

【研究紹介】

牛アミロイドーシスにおける血清アミロイドA蛋白の
臨床的意義に関する研究

高 橋 英 二

帯広畜産大学獣医学研究部門 臨床獣医学分野（〒080-8555 帯広市稲田町西2線11番地）

はじめに

牛アミロイドーシスはアミロイドA（AA）と呼ばれる分子量約9 kDaの蛋白質が凝集し、アミロイド線維となって全身諸臓器に高度に沈着することにより引き起こされる疾患で、ヒトでの分類による全身性反応性AAアミロイドーシスと同じタイプと考えられている。臨床的には持続性かつ難治性の下痢および全身の浮腫を特徴とし、直腸検査により多くの例で腎臓の腫大を認め、臨床病理学的には高度の低蛋白質血症および蛋白尿といったネフローゼ症候群様の所見がみられる。また、病理組織学的検査により全身諸臓器、特に腎臓および肝臓に高度のアミロイド沈着が認められる。疫学的調査では、基礎疾患として結核や慢性乳房炎、慢性関節炎のような慢性炎症性疾患を持つ例が多いこと、高齢牛に多いことなどが報告されているが、発病機序については不明な点が多い。

AA蛋白の前駆物質は、血清中に含まれる急性相反応蛋白質の1つである血清アミロイドA（SAA）で、分子量は約12～14 kDaである。SAAの機能についてはあまり明らかにされていないが、ヒトでは炎症時の血清リポ蛋白質、特にHDL₂の中に多く含まれ、アポ蛋白の1つとして働くこと、炎症反応により損傷した組織の修復に関与することなどが報告されている。アミロイド沈着臓器から精製したAA蛋白とSAAのN末端側のアミノ酸配列は非常に高い相同性を示すことから、SAAが何らかの原因で完全に分解されず、AAという中途半端な長さで残ってしまう結果、それが次々と凝集・線維化し、臓器に沈着していくと考えられている。

Gillmoreら^[1]は、AAアミロイドーシス患者のSAA

濃度を低くコントロールすることで臓器のアミロイド沈着量を減らすことができたと報告し、SAA濃度が長期間高値を持続することがAAアミロイドーシスの発症および病状悪化の大きな要因であると推察した。また、SAAにはアミノ酸配列の一部異なる複数のアイソフォームが存在し、マウスではSAA₂というアイソフォームのみにアミロイド原性があることが解っている^[2]。さらにLavieら^[3]は、健康なヒトの単球がSAAを完全に分解したのに対し、アミロイドーシス患者の単球はSAAを完全には分解できなかったと報告し、マクロファージ系細胞のSAA分解活性の低下がアミロイドーシス発症に関与するのではないかと推察している。これらの研究成績から、①血中SAA濃度の持続的な増加、②アミロイド原性SAAアイソフォームの存在、③マクロファージ系細胞の機能低下または異常によるSAA分解活性の低下、の3つがAAアミロイドーシス発症に深く関与していると考えられるが、いまだ確証を得るまでには至っていない。著者は、アミロイドーシス発症牛のSAAを解析することによって本症の発病機序の解明および早期診断につながるのではないかと、という仮説を立て、それを検証するために以下の試験を行った。

1. アミロイドーシス牛の血清アミロイドA（SAA）濃度の検討

1) 材料および方法

供試牛は北海道十勝地方で飼養されていた3～13歳のホルスタイン種乳牛25例である。臨床検査では持続性かつ難治性の軟便～水様便の排泄、胸垂・下顎・下腹部の冷性浮腫および直腸検査による左腎臓の腫大感が全例に認められた。また、血液検査では血清総蛋白質、血清ア

ルブミンおよび血清γグロブリン濃度の著しい低下がみられ、尿検査では尿比重の低下ならびに高度の蛋白尿が認められた。これらネフローゼ症候群様の所見がみられたため、アミロイドーシスを疑い経過観察したが、2日～4カ月後、全例が予後不良と診断されたため、安楽死させたのちに病理解剖した。病理解剖では全例で両側腎臓の著しい腫大と退色ならびに腸間膜の著しい水腫が認められた。また腎臓の病理組織学的検査により全例でアミロイドの沈着を認め、さらに抗ヒトAAマウスモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学染色により強い反応性が確認されたことから、全例がAAアミロイドーシスと確定診断された。対照牛として、慢性炎症性疾患に罹患したホルスタイン種乳牛18例（慢性乳房炎5例、慢性化膿性関節炎13例）、および健康なホルスタイン種乳牛10例を用いた。

