

IL-6 抗体を用いた実験的 AA アミロイドーシスの抑制

分担研究者 石原得博 山口大学医学部構造制御病態学講座

共同研究者 河野裕夫、石井文彩、崔 丹、星井嘉信
山口大学医学部構造制御病態学講座

研究要旨 AA アミロイドーシスでは、前駆体蛋白の産生刺激の中で IL-6 が重要な位置を占める事が示されており、我々はこれまでに、Interleukin-6(IL-6)ノックアウトマウスでは、実験的 AA アミロイドーシスが発症しない事を示してきた。今回は、実験的マウス AA アミロイドーシスにおいて、抗 IL-6 抗体を投与する事によって、血中 IL-6 を中和し、アミロイドーシスの発症抑制効果を得る事ができ、AA アミロイドーシスの治療法として IL-6 抗体療法の可能性を示した。

A. 研究目的

AA アミロイドーシスは、慢性関節リウマチや結核などの慢性炎症疾患患者に合併症として発症するもので、一度発症すると、原疾患以上に患者の予後を左右する。そのアミロイド線維の前駆体蛋白は、肝で産生される急性期蛋白 SAA (serum amyloid A protein) であり、種々の炎症刺激下で産生される IL-6, IL-1 β , TNF- α などのサイトカインが産生刺激となる事が分かり、これらを抑制する事により、SAA の産生を低下させアミロイドーシスの発症抑制効果を検討する。ひいては臨床的な治療法としての可能性を探る。

B. 研究方法

Mouse は 8-10 週令メス ICR mouse を使用し、Ram らの方法にしたがって、アミロイド発症刺激としてアジュバントをマウスの腹腔内に投与してアミロイドーシスを発症させた。抗 IL-6 抗体 (Techne 社製、USA) は市販の物を使用した。アミロイドーシス発症刺激マウスに、抗 IL-6 抗体を、0.5 μ g/ml, 5 μ g/ml, 40 μ g/ml を 1ml 連日皮下投与した。0, 1, 3, 5, 7 日目の血清を採取し、7 日目に屠殺し、臓器 (肝、脾、腎) を採取した。血清は、

ELISA kit を用いて、SAA, IL-6, IL-1 β , TNF- α をそれぞれ測定した。臓器はホルマリン固定パラフィン切片とし、HE, Congo Red 染色を行い、アミロイドの沈着を半定量した。対照群には、抗体の代わりに生食を投与した。また、抗体投与時期による変化についても、7 日間の抗体投与を、7 日間連続投与、はじめの 3 日間のみ投与、終わりの 4 日間のみ投与の三群に分けて検討した。

C. 結果

抗 IL-6 抗体 40 μ g/ml 投与群では、7 日目で 7 匹中 1 匹のみにアミロイドの沈着を認め、沈着を認めた固体でも、肝臓脾臓にごく微量の沈着を認めるのみであった。対照群では、すべてにアミロイドの沈着を認め、脾臓の沈着量は多量であった。血清中の IL-6 濃度は、抗体投与群では、対照群に比して上昇していた。SAA 濃度は、抗体投与群の方が低くなっていた。IL-6, IL-1 β 濃度は、いずれの群においても、アジュバント投与後すぐ上昇するが、3 日目に減少しその後再上昇を示すと言う 2 峰性を示した。TNF- α については両群間で差は認めなかった。投与時期に関する検討では、7 日間の後半に投与した

群で、血清 IL-6 濃度は低くなっており、アミロイドの沈着は認めしたがやや量が少なくなっていた。

D. 考察

これまでの検討では、IL-6 ノックアウトマウスでは表に示すように、完全なアミロイド沈着の抑制を示していた。これらのマウスでは、血清 SAA は、炎症刺激の翌日に軽度上昇するのみで、その後すぐに低下していた。SAA mRNA の量も同様の変化を示していた。従って、この実験系では、SAA の上昇は IL-6 に大きく依存している事が考えられた。そこで、血清 IL-6 を中和する事によっても、アミロイドの発症を抑制できると考えて今回の実験を行ったが、十分量の抗体を持続的に投与すると、実験的 AA アミロイドーシス発症において抑制効果がある事がわかった。血清 IL-6 濃度の変化については今後さらに検討する必要があるが、IL-6 中和抗体の epitope と IL-6 ELISA kit の抗体の認識する epitope が異なり、ELISA では中和された抗体も一緒に測定しているのではないかと考えられる。中和抗体の作用で、血清 IL-6 の産生は亢進している事も考えられる。IL-6、IL-1 β 濃度の二峰性については、今後検討が必要である。

E. 結論

IL-6 抗体療法が、実験的 AA アミロイドーシス発症において抑制効果がある事がわかった。今後、血清 IL-6 濃度の変化や、アミロイドの吸収期における、IL-6 抗体療法の効果についてのさらなる検討が必要である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 学会発表リスト

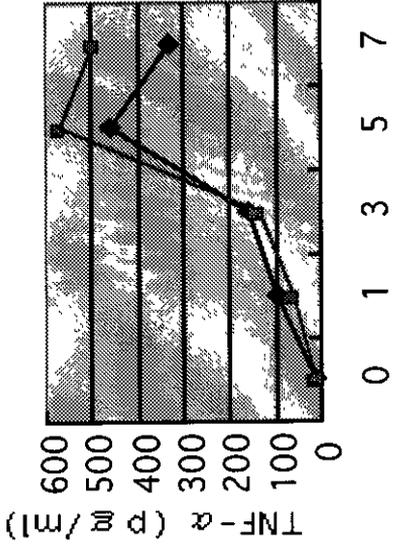
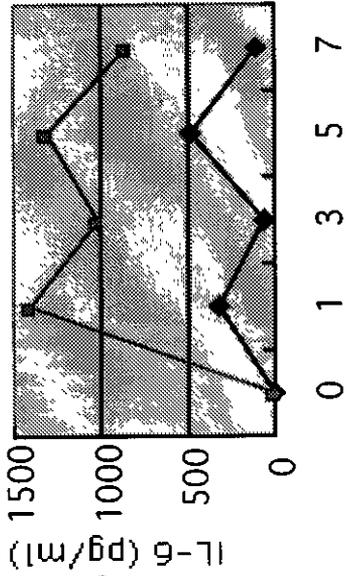
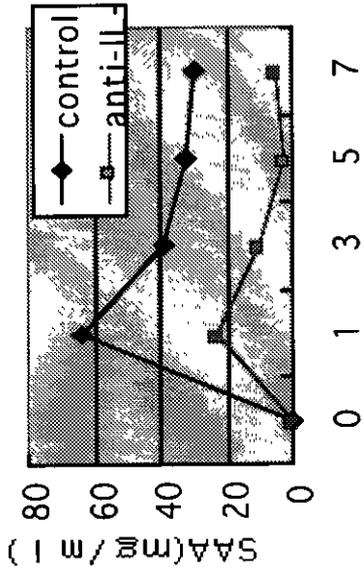
1. 河野裕夫、崔 丹、瀬戸口美保子、石原得博、内野文彌。マウス実験的 AA アミロイドーシスには IL-6 が不

