

ミロイドの蓄積を経時的に観察することが可能になった。また、CAA 関連脳出血の再発予防法として副腎皮質ステロイド療法は、検討例は少数であるが、有効な印象が得られた。そして、BF227PET は FAP 症例における TTR アミロイドの蓄積の評価にも有用であると考えられた。

E. 結論

[11C]BF227 アミロイド PET は剖検や生検に代わる非侵襲的なアミロイド検査法であると考えられる。また、本 PET は全身性アミロイドーシスの診断にも有用な可能性がある。

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

1) 安出卓司、下島恭弘、町田香津子、星 研一、鷺野谷利幸、工藤幸司、池田修一：脳アミロイドアンギオパチー関連脳出血に対する副腎皮質ステロイド治療の検討、第 51 回日本神経学会総会、横浜、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

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

BRI 関連蛋白の体内動態に関する研究

研究分担者 中里雅光 宮崎大学内科学講座神経呼吸内分泌代謝学分野
 共同研究者 塩見一剛、京楽 格
 宮崎大学内科学講座神経呼吸内分泌代謝学分野

研究要旨 英国およびデンマークで発見された家族性認知症を呈する疾患は、いずれも BRI 遺伝子の変異に起因していることが明らかとなった。BRI 関連遺伝子は 3 種類が同定されており、これまで報告された認知症を来すものは BRI2 遺伝子異常によるものである。BRI 関連蛋白は A β 蛋白生成や凝集形成との関連が報告されており、アルツハイマー病の発症に関連している可能性が示唆されている。BRI 関連蛋白がアミロイド形成にどのように関与しているのかを解明するため、免疫組織学および生体内での動態について検討した。BRI に対する抗体による免疫染色では神経細胞内に染色性を認めるとともに、老人斑の A β 染色陽性の周辺に染色性を認めた。確立した BRI2 測定系の感度は 30fmol/tube で ABri および ADan はそれぞれ BRI2 に対する抗体とは交差反応を示さなかった。この系を用いてアルツハイマー病や他の神経変性疾患における髄液中および血中 BRI2 の検索を行なった。また分子型の検索をウエスタンブロットにて行なった。髄液中の BRI2 はアルツハイマー病において他の神経変性疾患に比べて高い傾向を示し、また年齢とともに高くなる傾向にあった。髄液中に存在する BRI2 の分子型は、分泌型の BRI2 と、より大きな分子型が存在した。血中には分泌型よりも大きな分子型が主に存在することが示された。BRI2 はアルツハイマー病において他の疾患と異なる動態を示し発症に関与することが示唆された。

A. 研究目的

Familial British dementia (FBD)は英国で報告された脳血管および間質のアミロイド沈着による家族性認知症で、BRI 遺伝子の変異に起因している。また BRI 遺伝子の他の変異も Familial Danish dementia(FDD)を発症する。いずれも C 末端のアミノ酸残基が延長しアミロイド ABri と ADan を形成する。近年、FDD の原因ペプチド ADan と A β の共沈着が報告されており、また FBD や FDD の前駆蛋白である BRI 関連蛋白がアミロイド前駆蛋白 (APP) のプロセッシングに影響してアミロイド型 A β ペプチドの産生を抑制すると報告がある。今回、FBD や FDD の診断法の確立と BRI の機能解明のため、アルツハイマー脳における BRI 関連蛋白について検討するためにその測定系を開発した。

B. 研究方法

FBD および FDD の原因ペプチドの正常前駆蛋白である BRI2 の C 末端に対する抗体を作成した。こられの抗体を用いて免疫組織学的検索を行うとともに、RIA による BRI 測定系を作成しアルツハイマー病や神経変性疾患における髄液中の濃度を測定した。また BRI の髄液および血中の分子型についてウエスタンブロットにて検討した。

(倫理面への配慮)

研究に際しては、宮崎大学・医の倫理審査委員会の審査、承認を得た。

C. 研究結果

BRI2 に対する抗体は神経細胞に染色性を示し、また、アルツハイマー病における老人斑において、抗A β 抗体陽性のアミロイド沈着部位では中心のアミロイドを取り囲むようにBRI2の染色性を示した。この抗体を用いたRIAにより感度30fmol/tube

の測定系を確立した。

髄液中に存在する BRI2 の分子型は、分泌型の BRI2 とより大きな分子型が存在した。また血中には分泌型は存在せず、より大きな分子型が主として存在していた (図 1)。

血中の BRI2 濃度はアルツハイマー病と他の疾患では優位さはなく、髄液中の濃度はアルツハイマー病において、パーキンソン病とその関連疾患および筋萎縮性側索硬化症などの変性疾患よりも高い傾向を示した (図 1)。また年齢との相関はアルツハイマー病では正の相関を示し高齢になるほど高くなる傾向を示し、他の疾患では負の相関の傾向を示した (図 2)。

D. 考察

アルツハイマー病において老人斑において抗 A β 抗体陽性のアミロイドの部位に BRI 蛋白が共沈していることが示された。アミロイド前駆蛋白が A β の凝集に関与する可能性が示唆され、アミロイド形成に関わっている可能性が示された。これまでの報告では、*in vitro* の実験では BRI はアミロイド前駆蛋白のプロセッシングについては抑制的に働くとの報告があるほか、BRI の存在下で A β 蛋白のアミロイド形成を促進するという報告がある。A β 蛋白のアミロイド形成を阻害したとの報告もある。BRI が髄液に存在することが証明され、分泌型以外にも前駆体そのものも存在することが明らかになった。髄液中の BRI2 はアルツハイマー病では年齢とともに増加傾向にあり、その他の疾患と逆の相関を示すことから、アルツハイマー病の発症に何らかの関与が示唆される。今後も症例を増やして検討するとともに、A β の凝集に関する研究が必要であると考えられた。

