

尿中 SAA フラグメント測定による反応性アミロイドーシスの診断

黒田 毅

新潟大学保健管理センター
新潟大学大学院医歯学総合研究科
腎・膠原病内科学分野

New Diagnostic Method of Reactive AA Amyloidosis Associated with Rheumatoid Arthritis Using Urinary SAA Fragment

Takeshi KURODA

Niigata University Health Administration Center
Division of Clinical Nephrology and Rheumatology, Niigata University
Graduate School of Medical and Dental Sciences

要 旨

関節リウマチ (RA) に合併する AA アミロイドーシスは生命予後を左右する重大な疾患とであり、腎臓におけるアミロイドの沈着は進行すると腎不全、血液透析にいたる。また全身にアミロイドが沈着するため、血液透析に導入された後の予後も不良である。一方 AL アミロイドーシスにおいても腎臓にアミロイドが沈着するが、腎機能低下は尿タンパクが多いにもかかわらず穏やかに進行する。沈着するアミロイドによる病態の解明により予後を改善する可能性も期待されるため解析を行った。アミロイドの沈着量が同じでも AL の方に内皮障害が強いためタンパク尿が多く、AA は結節状に沈着し血管壁に多く沈着するため、クレアチニンクリアランスがより低下することが分かった。以上により AA と AL のアミロイドーシスの腎臓における病態の違いは沈着パターン起因する事が示唆された。また、腎へのアミロイドの沈着は腎生検で証明されるが、RA 症例においては関節痛のため生検が困難な場合も少なくない。非侵襲的な診断法を開発するため RA 患者でアミロイドーシス合併例と非合併例の尿を検討した。アミロイドーシス合併例の一部で遠心した尿の上清のイムノブロットによりアミロイドの尿への排泄が明らかになり、さらに尿沈渣の Congo-red 染色や腎組織の表面マーカーの二重染色によって腎組織への沈着の質的診断も可能であった。

キーワード：Rheumatoid arthritis; amyloidosis; serum amyloid A

はじめに

関節リウマチ (RA) は、関節のみならず多彩な関節外症状を来す疾患である。反応性 AA アミロ

イドーシスは進行期の RA の重要な合併症の一つで、予後は不良である。AA アミロイドーシスは RA 以外では、家族性地中海熱のような自己炎症症候群、血管炎症候群などにも合併しアミロイド

Reprint requests to: Takeshi KURODA
Division of Clinical Nephrology and Rheumatology,
Niigata University Graduate School of Medical
and Dental Sciences,
1-757 Asahimachi-dori, Chuo-ku,
Niigata 951-8510, Japan.

別刷請求先：〒951-8510 新潟市中央区旭町通 1-757
新潟大学大学院医歯学総合研究科
腎・膠原病内科学分野

黒田 毅

ーシスの存在が多くの症例の予後を決定する。アミロイドの生成機序は、関節炎の局所で産生される Interleukin-6, Tumor necrosis factor α 等の炎症性サイトカインが血液を介して肝臓に運ばれ Serum amyloid A 蛋白 (SAA) が生成される。SAA は 104 個のアミノ酸よりなり、4 つのリボン構造を持つ¹⁾。肝臓で生成された SAA は血中において 76 番目の部分で N-, C-terminal の 2 つに分解された後、N 末端側 (AA76) が重合性を帯びアミロイド蛋白として沈着する²⁾。沈着したアミロイド蛋白が、臓器に沈着し腎障害をはじめとする機能障害を起こすと考えられている。日本においては 90 % が RA に続発し、RA の約 6 % に

AA アミロイドーシスが認められる。

アミロイドの腎臓への沈着は均一か

腎臓におけるアミロイドの沈着は糸球体、血管、尿細管、間質など広範囲に及ぶが、アミロイド沈着部位の周辺には炎症細胞等の集積をほとんど認めず腎臓においては生体適合性の高いタンパク質であると考えられる。腎臓におけるアミロイド評価は腎生検により行われるが、沈着が腎臓のすべての部分で均質か否かは明らかではなかった。この点を明らかにするため、RA によるアミロイドーシスを合併し死亡した症例の腎より、左右の腎

