

機関番号 : 13601

研究種目 : 基盤研究 (C)

研究期間 : 2008~2010

課題番号 : 20590820

研究課題名 (和文) 老人性全身性 (心) アミロイドーシスの簡便かつ非侵襲的な診断法の確立に関する研究

研究課題名 (英文) Development of easy and less invasive diagnostic technique for senile systemic (cardiac) amyloidosis.

研究代表者

池田 修一 (IKEDA SHU-ICHI)

信州大学・医学部・教授

研究者番号 : 60135134

研究成果の概要 (和文) :

老人性全身性アミロイドーシス (SSA) は高齢者の難治性心不全の原因となる。従来、本疾患の確定診断には心筋生検が必須とされているが、高齢者に対して必ずしも安全に施行できる方法ではない。本研究では心筋生検より安全に施行できる腹壁の皮膚生検を 11 名 (男性 6 名、女性 5 名、年齢 70~97 歳) に行い、8 名にアミロイド沈着がみられた。以上より腹壁の皮膚生検は心筋生検に代わって SSA の簡便かつ侵襲の少ない診断法になりうると結論された。

研究成果の概要 (英文) :

Senile systemic amyloidosis (SSA) is a main cause of intractable heart failure in the elderly individuals. To make a definitive diagnosis of SSA histological demonstration of amyloid deposition is necessary and endomyocardial biopsy might be most suitable. However, this biopsy cannot be always applicable for the aged patients. During past 3 years 11 patients with SSA (6 males and 5 female; ages from 70 to 97 years) underwent skin biopsy from abdominal wall and 8 showed amyloid deposition. It is concluded that surgical skin biopsy including deep subcutaneous tissue is useful in demonstrating amyloid deposition in SSA patients.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野 : 医歯薬学

科研費の分科・細目 : 内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード : 老人性アミロイドーシス、心アミロイドーシス、トランスサイレチン、アミロイド、皮膚生検、腹壁脂肪組織

1. 研究開始当初の背景

老人性全身性アミロイドーシス (senile systemic amyloidosis、以後 SSA と略す) は旧名「老人性心アミロイドーシス」と呼ばれ、高齢者の難治性心不全の原因と考えられている。本疾患は野生型 transthyretin (TTR) 由来の全身性アミロイドーシスであるが、主な障害臓器は心臓である。従来、本疾患の大部分は剖検により確定されており、欧米では 80 歳以上の高齢者の 20~25% の頻度と報告されているが、日本人での正確な発生頻度は知られていない。

近年、TTR 遺伝子の簡便な検索法と組織アミロイドの免疫組織化学的同定法を組み合わせることにより、本疾患を生前に臨床診断することが可能となった。その結果、SSA は 60 歳代から発症しており、本疾患の頻度は予想以上に高いこと、また心不全の発現以前に手根管症候群、脳塞栓症などを発症していることなどが判明し、SSA の臨床症状は多彩であると推測される。さらに最近、TTR がアミロイドに変換されることを抑制する薬剤が登場しており、本疾患は治療可能ともいえる。

2. 研究の目的

SSA の確定診断に際しては従来、心筋生検が主に施行されている。しかし本法を心機能が低下した高齢患者に一律に実施することは危険性が高く、実際的に不可能である。そこで本研究では腹壁の皮膚生検を行い、SSA の診断における本法の有用性を検討する。

3. 研究の方法

過去 3 年間に臨床的に SSA が疑われた患者 14 名を対象とした。

I. SSA 疑いの基準

i) 心不全の既往、ii) 胸部 X 線像で心胸郭比 $\geq 50\%$ 、iii) 心電図で肢誘導の低電位と左側胸部誘導での OS pattern の存在、iv) 心エコーで心室壁の肥厚、特に心室中隔の厚さ $\geq 12\text{mm}$ 、同部位のエコー輝度の上昇 (いわゆる granular sparkling appearance) の存在、v) technetium-99m pyrophosphate (Tc-99m-PYP) 心筋シンチグラムでの陽性画像を満たす患者とした。

II. TTR 遺伝子の解析

スクリーニング法として血清中の TTR 蛋白を免疫沈降させて、その質量を matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight (MALDI/TOF) mass spectrometry で解析した。最終的には TTR 遺伝子の全 exon の DNA sequencing を行うことで、本遺伝子に変異がない (野生型である) ことを確認した。

