

厚生省特定疾患対策研究事業

# アミロイドーシスモデル動物における 発症機序の解明に関する研究

1999年度研究報告書

2000年3月

主任研究者 石原得博

厚生省特定疾患対策研究事業

# アミロイドーシスモデル動物における 発症機序の解明に関する研究

## 1999年度研究報告書

**ANNUAL REPORT OF THE RESEARCH ON THE  
PATHOGENESIS OF THE AMYLOIDOSIS ON THE EXPERIMENTAL  
ANIMAL MODELS, SURVEYS AND RESERCH ON SPECIFIC DISEASE,  
THE MINISTRY OF HEALTH AND WELFARE OF JAPAN**

2000年 3 月

March 2000

主任研究者 石 原 得 博

山口大学医学部病理学第一講座

Chairman: Tokuhiko ISHIHARA

The First Department of Pathology, Yamaguchi University School of Medicine

## 目 次

平成11年度総括研究報告 .....	5
平成11年度分担研究報告 .....	9
平成11年度事業報告 .....	55
平成11年度研究班班員名簿 .....	59
研究成果の刊行に関する一覧表 .....	63

アミロイドーシスモデル動物における  
発症機序の解明に関する研究  
平成11年度  
総括研究報告

石 原 得 博

山口大学医学部病理学第一講座

# 総括研究報告

## 研究目的

アミロイドーシスはその希少性と難治性ゆえに、動物実験モデルの必要性が高い。また、プリオン病にみられるような、外来性の異常蛋白（線維）の発症促進効果が注目される中で、老化促進マウスではAApoA II アミロイド線維の経口投与でアミロイドーシス発症が促進されることが、樋口等により報告されている。本年度は老化促進マウスのみでなく、実験的にAAアミロイドーシスおよびA $\beta$ アミロイドーシスモデル動物においてアミロイドの伝播の可能性について検討する。また、血清アミロイドP成分(SAP)ノックアウトマウス及びFAPモデルマウスを用いて遺伝性アミロイドーシス発症機構の解析を行う。さらに、各種粗製アミロイド線維のamyloid enhancing factor (AEF) について検討する。

## 研究成果

1：老化マウスアミロイドーシスにおけるアミロイドーシスの感染性についての検証と感染機構についての解析

老齢R1.P1-*Apoa2*<sup>c</sup>マウス糞のアミロイド線維画分からapoA-II蛋白質を抽出し、この画分をマウス腹腔内に投与するとアミロイドが誘発された。このことは糞を介したアミロイド線維の伝播の可能性を示している。合成A $\beta$ 1-40から形成されたアミロイド線維やヒトFAPのアミロイド線維 (ATTR) をR1.P1-*Apoa2*<sup>c</sup>マウスに静注するとアミロイド沈着 (AApoA II) が誘発され、アミロイド蛋白質や動物種の相違を越えた共通したアミロイド線維構造が鋳型になりアミロイド線維形成を*in vivo*で促進する可能性が示された。マウス老化アミロイドーシスの*in vitro*での線維伸長反応がrifampicinやNDGA等の抗酸化剤で阻害された。現在 R1.P1-*Apoa2*<sup>c</sup>マウスにアミロイドーシスを誘発し、rifampicinやNDGAを慢性的に投与してその効果を検討中である。

2：実験的AAアミロイドーシスにおけるアミロイド

ド伝播の可能性について

マウスAAアミロイドーシスの肝臓から水抽出した粗製AAアミロイド線維を胃ゾンデでマウスに投与した。対照としては蒸留水を用いた。10回連日投与終了後、3～5週間後にアミロイド惹起物質を注射し3日目に屠殺した。実験群では15匹中14匹にアミロイド沈着を認め、対照群では15匹全例に沈着は認められなかった。粗製アミロイド線維の経口投与によりアミロイドーシス発症が促進する可能性が示唆された。

3：アルツハイマー病における脳A $\beta$ アミロイドの形成機序や感染性について

脳アミロイド沈着と記憶・学習障害を認めるtransgenic mice (APPsw) を用いて易感染性を評価出来るシステムの基礎的検討を行った。1) APPswでは8ヶ月からA $\beta$ が加速的に増加して、組織学的にも脳アミロイドが出現し、老人斑出現部位には神経細胞減少とリン酸化tauが出現した。行動異常は脳A $\beta$ アミロイドと関連していた。このことからAPPswは脳アミロイド感染を評価するモデルと考えられた。また、実際に脳アミロイド感染が可能かどうかの評価方法を次の実験で検討した。2) 蛍光標識A $\beta$ による*in situ* amyloidogenesisではAPPsw脳の老人斑の染色を試みた。3) <sup>125</sup>I radioisotopeラベルしたA $\beta$ 40/42を作製し、動脈注射によりblood brain barrierを通過して脳アミロイドに取り込まれるか、基礎的検討を行った。4) アルツハイマー脳からflow cytometryを用いて老人斑アミロイドコアを精製する方法を検討し、APPswの脳に投与する基礎的検討を行った。以上のことから、A $\beta$ アミロイドが実際にヒトの脳や硬膜、血液などから感染が成立する可能性を従来より非常に敏感な動物モデルを用いることによって検討できる。

