

表 題 AA アミロイドーシスの診断における血清アミロイド A 蛋白断片 (AA76) 検出の有用性に関する研究

論文の区分 論文博士

著 者 名 佐藤 純司

所 属 栄研化学株式会社 研究開発統括部
バイオマテリアルリサーチセンター

2016年 8月 15日申請の学位論文

紹 介 教 員 地域医療学系 専攻 病態検査学
職名・氏名 教授・山田 俊幸

目次	
1. 要旨	p.2
2. 背景	p.3
3. 材料と方法	p.4
3-1. 患者試料	p.4
3-2. 抗体	p.4
3-3. 表面プラズモン共鳴解析による抗体の 反応性評価	p.5
3-4. 試料調製	p.5
3-5. 組織学的解析	p.5
3-6. イムノブロット	p.6
4. 結果	p.7
4-1. 新規抗 AA76 モノクローナル抗体の評価	p.7
4-2. 胃十二指腸標本の免疫組織化学	p.9
4-3. 胃十二指腸標本のイムノブロット	p.11
4-4. 胃十二指腸標本の検出感度	p.12
4-5. 腹壁脂肪試料のイムノブロット	p.13
5. 考察	p.15
6. 結論	p.18
謝辞	p.19
参考文献	p.20

1. 要旨

炎症性疾患の合併症である 2 次性 AA アミロイドーシスでは、血清アミロイド A (以下、SAA) の分解産物であるアミロイド A (以下、AA) 蛋白が線維化して臓器に沈着する。最も普遍的な AA 蛋白は、SAA のアミノ酸配列 76 位と 77 位の間で切断された N 末端側部分 (以下、AA76) であることから、組織中の AA76 の存在はアミロイド沈着の存在を示唆する。本研究では、異なる 2 つの方法を用いて、AA アミロイドーシスにおける AA76 検出の診断的意義について検討した。

既に AA アミロイドーシスと診断された経過観察患者 39 名 (n=115)、あるいは疑いのある患者 15 名 (n=15) の胃十二指腸粘膜生検試料 (全 54 名, n=130)、または経過観察患者 8 名 (n=8) と疑いのある患者 1 名 (n=1) の腹壁脂肪吸引試料 (全 9 名, n=9) を使用した。AA76 の C 末端部分を認識する抗体 (抗 AA76 抗体) を作製し、固定化した胃十二指腸粘膜組織の免疫組織化学に使用した。未固定の胃十二指腸粘膜または腹壁脂肪試料について、AA76 サイズを検出するイムノブロットを行った。

AA アミロイドーシス患者 39 名の胃十二指腸粘膜試料 (n=115) について、各法での陽性率は、コンゴレッド染色で 68.4 %、抗 AA76 抗体による免疫組織化学で 73.0 %、イムノブロットで 92.2 %であった。従来の抗 SAA 抗体では血液や漏出物中の SAA も染色されるが、抗 AA76 抗体では染色されなかった。非アミロイドーシス患者組織においては、免疫組織化学あるいはイムノブロットにより AA76 が検出されることはなかった。

腹壁脂肪試料のイムノブロットにより、AA アミロイドーシス患者全 8 検体で AA76 が検出され、胃十二指腸粘膜が陰性であった非アミロイドーシス患者 1 検体では AA76 は検出されなかった。

以上の結果から、AA76 検出は、AA アミロイドーシス診断の新しいアプローチとなりうる。固定化試料の免疫組織化学においては、新規抗 AA76 抗体は特異性を改善することが可能である。高い検出感度を有する非固定化試料のイムノブロットは、腹壁脂肪のような少量の試料に応用されるべきである。

2. 背景

2 次性 AA アミロイドーシスは、関節リウマチや結核等の慢性炎症性疾患の重篤な合併症であり、急性期蛋白である血清アミロイド A（以下、SAA）蛋白の分解産物であるアミロイド A（以下、AA）蛋白が線維化し、様々な臓器の細胞外に沈着する^{1,2)}。この疾患は、一般的には臨床所見と、主に胃十二指腸粘膜の生検組織のコンゴレッド染色により容易に診断される³⁾。抗 SAA 抗体を用いた特異性の高い免疫組織化学が診断をより確かにする。

AA アミロイドーシスは長い間、進行を阻止できない難治性疾患と考えられてきたが、近年の生物学的製剤をはじめとする抗炎症療法の進歩により、炎症活動性の低下あるいはアミロイド前駆体である SAA 産生の抑制により、アミロイドーシスの進行を阻止し、消化管粘膜においてはアミロイド沈着を消失させることも可能となった^{4,5)}。従って、AA アミロイドーシスの治療効果の評価には、組織中の少量のアミロイド沈着を検出することが必要になる。コンゴレッド染色はアミロイド沈着を検出する標準的な方法であるが、ごく僅かな沈着をしばしば見落とすことがある。一方の免疫組織化学は感度が高く、そのような沈着も検出可能であるが、使用する抗体が前駆体の SAA を認識するものであることから、陽性反応が必ずしもアミロイド沈着を示すとは限らない。そのため、アミロイド沈着内の AA 蛋白に高い反応性と特異性をもつ検出方法が求められる。