可欠である。第90回日本病理学会総会

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし。
2. 実用新案登録 なし。
3. その他 なし。

抗IL-6抗体投与時における血清SAA, IL-6, TNF- α 濃度変化



Days after i.p. injection of adjvar

Days after i.p.injection of adjuvant

Days after i.p. injection of adju

IL-6 knockout mouse における実験的AAアミロイドーシス

	1日目	3日目	5日目	7日目	10日目
TG. adjuvant投与	0/6	0/5	0/5	0/16	0/29
Control. adjuvant投与	0/6	0/6	0/6	20/27	29/29

(アミロイド発症数/総数)

TG. casein 40 回投与	0/8
Control. casein 40 回投与	2/2

抗体投与時期による血清IL-6濃度の変化

	IL-6濃度 (pg/ml)
連日投与	528
前3日間	460
後4日間	135

n=3 7日目屠殺

抗体投与時期による実験的AAアミロイドーシス

連日	3/3
前3日	3/3
後4日	3/3

*やや少ない

抗IL-6抗体投与による実験的マウスアミロイドーシス

Ab 0.5ug/ml, 1ml 連日腹腔投与	
1日目	0/3
3日目	0/3
7日目	3/3

(アミロイド発症数/総数)

Ab 40ug/ml, 1ml 連日腹腔投与	
cont	Ab
0日目	0/3
1日目	0/3
3日目	0/3
5日目	2/3
7日目	5/5

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
アミロイド沈着による病的要素に関する研究 分担研究報告書

吸収期の実験的マウス AA アミロイドーシスにおける
amyloid P component, apolipoprotein E 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 構造制御病態学講座

共同研究者 崔丹*、高橋睦夫**、権藤俊一***、星井嘉信*、河野裕夫*

*山口大学医学部 構造制御病態学講座(旧病理学第一講座)

**山口大学医学部 保健学科基礎検査学講座

***山口大学医学部 附属病院病理部

研究要旨 マウス AA アミロイドーシス吸収期における amyloid P component (AP)と apolipoprotein E (Apo E)について免疫組織化学的に検討をした。生後 6 週令の AKR マウスに 10%カゼインを連日に注射し、アミロイド沈着を確認し、カゼイン投与を中止した。カゼイン投与を中止した後 4、6、8、12、16 週でマウスを屠殺した。脾臓、肝臓および腎臓について抗 AA、抗 AP、抗 Apo E を一次抗体として LSAB 法で免疫組織化学的に検討した。カゼイン中止後脾臓、肝臓に沈着したアミロイドには吸収傾向がみられたが、腎臓に沈着したアミロイドには吸収が認められなかった。AP とアミロイドの反応は吸収期では経過につれて弱くなるが、逆に Apo E とアミロイドの反応は時期が経つと強くなった。

A. 研究目的

amyloid P component (AP)および apolipoprotein E (Apo E)はアミロイド線維蛋白と共存することが既に知られており、ほかのアミロイド共存蛋白へパラン硫酸プロテオグリカンなどと共に“pathological chaperon”としてアミロイド線維形成において何らかの役割を果たしていることが示唆されている¹⁾。一方、ノックアウトマウスの実験モデルにより AP および Apo E はアミロイド沈着においては必ずしも必要なものではないと報告されている^{2, 3)}。今回、マウス AA アミロイドーシス吸収期における AP と Apo E の動態を観察する目的で免疫組織化学的検討を行った。

B. 研究方法

1. 動物:生後 6 週令の AKR マウスメス 25 匹を、

5つのグループに分けて、1つのグループを 5匹とした。

2. アミロイドーシスの惹起およびアミロイド沈着の確認:マウスに 0.3M の NaHCO₃ に溶解した 10%カゼインを 0.5ml、一日一回連日皮下注射し、アミロイドーシスを惹起した。カゼイン投与 6 週後、10%ネンブタール(0.1ml/10mg)麻醉下で脾臓と肝臓の一部分を採取し(生検)、ホルマリン固定後 HE、Congo red 染色によりアミロイド沈着を確認し、カゼイン投与を中止した。カゼイン投与を中止した後 4、6、8、12、16 週でマウスを心臓から採血後屠殺し、脾臓、肝臓および腎臓を摘出した。

3. 各症例については抗 AA、抗 AP、抗 Apo E を一次抗体として LSAB 法で免疫組織化学的に検討した。アミロイド沈着期と吸収期での AP、Apo E

の分布について比較検討した。

4. 血清 SAA 濃度の測定：アミロイド沈着期とアミロイド吸収期の血清を採取し、ELISA で血清 SAA 濃度を測定した。

(倫理面への配慮)

実験に供したマウスの飼育状態が良好な環境になるように、また実験、屠殺に際しては苦痛が最小限になるように配慮し、山口大学医学部動物実験委員会の承認の下に、山口大学医学部の動物実験に関する指針に沿って行った。

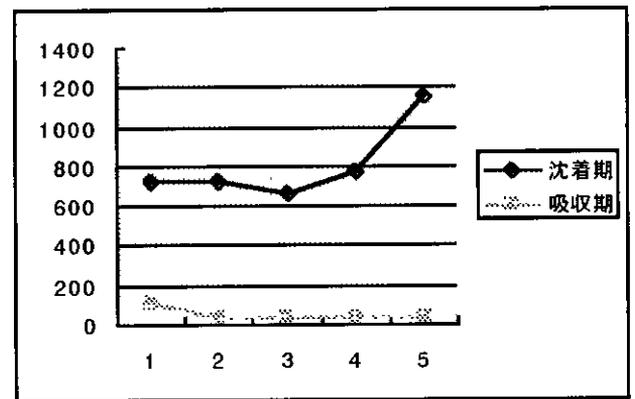
C. 研究結果

1. アミロイドの吸収程度：

生検時では全例の脾臓濾胞周辺帯に、または肝臓の Disse 腔、血管壁に大量のアミロイド沈着がみられたが、吸収期ではアミロイドは肝臓においてよく吸収される傾向がみられた。カゼイン投与中止後 12 週目では脾臓の濾胞周辺帯に沈着したアミロイドの著明な吸収がみられた。腎臓のアミロイドについてはカゼイン中止後 4、6、8、12、16 週の屠殺時のマウスほとんどの尿細管に少量から大量のアミロイドの沈着がみられた。