4：各種の粗製アミロイド線維のamyloid enhancing factor (AEF) についての病理学的研究

アミロイドーシス沈着臓器からの抽出物中には実験的マウス・アミロイドーシスの前アミロイド期を著しく短縮させる作用がある物質が存在し、

そのような物質に対してAEFと呼びならわしているが、その詳細は未だ不明である。AEFはアミロイド線維とは異なる物質と考えられているが、アミロイド線維自体にもAEF活性が存在することが報告されている。そこで種々の動物に沈着した粗製アミロイド線維を抽出し、マウスに投与してそのAEF活性の有無を調べた。粗製アミロイドを抽出した白鳥、牛、マウスのアミロイドは抗AA抗体と免疫組織化学的に反応し、AAアミロイドであった。ヒトではAA、AL (A $\kappa$ , A $\lambda$ ) が沈着した患者臓器およびカルシトニン由来のアミロイドが沈着していた甲状腺髄様癌患者の甲状腺から抽出した粗製アミロイド線維を用いた。マウス1匹あたり1mgのアミロイド線維を注射し、0.5mlのカゼイン・アジュバント (10%カゼインとcomplete Freund's adjuvantの等量懸濁液) をマウス皮下に注射し、7日目に屠殺した。脾臓を摘出し、アミロイド沈着の有無を調べた。白鳥、牛、マウスのAAアミロイドを注射した3匹中の2匹、ヒトAA、A $\lambda$ では3匹中の2匹、カルシトニン由来アミロイドでは3匹中の2匹のマウス脾臓にアミロイドの沈着を認めた。A $\kappa$ を注射したマウスでは3匹中のいずれにもアミロイド沈着は認めなかった。

種属の異なる動物から抽出したAAアミロイドにマウスの実験的AAアミロイドーシスを促進させる効果があった。また、ヒトのA $\kappa$ アミロイドには今回の実験ではこの様な効果はなかったが、A $\lambda$ およびカルシトニン由来アミロイドには同様の促進効果を認めた。この事は種属、種類が異なってもアミロイド線維にAEF活性があると思われた。AAアミロイドとは種類の異なるアミロイド線維が、何故AAアミロイドーシスを促進するのか今後、明らかにする必要がある。

5: 無血清アミロイドP成分 (SAP) マウスを用いたSAP機能の解析

無SAPマウスではAAアミロイドーシスの発症が遅れるため、他のアミロイドーシス発症のモデルマウスと交配して、血中のSAPレベルを下げることによりアミロイドーシスの発症を遅らせることが出来るか否かについて検討する。

SAPおよびトランスサイレチン (TTR) の遺伝

性アミロイドーシス発症に及ぼす効果の解析: 無SAPマウスとFAPの疾患モデルマウスとを交配させ、SAPを完全に欠損しFAPの病因となるヒトTTRMet30を合成するマウス株と、SAPとヒトTTRMet30の双方を合成する従来の疾患モデルマウス株を得た。そして、9ヶ月齢のこれらマウス各6匹におけるヒトTTRからなるアミロイド沈着の有無を調べたが、未だアミロイド沈着を認めなかった。一方TTRは、*in vitro*でA $\beta$ アミロイドの沈着を抑制することが見いだされているが、*in vivo*での証明はされていない。APPswマウスと無SAPマウスまたは無TTRマウス株と交配をさせて得られるTTR又はSAPを完全に欠損したAPPswマウスと対照野生型APPswマウスとを多数同定し、脳内A $\beta$ アミロイド沈着の開始時期や程度を月齢を追って比較解析する計画である。

6: FAPの新たなモデルマウス作製の試み

ヒトttrMet30遺伝子で惹起されるFAPは、30~40歳台で発症し、十数年後に死の転帰をとる。一方、ttrPro55遺伝子やttrLys54遺伝子は、20~30歳台で死亡する若年発症の激症型FAPを惹起する。これらの遺伝子のトランスジェニックマウス作製を試みる。

## まとめ

3年計画の初年度であるが、アミロイドーシスモデル動物に関する各研究者の現在までの研究のまとめに加えて、新しい結果が出つつあり、次年度からの成果が期待出来る。

## 今後の研究計画

1. 各種アミロイドーシスの伝播の可能性について、さらに検討する。
2. AA、TTRおよびA $\beta$ アミロイドーシス実験モデルにおいて発症機序を明らかにする。
3. Amyloid enhancing factor (AEF) の本態を明らかにする。
4. 新しいFAPモデルを開発する。
5. ALアミロイドーシスの動物モデルを開発する。
6. A $\beta$ 2Mアミロイドーシス (透析アミロイドーシス) の実験モデルの開発を試みる。

