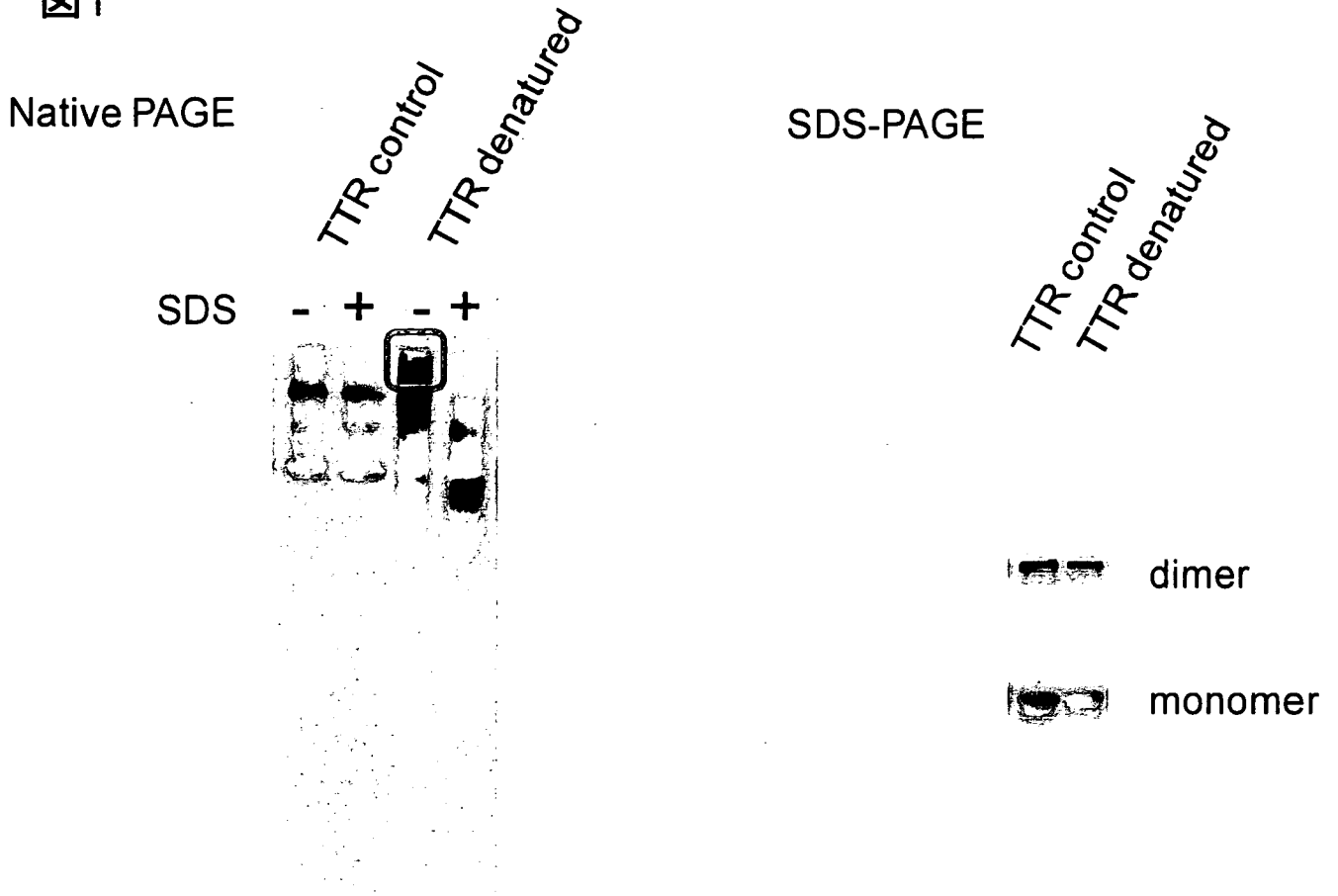


図2

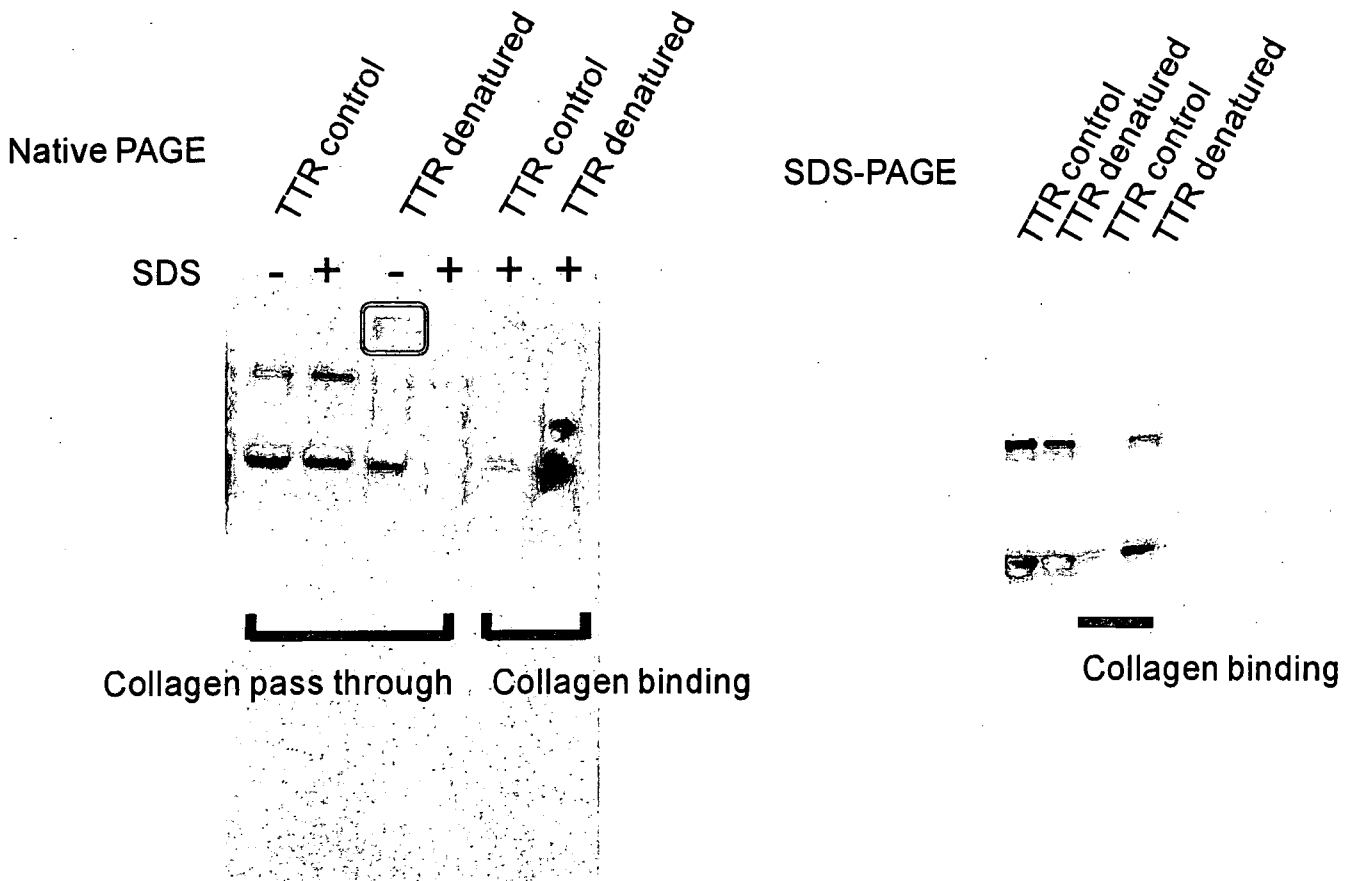
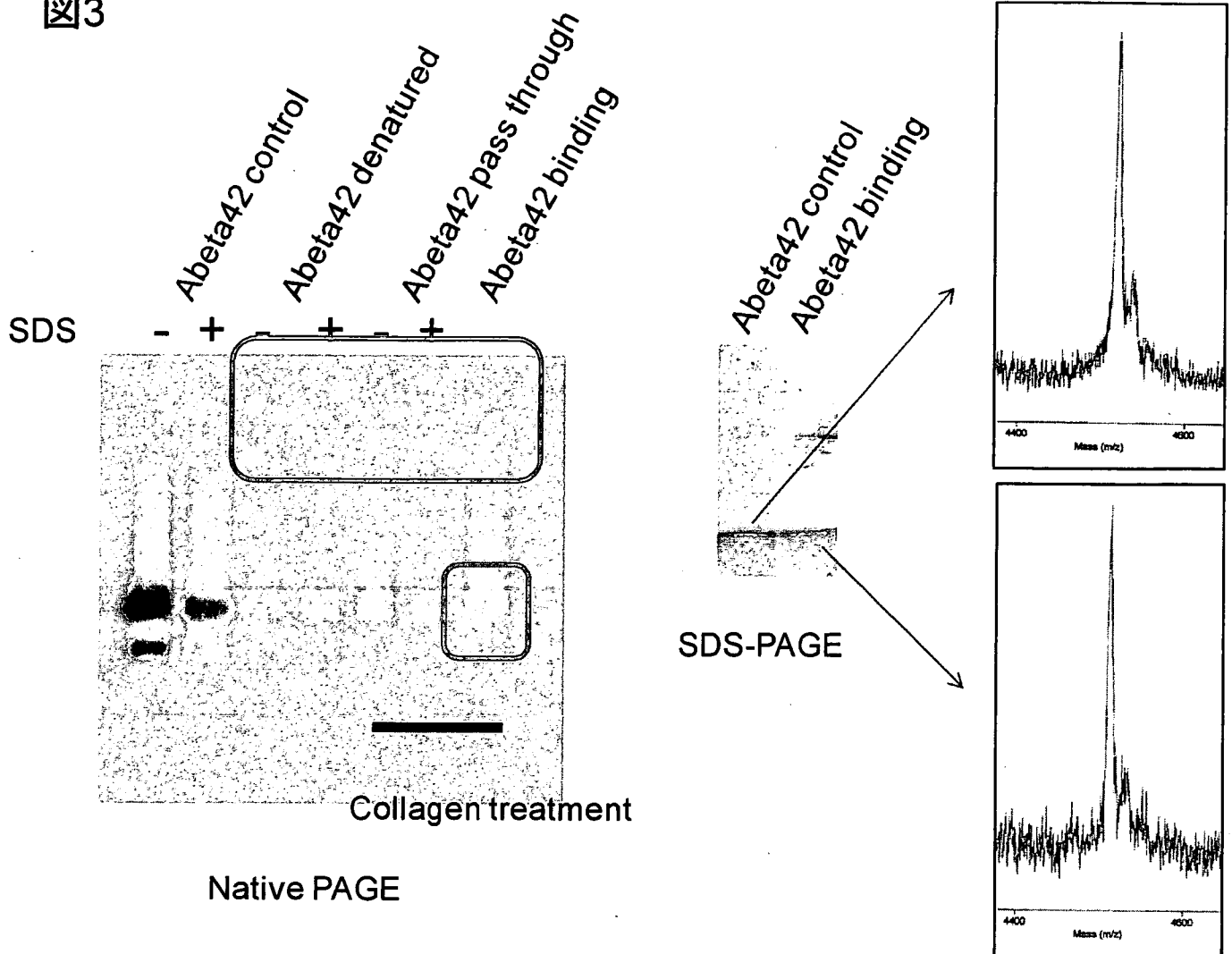