AA 蛋白は、SAA の限定分解産物の N 末端断片で、複数の切断部位が存在するため AA 蛋白のサイズは多様である⁶⁻¹⁰⁾。最も普遍的な切断部位は SAA のアミノ酸配列 76 位と 77 位の間であり、この N 末端側の断片（以下、AA76 と呼ぶ）はアミロイド沈着中の AA 蛋白の中で最も豊富に含まれている¹¹⁾。一方で AA76 は、非 AA アミロイドーシス患者の血漿あるいは組織中にほとんど検出されないことから、AA76 の検出は AA アミロイドーシスの特異性の高い診断に直結することになる。

そこで本研究では、AA76 を検出するために異なる 2 つのアプローチについて検討した。一つは新たに作製した AA76 特異抗体を用いた免疫組織学的検出で、もう一つは固定化していない試料中の AA76 サイズを検出するイムノプロットによる検出である。

3. 材料と方法

3-1. 患者試料

本研究は、自治医科大学、道後温泉病院、新潟大学の各倫理委員会の承認のもとで実施した。生検組織試料は、道後温泉病院及び新潟大学医歯学総合病院で同意が得られた関節リウマチ患者 54 名（58～84 才：平均 68.1 才）の胃十二指腸粘膜組織を内視鏡的に採取した。このうち 15 名については、アミロイド沈着の存在を検査するために初めて生検を受け、このスクリーニング検査で全て陰性判定となったことから、これらをスクリーニング陰性群とした。それ以外の 39 名は既に AA アミロイドーシスと診断されており、アミロイド沈着量の評価のために生検を行った患者であることから、経過観察群とした。腹壁脂肪組織は、従来からの報告に従って腹部皮下から吸引し¹²⁾、前述のスクリーニング陰性群のうちの 1 名と、経過観察群のうちの 8 名から採取した。

3-2. 抗体

本研究では、AA76 の C 末端を認識する抗体を新たに樹立した。N 末端側に可溶性アミノ酸残基 (DGDGD) を導入した SAA の 71～76 位の 6 アミノ酸残基 (HGAEDS) に相当するペプチド (以下、pAA76 : DGDGDHGAEDS)、及び 2 アミノ酸残基分が長く SAA の 71～78 位の 8 アミノ酸残基 (HGAEDSLA) に相当するペプチド (以下、pAA78 : DGDGDHGAEDSLA) を合成した。KLH と pAA76 の等量を混合してペプチドの N 末端との複合体としたものを免疫に使用し、同様にして BSA と pAA76 または pAA78 の各複合体を抗体活性の評価に使用した。50 μ g の pAA76-KLH 複合体を Freund 完全アジュバントと等量混合して乳状液を調製し、麻酔下の WKY ラット (日本チャールス・リバー社) に免疫して、2 週間後にラット腸骨リンパ節を回収した¹³⁾。既報の方法に従い^{14, 15)}、回収したリンパ節細胞を無血清培地で洗浄、0.17 mol/l 塩化アンモニウム水溶液で赤血球を溶血させた後、細胞数が 3 : 1 になるように NS-1 マウス・ミエローマと混合して電気融合装置 LF201 (ネッパジーン社) で細胞融合し、96 穴培養プレートに播種して炭酸ガス培養器内で培養した。目的とするモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、ELISA により培養上清の反応性を評価し、免疫したペプチドの pAA76 と反応し、かつ、pAA78 とは反応しないものを選択した。樹立した抗体のハイブリドーマを拡大培養し、その培養上清は硫酸塩析及び QAE カラム (東ソー社) を用いた陰イオン・クロマトグラフィで精製し、得られた免疫グロブリン分画をモノクローナル抗体として使用した。

以前に樹立し、SAA のアミノ酸残基の 30 位付近を認識することが確認されている¹⁶⁾、モノクローナル抗体である抗 SAA30 抗体を別に使用した。

3-3. 表面プラズモン共鳴解析による抗体の反応性評価

新たに作製した抗体の反応性は、ビアコア 2000 (GE ヘルスケア社) を用いた表面プラズモン共鳴解析 (以下、SPR) により検討した。装置は標準的な方法に従って操作した。50 μ g/mL 濃度の各抗体を CM5 センサーチップにアミン・カップリング法により共有結合させ、約 10,000 RU の固定化量になるよう調製した。被験物質の pAA76-BSA 複合体とリコンビナント SAA1.1¹⁷⁾ (以下、rSAA1.1) は、緩衝液 HBS-EP (10 mmol/l HEPES, pH7.4, 150 mmol/l NaCl, 3 mmol/l EDTA, 0.005 % Tween 20) で、それぞれ 1 μ g/mL と 5 μ g/mL に調製し、流速 20 μ L/min でセンサーチップに添加することで反応させ、抗体を固定化していない流路の反応 (結合) 量を、抗体を固定化した流路の反応量から差し引いたものを評価した。

3-4. 試料調製

経過観察群については胃前庭部、十二指腸球部、十二指腸第 2 部の各部位から、スクリーニング群からは胃前庭部から、それぞれ 2 つずつの組織試料を内視鏡的に採取した。一方は 10 %ホルマリン処理してパラフィン包埋切片を作製し、他方はイムノブロット解析に供するまで -70 °C で凍結保存した。

腹壁脂肪は、半量をスライドグラスに載せて乾燥させた後、10 %ホルマリンで固定してコンゴレッド染色に供し、残り半量はイムノブロット解析に供するまで -70 °C で凍結保存した。

