；男１７名、女２５名）と年齢を対応させた正常対照例２１名（年齢７２．９±７．６歳；男２３名、女１９）を対象とした。ＥＤＴＡ入り採血試験管に１８ｍｌ採血し、９：１の割合でbuffer A（38 mM citric acid、75 mM trisodium citrate、136 mM glucose、pH 6.4）を加えて撹拌し、２００Ｘｇ、１０分間、４℃で遠心し、上清と沈渣に分離した。上清は１５００Ｘｇ、１５分間、４℃で更に遠心し、その上清を用いて等電点電気泳動法にてＡＰＯＥのフェノタイプを決定した。沈渣にはbuffer B（5 mM tris、10 mM EDTA、10 mM aprotinin、10 mM leupeptin、0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride、pH 7.4）を１０ml加えて撹拌した後、１５００Ｘｇ、１５分間、４℃で遠心し、沈渣を得た。この沈渣に５M塩酸guanidineを加えて１０秒間超音波破砕後、１０００００Ｘｇ、１５分間、４℃で超遠心し、上清を希釈後、ＥＬＩＳＡにてＡβを定量した。ＥＬＩＳＡでは、ＢＮＴ７７（Aβ11-28に対するモノクローナル抗体）を固相化抗体とし、ＢＡ２７（Aβ1-40に対するモノクローナル抗体）やＢＣ０５（Aβ35-43に対するモノクローナル抗体）をＨＲＰ標識抗体とするサンドイッチ法によってAβ40やAβ42を分別定量した。蛋白定量にはBCA assay kit （Pierce、Rockford、Ill）を用いた。

（倫理面への配慮）

剖検脳を得るに際しては、家族にその目的を十分説明した後了承を得ており、倫理的には何ら問題がない。

C. 研究結果

血小板Ａβ４０の平均値±標準偏差はＡＤ群では12.1±14.7fmol/mg proteinで、対照群では10.8±15.2 fmol/mg protein であった。また血小板Ａβ４２はＡＤ群では13.4±11.2 fmol/mg protein 、対照群では10.0±7.54 fmol/mg proteinであった。両者間でＡβ４０に有意差はみられなかったが、Ａβ４２はＡＤで有意に増加していた（ｐ＝０．０４７、Mann-Whitney's U-test）。ＡＰＯＥの多型を解析すると、ＡＤ群では２／３が２例、３／３が２８例、３／４が１２例であり、対照群では２／３が３例、２／４が１例、３／３が３１例、３・４が７例であり、やはりＡＤ群ＡＰＯＥ－Ｅ４が多い傾向がみられた。血小板Ａβ値をＡＰＯＥのフェノタイプ別に比較すると、Ａβ４２がＡＤ群のＡＰＯＥ－Ｅ３／４（19.7±18.1 fmol/mg protein ）ではＡＤ群のＡＰＯＥ－Ｅ３／３（11.1±5.58 fmol/mg protein ）や対照群ＡＰＯＥ－Ｅ３／４（10.3±6.14 fmol/mg protein）に比して有意にＡβ４２が増加していた（それぞれｐ＝０．００９、０．０３６７；Fisher's PLSD test）。また、Ａβ４０は対照群ＡＰＯＥ－Ｅ３／４（19.7±18.9 fmol/mg protein ）では対照群ＡＰＯＥ－Ｅ３／３（6.99±11.6 fmol/mg protein ）に比して有意に増加していた（ｐ＝０．０３５６；Fisher's PLSD test ）。

D. 考察

ＡＤ脳ではＡβ４２が早期より広範に沈着することが知られているが、本研究においてＡＤ群で対照群に比して血小板Ａβ４２が有意に増加していたことは、ＡＤ脳内における神経細胞のＡβ４２の増加傾向が血小板において反映されていた可能性が考えられ、ＡＤの血小板におけるＡβ代謝の解析がＡＤの病態の解明に有用であることが示唆された。ＡＤ群のＡＰＯＥ－Ｅ３／４ではＡＤ群のＡＰＯＥ－Ｅ３／３に比して有意にＡβ４２が増加していた点より、ＡＤの危険因子の一つであるＡＰＯＥ－Ｅ４はＡＤの血小板においてＡβ４２を増加させる方向に作用し

ている可能性が示された。 対照群ＡＰＯＥ－Ｅ３／４では対照群ＡＰＯＥ－Ｅ３／３に比してＡβ４０が有意に増加しており、ＡＰＯＥ－Ｅ４はＡＤ群と対照群とでＡβ分子種に対する影響が異なるものと考えられた。ＡＤ群における血小板Ａβ４２の有意な増加には、ＡＤ群に含まれるＡＰＯＥ－Ｅ４の増加傾向が少なくともその一因となっているものと考えられた。

E. 結論

ＡＤ群では対照群に比して血小板Ａβ４２が有意に増加しており、ＡＤ群に含まれるＡＰＯＥ－Ｅ４の増加傾向が少なくともその一因となっているものと考えられた。 ＡＤ脳内における神経細胞のＡβ４２の増加傾向が血小板において反映されていた可能性が考えられ、ＡＤの血小板におけるＡβ代謝の解析がＡＤの病態の解明に有用であることが示唆された。

F. 研究発表

１．論文発表

1) Tamaoka A, Miyatake F, Matsuno S, et al: Apolipoprotein E allele-dependent antioxidant activity in brains with Alzheimer's disease. Neurology (in press)
2) Minoru Yausda, Sakan Maeda, Toshio Kawamata, Akira Tamaoka, Yasuji Yamamoto, Shigetoshi Kuroda, Kiyoshi Maeda, and Chikako Tanaka: Novel presenilin-1 mutation with widespread cortical amyloid deposition but limited cerebral amyloid angiopathy. J Neurol Neurosurg Psychiatry 68(2):220-223, 2000.
3) Mochizuki A, Tamaoka A, Shimohata A, Komatsuzaki Y, Shoji S: Abeta42-positive non-pyramidal neurons around amyloid plaques in Alzheimer's disease. Lancet 355(9197):42-3, 2000
4) Hu J, Miyatake F, Aizu Y, Nakagawa H, Nakamura S, Tamaoka A, Takahash R, Urakami K, Shoji M: Angiotensin-converting enzyme genotype is associated with Alzheimer disease in the Japanese population. Neurosci Lett 277:65-7, 1999.
5) Akira Tamaoka, Yoshiki Sekijima, Sayoko Matsuno, Takahiko Tokuda, Shin'ichi Shoji, Shu-Ichi Ikeda: Amyloid β protein species in cerebrospinal fluid and in brain from patients with Down's syndrome. Ann Neurol 46: 933, 1999.
6) Christie G, Markwell RE, Gray CW, Smith L, Godfrey F, Mansfield F, Wadsworth H, King R, McLaughlin M, Cooper DG, Ward RV, Howlett DR, Hartmann T, Lichtenthaler SF, Beyreuther K, Underwood J, Gribble SK, Cappai R, Masters CL, Tamaoka A, Gardner RL, Rivett AJ, Karran EH, Allsop D: Alzheimer's disease: correlation of the suppression of beta-amyloid peptide secretion from cultured cells with inhibition of the chymotrypsin-like activity of the proteasome. J Neurochem 73(1):195-204, 1999.
7) 玉岡 晃：アミロイドβ蛋白．日本臨床 ７４８：２８５－２８８、１９９９．
8) 玉岡 晃：Ａβ線維形成、医学のあゆみ１８９：１５－２１、１９９９．