E. 結論

BRI 関連蛋白はアルツハイマー病においてアミロイド形成に関与している可能性が示唆され、今後は生体内での動態や作用についてさらに検討する必要があると考えられた。

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

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

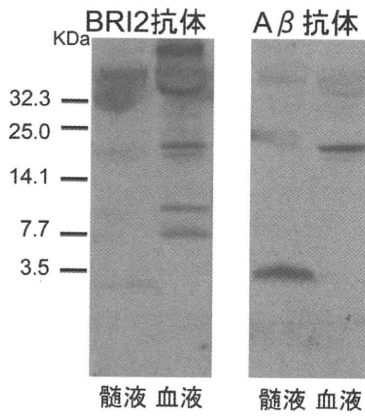
なし

3. その他

なし

図- 1

髄液および血液中BRI2



髄液および血中ITM2B

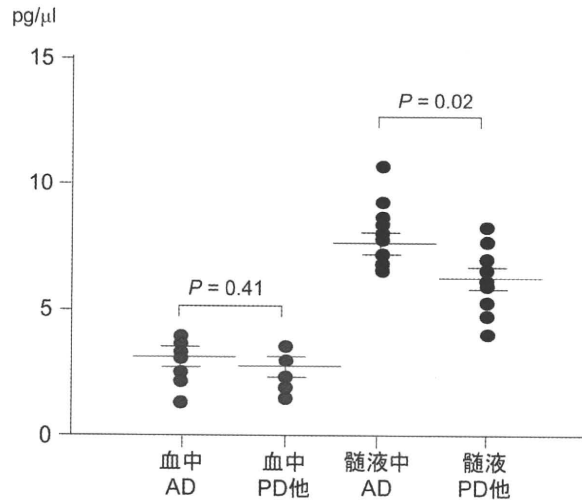
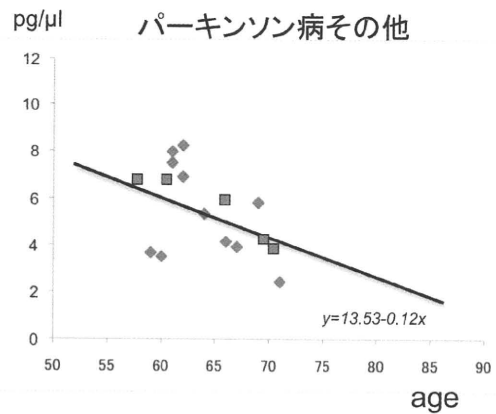
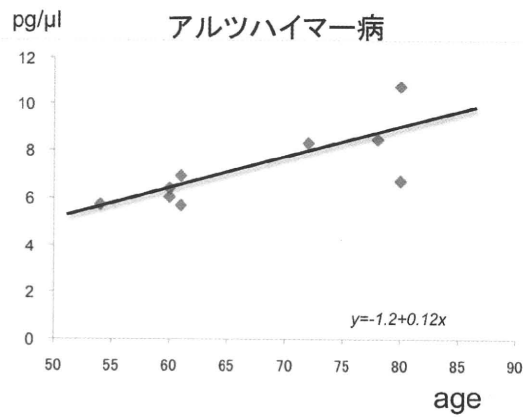


図- 2

髄液中BRI2と年齢との相関関係



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

細胞外シャペロンによる β_2 -ミクログロブリンアミロイド線維 形成抑制機構の解明

研究分担者 内木宏延 福井大学医学部病因病態医学講座・分子病理学領域
 共同研究者 小澤大作*、長谷川一浩*、李 映昊**、櫻井一正**、柳浩太郎**、大越忠和*、
 後藤祐児**
 *福井大学医学部病因病態医学講座・分子病理学領域、
 **大阪大学蛋白質研究所

研究要旨 近年、細胞外蛋白質品質管理機構が注目され、細胞外シャペロンがその一躍を担うことが示されつつある。透析アミロイドーシス患者の β_2 -ミクログロブリン (β_2 -m) アミロイド線維沈着部位では、線維と共に細胞外シャペロンの α_2 -マクログロブリン (α_2 M) が共存しており、血液透析患者血清中では α_2 M と β_2 -m の複合体形成も報告されている。今回われわれは、 α_2 M の β_2 -m アミロイド線維形成に及ぼす影響を検討すると共に、 α_2 M と β_2 -m の複合体形成機構を解析した。その結果、(i) α_2 M は 0.5 mM ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 存在下、pH 7.5 における β_2 -m アミロイド線維形成反応を濃度依存的かつ substoichiometric に抑制した。(ii) Dot blot 法や ELISA 法を用いた親和性解析から、 α_2 M は SDS 非存在下よりも SDS 存在下で β_2 -m との親和性が高まった。(iii) 円二色性測定、超遠心分析、ANS 蛍光測定を用いて 0.5 mM SDS 存在下での α_2 M の構造を解析したところ、興味深いことに天然状態ではテトラマーとして存在する α_2 M は、SDS 存在下では一部がダイマーに解離し、疎水性領域をより露出していた。(iv) ウェスタンブロット法により、 β_2 -m は α_2 M のテトラマー・ダイマー両方と結合し、ダイマーに強く結合していた。(v) 別の生理的条件 (ヘパリン存在下、pH 6.3) でも、同様に α_2 M の β_2 -m アミロイド線維形成抑制やダイマー化、 β_2 -m との親和性変化が見られた。以上より、蛋白質が変性し凝集しやすい環境下では、 α_2 M は変性蛋白質と結合するために有利な構造に変化し、変性蛋白質との親和性を高めることにより、アミロイド線維形成を抑制していると考えられる。

A. 研究目的

近年、細胞外における蛋白質の品質管理機構が注目されるようになり、細胞外シャペロンがその一躍を担うことが示されつつある。細胞外シャペロンである α_2 -マクログロブリン (α_2 M) やハプトグロビンは、アルツハイマー病で見られる A β アミロイド線維形成を抑制することが報告されている。透析アミロイドーシス患者の β_2 -ミクログロブリン (β_2 -m) アミロイド線維沈着部位では、線維と共に α_2 M が共存していることが示されており、また血液透析患者の血清中では α_2 M と β_2 -m の複合体形成が報告されている。今回われわれは、透析アミロイドーシスに対する予防・治療法の開発に向け、 α_2 M の β_2 -m アミロイド線維形成に及

ぼす影響を検討し、さらに α_2 M と β_2 -m の複合体形成機構に迫ることを本研究の目的とした。

B. 研究方法

β_2 -m アミロイド線維形成はチオフラビン T による分光蛍光定量法や電子顕微鏡を用いて確認した。 α_2 M と β_2 -m の相互作用は Dot blot 法や ELISA 法、ウェスタンブロット法を用いて検討した。 α_2 M と β_2 -m の構造は円二色性測定、超遠心分析、ANS 蛍光測定により解析した。

(倫理面への配慮)
 問題なし。

C. 研究結果

以前確立した中性条件下での β_2 -m アミロイド線維形成反応系に α 2M を添加し、線維形成に対する影響を調べた。その結果、 α 2M は 0.5 mM ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 存在下で pH 7.5 における β_2 -m アミロイド線維形成反応を濃度依存的に、substoichiometric に抑制することが明らかになった。また、Dot blot 法や ELISA 法を用いた親和性解析から、 α 2M は SDS 非存在下よりも SDS 存在下で β_2 -m との親和性が高まることが分かった。円二色性測定、超遠心分析、ANS 蛍光測定を用いて 0.5 mM SDS 存在下での α 2M の構造を解析したところ、興味深いことに天然状態ではテトラマーとして存在する α 2M が、SDS 存在下では一部がダイマーに解離し、疎水性領域をより露出することが明らかになった。ウエスタンブロット法により、 β_2 -m は α 2M のテトラマーとダイマー両方と結合し、ダイマーに強く結合していることが明らかになった。さらに別の生理的条件 (ヘパリン存在下、pH 6.3) でも、同様に α 2M の β_2 -m アミロイド線維形成抑制やダイマー化、 β_2 -m との親和性変化が見られた。

