

ミロイドーシスの発症促進効果が著明であ  
った。

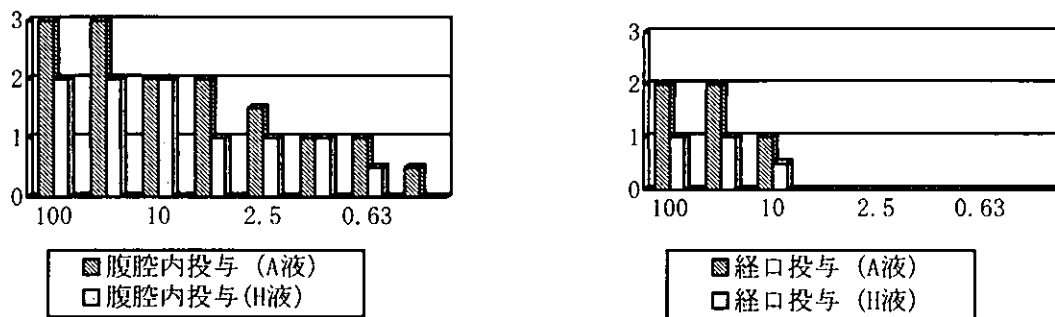
3). 今回調べた食用の市販肝臓にはアミ  
ロイドーシスの発症促進効果はなかった。

表1. ウシアミロイド線維の投与によりアミロイドーシスの発症促進効果：

投与したアミロイ ド線維の量	腹腔内投与マウスの脾臓アミロイド		経口投与マウスの脾臓アミロイド	
	沈着状態	沈着程度	沈着状態	沈着程度
100mg	3/3	Ⅲ	3/3	Ⅱ
50mg	3/3	Ⅲ	3/3	Ⅱ
10mg	3/3	Ⅱ	3/3	I
5mg	3/3	Ⅱ	0/3	0
2.5mg	3/3	I-Ⅱ	0/3	0
1.25mg	3/3	I	検索せず	
0.625mg	3/3	I	検索せず	
0.312mg	1/3	微量	検索せず	

Fig1. ウシアミロイド線維とアミロイドウシ肝臓ホモジナイズ液の投与により、アミロイド  
沈着量の比較:A液：ウシアミロイド線維懸濁液；B液：ウシアミロイド肝臓ホモジナイズ  
液

横軸：投与量(mg)を表す；縦軸：アミロイド沈着量を表す。



## アミロイド組織片の移入による

### マウスアミロイドーシス発症促進の可能性について

#### —移入部位別検討、アミロイド沈着進行状態の検討を加えて—

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 小野咲弥子、崔 丹、星井嘉信、河野裕夫

山口大学医学部構造制御病態学講座

#### 研究要旨

マウスのAAアミロイド肝組織片、AApoAⅡ腎組織片を用い、健常マウスの肝臓または皮下にアミロイド組織片を埋め込む移入実験を行った。アミロイド組織片を局所生体内に移入することにより、レシピエントにおいてアミロイドーシスの発症・促進効果があるか、ということについて検討したところ、肝臓・皮下への移入によりアミロイドーシスの発症・促進効果がみられた。さらに、移入後、アミロイド沈着進行状況を観察したところ、移入により発生したアミロイドが短時間内に重篤な程度まで進行するということが示唆された。

#### 研究目的

我々の教室のこれまでの実験において、アミロイド組織片を健常マウスの肝臓へ移入することにより、アミロイドーシスの発症促進効果が認められた。今回の実験では、肝臓・皮下への移入を行い、移入部位別に発症促進効果の有無を検討し、さらに移入によるアミロイド沈着の進行状態について検討した。

#### 研究方法

1. 動物:6~8週令の健常のAKRまたはICRマウスを実験対象とした。
2. 移入用のアミロイド組織片の準備:AAアミロイド肝組織片は6~8週令の健常マウスに10%カゼインを6週間連日皮下注射して、AAアミロイドーシスを発症させた個体の肝組織を部分的切除し、アミロイド沈着を確認した後、直ちに移入実験に用いた。AApoAⅡアミロイド腎組織片は、AApoAⅡアミロイドーシスを自然発症した95週令AKRマウスの、アミロイド沈

着が確認された腎組織片(凍結保存されたもの)を移入実験に使用した。使用した組織片の大きさは約1.5mm×4mmであった。

3. 移入実験は二群分け、行った。

〈実験1〉グループA:AAアミロイド肝組織片を、健常AKRマウスの肝臓・皮下に移入(5匹・5匹)したのち、直ちにカゼイン0.5mlの皮下注射を6日連続して行い、7日目に屠殺した。グループB:AAアミロイド肝組織片を健常AKRマウスの肝臓・皮下に移入(5匹・5匹)し、炎症刺激をせずに24週間飼育し、屠殺した。グループC:AApoAⅡアミロイド腎組織片を健常AKRマウスの肝臓に移入(5匹)し、炎症刺激なしに12週間、皮下に移入(5匹)したのち、炎症刺激なしに24週間飼育したのち、屠殺した。グループD:AApoAⅡアミロイド腎組織片を、健常AKRマウスの肝臓に移入(5匹)したのち、12週間無処置のまま飼育した。12週間後に脾臓の生検を行なったのち、カゼイン0.5mlの皮下注射を6日連続して行い、7日目に屠殺した。

〈実験Ⅱ〉グループ E：AA アミロイド肝組織片を、20 匹の健常 ICR マウスの肝臓に移入し、カゼイン 0.5ml の皮下注射を 6 日間連日投与を行なった。麻酔下に脾臓の生検を行い、その後 4 群 (E-a、b、c、d 群、各 5 匹) に分け、2、4、5、または 6 週間カゼイン 0.5ml の皮下注射を継続したのち屠殺した。グループ F：健常マウスから採取した肝組織片を、15 匹の健常 ICR マウスの肝臓に移入し、10 匹のマウスにカゼイン 0.5ml の皮下注射を 5 週間連日行なった。麻酔下に脾臓の生検を行い、その後 2 群 (F-a、b 群、各 5 匹) に分け、2 または 4 週間、カゼイン 0.5ml の皮下注射を継続したのち屠殺した。残りの 5 匹のマウス (F-c 群) には移入後、6 日間炎症刺激を行ったのち、屠殺した。

