

む MBS buffer で homogenize した。40%, 38%, 5%の不連続ショ糖勾配を作製して、100,000 g で 19 時間遠心し、1ml ずつ 11 分画を採取し、4 番目の lipid raft 分画を ELISA と Western blotting で検討した。

メラトニンの Tg2576 マウスにおける脳アミロイドの蓄積抑制作用機序を検討するため、24 匹の Tg2576 マウス (メラトニン group) に 4 ヶ月齢から 0.5mg/ml のメラトニンを投与した。対照として 20 匹の無処理 Tg2576 マウスを用いて、それぞれ 8, 9.5, 11, 15.5 ヶ月齢で脳および血液の A $\beta$ 40 と A $\beta$ 42 を ELISA で測定して比較した。SDS 可溶性不溶性分画に蓄積する AB オリゴマー量を Western blot で検討した。

オリゴマー化させた AB 1-42 ペプチドから SDS-PAGE で分離した AB 1-42 テトラマーをマウスに免疫し、AB オリゴマー特異的モノクローナル抗体を作製した。抗体のオリゴマー特異性の検討は AD 患者脳より抽出した脳アミロイドの免疫沈降法と Tg2576 マウス脳免疫組織化学的検討により行った。

### C. 研究結果

組織学的に脳アミロイドが沈着する以前の 6 か月齢から Tg2576 マウスでは lipid rafts に AB ダイマーの出現が認められた。これらは加齢と共に増加し、遅れて AB モノマーが出現した。Epitope mapping では AB40, AB42 ダイマーが同定された。このような、AB ダイマーの lipid rafts における出現は AD 脳、軽度認知障害と考えられる pathological aging の段階から同定された。さらに、AB ダイマーの蓄積は Apo E や過剰リン酸化 tau の蓄積を引き起こしており、

AD 脳で観察される二次的病理変化を引き起こすものと考えられた。

メラトニンの脳アミロイド抑制効果を Tg2576 マウス で検討すると、対照 Tg2576 マウスに比べて 8 ヶ月から 15.5 ヶ月まで有意に脳アミロイド蓄積を抑制した。SDS 抽出 AB40 (P=0.0068), AB42 (P=0.0366)分画とギ酸抽出 A $\beta$ 40 (P=0.0026), A $\beta$ 42 (P=0.0108)分画共に有意に抑制されていた。Tg2576 マウスの SDS 可溶性、不溶性分画では対照群に較べて、メラトニン投与群で AB ダイマー、モノマーの減少が認められた。一方、マウス血液中にはメラトニン投与群で AB40 と AB42 の増加がみとめられた。メラトニンは脳における AB オリゴマーの形成を抑制し、血液中に AB モノマーを除去することによって、脳アミロイド蓄積を抑制するものと考えられた。

AB オリゴマー特異的モノクローナル抗体は脳アミロイドを組織学的に染色し、今回検討したクローンは蟻酸抽出 AB ダイマーを主に選択的に検出していた。一方、可溶性 AB モノマーや AB 前駆体、AB 前駆体 C 末フラグメントとは全く反応せず、AB アミロイドダイマー特異的抗体であった。

### D. 考察

本年度の検討で、AB ダイマーが超早期脳アミロイド蓄積形態であり、ひき続く AD 脳の二次的病変を引き起こすことが明らかとなった。これらの AB ダイマーの超早期蓄積はモデルマウスの行動異常とも密接に関連しており、組織学的に同定される脳アミロイドよりも、直接の病原性分子と想定される。AD 患者脳から抽出した AB

オリゴマーの脳アミロイド促進作用や末梢血管から投与した AB ペプチドの脳アミロイド結合能と考え合わせると, AB オリゴマーは脳アミロイドーシスにおける病態の最も重要な病因分子と考えられる.

この脳 AB オリゴマーの蓄積はメラトニン投与では確実に解除可能であった. この機序は脳から末梢血液への生理的な AB のクリアランスを維持することによるものであり, 今後の臨床応用が期待される. さらに, 今回, より直接的に AB オリゴマーを認識する抗体の作成に成功した. AB ワクチン療法が重篤な副作用によって頓挫しており, 今後この抗体を用いた受動免疫療法の臨床応用が期待される.

#### E. 結論

lipid rafts における AB オリゴマーの蓄積が脳アミロイドーシスにおける最も重要な病態であることを明らかにした. この, AB オリゴマーの蓄積はメラトニンの経口投与によって解除されることが明らかとなった. AB オリゴマー特異抗体の作成に成功した.

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究結果発表

##### 1. 論文発表

- 1) Ikeda M, **Shoji M**, Kawarai T, Kawarabayashi T, Matsubara E, Murakami T, Sasaki A, Tomidokoro Y, Ikarashi Y, Kuribara H, Ishiguro K, Hasegawa M, Yen SH, Davies P, Chishti M A, Harigaya Y, Okamoto K, Abe K, Carlson GA, St. George-Hyslop

P, Westaway D. Accumulation of Filamentous Tau in the Cerebral Cortex of Human Tau R406W Transgenic Mice. **The American Journal of Pathology** 166(2):521-531, 2005