# 平成11年度研究報告

## 目 次

アミロイドーシス研究におけるモデル動物の歴史と概念 .....	15 山口大学医学部病理学第一講座 石原得博, 河野裕夫
AAアミロイド線維の経口投与によるマウスAAアミロイドーシス発症促進効果についての検討 .....	20 山口大学医学部病理学第一講座 石原得博, 崔 丹, 河野裕夫
変異導入マウスを用いた遺伝性アミロイドーシス発症機構の解析 .....	23 山梨医科大学医学部生化学第一講座 前田秀一郎, 玉置寿男, 伊藤禎洋, 岡田芳家 山梨医科大学医学部精神神経科学講座 神庭重信 山口大学医学部病理学第一講座 河野裕夫, 石原得博 山梨医科大学医学部臨床検査医学講座 坂本美穂子, 尾崎由基男
マウスAApoAIIアミロイドーシスを用いたアミロイドーシス伝播機構の解析 .....	29 信州大学医学部加齢適応研究センター脈管病態分野 樋口京一, Xing Yanming, 是永龍巳, 千葉卓哉, 傅 麗, 中村明宏, 森政之 京都大学再生医科学研究所再生誘導研究分野 松下隆壽, 小岸久美子, 細川昌則
脳A $\beta$ アミロイドーシスモデル動物によるA $\beta$ アミロイド伝播性の基礎的検討 .....	34 群馬大学医学部神経内科 東海林幹夫, 針谷康夫, 富所康志, 池田将樹, 金井光康, 松原悦朗, 瓦林毅, 岡本幸市 東京都立神経病院 平井俊策
各種の粗製アミロイド線維のamyloid enhancing factor (AEF) 効果 .....	39 社会保険小倉記念病院病理科 横田忠明 山口大学医学部病理学第一講座 河野裕夫, 石原得博, 権藤俊一, 星井嘉信 山口大学医学部附属病院病理部 高橋陸夫, 瀬戸口美保子
実験的アミロイドーシスの発症機序 .....	42 山口大学医学部附属病院病理部 高橋陸夫
ALアミロイド蛋白の分子生物学的解析 .....	46 山口大学医学部附属病院病理部 瀬戸口美保子 山口大学医学部病理学第一講座 河野裕夫, 石原得博



限局性ALアミロイドーシス症例の形質細胞初代培養の試み .....	50
山口大学医学部病理学第一講座	星井嘉信, 河野裕夫, 崔丹, 石原得博
山口大学医療技術短期大学部	上田順子, 岩田隆子
山口大学部附属病院病理部	瀬戸口美保子
小郡第一総合病院耳鼻科	増満洋一

## CONTENTS

History and introduction of animal model on amyloidosis ..... Tokuhiro ISHIHARA Hiroo KAWANO First Department of Pathology, Yamaguchi University School of Medicine	15
Induction of accelerated experimental amyloidosis by dietary exposure to semi-purified murine AA amyloid fibrils ..... Tokuhiro ISHIHARA Hiroo KAWANO, Dan CUI First Department of Pathology, Yamaguchi University School of Medicine	20
Analysis of molecular basis of familial amyloidoses by using the mice carrying targeted mutations ..... Shuichiro MAEDA* Toshio TAMAOKI***, Hiroo KAWANO***, Mihoko SAKAMOTO****, Yoshiie OKADA*, Sadahiro ITO*, Shigenobu KANBE**, Yukio OZAKI****, Tokuhiro ISHIHARA*** *Department of Biochemistry, Yamanashi Medical University **Department of Neuropsychiatry, Yamanashi Medical University ***First Department of Pathology, Yamaguchi University School of Medicine ****Department of Clinical and Laboratory Medicine, Yamanashi Medical University	23
Analysis of the Transmission of Amyloidosis Using Mouse AApoAII Amyloidosis (AApoAII) ..... Keiichi HIGUCHI* Xing YANMING*, Tatsumi KORENAGA*, Takuya CHIBA*, Fu LI*, Akihiro NAKAMURA*, Masayuki MORI*, Takatoshi MATSUSHITA**, Kumiko KOGISHI**, Masanori HOSOKAWA** *Department of Aging Angiology, Research Center on Aging and Adaptation, Shinshu University School of Medicine **Field of Regeneration Control, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University	29
Basic analysis of transmissibility of brain amyloid $\beta$ protein amyloidosis- Study of transgenic mice overexpressing $\beta$ APP with Swedish mutations ..... Mikio SHOJI* Yasuo HARIGAYA*, Yasushi TOMIDOKORO*, Masaki IKEDA*, Mitsuyasu KANAI*, Etsuro MATSUBARA*, Takeshi KAWARABAYASHI*, Koichi OKAMOTO*, Shunsaku HIRAI** *Department of Neurology, Gunma University School of Medicine **Tokyo Metropolitan Neurological Hospital	34

