

り、1994年90頭を越えていた飼育数が2005年には60頭を切った。当研究室において、1984年～2004年の20年間に死亡したチーター72頭のうち、本調査に適した60頭を病理学的に検査した結果によると、57頭(95%)にアミロイドの沈着がみられ、特に腎臓55/57頭(97%)、肝臓52/57頭(91%)、腸管46/51頭(90%)と、3臓器への沈着が目立った。チーターのアミロイド症は若齢でも発症し、また、発症頻度も高いことなどから死因として大変重要である。チーターを絶滅の危機から救うためには、アミロイド症の病理発生を解明し、治療法を開発する必要があるが、今日まで、日本動物園水族館協会種の保存委員会の協力を得て、死亡したチーターの疫学および病理学的解析をしてきた。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、アミロイド沈着も高度で、何らかの環境因子が関与していることが明らかとなった。また、今までの研究で、炎症刺激下のICRマウスにチーター由来アミロイドを腹腔内接種すると、伝達することが証明されている。しかし、経口投与ではチーター由来アミロイドの伝達性は証明されず、対照として行ったウシやマウスのアミロイドを用いた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AEF効果を持っているものの、他の動物に比較してその効果は低いと推察された。

一方、モルモットでは、週2回、2ヶ月のカゼイン接種でアミロイド誘発が可能であり、呼吸器系炎症に随伴して、しばしば高度のアミロイド沈着が報告されている(図1)。また、猫では難治性口内炎や上部気道感染症に関連するアミロイド症例が多く(図2)、さらに猫とチーターは同じ科に属する。また、経時的にアミロイドに関連する変化を検索できる大きさであることから、チーター由来アミロイドに対して感受性の高い新たなるアミロイド誘発モデル動物の開発と伝達性を、猫およびモルモットを用いて検討した。

一般的に、動物ではアミロイド症の生前診断が難しく、しかも、チーターではSAA値と組織におけるアミロイドの沈着程度が一致しないことが多い。また、チーターは、猛獣(危険動物)であ

り、ヒトと同じような検査は難しいため、生前診断法が確立されていなかったことから、非侵襲性的のアミロイド症生前診断法の確立を目的として研究を行った。本診断法の確立により、アミロイド症罹患動物の発見、予後判定や治療実験などが可能となる。

B. 研究方法

1. チーターの病性鑑定

2005～2007年の3年間に20頭のチーターが死亡した。これらを病理学的に検索し、アミロイド沈着をスコア一化して(アミロイド沈着指数*)、各因子との関連と併せて疫学的にも解析した。

*アミロイド沈着指数

指数0:沈着なし

指数1:沈着程度が30%未満

指数2:沈着程度が30%以上50%未満

指数3:沈着程度が50%以上

2.アミロイド伝達実験

1)接種材料:アミロイド症により死亡したチーターC-68(図3)、雄、4歳の肝臓を用いた。肝臓のアミロイド沈着指数は3であった。

2)使用動物:モルモット(ハートレイ)雄6匹。猫(SPF)雄6匹、雌12匹の計18匹。

3)アミロイド抽出方法:Pras法変法(NaCl回収法)を用いた。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、回収した。

4)投与方法:モルモットには腹腔内接種を、猫は腹腔内接種と静脈内接種を行った。対照動物としてICRマウスを用いた。

5)炎症刺激:モルモットは10%カゼイン(SIGMA)を1～2ml、猫は1%硝酸銀1mlあるいはAdjuvant complete freund(DIFCO)と10%カゼイン(SIGMA)の等量混合液2ml、ICRマウスはAdjuvant complete freund(DIFCO)と10%カゼイン(SIGMA)等量混合液0.5mlを背部に皮下注射し、炎症刺激を行った。

6)実験プログラム:モルモット6匹をアミロイド接種群3匹、対照群3匹に分け、10%カゼイン溶液(SIGMA)1～2mlを1日おきに皮下注射した。実験開始3日後に、接種群3匹にチーター由来アミ

ロイド 50mg/匹を腹腔内接種した後、4 週、8 週、12 週目に接種群と対照群から各々 1 匹ずつ安楽死した。猫は 18 匹を 8 グループに分け、刺激の回数、接種材料、接種時期、接種量、投与方法を変え(表 1)、1~2 週間観察したのち安楽死した。ICR マウスはチーター由来抽出アミロイドを炎症刺激物質とともに単回皮下接種し、8 日後に安楽死した。全ての動物について、安楽死後、病理組織学的にアミロイド沈着を観察した。また、AA アミロイドーシスでは臓器へのアミロイド沈着に先立ち、血清アミロイド A(SAA)値が上昇することが報告されており、猫では SAA の測定も行なった。SAA 測定は、動物用 SAA エライザキット(バイオソースインターナショナル社製)を使用した。

3. アミロイド症生前診断法の検討

チーターの腸におけるアミロイド沈着状況と、糞中へのアミロイド排出との関連をみるため、以下の材料と方法を用いた。なお、糞は生前に採取した 22 検体(TT 施設 6 検体、HC 施設 8 検体、WA 施設 8 検体<うち 3 検体は再検査用>)と死亡時に採材した糞 4 検体(C-67、68、84、90)を対象とした。

1)チーター由来アミロイド線維の精製：C-66、68 の肝臓(アミロイド沈着指数 3)より抽出、精製(図 4)。

2)チーター由来アミロイド線維抗体の作成：ウサギに抗原を接種し作成。

3)抗チーター由来アミロイド線維抗体を用いたウェスタンブロット法の確立(図 5)：各種動物の AA アミロイドとの反応性を検討。なお、この抗体はヒト AA、マウス AA、ウシ AA、マウス AApoA II との交差性はなく、チーター AA に特異性の高い抗体であることが確認された。

4)糞を用いたチーター由来アミロイド線維検出法(ウェスタンブロット法)の確立：Pras 法変法(NaCl 回収法)を用いて、ホモジナイズした糞を蒸留水に懸濁し、これに NaCl を加えてアミロイド線維を析出させ、ウェスタンブロット法を行った。
*以上の項目は、共同研究者の信州大学樋口京一先生が検討した。

5)糞を用いたチーター由来アミロイド線維検出法(ウェスタンブロット法)の診断への応用：4)

の方法を用いて、上述の 26 検体より、アミロイドを抽出し、ウェスタンブロット法で検査した。
6)病理組織学的検索：死亡したチーター 4 頭(2 頭は死亡時に糞と腸管を採材し、残りの 2 頭は糞採取日と死亡日が異なる<最長で 18 ヶ月後>)について、組織のアミロイド沈着状況と糞中アミロイドの関係を見た。アミロイド沈着については、Congo Red 染色を用いて各臓器および部位毎に沈着程度を指数化した。

(倫理面への配慮)

実験に供した動物の飼育状態が良好な環境になるように配慮した。また、実験・剖検に際しては苦痛が最小限になるように麻酔下で行った。実験は麻布大学実験動物委員会の承認の下、実験動物取り扱い規定に沿って行った。

C&D. 研究結果および考察

1. 病性鑑定

2005 年に輸入された 14 頭を含めて、2005 年時の国内チーター飼育数は 59 頭であったが、2005~2007 年の 3 年間に 20 頭が死亡した(表 2)。すなわち、3 分の 1 が死亡したことになり、80%(16/20)にアミロイドが沈着しており、アミロイド指数が上昇すると死亡年齢が低下するという逆相関がみられ、さらに、施設間でアミロイド沈着指数と平均年齢に大きな差があった(グラフ 1・2)。このことから、依然として、チーターにおいてアミロイド症は重要な死因であり、希少種の保存のためには、早急な病理発生の解明、治療法の確立が望まれる。

2. アミロイド線維の伝達性とモデル動物開発

モルモットおよび猫、いずれのアミロイド伝達実験においても、アミロイド沈着は観察されなかった。モルモットにおいてはカゼインによるアナフィラキシー反応と考えられる症状で 2 匹が計画より早期に死亡した。猫を用いた実験では、10%カゼイン溶液と Adjuvant complete freund を炎症刺激として用いた場合、全ての症例で SAA 値の著しい上昇がみられ、一部の個体を除いて観察期間中高値が継続していた(グラフ 3)。以上の結果から、猫では、炎症刺激により SAA の上昇を起こすこと