3-5. 組織学的解析

胃十二指腸及び腹壁脂肪標本は、常法に従ってコンゴレッド染色を行った。免疫組織化学的解析は胃十二指腸標本でのみ実施した。詳しくは、標本を 10 %ギ酸で 10 分間処理した後、Vectastain ABC キット (ベクター社) を用いたアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ反応を利用して検出した。1 次抗体として抗 SAA30 抗体または新たに樹立した抗体を濃度 2 μ g/mL で、室温で 60 分間反応させ、その後の操作はキットの操作法に従った。アミロイド沈着量は、グレード 0 : 陰性、グレード 1 : 希薄少量、グレード 2 : グレード 1 とグレード 3 の間、グレード 3 : 大量 (アミロイド沈着面積が標本全体の 30 %以上) に分類し

た。

3-6. イムノブロット

約 1 mg の固定化していない胃十二指腸粘膜あるいは腹壁脂肪組織を、100 μ L の 6 mol/l 尿素を含む 0.1 mol/l Tris-HCl, pH 8.5 中で超音波処理により懸濁した。これを、10 mmol/l DTT を含む SDS 電気泳動試料用緩衝液と等量で混合して加熱し、各試料 10 μ L をトリシン-SDS-PAGE で展開させた後、PVDF 膜に転写させた。この膜を 1 % BSA を含む PBS, pH 7.5 でブロッキング処理し、1 % BSA 及び 0.05 % Tween 20 を含む PBS, pH 7.5 (以下、BSA-PBS-T) で 1 μ g/mL に調製した抗 SAA30 抗体と室温で 1 時間反応させた。洗浄後、BSA-PBS-T で 10,000 倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗ラット免疫グロブリン抗体 (タゴ社) と室温で 1 時間反応させた。洗浄後、基質として EzWestLumi plus (アトー社) を用いて化学発光させ、Ez-Capture MG (アトー社) を用いて現像した。大腸菌で発現させたリコンビナント AA76¹⁸⁾ (以下、rAA76) 蛋白を、AA76 バンドサイズのリファレンスとして使用した。

DTT : Dithiothreitol

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

PAGE : Polyacrylamide Gel Electrophoresis

PVDF : Polyvinylidene Fluoride

BSA : Bovine Serum Albumin

PBS : Phosphate Buffered Saline

4. 結果

4-1. 新規抗 AA76 モノクローナル抗体の評価

最終的にクローン CF6 を樹立した。SPR 解析の結果、図 1 に示す通りクローン CF6 は pAA76-BSA と良好な反応性を示したのに対し rSAA1.1 には全く反応せず、逆に抗 SAA30 抗体は rSAA1.1 にのみ反応し、pAA76-BSA には反応しなかった。

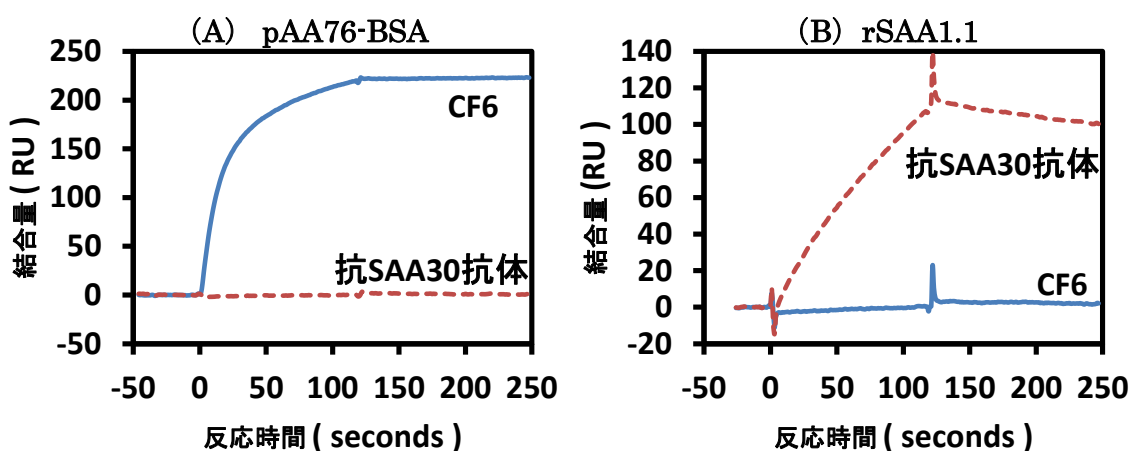


図1 ビアコアによるモノクローナル抗体CF6のpAA76-BSA及びrSAA1.1に対する反応性評価

抗SAA30抗体及びCF6をセンサーチップCM5に固定化。

pAA76-BSA (A) またはrSAA1.1 (B) を緩衝液HBS-EPで希釈して添加した。

CF6は、pAA76-BSAに反応したが、rSAA1.1には反応しなかった。

一方、抗SAA30抗体は、rSAA1.1に反応したが、pAA76-BSAには反応しなかった。

また、新規抗体クローン CF6 の特異性をイムノブロットにより評価した。その結果、クローン CF6 は AA76 断片には反応し、全長の rSAA1.1 には反応しなかったが、クローン CF6 の反応性は抗 SAA30 抗体よりもかなり弱いものであった (図 2)。