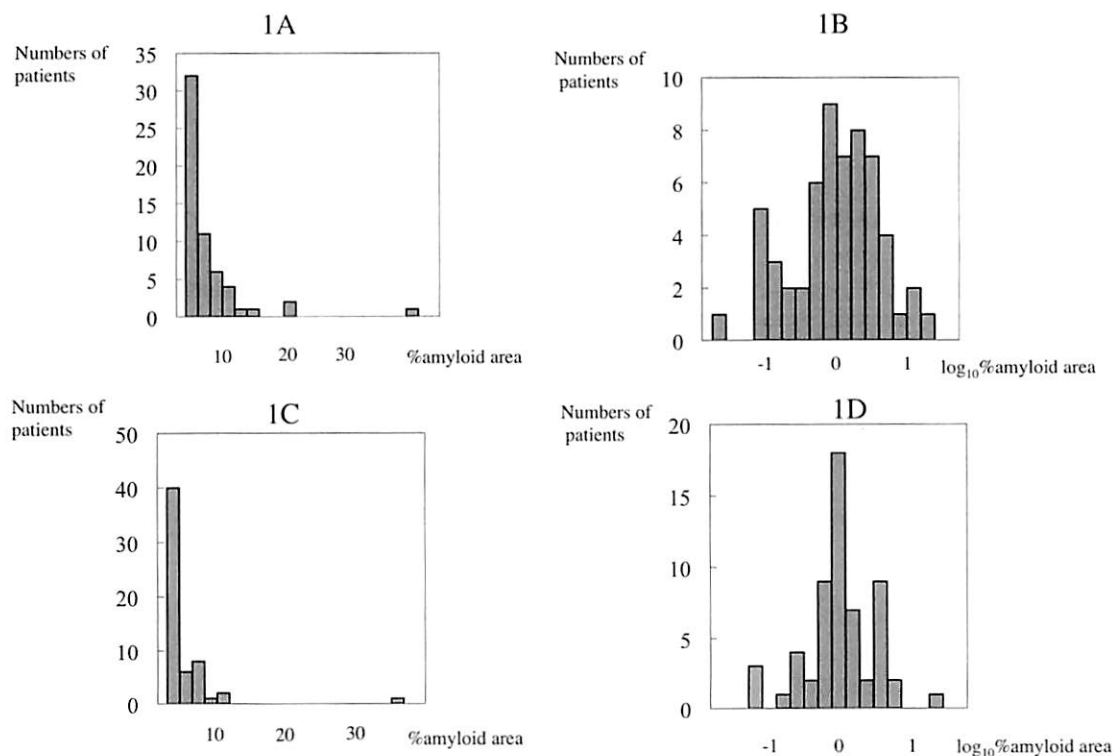


図1 標本におけるアミロイド沈着量の分布

AA, AL アミロイドーシス標本におけるアミロイド沈着量の分布を示す。

1A : AA アミロイドーシス症例の標本に占めるアミロイドの面積 (% amyloid area)。

1B : AA アミロイドーシス症例の標本に占めるアミロイドの面積を対数に変換 (log₁₀ % amyloid area)。

1C : AL アミロイドーシス症例の標本に占めるアミロイドの面積 (% amyloid area)。

1D : AL アミロイドーシス症例の標本に占めるアミロイドの面積を対数に変換 (log₁₀ % amyloid area)。

のそれぞれ上部、中部、下部の計 6 箇所から約 10mm × 10mm 程度の大きさの組織を切り出し光顕標本を作成した。作成した標本を画像として取り込んだ後、6 箇所をそれぞれ 4 分割し ImageJ を用いて標本に占めるアミロイドの割合を測定した。その結果、腎臓におけるアミロイド沈着は部位に関係なくほぼ均一に沈着していることが明らかになった³⁾。

従来アミロイドの糸球体への沈着が腎機能障害の主たる原因であると考えられていたが、糸球体沈着量をスコア化して解析を行なっても臨床データとは相関しないことが知られていた⁴⁾。尿細管におけるアミロイド沈着は従来評価の対象とされなかったが、腎臓ではアミロイドは生体適合性の良いタンパクであると考えられ、沈着量が多いほど障害大きいのではないかと推測し尿細管のアミロイドを含めた評価を行いアミロイドの沈着と腎機能障害の関連を検討した。