2. 免疫染色の結果：生検時の肝臓および脾臓では抗 AP 抗体はアミロイドと一致して、強く反応したが、吸収時の脾臓のアミロイド、特に肝のアミロイドは抗 AP 抗体との反応が減弱した (Fig 1.)。一方、生検時の肝臓および脾臓のアミロイドは抗 Apo E 抗体との反応性が弱かったが、吸収時の脾臓、肝臓のアミロイドは抗 Apo E 抗体との反応性が著明に増強した (Fig 2.)。

3. 血清 SAA 濃度：カゼインを投与している間に血清の SAA は $700 \mu\text{g/ml}$ 以上に維持されていたが、カゼイン中止後 6 週目から、SAA 濃度は正常値に近いレベル ($30 \mu\text{g/ml}$ 程度) まで下がった (Fig 3.)。



D. 考察

近年、アミロイド線維形成、分解におけるアミロイド共存蛋白 amyloid P component (AP) および apolipoprotein E などが注目を浴びている。アミロイド組織から分離した粗製アミロイドを EDTA などで処理すると autolysis を起こす例が知られているが、これは AP が除かれたことによりアミロイド線維を分解しやすくなったためとも考えられる。今回の実験では AP とアミロイドの反応がアミロイドの吸収の進行につれて、減弱し、特に肝臓においてはこの変化が著明であった。一方、ApoE はアミロイドの吸収段階においては、反応が増強した。アミロイドの吸収のさらに時期が経つと血中の ApoE がさらにアミロイドに沈着してくるか、それとも ApoE が吸収の阻害因子の一つとして考えられるか、さらに検討する必要がある。アミロイドの吸収期において AP と ApoE との反応性が異なるのは AP と ApoE がアミロイド線維の形成とアミロイド線維の吸収にそれぞれ異なる役を果たしている可能性が強い。

E. 結論

実験的 AA アミロイドーシスにおいては、原因を除くことによって、一旦沈着したアミロイドが吸収され、特に肝臓のアミロイドはより早く吸収された。アミロイド吸収の時期において AP と ApoE との染色態度が違う事は、AP と ApoE

がアミロイド線維の形成、アミロイド線維の吸収において、異なる役割を果たしている可能性を示唆した。

- 2. 実用新案登録
なし
- 3. その他
なし

[引用文献]

- 1) Christoph R, Ann S, Pathology, diagnosis and pathogenesis of AA amyloidosis. Virchows Archiv 440, 112-122 (2002).
- 2) Hoshii Y, Kawano H, Cui D, Takeda T, Gondo T, Takahashi M, Kogishi K, Higuchi K, Ishihara T. Amyloid A protein amyloidosis induced in apolipoprotein-E-deficient mice. America Journal of Pathology. 151, 911-917 (1998)
- 3) Usui I, Kawano H, Ito s, Hamada Y, Ishihara T, Meada S. Homozygous serum amyloid P component-deficiency does not enhance regression of AA amyloid deposits. Amyloid: J Protein Folding Disord 8, 101-104 (2001)

F. 健康危険情報

AA アミロイドーシスにおいては、原因を除くことによって、一旦沈着したアミロイドが吸収される可能性がある。

G 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

第91回日本病理学会総会 発表

日本病理学会会誌第91巻第1号

P 240. 2002年2月28日発行

H 知的財産権の出願、登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

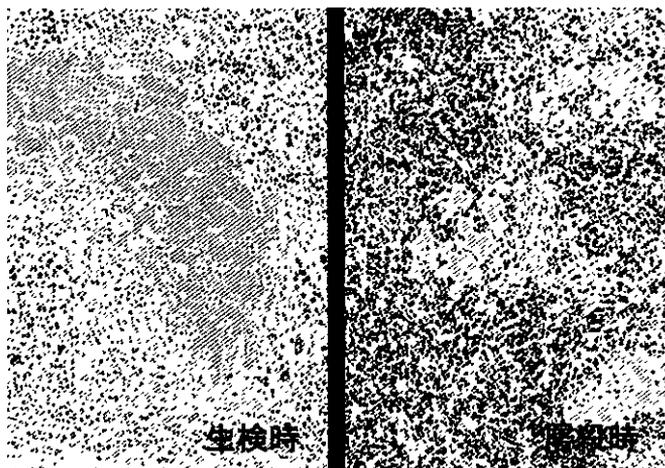


Fig 1. APの免疫染色の結果で、生検時では濾胞周辺帯に沈着したアミロイドは抗AP抗体と強く均一に反応したが、屠殺時ではAPとアミロイドの反応は弱くなった。

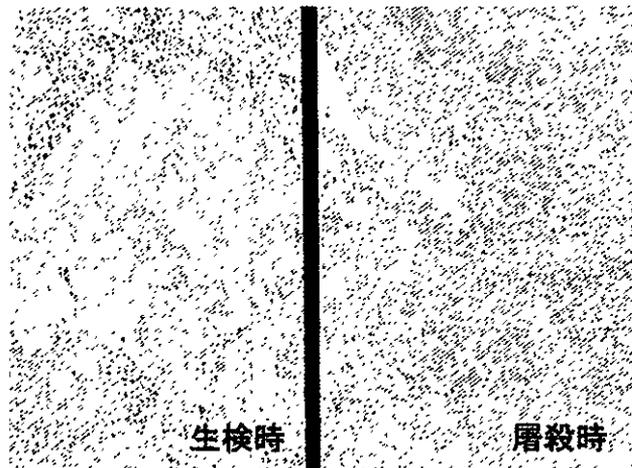


Fig 2. Apo Eの免疫染色の結果で、生検時では濾胞周辺帯に沈着したアミロイドは抗Apo E抗体との反応は弱かったが、屠殺時では、抗Apo抗体は残されたアミロイドと強く反応した。

飼育下チーター（*Acinonyx jubatus*）のアミロイド症

分担研究者 石原 得博 山口大学医学部構造制御病態学講座
共同研究者 宇根 有美 麻布大学獣医学部病理学研究室

研究要旨 チーターのアミロイド症を疫学的、病理学的に検索し、病理発生を解明し、併せて、ヒトの AA アミロイド症のモデル動物としての可能性を検討することを目的として研究を行った。死亡したチーター334 頭を疫学的に、63 頭を病理学的に検索した結果、輸入個体と国内繁殖個体、多頭飼育と少数飼育で平均寿命に大きな差があった。死亡したチーターの 95% (56/59) に AA アミロイド沈着が認められ、特に腎臓で顕著で、死に深く関わっていた。アミロイド沈着の背景病変として注目すべき胃腸炎が高率に観察された。結論として飼育下チーターには、AA アミロイドが高率に沈着し、これが死因として最も重要であることが明らかになった。しかし、その病理発生については今後さらに検討する必要がある。

