

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

AL アミロイドーシスに対する臨床試験における血清遊離軽鎖測定の有用性

研究分担者 島崎千尋 社会保険京都病院血液内科
 共同研究者 淵田真一、岡野 晃、初瀬真弓、村頭 智
 社会保険京都病院血液内科

研究要旨 AL アミロイドーシス分科会では、AL アミロイドーシスに対するボルテゾミブ・メルファラン・デキサメタゾン (BMD) 療法の安全性と有用性を検証する臨床試験を計画している。治療効果判定には第 10 回国際アミロイド・アミロイドーシス会議コンセンサス・オピニオンによる効果判定基準を用いるが、血液学的効果判定には血清遊離軽鎖 (free light chain: FLC) の測定が必須である。そこで、AL アミロイドーシスにおける血清 FLC 測定の有用性と問題点について検討した。血清 FLC の測定は AL アミロイドーシスの診断、全身性と限局性との鑑別、治療効果判定、治療継続の判定、予後の推定に有用であるが、全身性でありながら κ/λ 比正常の症例が存在すること、効果判定基準の対象からはずれる血清 FLC 値 100mg/L 未満の症例が 37%にみられることが課題として挙げられた。

A. 研究目的

当研究班 AL アミロイドーシス分科会では原発性 AL アミロイドーシスに対するボルテゾミブ・メルファラン・デキサメタゾン (BMD) 療法の安全性と有用性に関する臨床第 I/II 相試験を計画している。本試験における治療効果判定には第 10 回国際アミロイド・アミロイドーシス会議コンセンサス・オピニオンによる効果判定基準を用いている。この基準は、血液学的効果と臓器効果から構成される。血液学的効果の判定には血清遊離軽鎖 (free light chain: FLC) の測定が必須である。本邦においても 2010 年 8 月、Biding site 社製の測定キットが発売された。そこで、AL アミロイドーシスの臨床試験における血清 FLC 測定の有用性と問題点について検討した。

B. 研究方法

AL アミロイドーシス 24 例の血清 94 検体を対象とした。症例の年齢は 49~75 歳、男性 9 例、女性 15 例、全身性 20 例、限局性 4 例 (咽頭・肺・腎盂・消化管)、4 例が多発性骨髄腫を合併していた。障害臓器は、腎臓 14 例、消化管 13 例、心臓 9 例、神経 7 例、肝臓 4 例であった。 κ 型 4 例、 λ 型 20 例 (83%) であった。凍結保存血清中の

FLC 値を Biding site 社製の測定キットで測定した。

(倫理面への配慮)

患者データは匿名化して集団として処理し、患者個人が特定されないよう配慮した。

C. 研究結果

全身性 AL アミロイドーシスでは 19 例中 17 例で FLC κ/λ 比 (rFLC: 正常値 0.26~1.65) の異常がみられた。正常値を示した 2 例はいずれも IgG λ 型 M 蛋白を認めた。限局性 AL アミロイドーシスの 4 例はいずれも rFLC は正常であった。診断時の異常クローンの血清 FLC 絶対値 (iFLC 値) は 19 例中 7 例 (37%) で 100 mg/L 以下であった。診断時の血清 iFLC 値 152 mg/L 以上は予後不良とされるが、治療により CR を達成した 6 例では全例血清 iFLC 値は 152 mg/L 以下であった。また、CR 達成例の全例が生存中であるのに対し、CR 未達成 13 例中 6 例が死亡していた。また、CR 達成症では臓器効果がみられた。

D. 考察

AL アミロイドーシスに対する BMD 療法の臨床試験において、効果判定に使用する血清 FLC 測

定の有用性と問題点について検討した。従来の報告の通り、血清 FLC の測定は、AL アミロイドーシスの診断、予後予測、モニタリングに有用と考えられた。さらに、本検査は全身性と限局性の鑑別にも有用と考えられた。しかし、全身性と考えられる症例でも rFLC が正常を示す症例（19 例中 2 例）がみられ、当然のことながら AL アミロイドーシスの診断には組織学的検査が必要である。

一方、第 10 回国際アミロイド・アミロイドーシス会議コンセンサス・オピニオンによる効果判定基準では測定可能病変（血清 M 蛋白 0.5g/dL 以上あるいは尿 M 蛋白 100mg/日以上）がない場合、iFLC 値 100mg/L 以上の症例では部分奏効の効果判定に FLC 値を使用することになっている。しかし、実際には 37% の症例が iFLC 値 100mg/L 以下であり、これらの症例に対する効果判定は今後の課題である。

E. 結論

血清 FLC の測定は AL アミロイドーシスの診断、全身性と限局性との鑑別、予後予測、モニタリング、効果判定に有用であるが、効果判定基準については更なる検討が必要と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 島崎千尋、村上博和、澤村守夫、松田正之、木下朝博、畑 裕之、杉浦 勇、津下圭太郎、名倉英一、小杉浩史、伊藤淳治、清水一之：単クローン性 γ グロブリン血症における血清遊離軽鎖測定の実用性。 *臨床血液* 51:245-252, 2010.

2) 淵田真一、島崎千尋：Free light chain をマーカーとした新たな骨髄腫臨床の展望。 *血液フロンティア* 20:1041-1047, 2010.

3) Shiga K, Mizutani R, Isayama R, Shimazaki C, Tokuda T, Nakagawa M: Amyloid myopathy: a therapeutic trial for the rare and underdiagnosed myopathy with bortezomib. *J Neurol* 257:2091-2093, 2010.

4) 島崎千尋：血清遊離軽鎖測定導入による多発性骨髄腫診療の進歩。 *臨床血液* 51:1491-1498, 2010.

2. 学会発表

1) 島崎千尋：血清遊離軽鎖測定導入による多発性骨髄腫診療の進歩。第 72 回日本血液学会学術集会, 横浜, 9.24-26, 2010.

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

原発性 AL アミロイドーシスにおける化学療法の長期効果

研究協力者 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 加藤修明、田澤浩一、福島和広、下島恭弘、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

研究要旨 自施設で強力な化学療法を行なった原発性 AL アミロイドーシス患者 47 名について、生命予後と臓器機能障害を後方視的に検討した。化学療法の内訳はメルファラン大量静注＋自家末梢血幹細胞移植 (HDM/SCT) 26 名、VAD 単独 (ビンクリスチン、ドキシソルビシン、デキサメサゾン) 13 名、M-Dex (メルファラン＋デキサメサゾン) 8 名。治療後の血清 free light chain (FLC) κ/λ 比の正常化率と 5 年生存率はいずれも HDM/SCT 群、VAD 単独群、M-Dex 群の順に高かった。FLC κ/λ 比が正常化すれば、いずれの治療群でも生命予後は良好で、ネフローゼ症候群を呈した患者では 1 日尿蛋白と血清アルブミン値に改善が見られた。臓器障害が進行した一部の患者では肝臓破裂やクリプトコッカス髄膜炎などの重篤な合併症が見られた。原発性 AL アミロイドーシスにおける化学療法は、血清 FLC κ/λ 比を正常化させることができれば生命予後と臓器障害の両面で改善が期待できるが、経過中に重篤な有害事象が出現する可能性もあり、使用する薬剤やその薬用量に関しては慎重な検討を要する。

A. 研究目的

原発性 AL アミロイドーシスは異常免疫グロブリン軽鎖由来のアミロイドが全身の諸臓器に沈着して機能障害を引き起こす予後不良の難治性疾患である。1990 年代から原因蛋白を産生している異常形質細胞を標的としたメルファラン大量静注＋自家末梢血幹細胞移植 (HDM/SCT) などの化学療法が積極的に行われるようになり、その予後は劇的に改善した。今回、我々は自施設で化学療法を行なった患者を生命予後と臓器機能障害の観点から後方視的に検討した。