- 2) Moreira MC, Klur S, Watanabe M, Nemeth AH, Ber IL, Moniz JC, Tranchant C, Aubourg P, Tazir M, Schols L, Pandolfo M, Schulz JB, Pouget J, Calvas P, Shizuka-Ikeda M, **Shoji M**, Tanaka M, Izatt L, Shaw CE, M'Zahem A, Dunne E, Bomont P, Benhassine T, Bouslam N, Stevanin G, Brice A, Guimaraes J, Mendonca P, Barbot C, Coutinho P, Sequeiros J, Durr A, Warter JM, Koenig M. Senataxin, the ortholog of a yeast RNA helicase, is mutant in ataxia-ocular apraxia 2. **Nature Genetics** 69: 225-227, 2004
- 3) Ohyagi Y, Asahara H, Chui DH, Tsuruta Y, Sakae N, Miyoshi K, Yamada T, Kikuchi H, Taniwaki T, Murai H, Ikezoe K, Furuya H, Kawarabayashi T, **Shoji M**, Checler F, Iwaki T, Makifuchi T, Takeda K, Kira J, Tabira T. Intracellular AB42 activates p53 promoter: a pathway to neurodegeneration in Alzheimer's disease. **The FASEB Journal** 19(2):255-257, 2005
- 4) Kawarabayashi T, **Shoji M**, Younkin L, Wen-Lang L, Dickson DW, Murakami T, Matsubara E, Abe K, Ashe KH and Younkin SG, Dimeric A $\beta$  Rapidly Accumulates in Lipid Rafts Followed

by ApoE and Phosphorylated Tau as Memory is Impaired in the Tg2576 Mouse Model of Alzheimer's Disease. **Journal of Neuroscience** 24(15): 3801-9, 2004

- 5) Matsubara E, Sekijima Y, Tokuda T, Urakami K, Amari M, Shizuka-Ikeda M, Tomidokoro Y, Ikeda M, Kawarabayashi T, Harigaya Y, Ikeda S, Murakami T, Abe K, Otomo E, Hirai S, Frangione B, Ghiso J, **Shoji M**, Soluble A $\beta$  homeostasis in AD and DS: impairment of anti-amyloidogenic protection by lipoproteins. **Neurobiology of Aging** 25(7):833-41, 2004
- 6) Ikarashi Y, Harigaya Y, Tomidokoro Y, Kanai M, Ikeda M, Matsubara E, Kawarabayashi T, Kuribara H, Younkin SG, **Shoji M**. Decreased level of brain acetylcholine and memory disturbance in APPsw mice. **Neurobiology of Aging** 25: 483-90, 2004

## 2.学会発表

### 1. 一般演題

- 1) Kawarabayashi T, **Shoji M**, Younkin LH, Wen-Lang L, Dickson DW, Murakami T, Matsubara E, Nagano I, Abe K, Ashe KH, Younkin SG. Dimeric A $\beta$  rapidly accumulates in lipid rafts followed by ApoE and phosphorylated tau as memory is impaired in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. **Neuroscience 2004, the Society for Neuroscience 34th Annual**

Meeting, San Diego, 2004, 10, 23-27

## 2.シンポジウム, 教育講演

- 1) **Shoji M**, Soluble A $\beta$  homeostasis in Alzheimer's disease and Down syndrome: impairment of anti-amyloidogenic protection by lipoproteins, IANA International Symposium October 1, 2004, Tokyo

## 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

## 本邦高齢牛における全身性 AA アミロイドーシスと骨格筋病変に関する研究

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 吉田拓弘 徳田隆彦 信州大学医学部第三内科  
付 笑影 樋口京一 信州大学加齢研脈管病態  
星井嘉信 石原得博 山口大学医学部第一病理  
松井高峯 帯広畜産大学獣医学部家畜病理  
山田 学 動物衛生研病態病理

### 研究要旨

マウスを用いた実験的アミロイドーシスは個体間で伝播することが証明されており、その機序はプリオン病に類似していると想定されている。ヒトの食品に関連したアミロイドーシスとして高齢牛に発生する全身性 AA アミロイドーシスがある。本研究では第一段階として公的屠殺場で外見上は正常として屠殺された高齢牛 (4~19 歳、平均 8 歳) 302 頭の腎組織を採取して、Congo red 染色標本を偏光顕微鏡で観察して、アミロイド沈着の有無を検索した。15 頭にアミロイド沈着を認め、その頻度は 5% であった。アミロイド蛋白は生化学的ならびに免疫組織化学的検索により全例 AA と同定した。罹患牛 15 頭は解体時に内臓の肉眼的異常所見が見られ、基礎疾患として慢性炎症性疾患の存在が疑われた。第二段階としてヒトの食の安全を検討する目的で、さらなる 26 頭では腎臓と骨格筋を同時に採取して Congo red 染色標本を作成して、両組織におけるアミロイド沈着の有無を検索した。26 頭中 1 頭において腎組織へのアミロイド沈着が見られたが、骨格筋にはアミロイドは見られなかった。

### A. 研究目的

マウスの老化アミロイドーシス (senescence-accelerated mouse : SAM) は個体間で本アミロイドーシスが伝播することが証明されている。具体的には SAM 発症マウスと同居している若年マウスが本疾患を高率に発症し、その機序として若年未発症マウスが罹患高齢マウスの糞を舐めることにより、その中に含まれるアミロイド細線維が経口的に未発症マウスの体内へ入ることで発症を促進すると考えられている。この仮説を裏付ける事実として、SAM 発症マウスから分離・

精製した ApoAII 由来のアミロイド細線維を若年マウスに経静脈的または経口的に投与するとこれらマウスは 100% の確率で SAM を発症する。同様にマウスを用いた実験的 AA アミロイドーシスにおいても、AA アミロイド細線維の経口投与により本疾患が容易に誘発されることが明らかにされ、その機序としてプリオン病と共通する病因論が推測されている。AA アミロイドーシスは高齢牛において発生することが知られているため、牛の臓物を食するヒトは AA アミロイド細線維を経口的に摂取する危険性がある。特

に関節リウマチの長期罹患者、長期透析患者などの全身性アミロイドーシスを発症する危険性の高い個体がこうしたアミロイド細線維を摂取することは好ましくないと考えられる。本研究では公的屠殺場で外見上健常として処理された高齢牛における AA アミロイドーシスの正確な頻度とその病態を明らかにし、さらにこうした罹患牛における骨格筋へのアミロイド沈着についても検索する。