A. 研究目的

絶滅危惧種であるチーターは、ボトルネックを経験した動物種で、このため、遺伝子の均一化がかなり進んだ種として知られている。また、世界的にチーターの生存数が減少しており、盛んに保護活動が行われている。報告者は日本動物園水族館協会種の保存委員会の要請を受け、国内飼育下チーターの病性鑑定を継続しており、2003 年その数が 65 頭に達した。現在までの検索により、飼育下チーターにアミロイド症が高率に発生していることが明らかになった。同様の結果は、USA における研究でも報告されており、1990 年以降アミロイド症の罹患率が急上昇している。本研究では、飼育下チーターに多発するアミロイド症を疫学および病理学的に検索し、その病理発生を解明し、ヒトの AA アミロイド症のモデル動物としての可能性を検討することを目的としている。

B. 研究方法

日本動物園水族館協会種の保存委員会が行っているチーターの国内登録事業資料に基づき、1935 年より 2002 年 6 月までに死亡したチーター334 頭を疫学的に解析した。特に飼育園館間で共通認識となっている輸入個体と国内繁殖個体間の平均寿命の差

（輸入個体が繁殖個体より長寿）、飼育規模の違いによる平均寿命の差（少数飼育施設の動物の方が長寿）について検証し、これと病理所見との関連を検討した。

1994 年以降に死亡した 63 頭については、病理学的に検索した。特にチーターに多発するアミロイド症については、その背景病変を含めて検討した。

C. 研究結果

疫学調査：国内登録資料によれば、1935 年から 2002 年 6 月までに 334 頭のチーターが死亡していた。内訳は♂173 頭、♀161 頭。輸入個体 139 頭、国内繁殖個体 195 頭で、2 歳以上の成獣が 235 頭含まれていた。2 歳以上の成獣の平均寿命 6.5 歳（輸入個体 7.4 歳、国内繁殖個体 5.8 歳）で、10 歳以上（チーターのおよその平均寿命）生存した個体は 58 頭 (58/235、24.7%)、うち 46 頭 (79.3%) が輸入個体、12 頭が繁殖個体であった。図 1 に示すように 1999 年輸入個体に事故が多発した時を除けば、輸入個体の平均寿命がおしなべて長かった。また、20 頭以上の多頭飼育の 2 施設における平均寿命は輸入個体 9.4 歳、繁殖個体 4.9 歳で、少数飼育施設（5 頭以下、3 施設）における平均寿命は輸入個体 12.2 歳、繁殖個体 8.8 歳であった。国内飼育全頭数

は、毎年少数の繁殖があるものの、1994年の80頭をピークに漸減し2002年には54頭（うち6頭は最近輸入された）になった。1979年に初めて繁殖に成功して以降、飼育技術が向上しても、輸入個体より繁殖個体の平均寿命が優位に短く、かつ多頭飼育施設でその傾向が顕著であった。なお、少数飼育施設における繁殖個体は、すべて多頭飼育施設で繁殖した個体を導入したものであった。

病理学的検査：生前に血液検査が実施された症例のうち、44頭に腎不全が認められた。63頭のチーターの病性鑑定を行った結果、アミロイド沈着が56/59（95%）に認められた。アミロイドは、腎臓、肝臓、消化管、脾臓、膵臓、副腎、心、肺、舌などに種々の程度で沈着していた。特に腎臓髄質へのアミロイドの沈着は顕著で、しばしば腎乳頭壊死を随伴していた。アミロイドの沈着程度をスコア化し、輸入個体と繁殖個体と比較したところ、それぞれ2.3、4.1であった。繁殖個体では、多臓器にわたって、高度にアミロイドが沈着する傾向があり、若齢個体（3歳から）も高度の全身性アミロイド症により死亡していた。また、沈着アミロイドは抗ヒトアミロイドAA蛋白抗体を用いた免疫染色で陽性となり、続発性アミロイド症と診断された。なお、アミロイド沈着がみられなかった3頭のうち2頭は2歳以下で、事故死であった。

アミロイド沈着の背景病変を検討するために、全身臓器を病理学的に検索したところ、程度は様々であったが、リンパ・プラズマ細胞性胃炎や腸炎が高率に観察された。胃炎は萎縮性胃炎の形をとることが多く、高率にヘリコバクターの感染が認められた（新鮮胃のヘリコバクターコンセンサスプライマーを用いたPCR法で83%）、走査電顕による検索により、これらのヘリコバクターは *H. heilmannii*、*H. felis*、*H. acinonyx*、*Flexispira rappini* と同定された。また、チーター由来 *H. heilmannii* をマウスに接種したところ、慢性胃炎が誘発された。腸炎は腸管にも認められたが、小腸に比較して盲腸と結腸でより高度であった。主として盲腸と大腸に enteric ヘリ

コバクターの感染が認められ、菌の存在と病変の関連について解析したが、関連は見出せなかった。他の炎症性変化として、概して軽度であったが間質性腎炎が観察された。また、腎乳頭壊死に随伴する腎盂腎炎もみられた。

D. 考察

今回の検索により、チーターには非常に高率にアミロイド症が発生しており、死因として、アミロイド沈着による腎不全や多臓器不全が重要であることが明らかになった。特に腎乳頭壊死は急激に腎不全を進行させるとされ、生前に多くのチーターが、長期にわたって腎機能異常を指摘され、治療の対象となっていることから、最も注目すべき病変と考えられた。同様の結果は、Papendick (USA, 1997) によっても報告されており、1991～1995年のアミロイド症の罹患率は74%で、チーターの主たる死因であるとしている。さらに、この報告では、アミロイドの罹患率の推移を調査しており、1990年以前と1991～1995年では、腎アミロイド症の罹患率が20%から70%に上昇している。我々は、1994年よりチーターの病性鑑定を開始したため、日本においてもアミロイド症の罹患率に変化があったかどうかは不明であった。

今回の研究で、チーターに沈着していたアミロイド蛋白の種類は、免疫染色の結果からアミロイドAA蛋白と同定された。アメリカのチーターにみられたアミロイドもAA蛋白で、アミロイド症のチーターのすべてに炎症性病変がみられ、最も頻繁に慢性リンパプラズマ細胞性胃炎が観察された。さらに、胃炎の罹患率がアミロイド症と同様に1990年以前は19%であったのが、以降は43%に上昇していることから、アミロイド症の背景病変として胃炎の役割について注目している (Papendick 1997)。我々の研究においても、胃炎の罹患率が非常に高いことから、同様の機序が考えられたが、腸炎の罹患率も高く、胃炎のみならず腸炎の関与も疑われた。

