

## 考 案

脂漏性角化症に沈着するアミロイドの頻度は325中39例(12%)であった。これは、Olsenら<sup>3)</sup>が報告する18.4%にくらべてやや頻度は低かった。また、これまでに報告された基底細胞癌におけるアミロイド合併頻度<sup>3,6)</sup>と比べても低いものであった。しかし、なぜ腫瘍の種類によりアミロイドの沈着の頻度に違いがあるかについては、今後の課題である。

免疫染色の結果ではPCA、SCAの両者において同じ3種類の抗CK抗体で陽性であったが、その陽性頻度は異なるものであった。この3種類の抗CK抗体はすべて、表皮由来のCKを認識する抗体であり、沈着するアミロイドは表皮ケラチン由来であることが示唆された。陽性であった抗CK抗体のうち、34βE12、MNF116は両者ともに陽性頻度が高いが、DE-K10についてはPCAでは5.3%、脂漏性角化症では47.1%に陽性であり、PCAは脂漏性角化症に沈着するアミロイドとは異なり、DE-K10が認識するエピトープを含んでいない頻度が高かった。

## 結 論

1. 脂漏性角化症の325例中39例(12%)にアミロイド沈着を認めた。
2. 脂漏性角化症に沈着するアミロイドとPCAのアミロイドの前駆体蛋白はともに表皮CK由来であることが示唆された。
3. PCAは脂漏性角化症に沈着するアミロイドとは異なり、DE-K10が認識するエピトープを含んでいない頻度が高かった。

## 文 献

- 1) Hashimoto K, Kobayashi H. Histogenesis of amyloid in the skin. *Am J Dermatol* 1980;2:165-171.
- 2) Hashimoto K. Progress on cutaneous amyloidoses. *J Invest Dermatol* 1984;82:1-3.
- 3) Olsen KE, Westermarck P. Amyloid in basal cell carcinoma and seborrheic keratosis. *Acta Derm Venerol(Stockh)* 1994;74:273-275.
- 4) Looi LM. Localized amyloidosis in basal cell carcinoma. *Cancer* 1983;52:1833-1836.
- 5) Weedon D, Shand E. Amyloid in basal cell

carcinoma. *Br J Dermatol* 1979;101:141-146.

- 6) Satti MB, Azzopardi JG. Amyloid deposits in Basal cell carcinoma of the skin. *J Am Acad Dermatol* 1990;22:1082-1087.

An immunohistochemical study of cytokeratins in primary cutaneous amyloidosis and secondary localized amyloidosis associated with seborrheic keratosis

by

Tokuhiro ISHIHARA\*

Kayo INOUE\*\*, Yoshinobu HOSHII\*, Mihoko SETOYUCHI\*\*\*, Hiroo KAWANO\*

from

\*First Department of Pathology, Yamaguchi University School of Medicine

\*\*Department of Dermatology, Yamaguchi University School of Medicine

\*\*\*Department of Surgical Pathology, Yamaguchi University School of Medicine

We investigated the frequency of amyloid deposits in seborrheic keratosis (SK). Furthermore the derivation of amyloid deposits in primary cutaneous amyloidosis(PCA) and SK were investigated by immunohistochemical staining using eleven series of anti-cytokeratin(CK) monoclonal antibodies.

Amyloid deposits were found in 39 out of 325(12%) cases in SK.

Amyloid deposits in PCA and SK were both positively stained with three antibodies, but the positive occurrence of each were different; in PCA anti-CK10 antibody stained in 1 out of 19 cases(5.3%) , anti-CK1,5,10,14 antibody in all cases(100%) and anti-CK5,6,8,17 antibody in 5 out of 19 cases(26.3%).

In amyloid associated with SK, anti-CK10 antibody stained in 16 out of 34 cases(47.1%), anti-CK1,5,10,14 antibody in 31 out of 37 cases(83.8%) and anti-CK5,6,8,17 antibody in 30 out of 33 cases(90.9%) .

From the data, it is suggested that amyloid deposits both in PCA and SK may derive from epidermal keratins. Furthermore, compared to PCA the frequency of the rate CK10 epitope-containing was higher in amyloid associated with SK.

アミロイドーシスの共存蛋白に関する病理組織学的検討  
—ヒトおよびマウスのアミロイドーシスにおける amyloid P  
component, apolipoprotein E および ubiquitin の検討—

研究者 石原 得 博\* 河野 裕 夫\* 崔 丹\*  
星井 嘉 信\* 高橋 睦 夫\*\* 岩田 隆 子\*\*\*

はじめに

近年、アミロイド線維形成におけるアミロイド共存蛋白 amyloid P component (AP), apolipoprotein E (Apo E)あるいはubiquitin (Ub)の関与が注目をあびている<sup>1,2)</sup>。そこで、これらの共存蛋白の分布とその役割を検討する目的で、ヒトALおよびAAアミロイドーシスとマウスの実験的AAアミロイドーシスについて各々の共存蛋白に対する抗体を用いて免疫組織化学的検討を行った。

材料および方法

ヒトの例は、ヒトALおよびAAアミロイドーシスの剖検例各々17例の肝臓と脾臓を検索対象とした。マウスのAAアミロイドーシスは10%カゼイン0.5mlを1日1回連日皮下投与して発症させた。カゼイン投与開始から4, 6, 8, 12, 16週後にマウスを経時的に屠殺し、肝臓と脾臓を摘出した。

免疫組織化学的検索は、rabbit anti-AP (Calbiochem), rabbit anti-mouse AP (Calbiochem), goat anti-Apo E (Chemicon), rabbit anti-Ub (Dako A/S)を一次抗体としてLSAB法(Dako)で行った。

結 果

ヒトでは、APおよびApo EはAA, ALのアミロイドのタイプにかかわらず、全例の肝臓脾臓のアミロイドに均質に強陽性であった (Figure 1)。

Ubはヒトの肝、脾で各々22例陽性であったが、約1/3の症例のアミロイドが陰性であった (Table 1)。ヒト肝実質型の症例では、Disse腔のアミロイドで肝細胞よりも線状にUbは陽性であった (AA: 1/1, AL: 8/9, Figure 1)。脾臓の白脾髄のアミロイドでは、Ubは点状あるいは斑状に弱く陽性であった (Figure 2)。肝血管壁のアミロイドでは、顆粒状あるいは点状に少量のUb陽性を認めた。

マウスでは、4週目からアミロイドの沈着を認めた。最初は脾の濾胞周辺帯と肝のDisse腔に認め、その後、経時的に増加。肝ではDisse腔のアミロイドは沈着量が多くなると小結節状になってきた。これらはすべて抗マウスAA抗体陽性であった。

Table 1 Materials

human
AL: 17 cases
AA: 17 cases
15 males and 19 female
Age: mean = 63.8 y.o. (30 - 86 y.o.)
mouse
Amyloid induction:
0.5 ml of 10 % casein : daily injection (s.c.)
Sacrifice after 4, 6, 8, 12 and 16 weeks
(n = 5 per group)

\* 山口大学医学部病理学第一講座

\*\* 同 附属病院病理部

\*\*\* 同 医療短期大学部

Table 2 Results of ubiquitin immunoreactivity for amyloid deposits in human amyloidosis.