図3



図の説明

図1 TTRオリゴマーのNative-PAGEおよびSDS-PAGEによる解析

TTRオリゴマーはNative-PAGEではboxで示すようにゲルトップにスメア状泳動されるが、SDS-PAGEではコントロールと同じに泳動された。Native-PAGEではサンプル溶液に最終濃度が0.05%となるようにSDSを加えたものも泳動した(+で表示)。

図2 TTRオリゴマーとコラーゲン

TTRオリゴマー (boxで示す) はコラーゲンに結合した。吸着したTTRオリゴマーはSDS-PAGEではコントロールと同じに泳動された。Native-PAGEではサンプル溶液に最終濃度が0.05%となるようにSDSを加えたものも泳動した(+で表示)。

図3 Aβオリゴマーとコラーゲン

AβオリゴマーはNative-PAGEではboxで示すようにゲルトップにスメア状泳動され、コラーゲンに結合したAβオリゴマーはSDS存在下ではコントロールとは異なる移動度を示した。Native-PAGEではサンプル溶液に最終濃度が0.05%となるようにSDSを加えたものも泳動した(+で表示)。さらに、コラーゲンに結合したAβオリゴマーはSDS-PAGEではコントロールと同じに泳動され、質量解析でも化学的変化は検出されなかった。

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14例(男性2例、女性11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2から36ヶ月(14.1±10.0)であった。使用前後でクレアチニンクリアランスを検討した10例うち、増悪症例は1例のみで9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。画像解析により胃・十二指腸粘膜生検組織のアミロイドの沈着領域を検討した結果、9例中8例で著明に減少していた。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。RAの治療戦略は、アメリカリウマチ学会が2002年に発表したガイドラインによる治療が主流となっている。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 (MTX)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- α 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の産生が低下し組織への沈着が抑制され、さらに組織のturn overにより末梢の組織のアミロイドが減少・消失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14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。生物学的製剤の使用前後で、胃・十二指腸粘膜生検標本におけるアミロイド沈着の領域を画像解析ソフトであるImageJを用い経時的に検討した。

（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 12 例であり、対象者の年齢は 61.4 ± 8.5 歳、RA 発症年齢は 43.1 ± 11.7 歳、アミロイドーシス発症年齢は 57.6 ± 10.2 歳、RA 発症から 14.4 ± 7.8 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 3 例がインフリキシマブを使用され、他の 11 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 はインフリキシマブ使用の 3 例に、エタネルセプト使用の 2 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 2 から 36 ヶ月 (14.1 ± 10.0) であった。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 20mg/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 10 例中 6 例であり、ほぼ不変であった症例は 3 例、悪化した症例が 1 例であった。また、4 例は未評価である。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 10ml/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, 9 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。

使用期間が長い症例 3 の胃・十二指腸粘膜生検では開始前は血管を中心に標本に 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くなり 2 年 6 ヶ月後に標本内のアミロイドは消失した。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。図 4 に画像解析によるアミロイド領域の変化を示した。評価可能であった 9 例中 8 例で生物学的製剤の使用前後で減少しており症例 11 例の 1 例のみ増加していた。増加していた症例は気管支炎で 3 ヶ月間中断していた症例である。

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- α 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 についての記載はない。また、インフリキシマブに関しては Elkayam らが蛋白尿は減少したが 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・十二指腸粘膜生検に関しては 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 14 例に生物学的製剤を導入し、Ccr は使用前後で 10 例中 9 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。画像解析によるアミロイド領域の変化を示した。評価可能であった 9 例中 8 例で生物学的製剤の使用前後で減少していた。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

なし

2. 学会発表

1) 黒田毅, 佐藤弘恵, 村上修一, 佐伯敬子, 羽生忠正, 中野正明, 下条文武: 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・日本リウマチ学会、横浜、4月27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