#### 4. 移入効果 (または影響) の検討：

屠殺時に肝臓、脾臓、腎臓を、症例によっては舌、消化管、皮膚を摘出し、ホルマリン固定、パラフィン切片を作製した。アミロイド沈着を検索するために、HE、Congo red 染色を行い、Congo red 染色標本を偏光顕微鏡で観察した。アミロイド沈着のみられたものについては、アミロイドのタイプを同定するために免疫組織化学染色を行った。また、実験Ⅱでは、それぞれの群において、生検時の脾臓と屠殺時の脾臓でのアミロイド沈着の程度\*を比較した。

\*アミロイド沈着の程度は検鏡上、以下のように区分した。

Grade0 (G0)：アミロイド沈着なし。

Grade1 (G1)：少量のアミロイド沈着がみられる。

Grade2 (G2)：中等量のアミロイド沈着がみられる。

Grade3 (G3)：多量のアミロイド沈着がみられる。

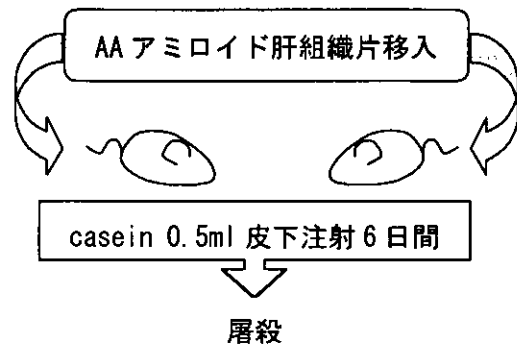
Grade4 (G4)：アミロイド沈着が脾臓の構造を破壊して大量にみられる。

#### (倫理面への配慮)

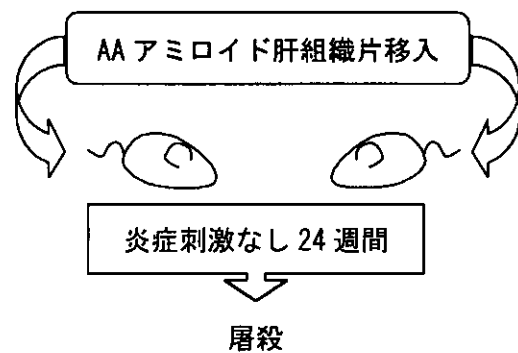
実験に供したマウスの飼育状態が良好な環境になるように、また実験、屠殺に際しては苦痛が最小限になるように配慮し、山口大学医学部動物実験委員会の承認の下に、山口大学医学部の動物実験に関する指針に沿って行った。

図 1：グループ A, B, C, D の方法

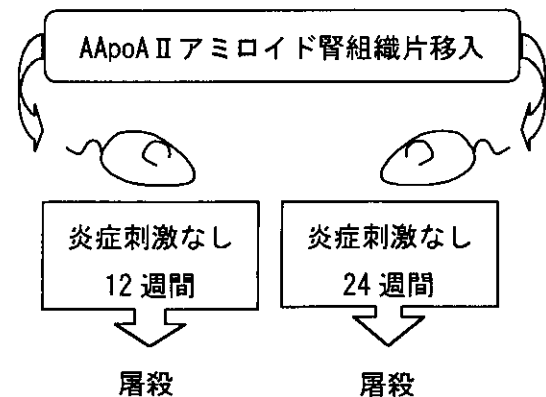
#### グループ A



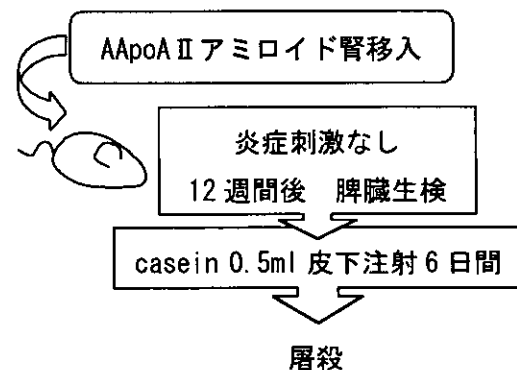
#### グループ B



#### グループ C



#### グループ D



## 研究結果

〈実験Ⅰ〉グループA:AA アミロイド肝組織片を、健常 AKR マウスの肝臓に移入したのち、炎症刺激を与えた群では、すべてのマウスの脾臓にアミロイドの沈着がみられ、症例によっては肝臓、腎臓、消化管にもアミロイドの沈着がみられた。沈着したアミロイドはすべて AA type であった。また、AA アミロイド肝組織片を、健常 AKR マウスの皮下に移入したのち、炎症刺激を与えた群では、アミロイドの沈着はみられなかった。グループ B: AA アミロイド肝組織片を、健常 AKR マウスの肝臓または皮下に移入したのち、炎症刺激をせずに 24 週間飼育した群では、いずれの臓器にもアミロイド沈着はみられなかった。グループ C: AApoA II アミロイド腎組織片を、健常 AKR マウスの肝臓に移入したのち、炎症刺激なしに 12 週間飼育した群では、全ての個体でアミロイド沈着がみられ、舌は 4 匹に、消化管 3 匹に、皮膚 1 匹にアミロイド沈着がみられた。沈着したアミロイドはすべて AApoA II type であった。AApoA II アミロイド腎組織片を、健常

AKR マウスの皮下に移入したのち、炎症刺激なしに 24 週間飼育した群では、全ての個体にアミロイドの沈着がみられ、舌 5 匹、皮膚 5 匹、消化管 4 匹、肝臓 1 匹、腎臓は 1 匹にアミロイドの沈着がみられた。沈着したアミロイドはすべて AApoA II type であった。グループ D: AApoA II アミロイド腎組織片を、健常 AKR マウスの肝臓に移入し、12 週間後に炎症刺激を与えた群では、生検では脾臓にアミロイドの沈着がみられなかったのに対し、屠殺時では 4 匹の脾臓、肝臓、腎臓、消化管、皮膚、舌などにアミロイドの沈着がみられた。沈着したアミロイドは 3 匹に AA type が、4 匹に AApoA II type が証明され、2 種のアミロイド沈着が同時に証明された個体は 4 匹中 3 匹であった。

〈実験Ⅱ〉グループ E: アミロイド肝組織片を移入し炎症刺激を行なった 4 群(E-a, b, c, d)では、生検時すでにすべての個体でアミロイド沈着がみられ、生検時の沈着の程度は Grade1~Grade2 であった。グループ F: 健常肝組織片を移入し