Amyloid protein	Classification	Liver	Spleen
AL	vascular	2/8	0/4
	parenchymal	8/9	8/12
AA	vascular	11/16	1/3
	parenchymal	1/1	13/14
Total		22/34	22/33

APおよびApoEは経過中、全てのアミロイドに陽性で、APは4週で、AAと同様にやや不均一に染まるが、6～16週では均質に陽性となった。ApoEは4週で、染まりの強さも分布もAAより不均一であり、8週以降は均質に染まってきた。しかし、さらに16週の脾臓の濾胞周辺帯のアミロイドでは染まりが不均一になり、周辺部より中央部が強く反応した。

Ubは、肝では4週目から認められたDisse腔およびグリソン鞘の血管壁の少量のアミロイドにも陽性で、全てのマウスでDisse腔のアミロイドに陽性であったが、惹起注射後経時的にUbの反応が強くなる傾向があった。ヒトの場合と同様に肝のアミロイドでは、Ubは線状に陽性となった。

マウス脾臓では、何れの時期も沈着したアミロイドにもUb陽性所見は得られなかった。

### 考 察

Ubは症例によってはアミロイド内に認められない例もあり、また、Apo Eにおいてはアミロイド内での分布が不均一であったことなどより、これらの共存蛋白はアミロイド線維の形成自体には直接関与していないことが示唆された。しかしながら、AP、Apo E、Ubはアミロイド沈着の進展に関わっているとの報告もあり、その役割に関してはさらなる検討が必要である。

### 文 献

- 1) Shirahama T, Skinner M, Cohen AS. Immunocytochemical identification of amyloid in formalin-fixed paraffin sections. *Histochemistry* 1981; 72(2): 161-171.
- 2) Yamada T, Kakihara T, Gejyo F, Okada M. A

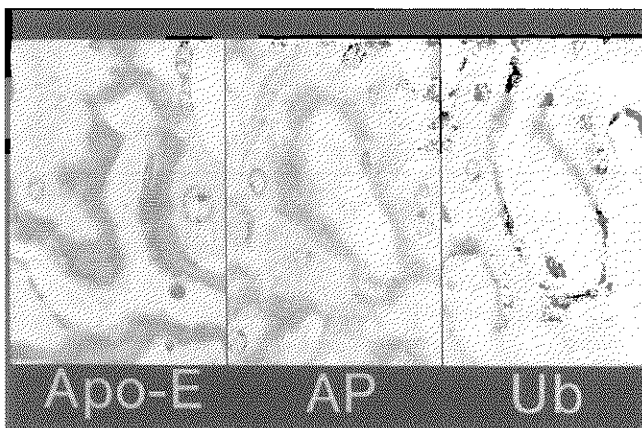


Figure.1 AL Amyloidosis, liver.

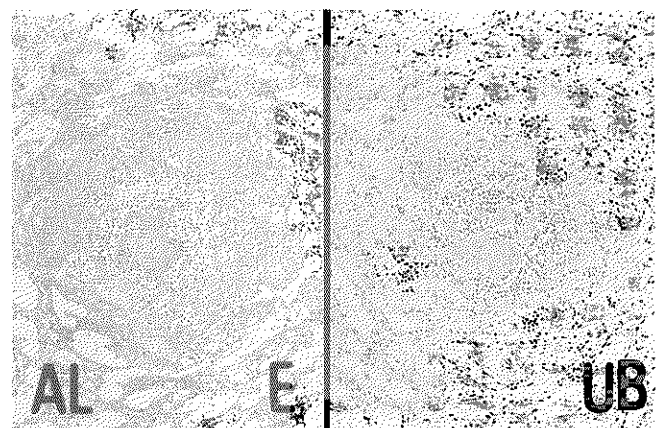


Figure.2 AL Amyloidosis, spleen.

monoclonal antibody recognizing apolipoprotein E peptides in systemic amyloid deposits. *Ann Clin Lab Sci* 1994;24(3):243-249.

- 3) Okada M, Miyazaki S, Hirasawa Y. Increase in plasma concentration of ubiquitin in dialysis patients: possible involvement in beta 2-microglobulin amyloidosis. *Clin Chim Acta* 1993;220(2):135-144.

# Immunohistochemical studies of amyloid associated proteins in human and murine amyloidosis

by

Tokuhiro ISHIHARA\*

Hiroo KAWANO\*, Dan CUI\*, Yoshinobu HOSHII\*,

Mutsuo TAKAHASHI\*\*, Takako IWATA\*\*\*

from

\*First Department of Pathology, Yamaguchi University School of Medicine

\*\*Department of Surgical Pathology, Yamaguchi University Hospital

\*\*\*The School of Allied Health Sciences, Yamaguchi University

Amyloid P component (AP) and apolipoprotein E (Apo E), which are known to be minor constituents of amyloid deposits, commonly are associated with almost all types of amyloid deposits. In this study, the distribution of AP-, Apo E- and ubiquitin (Ub)-immunoreactivity (IR) in amyloid deposits in the liver and spleen of human systemic amyloidosis (34 autopsy cases: 17 immunoglobulin light chain derived, 17 amyloid A protein derived) and experimental murine amyloidosis is examined using an immunohistochemical technique. In human cases, all of the amyloid deposits examined showed colocalization of AP- and Apo E- IR with individual amyloid proteins. In experimental amyloidosis, AP-IR of amyloid deposits in the liver and spleen and Apo E-IR in the liver were seen uniformly throughout this experiment. In contrast, Apo E-IR in the spleen was not uniform at the phase of amyloid deposition. At 4 weeks and at 16 weeks after casein injection, Apo E-IR was unevenly distributed in amyloid deposits in the perifollicular area; however, from 6 to 12 weeks it was seen to be uniform. Ubiquitin-IR of amyloid deposits in human cases was seen in 22 of 34 livers and in 22 of 33 spleens. In experimental amyloidosis, Ub-IR of amyloid deposits was demonstrated in the space of Disse in all mice examined, and there appeared to be a gradual increase in intensity with the amount of amyloid deposition. However, in the spleen, amyloid deposits did not react with anti-Ub antibody in any phase of amyloid induction. These results suggest that Apo E and Ub are not always associated with the process of amyloid deposition and may appear after the deposition.

## ユビキチンのamyloid enhancing factor (AEF) 効果についての 病理学的研究

研究者 横 田 忠 明\* 石 原 得 博\*\* 河 野 裕 夫\*\*  
権 藤 俊 一\*\* 星 井 嘉 信\*\* 瀬 戸 口 美 保 子\*\*\*  
高 橋 睦 夫\*\*\*

### はじめに

実験的マウス・アミロイドーシスでアミロイド沈着臓器からの抽出物を投与して発症実験を行うとアミロイド沈着までの期間（前アミロイド期）が著しく短縮する。抽出物中に存在するこのような作用をもつ物質をAmyloid enhancing factor (AEF) と呼びその本体の解明が試みられてきた。AEFはアミロイド線維やその前駆蛋白とは免疫学的に異なり、アミロイド線維を含まないとされる抽出物中に存在する。Hol<sup>1)</sup>らはこのAEFをtissue AEF (tAEF)と呼び、これまで種々の物質が推定されてきた。一方、アミロイド線維の抽出物中にもAEF活性があり、このAEFはアミロイド線維の抽出過程で線維とは切り離すことができず、Niewold<sup>2)</sup>らはアミロイド線維と関係したAEFをfibril AEF (fAEF)と呼んで区別している。Ali-Khan一派らはアルツハイマー病患者の脳組織および実験的マウス・アミロイドーシスの脾臓から抽出したユビキチンにAEF活性があり、ユビキチンがtAEFと報告した<sup>3,4)</sup>。しかし、未だ彼等の施設以外からユビキチンにAEF活性があったとの確認の報告はなく、また、世界で幾つかの施設がtAEFの解明を試みていたが彼等の報告以来、tAEFに関する報告はほとんどない。そこで本当にユビキチン