## B. 研究方法

第一シリーズとして公的屠殺場で外見上は正常として屠殺された高齢牛 302 頭の腎組織を採取した。Congo red 染色標本を偏光顕微鏡で観察し、アミロイド沈着のあった例はアミロイド蛋白を免疫組織化学的に同定した。また一部の例では腎組織からアミロイド細線維を精製して蛋白化学的分析した。第二シリーズとして同様な高齢牛 26 頭から腎組織と骨格筋組織を同時に採取して検索した。

(倫理面への配慮)

本研究は信州大学医学部における動物実験の倫理指針に沿う形で行われた。

## C. 研究結果

第一シリーズとして検索した牛 302 頭はホルスタイン 235 頭、和牛 67 頭、年齢 4~19 歳、平均年齢はホルスタインが 92.5 ヶ月、和牛が 146.8 ヶ月 8 であった。15 頭 (ホルスタイン 13 頭、年齢 55~150 ヶ月 : 和牛 2 頭、年齢 95、157 ヶ月) にアミロイド沈着が見られ、病変の主体は腎乳頭部を中心とする髄質であった。8 頭には皮質にもアミロイド沈着が見られたが、2 頭を除くといずれも軽度であった。アミロイド蛋白は免疫組織化学的検索にて全例 AA であり、2 頭で

行ったアミロイド細線維の蛋白化学的分析でも AA のアミノ酸配列を確認した。これら 15 頭には肉眼的に内臓病変 (肝出血、胆道感染、慢性胃腸炎など) が見られ、全ての臓物は破棄された。しかし骨格肉その他の利用物は市場に出荷された。

第二シリーズとして検索した 26 頭では 1 頭に腎髄質への中等度のアミロイド沈着がみられたが、骨格筋にはアミロイド沈着はなかった。

## D. 考察

本研究では公的屠殺場で処理されている高齢牛の 5% に内臓器官を障害する全身性反応性 AA アミロイドーシスが見出された。この頻度は過去に藤永らがわが国から報告<sup>5)</sup>した 1.2%、諸外国の 0.4~2.7% という報告結果<sup>4,6)</sup>に比較して非常に高い。藤永らは牛腎臓の断面をヨード・スルフィン酸反応でスクリーニングして、陽性例のみを病理組織学的に検索していた。本研究では全例を顕微鏡的に検索しており、微量なアミロイド沈着例も含まれていることが高頻度の数値として現れたと考えられる。高齢牛の全身性反応性 AA アミロイドーシスはヒトと同様に難治性の下痢、蛋白尿を主体とするネフローゼ症候群を呈するが、本研究で見出された腎臓へのアミロイド沈着例が臨床的には無症状として取り扱われていたのは、障害部位の主体が髄質であり、皮質の障害が軽かったために臨床症状が目立たなかったと想定される。本研究の最終目標はヒトの食の安全性を確保することであるが、こうした内臓に AA アミロイドーシスがある牛の骨格筋は市場に出回っている。そこで本研究でも少数例であるが、高齢牛の腎臓と骨格筋を同時に採取して両組織におけるアミロイド沈着の検索を開始した。今後はこうした点を重点的

に検討する予定である。

#### E. 結論

公的屠殺場で処理されている高齢牛におけるAA アミロイドーシスの頻度は予想以上に高い。ヒトの食の安全を確保する上でもこうした病態のさらなる解明が必要である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Fu X, Korenaga T, Fu Li, Xing Y, Guo Z, Matsushita T, Hosokawa M, Naiki H, Baba S, Kawata Y, Ikeda S, Ishihara T, Mori M, Higuchi K: Induction of AApoAII amyloidosis by various heterogenous amyloid fibrils. FEBS Lett 563: 179-184, 2004.

2) Tojo K, Tokuda T, Hoshii Y, Fu X, Higuchi K,

Matsui T, Kametani F, Ikeda S: Unexpectedly high incidence of visceral AA-amyloidosis in slaughtered cattle in Japan. Amyloid: J Protein Folding Disord in press.

##### 2. 学会発表

1) Tojo K, Tokuda T, Hoshii Y, Fu X, Higuchi K, Matsui T, Ikeda S: Unexpected high incidence of visceral AA-amyloidosis in slaughtered cattle in Japan. In International Symposium Prion Diseases, Sendai, Japan. October 31-November 2, 2004.

#### 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

牛アミロイドのウサギとヤギへの伝達実験

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

アミロイドーシス牛の腎臓より抽出したアミロイドをウサギおよびヤギに腹腔内、静脈内、経口投与しアミロイドーシスの伝達実験を試みた。腹腔内投与群のウサギでは 8/60、静脈内投与群では 28/46、経口投与群では 0/28 でアミロイドーシスの発生がみられた。腹腔内投与のヤギでは 0/3、静脈内投与では 2/4 にアミロイドーシスの発生がみられた。

A. 研究目的

牛のアミロイドがマウス以外の動物にも AEF (Amyloid Enhancing Factor) として作用する可能性をウサギとヤギを用いて検索する。

B. 研究方法

アミロイドーシス牛の腎臓より水抽出法により抽出した牛アミロイドをウサギおよびヤギに静脈内、腹腔内、経口的に投与後 FCA (Freund's Complete Adjuvant)、カゼイン等による炎症誘発を行った後、経時的に病理解剖を実施し、病理組織学的にアミロイド沈着の有無を検索する。

C. 研究結果

ウサギでは静脈内投与群 28/46 (61%)、腹腔内投与群 8/60 (13%)、経口投与群 0/28 (0%) でアミロイド沈着が誘発された。誘発症例のアミロイド沈着は主に脾臓と腎臓で認められた。

ヤギでは腹腔内投与群 0/3 (0%)、静脈内投与群 2/4 (50%) でアミロイド沈着が脾臓のみで認められた。

D. 考察

アミロイドーシス牛の腎臓より抽出したアミロイドはウサギおよびヤギに対して AEF 活性があるものと思われたが、その活性は投与経路によって大きく異なることが示唆された。今回の検索では経口投与による AEF 活性を証明できなかったが、マウスでは経口投与においてもその活性が証明されていることから、ウサギ等においても投与方法・条件、炎症刺激の条件等をかえることにより再検索する必要があるとおもわれた。