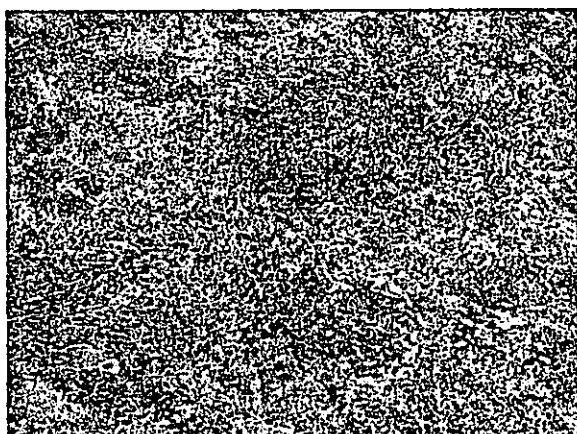
表 1: 実験Ⅰの結果

移入片	移入先	グループ A	グループ B	グループ C	グループ D
AA	肝臓	5 / 5 →AA type	0 / 3*		
	皮下	0 / 5	0 / 5		
AApoA II	肝臓			5 / 5 →AApoA II type	4 / 5** →AApoA II type 4/4 →AA type 3/4
	皮下			5 / 5 →AApoA II type	
炎症刺激		6 日間	なし	なし	炎症刺激せずに 12 週間観察した後、 脾臓生検を行い、 6 日間炎症刺激
屠殺までの 観察期間		6 日間	24 週間	12/24 週間	

\*観察中 2/5 が死亡した。

\*\*生検時、脾臓にはアミロイドの沈着 0/5。

表 2：実験Ⅱの結果より



E-a 群 脾臓 生検時：Grade 1 HE 100x



E-a 群 脾臓 屠殺時：Grade 3 HE 100x

たのち、5 週間の炎症刺激を与え、さらに炎症刺激を与えた 2 群 (F-a, b 群) では、生検時 1 例 (Grade0) を除いてすべての個体でアミロイド沈着がみられ、沈着の程度は多くが Grade1 ~ Grade2 であった。またグループ E、F の上記の群では、屠殺時には、追加した炎症刺激の期間に関係なくアミロイド沈着のレベルは Grade3 ~ Grade4 であった。

なお、正常肝組織を移入し、6 日間炎症刺激を行った群 (F-c 群) では、アミロイドの沈着はみられなかった。

### 考察

実験Ⅰの結果より AA、AApoAⅡタイプのアミロイドに関して、アミロイド組織片を生体内に移入することによりアミロイドーシスの発症・促進効果がみられること、また、AA アミロイドーシスの発症、促進には炎症刺激が必須であること、AApoAⅡアミロイド組織片の移入では肝臓だけでなく、皮下への移入でも発症・促進効果がみられること、そして異なる type のアミロイド線維核の導入によってもアミロイドーシスの発症促進効果があると考えられた。また、実験Ⅱの結果からアミロイド組織片を移入することにより、アミロイドが沈着するまでの期間が短縮されたと考えられ、全体としてアミロイドーシスの進行が短期間内に進行していると考えられた。

今回我々の研究では、アミロイド組織片を局所的に生体内に移入し炎症刺激を与えることで、AA type および AApoAⅡ type のアミロイドーシス発症促進効果が認められた。現段階では、アミロイドフィブリルそのものも amyloid enhancing factor (AEF) であり、アミロイド沈着を助長するといわれている。このようなアミロイドの伸展様式を考慮すると、移植医療においても、アミロイド線維核の導入によりレシピエントのアミロイドーシスの発症を促進させる可能性があることを考慮する必要があると考えられた。

### 結論

- 1) アミロイド組織片の移入によるマウスアミロイドーシス発症促進の可能性について、移入部位別に、またアミロイド沈着進行状況を加えて検討した。
- 2) アミロイド組織片を正常マウスの肝臓または皮下に埋め込む移入を行ったところ、レシピエントにおいて、アミロイドーシスの発症・促進効果がみられた。

### 健康危険情報

なし

牛アミロイドの抽出とその伝達実験

分担研究者 松井 高峯 帯広畜産大学畜産学部獣医学科  
共同研究者 古林与志安 帯広畜産大学畜産学部獣医学科

研究要旨 4例のアミロイドーシス牛の腎臓よりアミロイドを抽出し、沈着量を比較するとともに3群92羽のウサギ等を用い伝達実験を行った。

松井 高峯・帯広畜産大学畜産学部  
獣医学科家畜病理学教室教授

A. 研究目的

アミロイドを効率よく精製抽出するために、アミロイドーシス牛4例の腎臓でその沈着量を比較した。抽出したアミロイドに伝達性があるかをウサギ等において検索する。

B. 研究方法

アミロイドーシス牛4症例(A, B, C, D)の腎臓140gをホモジュナイズし、水抽出法にてアミロイドを抽出した。

A症例より抽出したアミロイドをウサギ12羽(I群)、42羽(II群)、38羽(III群)の腹腔内等に投与し、FCA(I群)、AgNO<sub>3</sub>(II群)、FCAとAgNO<sub>3</sub>(III群)を単独あるいは併用して様々な回数投与し、経時的に剖検して病理組織学的に検索した。また3頭の牛および山羊等にも同様に実験し検索した。尚、I群以外の動物には凍結保存したアミロイドを解凍して接種した。

C. 研究結果

4症例の腎重量はそれぞれ、A3.2Kg、B4.5Kg、C6.5Kg、D3.1Kgであり、アミロイドの抽出量はA約5g、B約3g、C約1g、D約5gであった。

伝達実験ではI群の4例とII群の2例でのみアミロイドーシスの発生が確認された。

D. 考察

アミロイドーシス牛腎臓よりのアミロイド抽出は腫大の顕著なものより、腫大の少ない腎臓より効率よく回収できるように思

われた。

伝達実験ではI群のみでコントロールを除くと50%に伝達できたが、他の群では殆ど伝達されなかった。I群以外では凍結保存したアミロイドを接種しており、このことが伝達率の低下に起因する可能性が示唆された。