D. 考察

蛋白質が変性し凝集しやすい環境下では、 α 2M は変性蛋白質と結合するために有利な構造に変化し (ダイマー化し疎水性領域がより露出した構造に変化することで)、変性蛋白質との親和性を高め、蛋白質品質管理を行っているのではないかと考えられる。 α 2M は、生体内で β_2 -m アミロイド線維形成抑制に関与しているのではないかと考えられる。

E. 結論

本研究から、 α 2M が β_2 -m アミロイド線維形成を抑制することが明らかになった。細胞外シャペロンの蛋白質品質管理機構を詳細に理解することは、アミロイドーシスの予防・治療法の開発に繋がると期待される。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) Yagi H, Ozawa D, Sakurai K, Kawakami T, Kuyama H, Nishimura O, Shimanouchi T, Kuboi R, Naiki H, Goto Y: Laser-induced propagation and destruction of amyloid β fibrils. *J Biol Chem* 285:19660-19667, 2010.
- 3) Chatani E, Ohnishi R, Konuma T, Sakurai K, Naiki H, Goto Y: Pre-steady-state kinetic analysis of the elongation of amyloid fibrils of β_2 -microglobulin with tryptophan mutagenesis. *J Mol Biol* 400:1057-1066, 2010.
- 4) Yamamoto K, Yagi H, Lee YH, Kardos J, Hagihara Y, Naiki H, Goto Y: The amyloid fibrils of the constant domain of immunoglobulin light chain. *FEBS Lett* 584:3348-3353, 2010.
- 5) Yoshimura Y, Sakurai K, Lee YH, Ikegami T, Chatani E, Naiki H, Goto Y: Direct observation of minimum-sized amyloid fibrils using solution NMR spectroscopy. *Protein Sci* 19:2347-2355, 2010.
- 6) Konuma T, Chatani E, Yagi M, Sakurai K, Ikegami T, Naiki H, Goto Y: Kinetic intermediates of β_2 -microglobulin fibril elongation probed by pulse-labeling H/D exchange combined with NMR analysis. *J Mol Biol* 405:851-862, 2011.
- 7) Ozawa D, Hasegawa K, Lee YH, Sakurai K, Yanagi K, Ookoshi T, Goto Y, Naiki H: Inhibition of β_2 -microglobulin amyloid fibril formation by α_2 -macroglobulin. *J Biol Chem*, in press.
- 8) 内木宏延、長谷川一浩、小野賢二郎、山田正仁 : アミロイド線維形成の重合核依存性重合モデルと線維形成阻害薬の探索. *薬学雑誌* 130:503-509, 2010.
- 9) 内木宏延 : 透析アミロイドーシス発症の分子機構. *医学のあゆみ* 別冊:75-81, 2010.

2. 学会発表

- 1) 八木寿梓、小澤大作、櫻井一正、加治優一、川上 徹、九山浩樹、内木宏延、後藤祐児：レーザー照射によるアミロイド線維の増殖と崩壊。第 10 回日本蛋白質科学会年会、札幌、6.16-18、2010.
 - 2) 小沼 剛、茶谷絵理、八木正典、櫻井一正、池上貴久、内木宏延、後藤祐児：パルスラベル H/D 交換法と NMR を用いた β_2 ミクログロブリンの線維伸長中間体の解析。第 10 回日本蛋白質科学会年会、札幌、6.16-18、2010.
 - 3) 宗 正智、八木寿梓、櫻井一正、内木宏延、後藤祐児：超音波による超高速アミロイド線維形成反応。第 10 回日本蛋白質科学会年会、札幌、6.16-18、2010.
 - 4) 吉村優一、櫻井一正、李 映昊、池上貴久、茶谷絵理、内木宏延、後藤祐児： β_2 -ミクログロブリンが形成するアミロイド線維の溶液 NMR による直接観察。第 10 回日本蛋白質科学会年会、札幌、6.16-18、2010.
 - 5) Ozawa D, Hasegawa K, Lee YH, Sakurai K, Yanagi K, Ookoshi T, Goto Y, Naiki H: α_2 -Macroglobulin inhibits β_2 -microglobulin amyloid fibril formation in vitro. The 3rd International Symposium on Protein Community, Nara, Sep 13-16, 2010.
 - 6) Yagi H, Ozawa D, Sakurai K, Naiki H, Goto Y: Laser-induced propagation and destruction of amyloid β fibrils. The 3rd International Symposium on Protein Community, Nara, Sep 13-16, 2010.
 - 7) Yoshimura Y, Sakurai K, Lee YH, Ikegami T, Chatani E, Naiki H, Goto Y: Direct observation of minimum-sized amyloid fibrils using solution NMR spectroscopy. The 3rd International Symposium on Protein Community, Nara, Sep 13-16, 2010.
 - 8) 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 Protein Community, Nara, Sep 13-16, 2010.
 - 9) Ozawa D, Hasegawa K, Lee YH, Sakurai K, Yanagi K, Ookoshi T, Goto Y, Naiki H: α_2 -Macroglobulin inhibits β_2 -microglobulin amyloid fibril formation in vitro. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、神戸、12.7-10、2010.
 - 10) 長谷川一浩、森永章義、山田正仁、内木宏延： β アミロイド線維の核形成における界面の影響。第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、神戸、12.7-10、2010.
 - 11) 水野愛子、宗 正智、八木寿梓、櫻井一正、河田康志、内木宏延、後藤祐児：超音波による K3 peptide と α -synuclein のアミロイド線維形成。第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、神戸、12.7-10、2010.
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
1. 特許取得
 - 1) 発明の名称：アルツハイマー病の検査方法
特許番号：特許第 4568840 号
取得日：平成 22 年 8 月 20 日
 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

重症の透析アミロイドーシスを合併した透析歴 42 年の透析患者の検討

研究分担者 高市憲明 虎の門病院腎センター

共同研究者 諏訪部達也*、乳原善文*、井上雅文**、大橋健一**

*虎の門病院腎センター、**同病理部

研究要旨 β 2MGが沈着する透析アミロイドーシスは、長期透析患者では高頻度に見られる透析合併症である。人工透析42年の超長期透析患者の臨床所見、剖検所見を分析した。患者は、血液透析42年目の60歳男性、1968年(18歳)にて血液透析導入。1995年以降に、透析アミロイドーシスによる様々な症状が出現した。2009年10月頃より発熱が続き、破壊性脊椎症による両下肢筋力低下・知覚障害が著明となり、最終的に両下肢完全麻痺となった。また、全く排便ができなくなり、腹部膨満が増悪、腸管が著明に拡大した。S状結腸に人工肛門造設術を行なったが、症状は改善せず、2010年7月に永眠された。剖検では、椎骨、消下管粘膜下層(胃・十二指腸・大腸)の血管壁、肺に高度のアミロイド沈着を認めた。