ができて、アミロイドを誘発できない。また、モルモットでもアミロイドを誘発できなかったことから、少なくとも従来の方法では、これらの動物は、アミロイドの誘発モデル動物として有用でないことがわかった。他の報告では、チーター由来アミロイドはマウスやウシのそれに比較して、AEF 効果が低いとされていることや、動物種差、炎症刺激方法と刺激期間の長さなどが適切でないことなどが原因として考えられた。

3. 非侵襲性アミロイド症生前診断法

糞中のアミロイド線維検出方法として、信州大学樋口京一先生が作製した抗チーターアミロイド線維抗体を用いたウエスタンブロット法(図 6)で、アミロイド線維の有無を検索した結果、生前採取された糞 22 検体のうち 20 検体(91%)からアミロイド線維が検出された(表 3)。反復検査が可能であった 3 検体(HC-3、4、5)では 19 ヶ月後の再検査でも 3 検体とも陽性となり、継続して、糞中にアミロイドが排泄されているものと考えられた。

施設別検出率の割合は TT 施設 100%、HC 施設 100%、WA 施設 75%で、多頭飼育施設である WA で検出率が低かった。しかし、検体数が少ないため、今回の検査結果だけで多頭飼育施設のアミロイド罹患率が低下しているとの判断はできなかった。実際、日本では 2005 年から 2007 年までに 20 頭のチーターが死亡しており、アミロイド罹患率は 80%であったが、WA 由来の 9 頭すべてにアミロイドの沈着があり、今回の生前診断法による罹患率とはかなりの差があった。

死亡時に採材した糞 4 検体のうちアミロイドは C-67 以外の 3 検体から検出された(75%)。各々のチーターの各臓器におけるアミロイド沈着指数は、C-67:腸 0、腎 2、肝 0、C-68:腸 1、腎 3、肝 3(図 7、8)、C-84:腸 1、腎 3、肝 3、C-90:腸 3、腎 3、肝 0 であり、糞中のアミロイド排泄状況は、腸のアミロイド沈着状況を反映していた(表 4)。しかし、死亡 4 ヶ月前に採材した糞からはアミロイド線維が検出されなかったが、死亡時、小腸から大腸にかけて高度のアミロイド沈着が見られた例もあったことから、今後さらに症例数を増やし、糞を用いたアミロイド症診断法の検出限界、アミロイド

線維の排泄推移などの検討や糞中アミロイド陽性チーターの臨床症状を解析する必要がある。また、今後はこの方法を用いて、現在飼育されているチーターにおけるアミロイド罹患状況の把握、治療実験などを行う予定である。

E. 結論

依然として、アミロイド症はチーターの死因として重要であった。チーターのアミロイド症と病理発生の解明のために、猫とモルモットを用いて新たな疾患モデル動物の開発を試みたが確立できなかった。糞中アミロイド線維の検出は危険動物チーターの生前診断法として有用と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Bergstrom J, Ueda M, Une Y, Sun X, Misumi S, Shoji S. and Ando Y. Analysis of amyloid fibrils in the cheetah (*Acinonyx jubatus*). *Amyloid*. 13(2) : 93-98, 2006

2. 学会発表

- 1) 伊藤亜紀子、小座間裕紀、碓井真紀、宇根有美、野村靖夫：チーター由来 *Helicobacter heilmannii* のマウス胃炎誘発と血中抗 HS70 抗体の推移. 第 139 回日本獣医学会、和光市民文化センター、3 月 29～31 日、2005 年
- 2) 勝山悠子、奥田裕也、小座間裕紀、山本 諭、伊藤亜紀子、宇根有美、伊藤修、川上茂久、野村靖夫：国内飼育チーターのアミロイド症における沈着指数と各種因子との関連. 第 139 回日本獣医学会、和光市民文化センター、3 月 29～31 日、2005 年
- 3) Yamamoto S, Une Y. and Nomura Y. Transmissibility of amyloid derived from cheetahs (*Acinonyx jubatus*). 23th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology. University of Naples Federico II Faculty of Veterinary Medicine,

Italy, 10月7～10日. 2005年.

4) Une Y, Fujino M, Fu S, Higuchi K. Diagnosis of AA amyloidosis in living cheetahs. 24th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology. Edinburgh, Scotland, 8月31～9月2日. 2006年.

5) 藤野みゆき、宇根有美、付笑影、樋口京一：糞を用いたチーターのアミロイド症の生前診断法の検討. 第144回日本獣医学会学術集会、酪農学園大学、9月2～4日. 2007年

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



図 1-1. モルモット肺 左図：肺は全体に退縮不全で、全葉にわたって水腫性。左肺前葉と後葉の一部には重篤な肺炎病巣（赤色）があり、肋骨胸膜と癒着、右後葉にやや白色かかった硬化性、不整形の肺炎病巣が観察される。中央：右後葉縦隔面、大豆大の膿瘍（黄色の結節）。右図：肺炎、上方に偽好酸球の破碎物の集塊（膿）、周囲に結合組織の増生が見られる。周辺組織で肺胞壁の肥厚、線維素析出、炎性充血あり。H.E.染色。

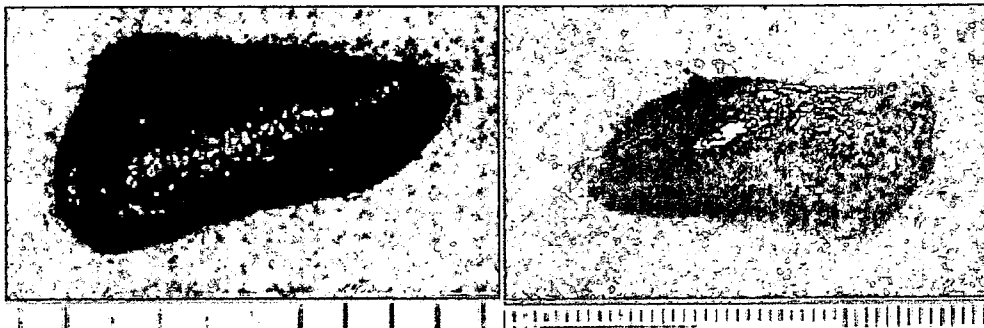


図 1-2. モルモット脾臓：腫大。濾胞、脾材不明瞭。

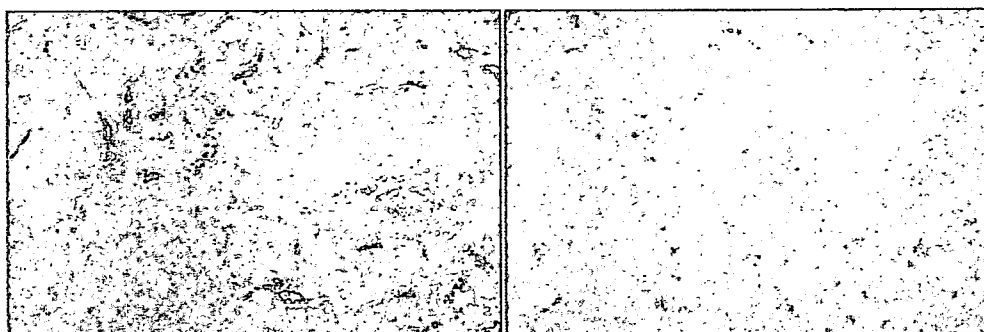


図 1-3. モルモット腎臓：軽度～中程度に弥漫性の鬱血。赤脾髄にアミロイドが沈着（ハム脾）。白脾髄（濾胞）が圧排され、沈着が高度な症例では消失していた。左図 H.E.染色。右図 Congo Red 染色。