アミロイドの沈着量と腎機能障害は関連するか

RA に伴う反応性 AA アミロイドーシスと、AL アミロイドーシスによる腎機能障害で、各々 58 例の生検時の臨床データと生検標本のアミロイド沈着量との関連性を検討し、腎生検組織におけるアミロイドの沈着量が多いほど腎障害が強いことを明らかにしてきた⁵⁾⁶⁾。しかしこれら 2 つのアミロイドーシスの臨床像は異なるため、アミロイド沈着による腎障害も異なっていることが予測された。以上の点を明らかにするため、腎生検標本のアミロイド沈着量を測定し両アミロイドーシスの臨床指標に対する差異を検討した。対象は先に画像解析を行った、AA アミロイドーシス 58 例と AL アミロイドーシス 58 例を対象とした。これらの症例の腎組織に占めるアミロイドの沈着量を計測し腎組織に占めるアミロイドの割合と臨床的パラメーターを比較検討した。図 1A は AA アミロイドーシスにおける腎生検標本のアミロイド沈着量の検討であるがほとんどが 10 % 以下の沈着量であり、正規分布化する為に、これらの値を対数に変換し (図 1B) 検討した。AL アミロイドーシ

スにおいても腎生検標本のアミロイド沈着量の検討であるがほとんどが 10 % 以下の沈着量であり (図 1C)、これらの値を同様に対数に変換した (図 1D) データを検討した。表 1 に示すように対象者全体の傾向は AA アミロイドーシスでは有意に女性が多く貧血も多く認められた。血清クレアチニン濃度 (Cr) に差は認められなかったがクレアチニークリアランス (Ccr) と推算糸球体濾過量 (eGFR) は AA アミロイドーシスの方が有意に低下していた。また、AA と AL アミロイドーシスの腎組織はメサングウム増殖性腎炎、膜性腎症、菲薄基底膜病などのアミロイドーシス以外の組織変化の混在もあったが両疾患での有意差は認められなかった。腎組織のアミロイドの割合を対数にした Log10 % amyloid と各種パラメーターの関連は表 2 に示した。AA アミロイドーシスは Cr, Ccr, eGFR で有意な相関を認め、AL アミロイドーシスでは Cr, eGFR で有意な相関を認めた。性、年齢、log10 % amyloid 補正後のパラメーターの関連を検討した (表 3)。これは沈着量が同じであった場合の各種の指標との関連を示しているが、収縮期血圧は AA アミロイドーシスで有意に高く、貧血も AA アミロイドーシスで有意に強かった。尿蛋白量は AL アミロイドーシスでは有意に多かったが、Ccr, eGFR は AA アミロイドーシスで有意に低下していた。これらの臨床像の違いを踏まえ、糸球体、ボーマン囊、血管極へのアミロイド沈着を組織学的に検討した。糸球体への沈着は AL アミロイドーシスでは 100 % 沈着しており AA アミロイドーシスの約 80 % に比べて有意に高かった ($p < 0.01$)。ボーマン囊への沈着は両者とも約 30 % 程度でほぼ同等であった。糸球体の血管極への沈着は AA アミロイドーシスでは AL アミロイドーシスに比べて有意に高度な沈着を呈していた ($p < 0.01$)。糸球体へのアミロイド沈着の解析では、メサングウムの沈着の程度は有意差を認めなかったが、係蹄壁への沈着は AL アミロイドーシスが AA アミロイドーシスに比べて有意に高度に沈着していた ($p < 0.01$)。また沈着の形態では、AA は有意に結節状の沈着を示したが ($p < 0.01$)、内皮障害を示す Spicule の形成は

