

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08712

研究課題名（和文）ラマン分光法を用いたALアミロイドーシスに対する迅速診断法の新規開発

研究課題名（英文）Novel and rapid diagnostic approach of AL amyloidosis by Raman spectroscopy

研究代表者

三木 浩和（MIKI, Hirokazu）

徳島大学・病院・講師

研究者番号：50511333

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ラマン分光法を用いたアミロイドーシスに対する新規診断法の確立を試みた。当院にてアミロイドーシスの確定診断が得られた11例のパラフィン包埋標本から薄層切片を新たに作成し、ラマンスペクトル解析を行った。検討したすべての標本で、Congo red染色陽性部位に一致して特異的なラマンシフトピーク（1680 cm⁻¹）を認めた。このピークはCongo red染色陰性部位には認めず、シート構造を反映していると考えられた。さらに主成分分析では心臓アミロイドーシスのALとATTRにおいて、第8主成分で異なる分布を認められた。ラマン分光法はアミロイドーシスに対する新規迅速診断法となりうる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身性アミロイドーシスは、臨床症状が非特異的であり、また初発症状から診断までに1年以上を要する症例も多い。特に心臓アミロイドーシスは心不全や不整脈などで生命予後不良である。本研究では、ラマン分光法を用いてアミロイドーシスの迅速診断を試みた。本研究結果から、ラマン分光法によるアミロイドーシスに対する新規迅速診断法の確立は、難病である全身性アミロイドーシス、および致死性の高い心臓アミロイドーシスの早期診断、治療開始の迅速化に寄与する可能性があり、臨床への貢献度は非常に大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Systemic AL amyloidosis remains a life-threatening disease that involves multi-organs including heart. The diagnosis of cardiac amyloidosis is often delayed, due to the non-specificity of clinical symptoms. Raman spectroscopy is a label-free and rapid technique that can provide structural information of a target, being adapted for biomedical analysis. Here, we explored the diagnostic utility of amyloidosis by Raman spectroscopy. Fifteen pathological specimens from 11 patients (8 AL, 2 ATTR, 1 AA) were examined. Raman spectroscopy analysis showed a specific peak of Raman shift at 1680 cm⁻¹ in the amyloid deposited areas, which indicative of the structure of -sheet. Interestingly, a principal component analysis of the spectra showed the differences in cardiac biopsy specimens between AL and ATTR amyloidosis. These results suggest that Raman spectroscopy may contribute to a rapid differential diagnosis in patients with amyloidosis, especially in cardiac amyloidosis.

研究分野：血液内科学

キーワード：ALアミロイドーシス ラマン分光法 心臓アミロイドーシス 主成分分析

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アミロイドーシスとは、通常は可溶性である蛋白質が、様々な原因により重合することでアミロイドと呼ばれる線維状の物質となり、組織の細胞外に沈着することで様々な臓器の機能障害を生じる難治性の疾患群である。これまでに 30 種類以上の蛋白質がアミロイド前駆物質として同定されている。AL アミロイドーシスは、罹病率は 100 万人あたり約 2 人と稀であり、倦怠感、食欲不振などの非特異的な症状を主訴とするため、早期では鑑別診断には挙がりにくく、臓器障害が進行してから診断されることも多い。米国での研究では、アミロイドーシス 515 例において、初発症状からアミロイドーシスの診断までに 1 年以上を要した症例が全体の約 37%を占めたと報告している(図 1)。特に心アミロイドーシスでは、心不全や致死的不整脈などを呈し、極めて予後不良である。さらに本疾患では、生検標本からアミロイド原因蛋白質を同定するが、確定診断には Congo red 染色などの免疫組織学的染色や質量分析装置を用いたプロテオーム解析などを行うが、多大な手間と時間を要するため、確定診断を得る前に重篤な病態に陥る症例も多い。