従来からチーターの胃には、ヘリコバクター属細菌が、高率に感染しており、胃炎

発生に関与していると報告されていた (Eaton 1993)。我々は、死亡したチーターの胃を顕微鏡的、電顕的および分子生物学的に検索し、さらに、飼育下のチーターの糞を用いた分子生物学的検索も併せて実施し、チーターにおけるヘリコバクター属の細菌の感染率と菌種の同定を行った。その結果、感染率は胃の顕微鏡的検索では 58% で、糞の PCR 検索では 87.5% であった。4 菌種 5 菌型のヘリコバクターを見出した。そのうち、高率に感染していた *H. heilmannii* をマウスに経口投与して胃炎誘発を試みたところ、接種後 4 週で胃炎が誘発された。このことから、チーター由来ヘリコバクターには、病原性がある可能性が示唆された。しかし、ヘリコバクターが感染していても、胃炎が軽度な症例も認められること、繁殖個体と輸入個体で、さらに多頭飼育と少数飼育でアミロイド沈着状況が、極端に異なることから、ヘリコバクター感染による胃炎の発生機序およびアミロイドの沈着機序には、さらに多くの要因の関与があるものと考えられた。

最後に、チーターを除いて自然発生性アミロイド症が、高率に発生し、死に深く関与している動物は、他に見当たらない。また、これほど、飼育条件によって、アミロイドの発生状況が異なること動物も知られていない。このことから、AA アミロイド症の発生機序を解明するために、チーターは有用な疾患モデル動物になるものと考えられた。

E. 結論

飼育下チーターには、AA アミロイドが高率に沈着し、これが死因として最も重要であることが明らかになった。しかし、その病理発生については今後さらに検討する必要がある。

[引用文献]

1, Eaton KA, Radin MJ, Kramer L, Wack R, Sherding R, Krakowka S, Fox JG, Morgan DR. Vet. Pathol. 1993. 30:55-63. Epizootic gastritis associated with gastric spiral bacilli in cheetahs (*Acinonyx jubatus*).

2, Papendick RE, Munson L, O'Brien TD, Johnson KH. Vet. Pathol. 1997. 34 :549-56. Systemic AA amyloidosis in captive cheetahs (*Acinonyx jubatus*).

F. 健康危険情報

なし。

G. 報告者学会発表リスト

- 1, チーターのアミロイド症と胃病変, 第 125 回日本獣医学会, 1998. 4
- 2, 死亡したチーター (*Acinonyx jubatus*) の病理学的観察, 第 4 回野生動物医学会, 1998. 8
- 3, 国内飼育チーター (*Acinonyx jubatus*) の病理学的検討, 第 73 回麻布獣医学会, 1998. 9
- 4, マウスにおけるチーター由来 *Helicobacter* 属細菌の感染実験と胃病変の誘発, 第 127 回日本獣医学会, 1999. 4
- 5, チーター (*Acinonyx jubatus*) 由来 *Helicobacter* 属細菌の超微形態学的検索, 第 129 回日本獣医学会, 2000. 4. 1
- 6, マウスにおけるチーター由来 *Helicobacter* 属細菌の除菌実験, 第 129 回日本獣医学会, 2000. 4. 1
- 7, チーター由来 *Helicobacter* 属細菌の PCR 法による検出方法の検討, 第 130 回日本獣医学会, 2000. 10. 1
- 8, チーター由来 *Helicobacter* 属細菌の超微形態, 獣医畜産新報 53 (11), 2000. 11. 1
- 9, チーター由来 *Helicobacter heilmannii* 感染マウスにおける胃病変と heat shock protein 70 の分布, 第 133 回日本獣医学会, 2002. 3. 28
- 10, 動物の *Helicobacter* 属細菌感染症と消化器疾患, 第 133 回日本獣医学会, 2002. 3. 28
- 11, PATHOLOGICAL STUDY OF CHEETAHS (*Acinonyx jubatus*) DYING IN CAPTIVITY IN JAPAN, The 2001 ACVP Annual Meeting. , 2001. 12. 3
- 12, HELICOBACTER INFECTION IN CAPTIVE CHEETAHS (*Acinonyx jubatus*) IN JAPAN, 19th Meeting of European Society of Veterinary Pathology, 2001. 9. 25
- 13, EPIDEMIOLOGICAL AND PATHOLOGICAL SURVEY OF CAPTIVE CHEETAHS (*Acinonyx jubatus*) IN JAPAN, 1935-2000., 27th World Veterinary Congress, 2002. 9. 25
- 14, THE PATHOGENICITY OF HELICOBACTER SPECIES ISOLATED FROM CHEETAHS IN JAPAN. , 20th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology. , 2002. 9. 21
- 15, ENTERIC HELICOBACTER IN CAPTIVE CHEETAHS (*Acinonyx jubatus*) IN JAPAN., 52nd Annual Meeting of American College of Veterinary Pathologists , 2002. 12. 8
- 16, 国内飼育下チーター (*Acinonyx Jubatus*) の enteric *Helicobacter* 感染, 第 134 回日本獣医学

会, 2002. 9. 19

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1、特許取得 なし。
- 2、実用新案登録 なし。
- 3、その他 なし。