表1 溶出物のAEF活性

200 $\mu$ g / 匹	0 / 5
400 $\mu$ g / 匹	2 / 3
粗製AEF	6 / 6

アミロイド陽性数/総マウス数

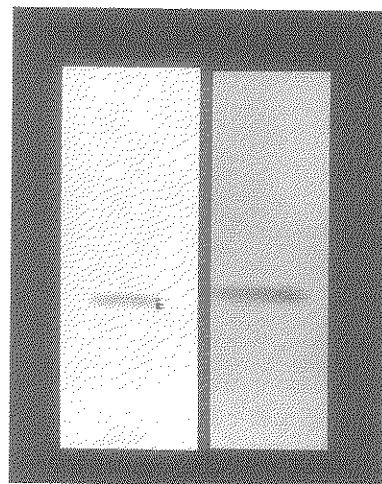


図1：左、溶出物のSDS-PAGE。一本のバンドが認められる。右、そのウエスタンブロットで、バンドは抗ユビキチン抗体と陽性に反応している。

\* 社会保険 小倉記念病院 病理科

\*\* 山口大学医学部病理学第一講座

\*\*\* 山口大学医学部附属病院病理部

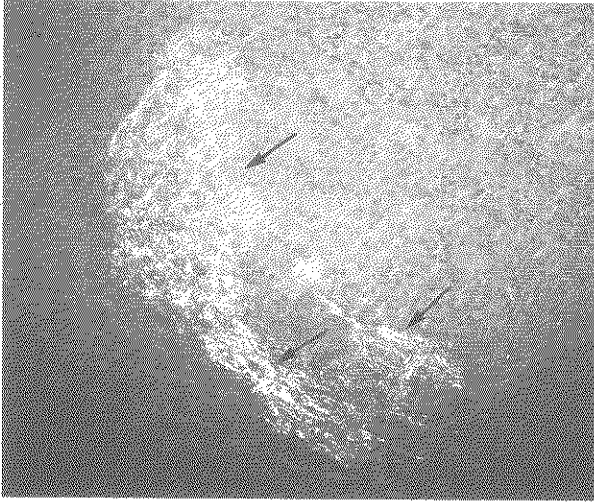


図2：400 $\mu$ gの溶出物を注射したマウスの脾臓をスライドガラスですりつぶし、コンゴウ・レッド染色後、偏光顕微鏡で観察したもの。緑色の複屈折を示すアミロイドの沈着が見られる（矢印）。

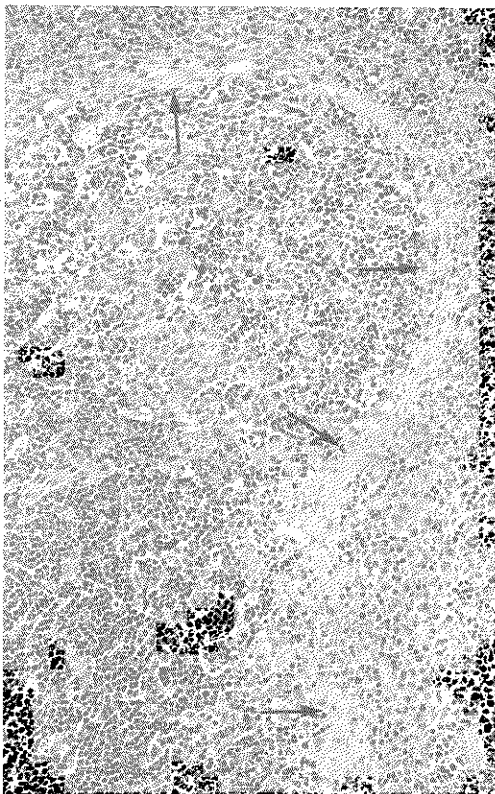


図3：400 $\mu$ gの溶出物を注射したマウスの脾臓。ヘマトキシリン・エオシン染色。濾胞周辺帯にアミロイド沈着を認める（矢印）。

にAEF活性があるかどうかを明らかにする必要があると考え、昨年度は粗製AEF中のユビキチンを抗ユビキチン抗体で吸収しAEF活性が消失するかどうかを調べた。しかし、完全にはユビキチンを吸収できずユビキチンのAEF活性の有無については断定し得なかった<sup>5)</sup>。本年度はユビキチンそのものを抽出して検討した結果について報告する。

## 方 法

CNBr-activated Sepharose 4Bゲル(Pharmacia Biotech)に抗ユビキチン抗体 (DAKOおよび Novocastra Lab)を結合させたカラムを作成した。アミロイドーシス惹起処置後摘出したマウス脾臓を燐酸塩緩衝液中でホモジネートし、その遠沈上清を上記カラムに流し、洗浄後、カラム吸着物を溶出した。溶出には0.2Mグリシン塩酸緩衝液、pH2.5を使用し、溶出後はトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンでできるだけ速やかに中和した。

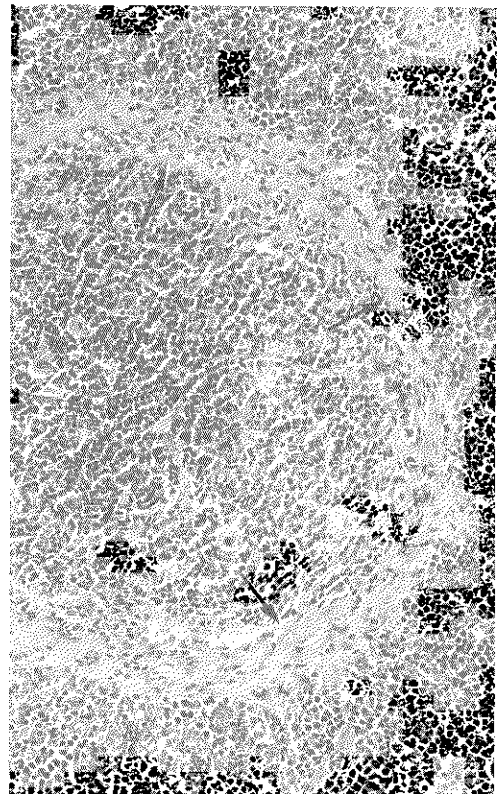


図4：粗製AEFを注射した対照マウス脾臓。ヘマトキシリン・エオシン染色。濾胞周辺帯にアミロイド沈着を認める（矢印）。沈着量は400 $\mu$ gの溶出物を注射したマウスとほぼ同程度である。



## 文 献

- 1) Hol PR, van Andel ACJ, van Ederen AM, Draayer J, Gruys E. Amyloid enhancing factor in hamster. *Br J Exp Pathol* 1985;66:689-697.
- 2) Niewold ThA, Hol PR, van Andel ACJ, Lutz ETG, Gruys E. Enhancement of amyloid induction by amyloid fibril fragments in hamster. *Lab Invest* 1987;56:544-549.
- 3) Alizadeh-Khiavi K, Normand J, Chronopoulos S, Ali-Khan Z. Alzheimer's disease brain-derived ubiquitin has amyloid-enhancing factor activity: behavior of ubiquitin during accelerated amyloidogenesis. *Acta Neuropathol* 1991;81:280-286.
- 4) Alizadeh-Khiavi K, Normand J, Chronopoulos S, Ali A, Ali-Khan Z. Amyloid enhancing factor activity is associated with ubiquitin. *Virchow Archiv A Pathol Anat* 1992;420:139-148.
- 5) 横田忠明、石原得博、権藤俊一、他. Amyloid enhancing factor (AEF) の病理学的研究—ユビキチンのAEF効果について— 厚生省特定疾患 代謝系疾患調査研究班アミロイドーシス分科会 1997年度研究報告書 1998;23-25.

