

# 家族性アミロイドポリニューロパチーの 診断に関する研究

研究協力者 鈴木友和  
共同研究者 東 強 辻野精一  
水野隆三 比嘉定吉  
(大阪大学医学部第三内科)  
和田芳直 林 昭  
(大阪府立母子医療センター)  
池田修一 柳澤信夫  
(信州大学医学部第三内科)

## 目 的

家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) は晩発性の遺伝性 (常染色体性優性) 末梢神経疾患である。大多数が20代後半から40歳代に発症し, 進行性の自律神経不全を含むポリニューロパチーの果てに悪液質に陥り, 約10年の経過で死亡する。本症を病理学的に特徴づけ, かつその予後を決定する最も重要な要因は末梢神経をはじめ殆どの臓器に認められるアミロイド沈着である。わが国の熊本県および長野県の focus の起原はともにも少くとも江戸時代にまでさかのぼり, 本症の “biological fitness” が殆ど減少せぬため, 現在も患者数は増加傾向にある。本症の早期診断, 発症前診断方法を開発し, 診療・遺伝相談に役立てることは本研究班の趣旨に沿う研究であると考えられる。

初年度 (昭和58年度) の研究では筆者らは熊本県荒尾 focus の3家系4症例の剖検腎臓からアミロイドフィブリル蛋白を抽出単離し, その一次構造がいずれもプレアルブミン変異種であることを明らかにした<sup>1)</sup>。すなわちヒトプレアルブミンのN末端から30番目のバリン残基がメチオニン残基に置換した構造異常を有していた。この研究は俵ら<sup>2)</sup> が1剖検例から得た所見を確認するとともに, FAP が異常プレアルブミン症であることをほぼ確定的なものとした。これと相前後して, いくつかの研究室から, FAP 患者の血中にはアミロイド蛋白と同一の異常プレアルブミンが存在していることが報告された<sup>3)-5)</sup>。

昨年度 (昭和59年度) の研究ではアミロイドフィブリル蛋白の一次構造に基き, synthetic oligonucleotide probe (19 mer) による FAP の DNA 診断法の開発を試みた<sup>6)</sup>。

今年度は再び蛋白レベルに戻り, 血中の異常プレアルブミンの単離同定による FAP の血漿診断法を確立した。以下にその概略を報告する。

## 方 法

異常プレアルブミンの単離: 長野県在住の FAP 患者3名のプールした血漿54 ml を30 mM

リン酸ナトリウム緩衝液 pH 7.0 と平衡化したあと、ブルーセルロファイン・アフィニティカラム (2.8×42 cm, 生化学工業) にのせ、同上の緩衝液250mlと1.0 M 食塩を含む同上緩衝液250mlとで塩濃度勾配のクロマトグラフィを行う。流速0.9ml/分, 分画容量4mlとする。各分画から5  $\mu$ l をとり、抗ヒトプレアルブミン血清 (Miles Laboratories) に対する免疫拡散法によりプレアルブミン分画を同定する。プレアルブミンを含む分画はコロジオンバッグで濃縮したあと、0.15 M 食塩を含む 20 mM トリス-塩酸緩衝液 pH 7.40 と平衡化する。これを DEAE-Sephadex A-50 カラム (2.2×30 cm) にのせ、同上の緩衝液500mlと0.45 M 食塩を含む同じ緩衝液500mlで塩濃度勾配のクロマトグラフィを行う。流速0.5ml/分, 分画容量4mlとする。プレアルブミンを含む分画は上述の免疫拡散法により同定する。この分画を脱イオン水で透析し、凍結乾燥する。その一部を Nucleosil 5C<sub>18</sub> カラム (0.5×20 cm, Machery-Nagel and Co.) にのせ、0.2%トリフルオロ酢酸水中で、40%から45%アセトニトリル濃度勾配で、逆相高速液体クロマトグラフィ (HPLC) を行う。主なピークを分取し、凍結乾燥する。