<p>Amyloid enhancing factor activity of several crude-amyloid fibrils .....</p> <p>Tadaaki YOKOTA*</p> <p style="padding-left: 40px;">Hiroo KAWANO**, Tokuhiko ISHIHARA**, Toshikazu GONDO**, Yoshinobu HOSHII**, Mutsuo TAKAHASHI***, Mihoko SETOGUCHI***</p> <p style="padding-left: 40px;">*Department of Pathology, Kokura Memorial Hospital</p> <p style="padding-left: 40px;">**First Department of Pathology, Yamaguchi University School of Medicine</p> <p style="padding-left: 40px;">*** Department of Surgical Pathology, Yamaguchi University Hospital</p>	<p>39</p>
<p>Amyloidogenesis in experimental AA amyloidosis .....</p> <p>Mutsuo TAKAHASHI</p> <p style="padding-left: 40px;">Department of Surgical Pathology, Yamaguchi University Hospital</p>	<p>42</p>
<p>Molecular biological analysis of AL amyloid protein .....</p> <p>Mihoko SETOGUCHI*</p> <p style="padding-left: 40px;">Hiroo KAWANO**, Tokuhiko ISHIHARA**</p> <p style="padding-left: 40px;">*Department of Surgical Pathology, Yamaguchi University Hospital</p> <p style="padding-left: 40px;">**First Department of Pathology, Yamaguchi University School of Medicine</p>	<p>46</p>
<p>An experiment of primary culture of the plasma cells obtained from amyloid deposited tissues in a localized AL amyloidosis case .....</p> <p>Yoshinobu HOSHII*</p> <p style="padding-left: 40px;">Junko UEDA**, Mihoko SETOGUCHI***, Hiroo KAWANO*, Dan CUI*, Takako IWATA**, Yoichi MASUMITSU****, Tokuhiko ISHIHARA*</p> <p style="padding-left: 40px;">*First Department of Pathology, Yamaguchi University School of Medicine</p> <p style="padding-left: 40px;">**The School of Allied Health Science, Yamaguchi University</p> <p style="padding-left: 40px;">***Department of Surgical Pathology, Yamaguchi University Hospital</p> <p style="padding-left: 40px;">****Ogori Daiichi hospital</p>	<p>50</p>

## アミロイドーシス研究におけるモデル動物の歴史と概念

研究者 石原得博 河野裕夫

### はじめに

アミロイドーシスは単一の疾患でなく、現在少なくとも18種類のアミロイド蛋白があり、全身性アミロイドーシスのみでも8種類ある(表1)。それぞれ、前駆体蛋白が異なり発症機序も異なるが、共通点もある<sup>1)</sup>。発症機序を解明するためには、人体例のみの検索では限界があり、それぞれのタイプにおいてモデル動物が必要である。そのうちAA, ApoA II, TTRおよびA $\beta$ アミロイドーシスにはモデル動物が報告されているが、ヒトの疾患に極めて類似したよりよいモデル動物を作製し、さらにそのモデル動物を用いてアミロイドーシス発症機序を解明することが必要である。本論文では現在までに報告されているモデル動物について簡単に紹介する。

### 実験的AAアミロイドーシス：

アミロイドーシスの惹起方法については、既に1895年に生菌の投与によるものが報告されて以来多くの方法があるが<sup>2)</sup>、代表的なものとしては毒素：菌体毒素(1903)、カゼイン(1922)、アゾカゼイン(1966)、生体色素(1972)、重金属(1926, 1972)、血清、臓器の抽出物(1967)、パラビーオシス(1959)、薬剤：コーチゾン、ACTH(1952)やRamらの方法(1968)<sup>3)</sup>がある。現在ではカゼイン及びRamらの方法(表2)がよく使われている。Ramらの方法では、投与後約1週間でマウスにAAアミロイドーシスが発症する。横田ら<sup>4)</sup>が詳細に報

山口大学病理学第一講座

告しているが、amyloid enhancing factor (AEF)とアミロイド惹起物質を投与すると、早いものでは36時間でアミロイドの沈着がみられる。

### 自然発症アミロイドーシス：

マウス<sup>5)</sup>、ネコ、イヌ、ウシ<sup>6)</sup>、ウマ、アヒルや白鳥にAAアミロイドーシス、マウスにAApoA IIアミロイドーシス<sup>7)</sup>の発症が、さらにイヌに形質細胞腫に合併したALの発症<sup>8)</sup>が報告されている。AApoA IIアミロイドーシスについては竹田、樋口ら<sup>7)</sup>の詳細な報告があるので、それを参考にして欲しい。

### トランスジェニックマウス(TTR, A $\beta$ )：

近年トランスジェニックマウス作製の技術が進歩し、多くの分野で病因の解明に使用されている。アミロイドーシスの研究分野においても、家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)の動物モデルとして30番目のバリンをメチオニンに置換したトランスサイレチン(TTR)を過剰に発現するトランスジェニックマウスが作製された<sup>9)</sup>。このマウスには約1年でTTR由来のアミロイドが沈着するが、FAP患者と異なって末梢神経には沈着がみられない。前田ら<sup>10)</sup>はFAPのよりよいモデルとしてマウスのTTRをノックアウトし、ヒトの変異TTRを過剰発現する実験モデルを作製した。ヒトTTR由来のアミロイドの沈着は認められたが、末梢神経への沈着はみられなかった。

