

Obayashi K, Ogawa H, Ando Y: Clinicopathological features of senile systemic amyloidosis: an ante- and post-mortem study. *Mod Pathol* 24: 1533-1544, 2011.

29) Ueda M, Ageyama N, Nakamura S, Nakamura M, Chambers J, Misumi Y, Mizuguchi M, Shinriki S, Kawahara S, Tasaki T, Jono H, Obayashi K, Sasaki E, Une Y, Ando Y: Aged vervet monkeys developing transthyretin amyloidosis with the human disease-causing Ile122 allele: A valid pathological model of the human disease. *Lab Invest*, in press.

30) Yamashita T, Ando Y, Okamoto S, Yohei M, Hitahara T, Ueda M, Obayashi K, Nakamura M, Jono H, Asonuma K, Inomata Y, Uchino M: Effect of liver transplantation on the survival of patients with ordinary onset familial amyloid polyneuropathy in Japan. *Amyloid* 18 (Suppl.1): 185-186, 2011.

31) Yamashita T, Ando Y, Okamoto S, Misumi Y, Hirahara T, Ueda M, Obayashi K, Nakamura M, Jono H, Shono M, Asonuma K, Inomata T, Uchino M: Long-term survival after liver transplantation in patients with familial amyloid polyneuropathy. *Neurology*, in press.

32) 安東由喜雄: 家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) の治療法の進歩. *神経治療学会誌* 28: 115-120, 2011.

33) 植田光晴、安東由喜雄: 家族性アミロイドポリニューロパチー, 老人性全身性アミロイドーシス疾患モデル動物. *関西実験動物研究会会報* 33: 1-9, 2011.

34) 植田光晴、安東由喜雄: 病理組織標本を用いた遺伝子変異解析. *日本臨床検査自動化学会会誌* 36: 189-195, 2011.

35) 山下太郎、安東由喜雄、内野誠: 家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP). *脳と神経* 63: 583-595, 2011.

36) 山下太郎、安東由喜雄: 遺伝性アミロイドアングリオパチー. *神経内科* 74: 485-492, 2011.

2. 学会発表

1) Yanagisawa A, Sueyoshi T, Ueda M, Obayashi K, Yawatari K, Ando Y, Mizuta H: TTR-related amyloidosis in ligamentum flavum. The VIIIth International Symposium on Familial Amyloidotic Polyneuropathy, Kumamoto, Japan, 11.20-22, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許出願

安東由喜雄、城野博史、Rene Alvarez、Dinah Sah
 1) 発明の名称: siRNA Therapy for Transthyretin (TTR) Related Ocular Amyloidosis
 出願番号: PCT/US2011/030392
 出願日: 平成 23 年 3 月 29 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

老人性全身性アミロイドーシスの臨床像の検討

研究分担者 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 関島良樹*、中川道隆*、東城加奈*、山崎恭平**

*信州大学医学部脳神経内科、リウマチ・膠原病内科、

**昭和伊南総合病院循環器内科

研究要旨 老人性全身性アミロイドーシス (SSA) は、高齢者で頻度の高い疾患であるが根本的な治療法が存在しないため積極的に臨床診断されることは少ない。しかし、TTR 四量体を安定化する低分子化合物や遺伝子治療は SSA に対して有効性が期待され、本症の臨床像の解明および早期診断法の確立は急務である。今回我々は、SSA 患者 20 名の臨床像を詳細に解析した。更に SSA の主要な症状の一つである手根管症候群 (CTS) に注目し、特発性 CTS 患者における野生型 TTR アミロイド沈着の頻度を検討した。SSA 患者は 70%が男性であり、発症年齢は平均 71.2 歳であった。臨床症状では、20 名中 13 名で CTS を認め内 11 例では初発症状であった。また、約半数の患者で腎機能障害を認め、経過中に脳梗塞や腎梗塞などの塞栓症を発症した症例が 5 例在した。特発性 CTS 患者の検討では、100 名中 34 名 (34%) に滑膜組織へのアミロイドの沈着を認め、その全てが野生型 TTR 由来のアミロイドであった。統計学的解析では、特発性 CTS 患者群では対照群に比べ有意に TTR アミロイド陽性率が高く (オッズ比 15.8, 95%信頼区間 3.3-75.7), 「加齢」と「男性」が手根管への TTR アミロイド沈着の独立した危険因子であることが明らかになった。今回の研究で、SSA は従来考えられていたよりも若年で発症する機会が多いことが明らかになった。また、CTS は心アミロイドーシスに先行して出現することが多く、TTR アミロイド陽性の CTS 患者を検索することにより、早期の SSA 患者の診断が可能であると考えられた。

A. 研究目的

老人性全身性アミロイドーシス (SSA) は、変性した野生型トランスサイレチン (TTR) が心臓を中心とした全身臓器に沈着する予後不良な疾患である。剖検例では、80 歳以上の 12~25%に心臓への TTR アミロイド沈着が認められると報告されているが、根本的な治療法が存在しないため積極的に臨床診断されることは少ない。しかし、新たな家族性アミロイドポリニューロパチーの治療薬として注目されている diflusal や tafamidis などの TTR 四量体を安定化する低分子化合物や siRNA やアンチセンスオリゴヌクレオチドなどの遺伝子治療は、SSA に対しても有効性が期待される。よって、SSA の臨床像の解明および早期診断法の確立は急務である。今回の我々の研究の目的は、早期診断の鍵となる SSA の臨床像を明らかにすることである。

B. 研究方法

当科で経験した SSA 患者 20 名の属性、臨床像、臨床検査所見、画像検査所見、生検組織の病理像を詳細に検討した。

更に、SSA の主要な症状の一つである手根管症候群 (CTS) に注目し、特発性 CTS 患者における野生型 TTR アミロイド沈着の頻度を検討した。具体的には、手根管開放術を受けた 126 名の CTS 患者中、特発性 CTS と診断された患者 100 名 (平均年齢 66.9±12.5 歳, 男性 26 名, 女性 74 名) を対象に、手根管開放術時に滑膜組織を採取し、コンゴレッド染色および免疫組織染色を行った。抗 TTR 抗体陽性であった場合は TTR 遺伝子の解析を行った。また、対照として生前に CTS を認めなかった剖検患者 32 名の手根管組織を病理学的に検討した。

(倫理面への配慮)

当科で経験した SSA 患者の解析は、個人が特定できないように匿名化して解析した。手根管症候群患者における野生型 TTR アミロイド沈着の頻度に関する研究は、信州大学医学部医倫理委員会の承認を受けた後、全ての患者から文書でインフォームド・コンセントを取得し、患者を特定できないように匿名化して実施した。

C. 研究結果

当科で経験した SSA 患者は、男性 14 例に対して女性 6 例と男性の頻度が高かった。また、診断時の平均年齢は 76.0 歳であったが、発症年齢の平均は 71.2 歳と比較的若く、特に男性では 14 例中 9 例が 60 歳代での発症であった。今回の解析では心臓へのアミロイド沈着を認めた症例のみを SSA と診断しているため、全例で心不全、不整脈、心伝導障害などの心臓関連の症状を認めたが、CTS の頻度も非常に高く、20 例中 13 例で認められ内 11 例では初発症状であった。また、経過中に脳梗塞や腎梗塞などの塞栓症を呈した症例が 5 例存在した。更に、約半数の患者で腎機能障害を認めた。アミロイド沈着の確認部位は、多くの例で心筋を含む複数臓器の生検でアミロイド沈着を確認し診断されていたが、最近の症例では皮膚や手根管組織などの心筋以外の生検と Tc-99m ピロリン酸心筋シンチとの組み合わせで診断される例も少なくなかった。

特発性 CTS 患者の検討では、100 名中 34 名 (34%) に滑膜組織へのアミロイドの沈着を認めた。免疫組織染色では、沈着したアミロイドは全例で抗 TTR 抗体で特異的に染色された。TTR 遺伝子および蛋白の解析では、全ての患者で変異は認められず、沈着したアミロイドは野生型 TTR 由来と考えられた。ロジスティック回帰分析を用いた統計学的な解析では、特発性 CTS 患者群では対照群に比べ有意に TTR アミロイド陽性率が高く (オッズ比 15.8, 95% 信頼区間 3.3-75.7), 「加齢」および「男性」が手根管への TTR アミロイド沈着の独立した危険因子であることが明らかになった。