SAA濃度の測定には、ELISA法を用いた市販のSAA定量キット（Serum Amyloid A assay: Tridelata, USA）を使用した。またSAAと同様、牛の炎症マーカーである血清ハプトグロビン（Hp）濃度を同時に測定し比較した。血清Hp濃度の測定には、一元免疫拡散法を用いた市販の定量キット（ウシHpプレート：メタボリック

エコシステム研究所、宮城）を使用した。

2) 成績

アミロイドーシス牛のSAA濃度は、中央値が105.1 $\mu\text{g/ml}$ であり、健康牛と比較して有意に高い値を示した。また、慢性炎症牛のSAA濃度は中央値が87.6 $\mu\text{g/ml}$ であり、こちらも健康牛と比較して有意に高い値を示したが、アミロイドーシス牛との間に有意差は認められなかった。

アミロイドーシス牛の血清Hp濃度は、中央値が950 $\mu\text{g/ml}$ であり、健康牛と比較して有意に高い値を示した。また、慢性炎症牛の血清Hp濃度は中央値が455 $\mu\text{g/ml}$ であり、こちらも健康牛と比較して有意に高い値を示したが、SAA濃度と同様、アミロイドーシス牛との間に有意差は認められなかった（表1）。

アミロイドーシス牛のSAA濃度と血清Hp濃度間の相関を調べたが有意な相関関係はみられなかった（ $r_s=0.04$ 、 $p>0.05$ 、 r_s : spearmanの順位相関係数）。一方、慢性炎症牛では両項目間で有意な正の相関関係が認められた（ $r_s=0.74$ 、 $p<0.01$ ）（図1）。

3) 考察

ヒト全身性反応性AAアミロイドーシスでは、SAA

表1. アミロイドーシス牛と慢性炎症牛の血清アミロイドAと血清ハプトグロビン濃度

群		血清アミロイドA (SAA)		血清ハプトグロビン (Hp)	
		中央値 ($\mu\text{g/ml}$)	範囲 ($\mu\text{g/ml}$)	中央値 ($\mu\text{g/ml}$)	範囲 ($\mu\text{g/ml}$)
アミロイドーシス牛	(n=25)	105.1 ^a	<0.3–225.8	950 ^d	<20–1860
慢性炎症牛	(n=18)	87.6 ^b	<0.3–298.2	455 ^e	<20–2000
健康牛	(n=10)	1.4 ^c	<0.3–13.5	ND ^f	ND