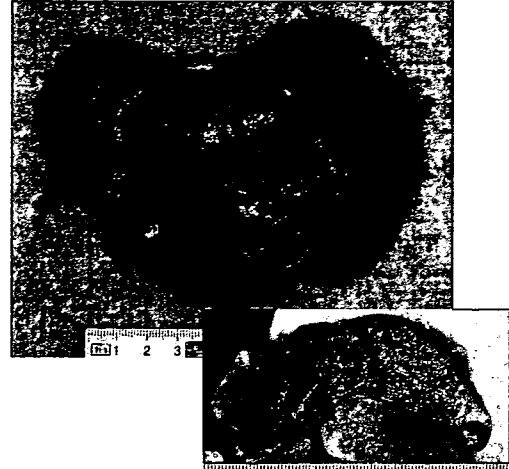


図 2-1. 猫：腹腔内出血、肝臓腫大。

図 2-2. 猫肝臓：褪色し、全葉は互いに膠着。血餅が多量に付着（外側右葉多量）。小葉不明瞭で質脆弱。内側右葉，外側右葉実質内に出血あり（外側右葉は出血高度で腫大高度）。断面には出血巣が多発。

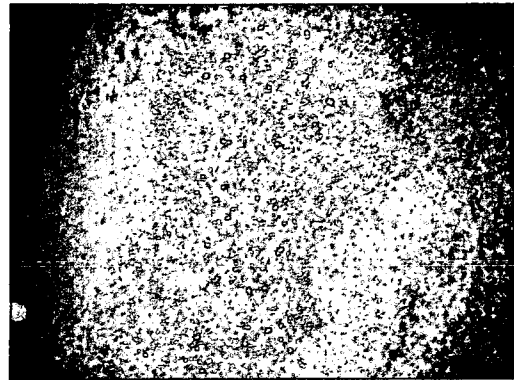
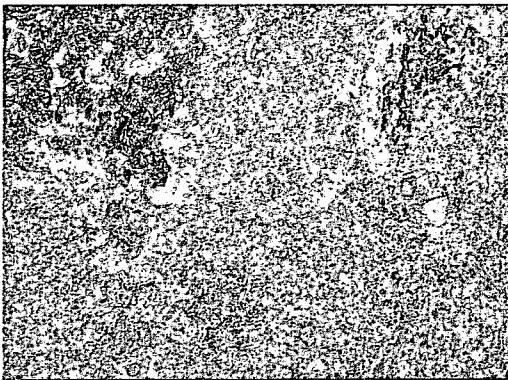


図 2-3. 猫肝臓 左：画面上方に出血、アミロイドは瀰漫性に沈着。
左：H.E.染色、右：Congo Red 染色 蛍光顕微鏡下。

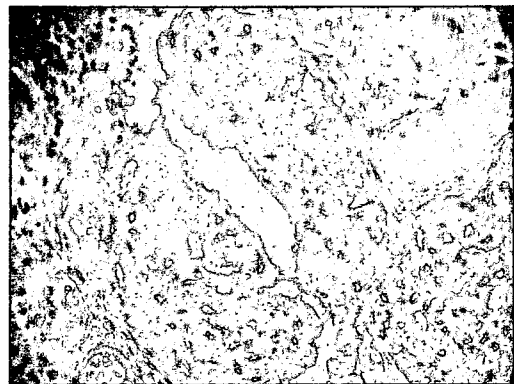
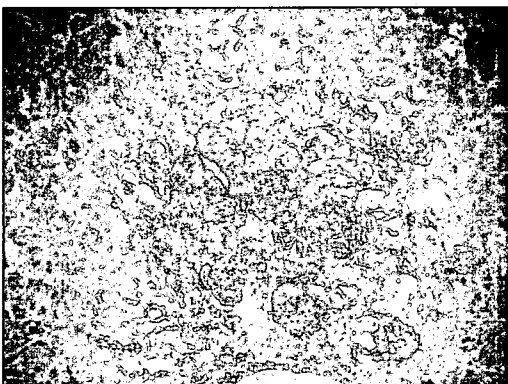


図 2-4. 猫腎臓皮質：アミロイドは主として糸球体に沈着。
Congo Red 染色（蛍光顕微鏡下）、右図糸球体メサギウム基質へのアミロイド沈着が高度。

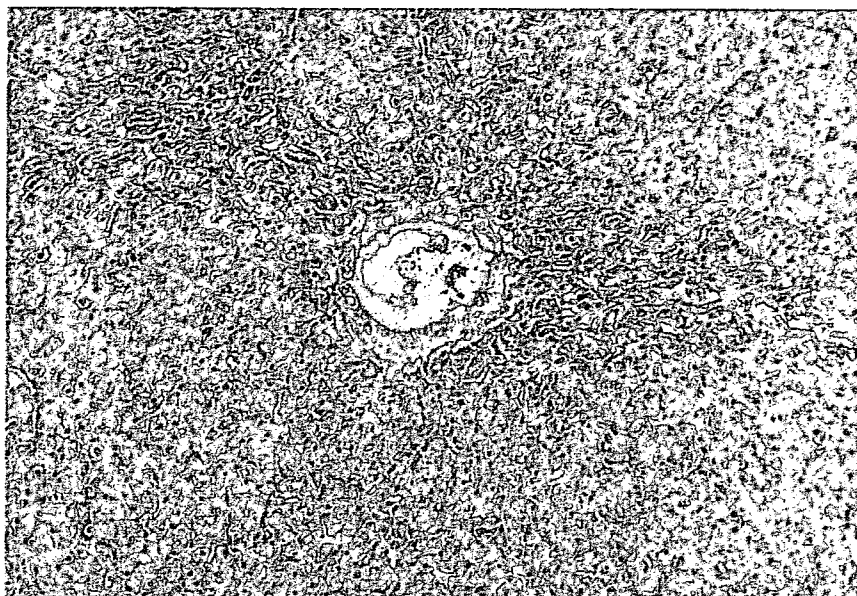


図3-1. 高度のアミロイド沈着により肝細胞索は萎縮、離開。
C-68の肝臓。H.E.染色。

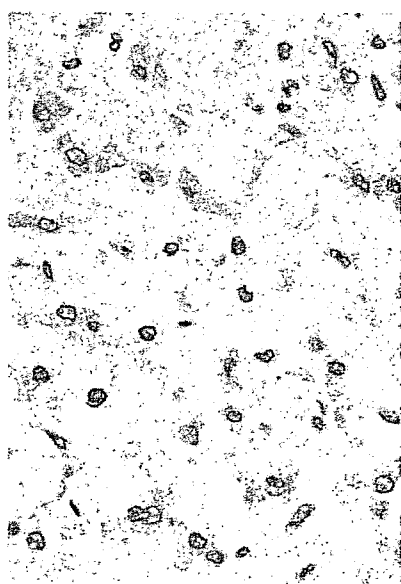


図3-2. C-68肝臓：高度なアミロイド沈着のため肝細胞は萎縮。
アルカリ Congo Red染色。

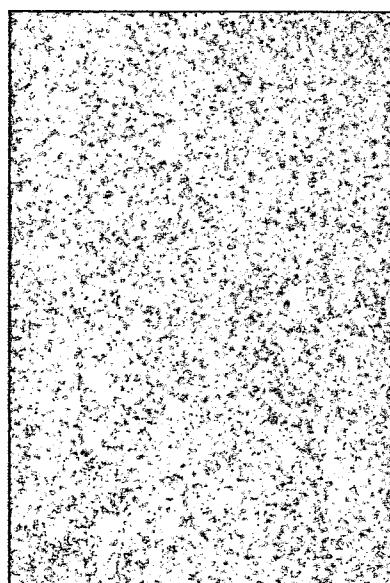
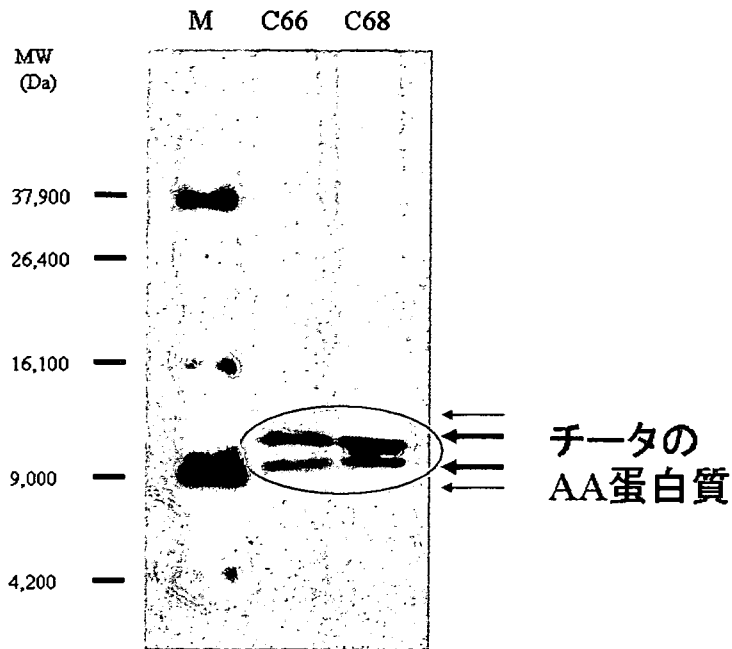