Secondary Ion Mass Spectrometry (SIMS) : トリプシン消化したあと凍結乾燥したプレアルブミンは、グリセロールと混合し、飽和トリクロール酢酸に溶解させて SIMS に供した。マススペクトルは松田型二重収束質量分析計で測定し、データは JMA-2000 データ処理システムにより分析する。

異常プレアルブミンの検出による FAP の血漿診断法 : 正常者 2 名と FAP 患者 2 名の個々の血漿4~10mlを30 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH 7.0 と平衡化し、ブルーセルロファインカラム (42.2×15 cm) にのせ、FPLC システム (Pharmacia Fine Chemicals) を用いて、同上の緩衝液中で40分かけて0~1.0 M 食塩濃度勾配のクロマトグラフィを行う。流速 4ml/分, 分画容量4mlとする。既述の免疫拡散法によりプレアルブミン分画を同定する。プレアルブミン分画は濃縮、ひきつづき20 mM トリス-塩酸緩衝液 pH 7.6 と平衡化し、Mono Q HR カラム (0.5×5 cm, Pharmacia Fine Chemicals) にのせ、40分かけて0~0.5 M 食塩濃度勾配の陰イオン交換クロマトグラフィを行う。流速 1ml/分, 分画容量2mlとする。免疫拡散法により同定されたプレアルブミン分画は脱イオン水で透析したあと凍結乾燥し、その一部を既述の HPLC に供する。

## 結 果

異常プレアルブミンの単離 : 第 1 図は FAP 患者血漿54mlのブルーセルロファイン・アフィニティクロマトグラフィのプロフィールを示したものである。プレアルブミンは全く吸着されることなく溶出される。第 2 図は精製の第 2 段階である DEAE-Sephadex A-50 イオン交換クロマトグラムである。プレアルブミンは巨大なピークのあとに小さなピークとして認められる。これまでの段階では正常プレアルブミンと異常プレアルブミンはクロマトグラフィ上全く同じ挙動を示し、区別できなかった。第 3 図はプレアルブミンの逆相 HPLCである。上段の正常のプレアルブミンでは 2 つの主要ピーク (b, d) が認められる。さらに 2 つの比較的低いピーク (c, e) が認められる。