D. 考察

SSA 患者 20 例の検討から、本症は男性では 60 代発症も稀ではなく、従来考えられていたよりも

若年で発症するケースが多いと考えられた。手根管組織への野生型 TTR アミロイドの沈着は、従来は限局性アミロイドーシスと考えられていたが、今回の SSA 患者の検討と特発性 CTS 患者の検討から、少なくともその一部は全身性アミロイドーシス (SSA) の初発症状を見ていると考えられた。SSA 患者において、CTS は心アミロイドーシスに先行して出現することが多く、TTR アミロイド陽性の CTS 患者を検索することにより、早期の SSA 患者の診断が可能であると考えられた。

E. 結論

SSA は従来考えられていたよりも若年で発症するケースが多。CTS は心アミロイドーシスに先行して出現することが多く、TTR アミロイド陽性の CTS 患者を検索することにより、早期の SSA 患者の診断が可能である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kodaira M, Morita H, Shimojima Y, Ikeda SI: Electrophysiological features of familial amyloid polyneuropathy in endemic area. *Amyloid* 18:10-18, 2011.
- 2) Tsuchiya-Suzuki A, Yazaki M, Kametani F, Sekijima Y, Ikeda S: Wild-type transthyretin significantly contributes to the formation of amyloid fibrils in familial amyloid polyneuropathy patients with amyloidogenic transthyretin Val30Met. *Hum Pathol* 42:236-243, 2011.
- 3) Katoh N, Matsuda M, Tsuchiya-Suzuki A, Ikeda S: Regression of gastroduodenal amyloid deposition in systemic AL amyloidosis after intensive chemotherapies. *Brit J Haematol* 153:535-538, 2011.
- 4) Ikeda S, Sekijima Y, Tojo K, Koyama J: Diagnostic value of abdominal wall fat pad biopsy in senile systemic amyloidosis. *Amyloid* 18:211-215.
- 5) Miyazaki D, Yazaki M, Ishii W, Matsuda M, Hoshii Y, Nara K, Nakayama J, Ikeda S: A rare lung nodule consisting of adenocarcinoma and amyloid deposition

in a patient with primary systemic AL amyloidosis. *Intern Med* 50:243-246, 2011.

6) Matsuda M, Katoh N, Tazawa k, Shimojima Y, Mishima Y, Sato K, Ikeda S: Surgical removal of amyloid-laden lymph nodes: a possible therapeutic approach in a primary systemic AL amyloidosis patient with focal lymphadenopathy. *Amyloid* 18:79-82, 2011.

7) 池田修一: 脳アミロイドアンギオパチーの概念の変遷と分類. *神経内科* 74:467-471, 2011.

8) 池田修一: 脳アミロイドアンギオパチーの画像診断と治療. *神経内科* 74:493-499, 2011.

9) 日根野晃代、池田修一: 脳アミロイドアンギオパチー. *日本臨床* 69:140-147, 2011.

10) 池田修一: 老人性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*, 医歯薬出版, 東京, pp102-107, 2011.

2. 学会発表

1) Sekijima Y, Uchiyama S, Tojo K, Sano K, Shimizu Y, Imaeda T, Kato H, Ikeda S: High Prevalence of Wild-Type TTR Deposition in Patients with Idiopathic Carpal Tunnel Syndrome: A Common Cause of Carpal Tunnel Syndrome in the Elderly. The 63rd Annual Meeting of the American Academy of Neurology, Hawaii, 4.9-16, 2011.

2) 池田修一: シンポジウム アミロイド蛋白の代謝回

転と治療による退縮. 第 52 回日本神経学会総会、名古屋、5.18-20、2011.

3) 町田香津子、安出卓司、東城加奈、古川勝敏、工藤幸司、鷺野谷利幸、池田修一: 脳アミロイドアンギオパチーおよび全身性アミロイドーシスに対する¹¹C]BF227PET の診断的有用性. 第 52 回日本神経学会総会、名古屋、5.18-20、2011.

4) 江澤直樹、東城加奈、関島良樹、池田修一: 老人性全身性アミロイドーシスの早期診断における両側手根管症候群の有用性. 第 52 回日本神経学会総会、名古屋、5.18-20、2011.

5) 鈴木彩子、矢崎正英、関島良樹、亀谷富由樹、池田修一: 肝移植後 FAP 患者における組織沈着アミロイドの turn-over について. 第 52 回日本神経学会総会、名古屋、5.18-20、2011.

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

非集積地の高齢発症型 FAP ATTR Val30Met の自然歴に関する検討

研究分担者 小池春樹 名古屋大学神経内科
 共同研究者 橋本里奈*, 富田稔*, 川頭祐一*, 飯島正博*, 山本正彦**, 田中章景*,
 藤竹純子***, 川並透****, 加藤丈夫****, 祖父江元*
 *名古屋大学神経内科 **愛知学院大学健康科学科
 京都市立病院神経内科 *山形大学第三内科

研究要旨 非集積地の高齢発症型 FAP ATTR Val30Met の自然歴を検討した。対象は集積地との関連を認めず、組織学的にアミロイドが検出され、遺伝子診断にて確定した 50 歳以上発症の FAP ATTR Val30Met 48 家系 50 例 (男性 43 例, 女性 7 例)。アミロイドーシスに関連した症状の出現年齢と死亡時年齢, および, 末梢神経伝導検査所見, 胸部 X-p 所見, 心エコー所見の推移を retrospective に検討した。上肢と下肢の感覚障害の出現時期はそれぞれ 66.0 ± 6.1 (mean \pm SD) 歳と 65.1 ± 6.5 歳, 上肢と下肢の運動障害の出現時期はそれぞれ 66.3 ± 5.8 歳と 66.5 ± 6.2 歳であった。10%の症例では上肢の症状が下肢の症状よりも早く出現した。下痢/便秘と立ちくらみ/失神の出現時期はそれぞれ 66.4 ± 5.8 歳と 66.4 ± 6.3 歳であった。排尿障害は 67.4 ± 6.7 歳時に出現した。杖と車椅子使用開始時期はそれぞれ 67.7 ± 6.6 歳と 68.9 ± 6.0 歳であった。心不全の症状は 69.3 ± 6.2 歳時に出現した。発症年齢は 51-77 歳と多様であったが, 上記の臨床的な指標がそれぞれの症例で出現する順序は一樣な傾向があった。死亡時年齢は 70.0 ± 6.0 歳であり, 発症から死亡までの期間は 7.3 ± 2.9 年であった。死因は心不全と突然死が多くを占めた。正中神経の複合筋活動電位と心胸郭比と心室中隔壁厚は 2,3 年の期間で明らかな悪化がみられた。以上の結果から, 非集積地の高齢発症型 FAP ATTR Val30Met は, 従来型の集積地の若年発症型 FAP ATTR Val30Met とは異なる経過を呈すると考えられた。

A. 研究目的

近年, 遺伝子診断の技術の進歩とともに, 高齢で発症し, 集積地との関連を認めない FAP ATTR Val30Met 症例が全国に散在性に分布していることが明らかになり, FAP, 特に FAP ATTR Val30Met は従来考えられていたほど稀な疾患ではないと考えられるようになってきている。非集積地の FAP ATTR Val30Met は高齢であるが故に肝移植の適応にならない症例が多いが, diflunisal や tafamidis などのトランスサイレチンを安定化させてアミロイドの沈着を抑制する薬剤が近い将来に使用可能になることが予想され, このような症例の自然歴の把握が重要な課題となってきた。今回, 非集積地の高齢発症型 FAP ATTR Val30Met の自然歴を検討した。

B. 研究方法

集積地との関連を認めず, 組織学的にアミロイドが検出され, 遺伝子診断にて確定した 50 歳以上発症の FAP ATTR Val30Met 48 家系 50 例 (男性 43 例, 女性 7 例) のアミロイドーシスに関連した症状の出現年齢と死亡時年齢, および, 末梢神経伝導検査所見, 胸部 X-p 所見, 心エコー所見の推移を retrospective に検討した。

(倫理面への配慮)

遺伝子診断に関しては名古屋大学および当該施設倫理委員会の承認のもと, 十分な説明を行い, 同意を得て行った。

C. 研究結果

上肢と下肢の感覚障害の出現時期はそれぞれ 66.0 ± 6.1 (mean \pm SD) 歳と 65.1 ± 6.5 歳, 上肢と下肢の運動障害の出現時期はそれぞれ 66.3 ± 5.8 歳と 66.5 ± 6.2 歳であった. これらの症状の出現時期は短期間に集中する傾向があり, 10%の症例では上肢の症状が下肢の症状よりもはやく出現しており, 従来型の集積地の若年発症例とは異なる経過を呈した. 下痢/便秘と立ちくらみ/失神の出現時期はそれぞれ 66.4 ± 5.8 歳と 66.4 ± 6.3 歳であった. 集積地の若年発症例にみられる嘔吐などの上部消化管症状は目立たなかった. 排尿障害は 67.4 ± 6.7 歳時に出現した. 杖と車椅子使用開始時期はそれぞれ 67.7 ± 6.6 歳と 68.9 ± 6.0 歳であった. 心不全の症状は 69.3 ± 6.2 歳時に出現した. 発症年齢は51-77歳と多様であったが, 上記の臨床的な指標がそれぞれの症例で出現する順序は一様な傾向があった. 死亡時年齢は 70.0 ± 6.0 歳であり, 発症から死亡までの期間は 7.3 ± 2.9 年であった. 死因は心不全 (21例中8例) と突然死 (21例中7例) が多くを占めた. 正中神経の複合筋活動電位と心胸郭比と心室中隔壁厚は2,3年の期間で明らかな悪化がみられた.