図3-3. C-68肝臓：蛍光顕微鏡下。
アルカリ Congo Red染色。

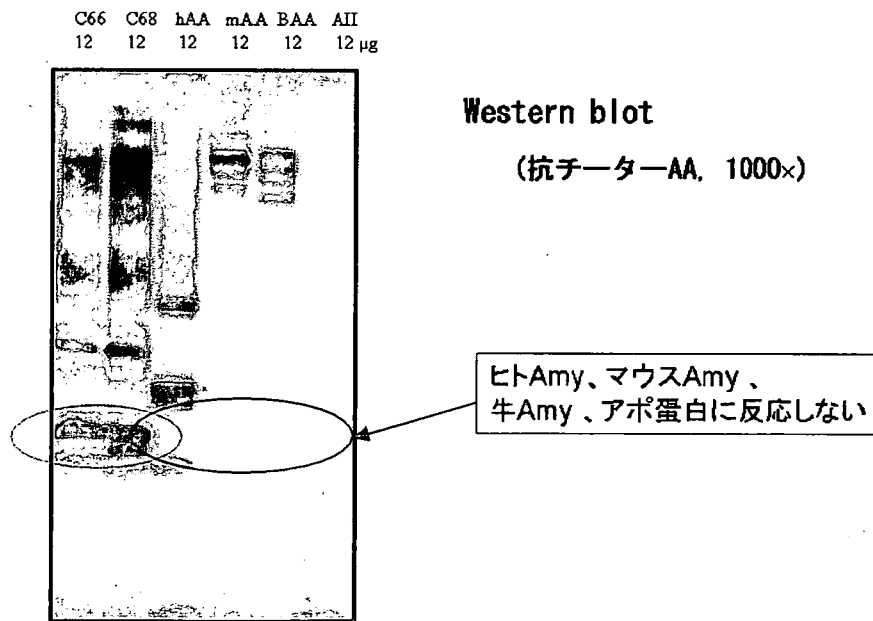
16.5% Tris-Tricine-SDS-PAGE



C66, C68: チーターの肝臓10 μ g

(樋口京一先生提供)

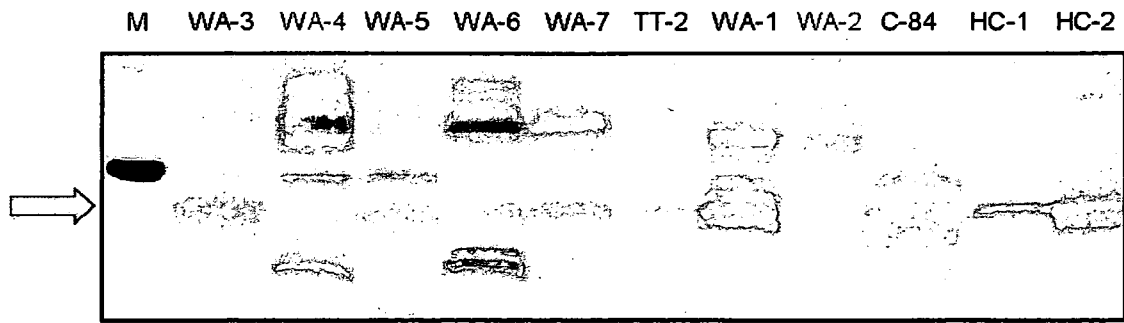
図4 チーター由来アミロイドの精製



C66, C68, cheetah AA; hAA, human AA;
mAA, mouse AA; BAA, bovine AA;
AII, mouse AApoAII.

(樋口京一先生提供)

図5 ウェスタンブロット法 抗チーターAA抗体



ウエスタンブロット 抗チーターAA抗体×3000

M: 分子マーカー (EzStandard, ATTO)