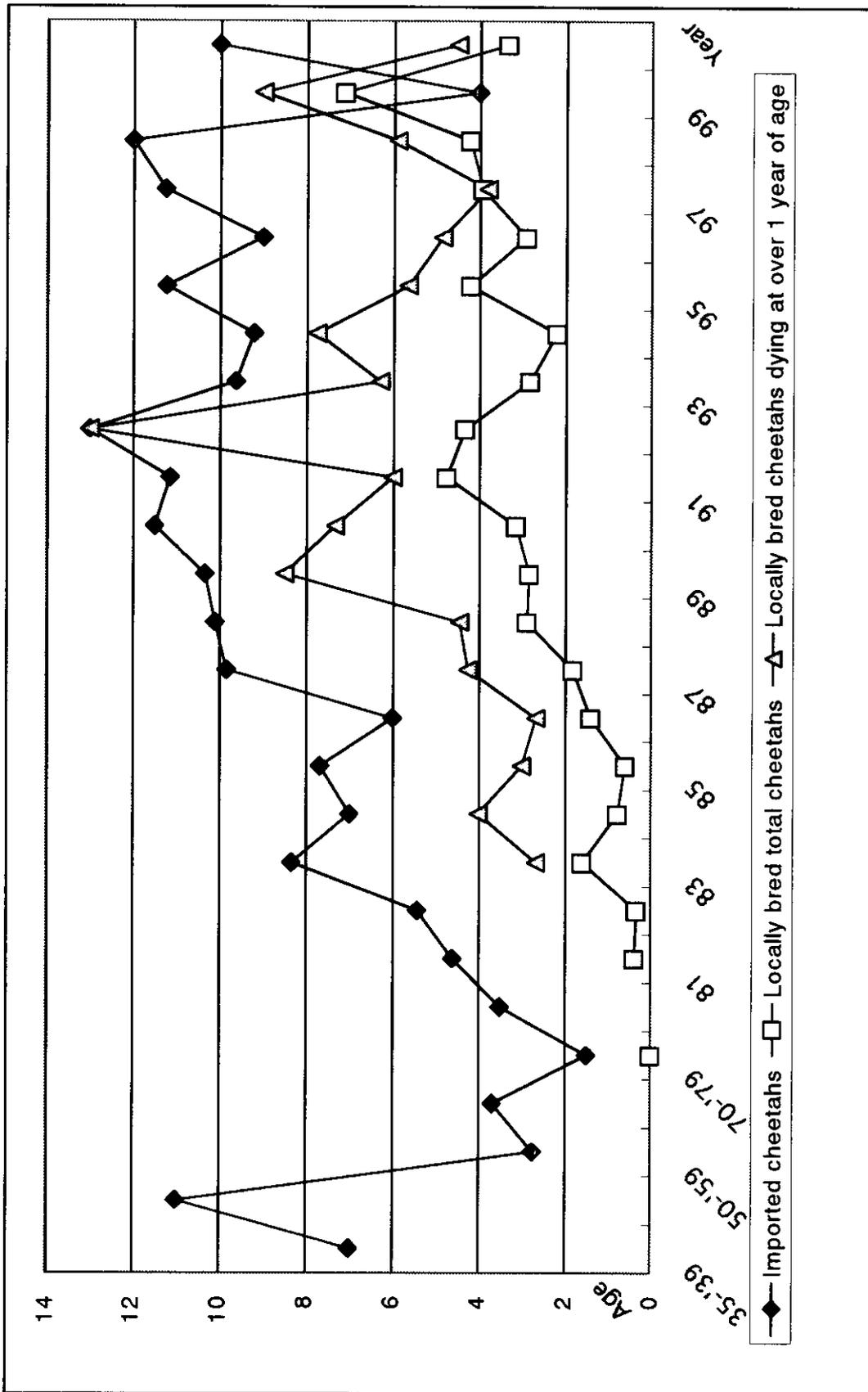


図 国内飼育下子ターの平均寿命の推移

遺伝子改変マウスを用いた遺伝性アミロイドーシスの発症予防法の開発：遺伝性アルツハイマー病におけるアミロイド沈着へのトランスサイレチン (TTR) ならびに血清アミロイド P 成分 (SAP) の関与の解析

分担研究者 前田秀一郎 山梨大学・医・生化 1

共同研究者 大森弘子*、魏 嵐*、伊藤禎洋**、杉山仁視***、
久保田正春***、神庭重信***、針谷康夫****、
東海林幹夫*****、瓦林 毅*****
山梨大学、*生化 1、**同・総合分析実験センター、
同・医・精神神経科、*群馬大学・医・神経内科、
*****岡山大学・大学院・医歯学総合研究科・神経病態内科

研究要旨 遺伝性アルツハイマー病のトランスジェニックマウスモデル (APP^{sw}) と我々が作製した無トランスサイレチン (TTR) マウス及び無血清アミロイド P 成分 (SAP) マウスを用いて、遺伝性アルツハイマー病での脳内 A β アミロイドの沈着に TTR や SAP がどう関与するかを解析し、以下の結果を得た。

1) 6~11 カ月齢の TTR 欠損 APP^{sw} 6 匹と同月齢の対照野生型 APP^{sw} 4 匹とにおける脳内 A β アミロイド沈着程度を解析した。この結果、11 カ月齢マウスの大脳皮質にのみ、微量のヒト A β 沈着を認めたが、その程度に両者で差異を認めなかった。

2) SAP 欠損 APP^{sw} については、8~18 カ月齢のマウスつき、脳内 A β アミロイド沈着程度を、同月齢の対照野生型 APP^{sw} と比較解析した。この結果、SAP が脳内 A β アミロイド沈着の初期の段階を促進することを示唆する結果を得た。

今後、SAP 欠損 APP^{sw} の系統については、より多数の 8 カ月齢~16 カ月齢のマウスを用いて、一方、TTR 欠損 APP^{sw} の系統については、11 カ月齢より高齢のマウスを用いて、月齢を追って、脳内 A β アミロイドの沈着程度を調べる必要がある。

A. 研究目的

TTR は、アルツハイマー病の A β アミロイドの形成を、*in vitro* で抑制することが見出されているが、*in vivo* での証明はされて

いない。また、種々のアミロイドーシスで沈着する異なるアミロイドに共通の微量成分、SAP が、A β アミロイドの沈着にどう関与するかも明らかでない。そこで本研究は、Hsiao

博士が作製した遺伝性アルツハイマー病のトランスジェニックマウスモデル (APP^{sw}) と我々が作製した無 TTR マウス及び無 SAP マウスを用いて、遺伝性アルツハイマー病での A β アミロイドの沈着に TTR や SAP がどう関与するかを明らかにし、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に遂行する。

B. 研究方法

Hsiao 博士から供与された、スウェーデンの早期発症型遺伝性アルツハイマー病の原因となるヒトの変異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 (APP^{sw}) と我々が確立した無 TTR マウス株あるいは無 SAP マウス株とを交配させて得た TTR 又は SAP 欠損 APP^{sw} と対照野生型 APP^{sw} とにおける脳内 A β 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し、A β アミロイドの沈着に TTR や SAP がどう関与するかを解析する。

脳内 A β アミロイドの沈着は、コンゴ赤染色法、および以下の 3 種類の抗 A β 抗体を用いた免疫組織化学的手法により調べた。

1) A β 9204 ; A β の N 末端を認識するポリクローナル抗体 2) BA27 ; A β の C 末端 40 を認識するモノクローナル抗体 3) BC05 ; A β の C 末端 42 を認識するモノクローナル抗体

本研究での動物実験は、山梨大学総合分析実験センターの実験指針に基づき、実験計画ごとに事前に委員会による審査を受け、承認されており、動物愛護の観点から倫理的に問

題は無いと考えられる。

C. 研究結果

1) 6~11 カ月齢の TTR 欠損 APP^{sw} 6 匹と同月齢の対照野生型 APP^{sw} 4 匹とにおける脳内 A β アミロイド沈着を、抗 A β 抗体とコンゴ赤を用いて解析した。この結果、11 カ月齢マウスの大脳皮質にのみ、極軽度のヒト A β 沈着を認めたが、その程度に両者で差異を認めなかった。今後、より多数の高齢マウスを、月齢を追って調べる必要がある。

2) SAP 欠損 APP^{sw} については、抗 A β 抗体及びコンゴ赤染色を用いて、8 カ月齢~18 カ月齢のマウスつき、脳内 A β アミロイド沈着程度を、同月齢の対照野生型 APP^{sw} と比較解析した。この結果、8 カ月齢、11 カ月齢では、差異を認めないが、13 カ月齢~16 カ月齢では、SAP 欠損 APP^{sw} において、対照野生型 APP^{sw} に比べ、A β 沈着程度が低い傾向を認めた。しかし、18 カ月齢では、差異を認めなかった (表 1)。