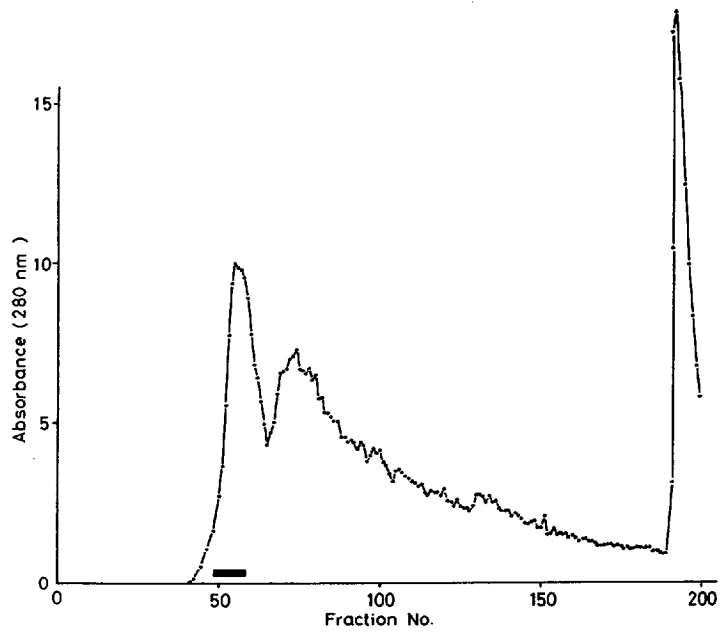


図1 正常人血漿のブルーセルロファイン・アフィニティ  
クロマトグラム  
— ; 免疫拡散法により同定されたプレアルブミン分画

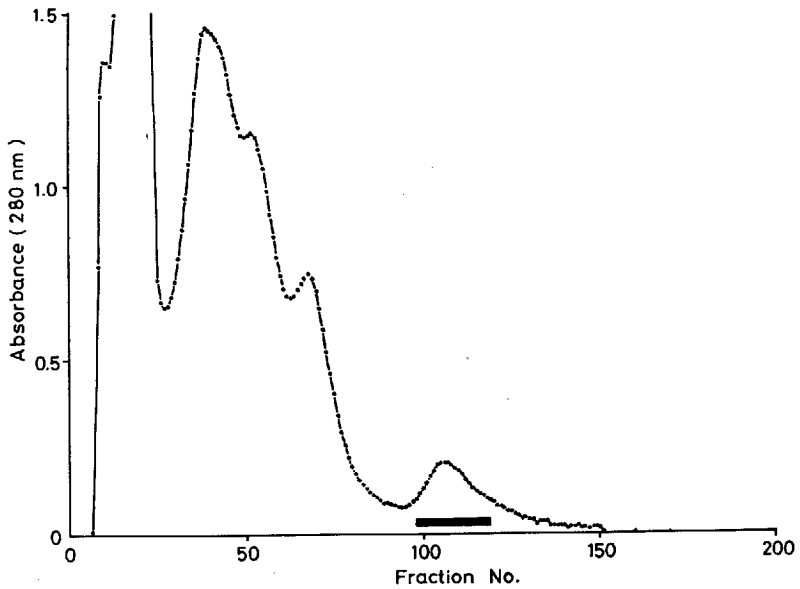


図2 ブルーセルロファインカラムで得られたプレアルブミン分画の  
DEAE-Sephadex A-50 クロマトグラム  
— ; 免疫拡散法で同定されたプレアルブミン分画

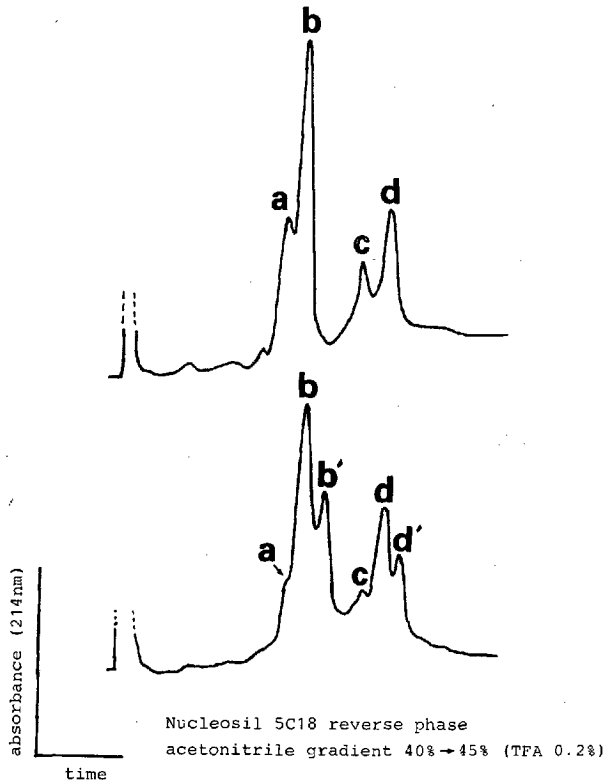


図3 プレアルブミンの逆相 HPLC

上段：正常者のプレアルブミン，下段：FAP 患者のプレアルブミン

ク (a, c) もある。一方下段の FAP 患者のプレアルブミンの場合には、これらのピークに加えて、b, d よりやや遅れて溶出される 2 つのピーク (b', d') が観察される。