溶出物をSDS-PAGE後、ウエスタンブロット法によりPVDF膜に転写し、抗ユビキチン抗体で免疫組織化学的に染色した。200  $\mu$ gおよび400  $\mu$ gの溶出物を10mM塩化カルシウム添加生理食塩水に溶かし、それぞれ5匹および3匹のマウス腹腔内に注射、さらに0.5mlのカゼイン・アジュバント(10%カゼインとcomplete Freund's adjuvantの当量懸濁液)を皮下に注射して4日目に屠殺、脾臓のアミロイド沈着を調べた。

対照には粗製AEFを注射後、同様の処置を行ったマウスを用いた。

## 結 果

溶出物のSDS-PAGEのクマシーブルー染色では1本のバンドが見られ、PVDF膜への転写物は抗ユビキチン抗体と陽性に反応した(図1)。

200  $\mu$ gの溶出物を注射した5匹のマウスにはいずれもアミロイドの沈着は認めなかった。400  $\mu$ gの溶出物を注射したマウスでは3匹中の2匹の脾濾胞周辺帯にコンゴー・レッドで橙赤色に染色され、偏光顕微鏡下で緑色の複屈折を示したアミロイドの沈着を認めた(図2,3)。

粗製AEFを注射した対照の6匹のマウスの全てにアミロイド沈着を認めた(図4)。

これらの結果を表1に纏めた。

## 考 察

200  $\mu$ gの溶出物の投与ではAEF効果は認めなかったが、400  $\mu$ gの投与では3匹中の2匹のマウス脾臓にアミロイドの沈着を認め、また、沈着量は対照マウスと同程度で、溶出物中にはAEF活性が存在すると思われた。カラム溶出物のSDS-PAGEでは1本のバンドが見られ、そのウエスタンブロットの転写物は抗ユビキチン抗体と陽性に反応した。このことから溶出物はユビキチンと考えられた。得られた溶出物の収量との関係で実験動物の匹数が少なく、また、粗製AEFでは蛋白量として200  $\mu$ gを投与するとAEF効果を示すのに対して、溶出物の200  $\mu$ g投与ではAEF効果がなかったことに疑問は残ったが、今回の実験結果はユビキチンにAEF活性があると判断してよい結果と思われた。

## Pathological examination of amyloid enhancing factor activity of ubiquitin

by

Tadaaki YOKOTA\*

Tokuhiro ISHIHARA\*\*, Hiroo KAWANO\*\*, Toshikazu GONDO\*\*, Yoshinobu HOSHII\*\*,  
Mihoko SETOGUCHI\*\*\*, Mutsuo TAKAHASHI\*\*\*

from

\*Department of Pathology, Kokura Memorial Hospital

\*\*First Department of Pathology, Yamaguchi University School of Medicine

\*\*\*Department of Surgical Pathology, Yamaguchi University School of Medicine

Ubiquitin (UB) was obtained from spleens of mice with an amyloidogenic stimulation by the method of immunoaffinity purification using CNBr- activated Sepharose 4B gel conjugated to an anti-UB antibody. A single band was detected on SDS-PAGE of the UB and the band positively reacted to the anti-UB antibody by Western blot analysis. AEF activity of the UB was tested by intraperitoneal injections of 200  $\mu$ g and 400  $\mu$ g UB/mouse. Although amyloid deposition was not detected in spleens of five mice which were injected 200  $\mu$ g UB, amyloid deposits were observed in spleens of two out of three mice which were injected 400  $\mu$ g UB. These findings suggested that UB might have AEF activity.

## マウス老化アミロイドーシスの伝播機構

研究者	樋口 京一*	森	政之*	千葉 卓哉*
	中村 明宏*	傅	麗*	松下 隆壽**
	小岸 久美子**	夏	晨**	細川 昌則**

## はじめに

マウス老化アミロイドーシスでは血清高密度リポ蛋白質(HDL)のアポ蛋白質であるapoA-IIがアミロイド線維(AApoAII)として全身に沈着する<sup>1)</sup>。マウスapoA-IIには少なくとも3種のvariants (type A,B,C)が知られており, このうちC型のapoA-IIをホモに持つマウスがもっとも高頻度かつ若齢からアミロイドーシスを発症し, B型をホモに持つマウスではほとんど発症しない<sup>2)</sup>。我々は微量のアミロイド線維(AApoAII)をマウスに静注することによって, アミロイド沈着を著しく促進できることを示してきた<sup>3)</sup>。これはAApoAIIが*in vivo*で線維核(seed)として働き, アミロイド線維の核形成反応(nucleation phase)をshort cutするためであると考えられる。プリオン病ではアミロイド線維(PrP<sup>Sc</sup>)の消化管を通じた感染が示唆されている<sup>4)</sup>。今回AApoAIIアミロイド線維をマウスの消化管内に投与し消化管経由のアミロイド線維による感染の可能性を解析した。

## 材料及び方法

## 1. 動物

加齢にともない重篤なアミロイド沈着を引き起こすC型apoA-II遺伝子(*Apoa 2*<sup>c</sup>)をSAMR1マウスに導入したコンジェニックマウスR1.P1-*Apoa 2*<sup>c</sup>は

京都大学再生医科学研究所において兄妹交配で維持され<sup>5)</sup>, コンベンショナルコンディションで飼育された。

## 2. アミロイド線維の胃内投与

マウス老化アミロイド線維(AApoAII)は19ヶ月齢のR1.P1-*Apoa 2*<sup>c</sup>マウスの肝臓より水抽出画分として分離した後, 超遠心分離法, スクロース密度勾配法で精製した<sup>6)</sup>。AApoAIIは凍結することなく1.0 mg/mlの濃度で蒸留水にsuspendした。氷中で冷却しながらソニケーターでアミロイド線維の切断と蒸留水中への可溶化(30秒, 10回)を行い0.1 mg/mlの濃度へ希釈後すぐに, 0.2ml(20 μg)を胃ゾンデを用いて2ヶ月齢雄R1.P1-*Apoa 2*<sup>c</sup>マウスに5回/週, 投与した。初回投与後2, 3, 4ヶ月後に屠殺し, 全身のアミロイド沈着をコンゴレッド染色で調べた。

## 3. アミロイド線維の飲水中への投与

ソニケートしたAApoAIIアミロイド線維(2.5 mg)を50mlの蒸留水に希釈し, 5匹の2ヶ月齢雄R1.P1-*Apoa 2*<sup>c</sup>マウスに自由摂取させた。アミロイド線維を含んだ蒸留水を全量摂取するのを確認したのち, 水道水にきり変えた。投与後1, 2, 4ヶ月後に屠殺し, アミロイドの沈着を調べた。

## 4. 同一ケージ内飼育による伝播の検証

15~20ヶ月齢のR1.P1-*Apoa 2*<sup>c</sup>雌マウス2匹を2ヶ月齢のR1.P1-*Apoa 2*<sup>c</sup>雌マウス5~7匹と同一のケージ内で飼育し, 3ヶ月後に屠殺してアミロイド沈着を観察した。コントロールとしては15~20

\*信州大学医学部加齢適応研究センター脈管病態分野

\*\*京都大学再生医科学研究所再生誘導研究分野

ヶ月齢のSAMR1(B型apoA-II遺伝子を持ちアミロイドーシスはほとんど発症しない)を2ヶ月齢のR1.P1-*Apoa 2*マウスと同一のケージ内で飼育し、3ヶ月後に屠殺した。

### 結 果

アミロイド線維の胃内投与：ソニケーターで細断したアミロイド線維(AApoAII)20 $\mu$ gを2ヶ月齢のR1.P1-*Apoa 2*マウスの胃内にゾンデを用いて5日間連続して投与した。コントロールとしては生理的食塩水を同量(0.2ml $\times$ 5回)投与した。投与後2ヶ月で屠殺したマウス13匹(13/13)全てにアミロイド沈着が観察された(図1)。投与後3ヶ月、4ヶ月に屠殺したマウスではアミロイド沈着の程度(Amyloid Index: AI)が増大した。アミロイド沈着は小腸粘膜固有層から沈着が始まり、続いて胃粘膜、舌乳頭へと沈着が進行した。肝臓、脾臓への沈着は投与後、4ヶ月で一部のマウスのみで観察された。アミロイド沈着の程度はAApoAIIを静脈投与した場合<sup>9)</sup>と比較すると有意に軽度で(投与3ヶ月で胃内投与で平均AIが0.79に対して、静脈内投与は2.70)、沈着臓器も小腸粘膜への沈着が顕著であった。一方生理的食塩水を投与したマウスではアミロイドの沈着は一匹を除いて観察されなかった(1/18)。

アミロイド線維の飲水中への投与：2ヶ月齢のR1.P1-*Apoa 2*マウスにアミロイド線維(AApoAII)を含んだ蒸留水を与えた。投与後1ヶ月ではアミロイド沈着は観察されなかったが2ヶ月では全マウス(5/5)の小腸粘膜固有層に沈着が観察され、4ヶ月ではアミロイド沈着が舌(5/5)、胃粘膜(2/2)、肝臓(2/5)へと拡大した。一方蒸留水を与えたマウスでは投与後、4ヶ月で一部のマウス(2/5)で小腸等に微量な沈着が観察された。