D. 考察

非集積地の高齢発症 FAP ATTR Val30Met の経過は発症年齢に関係なく比較的均一であり, 短期間のうちに症状が完成すると考えられた.

E. 結論

非集積地の高齢発症型 FAP ATTR Val30Met は, 従来型の集積地の若年発症型 FAP ATTR Val30Met とは異なる経過を呈すると考えられた.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Koike H, Tanaka F, Hashimoto R, Tomita M, Kawagashira Y, Iijima M, Fujitake J, Kawanami T, Kato T, Yamamoto M, Sobue G: Natural history of transthyretin Val30Met familial amyloid polyneuropathy: analysis of late-onset cases from

non-endemic areas. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 83: 152-158, 2012.

2) Koike H, Kiuchi T, Iijima M, Ueda M, Ando Y, Morozumi S, Tomita M, Kawagashira Y, Watanabe H, Katsuno M, Shimoyama Y, Okazaki Y, Kamei H, Sobue G: Systemic but asymptomatic transthyretin amyloidosis 8 years after domino liver transplantation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 82: 1287-1290, 2011.

3) Koike H, Hashimoto R, Tomita M, Kawagashira Y, Iijima M, Tanaka F, Sobue G: Diagnosis of sporadic transthyretin Val30Met familial amyloid polyneuropathy: a practical analysis. *Amyloid* 18: 53-62, 2011.

4) Koike H, Tanaka F, Sobue G: Paraneoplastic neuropathy: wide-ranging clinicopathological manifestations. *Curr Opin Neurol* 24: 504-510, 2011.

5) Koike H, Hashimoto R, Tomita M, Kawagashira Y, Iijima M, Nagamatsu M, Sobue G: The wide range of clinical manifestations in leprous neuropathy: two case reports. *Intern Med* 50: 2223-2226, 2011.

6) Koike H, Hama T, Kawagashira Y, Hashimoto R, Tomita M, Iijima M, Sobue G: The significance of folate deficiency in alcoholic and nutritional neuropathies: Analysis of a case. *Nutrition*, in press.

7) Koike H, Tanaka F, Sobue G: Transthyretin Val30Met familial amyloid polyneuropathy in Japan. In: Halcheck IP, Vernon NR editors. *Amyloids: Composition, Functions and Pathology*. Nova Science Publishers, in press.

8) Koike H, Sobue G: Paraneoplastic neuropathy. *Handb Clin Neurol*, in press.

9) Sone J, Tanaka F, Koike H, Inukai A, Katsuno M, Yoshida M, Watanabe H, Sobue G: Skin biopsy is useful for the antemortem diagnosis of neuronal intranuclear inclusion disease. *Neurology* 76: 1372-1376, 2011.

10) Morozumi S, Koike H, Tomita M, Kawagashira Y, Iijima M, Katsuno M, Hattori N, Tanaka F, Sobue G: Spatial distribution of nerve fiber pathology and vasculitis in microscopic polyangiitis-associated neuropathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 70: 340-348, 2011.

11) Iijima M, Koike H, Katsuno M, Sobue G:

Polymorphism of transient axonal glycoprotein-1 in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 16 Suppl 1: 52-55, 2011.

12) Miyazaki Y, Koike H, Akane A, Shibata Y, Nishiwaki K, Sobue G: Spinal cord stimulation markedly ameliorated refractory neuropathic pain in transthyretin Val30Met familial amyloid polyneuropathy. *Amyloid* 18: 87-90, 2011.

13) Miyazaki Y, Koike H, Ito M, Atsuta N, Watanabe H, Katsuno M, Kusunoki S, Sobue G: Acute superficial sensory neuropathy with generalized anhidrosis, anosmia, and ageusia. *Muscle Nerve* 43: 286-288, 2011.

14) Hashizume A, Koike H, Kawagashira Y, Banno H, Suzuki K, Ito M, Katsuno M, Watanabe H, Tanaka F, Naganawa S, Kaneko R, Ishii A, Sobue G: Central nervous system involvement in n-hexane polyneuropathy demonstrated by MRI and proton MR spectroscopy. *Clin Neurol Neurosurg* 113: 493-495, 2011.

15) Iida M, Koike H, Ando T, Sugiura M, Yamamoto M, Tanaka F, Sobue G: A novel MPZ mutation in Charcot-Marie-Tooth disease type 1B with focally folded myelin and multiple entrapment neuropathies. *Neuromuscul Disord*, in press.

16) 小池春樹、祖父江元：Acute autonomic and sensory neuropathy の臨床と病理. *自律神経* 48: 96-100, 2011.

17) 小池春樹、祖父江元：しびれとは. *日本医師会雑誌* 140: 328-330, 2011.

18) 小池春樹、祖父江元：ANCA 関連血管炎による神経障害. *医学のあゆみ* 236: 788-790, 2011.

19) 小池春樹、祖父江元：家族性アミロイドポリニューロパチーの臨床と病理. *臨床神経学* 51: 1134-1137, 2011.

20) 小池春樹、祖父江元：脚気ニューロパチーの神経病理. *神経内科*, in press.

21) 飯島正博、小池春樹、祖父江元：CIDP の遺伝子多型と治療反応性. *Annual review 神経* 300-309, 2011.

22) 橋口昭大、徳永章子、中村友紀、岡本裕嗣、有村公良、小池春樹、田中章景、祖父江元、高嶋

博：シャルコー・マリー・トゥース病200例のマイクロアレイDNAチップによる遺伝子診断. *Peripheral Nerve* 22: 64-71, 2011.

2. 学会発表

1) Koike H, Sobue G: Late-onset familial amyloid polyneuropathy in Japan. VIIIth International Symposium on Familial Amyloidotic Polyneuropathy, Kumamoto, Japan, 11.20-22, 2011.

2) Koike H, Hashimoto R, Tomita M, Kawagashira Y, Iijima M, Tanaka F, Sobue G: Diagnosis of sporadic transthyretin Val30Met familial amyloid polyneuropathy: a practical analysis. VIIIth International Symposium on Familial Amyloidotic Polyneuropathy, Kumamoto, Japan, 11.20-22, 2011.

3) Koike H, Kiuchi T, Iijima M, Ueda M, Ando Y, Morozumi S, Tomita M, Kawagashira Y, Watanabe H, Katsuno M, Shimoyama Y, Okazaki Y, Kamei H, Sobue G: Systemic but asymptomatic transthyretin amyloidosis eight years after domino liver transplantation. VIIIth International Symposium on Familial Amyloidotic Polyneuropathy, Kumamoto, Japan, 11.20-22, 2011.

4) Koike H, Hashimoto R, Tomita M, Kawagashira Y, Iijima M, Tanaka F, Sobue G: Diagnosis of sporadic transthyretin Val30Met familial amyloid polyneuropathy: a practical analysis. 2011 PNS Biennial Meeting, Potomac, Maryland, 6.25-29, 2011.