III. 病理組織学的検索

傍臍部の皮膚生検を施行した。組織は 1~

1.5cm 幅として皮下脂肪組織を十分含む大きさとした。通常のパラフィン包埋切片を作成して、H&E、Congo red 染色ならびに抗ヒト TTR 抗体を用いた免疫組織化学的染色を行った。また 20ml の注射器にて同部位から皮下脂肪組織を吸引して、smear 標本を作成し、これを乾燥後 Congo red 染色して、アミロイド沈着の有無を確認。アミロイド沈着陽性であれば、同組織をスライドガラスから剥離して、アミロイド細線維を分離・精製。最終的にはアミロイド蛋白を抽出して、MALDI/TOF mass spectrometry で解析することにより、TTR 分子が変異型であるのか、野生型であるのかを決定する。

4. 研究成果

14 名中 11 名で皮膚生検が行われた。これらの患者の臨床像の要約を表 1 に示す。大部分の患者は心筋生検に代表される他の部位の生検で抗 TTR 抗体陽性のアミロイド沈着が証明されていた (図 1)。皮膚生検の結果は 8 名にアミロイド沈着がみられた (陽性率 72%)。アミロイドは皮下深層の脂肪組織に斑状に沈着しており、H&E ではエオジン好性の物質として観察されたが (図 2)、Congo red 色素との親和性は低く、偏光も弱かった (図 2)。一方、抗ヒト TTR 抗体を用いた免疫組織化学的染色ではこのアミロイド沈着は特異的かつ強陽性に染色された (図 2)。心筋生検と腹壁皮膚生検におけるアミロイド沈着の程度を比較すると、前者の方が圧倒的にアミロイド沈着量が多かった。

腹壁脂肪の吸引生検は上記陽性者の 8 名中 3 名に施行したが、陽性者は 1 名のみであった。この例では極少量のアミロイドが smear 標本上に見られ、パラフィン切片上でもアミロイド沈着は少量かつ散在性であった (図 3)。皮下脂肪組織におけるアミロイド沈着量が少なく、かつ散らばっているため、吸引生検ではアミロイドが沈着した脂肪組織を採取できないと判断した。

表1. 患者の臨床像の要約

症例	年齢	性別	心エコー所見 IVS(mm)	EF(%)	FS(%)	Tc-99m-PYP シンチグラム	血清 BNP(pg/ml)	皮膚生検	他の陽性 生検部位
1	70	男	23.4	20.5	9.4	陽性	217.0	陽性	心筋
2	70	男	18.8	62.3	33.4	陽性	341.0	陰性	心筋
3	73	男	15.0	31.0	23.0	陽性	/	陰性	心筋
4	74	男	14.2	52.5	26.7	陽性	338.0	陽性	心筋
5	74	男	20.0	17.6	7.9	陽性	630.8	陽性	心筋
6	78	女	14.4	33.2	15.7	陽性	383.2	陰性	心筋
7	83	男	21.1	59.8	31.1	陽性	483.4	陽性	心筋
8	83	女	11.3	43.0	23.0	陽性	/	陽性	胃粘膜
9	84	女	15.2	25.6	11.6	陽性	433.5	陽性	十二指腸粘膜
10	86	女	10.7	36.1	17.5	陽性	532.8	陽性	/
11	97	女	13.8	33.3	/	陽性	187.9	陽性	/

IVS: interventricular septum (正常値 ≤ 12mm)、EF: ejection fraction (正常値 ≥ %)、FS: fractional shortening (正常値 ≥ %)、血清BNP濃度 (正常 ≤ pg/ml)。

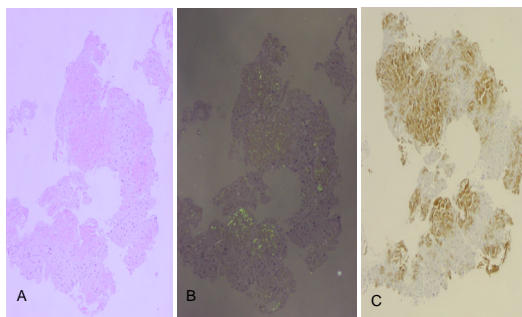


図1 症例5の心筋生検所見
A: Congo red染色、B: 同染色後の偏光顕微鏡観察、C: 抗TTR抗体を用いた免疫染色。
心筋内にはびまん性のCongo red陽性のアミロイド沈着が見られ、このアミロイドは緑色偏光を呈し、抗TTR抗体で特異的に免疫染色される。