E. 結論

アミロイドーシス牛の腎臓より抽出した牛アミロイドはウサギ、ヤギに対して静脈内投与で AEF 活性を示すことが認められた。しかしながら、現時点で経口投与による活性は証明されなかった。実験条件等を変更して、再度ウサギ等で経口投与による AEF 活性を検索する必要性が示唆された。

F. 危険情報

特になし

G. 研究発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

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  
山本 佑 （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 16 年 8 月までの二年間に病性鑑定を実施した牛 5702 頭のうちアミロイド症は 20 例で、その発生率は 0.35% だった。今回、抽出牛アミロイドを接種した豚においてアミロイドの沈着は認められなかった。

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。

また、牛腎由来 AA アミロイドの豚への接種試験を実施し、牛アミロイドの豚への伝播の可能性を検討する。

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 16 年 8 月までの二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、二年間での牛アミロイド症の発生頻度を明らかにする。

アミロイド症の牛腎臓より抽出した牛アミロイドを豚 12 頭（1 群）に腹腔内接種し、18 頭（2～4 群）に静脈内接種した。フロイントの完全アジュバントと硝酸銀を併用（1,2 群）、カゼイン（3 群：6 頭）、カゼインと硝酸銀を併用（4 群：6 頭）による炎症刺激を頻回実施し、経時的に剖検して（接種 2～6 週間後）病理組織学的に検索した。

（倫理面への配慮）

動物実験は、（独）動物衛生研究所動物実験倫理委員会の規定に基づき実施した。

C. 研究結果

平成 14 年 9 月から平成 16 年 8 月までの二年間に病性鑑定を実施した牛 5702 頭のうちアミロイド症は 20 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（6 歳）で、残りはすべて 7 歳から 12 歳の間であった。

今回、抽出牛アミロイドを接種した豚においてアミロイドの沈着は認められなかった。

D. 考察

平成 14 年 9 月から平成 16 年 8 月までの二年間に病性鑑定を実施した牛 5702 頭のうちアミロイド症の発生率は 0.35% だった。症例は 6 歳以上にみられる傾向にあった。

近年、続発性の AA アミロイド症において、アミロイドの接種とその後の炎症刺激によるマウスへの発症促進の報告がある。牛の AA アミロイ



ドにおいてもマウスへの投与とその後の炎症刺激によって発症促進が認められ、家畜のアミロイド症の病理発生においても、アミロイドの摂取の関与の可能性も疑われている。しかし、牛の AA アミロイド症に関してその病理発生は詳細にされておらず、その他動物へのアミロイド接種によるアミロイド症発症促進を家畜で検索した報告はない。今回、牛腎由来 AA アミロイドの豚への接種試験を実施し、豚におけるアミロイド症発症促進の可能性を検討した。対象動物として豚を選択した理由は、豚の SAA の検査キットが市販されており、既存の SAA のデータがあり、SAA の検索が可能なためであること、アミロイド症の自然発生例の報告があることである。今回、家畜を使うという目的で、扱いやすいことと、異種動物を用いる目的から牛ではない家畜として豚をまず選択した。今回、炎症刺激の方法をいろいろ変えてみたが、牛アミロイドを接種した豚においてアミロイドの沈着は認められず、今回の条件では、牛 AA アミロイド接種による豚のアミロイド症の発現は認められなかった。今回はアミロイド接種や炎症刺激の条件検討が不十分で詳細に検討することができなかったが、今後、アミロイド接種によるアミロイド症発症促進の可能性を、家畜のアミロイド症についても詳細に検討する必要があると思われる。

#### E. 結論

牛アミロイド症について、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  
なし。

#### 2. 学会発表

1) 中村菊保, 早稲田万大, 山本佑, 山田学, 中澤宗生, 秦英司, 寺崎敏明. 採卵用成鶏におけるアミロイド症を伴う鶏痘による増殖性壊死性皮膚炎の病理. 第 139 回日本獣医学会学術集会 (平成 17 年 3 月).

#### 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。

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

チーター(*Acinonyx jubatus*)由来アミロイドの伝達性に関する研究

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 山本 諭 麻布大学獣医学部病理学研究室

チーターの重要な死因であるアミロイド症の発生メカニズムを解明するために、チーター由来アミロイドの伝達性について検討した。アミロイド症により死亡したチーターの肝臓より Pras の変法 (NaCl 回収法) を用いて、アミロイド線維を抽出し、Freund's complete adjuvant と 10%カゼインにより炎症刺激を行った ICR マウスの腹腔にアミロイド線維湿重量 5、20、100mg/マウスに投与したところ、8日目までに 8 匹中 6 匹の脾臓にアミロイドの沈着が観察された。同様の刺激で経口投与した場合、アミロイドの沈着がみられなかったことから、チーターのアミロイドは Amyloid enhancing factor 効果を持っているものの、ウシやマウスに比較してその効果は低いと推察された。

A. 研究の目的

チーターは絶滅危惧種に指定され、世界的規模で保護が行われている。しかしながら、目立った個体数の増加はなく、国内ではむしろ減少しており、1994 年 90 頭を越えていた飼育数が、2003 年には 50 頭を切った。チーターを絶滅の危機から救うためには、チーターの死因として重要なアミロイド沈着のメカニズムを解明する必要がある、今までに日本動物園水族館協会種の保存委員会の協力を得て、死亡したチーターについて疫学のおよび病理学的に解析してきた。その結果、多頭飼育をしている飼育施設由来チーターの平均寿命は短く、アミロイドの沈着も高度で、何らかの環境因子が関与していることを明らかにしてきた。本研究では、アミロイド症の発生メカニズムを解明することを目的として、チ