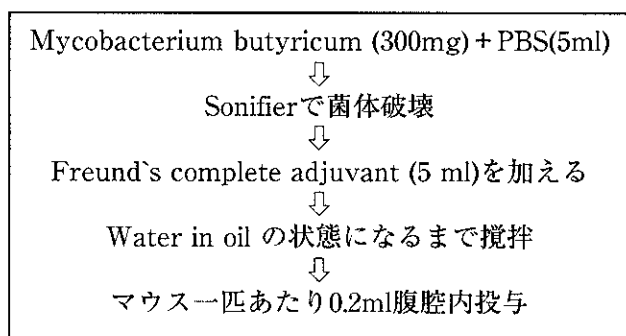
A $\beta$ アミロイドーシスのトランスジェニックマ

表1 アミロイドーシスの分類 (厚生省特定疾患調査研究班新分類一部改変)

アミロイドーシスの病型	アミロイド蛋白	前駆体蛋白
I 全身性アミロイドーシス		
1、免疫グロブリン性アミロイドーシス		
1) ALアミロイドーシス	AL	L鎖 ( $\kappa$ 、 $\lambda$ )
2) AHアミロイドーシス	AH	IgG1 ( $\gamma$ 1)
2、反応性AAアミロイドーシス	AA	アポSAA
3、家族性アミロイドーシス		
1) FAP*I	ATTR	トランスサイレチン
2) FAP II	ATTR	トランスサイレチン
3) FAP III	AApoAI	アポA I
4) FAP IV	AGel	ゲルソリン
5) 家族性地中海熱 (FMF)	AA	アポSAA
6) Muckle-Wells症候群	AA	アポSAA
7) 家族性アミロイドーシス		リゾチーム
8) 家族性腎アミロイドーシス		フィブリノーゲンA $\alpha$
4、透析 (A $\beta$ 2M) アミロイドーシス	A $\beta$ 2M	$\beta$ <sub>2</sub> -ミクログロブリン
5、老人性アミロイドーシス	ATTR	トランスサイレチン
II 限局性アミロイドーシス		
1、脳アミロイドーシス		
1) アルツハイマー型痴呆 (ダウン症候群)	A $\beta$	$\beta$ 前駆体蛋白
2) 脳血管アミロイドーシス	A $\beta$	$\beta$ 前駆体蛋白
3) 遺伝性アミロイド性脳出血 (オランダ型)	A $\beta$	$\beta$ 前駆体蛋白
4) 遺伝性アミロイド性脳出血 (アイスランド型)	ACys	シスタチンC
5) クロイツフェルト・ヤコブ病 ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群	AScr	スクレイピー前駆体蛋白
2、内分泌アミロイドーシス		
1) 甲状腺髄様癌	ACal	(プロ) カルシトニン
2) II型糖尿病・インスリノーマ	AIAPP	IAPP (アミリン)
3) 限局性心房性アミロイド	ANF	心房ナトリウム利尿ペプチド
3、皮膚アミロイドーシス	AD	ケラチン?
4、限局性結節性アミロイドーシス	AL	L鎖 ( $\kappa$ 、 $\lambda$ )

\*FAP：家族性アミロイドポリニューロパチー

表2 Ramらの方法による惹起法



ウスについては、種々の問題があったが、ヒトのアルツハイマー病に類似した病変を発症させるマウスが報告されている。最近、スウェーデンの早期発症型家族性アルツハイマー病の原因となるミスセンス変異をもつヒトのアミロイド前駆体蛋白 (APP) 遺伝子を運ぶトランスジェニックマウスを Mayo ClinicのHsiaoやYounkinらが開発した<sup>10)</sup>。これらは脳に老人斑アミロイドを沈着するトランスジェニックマウスでAPPsw miceとよばれ、脳内に変異β APPを過剰発現し、Aβアミロイド沈着および学習や記憶障害が見られる。8ヶ月齢で大脳皮質や海馬の細胞外に脳アミロイド沈着が出現し、加齢とともに増加する。本報告書の東海林らの報告にもあるが、9~10ヶ月齢から学習記憶障害を認めることが特徴である。このマウス脳には典型的老人斑 (cored plaque), ビマン性老人斑 (diffuse plaque) およびamyloid angiopathyがみられる。cored plaqueは主としてAβ 40, diffuse plaqueはAβ 42, amyloid angiopathyはAβ 40からなり、ヒト脳アミロイドと同じであることが明らかにされている。

アミロイドーシス発症に関連したモデル動物：

アミロイドーシス発症にはアミロイド蛋白のみでなく, amyloid P component (AP), apolipoprotein E (apo E)等の関与が示唆されているので, モデル動物を用いて検討することも発症機序解明の手助けとなる。無SAPマウス<sup>12)</sup> やapoE欠損マウス<sup>13)</sup> を用いてのアミロイドーシス惹起実験が行われ,

SAPもapoEも実験的AAアミロイドーシスの発症においては必ずしも必要ではないことが報告されている。SAPやapoEの欠損により発症時期が少し遅れる傾向にあるので, さらなる検討が必要である。