同一ケージ内飼育による伝播の検証：高齢(15~20ヶ月齢)のR1.P1-*Apoa 2*マウスを2ヶ月齢のR1.P1-*Apoa 2*マウスと同一ケージ内で3ヶ月飼育し、アミロイド沈着を観察した。同時に同一月齢の高齢SAMR1マウスと2ヶ月齢のR1.P1-*Apoa 2*マウスを同一ケージ内で飼育し対照群とした。全部で5回実験を繰り返し、それぞれの実験で高齢のR1.P1-*Apoa 2*マウスでは重篤なアミロイド沈着

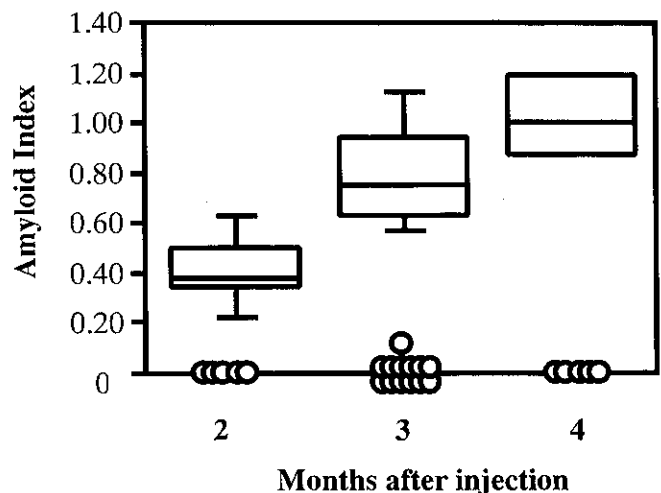


図1 胃内AApoAIIアミロイド線維投与マウスにおけるアミロイド沈着

箱ヒゲ図はAApoAII投与マウス群、○は蒸留水投与マウスを表す。Amyloid Indexは肝、脾、胃、小腸、皮膚、心、舌、腎の各臓器に沈着したAApoAIIの沈着程度に0~4の評点を与え、各個体で平均値を求めた。

を、SAMR1マウスではアミロイド沈着が無いことを確認した。高齢のR1.P1-*Apoa 2*マウスと同居した若齢R1.P1-*Apoa 2*マウスではアミロイド沈着が観察されたが(24/27)、沈着程度は胃内投与群と比較してもさらに軽度であり、小腸粘膜内に留まる個体が多かった。SAMR1と同居したマウスでは一匹のみに沈着が観察された(1/28)。

### 考 察

核構造依存性重合反応(nuclear-dependent-polymerization)モデルはクロイツフェルトヤコブ病(CJD)や狂牛病(BSE)などのプリオン病やアルツハイマー病のA $\beta$ 蛋白質で提唱され<sup>9,10)</sup>、核形成は熱力学的に非常に起こり難い反応で、その長いlag timeは大部分のアミロイドーシスが人生の中・後期で発症することを説明できると考えられている。これに対し線維伸長反応は迅速に進行し、アミロイド線維核はアミロイド蛋白質と接触しその構造を変換し $\beta$ 構造に富むアミロイド線維を形成させると考えられている。我々はマウス老化アミロイドーシスを用いてこのモデルが試験管内でも、生体内でも成り立つことを示してきた<sup>3,11)</sup>。

プリオン病では消化管を通したプリオン線維の伝播が示唆されているが、外部から侵入したプリオン核(PrP<sup>Sc</sup>)による宿主プリオン蛋白(PrP<sup>C</sup>)の構造変換による重合(線維伸長)反応はプリオン病伝播の機構を合理的に説明できるとされ<sup>12,13)</sup>、消化管経由のBSEのヒトへの感染が示唆されている<sup>4,5)</sup>。しかしながらプリオン以外のアミロイドーシスでの消化管を経由した伝播は報告されていない。今回我々のAApoAIIの伝播が最初の報告であると思われる、今後アミロイドーシスの発症機構を考える上で重要な発見であると考え。

### 結 語

マウス老化アミロイド線維核(AApoAII)が消化管を経由してマウス個体内に侵入しアミロイド蛋白(apoA-II)の構造変換を引き起こし、アミロイド沈着を誘導、促進するという、「蛋白質構造伝播仮説」が実証された。

### 文 献

- 1) Higuchi K, Yonezu T, Kogishi K, et al. Purification and characterization of a senile amyloid-related antigenic substance (apoSASSAM) from mouse serum: apoSASSAM is an apoA-II apolipoprotein of mouse high density lipoproteins. *J Biol Chem* 1986;261: 12834-12840.
- 2) Higuchi K, Kitagawa K, Naiki H, et al. Polymorphism of apolipoprotein A-II (apoA-II) among inbred strains of mice. Relationship between the molecular type of apoA-II and mouse senile amyloidosis. *Biochem J* 1991;279: 427-433.
- 3) Higuchi K, Kogishi K, Wang J, et al. Fibrilization in mouse senile amyloidosis is fibril conformation dependent. *Lab Invest* 1998;78:(in press).
- 4) Prusiner SB. Prion disease and BSE crisis. *Science* 1997;278: 245-251.
- 5) Collinge J, Sidle KCL, Meads J, et al. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* 1996;383: 685-690.
- 6) Higuchi K, Kitado H, Kitagawa K, et al. Development of congenic strains of mice carrying amyloidogenic apolipoprotein A-II (*Apoa 2<sup>c</sup>*). *Apoa 2<sup>c</sup>* reduces the plasma level and the size of high density lipoprotein. *FEBS Lett* 1993;317: 207-210.
- 7) Higuchi K, Wang J, Kitagawa K, et al. Accelerated senile amyloidosis induced by amyloidogenic apoA-II gene shortens the life span of mice but does not accelerate the rate of senescence. *J Gerontol* 1996;51: B295-B302.
- 8) Naiki H, Higuchi K, Nakakuki K, Takeda T. Kinetic analysis of amyloid fibril polymerization in vitro [published erratum appears in *Lab Invest* 1992;67: 652]. *Lab Invest* 1991;65: 104-110.
- 9) Jarrett JT, Lansbury PTJr. Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* 1993;73: 1055-1058.
- 10) Kelly JW, Lansbury PTJr. A chemical approach to elucidate the mechanism of transthyretin and  $\beta$ -protein amyloid fibril formation. *Amyloid* 1994;1: 186-205.
- 11) Naiki H, Higuchi K, Nakakuki K, Takeda T. Kinetic analysis of amyloid fibril polymerization in vitro. *Lab Invest* 1991;65: 104-110.
- 12) Kocisko DA, Come JH, Priola SA, et al. Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature* 1994;370: 471-474.
- 13) Bessen RA, Kocisko DA, Raymond GJ, Nandan S, Lansbury PT, Caughey B. Non-genetic propagation of strain-specific properties of scrapie prion protein. *Nature* 1995;375: 698-700.

## Transmission of Mouse Senile Amyloidosis

by

Keiichi HIGUCHI\*

Masayuki MORI\*, Takuya CHIBA\*, Akihiro NAKAMURA\*, Fu LI\*,  
Takatoshi MATSUSHITA\*\*, Kumiko KOGISHI\*\*, Chen XIA\*\*, Masanori HOSOKAWA\*\*

from

\*Department of Aging Angiology, Research Center on Aging and Adaptation, Shinshu  
University School of Medicine

\*\*Department of Medical Embryology, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto  
University

In mouse senile amyloidosis, apoA-II polymerizes to amyloid fibrils (AApoAII) and deposits systemically. Using AApoAII amyloidosis, we studied the transmittability of amyloid fibrils. AApoAII amyloid fibrils were isolated from the liver of old R1.P1-*Apoa2<sup>c</sup>* mouse. Sonicated AApoAII (20  $\mu$ g) were given daily and five days with feeding needles into the stomach of the two-month-old R1.P1-*Apoa2<sup>c</sup>* mice. After two, three and four months, mice were killed and amyloid deposition was determined. All mice (13/13) have AApoAII deposits in the lamina propria of small intestine at two months after feeding. The intensity of the amyloid deposition increased there-after. Amyloid deposition extended to the tongue, stomach, heart and liver. However the intensity of deposition in the mice fed AApoAII was significantly lower than mice that were injected AApoAII intravenously. Amyloid deposition was induced in the young mice reared in the same cages during three months with old mice that had severe amyloid deposition.