E. 結論

牛アミロイドの伝達性は、抽出アミロイドの凍結保存により低下することが示唆された。抽出アミロイドの保存方法を改善し、再度伝達実験を行うことが必要と思われた。

F. 危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

特になし

H. 財産権の出願・登録状況

特になし

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の検索に関する研究 分担研究報告書

家畜におけるアミロイド症の発生頻度の調査および病理学的検討

分担研究者 山田 学 (独) 動物衛生研究所生産病研究部病態病理研究室  
共同研究者 中村 菊保 (独) 動物衛生研究所生産病研究部病態病理研究室  
古林 与志安 帯広畜産大学畜産学部獣医学科  
松井 高峯 帯広畜産大学畜産学部獣医学科

研究要旨 平成 14 年 9 月から平成 15 年 8 月までの 1 年間に病性鑑定を実施した牛 3324 頭のうちアミロイド症は 13 例で、その発生率は 0.39% だった。牛アミロイド症 10 症例における、アミロイド沈着の病変分布を組織学的、免疫組織化学的に検索したところ、これまで言われてきた肝臓、脾臓、腎臓、消化管、内分泌器官に加え、生殖器、乳腺、骨格筋においてもアミロイド沈着が観察された。

山田 学・(独) 動物衛生研究所生産病研究部病態病理研究室研究員

(倫理面への配慮)

今回動物実験は実施していないため、特  
にありません。

A. 研究目的

家畜におけるアミロイド症の発生頻度と病理像、病変分布を明らかにする。

B. 研究方法

各都道府県の家畜保健衛生所において、平成 14 年 9 月から平成 15 年 8 月までの 1 年間に病性鑑定を実施した牛について、アミロイド症例を検索し、1 年間での牛アミロイド症の発生頻度を明らかにする。

牛アミロイド症と診断した 10 症例の全身諸臓器のパラフィン包埋材料について、抗アミロイド AA 抗体を用いた免疫染色を実施して、牛生体内におけるアミロイドの沈着部位の分布傾向を明らかにする。

C. 研究結果

平成 14 年 9 月から平成 15 年 8 月までの 1 年間に病性鑑定を実施した牛 3324 頭のうちアミロイド症は 13 例であった。今回アミロイド症と診断された牛のうち、7 歳未満のものは 1 例のみ (6 歳) で、残りはすべて 7 歳から 12 歳の間であった。

アミロイドの沈着は、肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺、副腎、膵臓、甲状腺、下垂体、リンパ節、前胃、腺胃、小腸、大腸、卵巣、子宮、乳腺、筋肉等において認められた。このうち、肺、卵巣、子宮では血管壁のみの沈着にとどまり、実質臓器への沈着は認められなかった。下垂体、小腸、大腸、乳腺、筋肉では、ほとんどのものは血管壁への沈着のみであったが、一部、実質臓器へ

の沈着も観察された。

#### D. 考察

平成 14 年 9 月から平成 15 年 8 月までの 1 年間に病性鑑定を実施した牛 3324 頭のうちアミロイド症の発生率は 0.39% だった。症例は 6 歳以上にみられる傾向にあった。

牛アミロイド症 10 症例における、アミロイドの沈着部位の分布傾向を組織学的、免疫組織化学的に検索したところ、これまで言われてきた肝臓、脾臓、腎臓、消化管、内分泌器官に加え、生殖器、乳腺、骨格筋においてもアミロイド沈着が観察された。

食肉屠場において、牛アミロイド症は当該病変の部分廃棄として扱われることが多い。牛アミロイド症が疑われた場合、検査保留として、場合によっては全廃棄処分を下すことが出来るような検査体制を整える必要があると思われた。また、牛のアミロイド症の監視を充実させるためには、生体検査や屠畜検査の際に活用できるような、簡便で迅速な簡易診断技術の確立が求められる。

今回、乳腺へのアミロイドの沈着が認められたことによって、牛乳へのアミロイドの移行が危惧されたが、乳腺に沈着が認められたものはすべて 7 歳齢以上の高齢牛だった。市販されている牛乳は、通常、2、3 産まで、多くても 4 産までの牛からしぼられており、最近では、黄色ブドウ球菌等の汚染防止のためにも高齢牛からは搾乳しないよう指導されている。7 歳齢以上の牛からは搾乳しないよう、指導を続けることが重要と思われる。

#### E. 結論

今後、更に症例を重ね、経過に従ったアミロイド沈着部位の推移や、発症年齢と病変の程度や病変分布との関連性、発症初期の病態の解明も必要であると考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 採卵鶏群に発生したアミロイド症の病理. 鶏病研究会報. 2003, 39(1), 38-42.

##### 2. 学会発表

なし。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許所得

なし。

##### 2. 実用新案登録

なし。

##### 3. その他

なし。

## 高齢ウシの腎臓におけるアミロイド沈着の組織学的検討

分担研究者 池田修一 信州大学医学部第三内科

共同研究者 東城加奈\*、松田正之\*、徳田隆彦\*\*

\*信州大学医学部第三内科

\*\*信州大学大学院加齢適応医科学系専攻

研究要旨 動物の個体間でアミロイドーシスが伝播する可能性があることは、近年、アミロイド細線維の投与によって様々なアミロイド蛋白の線維形成が促進されることが *In vivo* あるいは *In vitro* で報告されている。これに関連してヒトのアミロイドーシスで生じる医学的な問題としては、アミロイドーシス発症素因を有する個体が経口的にアミロイド細線維を摂取した場合に、アミロイドーシスの発症が促進される可能性が考えられる。このような背景から、今回我々は、食用として解体された一見正常に見えるウシの腎臓におけるアミロイドーシスの発症頻度を検討した。今回検討した 113 例では、1 例(9 歳雌、ホルスタイン種)で病理学的にアミロイド沈着を認め、その発症頻度は 0.88%であった。ウシのアミロイドーシスに関する過去の報告では、1990 年に藤永が高齢ウシを対象とした検討を行い、その頻度を 0.8%と報告しているが、今回の検討でも 1%前後の食用牛にアミロイドーシスが発症しているものと推測された。今後対象数を増やした検討、発症を規定する因子の解明および食用牛のアミロイドーシスに対する医学的な対応の指針を確立することが必要と考えられた。

分担研究者：池田修一  
信州大学第三内科・教授

### A. 研究目的

近年、プリオン病やマウスの AA および ApoA II アミロイドーシスなどでは、個体間におけるアミロイドーシスの伝播が証明されている。特にプリオン病では、家畜からヒトへの伝播が注目され、医学的・社会的に大きな問題になっている。