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

家族性アミロイドポリニューロパチーの凝固・線溶異常

研究分担者 山田正仁 金沢大学大学院脳老化・神経病態学 (神経内科学)

共同研究者 高橋良一*、小野賢二郎*、池田篤平*、赤木明生*、能登大介*、野崎一朗*、
 坂井健二*、朝倉英策**、岩佐和夫*

*金沢大学大学院脳老化・神経病態学 (神経内科学)

**金沢大学附属病院高密度無菌治療部 (第三内科)

研究要旨 家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)の凝固・線溶異常の有無について検討するため、トランスサイレチン変異を有するFAP患者と他の末梢神経障害患者を前向きに登録し凝固・線溶マーカーの測定を行った。FAP患者群は対照群と比較し有意に凝固因子X、プラスミノゲン、 $\alpha 2$ -プラスミンインヒビターが低値で、プロトロンビンフラグメントF1+2が高値であった。FAP患者は凝固・線溶異常を有するものと考えられた。

A. 研究目的

AL アミロイドーシスで凝固・線溶系の異常がみられることが報告されてきたが、家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)の凝固・線溶について研究した報告は少ない。我々は前向き研究により FAP の凝固・線溶の異常の有無について検討した。

トロンビン-アンチトロンビン複合体(TAT)、プラスミン- $\alpha 2$ プラスミンインヒビター複合体(PIC)、プロトロンビンフラグメント F1+2(F1+2)、凝固因子 X) を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は金沢大学の医学倫理委員会で承認を受けている。

B. 研究方法

金沢大学に入院したトランスサイレチン(TTR)変異を有する FAP 患者 8 名と、年齢をマッチさせた末梢神経障害患者 10 名を対照群として前向きに登録した。FAP 患者のうち 7 名が TTR Val30Met 変異、1 名が Leu58Arg 変異を有していた。対照群の患者の診断はアルコール性ニューロパチー 3 名、糖尿病性ニューロパチー 2 名、血管炎性ニューロパチー 1 名、Crow-Fukase 症候群 1 名、抗 myelin associated glycoprotein (MAG)抗体陽性ニューロパチー 1 名、慢性炎症性脱髄性多発根神経炎 1 名であった。FAP 患者群および対照群の血漿を用いて凝固・線溶のマーカー (プロトロンビン時間(PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)、フィブリノゲン、フィブリン分解産物(FDP)、FDP-D dimer、 $\alpha 2$ -プラスミンインヒビター($\alpha 2$ -PI)、アンチトロンビン、プラスミノゲン、

C. 研究結果

FAP患者群は対照群と比較し有意に凝固因子X、プラスミノゲン、 $\alpha 2$ -PIが低値で、F1+2が高値であった。

D. 考察

F1+2 はプロトロンビンがトロンビンに変化する際に生じ、凝固系の活性化を反映する。凝固因子 X については凝固系が活性化することで消費されている可能性がある。AL アミロイドーシスでは凝固因子 X はアミロイドに吸着して低下する可能性が示唆されており、FAP でも同様の機序が関与している可能性がある。線溶のマーカーについては FAP 患者群でプラスミノゲン、 $\alpha 2$ -PI の低下を認め、過剰線溶の状態が考えられた。FAP 患者では、線溶マーカーの低下の原因となるよう

な肝障害やアルブミン、コリンエステラーゼの低下は認めなかった。この結果は FAP 患者の凝固・線溶系が活性化していることを示している。凝固・線溶異常はアミロイドニューロパチーの診断上、生検や遺伝子検査に先立つ補助的な診断マーカーの 1 つである可能性がある。この結果を確認するためには多数例による検討を要する。

E. 結論

FAP 患者は凝固・線溶機能異常を有する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) Akagi A, Iwasa K, Sakai K, Motozaki Y, Ono K, Sugiyama Y, Yamada M: A unique familial amyloid polyneuropathy family with a transthyretin Leu58Arg mutation. VIIIth International Symposium on Familial Amyloidotic Polyneuropathy, Kumamoto, 11.20-22, 2011.

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

LC-MS/ MS を駆使したアミロイドーシス診断法の開発

研究分担者 大林光念 熊本大学大学院生命科学研究部病態情報解析学分野
 共同研究者 頼高多久也¹、田崎雅義¹、植田光晴¹、末永元輝¹、大嶋俊範¹、神力悟¹、
 庄野信¹、城野博史¹、安東由喜雄¹、畑裕之²、星井嘉信³、小池春樹⁴、
 祖父江元⁴
 熊本大学大学院生命科学研究部¹病態情報解析学分野、²血液内科学、
³山口大学医学部附属病院病理部、⁴名古屋大学神経内科

研究要旨 アミロイドーシスの前駆蛋白質を同定する手法としては、一般に免疫組織化学染色法が用いられている。しかし、本法には線維化した蛋白質への抗体の反応性低下による偽陰性や、血清成分のコンタミネーションによる偽陽性などが生じ、確定診断を困難にするという欠点がある。また、未知の原因蛋白質を原因とするアミロイドーシスに対して、免疫組織化学染色法は機能し難い。そこで我々は、Liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/ MS) を用いた新しいアミロイドーシス診断法を開発した。検討の結果、 $200\mu\text{m}\times 300\mu\text{m}\times 10\mu\text{m}$ 程度のアミロイド量があれば診断可能となる同法は、免疫組織化学染色法が抱える抗体の反応性に関する問題点を克服しうる、有用なアミロイドーシス病型分類法であることが確認された。また、本法を用いることで、従来その解析が困難であった未知のアミロイドーシスに関する原因蛋白質の同定が可能となった。

A. 研究目的

アミロイドーシスの病型診断では、いかに正確にアミロイド前駆蛋白質を捉えるかが極めて重要である。前駆蛋白質を同定する手法としては、一般に免疫組織化学染色法が用いられている。しかし、本法には線維化した蛋白質への抗体の反応性低下による偽陰性や、血清成分のコンタミネーションによる偽陽性などが生じ、確定診断を困難にするという欠点がある。また、未知の原因蛋白質を原因とするアミロイドーシスに対して、免疫組織化学染色法は機能し難い。本研究では、LC-MS/ MS を用いた新しいアミロイドーシス診断法が、免疫組織化学染色法では診断困難であったアミロイドーシスの前駆蛋白質同定に対して有用であるかを検討する。

B. 研究方法

対象は臨床的に FAP が疑われた患者 3 名、臨床的に AL アミロイドーシスが疑われたが、免疫染色で診断がつかなかった患者 1 名、および原因

不明の角膜アミロイドーシス患者 1 名。これらの患者より得られたホルマリン固定生検組織から、laser microdissection 法により、アミロイド沈着部位のみを $200\mu\text{m}\times 300\mu\text{m}\times 10\mu\text{m}$ 程度回収し、蛋白質可溶化剤を用いてトリプシン消化および蛋白質の抽出を行った後、そのサンプルを LC-MS/ MS を用いて解析し、その結果について検討した。

(倫理面への配慮)

熊本大学医学部附属病院における倫理審査委員会の承認を受け、患者や家族にインフォームドコンセントを行い、同意を得た場合にのみ研究を行った。

C. 研究結果

1. 臨床的に FAP が疑われた患者 3 名いずれについても、LC-MS/ MS で原因蛋白質候補の筆頭に TTR が検出され、同時に施行した免疫組織化学染色でも、アミロイド沈着部位に一致して抗 TTR 抗体陽性像を認めた。2. 臨床的に AL アミ

ロイドーシスが疑われたが、当初の腎臓ホルマリン固定組織を用いた免疫組織化学染色では確定診断に至らなかったケースについて、LC-MS/MSを用いて同サンプルの解析を行った結果、原因蛋白質の候補として上位にイムノグロブリンλチェーンが検出された。この結果を元に、十二指腸生検組織を用いて再度免疫染色を行った結果、ALλ陽性像を捉えることができた。3. 25歳、男性の角膜アミロイドーシス患者について、LC-MS/MSによる診断を試みた結果、原因蛋白質候補の筆頭としてラクトフェリンが検出された。確認のため、抗ラクトフェリン抗体を用いて本患者の角膜ホルマリン固定組織を免疫組織化学染色し、さらには同アミロイドから抽出した蛋白質に対してウエスタンブロッティングを施行した結果、本患者に沈着したアミロイドはラクトフェリンを原因蛋白質とするものであることが確認された。

D. 考察

200 μm×300 μm×10 μm 程度のアミロイド量があれば診断可能な LC-MS/MS 法は、免疫組織化学染色法が抱える抗体の反応性に関する問題点を克服しうる、有用なアミロイドーシス病型分類法であることが確認された。また、本法を用いることで、従来その解析が困難であった未知のアミロイドーシスに関する原因蛋白質の同定が可能となった。ちなみに、今回の検討で診断されたラクトフェリンアミロイドーシス患者については、両親がいとこ婚であることもあり、膠様滴状角膜変性症によるものと疑った。そこで、一般に膠様滴状角膜変性症の責任遺伝子とされるTACSTD 2を調べた結果、本患者はQ118XというTACSTD 2遺伝子の変異をホモで持つことが確認された。本患者では、TACSTD 2 遺伝子の変異をホモで持つことによって角膜上皮のバリア機能の著明な低下が生じ、それによってラクトフェリンの角膜への侵入を防ぎきれず、同部にアミロイドの沈着を許したものと考えられる。