A. 研究目的

β 2MGが沈着する透析アミロイドーシスは、長期透析患者では高頻度に見られる透析合併症である。長期透析患者のアミロイド沈着による臓器障害を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

重症の透析アミロイドーシスを合併し、最終的に当院で亡くなり剖検を行った透析歴42年の透析患者の臨床的経過、病理所見を検討した。

(倫理面への配慮)

対象患者の剖検に当たっては、患者遺族より書面にて同意書を得た。発表に当たっては、患者が特定できないように、注意を払った。

C. 研究結果

患者は、血液透析42年目の60歳男性、1968年(18歳)にて血液透析導入。特に並存疾患は無かった。図1にこの患者の長期経過を示した。1995年以降に、透析アミロイドーシスによる様々な症候が出現した。股関節アミロイド症、破壊性脊椎症、手根管症候群、アミロイド腫瘍などに対して、繰り返し手術が行われた。2009年10月頃より発熱が続き、破壊性脊椎症により両下肢筋力低下・知

覚障害が著明となり、最終的に両下肢完全麻痺となった。以前より排便困難で、多量の下剤を内服していたが、2009年12月下旬より、全く排便ができなくなり、腹部膨満が増悪、腸管が著明に拡大した。2010年2月にS状結腸に人工肛門造設術を行なったが、症状は改善せず、7月に永眠された。剖検では、図2に大腸のアミロイド染色の弱拡大と強拡大を示したが、血管壁に高度のアミロイド沈着を認めた。そのほか椎骨、胃・十二指腸などの消下管粘膜下層の血管壁、肺に高度のアミロイド沈着を認めた。血液透析前の血清 β 2-MG濃度は、1987年までは40mg/l程度であったが、1996年以降は15~20mg/l程度であった。

D. 考察

超長期透析患者では、アミロイド沈着による関節・骨格系の症候はもちろんであるが、消化管へのアミロイド沈着による消化器系症候も大きな問題であると考えられた。肺にも多量のアミロイド沈着を認めたが、臨床症状は顕著では無く、肺アミロイド症は症状が出にくいと考えられた。このような高度の透析アミロイドーシスの原因としては、長期透析や、導入初期の血清 β 2MG濃度高値が影響していると考えられた。

E. 結論

四肢麻痺、イレウスを呈した 42 年の超長期透析患者で、椎骨、消化管、肺に高度のアミロイド沈着を認めた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Sakurai-Chin C, Ubara Y, Suwabe T, Hoshino J, Yonaha T, Hasegawa E, Sumida K, Hiramatsu R, Yamanouchi M, Hayami N, Yamauchi J, Tominaga N, Sawa N, Takemoto F, Masuoka K, Takaichi K, Oohashi K: AL amyloidosis with IgD-lambda monoclonal gammopathy and lambda-type Bence-Jones protein: successful treatment by autologous stem cell transplantation. *Clin Exp Nephrol* 14:506-510, 2010.

2. 学会発表

1) 平松里佳子、乳原善文、星野純一、諏訪部達也、住田圭一、長谷川詠子、山内真之、澤 直樹、早見典子、竹本文美、高市憲明、大橋健一、谷口健一：原発性 AL アミロイドーシスにおける免疫グロブリン異常の検討（多発性骨髄腫との対比）. 第 53 回日本腎臓学会、神戸、6.16-18、2010.

2) 梶 大介、乳原善文、山内真之、早見典子、諏訪部達也、住田圭一、串田夏樹、永澤元規、平松里佳子、長谷川詠子、星野純一、澤 直樹、竹本文美、原 茂子、黒田陽子、大橋健一、高市憲明：高 Ca 血症と腎不全を合併した原発性 AL アミロイドーシスの一例. 第 40 回日本腎臓学会東部学術大会、宇都宮、9.24-25、2010.

3) 諏訪部達也、乳原善文、永澤元規、串田夏樹、住田圭一、早見典子、土谷良樹、平松里佳子、山内真之、長谷川典子、澤 直樹、竹本文美、高市憲明：高度の破壊性脊椎関節用から膀胱直腸障害を来し、イレウスを発症した透析歴 42 年の透析患者の 1 例. 第 40 回日本腎臓学会東部学術大会、宇都宮、9.24-25、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 長期透析患者の経過図