今後, AAアミロイドの前駆体蛋白であるSAAの肝細胞での産生に関与していると考えられているInterleukin (IL)-6についてもIL-6過剰産生マウスおよびIL-6欠損マウスについてもアミロイドーシス惹起実験を行う必要がある。また, マクロファージに機能異常のみられるop/opマウスなどを用いての実験もアミロイドーシス発症機序の解明に必要である。

#### 今後の目標

新しいタイプのFAP, ALおよびAβ 2Mアミロイドーシスのモデル動物を開発し, さらにそれらの動物を用いてアミロイドーシスの発症機序を明らかにすることが重要である。

#### 文 献

- 1) 石原得博, 高橋睦夫, 権藤俊一, 他. 厚生省特定疾患『アミロイドーシス』—その総論と発症機序に関して— 山口医学 1995;44:297-318.
- 2) 内野文彌, 石原得博, 高橋睦夫, 横田忠明. 実験的アミロイドーシス. 皮膚と全身, 大橋勝編 名古屋出版 pp253-268, 1987.
- 3) Ram JS, De Lellis RA, Glenner GG. Amyloid III. A method for rapid induction of amyloidosis in mice. Int Arch Allergy 1968; 34:201-201
- 4) 横田忠明, 内野文彌. Amyloid enhancing factorについて. 病理と臨床 1993;11:563-568.
- 5) 池上二郎. セミバリアシステムで飼育した高齢ICRマウスの自然発症アミロイドーシスについて 山口医学 1992;41:439-449.
- 6) 藤永良博. 高齢のウシにおけるアミロイドーシスの頻度とその病理組織学的所見 山口医学 1992;41:439-449.
- 7) Higuchi K, Yoneza T, Kogishi K, et al. Purification and characterization of a senile amyloid-related

- antigenic substance (apoSAS<sub>SAM</sub>) from mouse serum: apoSASSAM is an apoA-II apolipoprotein of mouse high density lipoproteins. *J Biol Chem* 1986;261:12834-12840
- 8) Ramos-Vara JA, Takahashi M, Ishihara T, et al. Intestinal extramedullary plasmacytoma associated with amyloid deposition in three dogs: An ultrastructural and immunoelectron microscopic study. *Ultrastruct Pathol* 1998;22:393-400.
  - 9) Yi S, Takahashi K, Naito M, et al. Systemic amyloidosis in transgenic mice carrying the human mutant transthyretin (met 30) gene: pathologic similarity to human familial amyloidotic polyneuropathy Type I. *Am J Pathol* 1991;138:403-412.
  - 10) Kohno K, Palha JA, Miyakawa K, et al. Analysis of amyloid deposition in a transgenic mouse model of homozygous familial amyloidotic polyneuropathy. *Am J Pathol* 1997;150:1497-1508.
  - 11) Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, et al. Correlative memory deficits, A $\beta$  elevation, amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 1996;274:99-102.
  - 12) Togashi S, Lim S, Kawano H, et al. Serum amyloid P component enhances induction of murine amyloidosis. *Lab Invest* 1997;77:525-531.
  - 13) Hoshii Y, Kawano H, Cui D, et al. Amyloid A protein amyloidosis induced in apolipoprotein-E-deficient mice. *Am J Pathol* 1997; 151:911-917.

## History and introduction of animal model on amyloidosis.

by

Tokuhiro ISHIHARA

Hiroo KAWANO

from

First Department of Pathology, Yamaguchi University School of Medicine.

Amyloidosis is a disease caused by the deposit of amyloid proteins in various tissues and organs. To date, 18 amyloid proteins have been identified in humans with systemic or localized amyloidosis. AA amyloidosis derived from serum amyloid A (SAA), AL(A  $\kappa$ , A  $\lambda$ ) from immunoglobulin light chain, including  $\kappa$  and  $\lambda$  type, ATTR from transthyretin (TTR), A $\beta$ 2M from  $\beta_2$ -microglobulin ( $\beta$ 2-M) and ApoA II amyloidosis from apoA II apolipoprotein are mainly classified in systemic amyloidosis.

Animal model is necessary to elucidate the pathogenesis in experimental amyloidosis. In this paper, a history and an introduction of animal model on amyloidosis is described. Since the first description of experimental amyloidosis by bacterial toxin in 1895, various kinds of the method on experimental amyloidosis including of casein and Ram's method, has been reported. Transgenic mouse model of familial amyloidosis and A $\beta$  amyloidosis are also used to elucidate the pathogenesis in amyloidosis.