1920 年代に Chandrasekhara Venkata Raman らは、単色光が物質に入射した際に、物質内の分子や結晶が振動や回転により入射光とは異なる波長として散乱し、入射光と同じ波長をレイリー波長、入射光と異なる波長をラマン散乱と命名した(図 2)。その後、入射光とラマン散乱光との差(ラマンシフト)は、物質の構造に特異的な数値をとることからラマン分光法は、分子の構造や状態を知るための非破壊的分析法として利用されている(図 3)。またラマン分光法を用いた解析は、生検標本などの試料の前処置(固定や染色)を必要としないために簡便かつ短時間で評価・解析が可能となる。これまでに我々は、AL および AA アミロイドーシスと診断されている患者の病理標本(パラフィン包埋)を用いて、ラマン分光法を用いて解析したところ、AL アミロイドーシス患者検体の Congo red 陽性部位に一致して、特異的なラマンシフトのピークを認めるという preliminary なデータを得た。以上から、ラマン分光法を用いた無染色組織イメージングは、AL アミロイドーシスに対する迅速な新規診断法となりうる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、難治性かつ診断に長時間を要する疾患の代表として AL アミロイドーシスを挙げ、ラマン分光法を用いた迅速な新規診断法の開発を目的とし、以下の検討を行った。

3. 研究の方法

既に免疫染色や遺伝子解析などで全身性アミロイドーシスと診断されている患者標本(パラフィン包埋)から以下の 3 種類の連続薄層切片(3 μm)を作成した(1) HE 染色, (2) Congo red 染色, (3) 脱パラフィンした未染色)。本学理工学部のラマン顕微鏡(図 4)にて、Congo red 染色陽性部位(緑色偏光陽性)、陰性部位とほぼ同じを未染色脱パラフィン標本で同定し、ラマンスペクトル解析を施行した。なお、本研究は、徳島大学病院生命科学・医学系研究倫理審査委員会に承認済みである(承認番号 3507-1)。

4. 研究成果

検討 (1) 全身性アミロイドーシス患者標本 (AL, ATTR, AA) におけるラマンスペクトル解析の検討

今回 2009-2021 年の期間に全身性アミロイドーシスと診断された 11 例の患者合計 15 標本を使用した。患者背景は、男性 8 例、女性 3 例、年齢 49-82 歳(中央値 70 歳)、アミロイド前駆蛋白は AL 8 例、ATTR 2 例(wild type)、AA 1 例、アミロイド浸潤臓器は、心臓 5 例(AL 3 例、ATTR 2 例)、胃 2 例(AL 1 例、AA 1 例)、十二指腸 1 例(AL)、直腸 2 例(AL)、腎臓 2 例(AL)、皮膚 3 例(AL)であった。

まず代表的な症例を提示する(図 5)。心臓の AL アミロイドーシス患者の標本で、Congo red 染色陽性部位(赤色部分)と Congo red 染色陰性部位(青～緑色部分)とのラマンスペクトルを

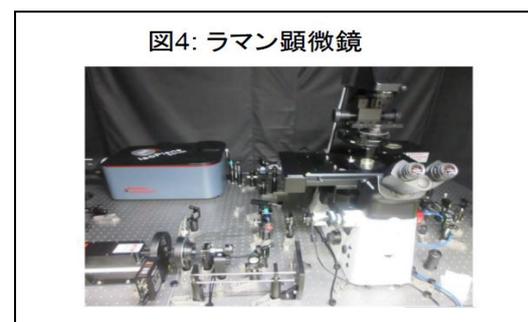
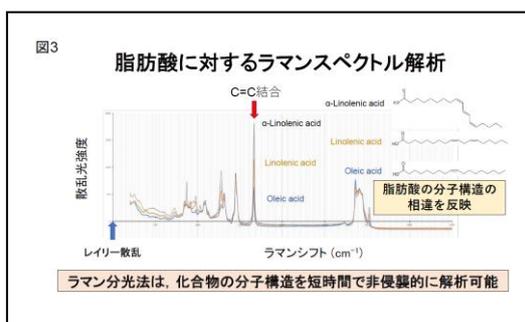
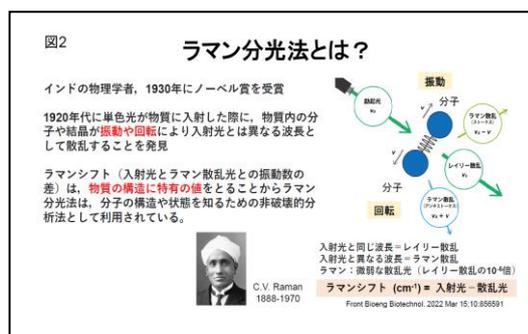
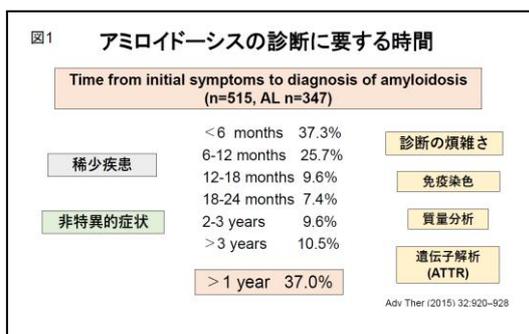
比較すると Congo red 染色陽性部位に、 1680 cm^{-1} 付近に特異的なラマンピークを認めた。続いて同様のラマンスペクトル解析を全 11 症例 15 検体に対して行ったところ、検討したすべての標本で、Congo red 染色陽性部位に一致して、 1680 cm^{-1} 付近にラマンスペクトルピークを認めた (図 6)。これまでの報告からこの 1680 cm^{-1} 付近のラマンシフトは、 β -sheet 構造を反映している可能性が示唆された。