The unique pathogenesis of amyloidosis "oral transmission of amyloid fibril conformation, that is; invasion of exogenous amyloid fibrils act as seeds and change the conformation of endogenous amyloid protein to polymerize into amyloid fibril" was shown.

## 血清アミロイド A 遺伝子多型：AA-アミロイドーシスとの関連 および人種差

研究者 馬 場 聡\* 筒 井 祥 博\* 石 原 得 博\*\*  
星 井 嘉 信\*\* 河 野 裕 夫\*\*

### はじめに

AA-アミロイドーシスは「むかし結核、いまりウマチ」に代表される慢性炎症性疾患に続発する全身性アミロイドーシスである。医療水準の向上に伴い本症の発見される慢性関節リウマチ (RA) 患者は増加し、現在約 10% 程度の RA 患者が本症を発症するとされる<sup>1)</sup>。本邦の RA 患者は 70 万人以上と推定されており、AA-アミロイドーシスは決して稀な病気ではない。一般に RA は比較的予後良好であるが、本症の合併により諸臓器障害をきたすようになればその予後は厳しい。RA 剖検例の 21~25% に本症の合併がみられ<sup>2)</sup>、RA 患者の死因として最も重要であることが認知されてきている。

血清アミロイド A (SAA) は、本症におけるアミロイドの主要成分であるアミロイド A タンパク (AA) の前駆体である<sup>3)</sup>。ヒト SAA ファミリーには SAA 1~4 の 4 つの遺伝子が知られているが、炎症時に高発現し AA-アミロイドとなって沈着するのは SAA 1 と SAA 2 の 2 つで、通常 SAA 1 由来の AA が量的に優位に沈着する。この SAA 1 と SAA 2 にはそれぞれ 2 つの多型 (1  $\alpha$ , 1  $\beta$ , 2  $\alpha$ , 2  $\beta$ ) が知られていたが、我々は新たに 1  $\gamma$  を見出した<sup>4,5)</sup>。そして、その後の我々の研究により、この 1  $\gamma$  が AA-アミロイドーシスの強い危険因子

であることが判ってきた<sup>6,7)</sup>。さらに SAA 遺伝子多型には大きな人種差があることも判ってきたので、これらを合わせて報告する。

### 対象および方法

#### (1) DNA 試料

日本人の健常者群 (156 人)、RA コントロール群 (442 人)、RA 合併 AA-アミロイドーシス群 (127 人) の血液または剖検材料からゲノム DNA を抽出した。AA-アミロイドーシスの診断は病理組織学的にコンゴ赤染色の過マンガン酸カリ感受性試験および抗 AA 免疫染色で確認した。また、血縁関係のない中国人 (遼寧省 100 人、江蘇省 100 人)、豪州イギリス系白人 (150 人)、およびハンガリー人 (150 人) (いずれも健常者) の血液からもゲノム DNA を抽出した。

#### (2) PCR-RFLP 解析

抽出した DNA を用いて PCR で SAA 1 および SAA 2 遺伝子の多型部位を含む DNA 断片を増幅した。プライマーは、SAA 1 遺伝子が forward:5'-GCCAATTACATCGGCTCAG-3', reverse:5'-TCCTCCGCACCATGGCCAAA-3', SAA 2 遺伝子が forward:5'-GAATATCCAGAGACTCACAG-3', reverse:5'-GACCTCACTAACTTTGTATCC-3' を使用した。増幅された DNA 断片は制限酵素で消化後、10% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動・銀染色を行い検出した。SAA 1 遺伝子断片 (530 bp) は制限酵素 Ban I により、1  $\alpha$  アレルの場合は

\* 浜松医科大学医学部病理学第二教室

\*\* 山口大学医学部病理学第一教室

表1 AA-アミロイドーシスにおける SAA 1 および SAA 2 の遺伝子型およびアレル頻度

SAA 1	Genotype						Allele		
	$\alpha/\alpha$	$\alpha/\beta$	$\alpha/\gamma$	$\beta/\beta$	$\beta/\gamma$	$\gamma/\gamma$	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
RA + AA	0.13	0.06	0.08	0.09	0.16	0.48	0.20	0.19	0.61
RA Cont.	0.09	0.24	0.27	0.10	0.20	0.10	0.35	0.31	0.34
Healthy	0.08	0.21	0.26	0.10	0.21	0.14	0.31	0.31	0.38

SAA 2	Genotype			Allele	
	$\alpha/\alpha$	$\alpha/\beta$	$\beta/\beta$	$\alpha$	$\beta$
RA + AA	0.76	0.24	0.00	0.88	0.12
RA Cont.	0.79	0.20	0.01	0.89	0.11
Healthy	0.71	0.27	0.02	0.85	0.15

RA + AA: RA patients with AA-amyloidosis (n=127), RA Cont.: RA patient controls which are not diagnosed as AA-amyloidosis (n=442), Healthy: Healthy controls (n=156).

2つのフラグメント (317 および 73 bp) に、1 $\beta$  と 1 $\gamma$  は3つのフラグメント (244, 188 および 73 bp) に消化される。一方、制限酵素 Bcl I では、1 $\beta$  の場合に2つのフラグメント (438 および 92 bp) に消化されるが、1 $\alpha$  と 1 $\gamma$  は消化されない。SAA 2 遺伝子断片 (201 bp) は制限酵素 Nco I により、2 $\alpha$  の場合には2つのフラグメント (179 および 22 bp) に消化されるが、2 $\beta$  は消化されない。以上のパターンから各サンプルの遺伝子型を判定した。

### (3) 統計学的解析

各人種の遺伝子頻度のデータから、観察された全ての遺伝子型の頻度と理論値とを比較し、 $\chi^2$  検定により Hardy-Weinberg 平衡を検討した。また、分割表を利用した  $\chi^2$  検定により各人種間で、また疾患群と対照群との間で、遺伝子型およびアレル分布の差異について有意差の有無を検討した。各遺伝子型についての比較には Fisher's exact 検定を用いた。オッズ比の 95% 信頼区間は Woolf の方法を用いて計算した。

### 結果および考察

#### (1) 日本人における SAA 多型と AA-アミロイドーシスとの関連

疾患群と対照群の SAA の遺伝子型分布およびアレル頻度に関する結果を表 1, 表 2 および図 1 に示した。

SAA1 遺伝子については、遺伝子型およびアレル頻度ともに健常者群と RA コントロール群とで

は有意差はなかったが、健常者群もしくは RA コントロール群とアミロイドーシス群との間では明らかな有意差 ( $p < 0.0001$ ) を認めた (表 2)。しかし、SAA 2 遺伝子では各群間でこのような違いはなかった。したがって、少なくとも日本人においては SAA 1 遺伝子の多型が、RA 自体にではなく、AA-アミロイドーシスに関連していることが判った。

ここで興味深いのは、アミロイドーシス群において 1 $\gamma$  アレルの頻度が高く (61%,  $p < 0.0001$ )、特に 1 $\gamma$  ホモ接合子の頻度が非常に高い (48%,  $p < 0.0001$ ) 点であった。そこで RA コントロール群とアミロイドーシス群のデータからオッズ比を求めると、少なくともひとつ 1 $\gamma$  アレルを持つ場合は 1.9 (95% CI 1.3-3.0)、また、1 $\gamma$  ホモ型の場合は 8.2 (95% CI 5.2-13.0) であった。したがって、RA 患者で 1 $\gamma$  ホモ接合子である場合にはそれ以外の