ーター由来アミロイドの伝達性を検討した。

B. 研究材料と方法

1) 接種材料：アミロイド症により死亡したチーター C-68 ビヨンデイ、雄、4 歳 (Ex030810) の肝臓を用いた。肝臓のアミロイド指数は 3 (指数は 0~3 で表記し、3 は沈着高度)。

2) 使用動物：ICR クローズドコロニー (非近交系)、Slc; 日本 SLC より購入。

3) アミロイド抽出方法：Pras らの方法の変法 NaCl 回収法

ホモジナイズした肝臓を蒸留水に懸濁し、これに NaCl を加えてアミロイド線維を析出させ、回収する方法。

4) 投与方法：アミロイドの経口投与は、カテーテルを用いて直接胃内に行った。腹腔接種は常法に従って行った。

#### 5) 炎症刺激

Freund's complete adjuvant (DIFCO) と 10% カゼイン (ヤトロン社製) の混合液 0.5ml を背部に皮下注射して炎症刺激を行った。

#### 6) 実験プログラム

炎症刺激とアミロイド接種をそれぞれ 1 回、同時に行い、4 日後と 8 日後に安楽死し、アミロイドの沈着を病理組織学的に確認した。

### C. 結果

接種した 8 匹のうち 6 匹のマウスにアミロイドの沈着が確認された。その詳細は表の 1 のとおりである。

詳細なデータは示さないが、伝達実験のための条件設定のために 20 回の実験を行い、各種条件の検討を行ったので、以下に結果のみを示す。

1) アミロイド抽出方法：山口大学医学部に赴き、Pras らの方法の変法 NaCl 回収法を用いて、アミロイドを抽出して接種材料とすると、アミロイド沈着が観察されたが、同じチーターの肝臓を用いて、同じ方法で麻布大学において抽出したアミロイドを接種してもアミロイドの沈着はみられなかった。都合 2 回山口大学で抽出し、技術や条件を検討したが、何ら技術的に異なるところはなく、抽出場所が異なると、なぜ、アミロイドの伝達が起きないのか、その理由は、今もって不明である。

2) 接種材料と接種量：山口大学で抽出したアミロイドには、AEF 効果があったが、チーター肝臓乳剤を腹腔接種してもアミロイドは沈着しなかった。1 匹当たりアミロイド湿重量 5、20、100mg を接種したが、接種量が多いと接種後 4 日ぐらいまでに 75%内外の

マウスが死亡した。接種後の動物の状態と沈着程度から単回、5mg/マウスが最も適当な接種量と判断した。

なお、観察期間としては、接種後 3 日でアミロイドの沈着を確認できるが、その量はごく少量で、判定には特殊染色が必要であった。8 日目には、容易に判定できるほどの十分量のアミロイドの沈着がみられた。

対照として、予め AEF 効果を示すことが確認されているウシとマウスの抽出アミロイドを用意した。マウスアミロイド線維溶解液を用いた実験を 4 回行ったが、50%の伝達率であった第 1 回を除いて他の 3 回の伝達性は 100%であった。ウシアミロイド NaCl 抽出アミロイドでは 50%の伝達性を示した。

3) 使用動物：実験には、ICR クローズドコロニー (非近交系)、Slc; 日本 SLC より購入したものと、Crlj; 日本チャールズリバーより購入。C57BL/6J; AA アミロイド症モデルとして用いられる近交系マウス、チャールズリバーより購入の 3 系統のマウスを用いた。アミロイド抽出場所により、実験結果が異なっていたため、正確に判断できなかったが、少なくとも今回使用した 3 系統で、伝達性に系統差はないものと判断された。

4) 投与方法：アミロイドの腹腔投与では伝達可能であったが、経口投与では伝達しなかった。肝臓乳剤を用いた場合、どのような接種方法を用いても伝達しなかった。

5) 炎症刺激：炎症刺激には、Freund's complete adjuvant (DIFCO 社製とシグマ社製)、カゼイン (ヤトロン社製と Wako 社製) と硝酸銀の検討をおこなった。その結果、Freund's complete adjuvant (DIFCO 社製) と 10%カゼイン (ヤトロン社製) の混合液 0.5ml、1 回、皮下注射のみで、アミロイドの伝達性を検討できた。当初、薬剤の製造元の違いが伝達性に影響を与える可能性が指摘

されていたが、少なくとも、今回用いた薬剤の製造元間で、結果に差はなかった。

#### D. 結論

炎症刺激下（アジュバンドとカゼイン混合液の1回皮下注射）で、チーター由来アミロイド（肝臓より NaCl 回収法、腹腔内接種）が伝達することが

証明された。しかし、経口投与で伝達性が証明されず、対照として行ったマウスアミロイド伝達実験結果と比較すると、チーターのアミロイドは Amyloid enhancing factor 効果を持っているものの、マウスに比較してその効果は低いと推察された。

アルツハイマー病βアミロイド線維およびAβ蛋白に対する各種生体分子の  
親和性の定量的解析（その2）-伝播機構解析の為の基礎的検討-

分担研究者 内木 宏延 福井大学医学部病因病態医学講座・分子病理学領域  
共同研究者 長谷川一浩 福井大学医学部病因病態医学講座・分子病理学領域

研究要旨 脳内においてアルツハイマー病βアミロイド線維(fAβ)形成・沈着・伝播を引き起こす複雑な分子間相互作用を解明するため、表面プラズモン共鳴法測定装置（ピアコア）を用いて網羅的解析を試みている。昨年度に引き続き、fAβ及びAβ蛋白質モノマーに対する各種生体分子（血漿蛋白質、細胞外基質成分等）の親和性を測定した。その結果、特に、Aβ蛋白質モノマーに対して結合速度が遅く、親和性の低い成分が検出された（HSA, トランスフェリンなど）。確認のため、Aβ蛋白質の部位特異的固定化法を開発し検討を行った。結果的には、いずれも低親和性であることが確認されたが、複数の固定化法により測定することで、より特異性の高い解析を行うことが可能となった。本方法により、Aβ蛋白質動態とfAβ形成に重要な影響を及ぼす生体成分を特定し、それらの反応機構を解析できると考える。また、本解析法を各種アミロイド線維に応用し、沈着・伝播に係わる生体成分を同定することも可能と考えられる。