２．学会発表

1) S.Matsuno, A.Tamaoka, S.Shoji: Amyloid β protein (Aβ) species in cerebrospinal fluid and brains from patients with Down's syndrome (DS). 19th Annual Meeting Society for Neuroscience. (Miami Beach), October, 1999.
2)A.Tamaoka, Y.Sekijima, S.Matsuno, T.Tokuda, S.Shoji, S.Ikeda: Amyloid b protein (Ab) species in cerebrospinal fluid and brains from patients with Down's

syndrome (DS). 19th Annual Meeting Society for Neuroscience. (Miami Beach), October, 1999.
3) 玉岡　晃、宮武史子、松野佐好子、石井一弘、庄司進一、佐原成彦、森　啓：アルツハイマー病脳における脂質過酸化とアミロイドβ蛋白や APOE 遺伝子型との相関. 第１８回日本痴呆学会、１０月８日、１９９９.
4) Akira Tamaoka, Yoshiki Sekijima, Sayoko Matsuno, Takahiro Tokuda, Shin'ichi Shoji, Shu-Ichi Ikeda: Amyloid β protein (Aβ) species in cerebrospinal fluid and brains from patients with Down's syndrome. International Symposium on Dementia (Kobe), September 13, 1999.
5) 宮武史子、会津善紀、胡　建国、中川八郎、中村重信、玉岡　晃、高橋良輔、浦上克哉、東海林幹夫：アルツハイマー病の危険因子としてのアンギオテンシンⅠ変換酵素遺伝子多型. 第４２回日本神経化学会大会、９月１６日、１９９９.
6) 玉岡　晃：アルツハイマー病の臨床と治療. きぬ守谷病院薬剤師会学術講演会、８月１９日、１９９９.
7) 玉岡　晃、宮武史子、松野佐好子、庄司進一、森　啓：アルツハイマー病（ＡＤ）脳における脂質過酸化とアミロイドβ蛋白（Ａβ）分子種や APOE 遺伝子型との相関についての解析. 第４０回日本神経学会総会、５月１９日、１９９９.
8) 石井一弘、松野佐好子、玉岡　晃、壱岐純子、庄司進一：アルツハイマー病（ＡＤ）小脳皮質を用いた瀰慢性老人斑の構成成分としてのアミロイドβ蛋白（Ａβ）分子種の検討. 第４０回日本神経学会総会、５月２１日、１９９９.
9) 佐村英里子、吉川泰弘、中村紳一郎、松野佐好子、玉岡　晃、庄司進一：老齢犬脳に沈着するアミロイドβ蛋白（Ａβ）分子種の解析. 第４０回日本神経学会総会、５月２１日、１９９９.
10) 望月昭英、玉岡　晃、庄司進一、土井幹雄：アルツハイマー病（ＡＤ）におけるアミロイドβ蛋白（Ａβ）の沈着過程についての検討. 第４０回日本神経学会総会、５月２１、１９９９.
11) 関島良樹、池田修一、松野佐好子、庄司進一、玉岡　晃：アルツハイマー型痴呆を伴うダウン症候群（ＤＳ）の髄液中アミロイドβ蛋白（Ａβ）濃度と脳内Ａβ分子種に関する研究. 第４０回日本神経学会総会、５月２１日、１９９９.
12) 松野佐好子、玉岡　晃、庄司進一、尾野精一、清水夏繪：筋萎縮性側索硬化症（ALS）皮膚におけるアミロイドβ蛋白（Ａβ）の ELISA による定量―疾患対照皮膚との比較検討―. 第４０回日本神経学会総会、５月２１日、１９９９.
13) 佐村英里子、松野佐好子、木村展之、中村紳一朗、玉岡　晃、庄司進一、中山裕之、土井邦夫、吉川泰弘：老齢犬脳における amyloid β protein 分子種の解析. 第 127 回日本獣医学会（相模原）、４月３日、1999.

厚生省科学研究費補助金　(特定疾患対策研究事業)
アミロイドーシスに関する研究　分担研究報告書

アミロイドアンギオパチーに起因する多発性脳出血に対する副腎皮質ステロイド療法の試み

分担研究者　池田修一　信州大学第三内科教授
共同研究者　星　研一、吉田邦広　信州大学第三内科
玉岡　晃　筑波大学臨床医学系神経内科

研究要旨　発病後 23 日以内に４回の大脳皮質下出血を起した 65 歳女性に対して脳生検を施行し、脳アミロイドアンギオパチーの存在を確認した。脳出血の再発予防目的で副腎皮質ステロイドホルモン療法を実施したところ、以後脳出血は起らず、患者髄液中のＡβ分子種の濃度は有意に低下した。副腎皮質ステロイドホルモンの作用機序として合併して存在していた可能性のある血管炎の抑制、アミロイド沈着を押さえるなどが考えられた。

A. 研究目的

脳アミロイドアンギオパチー（以下 CAA）は高血圧歴のない高齢者における脳出血の原因として最近重用視されている。本病変による脳出血は大脳の皮質下に多発性に生じ、また再発を起しやすいことが特徴である。したがって多くの患者は高齢であることと合わせて予後は不良である。

今回我々は脳出血を多巣性に繰り返し、脳生検で CAA と診断し、副腎皮質ステロイド療法がその再発防止に著効を示した患者を経験したので報告する。

B. 研究方法　C. 結果

患者は高血圧歴のない 65 歳女性、主訴は意識障害と右片麻痺。現病歴は 1998 年 7 月書字困難と頭痛のため近医脳外科を受診し、頭部 CT を施行し異常なし、抗核抗体陽性(X640)を指摘された。8 月頃より物忘れ、計算力低下、行動にまとまりがなくなる。11 月 2 日風呂で倒れているところを家人に発見され、救急車で来院した。身体所見では血圧は 93/56mmHg、意識は傾眠傾向、右不全片麻痺と右上下肢の深部腱反射の亢進を認めた。検査所見では血沈の亢進（36mm/hour)、抗核抗体陽性(X1280)、抗 DNA、抗 ENA、抗 RNP、抗 SSA などのの自己抗体陽性が見られたが、lupus anticoagulant は陰性であった。髄液所見ではキサントクロミー、総蛋白の上昇、tau の上昇 (526pg/ml、正常 :66-276) があり、アポリポ蛋白Ｅの表現型はε３／ε３であった。　頭部 CT、MRI では左頭頂葉の皮質下に血腫が見られたが(図１－Ａ)、脳血管撮影では腫瘍、血管奇形、血管炎症を疑わせる所見はなかった。高血圧歴を伴わない皮質下出血より CAA を疑い、確定診断のために脳生検の必要性を家族に説明したが、同意は得られなかった。

その後の臨床経過は、入院第 16 病日に左頭頂葉に二回目の出血を生じ（図１－B）、第 23 病日には右頭頂葉（図１－C）と左前頭葉（図１－D）の二箇所に個別の出血を生じ、意識状態は急速に悪化した。この時点で繰り返す脳出血の原因として、血沈の亢進、複数の自己抗体陽性より脳に主病変を持つ血管炎も考えられ、ステロイドパルス療法とそれに続くプレドニゾロン投与が開始された。以後患者では脳出血の再発はなく、意識状態ならびに手足の麻痺も改善して入院６ヵ月目には車イス移動が可能なまでに回復した（図１－E）。ステロイド療法開始後 80 日目に家人の同意を得て施行した前頭葉からの脳生検では、髄膜、皮質内の血管の全てにアミロイド沈着が見られ、一部の血管では壁の構造が二層化している“double barreling”の所見が存在した。このアミロイドは免疫組織化学的にＡβ陽性であり、またＡβ陽性の早期老人斑病変も少数観察されたが、抗 tau 抗体に反応する neurofibrillary degeneration は見られなかった。なお血管炎を疑わせる所見は伴っておらず、患者はプレドニゾロン 7.5mg/day の服用でリハビリ目的のため他院へ転院した。