WA-3~HC-2はチーター個体番号

糞から抽出したアミロイド線維10 μ Lをブロット。

図6 糞中のアミロイド線維検出結果

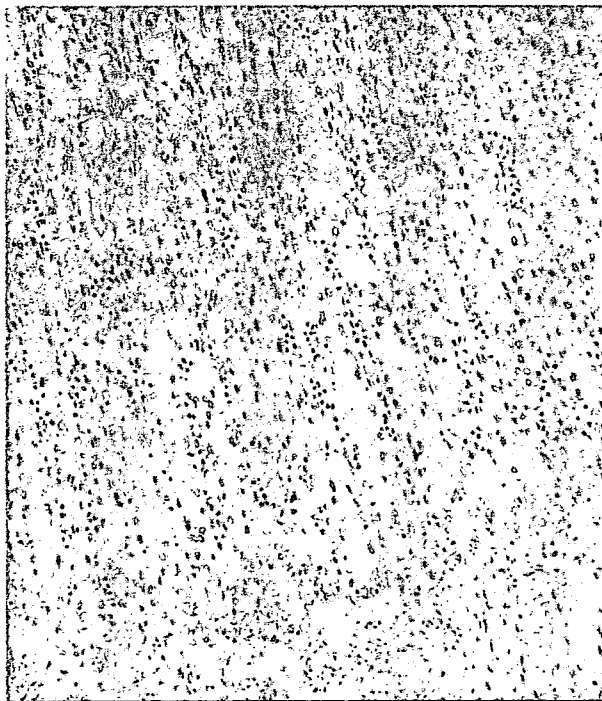


図7 C-68 小腸 Congo Red 染色。

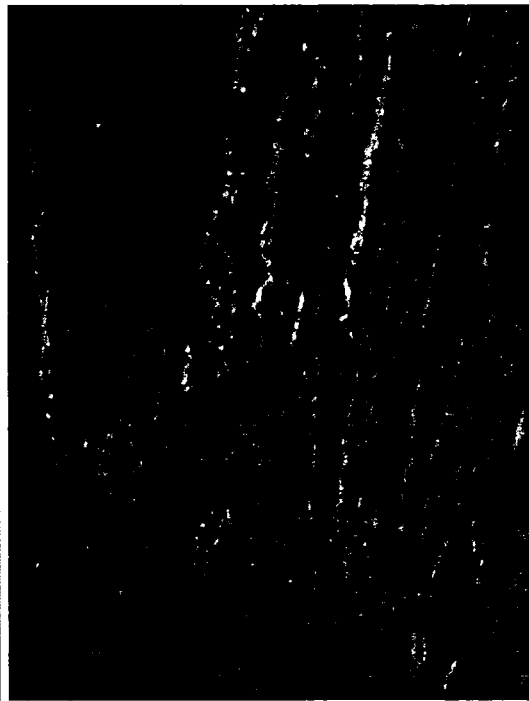


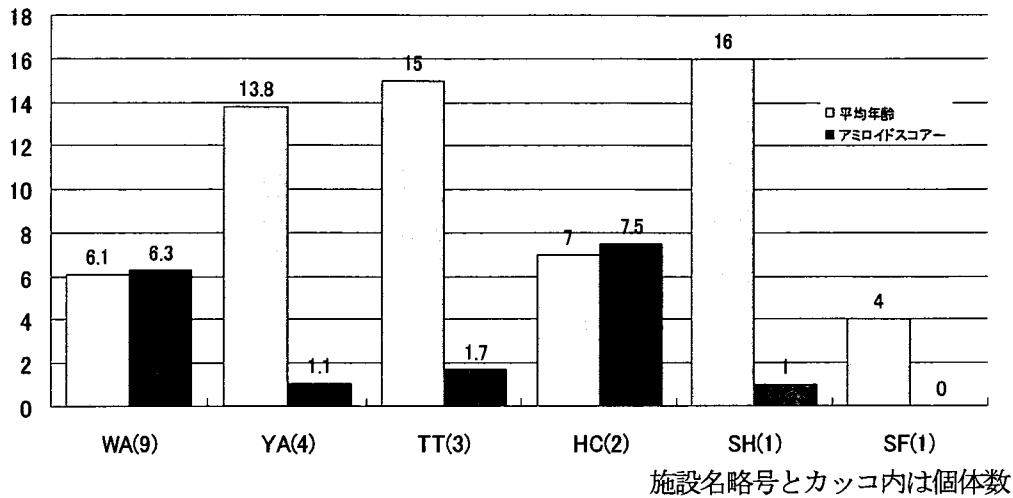
図8 C-68 小腸 蛍光顕微鏡観察。

表2 2005年1月～2007年12月までに死亡した20頭のチーターの内訳

No	由来	(愛称)	性別	年齢	臨床診断	腎病変	腎以外のアミロイド沈着		その他
							アミロイド	その他	
C-73 (329)	I/WA	ノルン	♀	12	腎不全	(+)	間質性腎炎、石灰沈着	肝、胃、脾、副腎	慢性胃炎
C-74 (267)	I/TT	アヤマ	♀	14	腎不全	(+)	間質性腎炎、間質線維化、高度尿細管変性・壊死、糸球体硬化、尿細管の一部に石灰沈着	(-)	慢性胃腸炎、肝水腫、脾臓骨髓脂肪腫、胃潰瘍、食道潰瘍、多臓器うっ血、ヘモジデリン沈着(肝、脾)
C-75 (235)	B/SH	ブラッディ	♂	16	胃腸炎	(-)	萎縮腎、間質性腎炎、糸球体硬化、尿細管一部に石灰沈着	十二指腸、脾臓	萎縮性胃炎、イヌ小回虫寄生(胃、十二指腸)、十二指腸潰瘍、間質性肺炎(軽度)、食道糜爛、脾臓多発性骨髓腫、脾臓髓外造血
C-76 (337)	I/YA	アナナー	♀	12	痴呆症	(-)	尿細管萎縮、一部尿細管に変性・壊死・石灰沈着、	(-)	脾臓萎縮、脾臓骨髓脂肪腫、胃ヘリコバクター属菌感染症、軽度うっ血肺、ヘモジデリン沈着(肝、脾)
C-77 (413)	I/SF	カジン	♀	4	急性腎不全	(-)	軽度間質性腎炎、近位尿細管変性	(-)	胃ヘリコバクター属菌感染症(重度)、慢性腸炎
C-78 (409)	B/WA	フォール	♂	1	神経症状	(-)	溶血	胃、腸、心、甲状腺、脾、副腎	間質性肺炎、肺水腫、大脳の水腫変性
C-79 (408)	B/WA	ネプティ	♂	1	神経症状(痙攣、硬直)	(+)	腎梗塞	肝、小腸、大腸、胃、脾臓	軽度出血を伴う肺水腫、全身性循環障害、脳脊髄神経細胞の高度変性、心内膜症
C-80 (365)	B/WA	カナタ	♂	8	不明※	(-)	間質性腎炎	肝臓、脾臓、小腸	肺水腫、脂質性肺炎、カタル性肺炎、胃幽門部上皮細胞の変性壊死、結腸潰瘍、慢性結腸炎、大脳水腫性変性
C-81 (355)	I/YA	ホダリー	♂	18	腎不全(削瘦、歩行困難)	(+)1~2	間質性腎炎、尿細管変性	(-)	慢性腸炎
C-82 (381)	B/YA	ラルク	♂	6	てんかん	(-)	(-)	(-)	肺水腫(高度)、誤嚥、慢性小腸炎、大腸炎
C-83 (372)	B/WA	アクセル	♂	6	不明※	(+)1	間質性腎炎、腎盂炎、腎乳頭壊死(軽度)	胃、腸、肝、副腎、心、脾、膵	食道潰瘍、リンパ・プラズマ細胞性小腸炎、大腸炎
C-84 (401)	B/WA	シュ克蘭	♀	3	腎機能低下	(-)	間質性腎炎、尿細管変性	肝、副腎、脾臓、心、胃、腸	肺血栓症、脂質性肺炎、膠様萎縮(脾脂肪組織)、ヘモジデロシス(脾、肺)
C-85 (385)	B/WA	ムー	♂	5	不明※	(+)	間質性腎炎、糸球体硬化	胃、腸、肝、脾、心、副腎	肺水腫、心臓線維化、慢性腸炎(軽度)、ヘモジデロシス(脾、腸間膜リンパ)、髓外造血(脾)
C-86 (343)	I/WA	アン	♀	11	不明※	(+)	ポウマン囊尿細管拡張	肝	肺水腫、肝変性、脳水腫
C-87 (253)	B/TT	ジーナ	♀	17	老衰	(-)	腎線維化	食道	全身性うっ血、心筋線維化、肝変性
C-88 (336)	I/YA	ズーリー	♀	19	腎不全	(-)	腎盂・髓質集合管上皮の過形成～異形成、髓質集合管上皮の扁平上皮化性(一部腫瘍性変性)、腎盂炎、膜性腎症、間質性腎炎	(-)	気管支・肺胞虚脱、肝ヘモジデロシス、脾臓骨髓脂肪腫、慢性大腸炎(軽度)
C-89 (377)	B/WA	ダイスケ	♂	8	感染症疑い	(+)	尿細管変性、梗塞性病変、糸球体硬化	脾、胃、肝、膀胱、副腎	肝細胞壊死、慢性胃炎、心筋変性・線維化(軽度)、脾臓骨髓脂肪腫、髓外造血(脾臓)
C-90 (356)	I/HC	クライド	♀	11	腎不全	(+)	間質性腎炎、糸球体萎縮(硬化?)	小腸、大腸、胃、脾、心	線維索性腸炎(盲腸、結腸)、潰瘍(結腸)、肝ヘモジデロシス(軽度)、洞カタル(盲腸リンパ)
C-91 (なし)	I/HC	シャンクス	♂	3	腎不全	(+)	硬化性糸球体腎炎、間質線維化	腸、肝、甲状腺、上皮小体	萎縮性胃炎(軽度)、慢性舌炎(軽度)
C-92 (345)	I/TT	ソテツ	♂	14		(+)	硬化性糸球体腎炎	肝、心	肺水腫、誤嚥性肺炎、骨髓脂肪腫、基底細胞腫(肛門腺)

B: 国内繁殖個体、I: 輸入個体 アルファベットは飼育施設の略号

グラフ1 各施設ごとの平均年齢とアミロイドスコアー (腎、肝、腸、脾の沈着指数の合計)



グラフ2 アミロイドスコアー、年齢と施設の関係

アミロイドスコアー(腎、肝、腸、脾臓)