B. 研究方法

対象は 2002 年 4 月から 2010 年 10 月までの間に当科を受診した 182 名の原発性全身性 AL アミロイドーシス患者のうち、我々が作成したフローチャート (Amyloid 11: 245-256, 2004) で治療方針を決定して化学療法を行った 47 名。診療録を調べ臨床経過と臓器障害の推移について検討した。治療に対する血液学的反応性の評価には血清 free light chain (FLC) κ/λ 比を用いた。また、生存率の比較は Kaplan-Meier 法で検討した。

(倫理面への配慮)

現在の病状から考えられる治療の選択肢や予想される有害事象について患者さんに十分に説明を行い、同意を得た上で治療を行った。今回のデータの解析にあたっては個人が特定できないよう倫理的側面に配慮した。

C. 研究結果

平均発症年齢は 50.8±8.6 歳 (男：女=25：22)。化学療法の内訳は HDM/SCT+VAD 22 名、HDM/SCT 単独 4 名、VAD 単独 (ビンクリスチン、ドキシソルビシン、デキサメサゾン) 13 名、M-Dex (メルファラン＋デキサメサゾン) 8 名であった。VAD を用いた前治療を行わず HDM/SCT を単独で行なった 4 名は、いずれも末梢神経障害と進行した心機能障害のいずれかを伴っていた。HDM/SCT 群 (26 名) のうち 3 名は 1 回目の治療では血清 FLC κ/λ 比が正常化せず、また 1 名はいったん正常化したものの 2 年以内に再び異常に転じ、メルファランを増量して 2 回目の治療を行った。この 4 名を含む 21 名 (80.8%) では治療後に血清 FLC κ/λ 比は正常

化した。残りの5名のうち4名は臓器障害の進行のために治療後4か月以内で死亡した。VAD単独群（13名）では1-3サイクルの投与により7名でFLC κ/λ 比は正常化した（53.8%）。M-Dex群（8名）では最大で8サイクルまで施行し、3名でFLC κ/λ 比が正常化した（37.5%）。

Kaplan-Meier法による生命予後の検討では（図1）、5年生存率がHDM/SCT群で約72%、VAD単独群で約57%、M-Dex群で約30%であった。HDM/SCT群は最初の治療例から9年を経過し、60%以上の累積生存率を保っているのに対し、VAD単独群とM-dex群では50%生存率がそれぞれ72.0 \pm 52.1か月、41.0 \pm 27.3か月であった。血清FLC κ/λ 比が治療後に正常化した群では、非正常化群と比較して有意に生存率が高かった（図2）。

臓器機能障害の検討は、主症状として最も多かったネフローゼ症候群/蛋白尿を呈した29名について行った。29名中20名で治療により血清FLC κ/λ 比の正常化が見られ、その全例で1日尿蛋白（図3A）と血清アルブミン（図3B）の改善が認められた。2回目のHDM/SCTでFLC κ/λ 比が正常化した1名と、いったんFLC κ/λ 比が正常化したものの再び異常に転じた1名とを含む9名では、1日尿蛋白と血清アルブミンに明らかな改善は見られなかった。

Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE), Ver. 4でgrade 3以上の有害事象はHDM/SCT群でのべ8名、VAD単独群でのべ9名、M-Dex群でのべ4名に見られた。感染症に起因するものが最も多かったが、肝臓破裂やクリプトコッカス髄膜炎といった原病に起因する重篤な合併症がM-Dex群の2名に見られた。

D. 考察

生命予後はHDM/SCT群、VAD単独群、M-Dex群の順に良好であったが、最初の化学療法を決定する段階で当施設のプロフローチャートで患者の振り分けを行っているため、臓器障害の少ない軽症者がもともとHDM/SCT群に選択されている。したがって今回の結果をもって治療法の有効性について論ずることはできない。しかしながら、どの治療群においても血清FLC κ/λ 比が正常化すれば、生命予後と臓器機能障害、特にネフローゼ症候群/蛋白尿は改善しうることは明らかとなった。

可能な限り血清FLC κ/λ 比の正常化をめざして化学療法を行うべきである。ただし、重篤な有害事象が治療中止や死亡の原因となることがあり、化学療法前に臓器障害の程度を正確に評価し、それに見合った治療法を選択することがなにより重要である。

E. 結論

原発性全身性ALアミロイドーシスにおける異常形質細胞を標的とした化学療法は、血清FLC κ/λ 比を正常化させることができれば生命予後と臓器障害の両面で改善が期待できる。しかしながら重篤な有害事象が出現する可能性もあり、適応に関しては慎重に検討する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Matsuda M, Gono T, Katoh N, Yoshida T, Tazawa K, Shimojima Y, Morita H, Ikeda S: Peripheral nerve involvement in primary systemic AL amyloidosis. *Eur J Neurol*, in press.

2) Katoh N, Matsuda M, Tsuchiya-Suzuki A, Ikeda S: Regression of gastroduodenal amyloid deposition in primary systemic AL amyloidosis after intensive chemotherapies. *Br J Haematol*, in press.

3) Miyazaki D, Yazaki M, Ishii W, Matsuda M, Hoshii Y, Nara K, Ikeda S: A rare nodular lung lesion consisting of adenocarcinoma and amyloid deposition in a patient with primary systemic AL amyloidosis. *Intern Med*, in press.

2. 学会発表

1) 松田正之、加藤修明、福島和広、下島恭弘、森田洋、池田修一：多発神経炎を呈する全身性ALアミロイドーシスの長期予後．第51回日本神経学会総会、東京、5.22、2010.