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 | SAA | TP | Cr | Ccr | U-P | 胃生検 | CRP | SAA | TP | Cr | Ccr | U-P |
| | | | | | | (mg/dl) | (μ g/ml) | (g/dl) | (mg/dl) | (ml/min) | (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. | 38 | M | E | 24 | (+) | (+) | 0.2 | 30 | 5.8 | 1.2 | 54.5 | 2.8 | (+) | 0 | 11.4 | 5.8 | 1.3 | 61.9 | 2.43 |
| 3. | 56 | F | I | 30 | (+) | (+) | 2.3 | 177 | 6.5 | 0.7 | 54.0 | 4.0 | (+) | 0 | 8.6 | 7.4 | 0.8 | 64.0 | 0.2 |
| 4. | 57 | F | I | 36 | (+) | (+) | 4.1 | 590 | 6.8 | 0.5 | 113.8 | 0.1 | (+) | 0 | ND | 6.5 | 0.5 | 120 | 0 |
| 5. | 64 | F | E | 23 | (-) | (+) | 0.8 | 162 | 7.2 | 1.6 | 22.4 | 0.1 | (+) | 0 | 7.8 | 7.1 | 2.7 | 16.1 | 0.38 |
| 6. | 69 | F | E | 20 | (-) | (+) | 0.4 | 44 | 6.5 | 2.1 | 18.5 | 0.3 | (+) | 0 | 13.0 | 7.4 | 6.4 | ND | ND |
| 7. | 71 | F | E | 15 | (-) | (+) | 2.2 | 180 | 5.8 | 0.7 | 42.4 | 0.3 | (+) | 0.2 | 32.3 | 5.9 | 0.7 | 45.0 | 0.3 |
| 8. | 68 | F | E | 17 | (-) | (+) | 1.2 | ND | 5.8 | 0.4 | 81.3 | 0.8 | (+) | 0 | ND | 7.7 | 0.5 | ND | ND |
| 9. | 56 | F | E | 19 | (-) | (+) | 0.7 | ND | 5.1 | 0.4 | 107.0 | 2.1 | ND | 0 | ND | 6.8 | 0.6 | 92.0 | 0 |
| 10. | 61 | F | E | 6 | (-) | (+) | 3.2 | 76.9 | 8.6 | 1.5 | 31.0 | 0.1 | (+) | 1.2 | 53.3 | 7.7 | 1.4 | 26.0 | 0.7 |
| 11. | 69 | F | E | 6 | (-) | (+) | 0 | 25 | 7.6 | 1.0 | 54.4 | 0.1 | (+) | 0 | 18.3 | 7.3 | 0.9 | 59.2 | 0.17 |
| 12. | 68 | F | I | 12 | (+) | (+) | 2.9 | 744 | 6.1 | 0.6 | 97.2 | 0.1 | (+) | 0 | ND | 6.0 | 0.5 | ND | ND |
| 13. | 62 | F | E | 3 | (+) | (+) | 1.0 | ND | 8.1 | 0.6 | 96.1 | 0.1 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| 14. | 65 | F | E | 2 | (-) | (+) | 1.2 | 106 | 6.9 | 1.2 | 27.5 | 0.3 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |

E:Etanercept, I:Infliximab

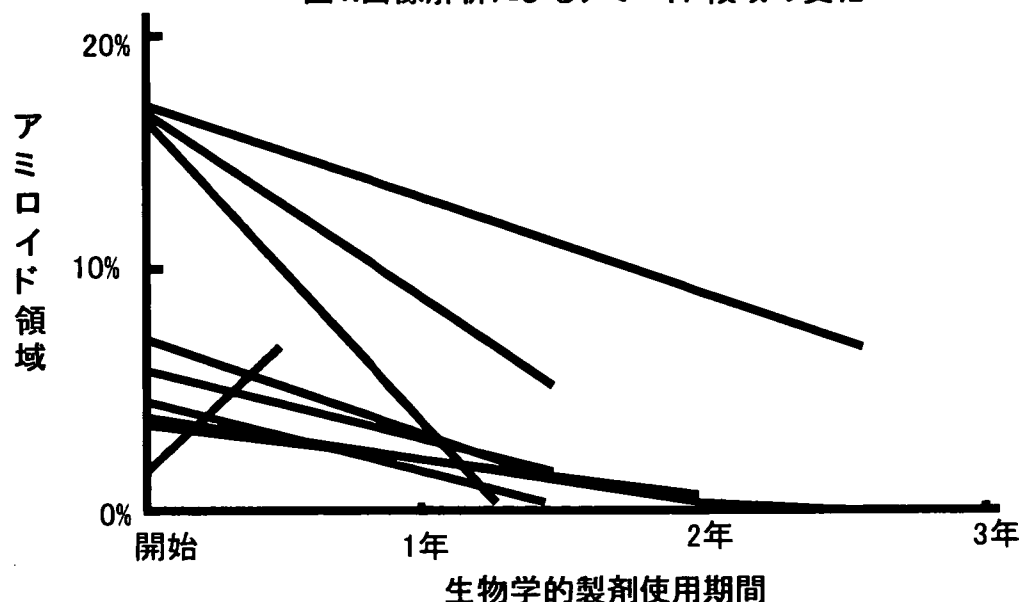
ND: not done

腎機能障害があるが不変と考えられる症例:症例1,5,10

腎機能が改善した症例または正常範囲である症例:症例2,3,4,7,9,11

腎機能悪化例:症例6

図1:画像解析によるアミロイド領域の変化



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患者の遺伝子異常と臨床像の検討

分担研究者 池田修一 信州大学医学部内科 (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*、中村昭則**、松田正之*

*信州大学医学部内科 (脳神経内科、リウマチ・膠原病内科)

**国立精神・神経センター

研究要旨 家族性地中海熱(FMF)は遺伝性周期熱に属する疾患で、反応性AAアミロイドーシスをきたす。本邦では従来稀と考えられていたが、近年遺伝子異常が判明した症例の報告が相次いでいる。今回我々は、本邦におけるFMFの特徴について検討した。本邦からの報告例、FMFに関する全国調査、及び自験例で、臨床的にFMFが疑われMEFV遺伝子検査にて異常が確認された計60例について、臨床像と遺伝子変異型を調査した。発作時の症状の頻度は、発熱98.3%、腹膜炎・胸膜炎約50%、関節痛23.7%であった。発症年齢は10歳代までの発症が多いが、30歳以降も15%あった。AAアミロイドーシスの合併は4例のみであった。治療は、35名がcolchicineの内服を行っており、32名で有効であった。MEFV遺伝子の変異型は、M694IとE148Qを含む症例が大部分であったが、L110Pを有する症例も23例あった。地中海地方で頻度の高い、M694V、M680I、V726Aは検出されなかった。正常対照群のアレル頻度は、L110P約4%、E148Q約25%、M694I0%であった。地中海地方の患者と比較し、本邦のFMF患者は、臨床的には発症年齢がやや高いこと、腹膜炎症状の頻度が低いこと、アミロイドーシスの合併が少ないこと、などの特徴があった。

A. 研究目的

家族性地中海熱(FMF)は、地中海沿岸地方に多く見られる遺伝病で、発熱や胸腹膜炎・関節炎など漿膜炎症状の発作を周期的に繰り返す。本邦では従来稀と考えられていたが、近年遺伝子異常が判明した症例の報告が相次いでいる。繰り返す炎症のため、反応性AAアミロイドーシスを合併することが知られており、発作の抑制やアミロイドーシス進展の予防に、コルヒチン内服が有効とされている。今回我々は、本邦におけるFMFの疫学や、遺伝子異常と臨床症状の特徴について検討した。

B. 研究方法

1. 対象

原因不明の繰り返す発熱・胸腹部痛・関節痛などをきたし、FMFの原因遺伝子であるMEFV遺伝子検査にて異常が確認された、日本人患者60名について検討した。

2. 方法

FMFに関する全国調査で詳細が判明した18名、自験例24名、その他学会・論文発表症例18名の計60名について、臨床像と遺伝子異常について検討した。

全国調査については、2006年秋に、全国の内科・小児科系診療科を有する病院の計1850科を対象として、FMFに関するアンケート調査を施行した。一次アンケートでは、臨床的または遺伝子検査にて診断されたFMF症例の有無、AAアミロイドーシス合併例の有無、そして基礎疾患不明のAAアミロイドーシスの経験の有無、について質問した。この調査で症例がありとの回答をした施設に対し、二次調査を施行した。FMFの臨床診断は、Tel-Hashomer criteriaに基づいて行なった。遺伝子診断では、FMFでは70%がホモ接合体か複合ヘテロ接合体を示すが、残りの30%はヘテロ接合体のみでもう一方の変異が同定されないとされている。本研究では、ホモ接合体か複合ヘテロ接合体