以上より CAA に起因する再発性脳出血と診断し、家族歴は不明であったが CAA を伴う遺伝性脳出血の可能性を考え遺伝子解析を施行した。具体的には患者白血球から得られた genomic DNA を用いて Iceland 型遺伝性脳出血の cystatinC 遺伝子の変異とβAPP 遺伝子の exon 16 と 17 の全塩基配列を解析したが、異常は見られなかった。ステロイド療法後の患者髄液中のＡβ分子種の濃度変化を表１に示す。治療前 $A\beta_{X\text{-}40}$ と $A\beta_{X\text{-}42}$ は正常値の上限を示していたが、経過と共に低下し、最終的には正常下限以下の値となった。

D. 考察

CAA が脳出血を起す機序としては、アミロイドが沈着した血管壁が脆弱化し破綻することが定説化しており、これに fibrinoid necrosis などが加わると一層血管は破れやすくなると考えられている。一方、最近アミロイドが沈着した脳血管に炎症細胞の浸潤が比較的高頻度に観察されることが注目されている。これらは“isolated cerebral angitis”や“granulomatous cerebral angitis”と呼称されており、アミロイド沈着が目立つ血管部で見られやすく、また電子顕微鏡的観察では異物型巨細胞がアミロイドを貪食している像も確認されている。したがってこうした病変はアミロイド沈着に続発した変化と位置付けられているが、こうした病変の存在がアミロイドで侵された血管の脆弱性をさらに高めるとも考えられている。

CAA に起因する脳出血は大葉性の大出血となり、また再発もしやすい特徴がある。さらに患者が高齢であることも手伝って本疾患に罹患した患者の予後は従来不良であった。しかし近年上記の所見を基に随伴する血管炎を押さえる目的で欧米では副腎皮質ホルモンや免疫抑制剤である cyclophosphamide の投与が試みられ、一部の患者では有効な結果が報告されている。我々は本患者に対して副腎皮質ステロイドホルモンの単独投与を行い、脳出血の再発予防が得られたと考えている。本患者の脳生検標本では血管炎の所見は見い出されなかったが、生検自体がステロイドホルモン療法を長期間行った後で行われており、本治療法による病変の修飾状況も十分考慮する必要がある。またこうした免疫抑制剤の作用機序としては一義的には随伴する血管炎を押さえることが考えられるが、本患者ではステロイドホルモン療法後髄液中の Ａβ濃度が急速に低下しており、脳血管におけるアミロイド沈着が抑制された可能性もその一因として検討する

必要があることが提唱された。

E. 結論

再発性の大脳皮質下出血を生じた65歳女性に対し脳生検を行い、CAA の存在を確認した。副腎皮質ステロイド療法が脳出血の再発予防に対し非常に有効であったが、その機序として合併する血管炎を押さえた、Aβの産生を押さえて脳血管へのアミロイド沈着を抑制したなどが考えられた。従来治療法のなかった疾患に対して治療への可能性が提唱されたわけで、今後多数例での検討が必要である。

F. 研究発表

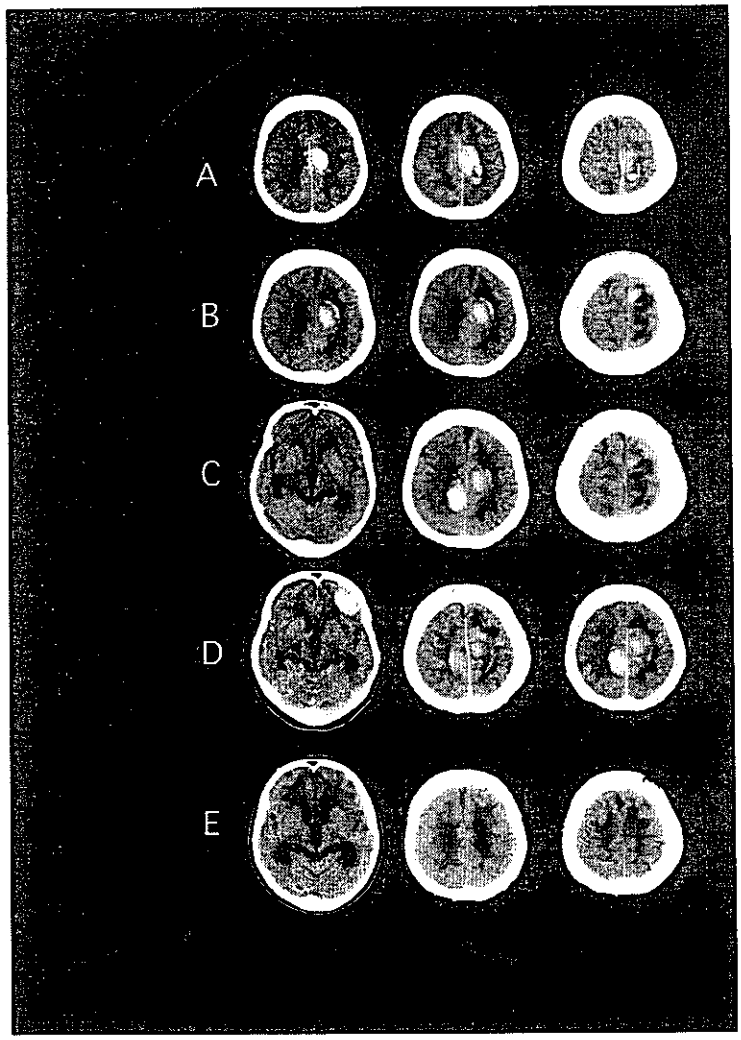
1.論文発表

1) Hoshi K, Yoshida K, Nakamura A, Tada T, Tamaoka A, Ikeda S: Cessation of cerebral hemorrhage recurrence associated with corticosteroid treatment in a patient with cerebral amyloid angiopathy. Amyloid: Int J Clin Exp Invest in press.
2) Tachibana N, Tokuda T, Yoshida K, Taketomi T, Nakazato M, Li Y-f, Masuda Y., Ikeda S: Usefulness of MALDI/TOF mass spectrometry of immunoprecipitated serum variant transthyretin in the diagnosis of familial amyloid polyneuropathy. Amyloid: Int J Exp Clin Invest 6:282-288, 1999.
3) Ikeda S, Takabayashi Y, Maejima Y, Tachibana N, Ehara T, Nezu A, Hoshii Y: Nodular lung disease with five year survivial and unilateral pleural effusion in AL amyloidosis. Amyloid: Int J Exp Cin Invest 6:292-296, 1999.
4) Misu K, Hattori N, Nagamatsu M, Ikeda S, Ando Y, Nakazato M, Takei Y, Hanyu N, Usui Y, Tanaka F, Harada T, Inukai A, Hashizume Y, Sobue G: Late-onset familial amyloid polyneuropathy type I (transthyretin Met30-associated familial amyloid polyneuropathy) unrelated to endemic focus in Japan. Clinical and genetic features. Brain 122:1951-1962, 1999.
5) Takei Y, Ikeda S, Hashikura Y, Ikegami T, Kawasaki S: Partial-liver transplantation to treat familial amyloid polyneuropathy:follow-up of 11 patients. Ann Inten Med 131:592-595, 1999.
6) Sekijima Y, Kametani F, Tanaka K, Okochi M, Usami M, Mori H, Tokuda T, Ikeda S: Presenilin-1 exists in the axoplasm fraction in the brains of aged Down's syndrome subjects and non-demented individuals. Neurosci Lett 267:121-124, 1999.
7) 池田修一：家族性アミロイドポリニューロパチーの治療。治療 81：65-70, 1999.
8) 池田修一：家族性アミロイドポリニューロパチーの診断・治療、最近の進歩。日本醫事新報 3931:1-8, 1999.
9) 川崎誠治、橋倉泰彦、池田修一、清澤研道、藤堂省、古川博之、幕内雅敏：臓器移植法制定後初めて行われた脳死からの臓器移植。肝臓移植症例報告。日本醫事新報 3926:24-27, 1999.
10) 池田修一：家族性アミロイドポリニューロパチー。生体の科学 50:366-368, 1999.
11) 池田修一：家族性アミロイドポリニューロパチーに対する肝移植、その適応と治療効果。Annual Review 神経 1999、後藤文男、高倉公明、木下真男、柳澤信夫、清水輝夫編。中外医学社、pp 95-101.