一方先に、モリス式水迷路により、雌 SAP 欠損 APP^{sw} 5 匹と対照雌野生型 APP^{sw} マウス 3 匹の空間認知能力を比較し、前者は後者に比べ、有意に空間認知能力が優れているという結果を得ている (図 1)。この結果も、SAP が A β 沈着を促進することを示唆する。今後、より多数の 8 カ月齢~16 カ月齢のマウスを用いて追試し、上記結果を確認する。

D. 考察

SAP 欠損及び対照野生型 APP^{sw} については、8 カ月齢から、脳内 A β アミロイド沈着を認

め、SAPがA β 沈着の初期の段階を促進することを示唆する結果を得た(表1)。

一方、TTR欠損APP^{sw}対照野生型APP^{sw}4匹には、11カ月齢のマウスにのみ大脳皮質に極軽度のヒトA β 沈着を認めたが、その程度に両者で差異を認めなかった。SAP欠損APP^{sw}の系統とTTR欠損APP^{sw}の系統に認められるA β アミロイド沈着時期の差異が何に由来するかは今後の興味深い研究課題と考えられる。

今後、SAP欠損APP^{sw}の系統については、より多数の8カ月齢～16カ月齢のマウスを用いて、一方、TTR欠損APP^{sw}の系統については、11カ月齢より高齢のマウスを用いて、月齢を追って、脳内A β アミロイドの沈着度を調べる必要がある。

E. 結論

SAP欠損APP^{sw}と対照野生型APP^{sw}を用いた解析により、SAPが脳内A β アミロイド沈着の初期の段階を、促進することを示唆する結果を得た。今後、より多数のマウスについて追試し、上記結果を確認する必要がある。一方、TTRが、脳内A β アミロイド沈着にどう関与するかは、今後11カ月齢より高齢のマウスを用いて解析する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 前田 秀一郎: 家族性アミロイドポリニューロパチー. 医学のあゆみ 204: 468-472, 2003.

2) Kato G, Maeda S: Production of mouse ES cells homozygous for Cdk5-phosphorylated site mutation in *c-src* alleles. J Biochem, *in press*.

2. 学会発表

1) Maeda S, Kanba S, Arita J, Ando Y, Gottesman ME, Tohyama C: What lessons to learn from the rodent models carrying targeted mutations at the TTR locus? First International Symposium on Transthyretin in Health and Disease, Strasbourg, France, April 22-25, 2002.

2) Maeda S, Kanba S, Ishihara T, Shoji M, Sakashita N, Ando Y, Yamamura K: Study on the Molecular Bases of Familial Amyloidotic Polyneuropathy by the Use of Genetically Altered Mice. The 5th International Symposium on Familial Amyloidotic Polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders & The 4th International Workshop on Liver Transplantation in Familial Amyloid Polyneuropathy, Matsumoto, Japan, September 24-27, 2002.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 1 SAP 欠損 APPsw と対照野生型 APPsw における脳内 A β アミロイド沈着程度

月齢	性	<i>app</i> 遺伝子	<i>sap</i> 遺伝子	アミロイド 沈着	月齢	性	<i>app</i> 遺伝子	<i>sap</i> 遺伝子	アミロイ ド沈着
18	F	+	-/-	++++	13	F	+	+/+	+++
18	F	+	+/+	++++	13	F	+	-/-	++
18	M	-	+/+	-	13	M	+	-/-	+
18	F	+	-/-	++++	13	F	+	+/+	++
16	F	+	-/-	++	11	M	+	-/-	+
16	M	+	+/+	+++	11	M	+	+/+	+
16	M	+	+/+	+++					
16	F	+	+/+	++++	8	F	+	+/+	+
					8	M	+	+/+	+
14	M	+	-/-	+++	8	M	+	-/-	+
13	M	-	+/+	-	8	M	+	-/-	-

アミロイド沈着程度は、1 スライドあたりの老人班の数で示した：-, 0; +, 0-10; ++, 10-20; +++, 21-50; +++, 51-

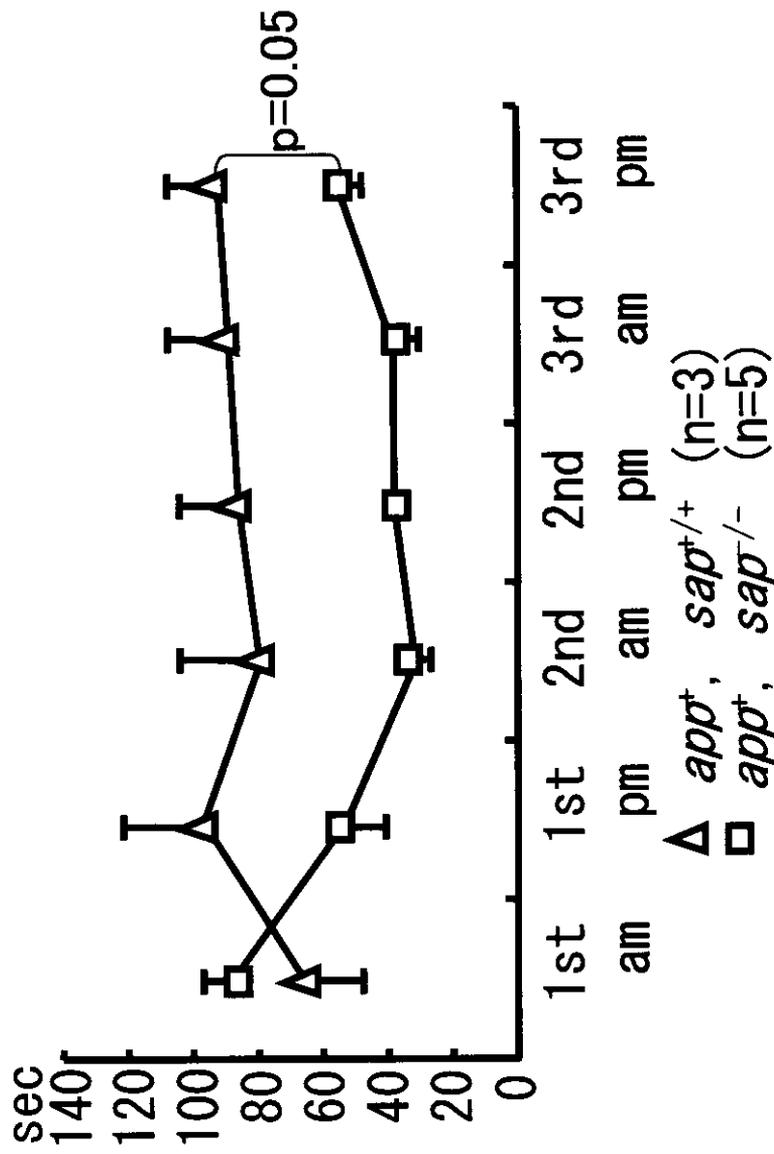


図1 雌APPswマウスのモリス式水迷路の成績へのSAPの影響

SAP欠損APPswの方が、対照野生型APPswよりもプラットフォームにたどり着く迄の時間が有意に短い。この結果から、前者は、後者に比べて空間認知能力が優れていると考えられる。