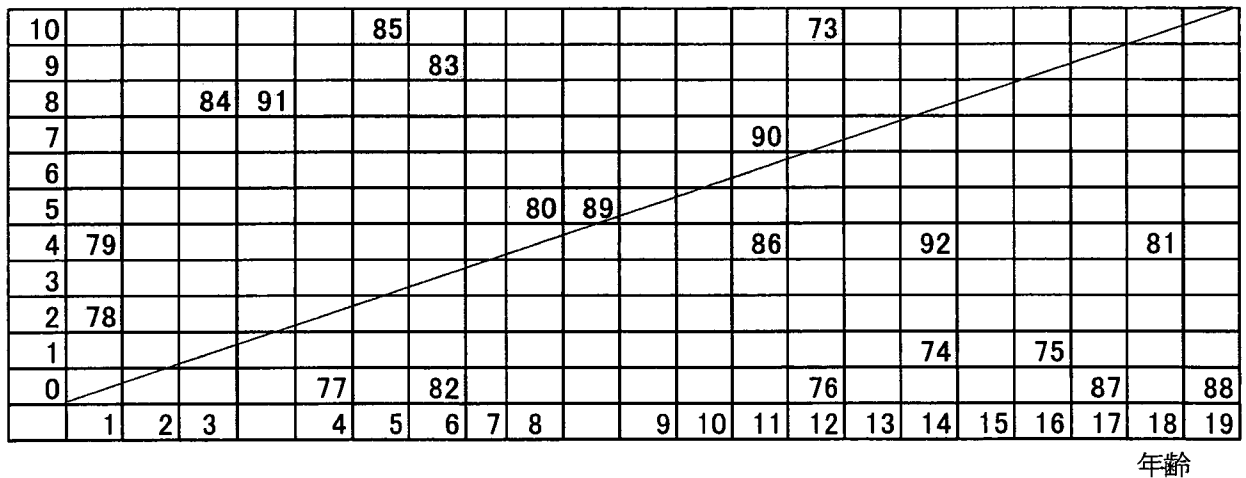


表1 猫を用いたチーター由来アミロイドの伝達実験

	総数	炎症刺激	観察期間	接種材料	匹数
実験1	4 匹	1%硝酸銀1ml×2 回	2 週間	Amy.100mg、IP	3 匹
				NT	1 匹
実験2	4 匹	カゼイン+アジュバンド×7 回	1 週間	Amy.10mg、IP	2 匹
				Amy.100mg、IP	2 匹
実験3	4 匹	カゼイン+アジュバンド×17 回(うち3 回は肝接種前)	2 週間	肝臓3g、IP	2 匹
				肝臓5g、IP	2 匹
実験4	6 匹	カゼイン+アジュバンド×17 回(うち3 回はAmy.接種前)	2 週間	Amy.1000mg、IP	4 匹
				Amy.1000mg、IV	2 匹

炎症刺激：1%硝酸銀 1ml または10%カゼイン溶液 (SIGMA) 1ml と Adjuvant complete freund 1ml の混合液を皮下注射。

グラフ3 猫 SAA 値の変化

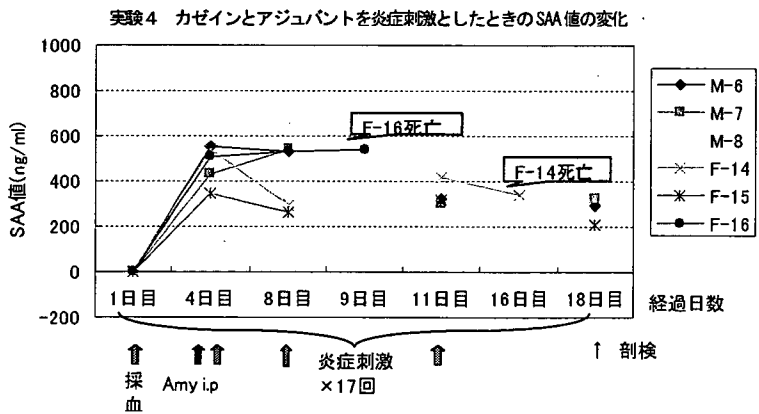
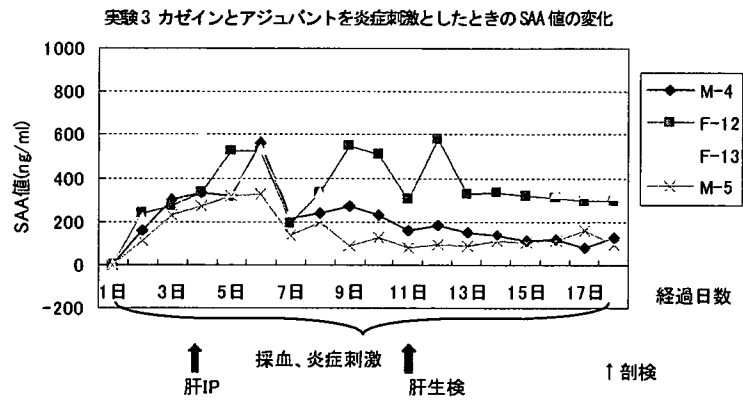
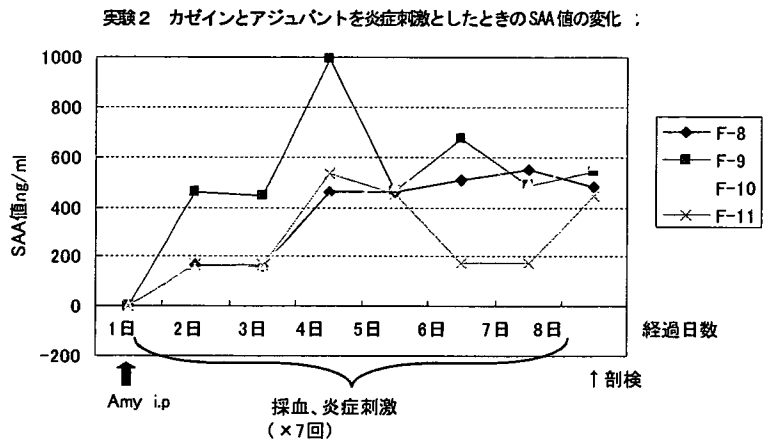
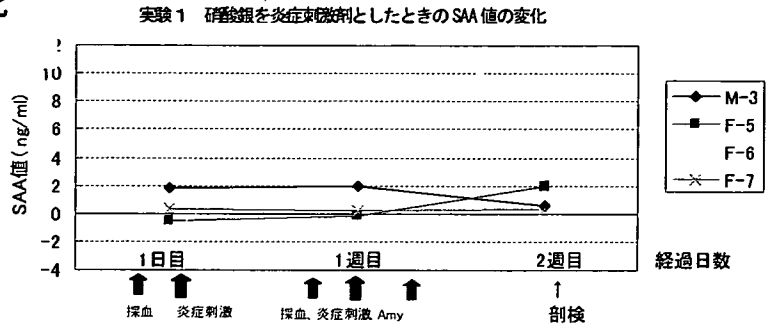


表3 生前採取した糞の検査結果

検体No.	施設	結果	19ヵ月後
HC-1	HC	+	NE
HC-2(C-90)	HC	+	NE
HC-3	HC	+	+
HC-4	HC	+	+
HC-5	HC	+	+
TT-1	TT	+	NE
TT-2	TT	+	NE
TT-3	TT	+	NE
TT-4	TT	+	NE
TT-5	TT	+	NE
TT-6	TT	+	NE
WA-1	WA	+	NE
WA-2	WA	—	NE
WA-3	WA	+	NE
WA-4	WA	+	NE
WA-5	WA	—	NE
WA-6	WA	+	NE
WA-7	WA	+	NE
WA-8	WA	+	NE

NE : not examined

表4 死亡個体の糞のウェスタンブロット結果および各臓器におけるアミロイド沈着指数

	施設	ウェスタンブロット結果	アミロイド沈着指数		
			腸	腎	肝
C-67	TT	—	0	2	0
C-68	WA	+	1	3	3
C-84	WA	+	1	3	3
C-90(HC-2)	HC	+	3	3	0

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)

アミロイドーシスの画期的診断・治療法に関する研究班 分担研究報告書

牛アミロイド症の病理発生の免疫組織化学的解析と野外診断法の検討

分担研究者 山田 学 (独) 動物衛生研究所 ウイルス病研究チーム
 共同研究者 山本 佑*、堀内雅之**、古林与志安**、松井高峯**、中村菊保*
 * (独) 動物衛生研究所 ウイルス病研究チーム、
 **帯広畜産大学 畜産学部病態獣医学講座