表1 AA アミロイドーシスと AL アミロイドーシスの患者背景因子

	AA (n=58)		AL (n=58)		P-value
Sex, male(%)	12	(20.7)	37	(60.7)	<0.001
Age (y.o.)	58.9	± 11.3	63.3	± 12.9	0.050
Log ₁₀ %Amyloid area	0.0984	± 0.698	0.0581	± 0.568	0.730
Systolic blood pressure (mmHg)	130.8	± 16.7	120.1	± 20.1	0.003
Diastolic blood pressure (mmHg)	75.8	± 11.2	72.0	± 10.2	0.067
RBC (X10 ⁴ /cumm)	369	± 75	422	± 66	0.002
Hematocrit (g/dl)	32.0	± 5.3	38.6	± 6.0	0.000
Urinary protein (g/day)	1.97	± 1.95	3.94	± 3.79	0.001
Creatinine clearance (ml/min/1.73m ²)	56.9	± 27.0	74.8	± 34.8	0.003
Blood urea nitrogen (mg/dl)	24.1	± 10.5	19.1	± 16.9	0.055
Serum creatinine (mg/dl)	1.22	± 0.90	1.06	± 1.23	0.425
Uric acid (mg/dl)	6.10	± 2.05	7.00	± 8.17	0.424
Total protein (g/dl)	7.50	± 10.1	5.06	± 0.9	0.063
Albumin (%)	39.7	± 38.5	38.0	± 21.8	0.774
Estimated glomerular filtration rate (ml/min/1.73m ²)	54.2	± 28.6	68.2	± 27.1	0.008

表2 Log10 % amyloid と各種パラメーターの関連

	AA		AL	
	r	P-value	r	P-value
Age (y.o.)	-0.293	0.027	0.186	0.155
Serum creatinine (mg/dl)	0.503	<0.001	0.341	0.007
Creatinine clearance (ml/min/1.73m ²)	-0.554	<0.001	-0.051	0.716
Blood urea nitrogen (mg/dl)	0.270	0.042	0.180	0.169
Uric acid (mg/dl)	0.242	0.069	0.067	0.624
Urinary protein (g/day)	0.153	0.286	-0.053	0.696
eGFR (ml/min/1.73m ²)	-0.555	<0.001	-0.369	0.004

eGFR: estimated glomerular filtration rate

AL では 100 % の症例に認められるのに対して AA アミロイドーシスでは約 50 % であり有意に高かった ($p < 0.01$). アミロイドの沈着パターンと腎障害との関係では, AA アミロイドーシスの腎組織では血管極への沈着が強く結節性病変も強いいため血流障害による Ccr の低下などを認める.

一方, 血管壁への沈着は弱いため血管領域での機能障害の部分が少ないと考えられ, タンパク尿が少ないという臨床上の特徴と一致していた. AL アミロイドーシスでは血管極への沈着が弱く結節性病変も少ないため, 血流障害が少なく Ccr は保たれている. しかし血管壁への沈着が強いため,

表 3 性, 年齢, log10 % amyloid area 補正後の各種パラメーターの関連

	AA			AL			P-value
	adjusted mean*	(95% CI)	adjusted mean*	(95% CI)	
Systolic blood pressure (mmHg)	129.9	(124.3 - 135.5)	120.3	(115.3 - 125.2)	0.015
Diastolic blood pressure (mmHg)	75.5	(72.3 - 78.7)	72.3	(69.4 - 75.1)	0.154
RBC ($\times 10^4$ /cumm)	383	(361 - 404)	419	(396 - 443)	0.031
Hematocrit (g/dl)	33.5	(31.8 - 35.2)	38.1	(36.3 - 40.0)	0.001
Urinary protein (g/day)	2.1	(1.27 - 3.02)	4.0	(3.20 - 4.75)	0.003
Creatinine clearance (ml/min/1.73m^2)	52.3	(43.9 - 60.7)	76.8	(68.9 - 84.6)	0.000
Blood urea nitrogen (mg/dl)	26.4	(22.6 - 30.2)	17.9	(14.5 - 21.4)	0.002
Serum creatinine (mg/dl)	1.31	(1.02 - 1.60)	1.02	(0.76 - 1.28)	0.163
Uric acid (mg/dl)	6.82	(5.11 - 8.53)	6.72	(5.14 - 8.30)	0.934
Total protein (g/dl)	7.37	(5.36 - 9.37)	5.03	(3.23 - 6.83)	0.100
Albumin (%)	39.0	(30.0 - 48.1)	37.8	(29.8 - 45.7)	0.843
Estimated glomerular filtration rate (ml/min/1.73m^2)	55.4	(48.7 - 62.1)	68.2	(62.2 - 74.2)	0.008

* Adjusted for age, sex, and log₁₀%amyloid area by using linear regression models.