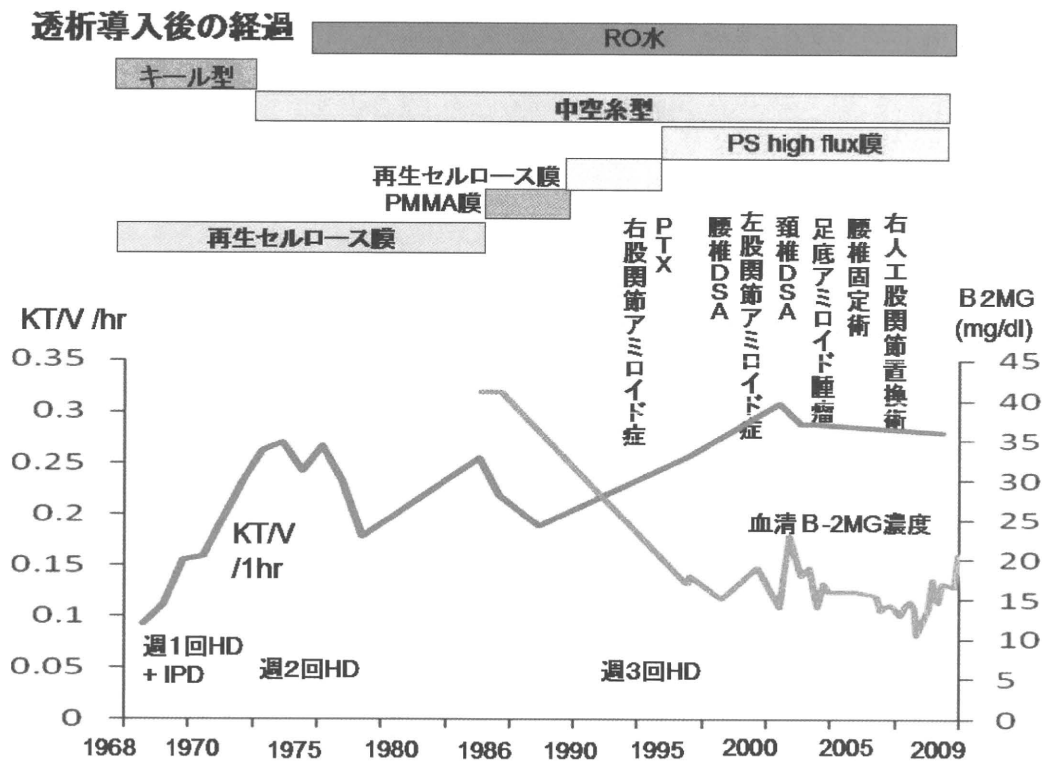
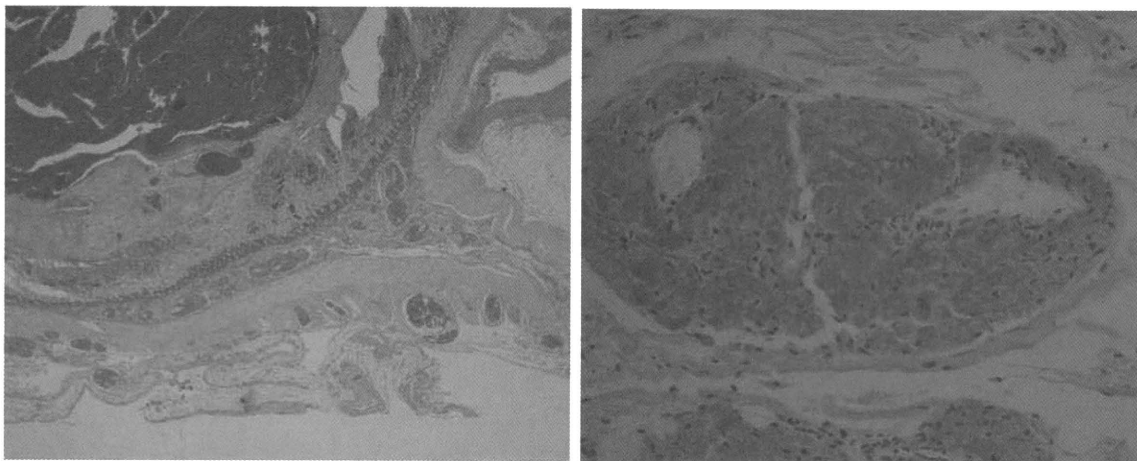


図2 大腸のアミロイド染色



DFS染色弱拡大

DFS染色強拡大

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

長期血液透析患者における手根管症候群の有無に影響する因子の検討

研究分担者 高市憲明 虎の門病院腎センター
 共同研究者 塚本真貴、諏訪部達也、串田夏樹、乳原善文
 虎の門病院腎センター

研究要旨 横断的研究では約 30 年程度透析を継続したほとんどの患者に手根管症候群 (CTS) を発症することが知られている。一方、血清 $\beta 2$ ミクログロブリン ($\beta 2\text{MG}$) と CTS の発症に直接の関係は見出されていない。当院で 30 年前後透析を継続している患者には CTS に対する手術歴の有る患者 (CTS+) が多い一方、CTS に対する手術歴の無い患者 (CTS-) も存在する。CTS+群と CTS-群に、長期間の血清 $\beta 2\text{MG}$ 濃度等に差がないかどうかを検討することを目的とした。 $\beta 2\text{MG}$ は 1986 年ころより測定を行っていた。測定頻度、測定間隔は時代によりばらつきがあるため、測定間の日数を加味した加重平均で検討した。その結果 CTS-群の患者にも、CTS+群患者と同様に大量の $\beta 2\text{MG}$ 負荷があったと考えられた。CTS-群には女性が多い傾向がみられた。大量の $\beta 2\text{MG}$ 負荷にも関わらず、CTS が発症していないのは現時点では判明していない個人的要因の影響が大きいと考えられた。

A. 研究目的

CTS+群と CTS-群に、長期間の血清 $\beta 2\text{MG}$ 濃度や透析検査成績等に違いがないかどうかを検討することを目的とした。

B. 研究方法

当院で 1977 年から 1982 年に血液透析を導入し腹膜透析の経験がなく、以後当院で血液透析を現在まで継続している患者を対象とした。対象患者は男性 6 名、女性 8 名であった。検査頻度は時代によりばらつきが存在するため、日数を加味した加重平均で検討した。

(倫理面への配慮)

すべて臨床資料を用いた後方視的調査研究であり問題ないとする。

C. 研究結果

図 1 に 1981 年に血液透析を導入したある患者の透析前後における血清 $\beta 2\text{MG}$ 濃度の推移を示す。1986 年頃より当院で透析前後の $\beta 2\text{MG}$ 濃度の測定が行われるようになった。1993 年頃までは透析後の $\beta 2\text{MG}$ 濃度は透析前値より高値を示す患者も多く、

当時の透析条件では $\beta 2\text{MG}$ はほとんど除去されず透析時の徐水による血液濃縮のため高値を示したと考えられた。すなわち 1980 年台には大量の $\beta 2\text{MG}$ の負荷があったものと推定された。透析膜等の改善により徐々に透析後の $\beta 2\text{MG}$ 濃度の低下を認めている。2004 年頃からは透析後の $\beta 2\text{MG}$ 濃度が 10mg/l 以下となる患者も認められるようになっていく。

表 1 に示したように CTS+は男性 5 名女性 3 名、CTS-は男性 1 名女性 5 名であった。統計的には有意差はなかったが、CTS-群には女性が多い傾向が見られた。CTS 手術を受けた患者の初回手術は 1998 年以後であり、平均すると透析 24 年後であった。

両群間に、年齢、 $\beta 2\text{MG}$ 濃度の透析前後値の平均に差を認めなかった。両群間に透析前の尿素窒素やカリウム濃度に有意差はないものの CTS+で高い傾向がみられた。透析前総蛋白は差を認めないが、透析後総蛋白は CTS+群で高い傾向をみとめ、CTS+群のほうが体重増加が多く透析時の徐水が多い可能性が伺われた。

D. 考察

日本透析医学会の 2009 年末におけるわが国の

慢性透析療法の現況によると、現在公表されている最も長期の生存率は、1983年に透析導入された患者の26年生存率で15.6%である。従って、今回対象とした患者は導入患者全体から見れば一部の全身状態の良好な患者群であると思われる。そういう患者群においては、CTS手術の有無は β 2MG濃度よりも、むしろ個人差によるものと推定される。

E. 結論

30年前後の長期間透析を継続しているにも関わらずCTS手術を経験していない患者にも、CTS手術経験者と同様に大量の β 2MG負荷があったと考えられた。CTS手術を経験していない患者には女性が多い傾向がみられた。大量の β 2MG負荷にも関わらず、CTS発症していないのは現時点では判明していない個人的要因が大きいと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Sakurai-Chin C, Ubara Y, Suwabe T, Hoshino J, Yonaha T, Hasegawa E, Sumida K, Hiramatsu R, Yamanouchi M, Hayami N, Yamauchi J, Tominaga N, Sawa N, Takemoto F, Masuoka K, Takaichi K, Oohashi K: AL amyloidosis with IgD-lambda monoclonal gammopathy and lambda-type Bence-Jones protein: successful treatment by autologous stem cell transplantation. *Clin Exp Nephrol* 14:506-510, 2010.