の症例をFMFと診断したが、これまで複数報告されているように、M694Iはヘテロ接合体のみでも発症することがあるため、これはFMFと診断することとした。また、頻度の高かった3つの変異について、その病的意義を検討するため、正常対照群(51名)でアレル頻度を求めた。

(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、検査を行い、対照群についても当院の倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

全国調査の一次アンケートの最終結果を表1に示す。この内、二次調査で詳細が判明した18名(15家系)、自験例24名(20家系)、その他論文・学会発表症例18名(14家系)の、合計60名での臨床像および遺伝子変異型を検討した。

臨床症状の詳細は表2,3の通りで、10歳代までの発症が多いが、30歳以降の発症も15%見られた。症状の種類は、発熱が98.3%とほぼ必発、腹膜炎・胸膜炎は50%程度、関節炎は23.3%であった。AAアミロイドーシスの合併は4例のみで、他に5名がベーチェット病を合併していた。治療に関しては、35名がcolchicine(0.5-2.0mg/day)の内服を行っており、32名で有効であった。

遺伝子型の結果は表4に示した通りで、M694IとE148Qを含む症例が大部分であった。自験例では全例exon 2のDNA sequenceを施行しており、exon 2に含まれるL110Pという変異も多いことが分かった。E148Qとの複合ヘテロ接合体が8例あった他、他の変異のみで診断が付いた症例の中にL110Pも有している例が多数あった。L110Pの有無を調べていない施設もあるため、実際にはさらに頻度の高い変異である可能性もある。なお、地中海地方で頻度の高い、M694V、M680I、V726Aは検出されなかった。

正常対照群のアレル頻度は、E148Qは約25%、M694Iは0%と、これまでの本邦の報告と同様の結果であった。L110Pは対照群では約4%と低く、患者群では少なくとも20%はあることから、この変異はFMFの発症に関わる変異と考えられた。

D. 考察

今回の60症例の臨床像を地中海地方の患者の特徴と比較した。半数は10歳未満の発症で、30歳以降の発症は5%未満とされている地中海地方と比べ、本邦では発症年齢がやや高い傾向にあった。また、地中海地方ではほぼ必発とされる腹膜炎症状の頻度が、本邦患者では50%と大きく異なっていた(表3)。AAアミロイドーシスの合併は、地中海地方では民族による違いはあるものの、トルコ人で60%、ユダヤ人で30%と多く見られるが、本邦では6.7%と低頻度であった。FMFにおけるAAアミロイドーシス発症の危険因子の一つとして、M694Vホモ接合体であることが挙げられているが、この変異は本邦症例では見られなかった。このような遺伝子変異の種類の相違によって、本邦患者ではAAアミロイドーシスの合併が少ない可能性が考えられる。

以上から、本邦のFMF患者では、遺伝子変異の種類と臨床症状の特徴が、地中海地方とは異なっていると考えられた。

E. 結論

本邦のFMF患者は、遺伝子変異の種類や臨床像が地中海地方と異なり、AAアミロイドーシスの合併頻度は少なかった。本邦でもFMF患者が相当数存在すると考えられ、周期性発熱などの診療上念頭に置く必要がある。

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。

表 1. FMF に関する全国調査(一次アンケート)の最終結果

| | 内科 | 小児科 | 計 |
|----------------|-----------|-----------|-----------|
| 調査実施施設 | 1338 | 512 | 1850 |
| 回答率(%) | 435(32.5) | 264(51.6) | 699(37.8) |
| 臨床的FMF患者経験施設 | 19 | 12 | 31 |
| 臨床的FMF患者 | 33 | 34 | 67 |
| 遺伝子変異確定患者経験施設 | 10 | 11 | 21 |
| 遺伝子変異確定患者 | 21 | 26 | 47 |
| AAアミロイドーシス合併例 | 3 | 1 | 4 |
| 原因不明アミロイドーシス患者 | 30 | 0 | 30 |

表 2. 本邦の FMF 60 症例の発症年齢

| 発症年齢 | (%) |
|-------|------|
| 10歳未満 | 23.3 |
| 10歳代 | 36.7 |
| 20歳代 | 23.3 |
| 30歳以降 | 15.0 |

表 3. 本邦の FMF 60 症例の臨床症状、地中海地方の患者との比較

| | 本邦(60例) | トルコ | ユダヤ | アラブ | アルメニア |
|-------|---------|-----|-----|-----|-------|
| 発熱 | 98.3 | 93 | 100 | 100 | 100 |
| 腹膜炎 | 51.7 | 94 | 95 | 82 | 96 |
| 胸膜炎 | 50 | 31 | 40 | 43 | 87 |
| 関節炎 | 23.3 | 47 | 77 | 37 | 37 |
| 丹毒様紅斑 | 0 | 21 | 46 | 3 | 8 |

表 4. 本邦の FMF 60 症例の MEFV 遺伝子変異型

| 60症例の主な遺伝子変異型 | (人数) | L110Pも有している例 |
|-------------------|------|----------------|
| M694I ホモ接合体 | 5 | |
| E148Q/M694I | 18 | 7 |
| M694Iヘテロ接合体 | 16 | 2 |
| E148Qホモ接合体 | 5 | 5 (1人はL110Pホモ) |
| E148Q/P369S/R408Q | 4 | 1 |
| P369S/R408Q | 1 | |
| E148Q/P369S | 1 | |
| L110P/E148Q | 8 | |
| E148Q/R202Q | 1 | |
| R202Q/M694I | 1 | |

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

AL アミロイドーシスの凝固異常解析および BJP 吸着療法の試み

分担研究者 満屋裕明 熊本大学医学部附属病院血液内科

共同研究者 畑 裕之^{*}、内場光浩^{**}、中村美紀^{*}、立津央^{*}、安東由喜雄^{***}、今村隆寿^{****}

^{*}熊本大学医学部附属病院血液内科、^{**}同輸血部、^{***}同臨床検査部、

^{****}同分子病理部

研究要旨 1: 線溶系亢進で発見された AL アミロイドーシスを経験し、uPA が形質細胞に発現していることが原因であることを確認した。他の AL アミロイドーシス症例でも同様の所見を認め、線溶系の亢進がアミロイドーシスの発症、進展に関わる可能性が示唆された。

2: 大量化学療法施行不能例に PMMA 膜を用いた BJP 吸着療法を行い、血液中 BJP の減少と神経症状の改善を認め、本治療が新規治療となる可能性が示された。

A. 研究目的

1: AL アミロイドーシスに線溶亢進状態が存在することは知られているが、その機序は不明である。固形腫瘍においては、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクティベーター (uPA) が腫瘍に発現していることが線溶亢進の原因となることが知られている。AL アミロイドーシスにおいても同様の機序が存在することを推定し、線溶亢進の機序を解明することを目的とする。

2: 大量化学療法により BJP を減少させることは AL アミロイドーシスの予後を改善する。しかし、本治療の適応とならない症例も多く存在することが問題であり、最近では本治療の有効性を疑問視する報告もあるため新規治療法の開発が望まれている。本研究では BJP 吸着療法の有効性、安全性を検討することを目的とする。

B. 研究方法

1: AL アミロイドーシス症例の凝固、線溶系を精査する。骨髓穿刺を行い、クロット標本を作成、形質細胞内の uPA を免疫染色にて検討する。
2: 宗教上の理由から大量化学療法を希望しない AL アミロイドーシス症例 (57 歳女性) に体外循環を行い、メタクリル酸メチル樹脂 (PMMA