E. 結論

LC-MS/MS の応用により、免疫染色では確定診断困難であったアミロイドーシスの原因蛋白質を同定しえた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ando Y: Therapy of ATTR amyloidosis: Perspective. *Amyloid* 18 (Suppl.1) : 182-184, 2011.
- 2) Ando Y, Ueda M: Proteomics for Transthyretin (TTR) Related Amyloidosis. *Current Proteomics* 8: 237-246, 2011.
- 3) Ando Y, Ueda M: Diagnostics and therapeutic approaches to transthyretin amyloidosis. *Curr Med Chem*, in press.
- 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 siblings with TTR Val107 familial amyloid polyneuropathy. *Clin Neurol Neurosurg* 113: 139-141, 2011.
- 5) 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* 91: 201-203, 2011.
- 6) Berk JL, Dyck PJ, Obici L, Zeldenrust SR, Sekijima Y, Yamashita T, Ando Y, Ikeda SI, Gorevic P, Merlini G, Kelly JW, Skinner M, Bisbee AB, Suhr OB; Familial Amyloidosis Consortium: The diflunisal trial: update on study drug tolerance and disease progression. *Amyloid* 18 (Suppl.1) : 196-197, 2011.
- 7) Guo J, Jono H, Kugimiya T, Saito S, Maruyama T, Misumi Y, Hoshii Y, Su Y, Shono M, Ueda M, Obayashi K, Otagiri M, Ando Y: Antioxidative effect of albumin on amyloid fibril formation in transthyretin-related amyloidosis. *Amyloid* 18 (Suppl.1) : 17-18, 2011.
- 8) Jono H, Anno T, Misumi Y, Mori Y, Motoyama K, Ueda M, Horibata Y, Shono M, Obayashi K, Arima H, Ando Y: Effect of cyclodextrins on transthyretin amyloid formation in transthyretin-related amyloidosis. *Amyloid* 18 (Suppl.1) : 58-59, 2011.
- 9) Jono H, Anno T, Motoyama K, Misumi Y, Tasaki T, Oshima T, Mori Y, Mizuguchi M, Ueda M, Shono M,

- Obayashi K, Arima H, Ando Y: Cyclodextrin, a novel therapeutic tool for suppressing amyloidogenic transthyretin misfolding in transthyretin-related amyloidosis. *Biochem J* 437: 35-42, 2011.
- 10) Kawahara S, Ueda M, Miyazaki A, Yuki U, Shono M, Horibata Y, Jono H, Obayashi K, Ikeda K, Tanase S, Ando Y: Age-dependent increase in thiol conjugated forms of transthyretin (TTR) in the elderly: quantitative analyses by the surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF MS) protein chip system. *Amyloid* 18 (Suppl.1) : 14-16, 2011.
- 11) Koike H, Kiuchi T, Iijima M, Ueda M, Ando Y, Morozumi S, Tomita M, Kawagashira Y, Watanabe H, Katsuno M, Shimoyama Y, Okazaki Y, Kamei H, Sobue G: Systemic but asymptomatic transthyretin amyloidosis 8 years after domino liver transplantation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 82: 1287-1290, 2011.
- 12) Kugimiya T, Jono H, Saito S, Maruyama T, Kadowaki D, Misumi T, Hoshii Y, Tasaki M, Su Y, Ueda M, Obayashi K, Shono M, Otagiri M, Ando Y: Loss of functional albumin triggers acceleration of transthyretin amyloid fibril formation in familial amyloidotic polyneuropathy. *Lab Invest* 91: 1219-1228, 2011.
- 13) Kumabe Y, Miura A, Yamashita T, Oshima T, Misumi Y, Ueda M, Obayashi K, Horibata Y, Jono H, Ando Y, Uchino M: A homozygote case of familial amyloid polyneuropathy amyloidogenic transthyretin Val30Met in a non-endemic area. *Amyloid* 18 (Suppl.1) : 169-170, 2011.
- 14) Misumi Y, Ando Y, Ueda M, Obayashi K, Jono H, Su Y, Yamashita T, Uchino M: Relationship between amyloid fibril formation and overproduction of basement membrane components in familial amyloidotic polyneuropathy (FAP). *Amyloid* 18 (Suppl.1) : 22-23, 2011.
- 15) Misumi Y, Ueda M, Obayashi K, Jono H, Su Y, Yamashita T, Ohshima T, Ando Y, Uchino M: Relationship between amyloid deposition and intracellular structural changes in familial amyloidotic polyneuropathy. *Hum Pathol* 43: 96-104, 2012.
- 16) Morizane R, Monkawa T, Konishi K, Hashiguchi A, Ueda M, Ando Y, Tokuyama H, Hayashi K, Hayashi M, Itoh H: Renal amyloidosis caused by apolipoprotein A-II without a genetic mutation in the coding sequence. *Clin Exper Nephrol* 15: 774-779, 2011.
- 17) Murata S, Ueda M, Tanabe Y, Kurata N, Demura N, Gram H, Tasaki M, Su Y, Jono H, Shono M, Obayashi K, Ando Y: Inhibitory effects of anti-IL-1 beta antibody in murine AA amyloidosis model. *Amyloid* 18 (Suppl.1) : 38-39, 2011.
- 18) Obayashi K, Yamashita T, Tasaki M, Ueda M, Shono M, Jono H, Ohshima T, Ohya Y, Asonuma K, Inomata Y, Ando Y: Amyloid neuropathy in a younger domino liver-transplanted recipient. *Muscle Nerve* 43: 449-450, 2011.
- 19) 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. *Hypertens Res* 34: 133-138, 2011.
- 20) Obayashi K, Hörnsten R, Wiklund U, Karlsson M, Okamoto S, Ando Y, Suhr OB: Haemodynamic responses after tilt reversal in FAP. *Amyloid* 18 (Suppl.1) : 166-168, 2011.
- 21) Obayashi K, Ueda M, Misumi Y, Yamashita T, Jono H, Tasaki M, Shono M, Yazaki M, Kametani F, Ohya Y, Asonuma K, Inomata Y, Ikeda SI, Ando Y: Amyloid turnover after liver transplantation in FAP. *Amyloid* 18 (Suppl.1) : 187-189, 2011.
- 22) Ohya Y, Okamoto S, Tasaki M, Ueda M, Jono H, Obayashi K, Takeda K, Okajima H, Asonuma K, Hara R, Tanihara H, Ando Y, Inomata Y: Manifestations of transthyretin-related familial amyloidotic polyneuropathy: long-term follow-up of Japanese patients after liver transplantation. *Surg Today* 41: 1211-1218, 2011.
- 23) Su Y, Horibata Y, Ueda M, Tasaki M, Misumi Y, Guo J, Shono M, Jono H, Obayashi K, Ogawa H, Ando Y: Transthyretin-derived amyloid deposition in the heart of an elderly Japanese population. *Amyloid* 18 (Suppl.1) : 180-181, 2011.
- 24) Su Y, Misumi Y, Ueda M, Shono M, Tasaki M, Guo J, Jono H, Obayashi K, Senokuchi T, Yamagata K,

- Ando Y: The occurrence of islet amyloid polypeptide amyloidosis in Japanese subjects. *Pancreas*, in press.
- 25) Sueyoshi T, Ueda M, Jono H, Tasaki M, Murata S, Horibata Y, Obayashi K, Irie H, Sei A, Ide J, Mizuta H, Ando Y: Transthyretin-derived amyloidosis in musculoskeletal systems. *Amyloid* 18 (Suppl.1): 163-165, 2011.
- 26) 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. *Human Pathol* 42: 1259-1264, 2011.
- 27) Sueyoshi T, Ueda M, Sei A, Misumi Y, Oshima T, Yamashita T, Obayashi K, Shinriki S, Jono H, Shono M, Ando Y, Mizuta H: Spinal multifocal amyloidosis derived from wild-type transthyretin. *Amyloid* 18: 165-168, 2011.
- 28) Ueda M, Horibata Y, Shono M, Misumi Y, Oshima T, Su Y, Tasaki M, Shinriki S, Kawahara S, Jono H, Obayashi K, Ogawa H, Ando Y: Clinicopathological features of senile systemic amyloidosis: an ante- and post-mortem study. *Mod Pathol* 24: 1533-1544, 2011.
- 29) Ueda M, Ageyama N, Nakamura S, Nakamura M, Chambers J, Misumi Y, Mizuguchi M, Shinriki S, Kawahara S, Tasaki T, Jono H, Obayashi K, Sasaki E, Une Y, Ando Y: Aged vervet monkeys developing transthyretin amyloidosis with the human disease-causing Ile122 allele: A valid pathological model of the human disease. *Lab Invest*, in press.
- 30) Yamashita T, Ando Y, Okamoto S, Yohei M, Hitahara T, Ueda M, Obayashi K, Nakamura M, Jono H, Asonuma K, Inomata Y, Uchino M: Effect of liver transplantation on the survival of patients with ordinary onset familial amyloid polyneuropathy in Japan. *Amyloid* 18 (Suppl.1) : 185-186, 2011.
- 31) Yamashita T, Ando Y, Okamoto S, Misumi Y, Hirahara T, Ueda M, Obayashi K, Nakamura M, Jono H, Shono M, Asonuma K, Inomata T, Uchino M: Long-term survival after liver transplantation in patients with familial amyloid polyneuropathy. *Neurology*, in press.
- 32) 安東由喜雄: 家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) の治療法の進歩. *神経治療学会誌* 28: 115-120, 2011.
- 33) 植田光晴、安東由喜雄: 家族性アミロイドポリニューロパチー, 老人性全身性アミロイドーシス疾患モデル動物. *関西実験動物研究会会報* 33: 1-9, 2011.
- 34) 植田光晴、安東由喜雄: 病理組織標本を用いた遺伝子変異解析. *日本臨床検査自動化学会会誌* 36: 189-195, 2011.
- 35) 山下太郎、安東由喜雄、内野誠: 家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP). *脳と神経* 63: 583-595, 2011.
- 36) 山下太郎、安東由喜雄: 遺伝性アミロイドアングリオパチー. *神経内科* 74: 485-492, 2011.