2. 学会発表

1) 平松里佳子、乳原善文、星野純一、諏訪部達也、住田圭一、長谷川詠子、山内真之、澤直樹、早見典子、竹本文美、高市憲明、大橋健一、谷口健一：原発性ALアミロイドーシスにおける免疫グロブリン異常の検討（多発性骨髄腫との対比）。第53回日本腎臓学会、神戸、6.16-18、2010.

2) 梶 大介、乳原善文、山内真之、早見典子、諏訪部達也、住田圭一、串田夏樹、永澤元規、平松里佳子、長谷川詠子、星野純一、澤直樹、竹本文美、原 茂子、黒田陽子、大橋健一、高市憲明：高Ca血症と腎不全を合併した原発性ALアミロイドーシスの一例。第40回日本腎臓学会東部学術大会、宇都宮、9.24-25、2010.

3) 諏訪部達也、乳原善文、永澤元規、串田夏樹、住田圭一、早見典子、土谷良樹、平松里佳子、山内真之、長谷川典子、澤直樹、竹本文美、高市憲明：高度の破壊性脊椎関節用から膀胱直腸障害を来し、イレウスを発症した透析歴42年の透析患者の1例。第40回日本腎臓学会東部学術大会、宇都宮、9.24-25、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 1981年に血液透析開始したある患者の血清β2MG濃度の推移

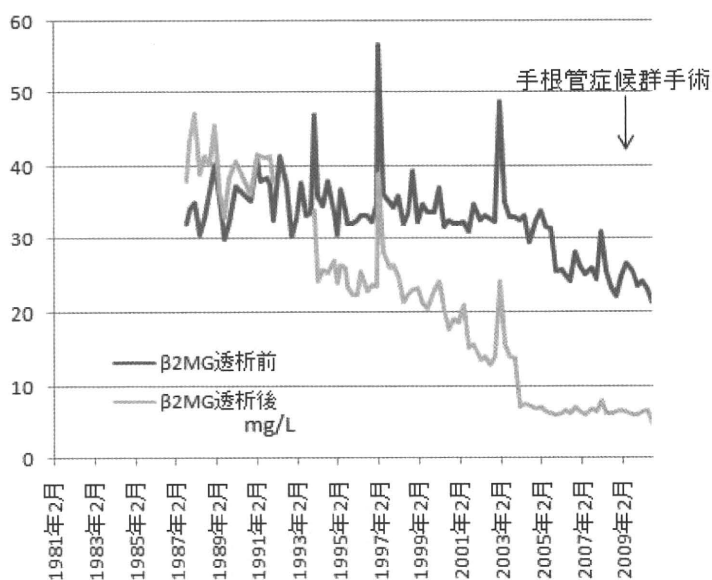


表 1 1977年から1982年に血液透析を導入し2010年まで虎の門病院で血液透析を継続している患者の検査成績の加重平均 (M ± SE)

	手根管手術あり	手根管手術なし	p
年齢	64.9 ± 4.6	68.3 ± 1.6	0.55
人数(男性/女性)	8 (5/3)	6 (1/5)	0.09
透析後β2MG(mg/L)	32.3 ± 0.8	35.1 ± 2.6	0.28
透析後β2MG(mg/L)	17.8 ± 1.1	18.0 ± 1.6	0.92
透析前総蛋白(g/dl)	6.8 ± 0.1	6.8 ± 0.1	0.83
透析後総蛋白(g/dl)	7.9 ± 0.2	7.5 ± 0.3	0.22
透析前尿素窒素(mg/dl)	83.1 ± 4.5	74.0 ± 4.8	0.2
透析後尿素窒素(mg/dl)	19.1 ± 1.4	15.7 ± 1.5	0.13
透析前カリウム(mEq/l)	5.2 ± 0.1	5.0 ± 0.2	0.3
透析後カリウム(mEq/l)	3.3 ± 0.1	3.3 ± 0.1	0.42

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

透析アミロイドーシス診断基準と炎症反応

研究分担者 西 慎一 神戸大学大学院医学研究科腎臓内科 腎・血液浄化センター

共同研究者 黒田 毅*、和田庸子*、中野正明**

*新潟大学大学院医歯学総合研究科腎・膠原病内科学分野、

**新潟大学医学部保健学科

研究要旨 透析アミロイドーシス(HDA)は、骨関節領域に多彩な病変を呈する。そのために、他の整形外科的疾患との鑑別が重要である。HDA に比較的特有な骨関節病変を組み合わせることで、診断精度が上がると考えられた。そこで、組み合わせ型の診断基準の作成を試み、実臨床での有用性を確認した。また、慢性炎症が透析アミロイドーシスの発症を助長すると言われているが、炎症性マーカーが診断補助マーカーとして有用か否かを検討した。組み合わせ型診断基準により、透析年数に伴い診断確定例が増加することが確認された。しかし、炎症性マーカーと骨関節病変、診断確定例との間に関連性はなく、補助診断マーカーとしての有用性は低いと考えられた。

A. 研究目的

透析アミロイドーシス(HDA)の診断基準の実臨床での有用性を確認する。現在までの検討では、臨床症状のみで判断が可能と考えられてきた。炎症反応はアミロイド化を促進すると言われてきた。そこで、炎症性マーカーが補助診断項目として有用かどうか検討することを目的とした

B. 研究方法

維持透析施設 3 施設、計 60 名の透析患者を対象とした。透析開始 5 年未満、5 年～10 年、10 年～15 年、15 年以上の透析患者をそれぞれの施設から各期間 5 名ずつ無作為に抽出し対象症例とした。臨床症状組み合わせ型の HDA 診断基準案を用い、該当者数、該当項目数の実態を調査した。また、HDA 発症促進因子と言われる慢性炎症を示す臨床マーカーとして、CRP、WBC、ferritin、アルブミンを取り入れた診断基準案の妥当性も検討した。統計処理には SPSS を用い解析した。

(倫理面への配慮)