AB オリゴマーの病原性の検討

分担研究者 東海林幹夫 岡山大学大学院医歯学総合研究科神経病態内科学
共同研究者 松原悦朗、瓦林毅、阿部康二
岡山大学大学院医歯学総合研究科神経病態内科学

研究要旨 アルツハイマー病(AD)患者脳において脳内リボ蛋白非結合型 amyloid β (A β)はダイマー形成能に富み、血液中に存在する同分子種とは質的相違を持った脳内アミロイドーシス惹起分子であると考えられる。昨年度はAD患者脳から抽出したA β オリゴマーがいったんマウス脳に入ると長期間分解されずに存在し、アミロイド原性に乏しいマウスA β ペプチドをも巻き込みアミロイド形成を促進することを報告した。本年度はこのA β オリゴマーに焦点を絞り、まずA β モノマーとの分別定量法を新たに開発した。このnew ELISA系で、A β ダイマーはAD患者脳TBS可溶性画分でのみ検出され、健常加齢脳や血液、髄液中では検出感度以下であった。さらに、A β オリゴマーの病原性やtransmissibilityを検討するインビボシステム構築のため、MRI用老人斑特異的造影剤プローブ作製を試み、T1強調画像での老人斑陰性造影効果を検討中である。

A. 研究目的

AD患者脳においてリボ蛋白非結合型A β はダイマー形成能に富み、血液中に存在する同分子種とは質的相違を持った脳内アミロイドーシス惹起分子であると考えられる。またAD患者脳A β オリゴマーはいったんマウス脳に入ると長期間分解されずに存在し、アミロイド原性に乏しいマウスA β ペプチドをも巻き込みアミロイド形成を促進することを昨年度報告した。本年度はA β オリゴマー特異的ELISAの開発と可溶性A β オリゴマーやAD患者脳A β オリゴマーの病原性検討を主眼とし、血液中からのマウス脳内、特に老人斑への移行をMRI画像にて検証するための、老人斑特異的造影剤の開発に着手した。

B. 研究方法

AD脳(6例)、正常加齢脳(4例)より、4倍量のTBS緩衝液でホモジェネートを作製し、10万gにて回収される上清(TBS可溶性画分)を調整し、ゲルろ過法、イムノブロット法、及びELISA法を用いて脳内A β 分子種を解析した。通常のア β モノマー特異的ELISA系(BNT77/BA27, BNT77/BC05)に加え、A β 40とA β 42を特異的に認識するモノクローナル抗体BA27、BC05を捕捉抗体として、さらにHRP標識した同抗体を検出抗体とするA β オリゴマー特異的ELISA系(BA27/BA27, BC05/BC05)を構築し検討を加えた。可溶性A β (500 μ g/1500 μ l)ペプチドと磁性

鉄 5×10^8 particle/ 20μ l/mg を 4°C にて一晩インキュベーション後、磁性鉄結合 AB を作製した。磁性鉄結合 AB を MRI 撮影し、T1 強調画像での陰性造影効果を確認した。さらに、アルツハイマー病患者海馬切片での *in situ* 老人斑結合能も MRI 撮影にて検討した。

C. 研究結果

血漿や髄液をゲルろ過にて分離後、各フラクションを両 ELISA 法により解析すると、AB モノマー特異的 ELISA 系では、従来どおり、リボ蛋白結合型と非結合型 AB モノマーが検出された。AB オリゴマー特異的 ELISA 系での検討では、リボ蛋白非結合型 AB オリゴマーは検出されなかった。しかしながら、推測どおりリボ蛋白結合型 AB モノマーが容易に検出され、AB オリゴマー定量にはゲルろ過などによる前処理が必要不可欠であることを明らかとした。次いで、TBS 緩衝液可溶性画分をゲルろ過にて分離し、各フラクションをイムノブロット法と AB モノマー特異的 ELISA 法により解析すると、正常加齢脳と AD 脳の両者で、リボ蛋白非結合型とリボ蛋白結合型 AB モノマーの存在が確認された。正常加齢脳に比し、AD 脳においては両分子種の絶対量の増加が認められ、脳内ではリボ蛋白非結合型 AB の占める割合が著増していた。一方、イムノブロットにて AD 脳にのみ AB ダイマーが検出されたが、今回構築した AB オリゴマー特異的 ELISA 系では、この AB ダイマーの存在するフラクションのみに反応し、AB ダイマーが特異的に検出されていると考えられた。しかしながら検出同定された AB ダイマーは AB40 ダイマーのみで、

AB42 ダイマーは検出されず、その感度に課題を残す結果となった。

一方、AB の病原性検討のため、血中投与した各種 AB がマウス脳内老人斑に結合するか否かを MRI にて検討することを目的として、磁性鉄に着目し検討を加えた。磁性鉄結合可溶性 AB1-40 ペプチドの作製は容易で、ドットブロットにて確認された結合効率は 90% 以上であった。MRI の T1 強調画像では、期待どおり鉄による顕著な陰性造影効果が得られた。まだ preliminary な段階ながら、アルツハイマー病患者海馬切片における老人斑への結合も MRI にて陰性造影像として検出されている可能性が高く、今後さらに高磁場の MRI で詳細に検討を加えていく予定である。

D. 考察

本年度の検討で、脳内 AB アミロイドシス惹起分子種である AB ダイマーやオリゴマーと AB モノマーの分別定量が可能となった。今後さらに感度向上が必要であるが、AB アミロイドシス惹起分子種特異的な ELISA 開発は極めて重要な病態解析ツールになると期待される。

老人斑を造影しうるプローブの開発に手ごたえを得た本年度の結果は、今後の AB の transmissibility 検討に多大な貢献すると考えられる。磁性鉄に今回使用した可溶性 AB モノマーばかりでなく、AB オリゴマー、AD 患者脳 AB オリゴマーを結合させることで、*ex vivo* と *in vivo* での MRI 撮影で老人斑結合能の比較が可能となるばかりでなく、アミロイド原性に乏しいマウス AB ペプチドを巻き込んだアミロイド形成がどの程度なされるか明らかにでき、AB の