表１　脳脊髄液中のＡβ分子種濃度

日　　時	入院後日数	Aβx-40	Aβx-42
11 月 16 日, 98'	14	2248.9	121.3
12 月 10 日, 98'	38	1059.3	61.9
1 月 16 日, 99'	75	684.4	39.8
1 月 28 日, 99'	87	387.9	28.8
Controls (mean±S.D:pM)		2560±1420	332±178

図１の説明は本文中を参照されたし。



厚生省科学研究費補助金　(特定疾患対策研究事業)
アミロイドーシスに関する研究　分担研究報告書

マウス老化 amyloid 蛋白質 (apoA-II) mRNA の発現：*in situ* hybridization 法による解析

分担研究者　樋口京一　　信州大学医学部　教授

研究要旨　従来，apoA-II の mRNA は肝臓特異的に発現すると報告されてきたが肝臓以外の組織での発現を若齢（3 ヵ月齢）と老齢（18 ヵ月齢）の R1.P1-*Apoa2*^{c} 系統マウスを用いて *in situ* hybridization 法，免疫組織化学法、RT-PCR 法で解析した。apoA-II mRNA は肝実質細胞以外に，皮膚毛嚢周囲細胞と基底細胞，舌粘膜の基底細胞，胃扁平上皮の基底細胞及び fundic gland の主細胞，小腸粘膜の crypt cell と少数の absorptive 上皮細胞での発現が認められた。免疫組織化学法では apoA-II mRNA を認めた細胞内に apoA-II 蛋白質の局在が確認された。心臓では apoA-II mRNA 及び apoA-II 蛋白質の存在は認められなかった。RT-PCR の結果 apoA-II PCR 産物が、肝臓、胃、小腸、舌、皮膚で認められた。肝臓外での apo A-II mRNA 発現細胞の周囲では早期よりアミロイド沈着が認められ、局所的な apoA-II の産生とアミロイド沈着との関連が示唆された。

A. 研究目的

マウス老化アミロイドーシス(AApoAII)では血清高密度リポ蛋白質(HDL)のアポ蛋白質である apoA-II が全身性に沈着するが、早期沈着臓器は小腸、舌、皮膚等である[1, 2]。従来 apoA-II は肝臓でのみ産生されると報告されてきたが、今回 *in situ* hybridization 法により肝細胞以外での apoA-II の産生を調べ、早期沈着臓器との関連を解析した。

B. 研究方法

マウス；R1.P1-*Apoa2*^{c} マウスは C 型 apoA-II 蛋白質を持ち、重篤なアミロイドーシスを発症するマウス系統で[3]、京都大学再生医科学研究所動物実験施設と信州大学医学部動物実験施設のコンベンショナル条件下で飼育した。9 匹の若齢（3 ヵ月齢）と 3 匹の老齢（16-18 ヵ月齢）R1.P1-*Apoa2*^{c} マウスを屠殺し、全身臓器を 4%パラフォルムアルデヒドで固定し、パラフィン包埋後、6 μm の組織切片を作成した。アンチセンスプローブはマウス apoA-II cDNA[4] を pGEM-3Zf(+)ベクターに組込み、T7 プロモーターを利用して digoxigenin (DIG)でラベルした。切片を protainase K で消化後、*in situ* hybridization を行い、DIG 抗体とアルカリフォスファターゼを用いて apoA-II mRNA 産生細胞を検出した。また抗 apoA-II 抗体[5] を用いて免疫染色を行った。各臓器より total RNA を分離し RT-PCR を行った。

C. 研究結果

アンチセンス apoA-II RNA プローブを用いた *in situ* hybridization では、肝実質細胞全体に強い signal が観察されたが、センスプローブでは signal は全く観察さ

れなかった。老齢のマウス肝臓には重度のアミロイド沈着が認められ、肝細胞の signal は若齢マウスに比較して減弱していた。アンチセンス apoA-II RNA プローブを用いた *in situ* hybridization では肝細胞と同程度の強い hybridization signal を胃の扁平上皮（腺上皮への移行部）の basal cell や fundic gland の chief cell、小腸の crypt cell や少数の absorptive epithelial cell、舌粘膜の basal cell、皮膚表皮や毛嚢の basal cell 等に認めた。老齢マウスではこれらの細胞の周囲に、アミロイド沈着が観察されたが、hybridization signal には差が無かった。さらにこれらの細胞中における apoA-II 蛋白質の存在を免疫組織染色で検討した。肝細胞と小腸 crypt cell では細胞内に微細な顆粒として signal が観察された。これに対し他の apoA-II mRNA 陽性細胞では、強い signal が細胞質全体に観察された。心筋組織には apoA-II mRNA、蛋白質とも観察されなかったが老齢マウスでは心筋間に重度のアミロイド沈着を認めた。RT-PCR では肝臓以外に上記の臓器での apoA-II mRNA 発現を確認したが、脳、肺、精巣、脾、腎等の臓器での発現も認めた（図１）。しかしこれらの臓器における特異的な apoA-II mRNA positive cell の同定は出来なかった。

D. 考察

臓器によってアミロイド沈着時期に差が存在することが知られてきた。AA アミロイドーシスでは脾臓の濾胞周辺帯から沈着が始まり、肝臓等の他の臓器へと広がる。TTR トランスジェニックマウスでは胃の扁平上皮の腺上皮への移行部で最初の沈着が起こると報告されている。マウス AApoAII アミロイドーシスでは小腸の乳糜管周囲や粘膜筋板側の粘膜固有層や胃の扁平、腺上皮移行部、舌乳頭等から沈着し始める[6]。マウスの月齢の増加にともない AApoAII の沈着は皮膚、腎盂、肺等の臓器に広がり、さらに心臓、肝臓、脾臓等の主要な沈着臓器への大量沈着へと進行していく。また AApoAII アミロイド線維を血中内に投与し、アミロイド沈着を促進したときにも、これらの組織より沈着が始まることが観察されている[7]。アミロイド沈着が特定の組織で開始するメカニズムはこれまで不明であり、アミロイド前駆蛋白質(apoA-II)が血中より供給され、特異的な吸着や濃縮、あるいは細胞による取り込みや、代謝、修飾等の局所的な環境が重要と考えられてきた。この研究では AApoAII 早期沈着部位周囲の細胞で apoA-II mRNA 産生が示された。これらの細胞で産生された apoA-II がアミロイド初期沈着に関与する機構はまだ不明であるが、今後のアミロイド沈着機構と予防方法さらにアミロイドーシス伝播機構の解明のための新たな視点を与えると考えている。肝細胞や小腸の crypt 細胞では強い apoA-II mRNA 陽性ながら、アミロイド沈着は遅く、また心臓は主要な沈着臓器であるが apoA-II 産生は認められなかった。肝細胞や crypt 細胞では細胞内に apoA-II 蛋白質が僅かしか認められないことより、合成された apoA-II は速やかに細胞外に分泌されると考えらる。これらの臓器では心臓と同様に主に血中より供給された apoA-II 蛋白がアミロイド線維を形成すると考えている。