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

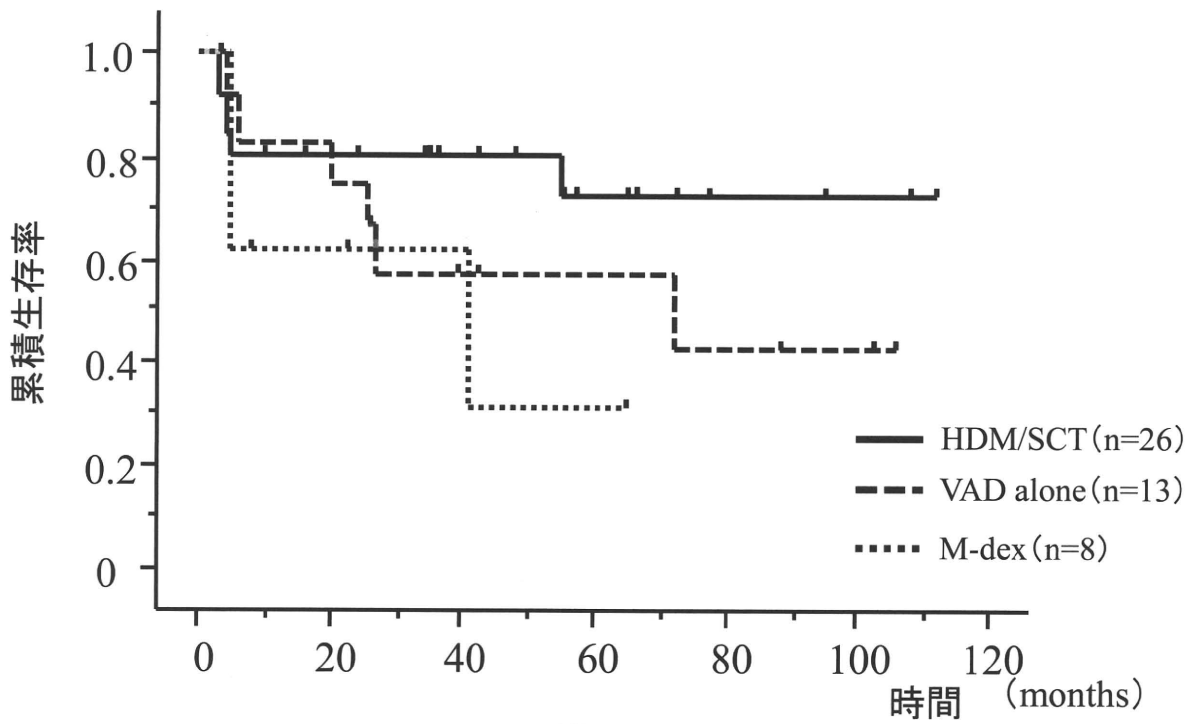


図1

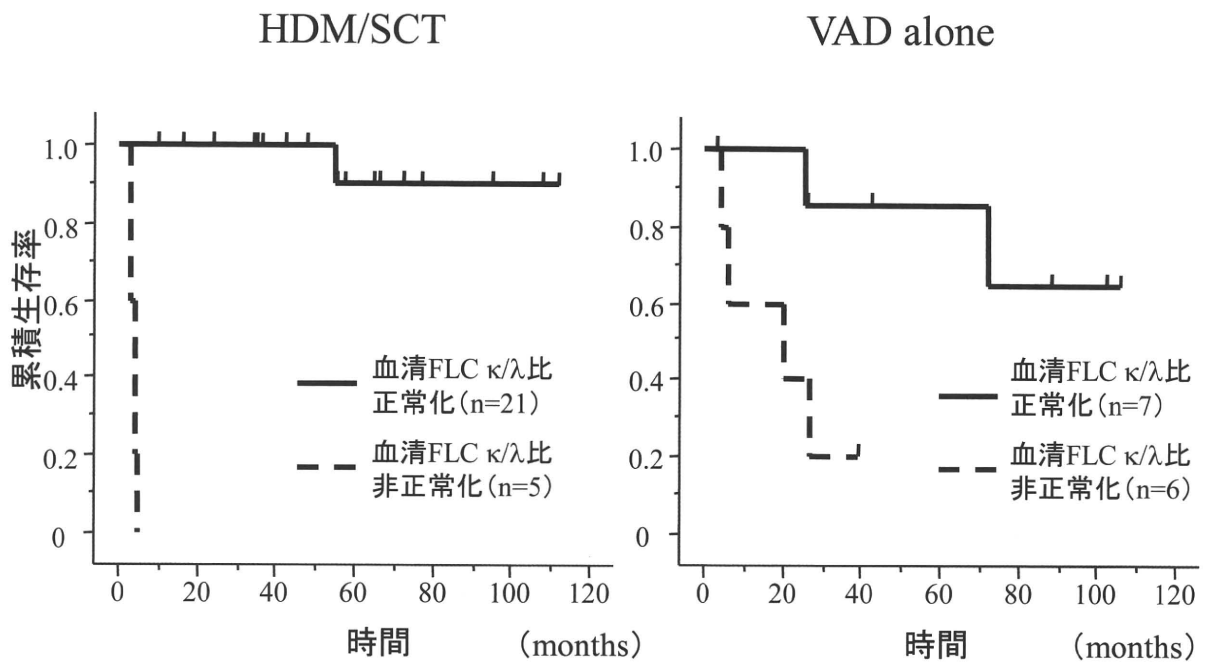


図2

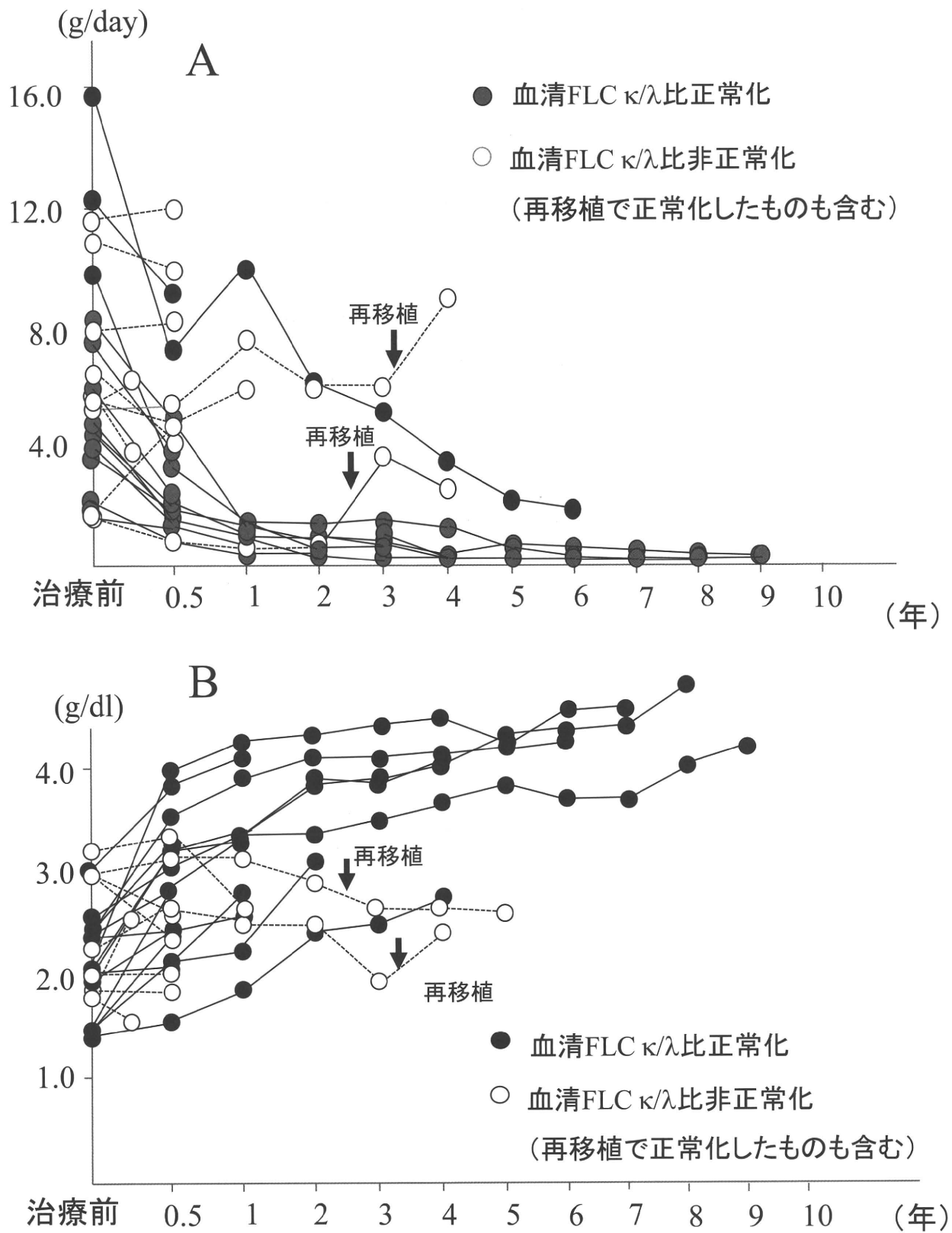


図3

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

原発性 AL アミロイドーシスの治療法と予後に関する 多施設共同後方視的研究

研究分担者 麻奥英毅 広島赤十字・原爆病院検査部

研究要旨 わが国における AL アミロイドーシスに対する自家造血幹細胞移植併用大量化学療法 (ASCT) および非 ASCT 治療法の治療成績と予後影響因子を明らかにすることを目的とした多施設共同後方視的調査研究を立案した。