a–c、b–c、d–f、e–f間で有意差あり（ $p<0.01$ 、Mann-Whitney test）

ND：検出できず

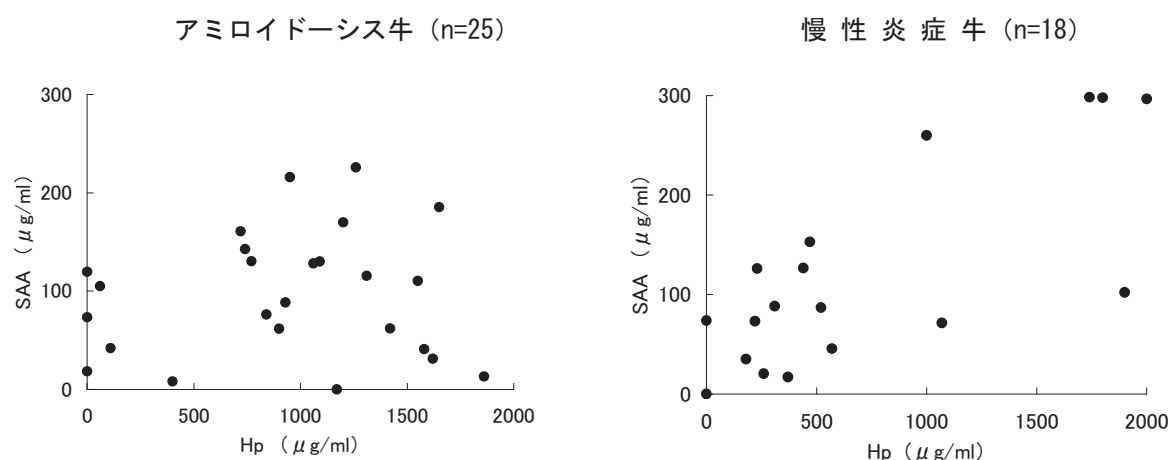


図1. アミロイドーシス牛と慢性炎症牛の血清アミロイドAと血清ハプトグロビン濃度の関係

アミロイドーシス牛：相関なし（ $r_s=0.04$ 、 $p>0.05$ ）

慢性炎症牛：正の相関あり（ $r_s=0.74$ 、 $p<0.01$ ）

r_s : Spearmanの順位相関係数

濃度が高値を持続することが発症および病状悪化の大きな要因だが、その濃度増加は単に合併している炎症性疾患の活動状態を反映しているにすぎず、AA アミロイドーシス診断の指標とはならないと考えられている。今回、アミロイドーシス発症牛25例のSAA濃度を測定したところ、健康牛と比較して有意に高値を示したが、本症の基礎疾患として重要である慢性炎症性疾患に罹患した牛のSAA濃度との間に有意差がみられなかったことから、ヒトと同様、アミロイドーシスにおけるSAA濃度測定の診断的意義は低いと考えられた。しかしながら、SAAと並んで牛における最も鋭敏な炎症マーカーとされる血清Hp濃度を同時に測定し、SAA濃度との相関を調べたところ、慢性炎症牛と異なりアミロイドーシス牛では有意な相関がみられなかったことから、アミロイドーシス牛でみられるSAA濃度の増加には炎症以外の要因が関与している可能性があり、量的な分析以外に質的な分析が必要と考えられた。

2. 抗ウシSAA抗体の作成およびそれを用いたイムノブロット法によるアミロイドーシス牛血清のSAAバンドパターンの分析

1) 材料

SAAバンドパターンの分析には、アミロイドーシス牛血清7検体、慢性炎症牛血清5検体、および健康牛血清2検体を用いた。また、抗ウシSAA抗体作成のためのウシSAAの精製には、慢性関節炎および慢性乳房炎に罹患し、SAA濃度が高値を示した牛のプール血清、計264 mlを用いた。

2) 方法

① ウシSAAの精製

まず、炎症牛プール血清から超遠心分離法によりウシアポHDLを精製した。その後、低速ゲルろ過クロマトグラフィー、逆相高速液体クロマトグラフィー、ゲルろ過高速液体クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーによりウシSAAを単離精製した。

② 抗ウシSAAウサギ血清の作成

精製したウシSAA200 µgをPBSに溶解し500 µlとしたものをFleund's Complete Adjuvant 500 µlと混合し、日本白色種のウサギの背部数カ所に皮内接種した。その後10日間隔で、初回の1/10量の抗原液を合計5回皮内接種し、2週間後に全採血を行い抗ウシSAAウサギ血清を得た。

表2. イムノブロット法により認められたアミロイドーシス牛血清と慢性炎症牛血清における2つのSAAバンド濃度の比率

	検体No.	バンドA濃度(%)	バンドB濃度(%)
AM	1	46.8	53.2
	2	86.1	13.9
	3	72.4	27.6
	4	67.5	32.5
	5	72.6	27.4
	6	87.5	12.5
	7	100.0	0.0
	平均	76.1 ^{a)}	23.9
C	8	50.6	49.4
	9	35.0	65.0
	10	61.9	38.1
	11	45.7	54.3
	12	49.5	50.5
	平均	48.5 ^{b)}	51.5

バンドA：電気泳動における移動度の低いSAAバンド
 バンドB：電気泳動における移動度の高いSAAバンド
 AM：アミロイドーシス牛 C：慢性炎症牛
 a-b間で有意差あり (t検定, $p < 0.01$)

③ SDS-PAGEとイムノブロッティング

血清を10倍希釈したものをサンプルとして15%平板ミニゲルを用いたSDS-PAGEを行ったのち、PVDFに転写し、作成した抗ウシSAAウサギ血清を一次抗体、市販のHRP標識抗ウサギIgGヤギ抗体を二次抗体としたイムノブロッティングを行い、化学発光法によりバンドを検出し解析した。

3) 成績

アミロイドーシス牛7頭中6頭の血清から2本、1頭からは1本の明瞭なSAAバンドが確認された。また、慢性炎症牛血清についてもアミロイドーシス牛にみられたものと同じ位置に2本のバンドが全例で観察された。その2本のバンドのうち、電気泳動での移動度の低いほうをA、高いほうをBとし、画像解析ソフトを用いて両バンドの濃度比率を調べた結果、アミロイドーシス牛ではバンドAの濃度比率が46.8～100.0 % (平均76.1%) と高かったのに対し、慢性炎症牛では35.0～61.9% (平均48.5%) と低く、両疾患牛でのバンドAの濃度比率に有意な差が認められた (表2)。