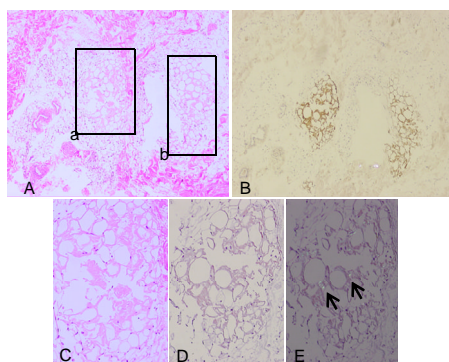


図2 症例5の皮膚生検所見
A & C: H&E染色、B: 抗TTR抗体を用いた免疫染色、D: Congo red染色、E: 同染色後の偏光顕微鏡観察、F: aの拡大が図C、D、Eである。皮膚の真皮深層の脂肪組織には図Aのa、bで囲む領域にエオジン好性の無構造物の沈着が見られ、この物質はCongo redで薄く染色され(D)、偏光も弱い(E)の矢印が、抗TTR抗体の免疫染色では特異的に染色される。

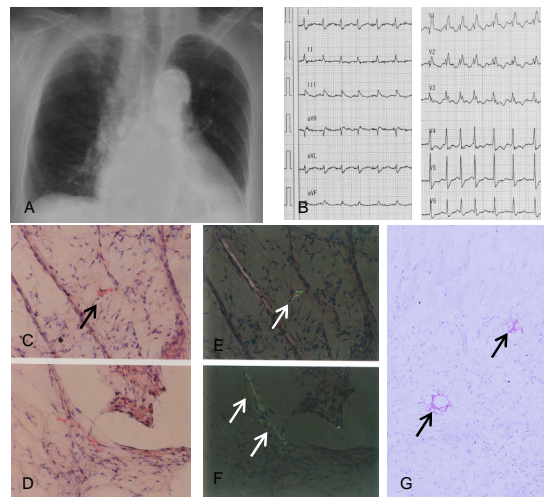


図3 症例10の心臓と皮膚生検所見
胸部Xでは心陰影の拡大(A)が見られ、心電図は心房細動(B)を示している。腹壁脂肪吸引生検では少量のアミロイド沈着がみられ(C,D,E,F)、外科的生検組織では抗TTR抗体陽性のアミロイドが僅かにみられる(G)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 27 件)

- 1) Chambers JK, Kanda T, Shirai A, Higuchi K, Ikeda S, Une Y: Senile systemic amyloidosis in an aged savannah monkey (cercopithecus aethiops) with tenosynovial degeneration. J Vet Med Sci, 査読有, 2010, 72:657-659.
- 2) Chambers JK, Kuribayashi H, Ikeda S, Une Y: Distribution of neprilysin and deposit patterns of Aβ subtypes in the