血管領域での機能障害の部分が多くそれに伴いタンパク尿が多いと考えられた。

尿によるアミロイドの検出

AA アミロイドーシスにおけるアミロイドの沈着は糸球体, 尿細管, 間質, 血管などに沈着するが, 沈着パターンは早期より極少量が様々なところに沈着する場合や, 糸球体のみに沈着する場合など種々である。これらのアミロイドのうちボーマン嚢に進展している場合や, 尿細管に沈着したアミロイドの代謝は不明である。以上の点を明らかにするため, 尿中におけるアミロイドの検出の可能性を検討した。AA アミロイドーシスの尿を上清と沈渣に遠心分離し, 沈渣を可溶化したものを AA76 の N-terminal に反応する抗体でイムノブロットを行った。また沈渣の一部を用いてサイトスロットを作成し, Congo-red 染色, 抗 SAA 抗体での染色, 抗 SAA 抗体と腎組織の表面マーカーとの二重染色を行った。尿サンプルは, RA で胃十二指腸粘膜生検によりアミロイドの沈着が認

められた症例 16 例と認められなかった 5 症例で検討した。アミロイドの沈着が認められた 16 例中, イムノブロットで AA76 が陽性であったのは 9 例であり, うち 1 例は上清でも AA76 が陽性であった。陰性であった 7 例中 2 例は RA の治療として生物学的製剤が使用されていた。一方, 胃十二指腸粘膜生検でアミロイドの沈着が認められなかった 5 例は, 全例で AA76 の陽性者は認めず上清でも検出されなかった。

尿沈渣による腎アミロイドーシスの質的診断

尿沈渣の可溶化によるイムノブロットでアミロイドが検出されたことより, 沈渣中にアミロイドが直接検出できる可能性が示唆されたため, 尿沈渣のサイトスロットを作成し Congo-red 染色, 抗 SAA 抗体での染色, 抗 SAA 抗体と腎組織の表面マーカーとの二重染色を行った。イムノブロットで AA76 が陽性であった尿沈渣中に Congo-red 染色粒子を認め, 偏光で apple green を呈していた事によりアミロイドと確認された (図 2)。ま