#### A. 研究目的

われわれはこれまでに、各種前駆体蛋白質からのアミロイド線維形成過程を、チオフラビンTを用いた閉鎖反応系、さらには表面プラズモン共鳴装置を用いた開放反応系を駆使して速度論的に解析してきた。その結果、同過程が重合核依存性重合モデルで説明できることを明らかにした。このモデルは、Aβ蛋白からの重合核形成過程及び線維伸長過程より成るが、後者の過程は一次反応速度論形式に従い速やかに進行する。一方、核形成過程は熱力学的に起こりにくく、全体の

律速過程になっている。アミロイドの伝搬は、核としてのアミロイド線維の伝搬により線維形成が誘発される現象と考えられる。

生体内における、アミロイド線維形成あるいは、前駆体蛋白質の産生、代謝過程を検討する上で、生体分子との相互作用を考慮することは不可欠である。アミロイド前駆体蛋白質が各種の生体成分と複合体を形成したり、アミロイド線維が好発部位に存在する特定の生体成分と強く相互作用して沈着することなどが考えられる。そこで昨年度は、Aβ蛋白とβ

アミロイド線維 (fA $\beta$ ) に対する各種生体成分の親和性を網羅的かつ定量的に解析し比較することを試みた。また、A $\beta$  蛋白および fA $\beta$  に対する各種生体分子の反応速度定数を測定し、生体を模倣する開放反応係数値モデルを用いたシミュレーションを行った。これにより、共存分子が A $\beta$  蛋白の動態にどの様に影響を及ぼすのかを推定することが可能と思われる。また、複数の反応を統合し定量的に評価することで、A $\beta$  蛋白の動態および fA $\beta$  形成過程の全体をシステムとして解析できる可能性があることを示した。本年度は、昨年度に引き続き、各種生体成分の親和性測定を進め、fA $\beta$  及び A $\beta$  蛋白質モノマーに対する各種生体分子 (血漿蛋白質、細胞外基質成分等) の親和性を測定した。その結果、特に、A $\beta$  蛋白質モノマーに対して結合速度が遅く、親和性の低い成分が検出された (HSA、トランスフェリンなど)。確認のため、A $\beta$  蛋白のセンサーチップへの部位特異的固定化法を開発し検討を行った。

## B. 研究方法

測定には表面プラズモン共鳴法を測定原理とする BIAcore 3000 (ピアコア) を用いた。反応のモデルケースとして、A $\beta$  40 蛋白、および、 $\beta$  アミロイド線維 (fA $\beta$  40) の系を用いた。センサーチップ上の別々のフローセルに、A $\beta$  蛋白モノマー、及び fA $\beta$  を固定化し、これに各種生体分子 (精製蛋白質) を含む緩衝液を添加し、A $\beta$  蛋白、fA $\beta$  それぞれに対する結合並びに解離速度定数、更に解離平衡定数 ( $K_D$ ) を求めた。この方法

により、平衡状態での親和性のみならず、動的な反応性を定量化した。

## 倫理面への配慮

本研究は試薬を用いての試験管内実験であり、倫理面での問題はない。

## C. 研究結果

1. 従来は、A $\beta$  40 蛋白の N 末端およびリジン残基のアミノ基を利用して、ピアコアセンサーチップ表面に固定を行っていた。今回は、センサーチップ表面にストレプトアビジンあるいは、システインを特異的に結合する活性基を導入した。次いで、N 末端あるいは C 末端にビオチンあるいはシステインを導入した A $\beta$  40 蛋白を反応させることで、部位特異的に固相化することが可能となった。

2. 血清アルブミン、トランスフェリン等について、末端特異的に固定化した A $\beta$  40 蛋白に対する親和性を測定したが、従来の固定化法の場合と同様に、低い親和性を示した。

3. 生体内で A $\beta$  40 蛋白の代謝に対して影響することが指摘されている  $\alpha$ 2-マクログロブリンについて、fA $\beta$  40 と A $\beta$  40 蛋白に対する親和性を測定した。fA $\beta$  40 に対しては、強い親和性を示したが、反応性は微量金属濃度に強く影響を受けた。

## D. 考察

本研究では、前駆体蛋白の代謝・分解・アミロイド形成の各経路を解析するために、A $\beta$  蛋白および fA $\beta$  に対する各種生体分子の親和性を網羅的かつ定量的に解析し、モデルを構築することを最終目標

とする。表面プラズマ共鳴法測定法（ピアコア）は、測定する対象物を修飾して標識する必要が無く、また、リアルタイム測定を行うため、比較的弱い分子間相互作用の親和性を測定することができる数少ない方法のひとつである。一方、生体分子間の相互作用を測定する為には少なくとも一つの成分の標識あるいは固相化が避けられない。今回、A $\beta$ 40蛋白の部位特異的固相化法を開発したことにより、N末端側あるいはC末端側の特定の残基に対して反応する場合でも、対応が可能となった。また、スペーサー化合物を導入することで、固相表面とA $\beta$ 40蛋白の距離を確保することができ、相互作用する際の立体障害を低減することができる。この様な工夫により、より信頼性の高い親和性定数測定が可能となった。

今後は今年度開発した方法により測定した結果を用いて、昨年度示したようなA $\beta$ 蛋白の産生・代謝・アミロイド線維形成に関する様々な生体分子の相互作用を考慮した数値モデルをさらに精緻にし、 $\beta$ アミロイド線維形成を脳内の一つのシステムとして再構成する試みを行う。また、各種のアミロイド線維と細胞外マトリックス成分などとの親和性と、生体成分による線維の安定化を解析することで、重合核としての線維の沈着・伝播に関する解析を展開することを計画している。