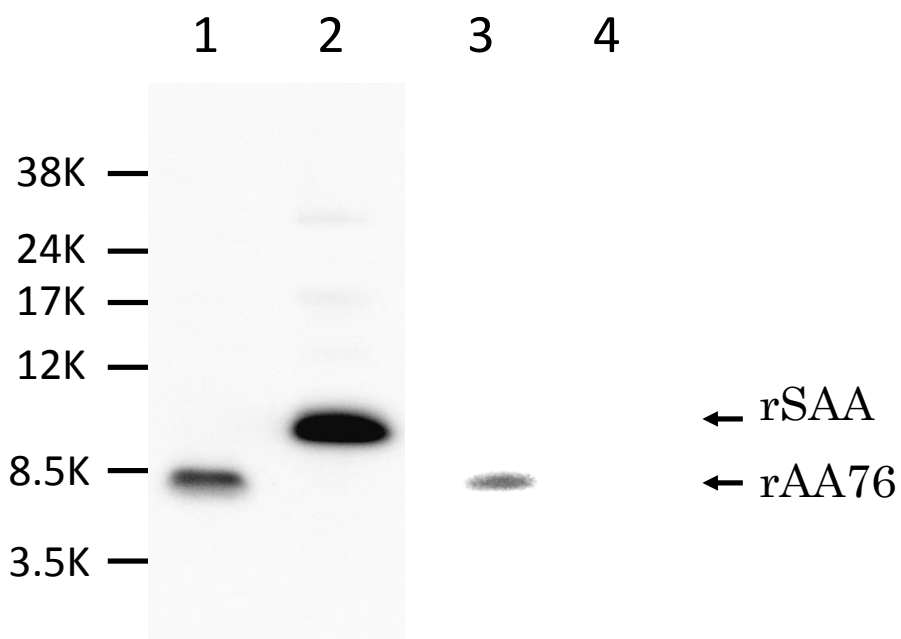


図2 イムノブロットによるモノクローナル抗体の特異性評価

以下の試料を電気泳動後にPVDF膜に転写し、以下に示す抗体で反応させた。

試料； レーン1, 3： rAA76 (0.1 µg) , レーン2, 4： rSAA1.1 (0.1 µg)

一次抗体； レーン1, 2： 抗SAA30抗体, レーン3, 4： CF6

CF6はrSAA1.1に反応せず、rAA76に反応した。しかし、その反応性は、抗SAA30抗体と比較すると弱いものであった。

4-2. 胃十二指腸標本の免疫組織化学

コンゴレッド染色陽性のアミロイド沈着を認める胃十二指腸粘膜組織標本においては、抗 SAA30 抗体及びクローン CF6 はどちらも陽性となった (図 3)。しかし、漏れ出した血液由来の前駆体 SAA と考えられる非アミロイド性のものも抗 SAA30 抗体が染色したのに対し、クローン CF6 ではそのような染色は認められず (図 4)、陰性群では両抗体とも陰性となった (表 1)。

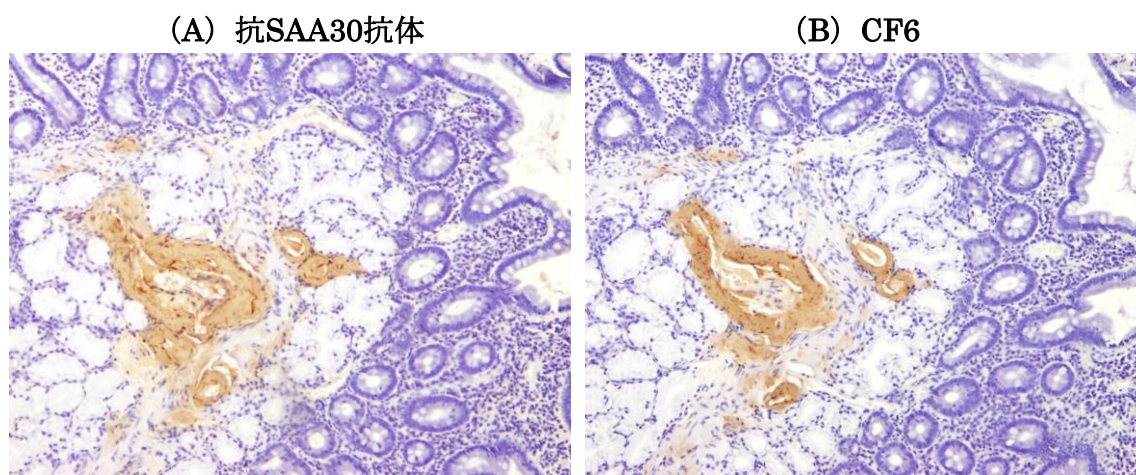


図3 胃十二指腸粘膜組織の免疫組織化学 (倍率×40)

コンゴレッド染色陽性の経過観察群患者標本。
抗SAA30抗体 (A) と同等の陽性反応がクローンCF6 (B) で得られた。

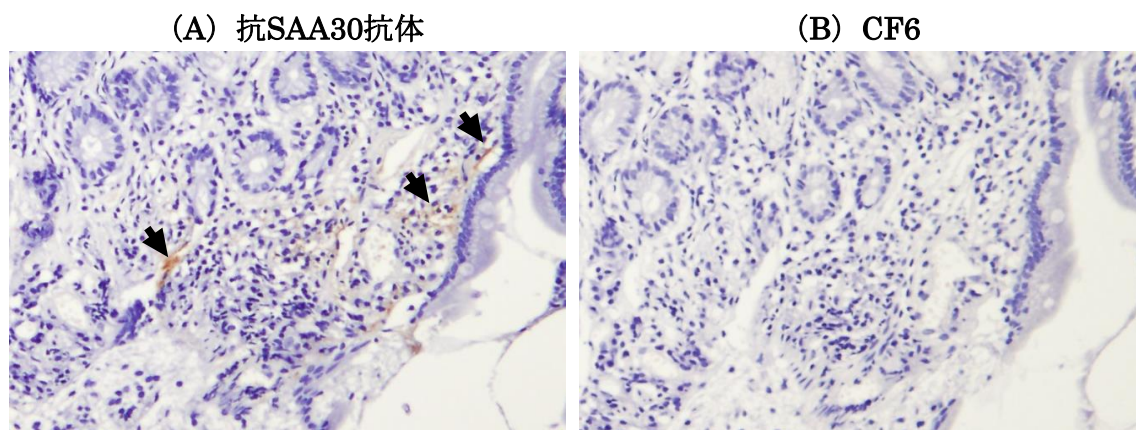


図4 胃十二指腸粘膜組織の免疫組織化学 (倍率×40)

アミロイド沈着が消失した経過観察群患者標本。
抗SAA30抗体 (A) は非アミロイド性物質を染色したが(矢印)、クローンCF6 (B) では染色されなかった。

図 4 (A) のような染色像は、経験のある病理医であれば非特異的な反応であると判断されるが、一般的には陽性と判定される場合が多く誤判定となる可能性があるため、免疫組織化学に抗 SAA30 抗体を使用する際は注意を要する。一方、同じ組織標本に新規抗体クローン CF6 を使用した図 4 (B) の染色像は、専門医でなくとも一般的に陰性と判定され、誤判定となる可能性は低く従来抗体よりも優れた特徴である。

4-3. 胃十二指腸標本のイムノブロット

イムノブロットでは、免疫組織化学で陽性となった全ての試料において、抗SAA30抗体は rAA76 と同じサイズのバンドを検出し、おそらく AA76 の二量体と考えられる高分子量のバンドも検出された (図 5, レーン 4)。また、免疫組織化学で陰性であった標本に相当する試料において、イムノブロットでは弱陽性の結果も認められた (図 5, レーン 3)。図 4 に示したような非アミロイド性のものが染色された試料では、全長 SAA に相当する陽性バンドが検出された (図 5, レーン 5)。一方、陰性群では AA76 に相当するバンドは検出されなかった (図 5, レーン 2)。

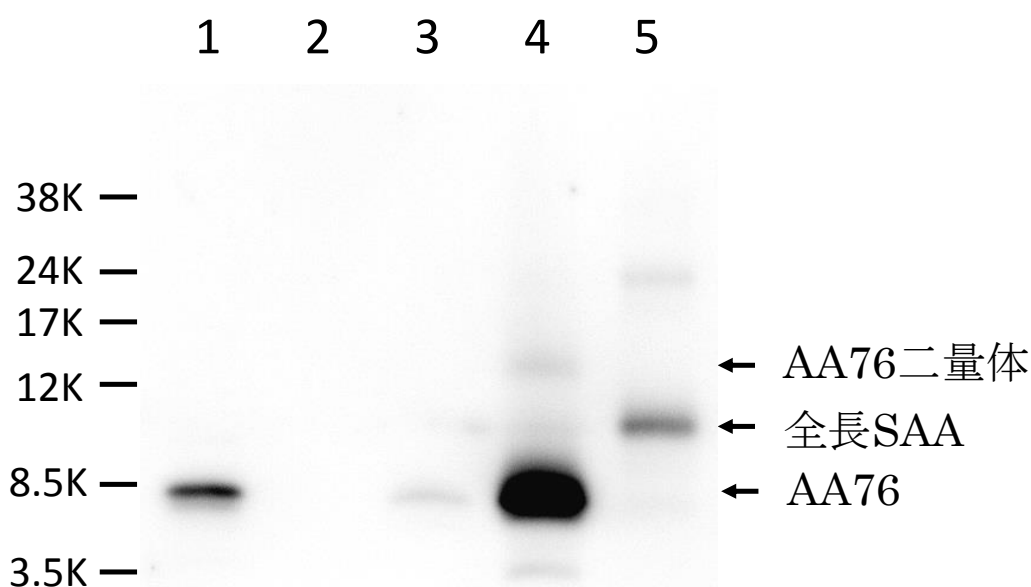


図5 胃十二指腸粘膜組織のイムノブロット解析

異なる患者の胃十二指腸粘膜組織 (レーン2~5) を電気泳動後にPVDF膜に転写し、抗SAA30抗体で反応させた。

レーン1 ; rAA76 (0.1 µg)

レーン2 ; スクリーニング陰性群の患者

レーン3 ; 免疫組織染色で陰性であった経過観察群の患者

レーン4 ; 免疫組織染色で陽性であった経過観察群の患者 (図3の標本患者)

レーン5 ; 免疫組織染色で陰性であった経過観察群の患者 (図4の標本患者)

レーン3では弱いながら陽性であった。レーン4では明確な陽性で分子サイズが rAA76 と同じであることが示されている。

レーン5ではAA76は陰性で、全長SAAの分子サイズが陽性であることから、血漿の混入が疑われる。

4-4. 胃十二指腸標本の検出感度

経過観察群の39名の患者から採取した胃十二指腸粘膜試料（n=115）の、各検査法による陽性数（率）は、コンゴレッド染色：78検体（68.4%）、免疫組織化学：84検体（73.0%）、イムノブロット：106検体（92.2%）であり、イムノブロットの検出感度が最も高かった。

十二指腸第2部、同球部、胃前庭部のうち一つでも試料が陽性となった場合にその患者を陽性とするならば、各検査法での陽性患者数（率）は、コンゴレッド染色：33名（84.6%）、免疫組織化学：36名（92.3%）、イムノブロット：39名（100%）であった（表1）。

免疫組織化学において抗SAA30抗体とCF6は同じ陽性率であったが、抗SAA30抗体を使用した免疫組織化学では非特異的な反応も含まれており判定に熟練を要するが、CF6を使用した場合は容易に判定可能であった。

表1 コンゴレッド染色・免疫組織化学・イムノブロットの検出感度の比較

試料群	n数	陽性数(率)			
		コンゴレッド染色	免疫組織化学		イムノブロット
			抗SAA30抗体	CF6	
陰性群(患者数)	15	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
経過観察群(試料数)	115	78(68.4%)	84(73.0%)	84(73.0%)	106(92.2%)
陽性群*(患者数)	39	33(84.6%)	36(92.3%)	36(92.3%)	39(100%)

*一つでも試料が陽性となった場合にその患者を陽性とした。

4-5. 腹壁脂肪試料のイムノブロット

腹壁脂肪試料においては、アミロイドーシス陽性患者から採取した8検体全てにおいてイムノブロット陽性となり、アミロイドーシスが否定された患者から採取した試料は陰性となった(図6, 表2)。また、採取量不足のためにコンゴレッド染色が実施できなかった試料においても、イムノブロットでAA76のバンドは陽性であった。レーン1の経過観察群患者の胃十二指腸粘膜中アミロイド沈着量はグレード2であり(表2)、AA76のバンドが薄いのは不十分な吸引によるサンプル不良の影響であると考えられた。

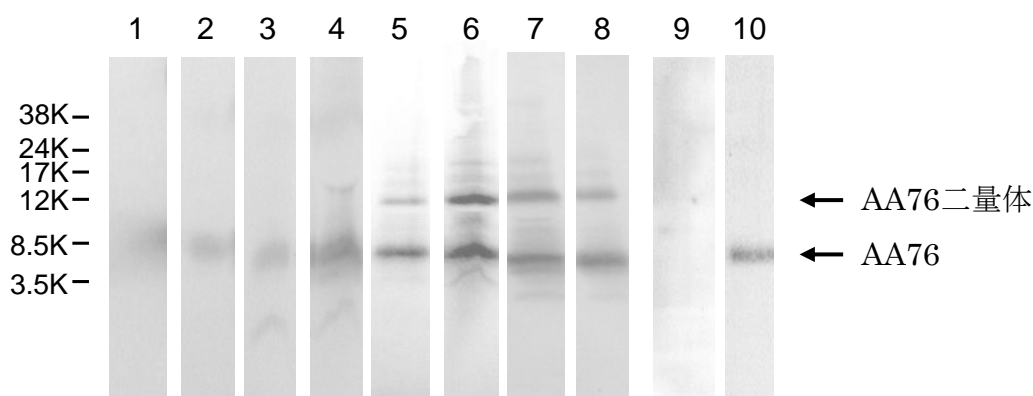


図6 腹壁脂肪試料のイムノブロット解析

異なる患者の腹壁脂肪試料(レーン1~9)を電気泳動後にPVDF膜に転写し、抗SAA30抗体で反応させた。

レーン1~8; 経過観察群の患者(アミロイドーシス患者)

レーン9; スクリーニング陰性群の患者

レーン10; rAA76 (0.1 µg)

レーン1~8は陽性でありAA76が検出されたが、レーン9は陰性であった。

表 2 コンゴレッド染色と腹壁脂肪試料のイムノブロットによる AA76 バンド
検出感度の比較

症例	コンゴレッド染色	イムノブロット	胃十二指腸粘膜中のアミロイド 沈着量:グレード 0～3
1	試料不足	+	2
2	+	+	2
3	+	+	1
4	+	+	2
5	+	+	1
6	+	+	3
7	試料不足	+	1
8	未実施	+	1
9	未実施	-	0

5. 考察

AA アミロイドーシスは、本邦においては関節リウマチ患者に最も多く発症する。関節リウマチの活動性管理が不十分であると、長期に渡って SAA の発現が亢進して AA アミロイド形成を引き起こす。SAA と沈着した AA の「前駆体ー生成物」の関係は疑いないものであるが、SAA の限定分解の意義については未解決の部分がある。AA アミロイドーシスのモデルマウスにおいては、前駆体の SAA と AA が沈着内で検出され、SAA から AA への転換は沈着後の現象であると考えられている¹⁹⁾。しかし、ヒトでは、前駆体の SAA はアミロイド沈着物からは検出されない。沈着内で最も普遍的に量的にも多くみられる AA は、SAA のアミノ酸残基 76 位と 77 位の間で蛋白分解された産物 AA76 である。従って、SAA から AA76 への転換は、ヒトにおいて線維形成に必要な事象である可能性がある。その機序と病因的意義は今後解明されるべきであるが、本研究は、AA76 がアミロイド沈着の過程または結果として出現するのであれば、その検出が診断に利用できるという仮説のもとに行われた。

通常は AA アミロイドーシスの診断は困難ではなく、生検組織のコンゴレッド染色が有効である。しかし、本研究で対象とした一部の患者のように、治療によりアミロイドが大幅に減少した場合は、コンゴレッド染色が微小な沈着を検出できないことがある。そのような場合は、本研究でも示した通り、免疫組織化学が有効となる。新規抗体クローン CF6 は、アミロイドの免疫染色において、従来の抗 SAA30 抗体と完全に染色性が一致したことから、検出感度は充分であるといえる。一方で、クローン CF6 は、組織中の非アミロイド性の全長 SAA とは反応しない (図 4 (B)) ことから、アミロイドに高い特異性を示すことが確認された。図 4(A) の染色像は、熟練した病理医であれば、この標本の抗 SAA30 抗体による染色がアミロイド沈着であると判断することはほぼないと考えられるが、ノイズは可能な限り排除されるべきである。AA アミロイドーシスの診断や治療効果判定に特異性の高いクローン CF6 を免疫組織化学に使用することは利点になると考える。

組織学的方法は有用であるが、アミロイドの分布の不均一性により、採取された試料または作製された切片によってはアミロイド沈着を含まないという問題がある²⁰⁾。本研究においても、経過観察群の免疫組織化学で 27% の試料が陰性となったことから示唆される。アミロイドを含まない生検試料についてはどの方法論も無力であるが、切片にしたためアミロイドが含まれない場合があるのであれば、未固定の組織塊のままアミロイドを検出する方法論が望まれ

る。

当初、AA76 に特異的な抗体を得てからの目標は、抗体を使って非固定化試料から免疫化学的に AA76 としてアミロイドを検出することであった。しかしながら、新規抗体は AA76 に対して特異性は高いが、イムノブロットの結果 (図 2) に示すように、その弱い反応性のために変性させた AA76 の検出には使用できなかった。実際に、AA 線維をグアニジンや尿素処理した場合、クローン CF6 の反応性は顕著に低下した。そのためこの抗体は、天然型 SAA よりも免疫原として使用したペプチド内のエピトープをより認識しているのかもしれない。そこで、新規抗体を用いた非固定化試料からの AA76 の検出法は断念し、AA76 と同じ分子サイズのコロニドを検出するイムノブロット法にアプローチ法を変更した。本研究で用いた低分子用 SDS-PAGE は AA76 に近い分子サイズを十分に分離可能であるが、リコンビナント AA76 が AA76 サイズの特定には有用であった。

イムノブロットは陽性率が高く、免疫組織化学で陰性となったいくつかの試料において AA76 が検出された。作製された切片がたまたまアミロイドを含まなかったか、またはイムノブロットの検出感度が高い理由で成績が乖離したのかもしれない。いずれにせよ、イムノブロットによる AA76 検出は、組織学的検索で見逃されたアミロイド沈着を検出できる可能性がある。

本研究は、非固定化試料において AA76 を免疫化学的に検出する有用性を示したが、歴史的また現実的な理由から、胃十二指腸粘膜の検査には固定標本を用いた組織学的方法が用いられる。むしろ、イムノブロットは、腹壁脂肪のような固定化に向かない試料に適しているかもしれない。実際に、腹壁脂肪中において AA アミロイドを定量的に評価している報告がある²¹⁾。本研究では、定性的な評価が可能であることが示された。特に、コンゴレッド染色が実施できなかった試料において AA76 が検出された (表 2) ことを強調したい。仮にコンゴレッド染色が実施可能な試料でさえ、組織切片と比較して、染色結果の評価は簡単ではないため、イムノブロットが応用されるべきと考える。高感度であるため多くの採取量を必要としない本法は、患者負担の軽減という利点もある。

また、未固定試料は、プロテオミクスによるアプローチ²²⁾のような新たな分析に応用が可能である。そのため、腹壁脂肪のような試料は固定化せずに、様々な解析に使用するまで凍結保存することを提案したい。

以上、AA アミロイドーシスの診断における AA76 検出の有用性を論じてきたが、それを確かなものにするには、AA アミロイド沈着には必ず AA76 が存在すること、アミロイド沈着過程以外で AA76 が検出されない、この 2 点を満たす必要がある。前者については、AA76 以外の AA 断片もまた AA 線維から検出されるが^{9,10)}、今回の検討で AA76 を伴わない試料はなかった。後者については、本検討でも、我々の経験からも非アミロイドーシス患者から採取した試料からは AA76 は検出されていない。更に今後の症例の蓄積において確認していく必要がある。

6. 結論

生検試料中の AA76 の検出は、AA アミロイドーシスの診断における新たなアプローチとなる。本研究では、新規抗体による特異性の高い免疫組織化学、高感度なイムノブロットの応用を示した。

謝辞

本研究のみならず、SAAに関する研究に際しまして多くのご指導を賜りました自治医科大学臨床検査医学講座・山田俊幸教授に深謝申し上げます。貴重な検体試料をご提供いただき、また本研究に対するご助言を賜りました道後温泉病院院長・奥田恭章先生、新潟大学保健管理センター・黒田毅准教授に厚く御礼申し上げます。

また、長年に渡って研究の場の提供ならびに多大なるご支援を賜りました自治医科大学臨床検査医学講座・谷口信行教授、実験にご協力いただきました生田目久美子様、賀来智美様、ならびにSAAの研究にご助言をいただきました自治医科大学地域医療学センター・小谷和彦教授に深く感謝いたします。

最後に、申請者の研究活動に対して多方面に渡りご支援いただきました栄研化学株式会社・荒川正明常務、定本伸也執行役、神田秀俊部長に御礼申し上げます。

参照文献

- 1) Husby G, Marhaug G, Dowton B, Sletten K, Sipe JD. Serum amyloid A (SAA): biochemistry, genetics and the pathogenesis of AA amyloidosis. *Amyloid Int J Exp Clin Invest.* 1:119-137, 1994
- 2) Westermark GT, Fändrich M, Westermark P. AA amyloidosis: pathogenesis and targeted therapy. *Annu Rev Pathol.* 10:321-44, 2015
- 3) Kobayashi H, Tada S, Fuchigami T, Okuda Y, Takasugi K, Matsumoto T, Iida M, Aoyagi K, Iwashita A, Daimaru Y, Fujishima M. Secondary amyloidosis in patients with rheumatoid arthritis: diagnostic and prognostic value of gastroduodenal biopsy. *Br J Rheumatol.* 35:44-49, 1996
- 4) Gillmore JD, Lovat LB, Persey MR, Pepys MB, Hawkins PN. Amyloid load and clinical outcome in AA amyloidosis in relation to circulating concentration of serum amyloid A protein. *Lancet.* 358(9275):24-29, 2001
- 5) Okuda Y, Takasugi K. Successful use of a humanized anti-interleukin-6 receptor antibody, tocilizumab, to treat amyloid A amyloidosis complicating juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.* 54:2997-3000, 2016
- 6) Levin M, Franklin EC, Frangione B, Pras M. The amino acid sequence of a major nonimmunoglobulin component of some amyloid fibrils. *J Clin Invest.* 51:2773-6, 1972
- 7) Sletten K, Husby G. The complete amino acid sequence of nonimmunoglobulin amyloid fibril protein AS in rheumatoid arthritis. *Eur J Biochem.* 41:117-25, 1974
- 8) Husebekk A, Skogen B, Husby G, Marhaug G. Transformation of amyloid precursor SAA to protein AA and incorporation in amyloid fibrils in vivo. *Scand J Immunol.* 21:283-7, 1985
- 9) Moyner K, Sletten K, Husby G, Natvig JB. An unusually large (83 amino acid residues) amyloid fibril protein AA from a patient with Waldenström's macroglobulinemia and amyloidosis. *Scand J Immunol.* 11:549-54, 1980
- 10) Westermark P. The heterogeneity of protein AA in secondary (reactive) systemic amyloidosis. *Biochim Biophys Acta.* 701:19-22, 1982
- 11) Yamada T, Okuda Y. AA amyloid quantification in biopsy samples from stomach. *Ann Clin Lab Sci.* 42:3-6, 2012

- 12) Klemi PJ, Sorsa S, Happonen RP. Fine-needle aspiration biopsy from subcutaneous fat. An easy way to diagnose secondary amyloidosis. *Scand J Rheumatol.* 16:429-31, 1987
- 13) Kishiro Y, Kagawa M, Naito I, Sado Y. A novel method of preparing rat-monoclonal antibody-producing hybridomas by using rat medial iliac lymph node cells. *Cell Struct Funct.* 20:151-6, 1995
- 14) Galfre G, Milstein C. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. *Methods Enzymol.* 72:3-46, 1981
- 15) Schmitt JJ, Zimmermann U, Neil GA. Efficient generation of stable antibody forming hybridoma cells by electrofusion. *Hybridoma.* 8:107-15, 1989
- 16) Yamada T, Hirano N, Kuroda T, Okuda Y, Itoh Y: Generation and characterization of rat monoclonal antibodies against human serum amyloid A. *Scand J Immunol.* 46:175-9, 1997
- 17) Yamada T, Kluge-Beckerman B, Liepnieks JJ, Benson MD: Fibril formation from recombinant human serum amyloid A. *Biochim Biophys Acta.* 1226:323-9, 1994
- 18) Yamada T, Liepnieks JJ, Kluge-Beckerman B, Benson MD. Cathepsin B generates the most common form of amyloid A (76 residues) as a degradation product from serum amyloid A. *Scand J Immunol.* 41:94-7, 1995
- 19) Shiroo M, Kawahara E, Nakanishi I, Migita S. Specific deposition of serum amyloid A protein 2 in the mouse. *Scand J Immunol.* 26:709-16, 1987
- 20) Okuda Y, Takasugi K, Oyama T. Amyloidosis in rheumatoid arthritis-clinical study of 124 histologically proven cases. *Ryumachi.* 34: 939-46, 1994
- 21) Hazenberg BP, Bijzet J, Limburg PC, Skinner M, Hawkins PN, Butrimiene I, Livneh A, Lesnyak O, Nasonov EL, Filipowicz-Sosnowska A, Gül A, Merlini G, Wiland P, Ozdogan H, Gorevic PD, Maiz HB, Benson MD, Direskeneli H, Kaarela K, Garceau D, Hauck W, Van Rijswijk MH. Diagnostic performance of amyloid A protein quantification in fat tissue of patients with clinical AA amyloidosis. *Amyloid J Prot Fold Dis.* 14:133-40, 2007
- 22) Vrana JA, Thesis JD, Dasari S, Mereuta OM, Dispenzieri A, Zeldenrust SR, Gertz MA, Kurtin PJ, Grogg KL, Dogan A. Clinical diagnosis and

typing of systemic amyloidosis in subcutaneous fat aspirates by mass spectrometry-based proteomics. *Haematologica*. 99:1239-47, 2014