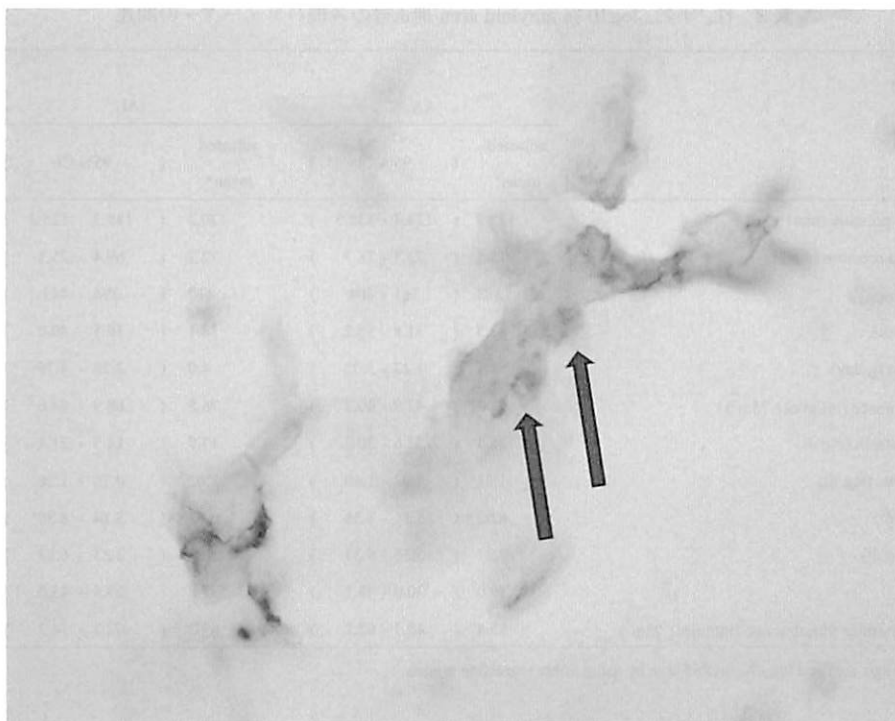


図2 尿沈渣中のアミロイド粒子

イムノプロットでAA76が陽性であった尿沈渣を用いサイトスプレットを作成しCongo-red染色を行った。沈渣中にCongo-red染色陽性の粒子を認め、偏光でapple greenを呈した(矢印)。

た抗SAA抗体による免疫染色でもアミロイド陽性の症例では沈渣が染色され、症例によっては抗メガリン抗体(近位尿細管と反応)、抗アクアポリン1抗体(近位尿細管と反応)、抗TAL抗体(遠位尿細管と反応)、抗アクアポリン2抗体(集合管と反応)、抗ポドカリキシン抗体(糸球体と反応)などとの二重染色でも抗SAA抗体と各種の腎組織のマーカーと同じ位置に確認される症例を認めた。以上より抗体認識部位へのアミロイドの沈着が示唆された。

おわりに

AAアミロイドーシスとALアミロイドーシスにおいて、腎組織へのアミロイドの沈着量と沈着

パターンを解析することにより腎機能障害の違いが明らかになった。また、反応性アミロイドーシスを合併したRA症例の尿中に、Common AA(AA76)サイズのSAAとintact SAAが検出可能であった。尿沈渣のサイトスプレットによる解析では、沈渣中にコンゴレッド染色陽性、偏光顕微鏡で緑色偏光を呈する沈渣が認められた。抗SAA抗体と尿細管のマーカーによる二重染色により症例によっては腎組織のアミロイドの局在診断が可能であると考えられる。

今後は腎生検標本と尿サンプルの同時採集による比較検討、治療などによるアミロイドの検出の有無の検討、臨床応用するためのポジショニングの設定が必要である。

謝 辞

本研究は JSPS 科研費 25461471 と有正基金の助成を受けたものです。ここに深謝致します。

稿を終えるにあたり、御指導を賜りました新潟大学大学院腎膠原病内科、成田一衛教授に深謝いたします。また、本研究の組織学的解析に関してご指導ご鞭撻を頂きました上越教育大学上野光博教授、新潟大学大学院腎膠原病内科、今井直史博士、伊藤山美博士に心より感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Lu J, Yu Y, Zhu I, Cheng Y and Sun PD: Structural mechanism of serum amyloid A-mediated inflammatory amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 5189 - 5194, 2014.
 - 2) Yamada T, Liepnieks JJ, Kluve - Beckerman B and 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 - 97, 1995.
 - 3) Kuroda T, Tanabe N, Sato S, Nakatsue T, Wada Y, Murakami S, Nakano M and Narita I: Distribution of amyloid deposits in the kidney of a patient with reactive amyloidosis associated with rheumatoid arthritis. *BMC Research Notes* 6: 231 - 235, 2013.
 - 4) Hopfer H, Wiech T and Mihatsch MJ: Renal amyloidosis revisited: amyloid distribution, dynamics and biochemical type. *Nephrol Dial Transplant*. 2011, 26: 2877 - 2884, 2011.
 - 5) Kuroda T, Tanabe N, Kobayashi D, Wada Y, Murakami S, Nakano M and Narita I: Significant association between renal function and area of amyloid deposition in kidney biopsy specimens in reactive amyloidosis associated with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 32: 3155 - 3162, 2012.
 - 6) Kuroda T, Tanabe N, Kobayashi D, Wada Y, Murakami S, Nakano M and Narita I: Significant association between renal function and amyloid - positive area in renal biopsy specimens in AL amyloidosis. *BMC Nephrol*. 2012 Sep 24; 13: 118 - 124, 2012.
-