また *in vitro* では、アミロイド細線維にはアミロイド原性蛋白質の線維形成促進効果があり、さらにこのアミロイド細線維を構成するアミロイド原性蛋白質の種類がアミロイド原性蛋白単量体とは異なっているにもかかわらず、そのアミロイド線維構造自体が単量体の線維化促進効果を有することが示されている。こうした従来の知見からは、ヒトに生じる医学的な問題として、慢性炎症性疾患患者や家族性アミロ

イドポリニューロパチー患者の肝臓をドミノ移植により移植された患者などのアミロイドーシスの発症素因を有する個体が、経口的にあるいはその他の経路でアミロイド細線維を摂取した場合に、そのアミロイドーシスの発症が促進される可能性がある。このような医学的・社会的背景から、現時点で、食用に供される動物でのアミロイドーシス発症頻度を検討することは、社会医学的に意義が大きいものと考えられる。そこで今回、食用動物の代表として、ウシにおけるアミロイドーシスの発症頻度を検討することを計画した。本邦では1990年藤永が高齢雌ウシにおけるアミロイドーシスの発症頻度を肉眼病理学的に検討し、その頻度を0.8%と報告している。また、アミロイド沈着の臓器別頻度では、腎臓が最も高いことを指摘している。現在ウシの流通は、BSEの影響もあり、明らかに病的なウシは食用として解体される前に疾病牛として排除されている。また、通常の牛の解体でも心・肺・消化器・肝などの臓物は、解体後、食肉とは違う経路で流通されている(図1)。

そこで今回我々は、食用に供される目的で屠殺される一見正常に見えるウシにおけるアミロイドーシスの発症頻度を明らかにする目的で、食用牛の腎臓(後腹膜臓器のため他の臓物とは異なり、解体時には骨格筋とともに存在する)を用いてアミロイド沈着の有無を病理学および生化学的に検討した。

## B. 研究方法

対象：2003年10月から12月までに

長野県内某所の食肉センターで食用として解体された2-16歳の雌ウシ113例(年齢；2歳1例、3歳4例、4歳8例、5歳8例、6歳19例、7歳17例、8歳13例、9歳14例、10歳6例、11歳5例、12歳4例、13歳5例、14歳4例、15歳1例、16歳4例、種類；ホルスタイン84例、和牛27例、ジャージー2例)を対象とした。検索臓器としては、これまでの報告から、ウシの臓器においてアミロイドの沈着率が最も高い臓器である腎臓を用いた。

方法：

### 1. 病理学的検討

解体された食用牛から腎臓を採取し、腎皮質・髓質を含む小切片(約1.5cmx2cm)を切り出し、10%ホルマリン液に固定後、パラフィン包埋切片を作成した。染色はH&E染色、phenol Congo red染色(Congo red 0.6g+NaCl 27g+蒸留水300ml+エタノール300mlを原液として、染色前に原液100mlに対しphenol 5gを溶解し、酢酸を1ml滴下した)、種々のアミロイド原性蛋白に対する抗体による免疫染色を行った。

Phenol Congo red染色陽性であったウシの腎皮質から採取した小組織片0.05gをhomogenizeして得られたTris-HClおよび1%SDSに不溶性の画分を6M guanidine-HClで可溶化した。このguanidine可溶画分を透析後にSDS-PAGEで分離し、CBB染色によりアミロイド原性蛋白を検出した。

## C. 研究結果

### 1. 病理学的検討

今回の検討では113例中1例のみ(0.88%)がphenol Congo red染色でアミロイド沈着陽性であった。陽性ウシは9歳雌、ホルスタイン種で、胃炎、腸炎、肝出血、脂肪肝を合併していた。アミロイド沈着は、糸球体輸入動脈、糸球体係蹄壁、髄質血管周囲、および尿細管周囲に認められ、偏光顕微鏡下で緑色複屈折を示した(図2上段)。またその沈着アミロイドは抗ヒトAA抗体による免疫染色で陽性に染色された(図2下段)。

アミロイド沈着が陽性であった9歳ホルスタインの腎臓小組織片の6M guanidine可溶画分のSDS-PAGEでは、アミロイド原性蛋白と考えられる約14kDaのバンドが検出された(図3)。これがアミロイド原性蛋白の分子量はこれまで報告されているAA蛋白のものと一致していた。

#### D. 考察

本邦におけるウシのアミロイドーシス発症頻度については、藤永(1990)の6歳から14歳の雌ウシ3000例を対象とした検討がある。この検討では、解体時に腎臓を摘出し、iodine sulfuric acid (ISA)反応で肉眼的に腎剖面のスクリーニングを行った後に、陽性例について全身臓器(腎・肝・副腎・腸管・心筋・肺)の病理学的検討を行っている。結果は、3000例中23例(ホルスタイン1800例中22例、和牛1200例中1例、total 0.8%)がISA反応陽性で、その全例が腎髄質にアミロイド沈着を認めた。その他の臓器では、肝、副腎、腸管では約50%程度にアミ

ロイド沈着を認めたが、心筋や肺にはほとんど認められなかった。またアミロイド沈着頻度には年齢相関性が認められた(図4)。

今回我々は、2歳から16歳の一見正常な食用牛113例を対象とし、全例の腎臓におけるアミロイド沈着の有無をphenol Congo Red染色で病理学的に詳細に検討した。また陽性例については、免疫組織学的検討および生化学的検討も併せて行った。結果は113例中1例(9歳雌、ホルスタイン種)が腎皮質、髄質にアミロイド沈着を認めた。頻度は0.88%であった。沈着アミロイドの主たる構成成分は、抗ヒトAA抗体染色陽性で約14kDaの蛋白質であることから、AA蛋白であると考えられた。今後この蛋白のprotein sequencingなどを行い、沈着蛋白成分の正確な同定を行う予定である。

今回の検討により、食用として流通している一見正常なウシにも、その約1%前後にアミロイドーシスが発症していることが推察された。今後は対象数をさらに増やして食用牛におけるアミロイドーシスの正確な発症頻度を明らかにするとともに、発症を規定する因子の解明および食用牛のアミロイドーシスに対する医学的な対応の指針を確立することが必要である。また、今回のような腎臓を用いた検討に加えて、食用牛で実際に食される臓器でのアミロイド沈着率の検討も必要と考えられる。しかし、現時点でのウシの流通経路や社会的背景を考慮するとそのような疫学的研究はかなり困難であり、アミロイドーシスを発症した病的牛での全身臓器の検索が、食用牛の各臓器