ApoA-II が肝細胞以外では分化が完了した細胞ではなく、分裂可能細胞で合成されていることも特徴的である。肝細胞以外での apoA-II mRNA の発現はマウス EST (Expressed Sequence Tags) データベースからも推測できる。また大腸癌細胞株 Caco-2 細胞では細胞分化に伴う apoA-II 産生の消失を報告されている[8]。アポリポ蛋白質は細胞にコレステロール

を分配したり余分なコレステロールを取り除く役割が示唆されている。特に細胞自体が産生した apoA-II が細胞分裂時のコレステロール供給にどのような関与をしているのか興味深い。

E. 結論

これまで肝臓のみが産生するとされていたマウスアミロイド蛋白質、apoA-II がアミロイドの早期沈着が観察される胃、小腸、舌、皮膚の特異的細胞でも産生されることが *in situ* hybridization 法で明らかになった。アミロイド線維の局所的形成や、細胞の分裂能との関連が示唆される。

文献

1. Takeshita S, Hosokawa M, Irino M, et al. Spontaneous age-associated amyloidosis in Senescence-Accelerated mouse (SAM). Mech Ageing Dev 1982; 20: 13-23.
2. Higuchi K, Yonezu T, Kogishi K, et al. Purification and characterization of a senile amyloid-related antigenic substance ($apoSAS_{SAM}$) from mouse serum; $apoSAS_{SAM}$ is an apoA-II apolipoprotein of mouse high density liorotein. J Biol Chem 1986; 261: 12834-12840.
3. Higuchi K, Kitado H, Kitagawa M, et al. Development of congenic strains of mice carrying amyloidogenic apolipoprotein A-II ($Apoa2^c$). $Apoa2^c$ reduces the plasma level and the size of high density lipoprotein. FEBS Lett 1993, 317: 207-210.
4. Kunisada T, Higuchi K, Aota S, Takeda T, Yamagishi H: Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for murine senile amyloid protein; nucleotide substitutions found in apolipoprotein A-II cDNA of senescence accelerated mouse (SAM). Nucleic Acids Res 1986; 14: 5729-5740.
5. Higuchi K, Matsumura A, Honma A, et al. Systemic senile amyloid in Senescence-Accelerated mice: A unique fibril protein demonstrated in tissues from various organs by the unlabeled immuno-peroxidase method. Lab Invest 1983; 48: 231-240.
6. Higuchi K, Hosokawa M, Takeda T. The Senescence-Accelerated Mouse. Methods Enzymol 1999; 309: 674-86.
7. Higuchi K, Kogishi K, Wang J, et al. Fibrilization in mouse senile amyloidosis is fibril conformation-dependent. Lab Invest 1998; 78: 1535-1542.
8. Johanne LB, Agnes R, Cyrille S, et al. Illgifinite expression of apolipoprotein A-II in Caco-2 cells is due to chromatin organization. Exp Cell Res 1999, 247: 373-379.

F. 研究発表

1. 論文発表

a. Chiba T, Kogishi K, Wang J, et al. Mouse senile amyloid deposition is suppressed by adenovirus-mediated overexpression of amyloid-resistant apolipoprotein A-II. Am J Pathol 1999; 155: 1319-1326.
b. Higuchi K, Hosokawa M, Takeda T. The Senescence-Accelerated Mouse. Methods Enzymol 1999; 309: 674-686.
c. Wang J, Matsushita T, Kogishi K, et al. Wild Type ApoA-II Gene Does Not Rescue Senescence-Accelerated Mouse (SAMP1) from Short Life Span and

Accelerated Mortality. J Gerontol B Biol Sci 2000; (in press)

d. Xia C, Higuchi K, Shimizu M, et al. Genetic typing of the senescence-accelerated mouse (SAM) strains with□microsatellite markers. 1999; 10: 235-258.

e. Higuchi K, Kogishi, Wang J, et al. Fibrilization in mouse senile amyloidosis is fibril conformation dependent. In Amyloid and Amyloidosis 1998, Kyle RA, Gertz MA eds, Parthenon Publishing, 1999; 47-49.

f. Chiba T, Kogishi K, Wang J, et al. AApoAII amyloid deposition is suppressed by adenovirus-mediated overexpression of type B apolipo-protein A-II gene in the mice. In Amyloid and Amyloidosis 1998, Kyle RA, Gertz MA eds, Parthenon Publishing, 1999; 56-58.

g. 樋口京一、細川昌則。SAM マウス。遺伝子治療開発研究ハンドブック、日本遺伝子治療学会編、エヌ・ティー・エス、1999；997-999

2．学会発表

a. 樋口京一、中村明宏、千葉卓哉、傅麗、松下隆壽、小岸久美子、夏晨、細川昌則、森政之：マウス老化アミロイドーシス(AApoAII)の伝達機構:。第 88 回日本病理学会 (1999.4.7) 東京

b. 樋口京一、森政之、千葉卓哉、中村明宏、傅麗、郭占軍、Xing Yanming, 是永龍巳、松下隆壽、小岸久美子、夏晨、細川昌則：マウス老化アミロイドーシス(AApoAII)の伝達機構-1：アミロイド核の経口伝播。第 22 回日本基礎老化学会 (1999.6.16) 京都

c. Xing Yanming, 中村明宏、小岸久美子、細川昌則、樋口京一：マウス老化アミロイドーシス(AApoAII)の伝達機構-2：糞を介したアミロイド線維核伝播の検証。第 22 回日本基礎老化学会 (1999.6.16) 京都

d. 傅麗、中村明宏、松山郁生、Xing Yanming、郭占軍、千葉卓哉、是永龍巳、中山淳、森政之、樋口京一：マウス老化 amyloid 蛋白質(apoA-II) mRNA の発現- *in situ* hybridization 法による解析。第 22 回日本基礎老化学会 (1999.6.16) 京都

e. 樋口京一老化促進モデルマウス(SAM)を用いた老化アミロイドーシス発症機構の解析。第 42 回日本神経学会、ワークショップアミロイドーシスの分子病理；アミロイド線維形成機序と治療戦略 (1999.9.16) 広島

f. 王静、松下隆壽、小岸久美子、夏晨、千葉卓哉、中村明宏、森政之、細川昌則、樋口京一：SAMP1 の促進老化と apoA-II 遺伝子；B 型 apoA-II は促進老化を改善できない。第 15 回老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会(1999.7.8) 徳島

g. Xing Yanming, 中村明宏、是永龍巳、小岸久美子、細川昌則、樋口京一：マウス老化アミロイドーシス伝播における糞の役割。第 15 回老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会 (1999.7.8) 徳島

h. 梅澤眞樹子、新真由美、小部真紀、安井佐和美、樋口京一、松下隆壽、細川昌則：食餌脂肪の老化アミロイド沈着への影響。第 15 回老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会 (1999.7.9) 徳島