2. 学会発表

- 1) 田崎雅義、植田光晴、三上紗弥香、韓美英、松本光希、川原理美、大嶋俊範、川路隆博、星井嘉信、坂東泰彦、神力悟、庄野信、城野博史、大林光念、安東由喜雄: ホルマリン固定組織を用いた質量分析法によるアミロイドーシスの病型診断. 第58回日本臨床検査医学会学術集会、岡山、11.17、2011.
- 2) 田崎雅義、植田光晴、三上紗弥香、韓美英、川原理美、大嶋俊範、柳澤哲大、末永元輝、菅崎郁加、坂東泰彦、神力悟、庄野信、城野博史、大林光念、安東由喜雄: 質量分析法による新たなアミロイド病型診断法の開発. 第36回日本医用マスペクトル学会年会、大阪、9.15、2011.

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

市販の抗L鎖抗体によるALアミロイドーシスの免疫組織化学的検討

研究分担者 星井嘉信 山口大学医学部附属病院病理部
 共同研究者 高橋睦夫 山口大学医学部保健学科

研究要旨 アミロイドの免疫組織化学的検出の際に、ALアミロイドは市販の抗L鎖抗体では検出が難しいことがあるが、検出可能なこともある。今回の研究ではある程度の技術があれば、一定レベルでALアミロイドの検出ができるように、どのような市販の抗体がよいのかを検討した。材料はALアミロイドーシス剖検例の消化管のホルマリン固定パラフィン切片Aλ型15例、Aκ型5例を用いた。市販の各種抗λ鎖抗体および抗κ鎖抗体H16-Eを一次抗体とし、抗原賦活処理としてギ酸処理を1分間施行、型どおり免疫染色を行った。ポリクローナル抗体であるA193、A80-112は共にAλ型15例中10例陽性、1例判定困難であり、ほぼ同等の染色性であった。モノクローナル抗体であるN10/2、HP6054はAλ型15例中1例のみ陽性であった。遊離型λ鎖とのみ反応するモノクローナル抗体クローン3D12、5LA/3D12はAλ型15例中4例陽性となり、同程度の染色性を示した。H16-EはAλ型全例陰性であった。Aκアミロイドは市販の抗λ鎖抗体では染まらず、H16-Eでは全例陽性であった。今回の研究ではAλアミロイドーシス例においてマウスモノクローナル抗体では陽性例が少なく、ウサギポリクローナル抗体の方がタイプ決定に適していると考えられた。現状で、市販の抗λ鎖抗体の中ではポリクローナル抗体と抗遊離型λ鎖モノクローナル抗体クローン3D12あるいは5LA/3D12の併用で、Aλアミロイドーシスの認識率が上がると推測された。H16-Eについてはその有用性が再確認された。

A. 研究目的

アミロイドーシスは近年、治療法の選択の点で、沈着しているアミロイドのタイプ決定が重要視されている。アミロイドのタイプ決定は、多くの施設では市販の抗体を用いた免疫組織化学的手法で行われているが、ALアミロイドは市販の抗L鎖抗体での検出が難しいこともしばしばある。検出が難しい原因として、市販の抗L鎖抗体は前駆体蛋白であるアミロイドになっていないL鎖(形質細胞など)を検出することを目的として作製されているため、立体構造の変化したアミロイド線維中の抗原決定基と反応しにくい、およびALアミロイドの多様性によると推測される。

今回の研究では一般病理施設でよりよくALアミロイドのタイプ決定ができるよう、市販の抗体の選別を行った。

B. 研究方法

材料はALアミロイドーシス剖検例20例の消化

管のホルマリン固定パラフィン切片(Aλ型15例、Aκ型5例)で、いずれも山口大学医学部病理形態学分野で作製されたanti-λ(118-134)、anti-κ(116-133)でタイプを確認した症例である。anti-λ(118-134)およびanti-κ(116-133)はホルマリン固定パラフィン切片上では、アミロイドになっていない免疫グロブリンとの反応性が市販のものよりも弱く、高率にALアミロイドを検出することが出来る。ただし、Aκ型No.3についてはanti-κ(116-133)陰性であったが、anti-VλVI(1-19)およびanti-VλVIFRⅢ陰性、anti-VκI(1-19)陽性であったため、Aκ型と判定された症例である。

全例コンゴ赤染色を行い、アミロイド沈着の部位を確認した。表1に示す抗体を一次抗体として用い、抗原賦活処理としてギ酸処理を施行した。一次抗体クローン3D12および5LA/3D12については、抗原抗体反応を増強させる東洋紡社のCan Get Signal Bを用いて希釈を行った。二次抗体はウサギ一次抗体にはEnVisionTM+/HRP(ウサギ一次

抗体用、DAKO)、マウス一次抗体には EnVisionTM+HRP (マウス一次抗体用、DAKO) をそれぞれ二倍希釈で使用した。発色には DAB+ (DAKO)を用い、DAKO Autostainer を用いて免疫染色を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は山口大学医学部附属病院医薬品等治験・臨床研究等審査委員会の審査を受け科学的・倫理的に妥当であると証明された。材料については病理解剖例を用い連結不可能匿名化を行った。

C. 研究結果

染色結果を表2に示す。アミロイドが広範、明瞭に染色されているものを+、やや染色性が弱いあるいは不均一であるが判定可能なものを(+)とし、併せて陽性とした。一方アミロイドのごく一部のみ染まっていたり、非常に染色性が弱く、タイプ確定が困難であったものを(-)、アミロイドが全く染まっていないものを-とし、併せて陰性とした。アミロイド以外の部分が強く染まっているためタイプ決定が困難なものは判定困難とした。

ポリクローナル抗体であるA193、A80-112は、ともにAλ型15例中10例陽性、1例判定困難であり、ほぼ同等の染色性であった。一方モノクローナル抗体クローンN10/2、HP6054はAλ型15例中1例のみ陽性であった。遊離型λ鎖とのみ反応するモノクローナル抗体クローン3D12、5LA/3D12はAλ型15例中4例陽性となり、同程度の染色性を示した。このうち2例はポリクローナル抗体陰性例、1例は判定困難例であった。抗κ鎖ウサギクローナル抗体H16-EではAλアミロイドーシス例は全例陰性であった。

Aκ型5例は市販の抗λ鎖抗体ではいずれも陰性であり、H16-Eでは全例陽性となった。

D. 考察

今回の研究では1種類の抗体ですべてのAλ例を認識する抗体はなく、市販の抗体によるアミロイドーシスの免疫組織化学的検討の難しさの原因の一つと考えられた。Aλアミロイドーシス例についてはマウスモノクローナル抗体では陽性例が少なく、ウサギポリクローナル抗体の方がタ