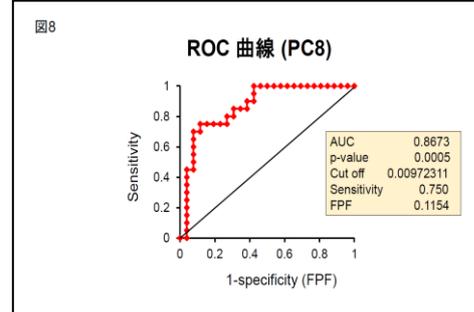
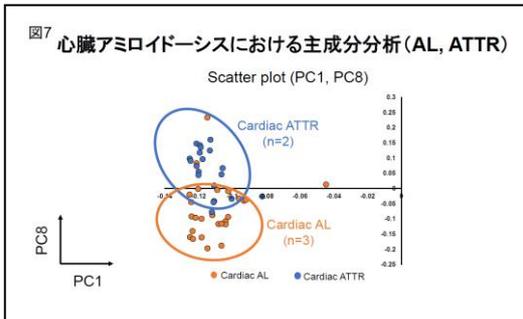
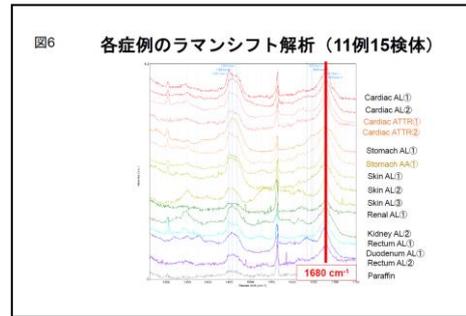
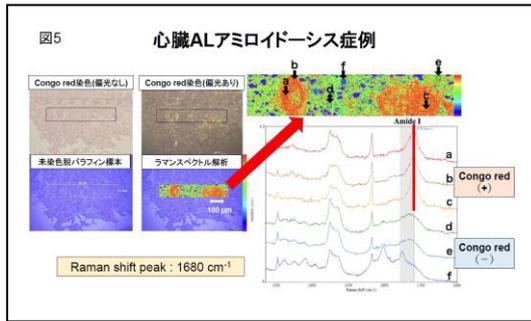
検討 (2) 心臓アミロイドーシス患者標本 (AL, ATTR) におけるラマン分光法と主成分分析を用いた病型分類の検討

ラマンスペクトル解析を用いることで、患者および浸潤臓器を問わず Congo red 染色陽性部位に一致したラマンシフトを見出したが、アミロイド前駆蛋白の同定は困難であった。続いて、アミロイドーシスの中でも特に生命予後不良である心臓アミロイドーシスに着目した検討を行った。5 例の心臓アミロイドーシス (AL3 例, ATTR2 例) 患者の標本から新たに作成した薄層切片標本を用いて検討した。5 例の標本から得られたラマンスペクトル曲線のデータに主成分分析 (Principal Component Analysis: PCA) を追加することでさらに詳細に解析したデータを図 7 に示す。第 1 主成分 (PC1) と第 8 主成分 (PC8) との解析で、散布図において、異なる分布を示した。さらに得られたデータから ROC 曲線を作成したところ (図 8), AUC0.8673, 感度 75%, 偽陽性率 11.5%とアミロイド前駆蛋白 (AL, ATTR) の鑑別に関して高い予測性能を有すると考えられた。