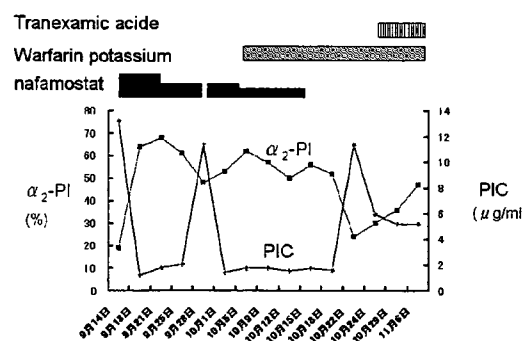
膜、東レ製 BK/F) にて週に 2 回吸着療法を施行した。血清中の BJP 多量体は、非還元条件で western blot を行い、anti-free kappa light chain 抗体を用いて検出した (Bethyl laboratories Inc. Montgomery, TX, USA)。膜吸着 BJP は 40% 酢酸にて溶出し血清と同様に検討した。

(倫理面への配慮)

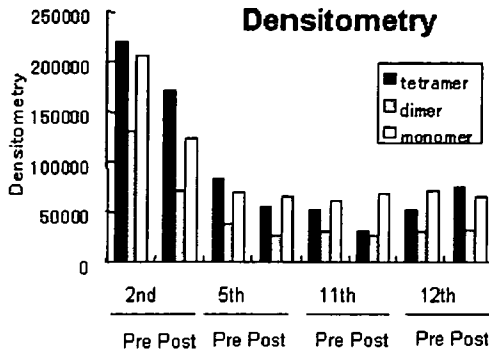
骨髓穿刺については患者より同意を得て行った。また BJP 吸着療法は、当院倫理委員会の許可を得て行った。

C. 研究結果

1: 凝固系を測定した症例 4 例全例が線溶亢進を呈した。そのうち 3 例で免疫染色を行い、全例で形質細胞内の uPA 発現が確認された。メシル酸ナファモスタットの投与が線溶亢進に極めて有効であった (下図)。



2 : BJP 吸着療法により、血清中の BJP 多量体は減少し、同時に電気生理学的検査による SNAP の改善を見た (4.1 μ V \rightarrow 10.4 μ V)。PMMA 膜には BJP の多量体—4 量体の吸着がみられた (下図)。



D. 考察

1 : AL アミロイドーシスには高率に線溶亢進が合併すると考えられるが、これは本症例に一致する所見である。TTR、AA アミロイドーシスではこのような異常は見られないとされており、線溶亢進が AL アミロイドーシスの発症、進展に重要な役割を担っている可能性がある。この中心に形質細胞における uPA の過剰発現が存在すると考えられる。Plasminogen の活性化以外の uPA の機能は種々知られてきており、基底膜の破壊による癌細胞の浸潤促進もそのひとつである。組織の破壊が uPA によりもたらされ、BJP が沈着しやすくなる可能性、BJP そのものが uPA により切断、修飾され amyloidogenic になる可能性が考えられる。アルツハイマー病の原因である A β ペプチドにおいて、変異ペプチドが平滑筋細胞に作用して uPA 発現を誘導するとの報告があり (THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 278: 19054-61, 2003)、同様に BJP が uPA 発現を誘導する可能性も示唆される。uPA が病態の中心であれば、uPA を阻害することで発症抑制、病状進行の停止をもたらす可能性があるが、この意味で uPA に直接作用する薬剤であるメシル酸ナファモスタットは有望と考えられる。

2 : 本吸着療法で BJP 多量体が血清中から減少することが確認された。これに伴い、神経症状、

SNAP の改善が認められた。しかし、吸着療法を長期間安定して試行することは困難である。本症例も血栓症の併発により中止された。今後、より効率の良い膜による安定した吸着が可能な治療法の開発が望まれる。

E. 結論

1 : AL アミロイドーシスに線溶亢進が合併し、形質細胞内における uPA の発現がその原因であることが示唆され、uPA 活性阻害が治療につながる可能性がある。

2 : BJP を PMMA 膜により吸着除去する方法は病状改善のために有効である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Tatetsu H, Ueno S, Hata H, Yamada Y, Takeya M, Mitsuya H, Tenen GD, Okuno Y. Downregulation of PU.1 by methylation of distal regulatory elements and the promoter is required for myeloma cell growth. Cancer Res 67: 5328-36, 2007.

2. 学会発表

1) 中村美紀、畑裕之、原田奈穂子、宮家宏定、河北敏郎、立津央、満屋裕明。当科における原発性アミロイドーシスの治療経験。第69回日本血液学会、第49回日本臨床血液学会合同総会、横浜。2007年10月。

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 分担研究報告書

ELISA 法を用いた血清中 free light chain の新規測定法の検討

分担研究者 松田正之 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 石井 亘*、田澤浩一*、吉田拓弘*、加藤修明*、池田修一*、山田俊幸**
 *信州大学医学部脳神経内科、リウマチ・膠原病内科
 **自治医科大学臨床検査学講座

研究要旨 ELISA 法を用いた血清中 free light chain (FLC) の新規測定用キットの臨床的有用性について検討した。対象は原発性全身性 AL アミロイドーシス患者 76 名。採取した血清中の FLC を Binding Site 社製キットと新規開発 ELISA キットの両方で測定した。ELISA 法では κ 鎖が全体に低く出る傾向があり、 κ 型 AL アミロイドーシスであっても FLC κ 鎖の優位な上昇を証明できない場合があった。現段階では臨床の場に本 ELISA キットを導入することは難しいと考えられた。

A. 研究目的

原発性全身性 AL アミロイドーシスでは診断と治療の指標として血清中 free light chain (FLC) の臨床的有用性が明らかにされている。最近、ELISA 法による尿中 FLC の測定用キットが開発された。本法は吸光度計さえあれば容易に測定できる点が長所である。我々は本キットと従来から用いられている比濁法による Binding Site 社製のキットとを用いて血清 FLC を測定し、両者の結果を比較検討した。

B. 研究方法

対象は原発性全身性 AL アミロイドーシス患者 76 名（男性 47 名、女性 29 名、平均年齢 52.3 ± 12.8 歳）。血清を採取して -70°C で凍結保存した。76 名中 32 名については化学療法前後で血清を採取した。FLC の測定には Binding Site 社製キット（従来法）と新規開発 ELISA キットとを用いた。後者では結合型免疫グロブリンが測定値に影響を及ぼす可能性が考えられたため、血清を 500 倍に希釈して用いる通常の方法（ELISA 通常法）に加え、2000 倍に希釈した患者血清と正常結合型 IgG を 3 mg/dl で含む調整液とを 1:1 の割合で混合し、最終的に 4000 倍希釈の血清を用いた修正法（ELISA 修正法）の二つの方法を用いた。従来法での測定値と ELISA キットでのものとの相関を simple regression test で検討した。また、治療前後での変化を調べる目的では Wilcoxon's signed

rank test を用いた。

（倫理面の配慮）

血清中の FLC を測定することの意義について口頭で患者に説明し、了解を得た。

C. 研究結果

治療前の predominant FLC と沈着アミロイドの免疫染色の結果との一致率を表 1 に示す。 λ 鎖については従来法・ELISA 通常法・ELISA 修正法の全てで一致率は 100%であった。一方、 κ 鎖については従来法で 100%であったのに対し、ELISA 通常法で 80%、ELISA 修正法で 71%と低値にとどまった。従来法と ELISA 法の相関では、 λ 鎖については ELISA 通常法と修正法のいずれも高い相関を示したのに対し、 κ 鎖については有意な相関は認められたものの、係数は低値であった（図 1）。また、 κ/λ 比については従来法と ELISA 修正法との間のみ有意な相関が認められた（図 2）。化学療法前後での比較検討では、ELISA 通常法・修正法のいずれも従来法と同様に有意な変化が認められた（図 3）。

D. 考察

今回の検討では、 κ 型 AL アミロイドーシスであっても ELISA 法では血清中 FLC κ 鎖の上昇を証明できないことがあることが明らかとなった。また、 λ 鎖に関しては ELISA 法でも問題はないが、 κ 鎖と κ/λ 比に