A. 研究目的

多施設共同の後方視的調査研究によりわが国における原発性全身性 AL アミロイドーシスの治療成績と予後因子をあきらかにする。

B. 研究方法

試験デザインは多施設共同の後方視的調査研究とする。

対象は 2001 年 1 月から 2009 年 12 月までに研究参加施設において治療した原発性全身性 AL アミロイドーシス患者である。対象患者の治療前臨床所見、血液検査所見、生理検査所見について調査票を用いてデータを集めて治療反応性と予後および臓器障害の改善度を解析する。生物統計学的方法により奏効率、生存曲線、無増悪生存曲線を求める。これらについては治療法ごとの解析も行う。治療前臨床所見、血液検査所見、生理検査所見について予後との相関を解析し相関を認めた因子については多変量解析を行い、予後に影響する因子を決定する。

(倫理面への配慮)

臨床研究に関する倫理指針、ヘルシンキ宣言に基づく倫理原則を遵守して実施する。個人情報の保護のため連結可能匿名化して情報の収集を行う。文部科学省、厚生労働省によって作成された「疫学研究に関する倫理指針」に従い、患者個人の同意取得は必要としないが、参加各施設の倫理委員会の承認と、施設長の許可を必要とする。

C. 研究結果

今年度は準備期間とし次年度より開始。調査期間は平成23年5月1日より10月31日までとする。

D. 考察

わが国の全身性 AL アミロイドーシスに対する ASCT の歴史は 2002 年に ASCT のプロトコルを作成したことに始まる。当初実施施設は数施設であったが 8 年が経過し現在では多く施設において施行され、症例が蓄積されてきた。欧米ではすでに AL アミロイドーシスに対する ASCT を解析した多くの論文が出ているが本邦ではまとまった報告がない。また現在 ボルテゾミブやレナリドマイドなど有用な新規薬剤が登場したことから新たな治療戦略を検討する時期にある。よって多施設共同の調査研究によって得られた結果は今後の治療研究を進展させていく上で貴重な基礎データとなりうる。

E. 結論

わが国における原発性全身性 AL アミロイドーシスの治療成績と予後因子をあきらかにするために多施設共同の後方視的調査研究が必要である。

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

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における糞中 AApoAII アミロイド線維の解析 伝播性の強い AApoAII アミロイド線維が発症中期に出現する

研究分担者 樋口京一 信州大学大学院医学系研究科加齢生物学分野

共同研究者 王 耀勇*、亀谷富由樹**、銭 金澤*、張 蓓茹*、付 笑影*、澤下仁子*、
 森 政之*、樋口京一*

*信州大学大学院医学系研究科加齢生物学分野、

**東京都精神医学総合研究所科

研究要旨 マウス老化アミロイドーシス (AApoAII) や反応性アミロイドーシス (AA) では、アミロイド線維を介した伝播 (Prion-like transmission) が発症に重要な役割を果たすことが明らかになりつつある。我々は糞中のアミロイド線維を介した伝播に注目して来た。マウス AApoAII アミロイドーシスを用いて、異なった発症時期における糞に含まれるアミロイド線維の生化学的特性と伝播力を解析した。アミロイド線維投与による誘発後、アミロイド沈着程度は 7 ヶ月後まで増加し、その後はほぼ横ばいになった。糞中に排出されるアミロイド線維は投与後 7 ヶ月で最も多くなり、その後は減少し、15 ヶ月ではほとんど検出されなくなかった。投与後 7 ヶ月の糞中には低分子量 (C 末端 68-78 番目のアミノ酸配列が欠失) の apoA-II モノマーが観察された。アミロイド線維あたりの伝播性は投与後 7 ヶ月の糞で最も強かった。これらの結果は、伝播性が強く、生化学的特性が異なる AApoAII アミロイド線維がアミロイドーシス発症中期の糞中出现し、個体間伝播に何らかの役割を果たす可能性を示している。

A. 研究目的

マウス老化アミロイドーシス (AApoAII) や反応性アミロイドーシス (AA) では、アミロイド線維を介した伝播 (Prion-like transmission) が発症に重要な役割を果たすことが明らかになりつつある。アミロイドーシスの個体間伝播の実態を把握し、予防するには、伝播経路を明らかにすることが重要である。我々は、マウス AApoAII アミロイドーシスやチーターAA アミロイドーシスの解析により、糞中に強い伝播性を持つアミロイド線維が存在することを明らかにして来た (Xing Y, Lab Invest 2001, Zhang B, PNAS 2008)。さらに、最近では、シカのプリオン病 (CWD) でも糞が感染に重要であることが報告されている (Tamgüney G, Nature 2009)。今回、マウス AApoAII アミロイドーシスについて、異なった発症時期における糞に含まれるアミロイド線維の生化学的特性と伝播力を解析した。

B. 研究方法

2 ヶ月齢の雌 R1.P1-*Apoa2^c* マウスに AApoAII アミロイド線維 100 μ g を静脈注射し、アミロイドーシスを発症させた。誘発 0, 0.5, 1, 2, 4, 7, 15 ヶ月後に新鮮な糞を採取した。またマウスを屠殺して全身臓器を採取した。各臓器の組織切片をコンゴ・レッド染色後、偏光顕微鏡下で緑色偏光を確認し、アミロイド沈着程度 (AI; Amyloid Index) を調べた。また、Pras らの方法で新鮮糞からアミロイド線維を抽出し、チオフラビン T (ThT) 蛍光法によって線維含量を測定した。抽出したアミロイド線維の特性を Western blot 法、アミノ酸配列解析および電子顕微鏡で解析した。さらに、各月齢の糞中アミロイド線維 1.0 μ g を 2 ヶ月齢の雌 R1.P1-*Apoa2^c* マウスに静脈注射し、2 ヶ月後のアミロイド沈着程度を調べ、伝播力を解析した。

(倫理面への配慮)

動物を用いた実験に関しては信州大学動物実

験等実施規定により信州大学動物実験委員会の審査を経て学長の承認を得ている（実験計画 No.190007, 210029, 220003, 動物実験室 No.192011）。

C. 研究結果

AApoAIIアミロイド線維投与0.5ヶ月後にはアミロイド線維が沈着し始め、その後、全身での沈着程度 (AI) が増加し、7ヶ月後には最大値に達し、その後はプラトーになった (図1A)。ThT法では、線維投与4ヶ月から糞中アミロイド線維が検出され、7ヶ月後まで増加したが、その後は減少し、15ヶ月後ではほとんど検出されなかった。Western blot法でモノマー量を解析すると、ThT法と同様な結果であり、15ヶ月後ではモノマーはほとんど検出されなかった (図1B)。特に、7ヶ月後の糞からは低分子サイズのモノマーが検出され、アミノ酸配列解析の結果、これはC末端68-78番目のアミノ酸配列が欠失している事が明らかになった (図1C)。線維1 µgあたりの伝播力は7ヶ月後が最強で、肝臓由来線維よりも有意に強い伝播を示した。一方、15カ月後の糞の線維分画は伝播力は非常に弱かった (図1D)。

D. 考察

最近、Prion-like な seeding 効果に基づいた伝播 (transmission) が様々なアミロイド関連疾患 (アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、タウオパチー等) の発症や進展に重要な役割を果たすことが示唆されている。特にマウス老化アミロイドーシス (AApoAII) や反応性アミロイドーシス (AA) では、アミロイド線維を介した「個体間の伝播」が発症に重要な役割を果たすことが明らかになりつつある。アミロイドーシスの個体間伝播の実態を把握し、予防するには、伝播経路を明らかにすることが重要である。我々はこれまでに糞を介したアミロイドーシスの伝播に注目してきた。今回はアミロイドーシスの誘発 (アミロイド線維の投与) から継時的 (0.5 - 15ヶ月) に新鮮な糞を採取して、アミロイド線維の含有量と伝播力を解析して、総合的な伝播の危険時期を明らかにしようとした。