#### E. 結論

A $\beta$ 蛋白および fA $\beta$ に対する各種生体分子の親和性を比較し、線維の沈着機序に及ぼす生体分子の効果の解析を行っている。その結果、特に、A $\beta$ 蛋白質モノマ

ーに対して結合速度が遅く、親和性の低い成分が検出された（HSA, トランスフェリンなど）。確認のため、部位特異的固定化法を開発し検討を行った。結果的には、いずれも低親和性であることが確認されたが、複数の固定化法により測定することで、より特異性の高い解析を行うことが可能となった。この様な方法により A $\beta$ 蛋白の動態および fA $\beta$ 形成過程の全体ならびに核の伝播に影響を及ぼす分子間相互作用をシステムとして解析できると考える。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. Ono K, Hasegawa K, Naiki H, Yamada M. J Neurosci Res. 75(6): 742-750, 2004

(2) A seed for Alzheimer amyloid in the brain. Hayashi H, Kimura N, Yamaguchi H, Hasegawa K, Yokoseki T, Shibata M, Yamamoto N, Michikawa M, Yoshikawa Y, Terao K, Matsuzaki K, Lemere CA, Selkoe DJ, Naiki H, Yanagisawa K. J Neurosci. 24(20):4894-4902, 2004.

(3) Environment- and mutation-dependent aggregation behavior of Alzheimer amyloid beta-protein. Yamamoto N, Hasegawa K, Matsuzaki K, Naiki H, Yanagisawa K. J Neurochem. 90(1): 62-69, 2004

(4) Low concentrations of sodium dodecyl sulfate induce the extension of beta 2-microglobulin-related amyloid fibrils at a neutral pH. Yamamoto S, Hasegawa K, Yamaguchi I, Tsutsumi S, Kardos J, Goto Y, Gejyo F, Naiki H. *Biochemistry*. 43(34): 11075-11082, 2004

(5) Vitamin A exhibits potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects in vitro. Ono K, Yoshiike Y, Takashima A, Hasegawa K, Naiki H, Yamada M. *Exp Neurol*. 189(2): 380-392, 2004

(6) Anti-amyloidogenic activity of tannic acid and its activity to destabilize Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. Ono K, Hasegawa K, Naiki H, Yamada M. *Biochim Biophys Acta*. 1690(3): 193-202, 2004

## 2. 学会発表

(1) Naiki, H. : Molecular interactions in the formation and destabilization of Alzheimer's  $\beta$ -amyloid fibrils in vitro. Joint Meeting of the 27th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society and the 47th Annual Meeting of the Japanese Society for neurochemistry ISN Symposium . Neurochemical aspects and approaches for neurological diseases. 2004,9,21-23, Osaka.

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
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
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に関する研究 分担研究報告書

## トリアミロイド-シスの発症頻度とトリアミロイド線維投与による AA アミロイド-シス発症促進効果に関する調査 および AA アミロイド-シス治療法の検討

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 河野裕夫<sup>1</sup>、崔丹<sup>1</sup>、星井嘉信<sup>1</sup>、小野咲弥子<sup>1</sup>、尾本雅俊<sup>2</sup>

1. 山口大学医学部 構造制御病態学講座(旧病理学第一講座)

2. 山口大学医学部 脳神経病態学講座(旧神経内科学講座)

**研究要旨** 山口県内の公園で飼育され死亡したハクチョウのアミロイド-シス発症頻度などについて検索した。17羽のコブハクチョウの内16羽に AA アミロイド-シスの発症を認めた。抽出トリアミロイド線維でマウス AA アミロイド-シスに対する発症促進効果がみられた。

漢方薬から精製した triptolide の AA アミロイド-シスの発症抑制効果について検討した。それぞれ 480、360、240、120  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の量の triptolide をカゼインと同時にマウスに投与した。初日にのみ AEF も投与した。240、120  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の triptolide 投与群ではごく一部の個体に微量のアミロイドの沈着がみられ、480、360  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の triptolide 投与群ではマウスにアミロイド-シスの発症を認めなかった。

### A. 研究目的

近年、ウシをはじめ、チーター、飼育ヒツジのアミロイド-シス、ニワトリのアミロイド関節炎の発症等について多くの報告が行われているが、水鳥類のアミロイド-シスについては、詳細な報告は少なく、今回われわれはハクチョウを中心に水鳥

のアミロイド-シス発症頻度、アミロイド線維の性質などを調べる目的で、調査を行った。

また、AA アミロイド-シスは慢性炎症疾患患者の合併症として発症することが知られており、現段階では反応性 AA アミロイド-シスに対する治療法としては、

Dimethylsulfoxide (DMSO) やコルヒチンの使用が提唱されている。しかし、不快な臭気や副作用などを伴い一般臨床での普及度は低い。漢方薬 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. は中国、台湾に広く分布し、中国では慢性関節リウマチの治療薬や全身性エリテマトーデス (SLE) などの免疫疾患の治療薬として繁用されている。その精製物である Triptolide による、実験的マウス AA アミロイドーシスに対する抑制効果を検討した。

## B. 研究材料及び方法

### 1. トリアミロイドーシスの発症頻度：

公園で死亡した白鳥を中心に鳥類のアミロイドーシスを検索した。肝臓、脾臓、腎臓、膵臓、心臓、消化管、舌、甲状腺、骨髄について、HE、Congo Red (以下 CR) 染色を行い、アミロイド沈着の有無について調べた。

### 2. トリアミロイドーシスのタイプの同定：

アミロイドが沈着した肝臓、脾臓の組織切片を用いて、抗ヒト AA 抗体を一次抗体として免疫染色を行った。また、Pras 等の方法に従って、コブハクチョウの肝臓、脾臓からアミロイドの粗抽出を行った。粗抽出したアミロイド線維を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、Western blot 解析を行った。