研究要旨 牛アミロイド症の肝臓のアミロイド沈着部位では、検索した 18 例中、9 例において、免疫組織化学的にクッパー細胞が対照正常牛と比べて有意に増数し、腎臓、副腎においても、対照正常牛と比べて、マクロファージが多数浸潤していた。これら肝臓や腎臓、副腎でクッパー細胞やマクロファージの増数がみられた 9 例では、肝臓に沈着したアミロイドの一部が線維状に抗 CD68 陽性を示した。またその 9 例のうち 4 例では、前胃粘膜、副腎、甲状腺に沈着したアミロイドの一部が抗 CD68 陽性を示した。今回、牛アミロイド症のアミロイド沈着部位においてマクロファージの浸潤増生がみられるものもあることが確認された。また沈着アミロイドの一部が抗 CD68 陽性を呈し、こういったアミロイドはマクロファージやクッパー細胞を経て、もしくは細胞膜の CD68 の修飾を受けて産生、沈着した可能性が疑われた。一方でマクロファージの反応のない牛アミロイド症も多数みられることも明らかにされた。今回、ルゴール液に浸したウサギの脾臓・腎臓において、肉眼的にアミロイドの沈着を確認し、ルゴール液による肉眼的なアミロイドの検出法の有効性が示唆された。

A. 研究目的

アミロイド症は、種々の異なる前駆蛋白がアミロイド線維となって沈着する疾患である。その発症機構についてはいくつかの共通因子があることが知られているが、研究のための動物モデルの不十分さの為に、その病態の詳細は不明である。近年、アミロイド症の病理発生として、前駆蛋白の摂取やマクロファージの関与によるアミロイド線維形成が注目されている。本課題では、アミロイド症の牛野外症例を組織学的に検索することにより、家畜のアミロイド症の病理発生を解析する。また食肉検査場等で応用可能な家畜のアミロイド症の迅速診断方法を検証する。

B. 研究方法

1) 2002 年から 2007 年にかけて牛アミロイド症と診断された牛 33 頭のうち、肝・脾・腎・消化管・内分泌臓器が採材されている 18 例について、マクロファージのマーカーである抗リソソームおよび抗 CD68 抗体を用いた免疫組織

化学的検索を実施した。

2) 実験的アミロイドーシスを発症させたウサギの脾臓、腎臓を薄く切り出し、ルゴール液に浸した後水洗し、肉眼的に観察した。

(倫理面への配慮)

動物実験に際しては、(独)動物衛生研究所実験動物倫理委員会の規程に基づいて実施した。

C. 研究結果

牛アミロイド症の肝臓では、検索した 18 例中、9 例において、免疫組織化学的にクッパー細胞が対照正常牛と比べて有意に増数していた。伊東細胞の有意な増数はみられなかった。腎臓、副腎においても、対照正常牛と比べて、マクロファージが多数浸潤していた。甲状腺ではマクロファージの浸潤はみられなかった。検索した 18 例中 9 例において、肝臓に沈着したアミロイドの一部が線維状に抗 CD68 陽性を示した。クッパー細胞は、抗リソソームと同様に抗 CD68 陽性を示したが、細胞質内の染色態度が通常とは異なり、線維状に

観察された。またその9例のうち4例では、前胃粘膜、副腎、甲状腺に沈着したアミロイドの一部が抗 CD68 陽性を示した。抗リソソーム陽性を示す沈着アミロイドは認められなかった。

今回、ルゴール液に浸したウサギの脾臓・腎臓において、肉眼的にアミロイドの沈着を確認した。

D. 考察

今回、牛アミロイド症の肝臓、腎臓、副腎のアミロイド沈着部位においてクッパー細胞やマクロファージの浸潤増生がみられるものもあることが確認された。甲状腺ではアミロイド沈着部位にマクロファージの浸潤は全例みられず、臓器によってマクロファージの反応は異なることが明らかにされた。

今回、CD68 の細胞質内の染色態度が通常とは異なり、線維状に観察された。また、肝臓に沈着したアミロイドの一部が線維状に抗 CD68 陽性を示した。腎臓、副腎、前胃、甲状腺でも沈着アミロイドの一部が抗 CD68 陽性を呈した。CD68 はマクロファージが酸化 LDL (低比重リポ蛋白) を貪食する際の受容体糖蛋白で、各臓器に分布するマクロファージ、肝臓のクッパー細胞などの細胞膜、細胞質内に発現する。今回、食細胞系の細胞内、細胞膜に発現する CD68 が、細胞外のアミロイドで発現していたが、こういったアミロイドはマクロファージやクッパー細胞を介して、もしくは細胞膜の CD68 の修飾を受けて産生、沈着した可能性が疑われた。CD68 は酸化 LDL 受容体蛋白であり、牛では肝臓の LDL 量の増加に炎症性サイトカインが関与することが知られている。また血中の SAA/ LDL 複合体や酸化変性 LDL はいくつかの慢性疾患において高値を示すことも知られている。牛のアミロイド症の中にはその病理発生に、CD68 や LDL が関与するものもある可能性が示唆された。

一方でマクロファージの反応のない牛アミロイド症も多数みられることも明らかにされた。マクロファージの反応の有無と、牛の年齢やアミロイドの沈着程度との相関は認められなかった。沈着アミロイドはマクロファージやクッパー細胞

によって貪食、除去されることが報告されている。病変のステージの問題による可能性もあるものの、貪食機能不全もアミロイド沈着の要因の一つとして疑われており、沈着アミロイドに対するマクロファージの遊走、貪食が行われないうちにアミロイドの沈着が重度になりアミロイド症発症に至った可能性も示唆された。

今回、ルゴール液による肉眼的なアミロイドの検出に成功し、食肉検査場等における家畜のアミロイド症の迅速診断方法として応用できる可能性が示唆された。

E. 結論

牛アミロイド症の中にはアミロイド線維形成にマクロファージやクッパー細胞が関与している症例もある可能性が示唆された。家畜のアミロイド症の野外迅速診断法としては、ルゴール液による肉眼的なアミロイドの検出法の有効性が示唆された。

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) 堀内雅之, 山田学, 古林与志安, 松井高峯.
牛アミロイド投与によるウサギの実験的アミロイドーシス. 第 144 回日本獣医学会学術集会、江別、2007年9月2日。

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 (難治性疾患克服研究事業)
 アミロイドーシスの画期的診断・治療法に関する研究班 分担研究報告書

ウシ由来 AA アミロイド投与による実験的ウサギ AA アミロイドーシス

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 堀内雅之*、古林与志安*、山田 学**、
 帯広畜産大学畜産学部獣医学科、** (独) 動物衛生研究所

研究要旨 アミロイドーシス牛由来のウシアミロイドを炎症刺激 (FCA+LPS) ウサギに投与しウサギに対する AEF(Amyloid Enhancing Factor) 効果を検討した。ウシアミロイドは飛節潰瘍症罹患ウサギに対しては静脈内および経口いずれの投与において AEF 効果を有することが確認された。

A. 研究目的

アミロイドーシス発生機構の詳細は不明であるが、マウスにおいては実験的に AA アミロイドーシスを作成でき、AEF(Amyloid Enhancing Factor)を投与するとこの作成過程が大幅に短縮される。近年アミロイド線維自体に AEF 効果があり、この AEF 効果は種の壁を越えて作用することも知られてきている。

ウシのアミロイドーシスは末期的な病態では臨床的に診断可能であるが、未発症牛に対する早期診断は不可能とされている。未発症アミロイドーシス牛由来の食肉等が食品として流通する可能性が示唆されている。

ウシのアミロイドがマウス以外の動物に対しても AEF 効果を有するか、ウサギを用いて検討する。

B. 研究方法

予備実験：

アミロイドーシス牛の腎臓よりアミロイドを抽出し、ウサギに様々な条件で炎症刺激を行いアミロイドを投与した。350羽のウサギに対し様々な条件で実験を行い30羽(9%)にアミロイドーシスの誘発が認められた。その際、飛節潰瘍症罹患 (SH、図1) ウサギやアミロイド投与以前に複数回の炎症刺激を与えたウサギにおいてアミロイドーシスの実験的な発生が高率であることが観察された (表1)。そこで SH ウサギを収集・購入し誘発実験を試みた。

本実験プロトコール：

日本白色種の飛節潰瘍症罹患ウサギ (SH) 75羽と24羽の健康対象ウサギ (non-SH) を使用した。実験開始時に無処置動物として3羽ずつを病理学的に検索した。実験はアミロイド耳静脈投与実験として A(SH: n=18)、B(SH: n=9)、C(non-SH: n=9) の3群、経口投与実験として D (SH: n=12) E (SH: n=12)、F (non-SH: n=12) の3群の計6群に分けて実施した(表2-1、2-2)。各群に対し、4日毎5回の炎症刺激(FCA+LPS)を行った。最終刺激時に A・C 群にはウシアミロイドを耳静脈内に、D・F 群にはカテーテルで胃内にアミロイドを投与した。B・E 群にはアミロイドを投与しなかった。また、D・E・F 群ではアミロイド投与後も4日毎に同様の炎症刺激を与え続けた。