糞中へのアミロイド線維の排泄はアミロイド

ーシスの全身への沈着が進展している誘発4ヶ月後から顕著になり、7ヶ月後には全身の沈着程度がピーク値に達するのと平行して、糞中の線維量も最大になった。その後は、重篤なアミロイド沈着は維持されるが、糞への排出量は減少し、15ヶ月後には排出されなくなった。この様な糞への線維排出量の変動のメカニズムは不明であるが、1) 線維沈着が急速に進んでいるときにオリゴマーや未成熟な線維が排出され、線維の成熟が進むと排出され難くなる。2) マウスの加齢に伴い、腸での蛋白質分解酵素や免疫細胞の働きが弱くなる。等の可能性が考えられるが、今後の研究課題である。

アミロイーシス誘発7ヶ月後の糞には分子量が小さくC末端のアミノ酸配列を欠く apoA-II 分子種が含まれ、この分子種を含む糞アミロイド線維は肝臓線維に比較して、有意に高い伝播力 (線維1 µg 当たり) を示した。この低分子量 apoA-II は大腸内の糞や新鮮糞にのみ含まれている様であるが、その起源と構造的特性を解析する必要がある。

糞を介した伝播が、ヒト患者でのアミロイドーシス発症に関与する可能性は低いと考えられるが、マウス AApoAII アミロイドーシスを用いた詳細な解析は、アミロイドーシスの伝播のメカニズムと予防法の解析に重要な情報を与えると考えている。

E. 結論

伝播性が強く、生化学的特性が異なる AApoAII アミロイド線維がアミロイドーシス発症中期に糞中に出現し、個体間伝播に重要な役割を果たす可能性が示された (図2)。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Qian J, Yan J, Ge F, Zhang B, Fu X, Tomozawa H, Sawashita J, Mori M, Higuchi K: Mouse senile amyloid fibrils deposited in skeletal muscle exhibit amyloidosis-enhancing activity. *PLoS Pathogens*

6:e1000914, 2010.

2) Zhang P, Fu X, Sawashita J, Yao J, Zhang B, Qian J, Tomozawa H, Mori M, Ando Y, Naiki H, Higuchi K: Mouse model to study human A β 2M amyloidosis: Generation of a transgenic mouse with excessive expression of human β 2-microglobulin. *Amyloid* 17:50-62, 2010.

3) Chambers JK, Kanda T, Shirai A, Higuchi K, Ikeda SI, Une Y: Senile systemic amyloidosis in an aged savannah monkey (*Cercopithecus aethiops*) with tenosynovial degeneration. *J Vet Med Sci* 72:657-659, 2010.

4) 銭 金澤、弘瀬雅教、王 耀勇、張 蓓茹、付笑影、澤下仁子、張 鵬堯、友澤 寛、森 政之、中井 彰、樋口京一：マウス老化アミロイドーシスにおける熱ストレス反応の役割；HSF1 ノックアウトマウスを用いた解析. *基礎老化研究* 34:23-26, 2010.

5) 樋口京一、池田修一：全身性アミロイドーシスの伝播. 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「プリオン病及び遅発性ウイルス感染症に関する研究調査班」(編) *プリオン病と遅発性ウイルス感染症* pp44-50, 2010.

6) 樋口京一：全身性アミロイドーシス. 山田正仁 (編) *アミロイドーシス診療のすべて-ガイドライン完全詳解-*, in press.

7) Higuchi K, Mori M, Sawashita J: Mouse senile systemic AApoAII amyloidosis; pathology, genetics and transmission. Takeda T (ed), *The Senescence-Accelerated Mouse (SAM): Achievements and Future Directions* Elsevier, in press.

2. 学会発表

1) 王 耀勇、銭 金澤、田 耕、澤下仁子、森 政之、樋口京一：炎症反応性 AA アミロイドーシスにおけるアポリポ蛋白質 A-II の機能. 第 99 回日本病理学会総会、東京、4. 27-29、2010.

2) 銭 金澤、弘瀬雅教、王 耀勇、張 蓓茹、付笑影、澤下仁子、張 鵬堯、友澤 寛、森 政之、中井 彰、樋口京一：マウス老化アミロイドーシスにおける熱ストレス反応の役割. 第 99 回日本病理学会総会、東京、4.27-29、2010.

3) 王 耀勇、銭 金澤、田 耕、澤下仁子、森 政

之、樋口京一：炎症反応性 AA アミロイドーシスにおけるアポリポ蛋白質 A-II の機能. 第 57 回日本実験動物学会総会、京都、5.12-14、2010.

4) 澤下仁子、亀谷富由樹、長谷川一浩、張 蓓茹、王 耀勇、森 政之、内木宏延、樋口京一：マウス F 型 apolipoprotein A-II (apoA-II) の C 末アミノ酸配列はアミロイド線維形成を阻止する. 日本基礎老化学会第 33 回大会、名古屋、6.17-18、2010.

5) 銭 金澤、弘瀬雅教、張 蓓茹、王 耀勇、付笑影、澤下仁子、張 鵬堯、友澤 寛、森 政之、中井 彰、樋口京一：マウス老化アミロイドーシスにおける熱ストレス反応の役割：HSF1 ノックアウトマウスを用いた解析. 日本基礎老化学会第 33 回大会、名古屋、6.17-18、2010.

6) 王耀勇、銭金澤、亀谷富由樹、張 蓓茹、付笑影、澤下仁子、森政之、樋口京一：SAMR1C マウスにおける糞中 AApoAII アミロイドの解析. 第 25 回老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会、金沢、7.9-10、2010.

7) 銭 金澤、弘瀬雅教、張 蓓茹、王 耀勇、付笑影、澤下仁子、張 鵬堯、友澤 寛、森 政之、中井 彰、樋口京一：HSF1 ノックアウトにおける老化アミロイドーシスの促進. 第 25 回老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会、金沢、7.9-10、2010.

8) 樋口京一：モデル動物から学ぶ老化と予防医療. 第 25 回老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会. 公開講座「食と老化、脳機能」、金沢、7.9-10、2010.

9) Sawashita J, Higuchi K: ApoA-II and amyloidosis: Molecular mechanism of transmissible amyloidoses. The 3rd International Symposium on P rotein Community, Nara, Japan, 9.13-16, 2010.

10) Sawashita J, Kametani F, Hasegawa K, Mori M, Naiki H, Higuchi K: Transmissible amyloid fibrils formed by selective N-, C-terminal sequences of mouse apolipoprotein A-II. The 3rd International Symposium on P rotein Community, Nara, Japan, 9.13-16, 2010.

11) Qian J, Yan J, Ge F, Zhang B, Fu X, Tomozawa H, Sawashita J, Masayuki M, Keiichi H: Mouse apoA-II amyloid fibrils deposits in skeletal muscle and exhibit amyloidosis enhancing activity. The 3rd International Symposium on Protein Community,

Nara, Japan, 9.13-16, 2010.

12) Higuchi K: Transmission of amyloidosis in mouse and cheetah. Implication in human systemic amyloidosis. International Symposium on Transmission of Amyloidosis, Tokyo, 1.27, 2011.