イプ決定に適していることが示唆された。しかしながら抗遊離型λ鎖マウスモノクローナル抗体(5LA/3D12と3D12)ではウサギポリクローナル抗体(A193とA80-112)陰性例および判定困難例で陽性を示すものが3例見られた(Aλ型No.1、No.8、No.14)。この抗遊離型λ鎖マウスモノクローナル抗体については、ALアミロイド線維蛋白はL鎖のみからなっているため、抗遊離型λ鎖マウスモノクローナル抗体を用いることで、結合型を認識する通常の抗体よりも背景の染色性が弱くなり、アミロイドを良好に認識することができるのではないかと期待して使用した。Aλアミロイドーシス15例中陽性例は4例と少なかったが、これらの症例はいずれもアミロイドが明瞭に染色され、また判定困難例はなかった。κ型L鎖を認識するH16-EはすでにAκアミロイドのタイプ決定に有用であることが判明しているが、再検討の結果も同様で、Aλ型は全く染まらず、anti-κ(116-133)陰性であったAκ型No.3を含めAκ型はすべて陽性で、Aκ型のタイプ決定に有用であることが再確認された。

抗λ鎖ポリクローナル抗体と、3D12あるいは5LA/3D12の併用により86.6%のAλアミロイドーシス例を判定することができ、更にH16-Eを使用すると、大部分のALアミロイドーシスが判定可能であった。よってこの3種の抗体の併用は、市販の抗L鎖抗体の中では、ALアミロイドーシスの同定に有用であると考えられる。

E. 結論

Aλアミロイドーシスのタイプ決定の際には市販の抗体ではポリクローナル抗体を用いた方が検出率が高い。抗λ鎖ポリクローナル抗体とマウスモノクローナル抗体3D12または5LA/3D12、H16-Eの併用はALアミロイドーシスの同定に有用である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Hoshii Y, Nanbara H, Cui D, Takahashi M, Ikeda E:

Immunohistochemical examination of A κ amyloidosis with antibody against adjacent portion of the carboxy terminus of immunoglobulin kappa light chain. *Med Mol Morphol*, 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

なし

表1. 使用した一次抗体

抗L鎖抗体		メーカー	倍率		希釈液	賦活処理
A193	ウサギ ^o リクロナル	DAKO	1:20,000	F+B*	diluent	ギ酸
A80-112	ウサギ ^o リクロナル	BETHYL	1:5000	F+B	diluent	ギ酸
N10/2	マウス ^o モノクローナル	DAKO	1:100	F+B	diluent	ギ酸
HP6054	マウス ^o モノクローナル	Novocastra	1:100	F+B	diluent	ギ酸
3D12	マウス ^o モノクローナル	HyTest	1:100	F**	CGSB※	ギ酸
5LA/3D12	マウス ^o モノクローナル	Meridian Life Science	1:100	F	CGSB	ギ酸
H16-E	ウサギ ^o モノクローナル	DB Biotech	1:100	F+B	diluent	ギ酸
anti-λ (118-134)	ウサギ ^o リクロナル	山口大学	1:1600	不明	diluent	ギ酸
anti-κ (116-133)	ウサギ ^o リクロナル	山口大学	1:2000	不明	diluent	未処理

A193, A80-112, N10/2, HP6054, 3D12, 5LA/3D12は抗λ鎖抗体、H16-Eは抗κ鎖抗体

*:F+Bは遊離型L鎖と、重鎖に結合したL鎖の両方を認識する抗体

** :Fは遊離型L鎖のみを認識する抗体

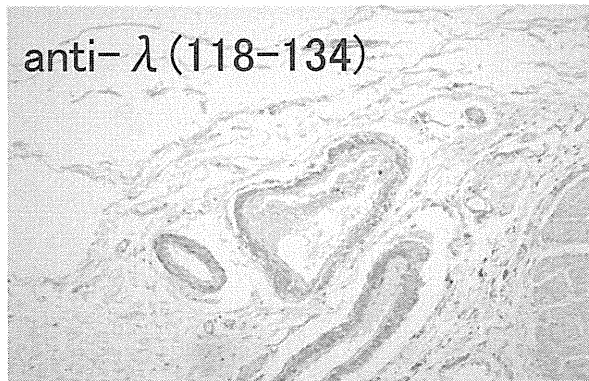
※:Can Get Signal B (東洋紡)

表2. 結果

Aλ型	anti-λ (118-134)	anti-κ (116-133)	A 193	A80-112	N10/2	HP6054	3D12	5LA/3D12	H16-E
1	+	-	(-)	(-)	-	-	+	+	-
2	+	-	+	+	-	-	-	-	-
3	+	-	+	+	-	-	-	-	-
4	+	(-)	+	+	(-) 周囲のみ	(-)	(-)	(-)	-
5	+	-	+	+	+	+	+	+	-
6	+	-	+	+	-	-	-	-	-
7	+	-	+	+	-	-	-	-	-
8	+	-	(-)	(-)	-	-	+	+	-
9	+	-	(+)	(+)	(-)	(-)	-	-	-
10	+	-	-	-	判定困難	判定困難	-	-	-
11	+	-	(+)	+	-	-	-	-	-
12	+	-	(-)	(-)	(-)	(-)	-	-	-
13	+	-	+	+	-	(-)	-	-	-
14	+	-	判定困難	判定困難	判定困難	-	+	+	-
15	+	-	(+)	+	-	-	-	-	-

Aκ型	anti-λ (118-134)	anti-κ (116-133)	A 193	A80-112	N10/2	HP6054	3D12	5LA/3D12	H16-E
1	-	+	-	-	-	-	-	-	+
2	-	+	-	-	-	-	-	-	+
3	-	(-)	-	-	-	-	-	-	+
4	-	+	-	-	-	-	-	-	+
5	-	+	(-)	(-)	-	(-)	-	-	+

図 1. ポリクローナル抗体のみ陽性になった症例



A80-112はanti-λ (118-134)と同様の部が染まっているが、5LA/3D12は全く染まっていない。

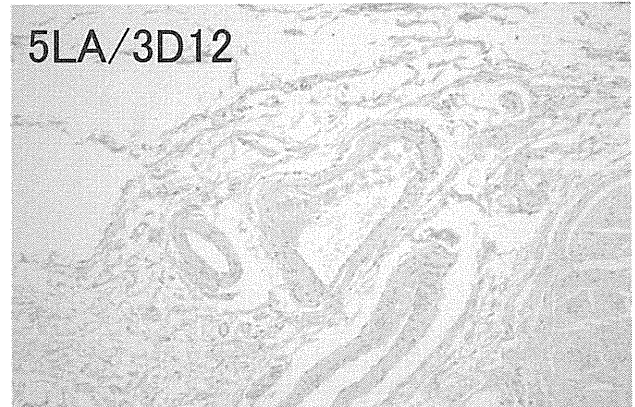
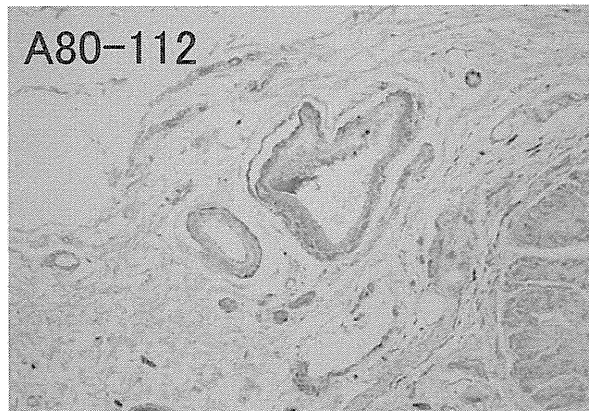
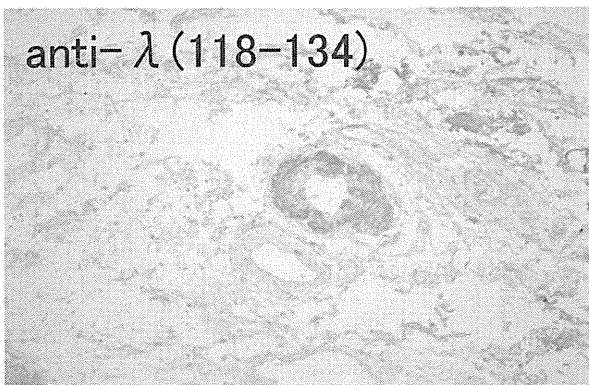
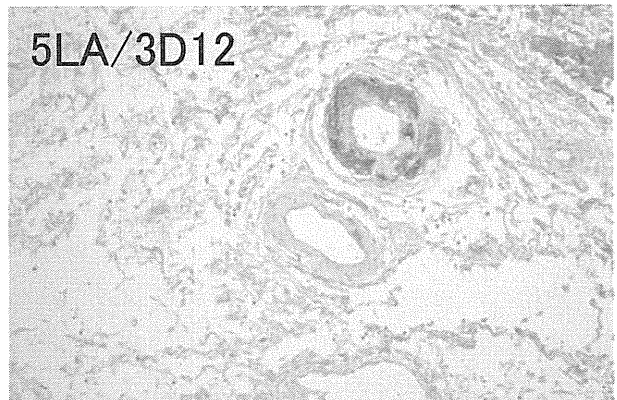
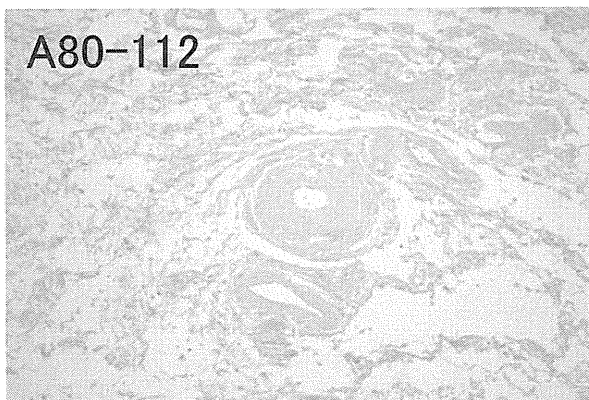