研究の総括

以上の結果から、ラマン分光法は、AL アミロイドーシスに対する新規迅速診断法と有効であり、また短時間での前駆蛋白の病型分類にも応用できうる可能性が示唆された。しかし今回の研究の問題点として、少数例での検討かつ AA アミロイドーシスや透析アミロイドーシスの患者などが含まれていないこと、そして PC8 が何を意味しているかなどが挙げられる。今後は、実臨床への応用を目指して、ラマンスペクトル解析の精度を向上させ、さらにラマン分光法による無染色標本での迅速診断を実現できるように研究を進展させていきたい。





5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hirokazu Miki, Shingen Nakamura, Masahiro Oura, Masafumi Nakamura, Ryohei Sumitani, Kimiko Sogabe, Mamiko Takahashi, Tomoko Maruhashi, Takeshi Harada, Shiro Fujii, Hirofumi Hamano, Masateru Kondo, Naoto Okada, Itsuro Endo, Masahiro Abe	4. 巻 -
2. 論文標題 The importance of retaining physical functions to prevent skeletal-related events in multiple myeloma patients with bone disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eJHaem	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jha2.402	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 谷口 元基, 本田 剛士, 柳谷 伸一郎, 高成 広起, 南 康夫, 中村 信元, 三木 浩和, 安倍 正博, 坂東 良美, 常山 幸一
2. 発表標題 ALアミロイドーシス無染色標本のラマン分光顕微観察
3. 学会等名 第83回日本応用物理学会秋期学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mizuki Yoshimoto, Takeshi Honda, Hiroki Takanari, Shin-ichiro Yanagiya, Hirokazu Miki
2. 発表標題 Diagnosis of cardiac amyloidosis using Raman spectroscopy
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hirokazu Miki, Shingen Nakamura, Masahiro Oura, Masafumi Nakamura, Ryohei Sumitani, Kimiko Sogabe, Mamiko Takahashi, Tomoko Maruhashi, Takeshi Harada, Shiro Fujii, Hirofumi Hamano, Masateru Kondo, Naoto Okada, Yoshimi Bando, Itsuro Endo, Masahiro Abe
2. 発表標題 The importance of retaining physical functions to prevent skeletal-related events in multiple myeloma patients with bone disease
3. 学会等名 The 48th annual meeting of European Calcified Tissue Society (web開催) (国際学会)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Hirokazu Miki, Shingen Nakamura, Masahiro Oura, Masafumi Nakamura, Ryohei Sumitani, Kimiko Sogabe, Mamiko Takahashi, Tomoko Maruhashi, Takeshi Harada, Shiro Fujii, H Hamano, Masateru Kondo, Naoto Okada, Yoshimi Bando, Itsuro Endo, Masahiro Abe
2. 発表標題 The importance of retaining physical functions to prevent SRE in multiple myeloma
3. 学会等名 The 46th annual meeting of Japanese Society of Myeloma (web開催)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Hirokazu Miki, Shingen Nakamura, Masafumi Nakamura, Ryohei Sumitani, Masahiro Oura, Kimiko Sogabe, Mamiko Takahashi, Tomoko Maruhashi, Takeshi Harada, Shiro Fujii, Susumu Nishio, Tetsu Tomonari, Masahiro Abe
2. 発表標題 Assessment of liver stiffness with shear wave elastography for hepatic AL amyloidosis
3. 学会等名 18th International Myeloma Workshop (web開催) (国際学会)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Hirokazu Miki, Shingen Nakamura, Shiro Fujii, Masafumi Nakamura, Makiko Mizuguchi, Ryohei Sumitani, Masahiro Oura, Kimiko Sogabe, Mamiko Takahashi, Tomoko Maruhashi, Takeshi Harada, Kumiko Kagawa, Susumu Nishio, Tetsu Tomonari, Masahiro Abe
2. 発表標題 Diagnostic efficacy of non-invasive ultrasound shear wave elastography for hepatic AL amyloidosis
3. 学会等名 83th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology (web開催)
4. 発表年 2021年～2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	南川 丈夫 (MINAMIKAWA Takeo) (10637193)	徳島大学・ポストLEDフォトリクス研究所・准教授 (16101)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	高成 広起 (TAKANARI Hiroki) (70723253)	徳島大学・ポストLEDフォトンクス研究所・准教授 (16101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関