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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

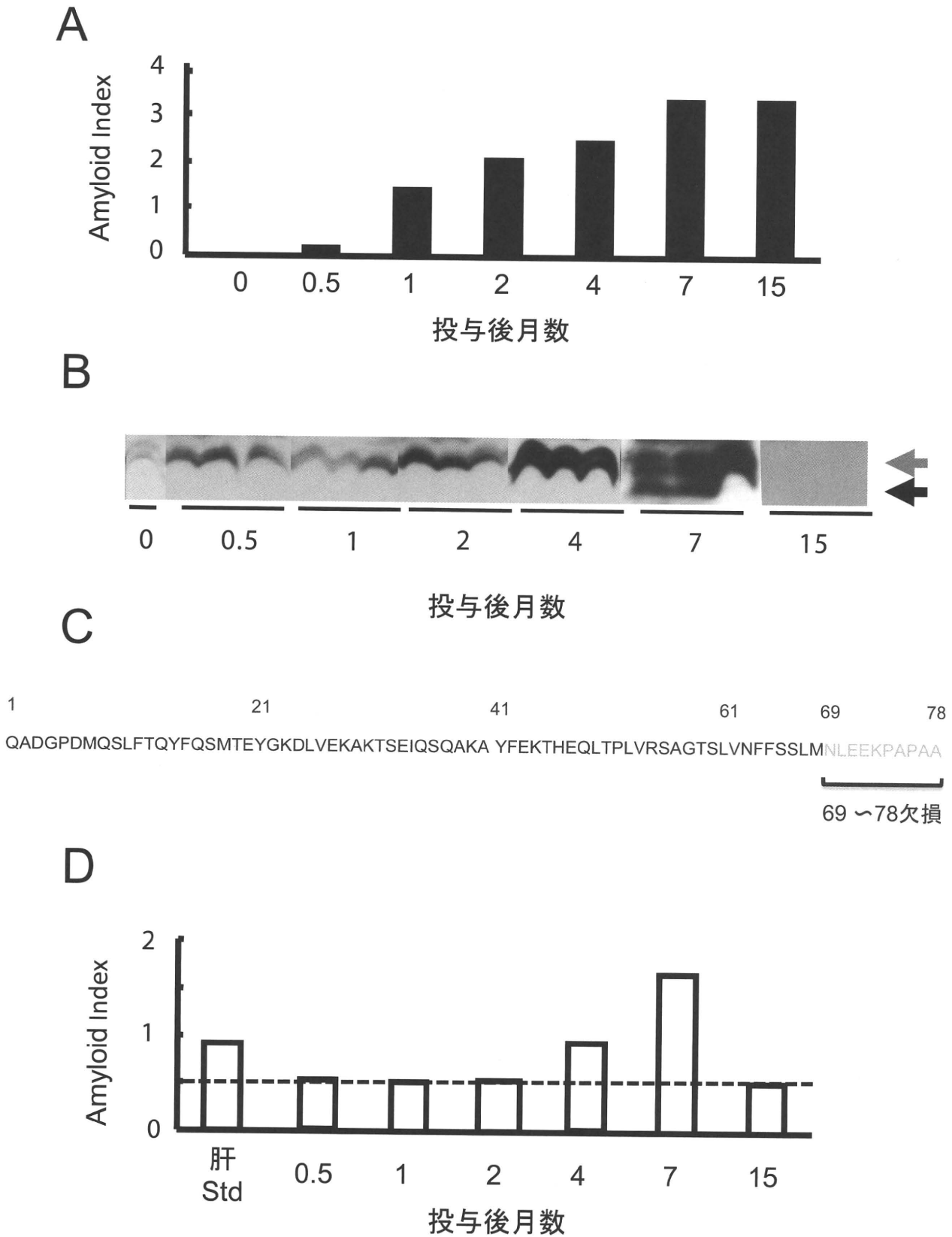


図1 糞中Aβ42 アミロイド線維の解析:

A. SAMR1-*Apoa2c* マウスへのアミロイド線維投与によるアミロイドーシス誘発後のアミロイド沈着 (Amyloid Index)。B. Western blot analysisによるapoA-IIモノマーの解析。黒い矢印はFull length, 灰色矢印は7ヶ月後の糞中に見られた低分子量モノマーを示す。C. 糞中低分子量モノマーの amino acid 配列は69-78のC末端アミノ酸を欠失していた。D. 糞中より抽出したアミロイド線維1.0 μgをSAMR1-*Apoa2c*マウスへ投与後、2ヶ月のアミロイド沈着 (伝播力)を調べた。点線は非特異的誘発と考えられる沈着程度を示す。

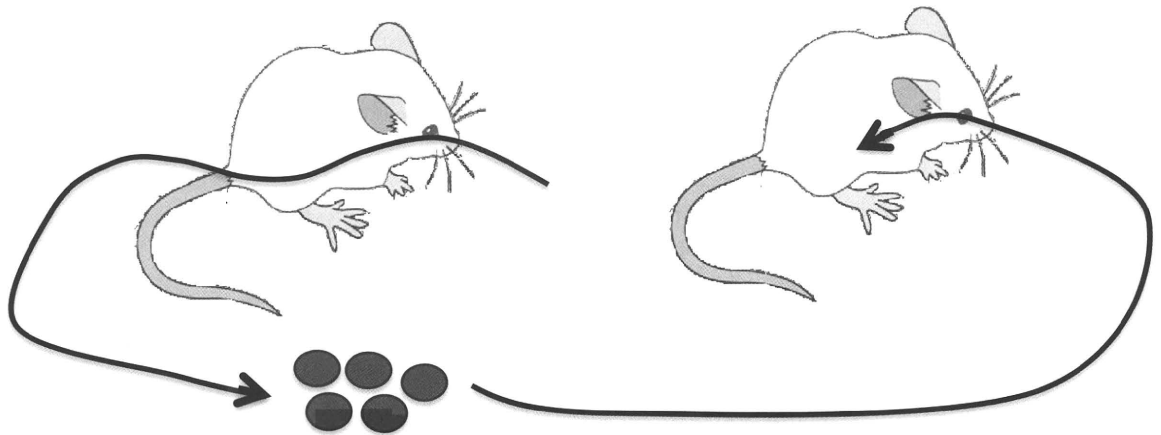


図2 糞を介したマウスAApoAII アミロイドーシスの伝播

おそらく腸管に沈着したアミロイド線維が糞中に排出され、体外へ出ると考えられる。糞中のアミロイド線維は別のマウスの体内へ侵入し(糞食、毛繕い、餌に付着、空気中へ飛散などの経路は不明)、アミロイドーシスを促進・誘発する。分子量や立体構造が異なり、伝播力が強い線維がアミロイドーシスの特定の時期に排出される可能性が示唆された。

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

老人性全身性アミロイドーシスの診断と実態調査

研究分担者 安東由喜雄 熊本大学大学院生命科学研究部 病態情報解析学
 共同研究者 *大嶋俊範、*植田光晴、*庄野 信、*蘇 宇、*田崎雅義、*神力 悟、
 三隅洋平、山下太郎、*城野博史、*大林光念、***小川久雄
 熊本大学大学院生命科学研究部 *病態情報解析学、**同神経内科学、
 ***循環器病態学