- brains of aged squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *Amyloid*, 査読有, 2010, 17:75-82.
- 3) Hirohata M, Yoshita M, Ishida C, Ikeda SI, Tamaoka A, Kuzuhara S, Shoji M, Ando Y, Tokuda T, Yamada M: Clinical features of non-hypertensive lobar intracerebral hemorrhage related to cerebral amyloid angiopathy. *Eur J Neurol*, 査読有, 2010, 17:823-829.
 - 4) Tojo K, Tsuchiya-Suzuki A, Sekijima Y, Morita H, Sumita N, Ikeda S: Upper limb neuropathy such as carpal tunnel syndrome as an initial manifestation of ATTR Val30Met familial amyloid polyneuropathy. *Amyloid*, 査読有, 2010, 17:32-35.
 - 5) Koyama J, Falk RH: Prognostic significance of strain imaging in light-chain amyloidosis (reply to the letter). *J Am Coll Cardiol Img*, 査読有, 2010, 3:788.
 - 6) Koyama J, Falk RH: Prognostic significance of strain Doppler imaging in patients with light-chain amyloidosis. *J Am Coll Cardiol Img*, 査読有, 2010, 3:333-342.
 - 7) Ikeda S, Tojo K, Tsuchiya-Suzuki A, Akamatu T, Hashimoto T, Higuchi K: Significant deposition of wild type transthyretin-derived amyloid in the gastrointestinal tract of aged individuals. *Amyloid*, 査読有, 2009, 16:174-177.
 - 8) Katoh N, Matsuda M, Miyazaki D, Gono T, Yazaki M, Ikeda S: Rituximab therapy in nephrotic syndrome due to AH amyloidosis. *Amyloid*, 査読有, 2009, 16:178-180.
 - 9) Katoh N, Matsuda M, Yoshida T, Yazaki M, Morita H, Sakashita K, Ikeda S. Primary AL amyloid polyneuropathy successfully treated with high-dose melphalan followed by autologous stem cell transplantation. *Muscle Nerve*, 査読有, 2009, 41:138-143.
 - 10) Koike H, Morozumi S, Kawagashira Y, Iijima M, Yamamoto M, Hattori N, Tanaka F, Nakamura T, Hirayama M, Ando Y, Ikeda S, Sobue G: The significance of carpal tunnel syndrome in transthyretin Val30Met familial amyloid polyneuropathy. *Amyloid*, 査読有, 2009, 16:142-148.
 - 11) Tazawa K, Katoh N, Shimojima Y, Matsuda M, Ikeda S: Marked shrinkage of amyloid lymphadenopathy after an intensive chemotherapy in a patient with IgM-associated AL amyloidosis. *Amyloid*, 査読有, 2009, 16:183-185.
 - 12) Yoshida T, Zhang P, Fu X, Higuchi K, Ikeda S: Slaughtered aged cattle might be one dietary source exhibiting amyloid enhancing factor activity. *Amyloid*, 査読有, 2009, 16:25-31.
 - 13) Noto Y, Tokuda T, Shiga K, Tsuchiya A, Yazaki M, Matoba S, Nakagawa M: Cardiomyopathy in a Japanese family with the Glu61Lys transthyretin variant: a new phenotype. *Amyloid*, 査読有, 2009, 16:99-102.
 - 14) Kojima Y, Sakai K, Ishida C, Asaka T, Hamaguchi T, Nozaki I, Fukushima K, Tsuchiya A, Kametani F, Yazaki M, Okino S, Yamada M: Hereditary rimmed vacuole myopathy showing interstitial amyloid deposition in muscle tissue. *Muscle Nerve*, 査読有, 2009, 40:472-475.
 - 15) Yamano M, Azuma A, Yazaki M, Ikeda S, Sawada T, Matsubara H. Early cardiac involvement in senile systemic amyloidosis: a case report. *Amyloid*, 査読有, 2009, 15:54-59.
 - 16) Machida K, Tojo K, Naito K, Gono T, Kusano Y, Ikeda S: Cortical petechial hemorrhage subarachnoid hemorrhage and corticosteroid-responsive leukoencephalopathy in a patient with cerebral amyloid angiopathy. *Amyloid*, 査読有, 2008, 15:60-64.
 - 17) Matsuda M, Gono T, Katoh N, Yoshida T, Tazawa K, Shimojima Y, Ishii W, Fushimi T, Ikeda S: Nephrotic syndrome due to primary systemic AL amyloidosis, successfully treated with VAD (vincristine, doxorubicin and dexamethasone) alone. *Intern Med*, 査読有, 2008, 47:543-549.
 - 18) Matsuda M, Gono T, Shimojima Y, Yoshida T, Katoh N, Hoshii Y, Yamada T, Ikeda S: AL amyloidosis manifesting as systemic lymphadenopathy. *Amyloid*, 査読有, 2008, 15:117-124.
 - 19) Miyazaki D, Yazaki M, Gono T, Kametani F, Tsuchiya A, Matsuda M, Takenaka Y, Hosii Y, Ikeda S: AH amyloidosis associated with an immunoglobulin heavy chain variable region(VH1) fragment: A case report. *Amyloid*, 査読有, 2008, 15:125-128.
 - 20) Shimojima Y, Morita H, Kobayashi S, Takei Y, Ikeda S: Ten-year follow-up of peripheral nerve function in patients with familial amyloid polyneuropathy after liver transplantation. *J Neurol*, 査読有, 2008, 255:1220-1225.