## AAアミロイド線維の経口投与による AAアミロイドーシス発症促進効果についての検討

研究者 石 原 得 博 崔 丹 河 野 裕 夫

### 研究要旨

粗製マウスアミロイド線維を経口投与することにより実験的AAアミロイドーシスが発症するかどうかについて検討した。AAアミロイドマウスの肝臓または脾臓から粗抽出したアミロイド線維を経口投与し、投与完了直後に炎症刺激を与えたグループでは2/15のマウス脾臓にアミロイド沈着がみられ、投与完了3週間後に炎症刺激を与えたグループでは14/15のマウス脾臓にアミロイド沈着を認めた。粗製マウスアミロイド線維を経口投与した上に炎症刺激を加えると実験的AAアミロイドーシスの発症が促進されたが、アミロイド線維の経口投与のみでは実験的アミロイドーシスは発症しないことが示唆された。

### はじめに

プリオン病では、外部から侵入したプリオンが核になり、構造変換した宿主プリオン蛋白は重合反応を生じ、プリオン病が伝播すると考えられている<sup>1,2)</sup>。また、消化管を経由して牛海綿状脳症(BSE)がヒトに感染することが示唆されている。さらに、老化促進マウスではAApoAⅡアミロイド線維の経口投与によりアミロイドの沈着が誘導、促進されることが報告された<sup>3)</sup>。今回、粗製マウスAAアミロイド線維の経口投与により実験的AAアミロイドーシスの発症促進効果の有無を検討する目的で実験を行った。

### 材料および方法

マウスに0.3M NaHCO<sub>3</sub>に溶解した10%カゼインを連日皮下注射して、AAアミロイドーシスを発症させた。この、AAアミロイドマウスの肝臓および脾臓から水抽出法によりAAアミロイド線維を粗抽出した。粗製AAアミロイド線維を蒸留水で10mg/ml(湿重量)の濃度に希釈し、6~8週齢の雌ICRマウスに10mg/匹を胃ゾンテで週5回、2週間投与した。対照として蒸留水を同じ方法で投与した。

粗製AAアミロイド線維を経口投与したマウスを四群に分け次のようなマウスAAアミロイドーシスの惹起方法を行った。

- I 群：経口投与完了後翌日に *M. butyricum* と adjuvant の混合液を0.2ml皮下に一回投与し、3日後にマウスを屠殺した。
- II 群：経口投与3週間後 *M. butyricum* と adjuvant の混合液を0.2ml皮下に一回投与し、3日後にマウスを屠殺した。
- III 群：経口投与3週間後に0.3M NaHCO<sub>3</sub>に溶解した10%カゼイン0.5mlを7回連日皮下投与後翌日にマウスを屠殺した。
- IV 群：経口投与後に放置し、5週間後にマウスを屠殺した。

脾臓、肝臓、腎臓および消化管のホルマリン固定パラフィン包埋切片を作製し、ヘマトキシリン・エオシンとコンゴレッド染色を行った。コンゴレッド染色標本を偏光顕微鏡で観察し、アミロイド沈着の有無を調べた。

表1 アミロイド線維経口投与によるアミロイドーシス発症についての検討

実験群	アミロイド線維* 投与後放置期間	炎症刺激	アミロイド沈着頻度
I 群	なし	adjuvant混合液	2/15
II 群	3週間	adjuvant混合液	14/15(対照0/15)
III 群	3週間	カゼイン	14/15(対照0/15)
IV 群	5週間	なし	0/9

\*いずれもアミロイド線維を10日間経口投与した。

## 結 果

結果は表1に纏めた。

粗製AAアミロイド線維の経口投与後よりすぐにadjuvant 混合液を投与したグループ（I 群）では15匹中2匹にアミロイド沈着を認めた。AAアミロイド線維を経口投与3週間後adjuvant混合液を投与したグループ（II 群）またはカゼインを投与したグループ（III 群）ではそれぞれ14/15のマウスの脾臓に、症例によっては肝臓あるいは腎臓にもアミロイド沈着がみられた。いずれのマウスでも消化管にはアミロイド沈着を認めなかった。粗製AAアミロイド線維の経口投与のみで5週間後に屠殺したグループ（IV 群）では、アミロイドの沈着を認めなかった。

## 考 察

マウスの粗製AAアミロイド線維の経口投与により実験的AAアミロイドーシスの発症の促進効果を認めた。マウス老化アミロイド線維（AApoA II）をマウスの消化管内に投与することによりアミロイドーシスが伝播すると報告されている。また、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。しかしながら、AAアミロイド線維の消化管を経由した伝播は報告されていない。粗製AAアミロイド線維を経口投与し、5週間放置してもアミロイドーシスの発症を認めなかったが、adjuvant混合液またはカゼインで刺激を加えたグループではアミロイドの沈着がみられた。粗製AAアミロイド線維を経口投与すると同時に炎症刺激を伴うことが実験的AAアミロイドーシスの発症に必要と考えられる。ヒトのAAアミロイドーシスは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。慢性関節リウマチの約10%程度

にAAアミロイドーシスを合併することが報告されているが<sup>4)</sup>、長期間にわたってアミロイド線維様物質の経口摂取することはアミロイドーシス合併の危険因子の一つになる可能性がありうる。粗製AAアミロイド線維の経口投与後から炎症刺激を加えるまでに、ある期間が必要な理由を明らかにするためにはさらなる検討が必要である。

## 結 語

マウスに粗製AAアミロイド線維を経口投与すると、実験的AAアミロイドーシス発症促進効果があることが明らかになった。また、マウスAAアミロイドーシスの発症には炎症刺激が必須であり、アミロイド線維の摂取のみではAAアミロイドーシスは発症しないことが確認された。

## 文 献

- 1) Kocisko DA, Come JH, Priola SA, et al. Cell-free formation of protease-resistant prion protein. Nature 1994;370:471-474.
- 2) Bessen RA, Kocisko DA, Raymond GJ, Nandan S, Lansbury PT, Caughey B. Non-genetic propagation of strain-specific properties of scrapie protein. Nature 1995;375:698-700.
- 3) 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 1998;59-62.
- 4) 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.