研究要旨 老人性全身性アミロイドーシス (SSA) は、野生型トランスサイレチン (TTR) が原因となり生じる孤発性の全身性アミロイドーシスであり、心不全を中心とした全身諸臓器の機能障害を引き起こす。しかし、詳細な病態や本邦での実態などは不明であり、見逃されている症例が多数存在している可能性がある。本研究では、剖検 (連続 181 例) の病理組織を用いた組織学的な検討と、当院を受診し SSA と診断を受けた患者 (11 例) に対し、臨床所見および病理学的な解析を行った。剖検心の検討では、80 歳以上の 11.5% に SSA を認め、頻度は年齢依存的に上昇する傾向がみられた。全身の組織学的解析で、心臓や肺、舌、膀胱などに高頻度にアミロイド沈着を認めた。SSA 患者の生検組織による検討では、心筋生検は全例でアミロイド沈着を認めたものの、消化管生検と腹壁皮膚生検では 3 割程度の陽性率であった。また、SSA 患者では多くの症例で胸部 CT 上、小結節やすりガラス状陰影といった異常所見を認め、TTR アミロイド沈着による影響が考えられた。本研究結果より、日本人における SSA の頻度は、これまで報告された欧米における頻度 (80 歳以上の 25% 前後) より低いことが判明したが、遺伝的要因や環境要因が SSA 発症に重要な役割を果たしている可能性がある。さらに、SSA のアミロイド沈着様式を念頭に置き、診断時の生検部位や結果の判断を行う必要がある。

A. 研究目的

老人性全身性アミロイドーシス (SSA) は、野生型トランスサイレチン (TTR) が原因となり生じる孤発性の全身性アミロイドーシスである。高齢者の心臓を中心とした全身諸臓器にアミロイド沈着を来し、心不全や不整脈の原因疾患として高頻度に存在していると考えられおり、欧米における剖検例の解析では 80 歳以上の 22-25% にアミロイド沈着が認められている。しかし、本邦におけるその実態は明らかにされておらず、見逃されている症例が多数存在していると考えられる。そのため、より安全で簡便な SSA の診断が重要となっている。

本研究の目的は、SSA に関して本邦の実態を調査し、アミロイド沈着の特徴を病理学的に解析することで、SSA の診断率の向上の探求をめざすことである。

B. 研究方法

1. 剖検例の解析

2001 年 1 月から 2008 年 3 月に熊本大学医学部附属病院で剖検を施行された、死亡時年齢 40 歳以上の連続 181 例の剖検心を用いて、以下の解析を行った。

コンゴ・レッド染色にて、アミロイドの有無を確認したのち、各種免疫染色を施行し、アミロイドーシスの病型を確認した。抗 TTR 免疫染色陽性例に関しては、遺伝子検査を行い、SSA と遺伝性の TTR アミロイドーシスである家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) を鑑別した。SSA 症例に関しては、全身諸臓器における組織学的解析を行った。

2. SSA 患者の解析

2002 年 6 月から 2010 年 9 月に熊本大学医学部附属病院の循環器内科を初めて受診し、検査の結

果、SSA と確定診断のついた 11 例について以下の解析を行った。

施行した心筋生検、消化管生検、腹壁皮膚生検についてコンゴ・レッド染色、抗 TTR 免疫染色を行い、アミロイド陽性率を検証するとともに、胸部 CT 像の解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、熊本大学倫理委員会で承認を受け、インフォームドコンセントを得た症例を解析した。

C. 研究結果

剖検心の検討では、181例中48例がコンゴ・レッド陽性であった。そのうちSSAは6例であり、80歳以上の11.5% (3/26) に認めた。他の病型のアミロイドーシスも認め、内訳は、FAP5例、限局性心房性アミロイドーシス29例、AAアミロイドーシス5例、ALアミロイドーシス1例、透析アミロイドーシス1例、心臓弁アミロイドーシス3例、未同定アミロイドーシス2例であった。全身の組織学的解析ではFAPとSSAで、アミロイド沈着を来しやすい臓器や各臓器における部位が異なっていた。また、心臓では、SSAでは主に心筋内側にパッチ状のTTRアミロイド沈着を認めたが、FAPでは主に心膜下に心筋を取り囲むようにTTRアミロイド沈着を認めた。また、電子顕微鏡による観察では、アミロイド線維は、SSAでは短く硬い線維が無秩序に認め、これに対してFAPでは長く直線的な線維を平行に認めた。消化管では、SSAでは基底層より深層の小血管周囲を中心としたアミロイド沈着を認めたが、FAPでは血管周囲に加えて、基底層にアミロイド沈着を認めた。SSA患者の生検組織による検討では、心筋生検は100% (8/8) でアミロイド沈着を認めたが、消化管生検と腹壁皮膚生検は各々38%と33%の陽性率であった。消化管生検と腹壁皮膚生検の結果を合わせて判断することで、アミロイド陽性率は44.4% (4/9) まで向上することも確認できた。また、SSA患者では多くの症例で胸部CT上、小結節やすりガラス状陰影といった異常所見を認めることも、新たに判明した。

D. 考察

剖検例の解析にて、本邦における SSA の頻度は、80 歳以上の 11.5%であり、アジア人種で初めて SSA の頻度が明らかとなった。本結果は、欧米で行われた同様の研究結果と比較して低いものの、本邦でも高頻度に SSA 患者が存在することを示唆する結果であった。また、欧米との結果の違いは、遺伝的要因や環境要因などによる影響が推測された。また、SSA の全身諸臓器におけるアミロイド沈着様式の検討では、FAP との比較にていくつかの違いを認め、アミロイド沈着機構がそれぞれの疾患で異なる可能性が考えられた。SSA では心臓や肺、膀胱、血管壁など、機械的ストレスを受けやすい部位にアミロイド沈着を認める傾向にあった。

SSA 患者の心筋では全症例で、TTR アミロイド沈着を認めたことから、アミロイド沈着を証明するには心筋生検が最も良いと考えられたが、高齢者に対して、比較的安全で簡便な方法として、検出率を十分念頭に置いた上で、消化管生検や腹壁皮膚生検も代替の生検部位として意義はあると考えられた。また、定期的に繰り返し行うことで見逃し症例を減らすことができると考えられる。さらに、SSA 症例の胸部 CT 所見を注意深く観察することも重要である。

E. 結論

80 歳以上の 11.5%に SSA を認め、アジアでは欧米より頻度が低いものの確かに本症が存在することが判明した。また、SSA と FAP のアミロイド沈着様式は、いくつかの違いを認め、このような違いを念頭においた上で、診断時に生検を行うことが、SSA の確実な診断につながると期待できる。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ando Y: FAP is a candidate disease in patients with undetermined polyneuropathy. *Intern Med* 49:1841-1842, 2010.