表 2 各群 (表 1) 間における SAA 1 遺伝子分布の差異の有無についてのカイ二乗検定

Compared groups	$\chi^2$	d.f.	p-value
<b>Genotype</b>			
Healthy vs RA NOS	2.0	5	$p=0.84$
Healthy vs RA + AA	57.1	5	$p<0.0001$
RA NOS vs RA + AA	111.7	5	$p<0.0001$
<b>Allele</b>			
Healthy vs RA NOS	1.6	2	$p=0.44$
Healthy vs RA + AA	29.2	2	$p<0.0001$
RA NOS vs RA + AA	58.1	2	$p<0.0001$



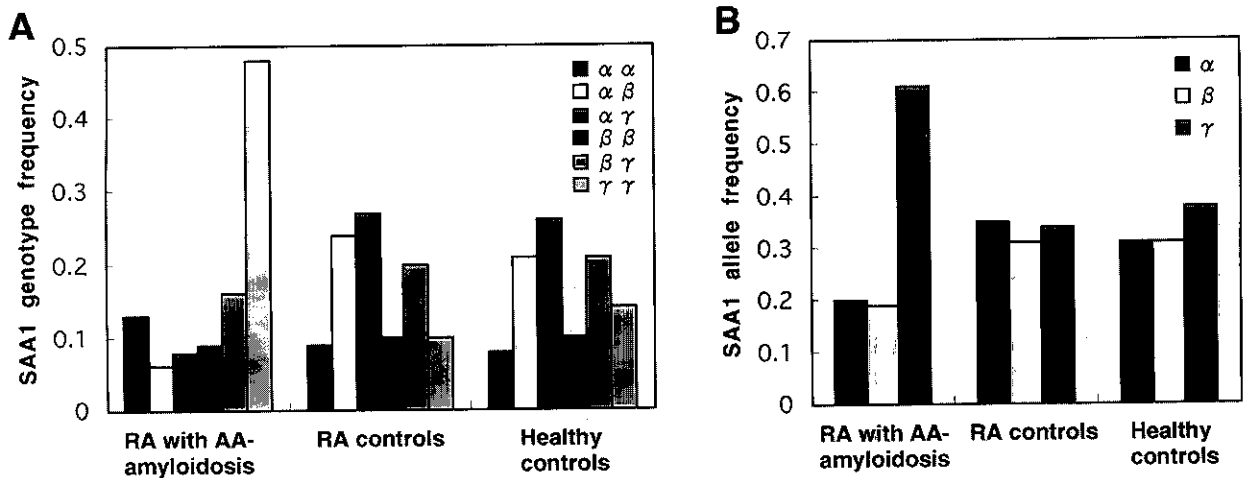


図1 AA-アミロイドーシスにおける SAA1 の遺伝子型およびアレルの分布

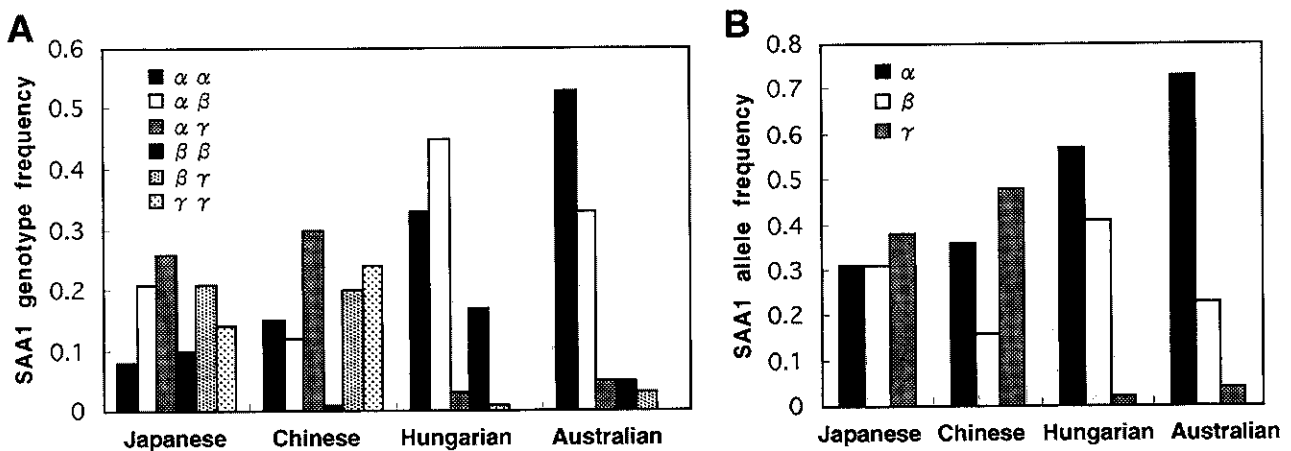


図2 各人種における SAA1 および SAA2 の遺伝子型およびアレルの分布

場合と比べてアミロイドーシス合併の危険性が約 8 倍も高いと推定された。

### (2) SAA 多型の人種間比較

各人種集団における SAA の遺伝子型分布およびアレル頻度に関する結果を表 3 と図 2 に示した。各々の人種集団について Hardy-Weinberg 平衡の成立について  $\chi^2$  検定を行ったところ、いずれも平衡は否定されなかった。

人種間で比較すると、SAA1 遺伝子については、日本人では 3 つのアレルいずれもほぼ同頻度であった。中国人では遼寧省と江蘇省とではほとんど差がなかったが、日本人と比較すると 1  $\beta$  が約 1/2 の頻度、1  $\gamma$  が約 10% ほど高頻度であった。これらアジア民族と大きな違いを示したのがハンガリー人と豪州イギリス系白人で、1  $\gamma$  はきわめて低

頻度、特に 1  $\gamma$  のホモ接合子は全く観察されなかった。両白人ともに最も頻度が高いのは 1  $\alpha$  アレルであるが、特に豪州白人では 73% と圧倒的に多かった。SAA 2 遺伝子の 2 つのアレルについては、いずれの人種集団においても 2  $\alpha$  が圧倒的に高頻度 (85~99%) で大きな人種間差はなかったものの、日本人や両白人と比べ中国人では 2  $\beta$  が極めて少なかった。さらなる検討を要するものの、以上の結果はこれまでに報告されている古典的遺伝子マーカーや DNA 多型解析に基づいた各人種の系統的關係には矛盾しないものと考えられた。また、1  $\gamma$  アレルが人類の進化のいつ頃どこで発生し、どのように移動したかなど、SAA 多型は人類遺伝学的に面白いマーカーの一つではないかと思われた。さらに、疾患との関連において今回判明した

表3 各人種における SAA 1 および SAA 2 の遺伝子型およびアレル頻度

SAA 1	Genotype						Allele		
	$\alpha/\alpha$	$\alpha/\beta$	$\alpha/\gamma$	$\beta/\beta$	$\beta/\gamma$	$\gamma/\gamma$	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
Japanese	0.08	0.21	0.26	0.10	0.21	0.14	0.31	0.31	0.38
N. Chinese	0.15	0.13	0.30	0.00	0.19	0.23	0.37	0.16	0.48
M. Chinese	0.15	0.10	0.29	0.01	0.21	0.24	0.35	0.17	0.50
Hungarians	0.33	0.45	0.03	0.17	0.01	0.00	0.57	0.41	0.02
Australians	0.53	0.33	0.05	0.05	0.03	0.00	0.73	0.23	0.04

SAA 2	Genotype			Allele	
	$\alpha/\alpha$	$\alpha/\beta$	$\beta/\beta$	$\alpha$	$\beta$
Japanese	0.71	0.27	0.02	0.85	0.15
N. Chinese	0.94	0.06	0.00	0.97	0.03
M. Chinese	0.98	0.02	0.00	0.99	0.01
Hungarians	0.79	0.20	0.01	0.89	0.11
Australians	0.74	0.24	0.02	0.86	0.14