- 21) Tojo K, Sekijima Y, Machida K, Tsuchiya A, Yazaki M, Ikeda S: Amyloidogenic transthyretin Val30Met homozygote showing unusually early-onset familial amyloid polyneuropathy. Muscle Nerve, 査読有, 2008, 37:796-803.
- 22) Tsuchiya A, Yazaki M, Kametani F, Takei Y, Ikeda S: Marked regression of abdominal fat amyloid in patients with familial amyloid polyneuropathy during long-term follow-up after liver transplantation. Liver Transpl, 査読有, 2008, 14:563-570.
- 23) Kodaira M, Sekijima Y, Tojo K, Tsuchiya A, Yazaki M, Ikeda S, Sekijima Y, Hoshii Y, Tachibana S: Non-senile wild-type transthyretin systemic amyloidosis presenting as bilateral carpal tunnel syndrome. J Peripher Nerv Syst, 査読有, 2008, 13:148-150.
- 24) Yoneyama A, Koyama J, Tomita T, Kumazaki S, Tsutsui H, Watanabe N, Kinoshita O, Ikeda U: Relationship of plasma brain-type natriuretic peptide levels to left ventricular longitudinal function in patients with congestive heart failure assessed by strain Doppler imaging. Int J Cardiol, 査読有, 2008, 130:56-63.

[学会発表] (計 19 件)

- 1) Koyama J, et al: Peak systolic velocity of pulmonary venous flow is closely associated with left ventricular global longitudinal strain, which is a powerful predictor of clinical outcome, in patients with light-chain amyloidosis. AHA scientific sessions 2010 in Chicago (USA). Circulation. 2010;122:A12412 (abstract).
- 2) Minamisawa M, et al: Left atrial dysfunction in patients with systemic amyloidosis. The 59th annual scientific session, ACC 2010 Atlanta (USA). J Am Coll Cardiol. 2010; 55 (suppl); A36 (abstract).
- 3) Minamisawa M, et al: Severe left atrial dysfunction in patients with non-symptomatic cardiac amyloidosis. ESC congress 2010 Stockholm (Sweden).
- 4) 鈴木彩子, 他: 肝移植を受けた FAP 患者 45 例の術後経過の検討. 第 28 回日本肝移植研究会, 2010 年 7 月 1 日, 広島.
- 5) 加藤修明, 他: 消化管限局免疫グロブリン由来(原発性 AL)アミロイドーシスの臨床病態. 第 107 回日本内科学会総会・講演会, 2010 年 4 月 10 日, 東京.
- 6) Koyama J, et al: A comparison of

ventricular torsion between cardiac amyloidosis and pressure overload hypertrophy caused by aortic valve stenosis. The 58th annual scientific session, ACC 09 Orlando (USA). J Am Coll Cardiol. 2009; 53(suppl 1); A 234(abstract).

- 7) 松田正之, 他: 本邦における全身性 AL アミロイドーシスの臨床像・当科における 160 例の臨床的検討. 第 106 回日本内科学会総会・講演会, 2009 年 4 月 12 日, 東京.
- 8) 東城加奈, 他: 老人性全身性アミロイドーシスの臨床像についての検討. 第 106 回日本内科学会総会・講演会, 2009 年 4 月 11 日, 東京.
- 9) Tsuchiya-Suzuki A, et al: The contribution of wild-type TTR to abdominal fat amyloid in FAP patients: an age-related change. The VIIth International Symposium on Amyloidosis. September 2008, London (UK).
- 10) Ikeda S, et al: TTR-derived amyloid deposition on punched skin biopsy in patients with senile systemic amyloidosis. The VIIth International Symposium on Amyloidosis. September 2008, London (UK).
- 11) Yazaki M, et al: The presence of wild-type TTR in gastroduodenal mucosal amyloid in FAP patients. The VIIth International Symposium on Amyloidosis. September 2008, London (UK).
- 12) 小平農, 他: 野生型トランスサイレチン由来アミロイドに伴う手根管症候群の臨床像検討. 第 49 回日本神経学会総会, 2008 年 5 月 15 日, 横浜.
- 13) Koyama J, et al: Elevated plasma BNP levels are associated with global longitudinal left ventricular dysfunction in patients with cardiac amyloidosis. The 57th annual scientific session, ACC 2008, Chicago (USA). Am Coll Cardiol. 2008; 51(suppl); A 63(abstract).

[図書] (計 1 件)

- 1) 小山 潤: 特定心筋症を探る 心アミロイドーシスの心エコー. 文光堂, 心エコー, 2008, vol.9 No.6 6 月号 pp598-605.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 修一 (IKEDA SHU-ICHI)
信州大学・医学部・教授
研究者番号: 60135134

(2) 研究分担者

矢崎 正英 (YAZAKI MASAHIDE)

信州大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：70372513

小山 潤 (KOYAMA JUN)
信州大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：10303463