におけるアミロイドーシス罹患頻度の参考になるものと考えられる。

#### E. 結論

今回検討した食用牛 113 例での腎臓におけるアミロイド沈着率は 0.88%であった。またそのアミロイド蛋白は、AA アミロイド蛋白であると考えられた。今後対象数をさらに増やして検討を続ける方針である。

#### F. 健康危険情報

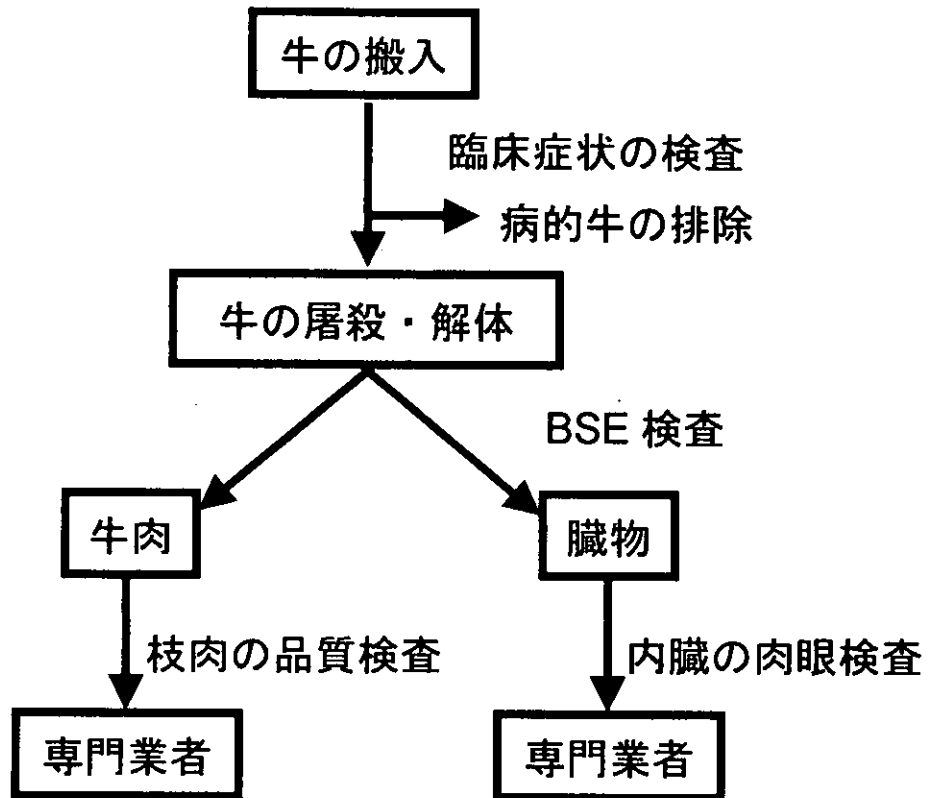
なし

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### H. 知的所有権の取得状況

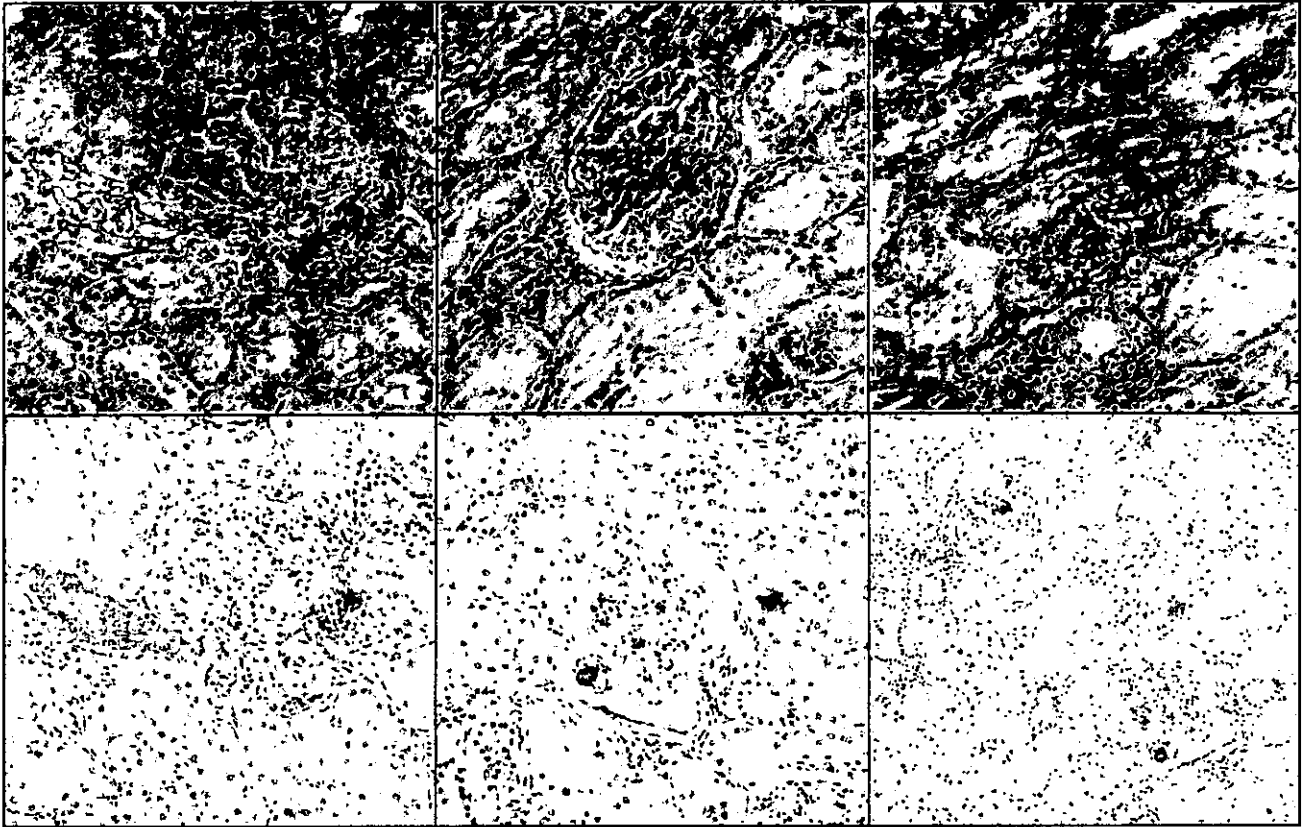
1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし



連続番号：追跡可能

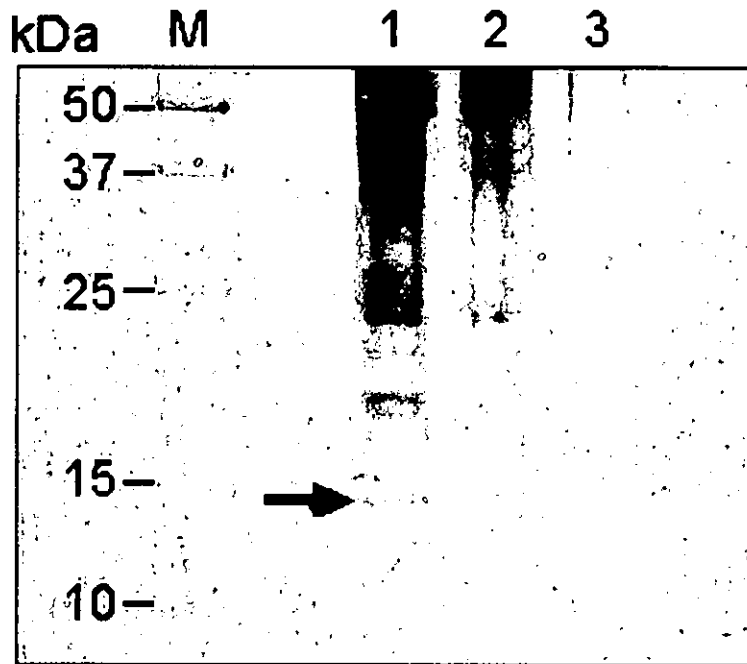
袋詰め後は追跡不能

図1 牛肉・牛物の流通経路



## 図2 病理学的検討

Phenol Congo red染色陽性牛(9歳、雌ホルスタイン)の腎臓の病理組織像。  
上段：phenol Congo red染色、下段：抗AA抗体染色。



### 図3 生化学的検討

アミロイド沈着陽性例の腎皮質より採取した3個の小切片(lane1-3)の6Mゲアニジン可溶画分のSDS-PAGE & CBB染色。14 k Da 付近にアミロイド原性蛋白由来と考えられるバンドが検出された。

	藤永 (山口医学, 39, 293-303, 1990)	今回の検討
対象	6歳以上の雌ウシ3000頭	2歳以上の食用雌ウシ113頭
方法	解体時に腎臓を摘出し、iodine sulfuric acid (ISA) 反応で腎断面のスクリーニングを行い、陽性例は全身臓器の病理学的検討を行った。	食用ウシの腎臓をCongo red染色により病理学的に検討した。陽性例では各種アミロイド蛋白抗体による免疫組織化学的検討と生化学的検討も行った。
結果	ホルスタイン1800例中22例 (1.2%)、和牛1200例中1例 (0.08%)にISA反応陽性。23例全例で腎にアミロイド沈着を認めた。年齢相関性あり。	113例中1例(9歳、ホルスタイン)にアミロイド沈着を認めた。沈着アミロイドは抗AA抗体染色陽性で、その主たる構成成分は約14kDaの蛋白質であった。
合併症	胆管炎、腎膿瘍、心外膜膿瘍など	胃炎、腸炎、脂肪肝、肝出血

図4 牛アミロイドーシスについての病理学的検討

アミロイド沈着による病的要素の検索に関する研究

分担研究報告書

牛の弁膜アミロイド症の病理学的検索

分担研究者 宇根有美 麻布大学獣医学部病理学研究室

研究協力者 田中美穂 麻布大学獣医学部病理学研究室  
大平正剛 神奈川県食肉衛生検査所

牛の弁膜に沈着するアミロイドを病理学的に検索した。検出頻度は 64 頭中 4 頭（平均 6.3%、3.7～20.0%）、全てホルスタイン種の廃用牛で、平均年齢 72.8 カ月齢であった。これらの牛の 3 頭は炎症性病変を有していた。アミロイドは房室弁、特に僧帽弁に沈着し、半月弁には認められなかった。アミロイドの沈着がみられた弁は肉眼的に黄白色を呈し肥厚していた。アミロイドはコンゴ赤染色橙赤色で、蛍光顕微鏡でレンガ色の蛍光を発し、抗 AA アミロイド抗体で陽性となった。他に肝臓、脾臓、消化管などにアミロイドの沈着が認められたが、いずれも少量であった。特異な病型として牛の弁膜 AA アミロイド症が高率にみられることが明らかになった。

A. 研究の目的

弁膜アミロイド症は、ヒトでは弁の障害や癒痕化などに随伴する異栄養性アミロイド症として知られているが、動物での報告は見当たらない。今回、牛の弁膜アミロイド症の発生状況、病理像を明らかにし、病理発生を明らかにするために検索を行った。

B. 研究方法

1) 研究対象 いずれも廃用となったホルスタイン種乳用牛（雌）で、合計 64 頭、その内訳は、全身隈無く検査した A 群 10 頭と弁のみを検査した B 群 54 頭である。平均年齢は 70.7 ヶ月（12～155 ヶ月）で、廃用となった理由は起立不能、乳房炎、第 4 胃変位や関節炎などであった。剖検した結果、何らかの炎症のあったもの 47 頭、なかったものは 17 頭であった。

2) 病理学的検索

これらの材料を 10%緩衝ホルマリン液で固定後、パラフィン包埋、3～4 μに薄切し、HE 染色、コンゴレッド染色、ダイレクト・ファスト・スカーレット染色および抗ヒト AA アミロイド抗体（協和発酵）を用いて免疫組織化学的検索を行った。コンゴレッド染色標本は一般光学顕微鏡以外に偏光装置および蛍光顕微鏡でも観察した。