図 2. 抗遊離型λ鎖モノクローナル抗体のみ陽性になった症例



5LA/3D12はanti-λ (118-134)と同様の部が染まっているが、A80-112は非常に染色性が弱い。



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おける過剰線溶

研究分担者 畑裕之 熊本大学医学部附属病院血液内科*

共同研究者 内場光浩**、大林光念***、植田光昭****、安東由喜雄****、満屋裕明*

*熊本大学医学部附属病院血液内科、**輸血細胞治療部科、***検査部、

****熊本大学大学院医学薬学研究部病態情報解析学分野

研究要旨 AL アミロイドーシスにおける過剰線溶の機序を解明するために、uPA, uPAR の mRNA 発現を検討したところ、形質細胞よりもむしろ、アミロイド沈着臓器において uPA/uPAR が発現していた。アミロイド繊維を肝細胞株に添加すると、uPA の発現が増強した。過剰線溶は、アミロイド沈着臓器で誘導されていることが判明した。

A. 研究目的

我々は、AL アミロイドーシスにおいて過剰線溶が存在することを報告してきた。今回はその機序を解明することを目的とした。

AL アミロイドーシス由来臓器で家族性アミロイドーシス症例に比して有意な uPA および uPAR の mRNA 発現増加を認めた。

B. 研究方法

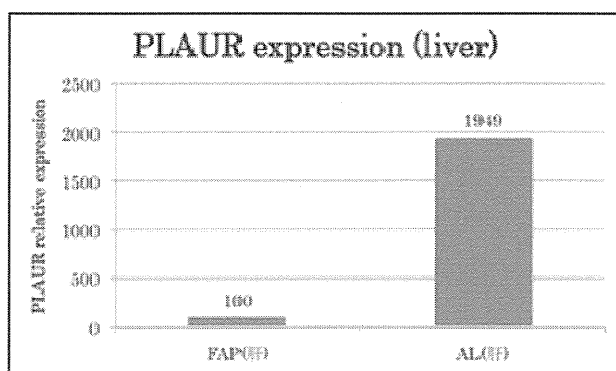
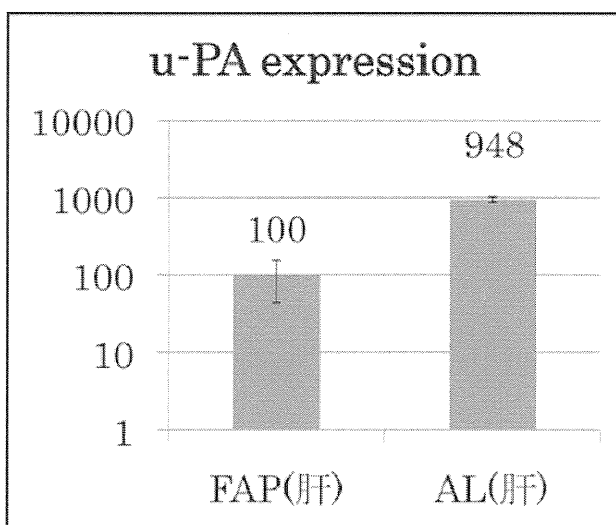
uPA は免疫染色、RT-PCR、Real time PCR で検出した。骨髄サンプルから、CD138 磁気ビーズを用いて形質細胞を純化して RNA を抽出した。アミロイド沈着組織から RNA を抽出し、uPA および uPA receptor (UPAR) の発現を解析した。コントロールとして家族性アミロイドーシス臓器を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究で得られるデータは、日常診療上得られるものであり、倫理面の問題はない。骨髄サンプル、生検標本は、同意を得て採取しており匿名性を保持して使用している。

C. 研究結果

免疫染色では AL アミロイドーシス患者由来形質細胞に uPA が検出されたが、MGUS 由来形質細胞では検出されなかった。一方、AL アミロイドーシスと MGUS の形質細胞の uPA および uPAR の mRNA 発現には差を認めず、高い発現を見た症例は少数であった。アミロイド沈着臓器の検討では、



舌 AL アミロイドーシス症例由来アミロイド繊維は、肝細胞株 HepG2 での uPA 発現を mRNA レベルで誘導した。

D. 考察

本疾患における PIC 過剰線溶の原因である uPA は形質細胞のみならず、アミロイド沈着組織から産生されていた。

今回の検討では、uPA の形質細胞での mRNA 発現は AL 症例と MGUS 症例に差を認めなかった。一方、AL 症例の形質細胞にのみ uPA が免疫染色された理由は、血液中の uPA と形質細胞上の uPAR との結合による可能性も考えられた。uPAR はアミロイド沈着臓器にも大量に発現しており、uPA はアミロイド沈着臓器上でも uPAR と結合して存在する可能性がある。なぜ AL アミロイドにおいて uPA/uPAR 系が誘導されるのかは不明であるが、アミロイド繊維が少なくとも uPA 発現を誘導する可能性が示された。

E. 結論

AL アミロイドーシスにおける過剰線溶は、アミロイド沈着臓器局所で機能する。今後、過剰線溶誘導機序、プラスミンの機能などを検証する必要がある。過剰線溶がアミロイドーシスの進行に関与しているのであれば、線溶阻害剤が病状のコントロールに有用である可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kumar SK, et al: Risk of progression and survival in multiple myeloma relapsing after therapy with IMiDs and bortezomib: A multicenter international myeloma working group study. *Leukemia* 26:149-157, 2011.

2) Kawano Y, Ueno S, Abe M, Kikukawa Y, Yuki H, Iyama K, Okuno Y, Mitsuya H, Hata H: TRAIL produced from multiple myeloma cells is associated with osteolytic markers. *Oncology Rep* 27:39-44, 2011.

3) 河野和、畑裕之: 分子病態に基づく多発性骨髄腫の治療戦略. *血液内科* 62(4): 463-468, 2011.

4) 畑裕之: 再発難治性骨髄腫に対する治療戦略. *内科* 108(2):252-255, 2011.

5) 畑裕之: 多発性骨髄腫に対する新規治療薬開発の現状と展望. *臨床血液* 52(8): 603-608, 2011.

6) 畑裕之: 免疫調節薬による骨髄腫治療. *臨床血液* 52(10):1485-1495, 2011.

2. 学会発表

1) Takamatsu Y, Sunami K, Muta T, Tsukada J, Miyamoto T, Eto T, Higuchi M, Hata H, Uozumi K, Ogata M, Tamura K: Bortezomib, doxorubicin and intermediate-dose dexamethasone (iPAD) therapy for relapsed myeloma. 73rd annual meeting of Japanese Society of Hematology, Nagoya, Japan, 10.14-16, 2011.

2) Kawano Y, Fujiwara S, Yuki H, Tatetsu H, Izaki M, Uneda S, Yoshida M, Yamasaki H, Sakai A, Okuno Y, Mitsuya H, Hata H: Low CD138 expression in myeloma cells, a potential indicator predicting poor prognosis. 73rd annual meeting of Japanese Society of Hematology, Nagoya, Japan, 10.14-16, 2011.

3) Yuki H, Ueno S, Tatetsu H, Niuro H, Hata H, Qatanabe T, Akashi K, Mitsuya H, Okuno Y: PU.1-induced growth arrest and apoptosis in classical Hodgkin lymphoma cell lines. 73rd annual meeting of Japanese Society of Hematology, Nagoya, Japan, 10.14-16, 2011.

4) Fujiwara S, Kawano Y, Yuki H, Okuno Y, Nosaka K, Mitsuya H, Hata H: High serum LDH levels correlate with the Warburg effect in myeloma cells. 73rd annual meeting of Japanese Society of Hematology, Nagoya,