問題なし。

C. 研究結果

HDA診断基準案を、8つの臨床的所見（主要症状5項目、副症状3項目）と2つの病理学的所見とした。臨床的主要症状2項目以上陽性例を臨床的診断例、臨床的主要症状1項目陽性+副症状1項目以上陽性例を臨床的疑い例として診断場合、対象症例60例の中で、臨床的診断例は、透析期間5年未満群で0例(0%)、透析期間5年～10年群で1例(1.7%)、透析期間10年～15年群で4例(6.7%)、透析期間15年以上群で11例(18.3%)であった。また、臨床的疑い例は、透析期間5年未満群で0例(0%)、透析期間5年～10年群で1例(1.7%)、透析期間10年～15年群で5例(8.3%)、透析期間15年以上群で2例(3.3%)であった。次にCRP、WBC、ferritin、アルブミンなどの炎症性マーカーと診断主要症状である骨関節症状との関連を検討したが、両者間に関連は認められなかった。また、炎症性マーカーと診断基準に基づいた臨床的診断例、疑い例などの診断確定との関連性の検討でも、これらの間にも有意な関連は認められなかった(図1)。

D. 考察

臨床的主要症状2項目以上陽性例、臨床的主要症状1項目陽性+副症状1項目以上陽性例は、透析年数とともに増加する傾向が確認された。透析

年数に依存して発症が増加すると言われる HDA の診断に関して、骨関節症状を組み合わせた診断は、信頼性における診断方法と考えられた。ただし、炎症反応と主要症状の骨関節症状、診断基準による診断確定例との間に関連性がないことから、炎症反応に関する臨床検査データを取り入れる意義は少ないと考えられた。

E. 結論

臨床的主要症状 2 項目以上陽性例を臨床的診断例、臨床的主要症状 1 項目陽性+副症状 1 項目以上陽性例を臨床的疑い例として診断することが実臨床上当たると考えられた。臨床症状を組み合わせて作成した HDA 診断基準の臨床的有用性があると判断されたが、炎症反応性マーカーは補助診断項目とはなりえないと判断された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 西慎一: 合併症に対する血液透析方法を考える. アミロイド症. *臨床透析* 26:231-234, 2010.
- 2) Nakai S, Suzuki K, Masakane I, Wada A, Itami N, Ogata S, Kimata N, Shigematsu T, Shinoda T, Syouji T, Taniguchi M, Tsuchida K, Nakamoto H, Nishi S, Nishi H, Hashimoto S, Hasegawa T, Hanafusa N, Hamano T, Fujii N, Marubayashi S, Morita O, Yamagata K, Wakai K, Watanabe Y, Iseki K, Tsubakihara Y: Overview of regular dialysis treatment in Japan. *Ther Apher Dial* 14:505-540, 2010.

3) Tsubata Y, Akiyama F, Oya T, Ajiro J, Saeki T, Nishi S, Narita I: IgG4-related chronic tubulointerstitial nephritis without autoimmune pancreatitis and the time course of renal function. *Intern Med* 49:1593-1598, 2010.

4) Saeki T, Nishi S, Imai N, Ito T, Yamazaki H, Kawano M, Yamamoto M, Takahashi H, Matsui S, Nakada S, Origuchi T, Hirabayashi A, Homma N, Tsubata Y, Takata T, Wada Y, Saito A, Fukase S, Ishioka K, Miyazaki K, Masaki Y, Umehara H, Sugai S, Narita I: Clinicopathological characteristics of patients with IgG4-related tubulointerstitial nephritis. *Kidney Int* 48:1016-1023, 2010.

2. 学会発表

- 1) 小林大介、和田庸子、黒田 毅、上野光博、西慎一、中野正明、成田一衛: 糸球体上皮下および内皮下に microtubules で構成された organized deposits を認めたループス腎炎の 1 例. 第 40 回東部臓学会、栃木、9.25、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

加熱処理後ウシアミロイドの伝播性についての病理学的検討

研究分担者 松井高峯 帯広畜産大学基礎獣医学病理学分野

共同研究者 渡邊謙一*、村上智亮*、古林与志安*、澤下仁子**、樋口京一**

*帯広畜産大学基礎獣医学病理学分野、

**信州大学大学院医学系研究科加齢生物分野

研究要旨 未発症アミロイドーシス牛に由来する牛アミロイドが食品として流通する可能性があるため、牛アミロイドに対する熱処理の影響を 105, 121, 132°C の条件で検討した。病理組織学的に牛アミロイドの染色性は 121°C で殆ど消失した。しかしながら、マウスへの伝播試験では 105°C で 2/9、121°C で 1/9 匹のマウスにアミロイド沈着が誘発された。

A. 研究目的

未発症アミロイドーシス牛に由来する牛アミロイドが食品に含まれる可能性が示唆されるため、牛アミロイドの加熱処理による性状の変化を組織学的および超微形態学的に検討するとともにマウスに対する伝播能の有無を検討する。

のものとの間に殆ど差異は認められなかった。

マウスによる伝播性試験では未処理投与群で1/11、105°C投与群で2/9、121°C投与群で1/9匹の脾口胞周囲にアミロイドの沈着が認められた。132°C投与群10匹での沈着は認められなかった。なお、陽性対照として用いたマウスアミロイド(未処理)投与群での沈着は4/4匹であった。

B. 研究方法

アミロイドーシス牛の腎臓組織切片に対し 30 分の加熱処理 (105, 121, 132°C) を行った後の染色性 (HE、PAS、コンゴレッド、チオフラビン、免疫染色) を比較する。ミロイドーシス牛の腎臓を加熱処理した後超微形態学的に観察する。アミロイドーシス牛の腎臓より精製・抽出したアミロイドに加熱処理を行い同様の方法で観察するとともに、硝酸銀にて炎症刺激を行ったマウスに投与して伝播能の有無を検討する。

D. 考察

牛のアミロイドは 121°C の加熱処理により、病理組織学的に染色性が著しく減衰したが、AEF 活性 (伝播性) は保持されていることが示された。しかしながら、未処理牛アミロイドの伝播性はマウスアミロイドに比べ著しく低く、アミロイドの伝播には種の壁の存在が示唆された。

(倫理面への配慮)

特になし。

E. 結論

牛のアミロイドは通常の調理温度 (100°C、121°C) に手は AEF 活性 (伝播能) が保持されていることが示唆された。

C. 研究結果

組織切片および抽出アミロイドの塗抹標本において121°C以上の熱処理によりコンゴレッド、チオフラビンに対する染色性が著しく減衰した。HE、PAS、抗牛SAAモノクローナル抗体を用いた免疫染色および超微形態像は熱処理したものと未処理