C. 結果

【検出頻度】

64 頭中 4 頭（6.3%）、その内訳は、A 群 10 頭中 2 頭（20.0%）、B 群 54 頭中 2 頭（3.7%）であった。

【弁膜アミロイド症の牛のプロフィール】

Pr02016B：48 ヶ月齢、病理学的診断：関節

周囲炎、骨軟骨症、関節周囲膿瘍、腎多発性貧血梗塞、間質性腎炎、脾ヘモジデロシス、好酸球性小腸炎

Pr02025B：84 ヶ月齢、病理学的診断：肺膿瘍、化膿性気管支肺炎、間質性腎炎、好酸球性小腸炎

No. 23：72 ヶ月齢、剖検診断：乳房炎、肝包膜炎

No. 47：87 ヶ月齢、剖検診断：起立不能  
4頭の牛の平均年齢は72.8ヶ月で、4頭中3頭に何らかの炎症性病変が認められた。

【病変分布1】

表1 アミロイドの弁における分布

No.	左心室		右心室	
	僧帽弁	大動脈弁	三尖弁	肺動脈弁
Pr02016B	●	—	○	—
Pr02025B	●	—	○	—
No. 23	●	ND		
No. 47	○	ND		

丸印はアミロイド存在（●肉眼的に観察可能、○組織学的に確認）

アミロイドは房室弁のみに沈着し、特に僧帽弁では、肉眼でも異常を確認できた。また、アミロイドは弁の心房面あるいは心室面に限りなく心内膜下に沈着していた。

【弁膜の病理学的所見】

最も重篤であった症例では、弁の遊離縁・ラフゾーンがび慢性に全体的に肥厚し、黄白色を呈し、表面が粗造となっていた。また、軽度の症例では、弁のラフゾーンの表面のみが、粗造となり、やや肥厚しているような感があった。また、肉眼的に病変が確認できた3例には、腱索表面が微細顆粒状になっていた。No. 23では、腱索にのみ病変が認められた。

組織学的には、アミロイドは心内膜下に、HE染色で、弱好酸性、均一無構造の物質として観察され、高度な例では、内膜下に帯状に、軽度な例では限局して、塊状にみられた。部位によっては、内皮細胞は脱落し、アミロイ

ド間に少数の単核細胞の浸潤が認められた。腱索の微細顆粒状病変は、組織学的には内皮下に塊状にアミロイドが沈着し、その表面を腫大した内皮細胞により被覆されている乳頭状病変として観察された。沈着物質は、コンゴレッド染色で赤橙色に染まり、偏光装置で緑色偏光を、蛍光顕微鏡でレンガ色の蛍光を発した。ダイレクト・ファスト・スカーレット染色で赤色、抗ヒトAAアミロイド抗体を用いた免疫染色で陽性となった。

【病変分布2 弁膜以外のアミロイド分布】

全身諸臓器の検索が可能であったPr02016BとPr02025Bの2頭に次のような部位にアミロイドが沈着していた。Pr02016B：肝臓、小腸（粘膜固有層）、腎周囲の脂肪組織。Pr02025B：肝臓、脾臓（被膜）小腸（粘膜固有層）、腸間膜。しかし、いずれの部位においても、ごくわずかで限局性であった。

D. 考察

弁膜に沈着していた物質はその染色性からAAアミロイドを同定された。従来の牛アミロイド症は、主として肝臓、腎臓などを冒すとともに全身に沈着が見られる。高度な場合、心筋線維間や血管に沈着することはあっても、弁膜に肉眼で認識できるほどの病変は形成しない。今回、全身諸臓器が検索できた牛では、弁のみならず、肝臓、脾、小腸などにアミロイドが沈着していたが、限局的で少量であり、明らかに従来の牛のアミロイド症と分布が異なっていた。

牛のアミロイド症の発生頻度に関する報告がいくつかある。対象とする動物や検査方法によって頻度は異なるが、藤永らは老廃牛を対象として22/1,800(1.2%)、6歳以上で高率にみられることを報告した。また、松井らは、廃用牛を対象として、肉眼的および組織学的検索で、31/1118(2.8%)を見出している。弁膜アミロイド症の検出頻度は、平均6.3%、3.7~20.0%で、著しく高率であった。今回の検索で対象とした牛は乳廃用牛で、平均5.9歳、

アミロイド症例は平均6.1歳と決してそれほど老齢ではない。また、廃用理由もまた、罹患していた疾患も従来の廃用牛によく見られる病変で、このように検出率が異なった理由は不明であったが、予想以上に弁膜アミロイド症の検出頻度が高かった。

ヒトでは、異栄養性弁膜アミロイド症が発生する。これは弁膜の障害に関連して沈着し、石灰沈着を伴い、末期に弁膜閉鎖不全を招来する。牛の弁膜アミロイド症には、弁の器質的障害は観察されず、石灰沈着もなく、構成

蛋白はAAアミロイドであった。ヒトの弁膜アミロイド症は、AA、AL、TTR、ANF、 $\beta$ 2M、 $\beta$ 蛋白に対する抗体のいずれにも反応しない構成蛋白が不明なアミロイドとされており、牛と異なっていた。

結論として、牛に特異な沈着分布を示す弁膜 AA アミロイド症が存在し、高率に検出されることが分かった。今後、どのような機序で弁膜 AA アミロイド症が生じるのか、さらに検討する必要がある。



図1アミロイド沈着により肥厚する僧帽弁



図2 心内膜下アミロイド沈着(HE染色)



図3 心内膜下アミロイド沈着(拡大)

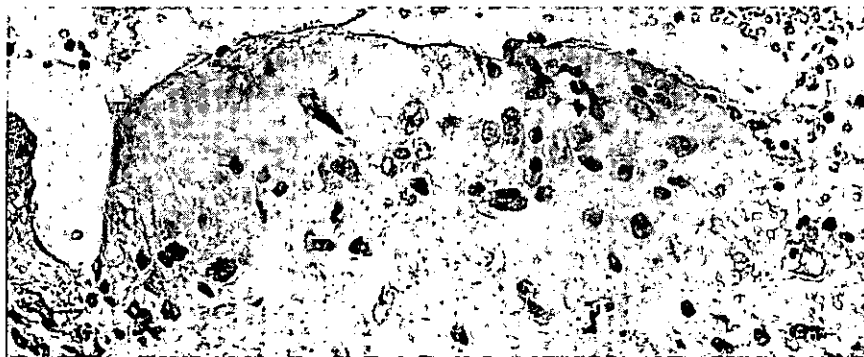


図4 心内膜下アミロイド沈着(コンゴ赤染色)