2) Asahina A, Yokoyama T, Ueda M, Ando Y,

- Ohshima N, Saito I, Tadokoro E, Hasegawa K: Hereditary Gelsolin Amyloidosis: A new Japanese case with cutis laxa as a diagnostic clue. *Acta Derm Venereol*, in press.
- 3) Obayashi K, Hörnsten R, Wiklund U, Karlsson M, Okamoto S, Ando Y, Suhr OB. Blood pressure overshoot after tilt reversal in patients with familial amyloidotic polyneuropathy. *Hypertension Res* 34:133-138, 2011.
- 4) Asahina M, Akaogi Y, Misawa S, Kanai K, Ando Y, Sakakibara R, Arai K, Hattori T, Kuwabara S: Sensorimotor manifestations without autonomic symptoms in two sibilings with TTR Val107 familial amyloid polyneuropathy. *Clin Neurol Neurosurg*, in press.
- 5) Araki S, Ando Y: Transthyretin-related familial amyloidotic polyneuropathy. *Proc Japn Acad Ser B* 86:694-706, 2010.
- 6) Anan I, Kiuru-Enari S, Obayashi K, Ranløv PJ, Ando Y: Investigation of AGE, their receptor and NF- κ B activation and apoptosis in patients with ATTR and Gelsolin amyloidosis. *Histol Histopathol* 25:691-699, 2010.
- 7) Arima H, Yamashita S, Mori Y, Hayashi Y, Motoyama K, Hattori K, Takeuchi T, Jono H, Ando Y, Hirayama F, Uekama K: In vitro and in vivo gene delivery mediated by lactosylated dendrimer/ α -Cyclodextrin conjugates (G2) into hepatocytes. *J Control Release* 146:106-117, 2010.
- 8) Hirohata M, Yoshita M, Ishida C, Ikeda SI, Tamaoka A, Kuzuhara S, Shoji M, Ando Y, Tokuda T, Yamada M: Clinical features of non-hypertensive lobar intracerebral hemorrhage related to cerebral amyloid angiopathy. *Eur J Neurol* 17:823-829, 2010.
- 9) Hara R, Kawaji T, Ando E, Ohya Y, Ando Y, Tanihara H: Impact of liver transplantation on transthyretin-related ocular amyloidosis in Japanese patients. *Arch Ophthalmol* 128:206-210, 2010.
- 10) Kawaji T, Ando Y, Hara R, Tanihara H: Novel therapy for transthyretin-related ocular amyloidosis a pilot study of retinal laser photocoagulation. *Ophthalmology* 17:552-555, 2010.
- 11) Kawaji T, Ando Y, Ando E, Sandgren O, Suhr OB: Transthyretin-related vitreous amyloidosis in different endemic areas. *Amyloid* 17:105-108, 2010.
- 12) Kono S, Manabe Y, Tanaka T, Fujii D, Sakai Y, Narai H, Omori N, Ueda M, Ando Y, Abe K: A case of familial amyloid polyneuropathy due to Phe33Val TTR with vitreous involvement as the initial manifestation. *Intern Med* 49:1213-1216, 2010.
- 13) Sueyoshi T, Ueda M, Jono H, Irie H, Sei A, Ide J, Ando Y, Mizuta H: Wild-type transthyretin-derived amyloidosis in various ligaments and tendons. *Hum Pathol*, in press.
- 14) Tasaki M, Ueda M, Ochiai S, Tanabe Y, Murata S, Misumi Y, Su Y, Sun X, Shinriki S, Jono H, Shono M, Obayashi K, Ando Y: Transmission of circulating cell-free AA amyloid oligomers in exosomes vectors via a prion-like mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 400:559-562, 2010.
- 15) Zhang P, Fu X, Sawashita J, Yao J, Zhang B, Qian J, Tomozawa H, Mori M, Ando Y, Naiki H, Higuchi K: Mouse model to study human A β 2M amyloidosis: generation of a transgenic mouse with excessive expression of human β 2-microglobulin. *Amyloid* 17:50-62, 2010.
- 16) 安東由喜雄: 知って得する最新情報「家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP)」。 *Clinical Neuroscience* 28:224-225, 2010.
- 17) 安東由喜雄: 老化とアミロイドーシス. 熊本医学会ニューズレター 8: 22-28, 2010.
- 18) 安東由喜雄、大林光念: 血漿蛋白質の遺伝子変異体に関する意味論. *臨床化学* 39:52-57, 2010.
- 19) 安東由喜雄、大林光念: 血清アルブミンとトランスサイレチン. *臨床と研究* 87: 39-43, 2010.
- 20) 大林光念、安東由喜雄: アミロイド蛋白への治療アプローチ -家族性アミロイドポリニューロパチーをモデルとして-. *生物物理化学* 54:23-25, 2010.
- 21) 植田光晴、安東由喜雄: 遺伝性アミロイドーシスの診断と病態解析における質量分析法の有用性. *JSBMS Letters* 35:48-54, 2010.
- 22) 内場光浩、畑 裕之、今村隆寿、安東由喜雄: AL-アミロイドーシスと線溶異常. *日本血栓止血学会誌* 21:9-15, 2010.

2. 学会発表

1) Su Y, Horibata Y, Ueda M, Tasaki M, Misumi Y, Jono H, Obayashi K, Ogawa H, Ando Y: Clinicopathologic findings in Japanese patients with senile systemic amyloidosis (SSA) - First report elucidating the prevalence of SSA in an Asian country -. XII International Symposium on A myloidosis, Rome, Italy, 4.18-21, 2010.

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

研究分担者 工藤幸司 東北大学未来医工学治療開発センター

共同研究者 福田絵美子¹⁾、岡村信行^{1,2)}、古川勝敏³⁾、荒井啓行³⁾、星井嘉信⁴⁾、宇田裕史⁵⁾、佐伯 修⁵⁾、奥田恭章⁶⁾、中村 正⁷⁾、坂井勇仁⁸⁾、和田庸子⁸⁾、中野正明⁸⁾、佐藤弘恵⁹⁾、小関由美¹⁰⁾、田村裕昭¹¹⁾、神谷百合香¹²⁾、寺井千尋¹²⁾、亀田智宏¹³⁾、谷口義典¹⁴⁾、公文義雄¹⁴⁾、松下正人¹⁵⁾、江原重幸¹⁶⁾、楢崎雅司¹⁷⁾、岩崎由恵¹⁸⁾、川上 純¹⁹⁾、吉崎和幸²⁰⁾、山田正仁²¹⁾

東北大学未来医工学治療開発センター¹⁾、東北大学医学系研究科機能薬理学分野²⁾、東北大学加齢医学研究所³⁾、山口大学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)⁴⁾、堺温心会病院内科⁵⁾、道後温泉病院リウマチセンター内科⁶⁾、熊本リウマチセンターリウマチ膠原病内科⁷⁾、新潟大学大学院医歯学総合研究科内部環境医学講座(第2内科)⁸⁾、新潟県立リウマチセンター⁹⁾、東京女子医大付属膠原病リウマチ痛風センター¹⁰⁾、勤医協中央病院内科(リウマチ・膠原病)¹¹⁾、自治医科大学付属さいたま医療センターアレルギーリウマチ科¹²⁾、香川大学医学部内分泌代謝・血液・免疫・呼吸器内科¹³⁾、高知大学医学部内分泌代謝・腎臓内科¹⁴⁾、大阪南医療センター¹⁵⁾、神戸徳洲会病院¹⁶⁾、大阪大学大学院医学系研究科免疫アレルギー内科¹⁷⁾、八尾徳洲会総合病院¹⁸⁾、長崎大学病院第一内科¹⁹⁾、大阪大学先端科学イノベーションセンター²⁰⁾、金沢大学大学院脳老化・神経病態学(神経内科学)²¹⁾

研究要旨 82 症例のアミロイドーシス患者様の消化管生検標本について、BF-227 染色を行った。症例ごとに3か所またはそれ以上の部位の染色を行った結果、82 症例中 64 症例が全部位 BF-227 染色陽性と、多数を占めた。トシリズマブ治療開始1年後または2年後の時点では12 例中6例の改善例がみられた。

A. 研究目的

アミロイドーシスという難病に苦しむ患者様により優れた診断法(プローブを用いたインビボ画像診断)を提供することを最終目的として、これまでにヒトアミロイドーシス標本および動物モデルにおけるアミロイド蛋白と、分担研究者らによって開発されたアミロイドリガンド BF-227 との結合性を検討し、いずれの標本および動物モデルにおいても高い結合性を示すことを確認してきた。本年度は「AA アミロイドーシス臨床研究会」会員よりお送りいただいたアミロイドーシス患者様の消化管生検標本の BF-227 染色を実施した。

B. 研究方法

1) アミロイドーシス患者様の消化管生検標本の BF-227 染色

「AA アミロイドーシス臨床研究会」会員よりお送りいただいたアミロイドーシス患者様の消化管生検(胃幽門輪の0時、3時、9時)標本の BF-227 染色を実施した。2011年1月25日までに14機関から延べ82症例の AA アミロイドーシス患者様消化管生検標本をお送りいただいた(表1)。

(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、標本提供許である各施設倫理委員会の承認を得た上で使用する。