プレアルブミンのトリプシン消化物の SIMS：第 4 図上段にピーク b のトリプシン消化ペプチドの SIMS を示す。m/z1366 にみられる圧倒的に強いピークはプレアルブミンの N 末端から〔22-34〕のペプチドに相当するものである。また m/z 1494, 1394 と 1267 のピークはそれぞれ〔22-35〕,〔36-48〕と〔71-80〕に相当するものである、一方第 4 図下段のピーク b' のトリプミン消化ペプチドの SIMS では、m/z1366 にピークがなく、代りに m/z1398 に強いピークが観察される。この質量は〔22-34〕の中、30 番目のバリンがメチオニンに置換した場合に一致する。また m/z1414 のピークはそのメチオニン残基が酸化された“メチオニンスルフォキシド”で説明することができる。

異常プレアルブミンの検出による FAP の血漿診断法：第 5 図に FAP 患者のプレアルブミン精製第 1 段階のブルーセルロファイン・アフィニティクロマトグラム，第 6 図に精製第 2 段階の MonoQ カラムクロマトグラムのそれぞれ 1 例を示す。正常プレアルブミンと異常プレアルブミンはこれらのクロマトグラフィでは全く区別できなかった。しかし逆相 HPLC により

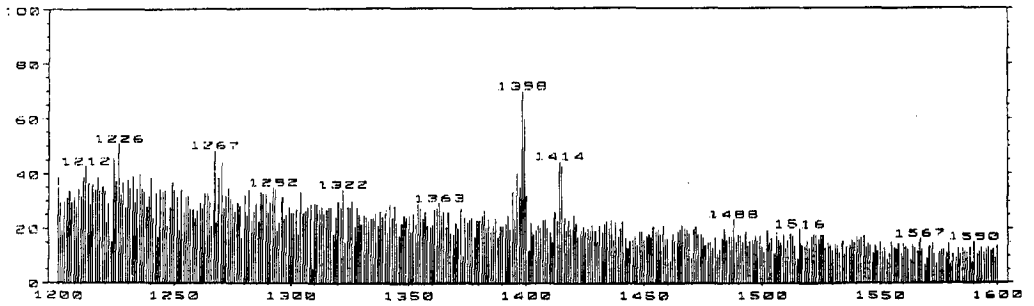
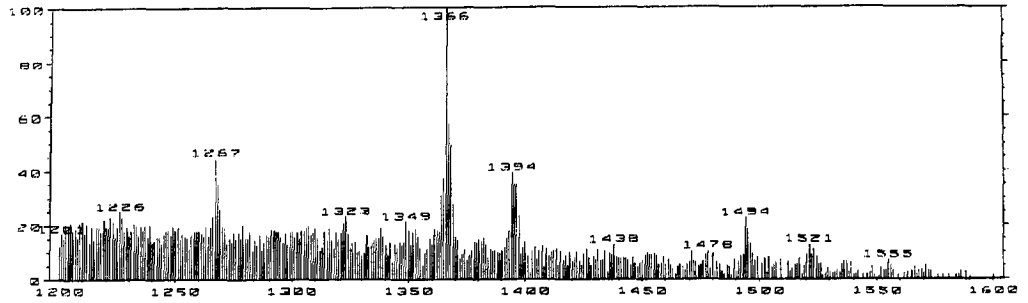