Japanese (Tokyo; n=156), North Chinese (Liaoning; n=100), Middle Chinese (Jiangsu; n=100), Hungarian Caucasians (n=150), Australian Caucasians (Sydney; n=150)

SAA 多型の人種差, 特に  $1\gamma$  の頻度の高低が各人種における AA-アミロイドーシスの発症率に影響している可能性があるとして推測され, これも興味深い課題と思われる。

### 結 論

SAA 1 多型が AA-アミロイドーシスに関連し,  $1\gamma$  のホモ接合子とその強い危険因子であることを分子疫学的に明らかにした。また, SAA 多型には人種差があり,  $1\gamma$  は日本人や中国人で高頻度であった。したがって  $1\gamma$  は我々日本人の RA 患者にとって取り分けて重要な因子であることが判った。今後は SAA 1 多型がどのように AA-アミロイドーシスに関与しているのか, その機序を解明することが本症の予防法, 治療法の手掛かりとなるとと思われる。

### 文 献

- 1) 奥田恭章, 高杉潔, 小山徹, 他. 慢性関節リウマチに合併した2次性アミロイドーシス 124 例の臨床的検討—胃十二指腸生検による診断と予後を中心として—. *リウマチ* 1994;34:939-946.
- 2) 中野正明, 荒川正昭, 村澤章. 慢性関節リウマチにおける続発性アミロイドーシス. *臨床リウマチ* 1997;9:218-224.
- 3) Steel DM, Whitehead AS. The major acute phase reactant: C-reactive protein, serum amyloid P

component and serum amyloid A protein. *Immunol Today* 1994;15:81-88.

- 4) Baba S, Takahashi T, Kasama T, et al. Identification of two novel amyloid A protein subsets coexisting in an individual patient of AA-amyloidosis. *Biochim Biophys Acta* 1992;1180:195-200.
- 5) Baba S, Takahashi T, Kasama T, et al. A novel polymorphism of human serum amyloid A protein, SAA1 $\gamma$ , is characterized by alanines at both residues 52 and 57. *Arch Biochem Biophys* 1993;303:361-366.
- 6) Baba S, Masago SA, Takahashi T, et al. A novel variant of serum amyloid A, SAA1 $\gamma$ : genomic evidence, evolution, frequency, and implication as a risk factor for reactive systemic AA-amyloidosis. *Hum Mol Genet* 1995;4:1083-1087.
- 7) Baba S, Miyamoto S, Kawashima M, et al. Serum amyloid A gene polymorphism and AA-amyloidosis. In: *Amyloid and Amyloidosis*, New York, Parthenon Publishing Group (in press).

Serum amyloid A gene polymorphism: Association with risk for AA-amyloidosis and comparison among ethnically defined human populations

by

Satoshi BABA\*

Yoshihiro TSUTSUI\*, Tokuhiko ISHIHARA\*\*, Yoshinobu HOSHII\*\*, Hiroo KAWANO\*\*

from

\*Second Department of Pathology, Hamamatsu University School of Medicine

\*\*First Department of Pathology, Yamaguchi University School of Medicine

We previously identified a new polymorphism of serum amyloid A, SAA1  $\gamma$ , and found that its frequency was remarkably increased in AA-amyloidosis. To clarify whether the SAA1  $\gamma$  is really a risk factor for AA-amyloidosis, we have analysed the relative frequencies of the genotypes and alleles of SAA genes in healthy subjects and rheumatoid arthritis (RA) patients with and without AA-amyloidosis in Japanese population. The distribution of SAA1 genotypes and alleles in AA-amyloidosis was significantly different ( $p < 0.0001$ ) from that in the RA controls and healthy subjects, although that in the RA controls was very close to that in healthy subjects. The frequency of the 1  $\gamma$  allele was increased in AA-amyloidosis (0.61) compared with the RA controls (0.34), predominantly due to a higher proportion of 1  $\gamma$ /1  $\gamma$  homozygotes (0.48) in AA-amyloidosis. The odds ratio for the association of AA-amyloidosis with 1  $\gamma$ /1  $\gamma$  homozygosity was 8.2 (95% CI=5.2-13.0) compared with the RA controls. There were little differences in the allelic and genotypic distributions of SAA2 gene among the subjects. These results suggest that the SAA1 gene polymorphism is associated with AA-amyloidosis, but not with RA itself, and that 1  $\gamma$ /1  $\gamma$  homozygosity is associated with an especially increased risk of having AA-amyloidosis.

In addition, we have analysed the differences in distribution of genotype of SAA genes in five ethnic populations. The SAA1  $\gamma$  is more frequent in North Chinese (48%) and Middle Chinese (50%) than Japanese (38%), whereas extremely rare in Hungarians (2%) and Australian Caucasians (4%). This finding suggests that the difference in the frequency of SAA1  $\gamma$  may have affected to the incidence of AA-amyloidosis in RA patients in each ethnic population.

## アミロイドと反応するAM34抗体と 補体制御蛋白H因子の関連についての検討

研究者 今井浩三 伊東文生 吉本 満  
本多佐保

### 目 的

アルツハイマー病の老人斑は、 $\beta$ 蛋白 ( $A\beta$ ) の沈着と変性した神経突起より構成される。 $A\beta$  は amyloid precursor protein (APP) という膜蛋白から形成される39から43アミノ酸残基のポリペプチドである。髄液などに見出される可溶性の $A\beta$  はほとんどが $A\beta_{1-40}$ であるが、老人斑においては $A\beta_{1-42/43}$ の比率が高く、これらは $A\beta_{1-40}$ より不溶性のアミロイド線維を形成しやすい。したがって、APP代謝の異常による $A\beta_{1-42/43}$ の蓄積がアルツハイマー病の発生過程に重要とされているのだが、沈着した $A\beta$ が神経組織を障害する機序については不明な点も多い。

我々は、続発性アミロイドーシスの腎組織を免疫原にしてモノクローナル抗体AM34を作製したが、AM34は続発性アミロイドーシスのAAアミロイド沈着部位のみならず、老人斑の $A\beta$ 沈着部位にも反応を示した<sup>1)</sup>。AM34の対応抗原を検索する目的で肝臓由来のcDNAライブラリーを用いて免疫スクリーニングを行ったところ、得られた陽性クローンは補体制御蛋白であるH因子のC末端側部分の遺伝子配列に一致していた<sup>2)</sup>。H因子は補体のalternative pathwayにおいて、C3Bb (C3/5 convertase) の失活解離や、I因子によるC3bの不活化に深く関わっている制御蛋白である。その構

造は、short consensus repeat (SCR) と呼ばれる約60アミノ酸残基の反復相同配列が20個連なった形をとっており<sup>3)</sup>、我々が免疫スクリーニングで得た陽性クローンはSCR15-20の遺伝子配列に一致していた。一方、これと同様の反復相同配列で構成され類似したアミノ酸配列を有し、しかも免疫学的にも交叉反応性を示す、H因子関連蛋白factor H related protein (FHR) が近年同定されており、現在のところFHR-1からFHR-4までが知られている<sup>4,5)</sup>。これらはH因子の活性に必要とされるSCR 1-4と相同なドメインを欠いているため、その生理的意義は全く不明であるが、いずれの関連蛋白もH因子のSCR19-20と高い相同性を有している。従って、AM34がH因子ではなく、関連蛋白と反応している可能性は否定できない。そこで本研究では、RT-PCR法により脳組織におけるH因子及び関連蛋白のmRNAの発現を検討し、さらにAM34対応抗原とH因子の同一性について免疫沈降法及びwestern blot法により検討した。

### 方 法

(1) ヒト非アルツハイマー病脳組織よりtotal RNAを抽出し、RT-PCR法でH因子及び関連蛋白のmRNAの発現を検討した。H因子と関連蛋白を同時に拾い上げるため、特に相同性の高いSCR19内にプライマーを設定し、RT-PCRを行った。得られたバンドをゲルから切り出して回収した後subcloningしてそれぞれ塩基配列を決定し、H因子