### 3. ハクチョウアのミロイド線維によるマ

ウス AA アミロイドーシスの発症促進効果についての検討：

肝臓および脾臓から粗抽出したアミロイド線維を生理食塩水で懸濁液とした。このアミロイド懸濁液を7週齢の ICR マウスの腹腔内に一回投与した。初日から10%カゼイン0.5mlを7日間連続皮下注射し、8日目に屠殺した。各マウスから、肝臓、腎臓、脾臓を摘出し、ホルマリン固定パラフィン切片を作成し、HE、CR 染色を行った。陽性コントロールとしてハクチョウアミロイド線維の代わりにマウスアミロイド線維を投与した。陰性コントロールとして生理食塩水を投与した。

### 4. Triptolide による、実験的マウス AA アミロイドーシスにおける発症抑制効果：

体重あたり480、360、240、120  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の濃度の Triptolide を、7週齢 ICR マウスの腹腔内に投与し、同時に10%カゼイン0.5mlを皮下に7日間連日投与を行った。初日のみ0.5mlAEF (マウス AA アミロイドの沈着した脾臓から抽出) を腹腔内に投与した。8日目にマウスを屠殺し、各マウスから、肝臓、腎臓、脾臓を摘出し、ホルマリン固定パラフィン切片を作成し、HE、CR 染色で、アミロイド沈着の有無を確認した。マウスの屠殺と同時に血液を採取し、血清の SAA、IL-6 濃度を測定した。コントロールとして Triptolide のかわりに MTX

(Methotrexate) または生理食塩水を投与した。(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. トリアミロイドーシスの発症頻度を表 I にまとめた。

沈着臓器からみれば、すべての鳥の脾臓にアミロイドの沈着がみられ、個体によって肝臓、腎臓、膵臓、心臓、消化管、舌、甲状腺、骨髄にもアミロイドの沈着がみられた (写真 1.)。

2. トリアミロイドーシスのタイプ：

アミロイドの沈着がみられる症例の肝臓、脾臓の組織切片について抗ヒト AA 抗体を一次抗体として免疫染色を行い、いずれもアミロイドは抗ヒト AA 抗体とびまん性に反応した (写真 1.)。粗抽出アミロイド線維を SDS-PAGE で分離し、14.4kDa の明瞭なバンドがみられ、Western blot では、このバンドが抗ヒト AA 抗体とよく反応した (写真 2.)。

3. マウス AA アミロイドーシスにおけるトリアミロイド線維の発症促進効果：  
粗抽出した鳥アミロイド線維をマウス

に投与し、同時に炎症刺激を与えた。結果は表 II にまとめた。

4. 実験的マウス AA アミロイドーシスに対する Triptolide の発症抑制効果：

Triptolide による、実験的マウス AA アミロイドーシスに対する発症抑制効果を表 III にまとめた。240、120  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の Triptolide を投与した群のマウスではごく少数の個体にごく微量のアミロイドの沈着がみられた。480、360  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の Triptolide を投与した群でマウスにアミロイドの沈着がみられなかった。Triptolide を投与した群では血清 SAA の上昇が抑制されていた。血清 SAA の濃度をグラフ I に示す。MTX を投与群では、すべてのマウスに中等量のアミロイドの沈着を認め、血清 SAA も高値であった。屠殺の時点で、いずれの実験群においてもマウスの血清 IL-6 の上昇は認めなかった。

### D. 考察

今回、われわれはハクチョウを中心に死亡した水鳥類のアミロイドーシスについて調べた。今現在のところ、17羽のコブハクチョウを調べたが、16羽にアミロイドの沈着がみられた。アミロイド沈着が認められた個体はほとんどの場合、衰弱により死亡していた。これらの個体の肝臓、腎臓およびその他の臓器に多量のアミロイ

ドの沈着がみられ、アミロイド沈着により、多臓器機能不全を来し、死亡したと推測される。しかし、アミロイド-シス発症の原因と思われる炎症についてははっきりせず、さらに検討する必要があると思われる。

沈着アミロイドは、抗ヒトAA抗体と反応し、分子量は14.4kDaであった。トリアミロイド-シスはヒトAAアミロイド-シスに相同性が高いと思われる。

今まで、さまざまな種類のアミロイド線維がアミロイド-シスの発症促進効果を有することが報告されている。今回、鳥アミロイド線維について検討し、脾臓、肝臓から抽出したアミロイド線維をマウスに投与した結果、5匹中3匹のマウスの脾臓にアミロイドの沈着がみられた。トリアミロイド線維もマウスAAアミロイド-シス発症促進効果を持つ事が示された。

Triptolideの投与により実験的AAアミロイド-シスの発症を抑制することができた。血中のSAA上昇を抑制することによりAAアミロイド-シスの発症を抑制したと考えられる。

## E. 結論

1. 鳥のアミロイド-シスの頻度が決して低くない可能性を示し、鳥のアミロイド線維でも、アミロイド-シス発症促進効果がある事を示した。

2. 反応性AAアミロイド-シスの治療法としてTriptolideの可能性を示した。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1) 国内

口答発表

10件

原著論文による発表

5件

それ以外（レビュー等）の発表

9件

そのうち主なもの

論文発表

Ueno T, Hoshii Y, Cui D, Kawano H, Gondo T, Takahashi M, Ishihara T. Immunohistochemical study of cytokeratins in amyloid deposits associated with squamous cell carcinoma and dysplasia in the oral cavity, pharynx, and larynx. *Pathol Int* 53(5):265-269,2003  
Cui D, Kawano H, Takahashi M, Hoshii Y, Setoguchi M, Gondo T, Ishihara T.

Acceleration of murine AA amyloidosis by oral administration of amyloid fibrils extracted from different species. *Pathol Int* 2002;52:40-45.

### 2) 海外

口答発表

1件