Induction of accelerated experimental amyloidosis by dietary exposure to semi-purified murine AA amyloid fibrils

by

Tokuhiro ISHIHARA,  
Hiroo KAWANO, Dan CUI

from

First Department of Pathology, Yamaguchi University School of Medicine

We now report that experimental murine AA amyloid deposition is accelerated by oral administration of the semi-purified murine AA amyloid fibrils. The amyloid fibrils were extracted from amyloid rich liver or spleen of mice. The mice, exposed to dietary murine AA amyloid fibrils for 10 days, was subjected to an inflammatory stimulation after 3 weeks, 3 days after the stimulation the mice were sacrificed for pathological studies. Amyloid deposition in the spleen was found in 14 out of 15 mice. Control mice having inflammatory stimulation only were not showing any amyloid deposit on the 3rd day after the stimulation.

The mice, exposed to the dietary amyloid fibrils but lack for the inflammatory stimulation, were sacrificed after 5 weeks. Amyloid deposition was not found in the mice.

These findings suggest that induction of experimental amyloidosis is accelerated by dietary exposure to AA amyloid fibrils when there is a concurrent inflammatory stimulation.

## 変異導入マウスを用いた遺伝性アミロイドーシス発症機構の解析

研究者 前 田 秀一郎\* 玉 置 寿 男\*\*\* 河 野 裕 夫\*\*\*  
坂 本 美穂子\*\*\*\* 岡 田 芳 家\* 伊 藤 禎 洋\*  
神 庭 重 信\*\* 尾 崎 由基男\*\*\*\* 石 原 得 博\*\*\*

### 目 的

常染色体性優性の遺伝病、家族性アミロイドポリニューロパチー (Familial Amyloidotic Polyneuropathy; FAP)では、血清蛋白質、トランスサイレチン (TTR) の1アミノ酸が置換した異型TTRがアミロイドを形成して全身種々の臓器に沈着する。FAPの病因は、*ttr*遺伝子上の点変異であることが明らかにされているが、発症機構は不明である。現在、FAPの治療法として、TTRの主要産生臓器である患者の肝を切除し、正常肝を移植する方法が行なわれている。肝移植により症状の進行を止めることができ、現在、唯一の有効な治療法である。しかし、肝移植後に主要症状である神経障害がどれほど改善するかについては、今後、長期に亘る検討が必要と考えられる。また、TTRは肝の他、脳の脈絡叢や眼の網膜などで合成されることから肝移植後に硝子体にアミロイドが沈着し、視力障害をきたす場合があること、移植は危険を伴い、ドナーの確保が難しく、多大の費用を要すること、さらに、世界で最も症例数の多いTTR Met30に起因するFAPには有効だが、心のアミロイドが沈着する他の異型TTRに起因する症例では、移植後に心へのアミロイド沈着が増加し続けた無効例が見出されていることなど問題点も多い。

一方、*ttr*遺伝子の同一変異(Met30)に起因しても

発症年齢は、ポルトガル人と日本人の多くは30~40歳台、スウェーデン人は平均56歳と異なっている。また、同一家系内でも、個人によって発症年齢に20~30年にわたる違いがある例がしばしば見出されている。さらに、スウェーデンのFAP家系の人々がアメリカ合衆国に移住して、数世代を経ると早く発症する傾向が認められている。これらのことから発症には、主因となる*ttr*遺伝子変異のほかに、老化、環境因子や他の蛋白質が関与することが予想されている。そこで、FAPの治療法や発症を遅らせる手だてを開発するためには、実験操作の容易なマウスで疾患モデルを作り、発症に関与する因子を明らかにすることが必要と考えられる。先に我々は、FAPの病因であるMet30点変異を持つヒト*ttr*遺伝子をマウス受精卵に注入する方法で、FAPのトランスジェニックマウスモデルを作製した。これらマウスでは、FAP患者と同様の種々の臓器に、ヒト異型TTRから成るアミロイドが沈着する。しかし、この方法ではマウス内在性の*ttr*遺伝子の機能は正常のまま、FAP患者に特徴的な末梢神経へのアミロイド沈着がなく、神経障害を認めない。

そこで本研究では、FAPにより近似したモデルマウスの作製を目指すとともに、既に標的遺伝子組換え法を用いて作製した遺伝子欠損マウスや上記のトランスジェニックマウスモデル等を用いて、FAPにおけるアミロイドの沈着機構を明らかにし、発症に関与する因子を見出して、この遺伝性神経難病の治療法や予防法を確立することを目的とする。

\*山梨医科大学医学部生化学第一講座

\*\*山梨医科大学医学部精神神経科学講座

\*\*\*山口大学医学部病理学第一講座

\*\*\*\*山梨医科大学医学部臨床検査医学講座