F. 健康危険情報

特になし。

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

牛アミロイドの熱処理による性状の変化と伝播性

帯広畜産大学 家畜病理学教室 松井 高峯

	組織切片					塗沫標本(精製アミロイド)				図1
	CR	CR蛍光	ThT	抗SAA	EM	CR	CR蛍光	ThT	EM	
表1 無処理	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
105°C	+	+	+	+	+	±	±	±	+	
121°C	-	-	-	+	+	-	±	-	+	
132°C	-	-	-	+	+	-	±	-	+	

	アミロイド	投与量	沈着マウス	沈着量	
表2 無処理	ウシ由来	100 μg	0/5	1/11	1+
		500 μg	<u>1/6</u>		
105°C		100 μg	<u>2/5</u>	2/9	2+
		500 μg	0/4		
121°C		100 μg	0/5	1/9	2+
		500 μg	<u>1/4</u>		
132°C		100 μg	0/5	0/10	
		500 μg	0/5		
コントロール	マウス由来	100 μg	<u>4/4</u>	1+~2+	

• 表1 熱処理による牛アミロイドの性状変化

CR:コンゴレッド染色 ThT:チオフラビン染色 EM:電子顕微鏡像 抗SAA:免疫染色

• 表2 熱処理アミロイドのマウスへの伝播試験

• 図1 精製アミロイド(無処理)のコンゴレッド染色後の偏光像

2 121°C処理後の精製アミロイドのコンゴレッド染色後の偏光像

3 精製アミロイド(無処理)の電顕像

結論 121°Cの熱処理で染色性の減退が認められるが、121°Cの熱処理後のアミロイドにも伝播性は認められた。

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 分担研究報告書

AA アミロイドーシスモデルマウスにおける SAA、アポ E の動態

研究分担者 山田俊幸 自治医科大学臨床検査医学

共同研究者 佐藤純司 自治医科大学臨床検査医学

研究要旨 マウス AA アミロイドーシスの経過における血清または組織中の SAA、アポ E の動態を検討した。アミロイドーシスは AEF と硝酸銀で惹起し、2 日、5 日、21 日、55 日後の血清、脾臓を採取した。硝酸銀のみの投与群と比較してアミロイドーシス惹起群で血清アポ E 濃度は高値の傾向であったが、血清 SAA 濃度には特徴的な所見はなかった。脾臓の免疫染色、イムノブロットによる検討では 2 日目で既に SAA が検出され、複数の分解産物のパターンは経過を通して同一であった。この分解産物の分子サイズは血清中にみられたものとは異なっていた。吸収という観点では intact SAA ならびに高分子 SAA 分解産物は速めに吸収され、いわゆる AA サイズのものは残存傾向にあった。アポ E は 21 日目以降から検出され、分解産物のみが量的に少なく認められた。SAA はアミロイド特異的な分解を受けて沈着すると想定され、そのサイズによって吸収態度が異なる。アポ E の沈着は量的に少なく、遅く起こる。以上を治療のターゲットを考慮する上で参考にしたい。

A. 研究目的

著者らは昨年の本研究でマウス SAA とその分解産物 AA に良好な反応性を示すモノクロナル抗体を取得した。本研究ではこの抗体を応用して、マウス AA アミロイドーシス (ア症) においてアミロイド主成分である AA と前駆体である SAA の血中、組織中における動態を免疫化学的に追跡した。あわせてアミロイド共通因子であるアポリポ蛋白 E (アポ E) についても同様に検討した。

B. 研究方法

ヒトアポ E ノックインマウスに硝酸銀、AEF 投与によりアミロイドーシスを惹起した。惹起前、2 日、5 日、21 日、55 日後の血清、脾臓を採取した。AEF 非投与群を非ア症群とした。モノクロナル抗マウス SAA 抗体、抗ヒトアポ E 血清を用いて、脾臓組織は免疫組織化学に、血清と脾臓ホモジネートはイムノブロットに、血清は ELISA による濃度測定に供した。

(倫理面への配慮)

動物実験は学内の審査委員会の許可を得、規程に従って行った。炎症刺激が苦痛となるが炎症惹

起物質の量を可能な限り少なめにする、などの配慮をした。

C. 研究結果

血清 SAA 濃度においては、ア症群と非ア症群との間に差異はなかった。イムノブロットでは intact SAA の他に複数の分解産物を認めた。

脾臓には SAA と AAs が Day 2 で既に認められ、Day 4 と Day 21 に顕著であった。Day 55 には SAA ならびに高分子の AAs が消失し、低分子 AA が残存する傾向にあった。脾臓中の AAs の分子サイズは前述した血清中の SAA 分解産物のそれらとは異なっていた。

アポ E においては、急性炎症期には血清濃度は低下傾向にあった。また、ア症群が非ア症群に比べ高値傾向にあった。全時期を通じて血清中には intact サイズのものだけが検出された。

脾臓には Day 2、4 では明確に検出されず、Day 21 で明確に分解産物のみが検出された。それは Day 55 で著減したものの残存は明確であった。

D. 考察

脾臓に SAA/AAs が沈着する際は、SAA として

沈着した後に AA サイズに分解されるという説があったが、今回の結果は、始めから SAA と複数の分解産物 AAs として沈着するが、SAA サイズならびに高分子 AAs はターンオーバー（消去）が速く、一方いわゆる AA は残存しやすい可能性が考えられた。例えば AA サイズにおいて臓器別差異があるならアミロイドのターンオーバーにも影響している可能性がある。また、血中で検出されるおそらく自然分解による AA サイズとアミロイド内の AA サイズが異なることは、やはりアミロイド特異的な分解様式の存在が示唆される。

アポ E は沈着蛋白量として少なく、参画も遅い。SAA と異なり恒常的に産生されているためとも考えられるが、その発現がアミロイドーシス発症に重要であるという知見から考えると奇異な印象が残る。

以上の知見をアミロイドーシス治療法の開発に役立てていきたい。

E. 結論

マウス AA アミロイドーシスにおいて SAA はアミロイド特異的な分解を受け、複数の AA として沈着するが、高分子サイズのもの吸収されやすく、低分子サイズのもの残存しやすい。アポ E の参画は遅く、少ない。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kotani K, Satoh N, Yamada T: Bezafibrate and serum amyloid A-low-density lipoprotein complex in patients with type 2 diabetes mellitus and hypertriglyceridemia. *Eur J Intern Med* 21:e10, 2010.
- 2) 山田俊幸: M 蛋白検出法とその問題点. *臨床病理* 58:397-400, 2010.
- 3) 山田俊幸: 広義のアポリポ蛋白. SAA. *臨床検査* 54:395-400, 2010.
- 4) 山田俊幸: 全身性アミロイドーシス. *検査と技術* 38: 343-347, 2010.

2. 学会発表

- 1) 山田俊幸, 奥田恭章: SAA 1 と HDL の親和性. 第 54 回日本リウマチ学会学術集会、神戸、4.23、2010.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得（申請中を含む）

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし