

氏名	佐藤 純司
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	乙第 724号
学位授与年月日	平成 28年 12月 12日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第4条第3項該当
学位論文名	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
論文審査委員	(委員長) 教授 寺井 千尋 (委員) 教授 岩本 雅弘 教授 佐藤 健夫

論文内容の要旨

1 研究目的

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。

2 研究方法

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。

3 研究成果

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。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。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 は検出されなかつ

た。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。

4 考察

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。

5 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。

論文審査の結果の要旨

著者は本学位論文で、関節リウマチなど慢性炎症性疾患に続発する AA アミロイドーシスの診断に用いられる市販の抗 AA (アミロイド A) 抗体が組織中の SAA とも反応し非特異性の要因となることから、アミロイド A に特異的な SAA の断片 AA76 に対する抗体を作成し、組織染色やイムノブロットにおける診断的意義を検討し、同抗体が AA76 に特異的で免疫組織染色において AA アミロイドーシスの診断に有用であることを示した。

組織における AA アミロイドの沈着が少ないために診断に難渋するような場合に、本抗体は有用であると考えられる。おそらく同様のアプローチはアミロイド研究を行っている諸外国の他の研究室でも行われていると想像されるが、かかる抗体はまだ報告されておらず、新規のものである。審査において大きな問題点はなく、方法や結果で一部をより判りやすい表現にするよう指導した。世界的にも他に報告のない新規の抗体で、AA アミロイドーシスの診断における意義は大きく、本学学位論文として十分な内容を備えていると考え、合格と判定した。

試問の結果の要旨

申請者は学位論文審査の口演において、AA アミロイドーシス症の背景から解説し、病理診断における問題点を指摘、その問題点を解決するため本研究を行ったことを説明した。その後、方法と材料、結果、考察、結論を学位論文の内容に沿って解説した。

審査員よりの質疑では、材料で各患者より複数個検体が得られているため患者数と検体数の関係が分かりづらいこと、免疫に用いた可溶性アミノ酸残基を導入した合成ペプチドのどこまでが可溶性アミノ酸残基でどこからが SAA の配列なのか不明であること、本抗体がどのようなエピトープを認識しているか、「診断性能」よりも「診断感度」とすべきでないか、本抗体が AA76 に特異

的で従来の抗体より特異性が高いことをより強調すべきでないか、腹壁脂肪生検試料のイムノブロットの図を追加すること、などの点が質問・修正提議がなされた。申請者は質問にはすべて適切に回答することができ、本研究領域において十分な知識を有することが理解できた。またその後の修正論文において、指摘された点はすべて適格に修正がなされていた。

上記のように、申請者は本研究の背景から研究内容、結果、意義を手際よく発表でき、質疑応答においても適切に回答でき、研究領域につき十分な知識を有し学位取得に値する能力および研究経験を有すると考え、試問においても合格と判定した。