E. 知的所有権の取得状況

無し

図 1　若齢マウス各組織における apoA-II mRNA 発現の RT-PCR による検出。320 bp のバンドが予想される apoA-II の PCR 産物である。M; DNA マーカー（λ/Hind III + φ x 174/HaeIII），1: apoA-II cDNA プラスミド、2; 肝臓、3; 胃、4; 小腸、5; 舌、6; 皮膚、7; 心臓、8; 脾臓、 9; 副腎、 11; 脳、 12; 腎臓

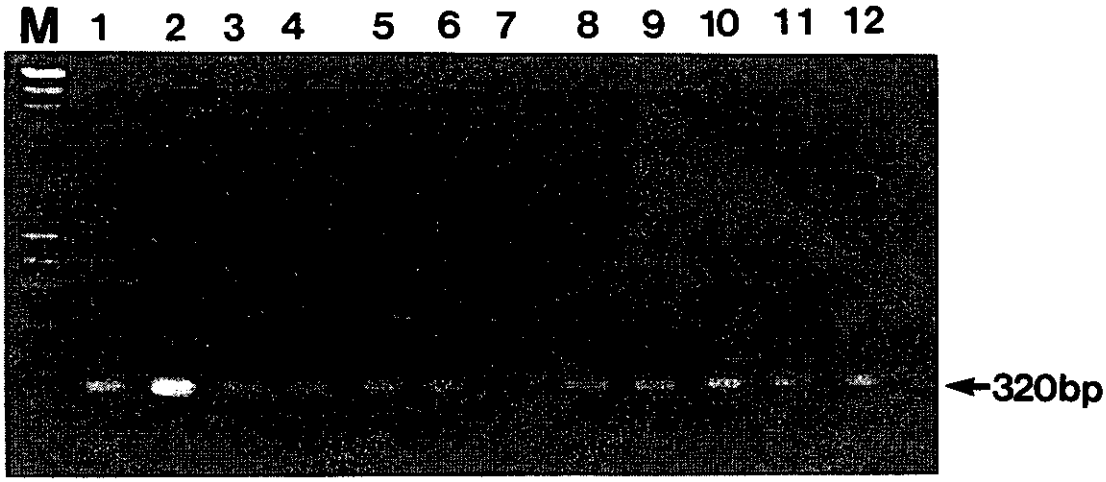


図 1

厚生省科学研究費補助金　(特定疾患対策研究事業)
アミロイドーシスに関する研究　分担研究報告書

C型 apoA-II は B 型 apoA-II による アミロイド線維形成を誘導する

分担研究者　樋口京一　　信州大学医学部　教授

研究要旨　アミロイド線維形成機構とプリオン蛋白質の自己触媒的増殖機構の類似性についてマウス老化アミロイドーシスの実験系で検証した。アミロイド原性の低い B 型 apoA-II をもつ SAMR1 マウスに重合核としてアミロイド原性の高いC型 apoA-II からなるアミロイドを投与したところ、投与後 400 日頃より舌をはじめとして胃、小腸、および心筋に著明なアミロイド線維の沈着を認めた。生化学的解析からその主要成分は内在性の B 型 apoA-II であることが判明した。またこれらのアミロイド線維は重合核としての活性も有していた。これらの結果は、重合核となるアミロイド線維が B 型 apoA-II に働いてその高次構造をアミロイド原性の高い形に変化させうる可能性を示しており、アミロイド線維形成過程においてプリオン蛋白質増殖機構と類似した機構が存在することを示唆する。

A. 研究目的

私たちはこれまでに、マウス老化アミロイドーシスにプリオン病と類似した現象をみいだし報告してきた [1,2]。今回はプリオン病で提唱されているプリオン蛋白質の正常型からスクレイピー型への”自己触媒的構造変換”仮説をもとに、アミロイド線維形成過程において重合核がアミロイド前駆蛋白質の高次構造変化をもたらす可能性について、アミロイドジェニックな異型 apoA-II (C型) をもつ SAMR1(C)マウスと正常型 apoA-II (B 型) をもつ SAMR1(C)マウスの実験系を用いて検証を試みた。

B. 方法

重合核とするアミロイド線維は SAMR1(C)マウスの肝アミロイド画分あるいは SAMR1 マウスの舌アミロイド画分より精製して用いた。

精製アミロイド線維を SAMR1 マウスおよび SAMR1(C)マウスの尾静脈より注射した後、経時的に屠殺して得た諸臓器の組織標本についてコンゴーレッド染色および抗 apoA-II 抗血清による免疫染色を行った。SAMR1 マウスの舌アミロイド画分より調製型 2 次元電気泳動にて apoA-II を分離後、PVDF 膜に転写し、膜上にてピログルタミルアミノペプチダーゼ処理した後、気相式アミノ酸シークエンサーにて N 末側アミノ酸配列を決定した。

C. 研究結果

SAMR1(C)マウス肝アミロイド画分より精製したアミロイド線維を投与された SAMR1(C)マウスおよび SAMR1 マウスではそれぞれ 30 日頃、400 日頃より諸臓器

へのアミロイド沈着を認めた。いずれもコンゴーレッド染色部位と抗 AApoAII 抗血清反応部位とはよく一致していた。最終的（SAMR1(C); 400 日齢、SAMR1; 800 日齢）な平均アミロイドインデックス値は両者とも顕著な差は認められなかったが、主要なアミロイド沈着組織は SAMR1(C)マウスでは肝臓および脾臓であるのに対して SAMR1 マウスでは舌をはじめ、胃、小腸の粘膜固有層および心筋細胞間隙であり両者の沈着組織には差異が認められた。

SAMR1 マウスに沈着したアミロイド線維の生化学的解析を試みた。抗 AApoAII 抗血清をもちいたイムノブロット解析によりアミロイド画分の主要蛋白質として AApoAII を同定した。調製型 2 次元電気泳動にて apoA-II を精製し N 末端側部分アミノ酸配列を決定した結果、5 番目はプロリンであり、B 型 apoA-II であることが判明した。

SAMR1 マウスに沈着した B 型 apoA-II を主成分とするアミロイド線維をさらに別の SAMR1 マウスに投与した。投与後 400 日頃より、心筋細胞間隙をはじめ、舌、胃、小腸の粘膜固有層へのアミロイド沈着を認めた。平均アミロイドインデックス値は C 型 apoA-II を投与された SAMR1 マウスと有意な差は認められなかった。

D. 考察

今回、重合核としてアミロイド線維を投与することにより、本来アミロイド原性の低い B 型 apoA-II をもつ SAMR1 マウスに重篤なアミロイドーシスを発症させることに成功した。また生化学的解析から、沈着したアミロイド線維の主要な構成成分は B 型 apoA-II であることがわかった。またこのアミロイド線維は C 型 AApo A-II と同様に重合核としての活性も有していた。この結果は、投与した外来のアミロイド線維が、一次構造上はアミロイド原性の低い内在性の B 型 apoA-II 単量体の高次構造をアミロイド原性の高い形に変化させる”分子シャペロン”様の役割を演じていることを示唆する。これはプリオン病で提唱されている外来のスクレイピー型プリオンの触媒による内在性の正常型プリオン蛋白質のスクレイピー型プリオン蛋白質への構造変換仮説との共通性を想起させるものであり極めて興味深い。私たちは、同様の可能性を示唆する結果をヒトの家族性アミロイドポリニューロパチーの心筋アミロイドの解析からも得ており（Yazaki ら、投稿中）、このような機構がマウス老化アミロイドーシスに限らず広くアミロイドーシス一般に普遍的にみられる現象である可能性もある。今後、in vitro の実験系で蛋白質化学的解析を通して B 型 apoA-II の高次構造変化についての直接証拠を得ることを目指している。

E. 結論

マウス老化アミロイドーシスにおいて重合核となるアミロイド線維がアミロイド前駆蛋白質の高次構造変化をもたらす可能性がある。

文献

1. Higuchi K, Kogishi K, Wang J, et al. Fibrilization in mouse senile amyloidosis is fibril conformation-dependent. Lab Invest 1998; 78: 1535-1542.
2. 樋口京一、森政之、千葉卓哉、他。マウス老化アミロイドーシスの伝播機構。 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 1998 年度研究報告書 1999; 59-61.
3. Weismann C. Molecular genetics of transmissible spongiform

encephalopathies. J Biol Chem 1999; 274, 3 – 6.