A 群は最終炎症刺激・アミロイド投与後1(n=3)、3(n=3)、6 (n=9)、8(n=3)日後に、B、C 群は1、3、6日後に3羽ずつ、D・E・F 群は1、4、7、12日目に3羽ずつを病理学的に検索した。

(倫理面への配慮)

予備実験・本実験共に帯広畜産大学実験動物委員会に計画を提出・承認後に実験を行い、実験時には動物に苦痛を与えないように配慮して操作した。

C. 研究結果

A群18/18及びD群12/12全ての個体でアミロイ

ドの沈着が、ウシアミロイド投与後1日目より認められた。アミロイドは脾臓の白脾髄周囲、腎臓の糸球体及び間質に認められた。

実験開始時に検索した無処置動物及びB・C・E・F群ではいずれの個体にもアミロイドの沈着は認められなかった。

D. 考察

ウシアミロイドの投与により飛節潰瘍症罹患ウサギにアミロイドーシスを短期間で誘発できることが示された。今回の実験では自然発症の飛節潰瘍症罹患ウサギを使用した。今後飛節潰瘍病変等を人為的に作成すること等により、ウサギはアミロイドーシス発生機構解明のための有用なモデル動物に成り得るものと考えられた。

E. 結論

ウシ由来アミロイドはマウス以外の動物(ウサギ)に対してAEFとして作用する。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Horiuchi N, Kotani Y, Koga M, Yamada M, Kobayashi Y, Matsui T. Experimental induction of amyloidosis by bovine amyloid fibrils in sore-hock rabbits. Amyloid (in press)

2. 学会発表

- 1) 堀内雅之、山田学、古林与志安、松井高峯：牛アミロイド投与によるウサギの実験的アミロイドーシス。第144回日本獣医学会。酪農学園大学(江別)。2007,9,2

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

表 1 予備実験に用いたウサギの種類・実験種別アミロイド沈着率

	足：正常	足：SH	計
アミロイド投与後に炎症刺激	7/294 (2%)	2/18(11%)	9/312(3%)
炎症刺激後にアミロイド投与	15/31 (48%)	6/7 (86%)	21/38(55%)
計	22/325 (7%)	8/25 (32%)	30/350(9%)

表 2-1 ウシアミロイド経静脈投与実験プロトコールと結果

群	動物数	足	炎症回数	アミロイドの投与	剖検日ごとの発症数 (発症数/被検数)			
					1*	3*	6*	8*
A	18	SH	5	+	(3/3)	(5/5)	(7/7)	(3/3)
B	9	SH	5	-	(0/3)	(0/3)	(0/3)	
C	9	Non SH	5	+	(0/3)	(0/3)	(0/3)	

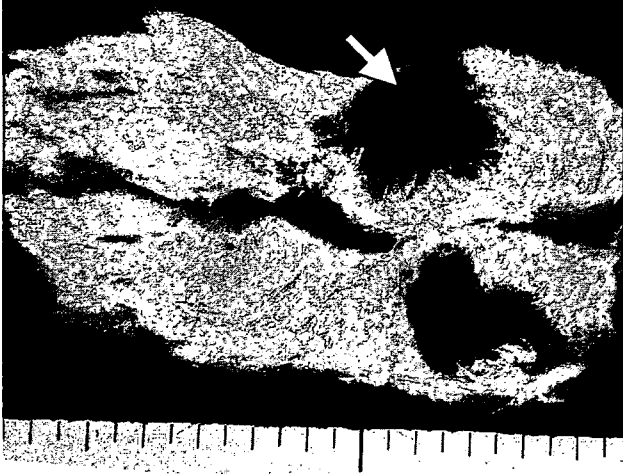
*最終炎症刺激経過後日数

表 2-2 ウシアミロイド経口投与実験プロトコールと結果

群	動物数	足	炎症回数	アミロイドの投与	剖検日ごとの発症数 (発症数/被検数)			
					1*	4*	7*	12*
D	12	SH	5	+	(3/3)	(3/3)	(3/3)	(3/3)
E	12	SH	5	-	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)
F	12	Non SH	5	+	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)

*最終炎症刺激経過後日数

図1 飛節潰瘍症 (SH) 自然発症例



患部を矢印で示す。

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)
 アミロイドーシスの画期的診断・治療法に関する研究班 分担研究報告書

実験的マウス AA アミロイドーシスの発症における外来性
 アミロイド線維の役割および AA アミロイドーシスの治療

分担研究者 石原得博 山口大学医学部医学研究科 構造解析病態学講座

共同研究者 崔 丹*、河野裕夫*、星井嘉信*、宇根有美**、権藤俊一***

*山口大学医学部医学研究科 構造解析病態学講座、**麻布大学獣医学部獣医学
 科病理学研究室、***山口大学病院病理科

研究要旨 マウス、ウシ、チーター、ハクチョウ、ネコの肝臓からアミロイド線維を抽出し、これらの線維をマウスに投与し、マウスのアミロイドーシスの発症促進効果について検討した。マウスアミロイド線維は強いアミロイドーシスの発症促進効果を有することに対して、ウシ、チーター、ハクチョウ、ネコの AA アミロイド線維は同程度のアミロイドーシスの発症促進効果を示し、マウスのものより随分弱いものであった。さらに投与したアミロイド線維の分布を調べるために、マウスに投与したアミロイド線維を FITC で標識した。抗 FITC 抗体の免疫染色によると、FITC 標識アミロイド線維を投与した 3 時間後に、脾臓の濾胞周辺帯に FITC 陽性物質の集積がみられ、7 日後脾臓に中等量のアミロイド沈着が認められ、このアミロイド沈着に斑点状の FITC 陽性物質がみられた。すでに発症したマウス AA アミロイドーシスにおける triptolide の効果を検証した。triptolide を投与すると、炎症刺激を継続しても、アミロイドーシスは進行しなかった。アミロイドの沈着があったマウスの炎症刺激を中止し、更に triptolide を投与すると、沈着したアミロイドの吸収がより早くなった。

A. 研究目的

これまで、異種由来の異なるタイプのアミロイド線維はマウスアミロイドーシスの発症を促進することが報告されていたが、異種由来の同タイプアミロイド線維を投与することによってマウスのアミロイドーシスの発症促進効果が異なるかどうかについての詳細な検討は行われていない。そこで、異種動物由来の AA アミロイド線維を用いて、マウスのアミロイドーシスの発症促進効果を検討した。外来性のアミロイド線維はアミロイドーシスの発症における役割を解明するために、マウスに投与するアミロイド線維を蛍光色素 FITC で予め標識し、投与後のアミロイド線維の分布を調べた。

漢方薬雷公藤は中国では関節リウマチや全身性エリテマトーデスなどの免疫疾患の治療薬として繁用されている。triptolide は雷公藤の最も有効な成分である。ラットのコラーゲン誘発関節炎や心臓移植後慢性拒絶反応、冠動脈硬化症におい

て抗炎症作用や免疫抑制作用などを示すことが報告されている。我々のこれまでの研究で triptolide は濃度依存的にマウス AA アミロイドーシスの発症における抑制効果を有することが明らかとなった。すでに発症したアミロイドーシスの進行や吸収における triptolide の効果を検討する目的で今回の実験を行った。

B. 研究方法

1. 異動物種アミロイド線維のマウス AA アミロイドーシスの発症促進効果:

1) アミロイド線維の抽出: マウス、ウシ、チーター、ハクチョウ、ネコの肝臓から Pras らの方法に準じてアミロイド線維を水抽出した。これらのアミロイド線維はすべて AA タイプである。

2) 上記のアミロイド線維の量を変えて各実験群のマウスの尾静脈に投与し、同時に炎症刺激を加えた。実験開始 7 日後、マウスを安