関しては従来法と有意な相関がないか、あっても相関係数は低く、単独の測定値の解釈にあたっては注意が必要であることがわかった。現段階で臨床の場に本 ELISA キットを導入することは難しいと考えられ、今後のさらなる精度向上が望まれる。

E. 結論

新規開発 ELISA キットはκ鎖の値に問題があり、現段階で臨床の場に導入することは難しい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsuda M, Gono T, Shimojima Y, Yoshida T, Katoh N, Nakazawa Y, Koike K, Hoshii Y, Ikeda S. AL amyloidosis manifesting as systemic lymphadenopathy. *Amyloid: J Protein Folding Disord* (in press).
 - 2) Matsuda M, Gono T, Katoh N, Yoshida T, Tazawa K, Shimojima Y, Ishii W, Fushimi T, Ikeda S. Nephrotic syndrome due to primary systemic AL amyloidosis, successfully treated with VAD alone. *Intern Med* (in press).
 - 3) Miyazaki D, Yazaki M, Gono T, Kametani F, Tsuchiya A, Matsuda M, Takenaka Y, Hoshii Y, Ikeda S. AH amyloidosis associated with an immunoglobulin heavy chain variable region (VH1) fragment: a case report. *Amyloid: J Protein Folding Disord* (in press).
 - 4) 松田正之:AL アミロイドーシスの治療と展望. 腎と透析 62 (2): 188-193, 2007.
 - 5) 松田正之:AL アミロイドーシスの最新治療. 血液・腫瘍科 55(4): 484-488, 2007.
 - 6) 松田正之:家族性地中海熱. リウマチ科 38 (4): 356-360, 2007
2. 学会発表
 - 1) 松田正之、五野貴久、下島恭弘、吉田拓弘、加藤修明、池田修一:リンパ節腫脹を主症状とする AL アミロイドーシスの臨床的検討. 第 104 回日本内科学会総会、2007. 4
 - 2) 土屋彩子、矢崎正英、中村昭則、吉田邦広、松田正之、池田修一:当科で経験した家族性地中海熱患者の遺伝子異常とその臨床像. 第 104 回日本内科学会総会、2007. 4
 - 3) 土屋彩子、矢崎正英、松田正之、池田修一:当科で診断した日本人家族性地中海熱 8 症例の遺伝子異常とその臨床像. 第 51 回日本リウマチ学会総会、2007. 4
 - 4) 五野貴久、下島恭弘、森田洋、松田正之、池田修一:多発神経炎を主症状とする原発性 AL アミロイドーシスの臨床的検討. 第 48 回日本神経学会総会、2007. 5
 - 5) 吉田拓弘、松田正之、土屋彩子、下島恭弘、五野貴久、矢崎正英、池田修一:家族性地中海熱と Behçet 病が併存する若年成人の 2 例. 第 51 回日本リウマチ学会総会、2007. 4
 - 6) 岸田大、小池千尋、滝沢崇、福島和広、石井亘、松田正之、池田修一:RA による AA アミロイドーシスにてエンブレルを使用中に S 状結腸の穿孔を認めた 1 例. 第 19 回中部リウマチ学会、2007. 9
- #### 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

| | | λ | κ |
|-----------------|----------|-----------------|-----------------|
| | 沈着アミロイド | 51 | 25 |
| Predominant FLC | 従来法 | 51/51 (100%) | 25/25 (100%) |
| | ELISA通常法 | 51/51 (100%) | 20/25 (80%) |
| | ELISA修正法 | 39/39 (100%) | 10/14 (71%) |