F. 研究発表

1. 論文発表

a Chiba T, Kogishi K, Wang J, et al. Mouse senile amyloid deposition is suppressed by adenovirus-mediated overexpression of amyloid-resistant apolipoprotein A-II. Am J Pathol 1999; 155: 1319-1326.

b Higuchi K, Hosokawa M, Takeda T. The Senescence-Accelerated Mouse. Methods Enzymol 1999; 309: 674-686.

c Wang J, Matsushita T, Kogishi K, et al. Wild Type ApoA-II Gene Does Not Rescue Senescence-Accelerated Mouse (SAMP1) from Short Life Span and Accelerated Mortality. J Gerontol B Biol Sci 2000; (in press)

d Xia C, Higuchi K, Shimizu M, et al. Genetic typing of the senescence-accelerated mouse (SAM) strains with□microsatellite markers. 1999; 10: 235-258.

e Higuchi K, Kogishi, Wang J, et al. Fibrilization in mouse senile amyloidosis is fibril conformation dependent. In Amyloid and Amyloidosis 1998, Kyle RA, Gertz MA eds, Parthenon Publishing, 1999; 47-49.

f Chiba T, Kogishi K, Wang J, et al. AApoAII amyloid deposition is suppressed by adenovirus-mediated overexpression of type B apolipo-protein A-II gene in the mice. In Amyloid and Amyloidosis 1998, Kyle RA, Gertz MA eds, Parthenon Publishing, 1999; 56-58.

g 樋口京一、細川昌則。SAM マウス。遺伝子治療開発研究ハンドブック、日本遺伝子治療学会編、エヌ・ティー・エス、1999；997-999

2. 学会発表

a 樋口京一、中村明宏、千葉卓哉、傅麗、松下隆壽、小岸久美子、夏晨、細川昌則、森政之：マウス老化アミロイドーシス(AApoAII)の伝達機構：。第 88 回日本病理学会 (1999.4.7) 東京

b 樋口京一、森政之、千葉卓哉、中村明宏、傅麗、郭占軍、Xing Yanming, 是永龍巳、松下隆壽、小岸久美子、夏晨、細川昌則：マウス老化アミロイドーシス(AApoAII)の伝達機構-1：アミロイド核の経口伝播。第 22 回日本基礎老化学会 (1999.6.16) 京都

c Xing Yanming, 中村明宏、小岸久美子、細川昌則、樋口京一：マウス老化アミロイドーシス(AApoAII)の伝達機構-2：糞を介したアミロイド線維核伝播の検証。第 22 回日本基礎老化学会 (1999.6.16) 京都

d 傅麗、中村明宏、松山郁生、Xing Yanming、郭占軍、千葉卓哉、是永龍巳、中山淳、森政之、樋口京一：マウス老化 amyloid 蛋白質(apoA-II) mRNA の発現- *in situ* hybridization 法による解析。第 22 回日本基礎老化学会 (1999.6.16) 京都

e 樋口京一老化促進モデルマウス(SAM)を用いた老化アミロイドーシス発症機構の解析。第 42 回日本神経学会、ワークショップアミロイドーシスの分子病理；アミロイド線維形成機序と治療戦略 (1999.9.16) 広島

f 王静、松下隆壽、小岸久美子、夏晨、千葉卓哉、中村明宏、森政之、細川昌則、樋口京一：SAMP1 の促進老化と apoA-II 遺伝子；B 型 apoA-II は促進老化を改善できない。第 15 回老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会

(1999.7.8) 徳島

g Xing Yanming, 中村明宏、是永龍巳、小岸久美子、細川昌則、樋口京一：マウス老化アミロイドーシス伝播における糞の役割。第 15 回老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会(1999.7.8) 徳島

h 梅澤眞樹子、新真由美、小部真紀、安井佐和美、樋口京一、松下隆壽、細川昌則：食餌脂肪の老化アミロイド沈着への影響。第 15 回老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会(1999.7.9) 徳島

G. 知的所有権の取得状況

無し

厚生省科学研究費補助金　（特定疾患対策研究事業）
アミロイドーシスに関する研究　分担研究報告書

動脈硬化における Serum Amyloid P Component の役割に関する研究

分担研究者　由谷親夫　国立循環器病センター　部長
共同研究者　李祥安、畑中薫、下門顕太郎　　国立循環器病センター

研究要旨 目的：SAP は肝臓で合成される pentraxin family に属する血清蛋白である。本研究ではヒト動脈硬化巣での SAP の有無およびその存在形式を検討した。方法：ヒト剖検例より得た大動脈（10 名）を、抗 SAP 抗体による免疫組織化学により SAP の存在を検討した。Ca または EDTA を含むバッファー、次いでコラゲナーゼ処理により SAP を抽出し、electroimmunoassay により定量、Western blot, gel filtration, ligand blotting により検討した。また solid phase ELISA によりリポ蛋白との結合を検討した。結果：1）SAP は動脈硬化内膜に多く存在し、若年者の正常動脈には検出されなかった。その含量は動脈硬化の程度（コレステロール含量）と相関（$P<0.05$）した。2）Ligand blotting により動脈硬化巣の可溶性分画に 43Kd の SAP 結合蛋白の存在がしめされた。3)リポ蛋白のうち、HDL と VLDL と SAP は特異的に結合したが、LDL とは結合しなかった。考察：SAP が動脈硬化の進展にしたがって動脈内に増加することから、動脈硬化の進展に SAP が関与する可能性が考えられる。

A. 研究目的

SAP は肝臓で合成される pentraxin family に属する血清蛋白である。系統発生の過程で良く保存されていること、多くの蛋白と結合すること、急性炎症で増加し、そのノックアウトマウスは amyloid 沈着が少ないなどの事実から生体機能維持に重要であると予想されるが、その機能は不明のままである。本研究ではヒト動脈硬化巣での SAP の有無およびその存在形式を検討した。

B. 研究方法

ヒト剖検例より得た大動脈を、抗 SAP 抗体による免疫組織化学により SAP の存在を検討した。Ca または EDTA を含むバッファー、次いでコラゲナーゼ処理により SAP を抽出し、electroimmunoassay により定量、Western blot, gel filtration, ligand blotting により検討した。また solid phase ELISA によりリポ蛋白との結合を検討した。

C. 結果

（1）SAP は動脈硬化内膜に多く存在し、若年者の正常動脈には検出されなかった。

その含量は動脈硬化の程度（コレステロール含量）と相関（$p<0.05$）した。とりわけ内膜可溶性 SAP 含量、およびコラゲナーゼ処理後に抽出される中膜中の含量と動脈硬化の程度は良く相関した。

（2）Ligand blotting により動脈硬化巣の可溶性分画に 42Kd の SAP 結合蛋白の存在がしめされた。（3）リポ蛋白のうち、

HDL と VLDL と SAP は特異的に結合したが、LDL とは結合しなかった。脱脂により SAP と HDL の結合は減弱した。

D. 考察

SAP が動脈硬化の進展にしたがって動脈内に増加することから、動脈硬化の進展に SAP が関与する可能性が考えられる。SAP は血管壁の分子に結合して正常の機能を阻害するかもしれないし、他の急性反応蛋白が炎症で果すような役割を慢性炎症反応としての動脈硬化の進展において果すかもしれない。

E. 結論

動脈壁内 SAP は動脈硬化の進行にしたがい増加する。

F. 研究発表

1．論文発表

Li XA, Yutani C, Shimokado K. Serum amyloid P component associates with high density lipoprotein as well as very low density lipoprotein but not with low density lipoprotein. Biophys Biochem Res Commun. 1998; 244, 249-252.