図4 プレアルブミンのトリプシン消化ペプチドの SIMS

上段；図3のピークbのトリプシン消化物

下段；図3のピークb'のトリプシン消化物

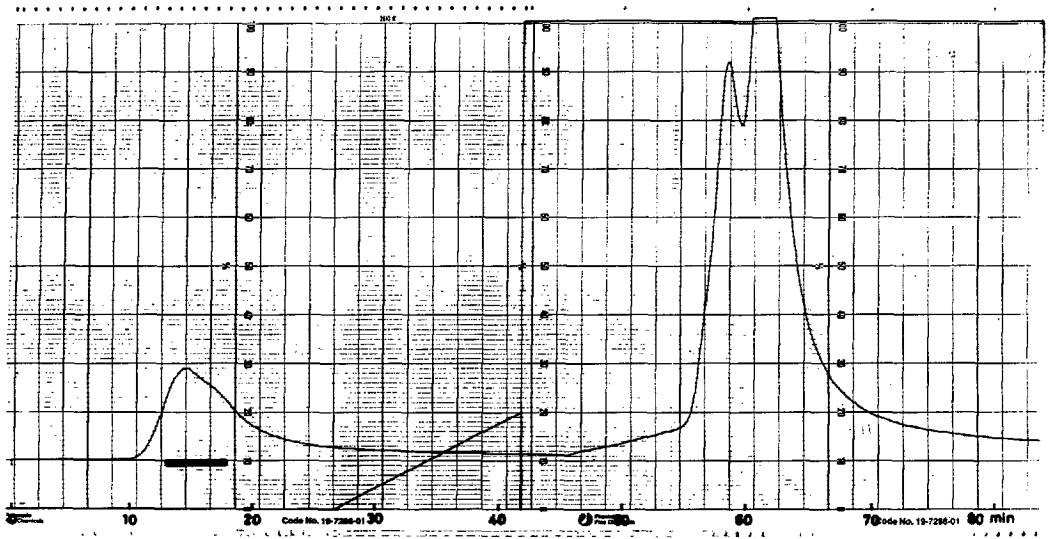


図5 FAP 患者血漿のブルーセルロファインカラムによる FPLC 縦軸；A<sub>280</sub>，—；免疫拡散法により同定されたプレアルブミン分画

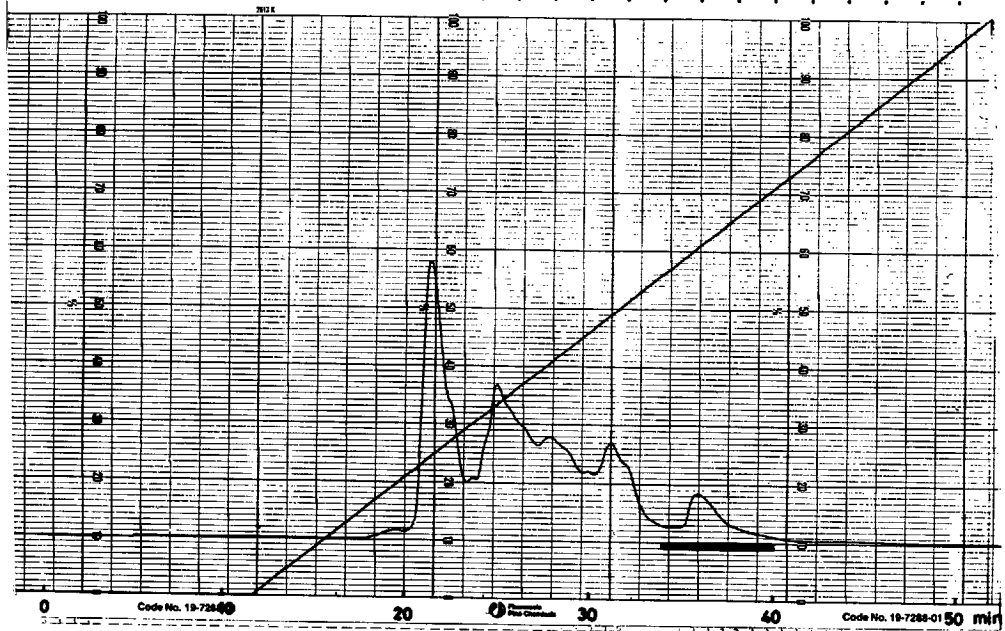


図6 ブルーセルロフィン・FPLC で得られたプレアルブミン分画の Mono Q カラムによる FPLC 縦軸；A<sub>280</sub>，——；免疫拡散法で同定されたプレアルブミン分画

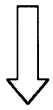
両プレアルブミンは明瞭に分離識別された。その HPLC のパターンは第3図と全く同様であったので省略する。