図1

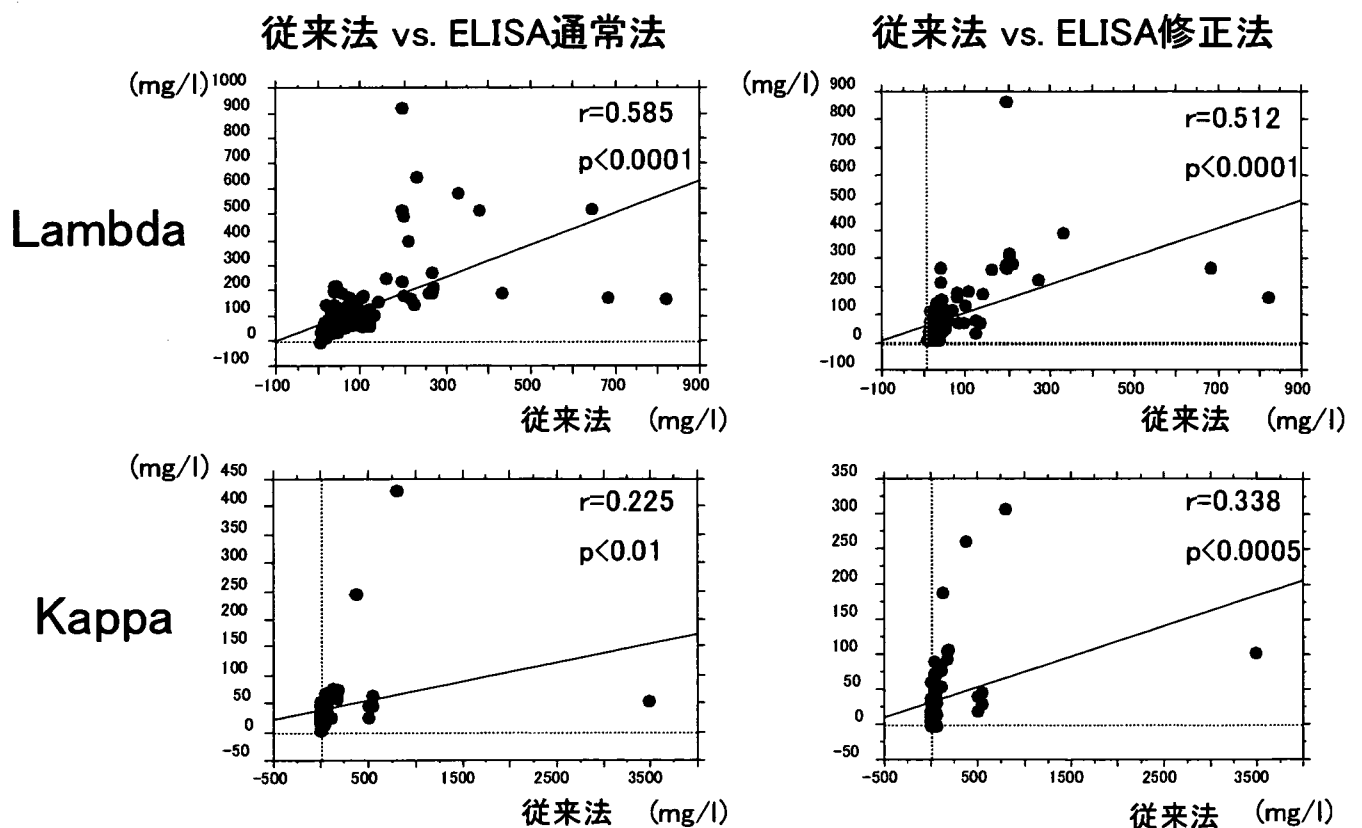


図2

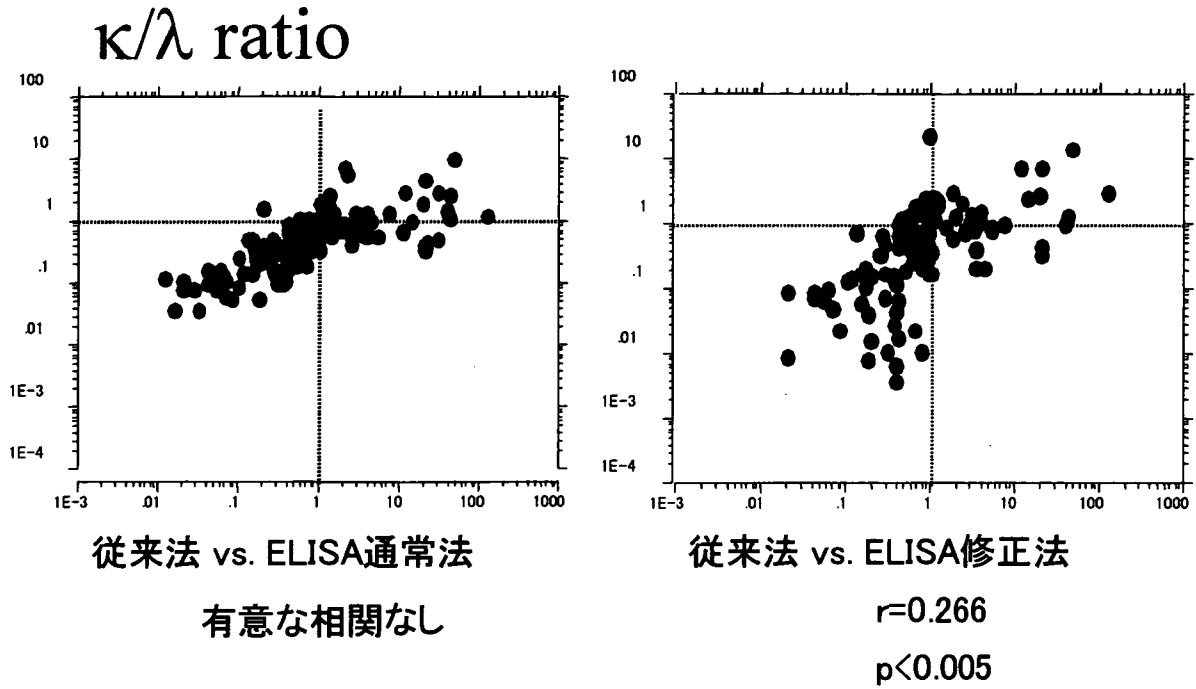
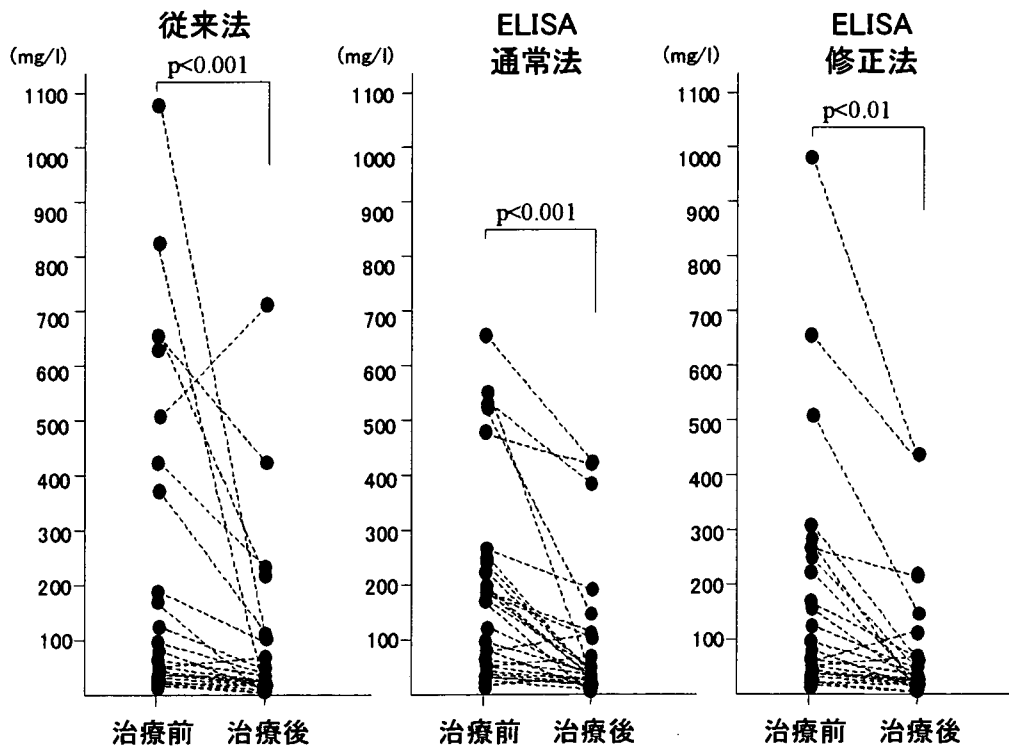


図3



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

Tc-99m アプロチニンの臨床利用の報告—心集積を認めた家族性アミロイドポリニューロパチーの1例

分担研究者 松田博史 埼玉医科大学国際医療センター核医学科

共同研究者 今林悦子*、久慈一英*、瀬戸陽**

*埼玉医科大学国際医療センター核医学科、**埼玉医科大学病院核医学診療科

研究要旨 腹部以外のアミロイドーシスの診断において特異性が高く、特に心アミロイドーシスの診断において判別能が高いとされている核医学検査用製剤として Tc-99m アプロチニンがある。KIT を作成し、Tc-99m で標識し、アミロイドーシスの疑われた患者に対しての検査を行った。心集積を認めた1人の患者で、本検査の結果により胃生検検査が施行され、最終的に家族性アミロイドポリニューロパチーと診断された。Tc-99m アプロチニンの集積は特異的で特に心集積の評価が容易で精度が高く、検査として有用なことが確認できた。今後は治療効果判定への利用が期待できる。

A. 研究目的

腹部以外の領域において、アミロイドーシスの検出能がよく、特異性も高く、キットの冷凍保存が可能な核医学検査用製剤として、Tc-99m アプロチニンがある。Tc-99m アプロチニンはヨーロッパでは過去に腎シンチグラフィ製剤として臨床使用されていた薬剤で、安全性についても信頼性がある。昨年度、キットの調整に成功し、健常者にて薬剤分布・動態を確認した。今年度は疾患例にて、検査を実施し、分布の確認、病変の検出能についての検討を試みた。

B. 研究方法

1. 対象

アミロイドーシスの疑われた6名の患者を対象とした。1名は3年間持続する筋力低下と末梢神経障害の患者、4名は関節痛のある透析患者、1名はネフローゼ症候群の患者であった。

2. 方法

トラジロールにピロリン酸を加えたキットを作成、凍結保存した。安全性についてエンドトキシン試験、7日間の無菌試験、pH測定を行った。安全性・性状に問題はなかった。また標識率の測定も行ったが、標識率は95%以上と良好であった。室温にて解凍後、^{99m}TcO⁴⁻を混入して標識し

た。

740MBq を経静脈的に投与し、90分後、全身撮像と胸部のSPECT撮像を行った。

6名中5名の患者ではほぼ同時期(1週間以内)にアミロイドのみならず炎症や腫瘍にも非特異的に集積する Tc-99m (V) DMSA による核医学検査も施行した。

(倫理面への配慮)

Tc-99m アプロチニン検査について、当院 IRB での承認を得、研究内容についての説明を研究対象者に行い、同意を得た上で検査を施行した。

C. 研究結果

Tc-99m アプロチニン検査の結果は、心に集積を認めた患者が2名であった。1名は最終的に家族性ポリアミロイドニューロパチーと診断された(図1)。この患者の心/バックグラウンドのカウント比は1.87と異常高値を示していた。もう1名は透析中の患者で、長期心不全の既往があり、生検は行われず、経過観察とされた。他の4例のうち1例は破壊性脊椎炎と手根管症候群のある透析患者で関節と両肺野、皮下結節に集積増加が認められた。他の3名の患者では明らかな異常集積増は認められなかった。Tc-99m DMSA (V) との比較では、破壊性脊椎炎と手根管症候群のある患者では手関

節を含む多くの関節にTc-99m DMSA (V) と Tc-99m アプロチニンの双方の集積増加が認められた。Tc-99m アプロチニンで異常所見の認められなかった3名の患者では、Tc-99m DMSA (V) 検査では多数の関節にて異常集積増加が認められた。なおTc-99m DMSA (V) 検査では血液プール像があるため心筋集積の有無は評価できなかった。

D. 考察

Tc-99m アプロチニンは、Tc-99m DMSA (V) と比較し、アミロイドへの集積について特異性が高いと考えられた。今回は最終的に家族性アミロイドポリニューロパチーと診断された症例において異常な心集積を認めた。この検査の結果をふまえて胃生検が加えられ、最終的な確定診断に至った。臨床診断を行うための検査として有用性が高いと考えられた。

E. 結論

従来の報告どおり、アミロイドーシスにおいてTc-99m アプロチニンの集積は特異的と考えられた。特に心アミロイドーシスの診断において有用なことが確認された。評価も容易で、バックグ

ラウンドとの比の算出により半定量化も可能である。今後は新しい活用法として、治療効果判定への利用が期待できる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 今林悦子、松田博史：アミロイドーシスの画像診断. 腎と透析, 62 巻 2 号: 177-184, 2007 年.