2．学会発表

Characterization of serum amyloid P component in normal and atherosclerotic human aortic intima. Xiang-An Li, Kaoru Hatanaka, Chiko Yutani and Kentaro Shimokado. Gordon Conference on Atherosclerosis, June 1999. USA

厚生省科学研究費補助金　(特定疾患対策研究事業)
アミロイドーシスに関する研究　分担研究報告書

精嚢アミロイドーシスの免疫組織化学的検討

分担研究者　石原得博　山口大学医学部病理学第一講座教授
共同研究者　瀬戸俊彦、権藤俊一、河野裕夫、星井嘉信
山口大学医学部病理学第一講座

研究要旨　前立腺全摘症例 53 例の精嚢を免疫組織化学的に検索した。精嚢アミロイド(SVA)は 53 例中 13 例(24.5%)にみられた。SVA の頻度は加齢に伴って軽度に増加していた。SVA13 例中 9 例において、過マンガン酸カリ処理抵抗性であった。12 例ではアミロイド沈着部にカルシウムが顆粒状に沈着していた。SVA は抗 lactoferrin、抗 apolipoprotein E および抗 amyloid P component 抗体と反応した。SVA の蛋白は、免疫組織化学的検索結果からではあるが、精嚢上皮細胞が産生した lactoferrin に由来すると推測する。

A. 研究目的

高齢者の精嚢には多量のアミロイドが高い頻度で沈着することが報告されている[1-5]。心房、大動脈、副甲状腺、脳血管、椎間板、関節軟骨などにおいて加齢に伴ってアミロイドの沈着が高頻度にみられることは良く知られているが、精嚢ほどは多量に沈着しない。アミロイド蛋白には現時点では少なくとも 18 種類が報告されている。1990 年にはアミロイド蛋白をもとにアミロイド及びアミロイドーシスの分類が作成され、その後も、改訂がなされている。しかし、精嚢のアミロイド(seminal vesicle amyloid, SVA)はその蛋白が決定されていないためにその分類に含まれていない。精嚢アミロイドは lactoferrin に由来すると考えられているが、その由来については不明な点も多い。SVA の蛋白が lactoferrin か否かについて、早急に明らかにすべきである。さらに、SVA のアミロイド産生機序を明らかにすることは全身性アミロイドーシス発症機序解明の手助けとなる。今回、外科的に摘除した精嚢を用いて SVA の組織化学的および免疫組織化学的検討を行なった。

B. 研究方法

材料としては前立腺全摘術を施行した 53 症例の精嚢を用いた。年齢は 57 歳から 87 歳で、平均年齢は 69.7 歳であった。53 例の前立腺の病理組織診断は 26 例が腺癌で、27 例が増殖症であった。腺癌症例 26 例は 58～87 歳で、平均年齢 72.0 歳で、増殖症 27 例は 57～78 歳で平均年齢 67.5 歳であった。

精嚢からホルマリン固定パラフィン切片を作製しヘマトキシリン・エオシン(HE)、コンゴ赤、過マンガン酸 ($KMnO_4$) 処理コンゴ赤染色、コッサ染色、PAS、Sulfate alcian blue (SAB)と免疫組織化学的染色を行なった。免疫組織化学的染色には一次抗体として抗 lactoferrin 抗体(Dako A/S, Glostrup, Denmark)、抗

amyloid P component(AP) 抗体 (Calbiochem Corporation, La Jolla, CA, USA)、抗 apolipoprotein E(ApoE)抗体 (Dako A/S)を使用した。

C. 研究結果

HE 染色では、症例により沈着程度に差はあるが、好酸性で均質な物質が上皮直下から筋層にかけてびまん性に沈着していた（図１）。その好酸性物質はコンゴ赤染色で、橙赤色に染まり、偏光顕微鏡下で緑色の複屈折を呈し、アミロイドである。13 例中９例の SVA は $KMnO_4$ 処理抵抗性で（図２）、４例が感受性であった。12 例では SVA にびまん性顆粒状のカルシウム沈着が認められた。SVA は 13 例とも抗 lactoferrin 抗体と強く反応し（図３）、精嚢上皮と腺腔内の分泌物も抗 lactoferrin 抗体と反応した。SVA は抗 AP および抗 ApoE 抗体とも反応した。

前立腺癌症例では 26 例中 10 例に、前立腺増生症症例では 27 例中３例に SVA 沈着が認められた。70 歳未満では前立腺癌の 9 例中 2 例に、前立腺増生症の 17 例中 1 例に、70 歳以上では前立腺癌症例の 17 例中 8 例に、前立腺増生症症例の 10 例中 2 例に SVA が認められた。

D. 考察

アミロイド沈着は 53 例中 13 例(24.5%)にみられ、前立腺癌症例では 26 例中 10 例(38.5%)と、増殖症 27 例中３例(11.1%)に比し頻度が高い。しかし、年齢を加味すると統計学的には SVA の頻度は前立腺の疾患よりも加齢との関係が強くみられた。本報告における SVA の頻度は剖検症例による他の報告の７～17％より頻度がやや高い。Bursell は 50 歳以上で 16.9%、Goldman[1]は 99 例の検索から 9.1%と、Pitkanen ら[2]は 46 歳以上で 16.3%で、75 歳以上では 21%と報告している。SVA の検索は剖検症例での検索がほとんどで、本報告のように手術症例での広範な検索はなされていない。

SVA は $KMnO_4$ 処理感受性であると報告されているが、今回の検索では 13 例中９例が抵抗性であった。AA、AL、Aβ2M 等の他のアミロイドと異なり 13 例中 12 例において主として、アミロイド沈着部に顆粒状のカルシウムがびまん性に認められた。このカルシウムは、既に指摘されている Apo E や SAP[6]と同様に血液中から由来しアミロイド間に沈着したと考える。

Cornwell GGⅢら[3]は SVA から抽出したアミロイドが 14kDa の蛋白であり、その蛋白に対する抗体は SVA や正常の精嚢上皮細胞と反応することを明らかにした。Tsutsumi ら[5]は３例の SVA を免疫組織化学的に検索し、その SVA が lactoferrin と反応すると報告した。生化学的にアミロイド蛋白を同定する必要があるが、免疫組織化学的には SVA は lactoferrin 由来と推測する。

E. 結論

SVA のアミロイドの多くが $KMnO_4$ 処理抵抗性で、免疫組織化学的のは抗 lactoferrin 抗体と反応し、SVA のアミロイドは精嚢上皮が産生した lactoferrin に由来することが示唆された。

文献

1) Goldman H. Amyloidosis of seminal vesicles and vas deferens: Primary localized cases. Arch. Pathol., 75: 94-98, 1963.

2) Pitkanen P, Westermark P, Cornwell GG Ⅲ, Murdoch W. Amyloid of the seminal vesicles. A distinctive and common localized form of senile amyloidosis. Am J