## 考 察

FAP の血清診断法としてはすでに RIA がある<sup>7)</sup>。しかしこれは現在宮崎医科大学第二生化学教室でしか測定できない。また Saraiva ら<sup>4)</sup>や Benson and Dwulet<sup>7)</sup> は正常プレアルブミンと異常プレアルブミンの混合物のまま CNBr を作用させ、HPLC により異常ピークを検出する方法を公表している。本研究は初めて逆相 HPLC により異常プレアルブミンを正常プレアルブミンから分離し、SIMS により同定することを可能にした。次いで血漿5~10ml で実施できる方法に改良し、臨床応用可能なスケールにすることができた。日常診療においては、プレアルブミン精製第2段階の Mono Q カラムのプレアルブミン分画は、ほぼシングルピークであるため、免疫拡散法を割愛し、逆相 HPLC のパターンから直ちに診断して差し支えない。したがって本診断法は比較的簡単で、短時間の中に実施でき、信頼度の高い方法だと言えることができる。現在無症状保因者について検索を進めており、本法が FAP の発症前診断法としても有用であることが明らかにされつつある。

## 文 献

- 1) 鈴木友和, 上地正雄, 比嘉定吉, 佐古田三郎, 岸本 進, 竹迫良雄, 林 昭, 千谷晃一 : 厚生省心身障害研究先天異常のモニタリングに関する研究. 昭和58年度研究報告書, p. 23, 1984.
- 2) Tawara, S., Nakazato, M., Kangawa, K., Matsuo, H. and Araki, S. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **116** : 880~888, 1983.
- 3) Dwulet, F.E. and Benson, M.D. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **114** : 657~662, 1983.
- 4) Saraiva, M.J.M., Birken, S., Costa, P.P. and Goodman, D.S. : *J. Clin. Invest.* **74** : 104~119, 1984.
- 5) Nakazato, M., Kangawa, K., Minamino, N., Tawara, S., Matsuo, H. and Araki, S. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **122** : 712~718, 1984.
- 6) 鈴木友和, 佐古田三郎, 比嘉定吉, 東 強 : 厚生省心身障害研究先天異常のモニタリングに関する研究. 昭和59年度研究報告書, p. 25, 1985.
- 7) Benson, M.D. and Dwulet, F.E. : *J. Clin. Invest.* **75** : 71~75, 1985.



## 検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



### 目的

家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) は晩発性の遺伝性(常染色体性優性)末梢神経疾患である。大多数が 20 代後半から 40 歳代に発症し,進行性の自律神経不全を含むポリニューロパチーの果てに悪液質に陥り,約 10 年の経過で死亡する。本症を病理学的に特徴づけ,かつその予後を決定する最も重要な要因は末梢神経をはじめ殆どの臓器に認められるアミロイド沈着である。わが国の熊本県および長野県の focus の起原はともに少なくとも江戸時代にまでさかのぼり,本症の“biological fitness”が殆ど減少せぬため,現在も患者数は増加傾向にある。本症の早期診断,発症前診断方法を開発し,診療・遺伝相談に役立てることは本研究班の趣旨に沿う研究であると考えられる。

初年度(昭和 58 年度)の研究では筆者らは熊本県荒尾 focus の 3 家系 4 症例の剖検腎臓からアミロイドフィブリル蛋白を抽出単離し,その一次構造がいずれもプレアルブミン変異種であることを明らかにした。すなわちヒトプレアルブミンの N 末端から 30 番目のバリン残基がメチオニン残基に置換した構造異常を有していた。この研究は依らが 1 剖検例から得た所見を確認するとともに,FAP が異常プレアルブミン症であることをほぼ確定的なものとした。これと相前後して,いくつかの研究室から,FAP 患者の血中にはアミロイド蛋白と同一の異常プレアルブミンが存在していることが報告された。

昨年度(昭和 59 年度)の研究ではアミロイドフィブリル蛋白の一次構造に基き,synthetic oligonucleotide probe(19mer)による FAP の DNA 診断法の開発を試みた。

今年度は再び蛋白レベルに戻り,血中の異常プレアルブミンの単離同定による FAP の血漿診断法を確立した。以下にその概略を報告する。