2. 学会発表

1) 今林悦子、松田博史、久慈一英：^{99m}Tc 標識アプロチニンキットの合成とイメージング. 第 47 回日本核医学会 仙台 2007 年 11 月.

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

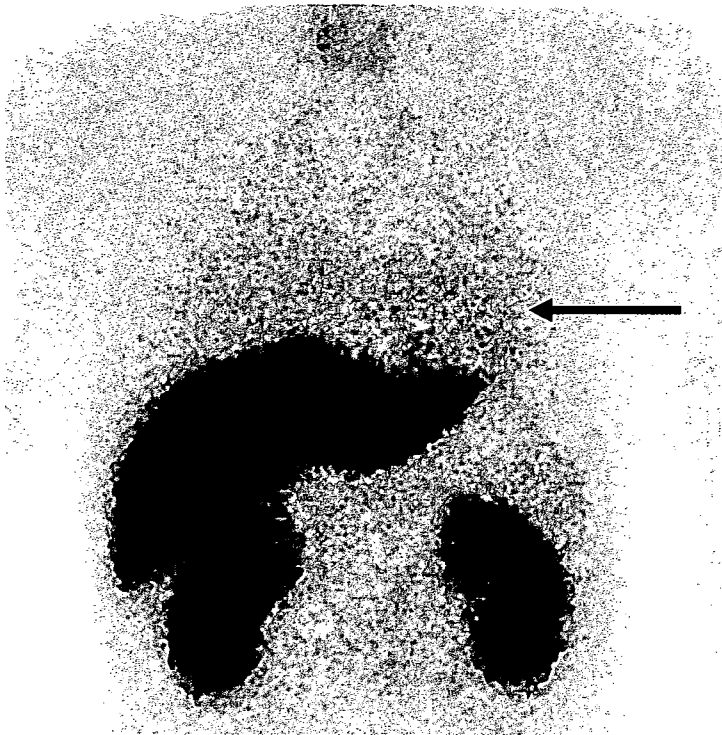


図1-1

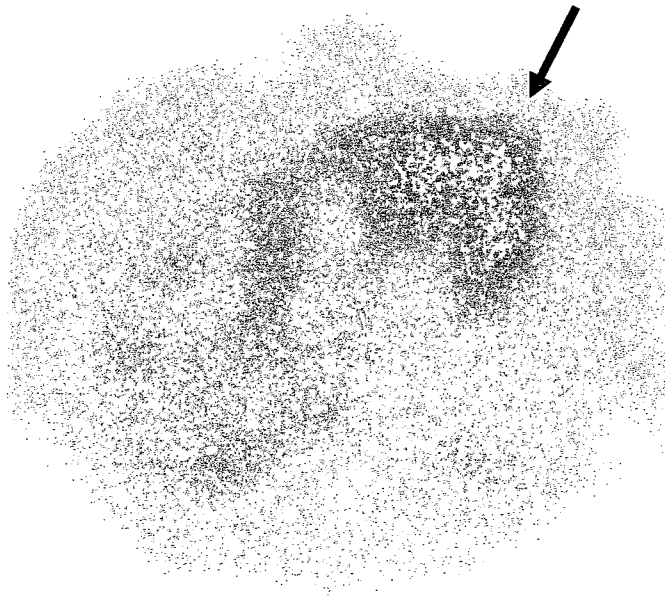


図1-2

図1 Tc-99m アプロチニンによるアミロイドシンチグラフィ検査
図1-1: 前面プラナー像、図1-2: SPECT横断画像
心筋への集積を黒矢印で示す。

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

新たな手法を用いたハイスループットな異型トランスサイレチンの分析
 —検査室で可能な迅速かつ確実な FAP 診断法の確立—

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、*城野 博史、*大林 光念、*中村 政明、**山下 太郎、
 三隅 洋平、内野 誠
 熊本大学大学院医学薬学研究部 *病態情報解析学、**同神経内科

研究要旨 質量分析装置を用いた異型トランスサイレチン (TTR) の分析は FAP の診断や治療後の経過観察、病態解析などに有用な方法である。しかし、従来の免疫沈降物などを用いた TTR 質量分析には数日間の時間と熟練した研究室レベルの技術が必要であり、病院の検査室レベルで行われる日常の診療手法としては実施が困難であった。病院の検査室レベルで日常診療として実施可能な迅速かつ確実な FAP 診断法の確立を目的として、ハイスループットな SELDI-TOF MS システムを用いて異型 TTR の解析を検討した。SELDI-TOF MS 法では、抗 TTR 抗体を用いた免疫沈降物の作成を行う必要なく、希釈したサンプルを直接プロテインチップにアプライすることにより、1 ステップのみの約 3 時間で簡便に異型 TTR を解析できることが判明した。異型 TTR の質量変化は遺伝子検査で同定されたアミノ酸変異と一致した。また、従来の免疫沈降物を用いた MALDI -TOF MS 法では検出困難であった TTR 変異型である ATTR Y114C が、測定条件を変えることにより SELDI-TOF MS で検出可能であることも判明し、本方法を用いることで新たな病態解析が可能となった。WT TTR と ATTR V30M のピーク比で、それぞれの存在比が算出できることが判明し、溶液中の WT TTR と ATTR V30M の存在比率解析がハイスループットに行うことが可能と考えられる。FAP 患者の治療前後などのフォローアップにも有用な検査方法になると思われる。

A. 研究目的

家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) は肝移植という治療法のある遺伝性神経変性疾患である。病態の進行していない発症初期に肝移植を施行すると治療効果が高く、予後が良好であるため、FAP の診断は迅速に行う必要がある。

我々は迅速かつ確実な FAP の診断を実現するため、特徴的な臨床症候を捉えることに加えて、1. 遺伝子検査、2. 質量分析装置を用いた異型白質の分析、3. 病理学的な解析を行ってきた (図 1)。

質量分析装置を用いた異型トランスサイレチン (TTR) の分析は FAP の診断や治療後の経過観察、病態解析などに有用な方法である。しかし、従来の免疫沈降物などを用いた TTR 質量分析には数日間の時間と熟練した研究室レベルの技術が必要であり、病院の検査室レベルで行われる日

常の診療手法としては実施が困難であった。

新たな質量分析装置である Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization - Time Of Flight Mass Spectrometry (SELDI-TOF MS) は独自に設計された各種のプロテインチップを用いることで、測定までの検体処理を簡便かつ迅速に行うことが可能である。ハイスループットな本解析システムを用いて異型 TTR の解析が可能であるか検討し、病院の検査室レベルで日常診療として実施可能な迅速かつ確実な FAP 診断法の確立を本研究の目的とする。

B. 研究方法

陰イオン交換体がコーティングされている Q10 と陽イオン交換体がコーティングされている CM10 のプロテインチップを用い pH 3, 4, 5,