4) 考察

SAAにはアミノ酸配列の一部異なる複数のアイソフォームが存在するため、炎症時の血清についてSDS-PAGEによる一次元電気泳動およびイムノブロッティングを行うと複数のバンドが出現することが、ヒトおよび牛で確認されている。また、マウスにおいては、主要な

SAAアイソフォームであるSAA₁とSAA₂がSDS-PAGEとイムノブロッティングにより明瞭な二重バンドとして識別され、さらにアミロイドーシス発症過程においては、両アイソフォームの血中濃度比率が大きく変化する結果、二重バンドの濃度比率も大きく変化する」と報告されている。今回、慢性炎症牛とアミロイドーシス牛において同じ位置に2本のバンドが検出されたが、その濃度比率が両者間で大きく異なっていたことから、血中に増加しているSAAアイソフォーム組成に違いがあると考えられ、その中にアミロイドーシス牛に特異的なアイソフォームが存在する可能性が示唆された。

3. 二次元電気泳動およびイムノブロット法によるアミロイドーシス牛血清のSAAアイソフォーム分析

1) 材料および方法

材料としてアミロイドーシス牛血清10検体、慢性炎症牛血清10検体および健康牛血清2検体を用いた。まず一次元目として等電点電気泳動を行ったのち、二次元目としてSDS-PAGEを行った。イムノブロッティングは実験2の方法に準じて行い、化学発光法により肉眼的に認められた約14 kDaのスポットを、SAAアイソフォームスポットとした。

2) 成績

アミロイドーシス牛と慢性炎症牛ではやや異なるスポットパターンを示し、特にアミロイドーシス牛ではSAA pI 5.2と8.6が高頻度に検出された。健康牛ではSAA pI 7.7のみが検出された (表3)。

3) 考察

アミロイドーシス牛のみに特異的に発現するSAAアイソフォームは検出されなかったものの、SAA pI 5.2と8.6の高頻度な発現はアミロイドーシス牛の特徴的所見であり、診断的意義があると考えられた。今後これらのアイソフォームにアミロイド原性があるかどうかを検証するためには、それぞれのアイソフォームを単離し、組織に沈着したAA蛋白とのアミノ酸配列の相同性について調べる必要がある。

ヒトではアミロイド前駆蛋白として最も重要と考えられるSAA 1の血中濃度が高値を持続しやすい血統があることが報告され、AAアミロイドーシス発症には遺伝的な要因も関与しているのではないかと考えられている。また、Jacobsenら^[4]は、数頭の牛に同じ炎症刺激を与えてSAAアイソフォームパターンの変化を観察したところ、一部の牛で、他の牛と著しく異なったパターンが

表3. 二次元電気泳動およびイムノブロット法で認められたアミロイドーシス牛、慢性炎症牛および健康牛血清のSAAアイソフォーム

群	検体No.	SAA アイソフォーム (pI)						
		5.2	5.6	6.1	6.4	6.8	7.7	8.6
A	1	-	+	+	+	+	+	-
	2	-	+	+	+	+	+	+
	3	-	+	+	+	+	+	+
	4	+	+	+	+	+	+	+
	5	-	+	+	+	+	+	+
	6	+	+	+	+	+	+	+
	7	+	+	+	+	+	+	+
	8	+	+	+	+	+	+	+
	9	-	+	+	+	+	+	+
	10	-	+	+	+	+	+	+
B	11	+	+	+	+	+	+	-
	12	-	+	+	+	+	+	+
	13	-	+	+	+	+	+	+
	14	-	+	+	+	+	+	-
	15	-	-	+	+	+	+	-
	16	-	+	+	+	+	+	-
	17	-	+	+	+	+	+	-
	18	-	-	+	+	+	+	-
	19	-	-	+	+	+	+	-
	20	-	-	-	+	+	+	-
C	21	-	-	-	-	-	+	-
	22	-	-	-	-	-	+	-

A: アミロイドーシス牛 B: 慢性炎症牛 C: 健康牛
pI: 等電点 (isoelectric point)

みられたことから、牛についても遺伝的に発現しやすいSAAアイソフォームが存在するのではないかと推察している。これらのことから、もし牛でアミロイド原性の強いアイソフォーム (例えばマウスのSAA₂のような) が存在し、そのアイソフォームを遺伝的に発現しやすい系統の牛がいるとすれば、「同じような慢性炎症性疾患に罹患した牛で、なぜアミロイドーシスを発症する牛としない牛がいるのか?」という問いに対する一つの答えが出せるかもしれない。

おわりに

本稿では、私が約10年前に書いた学位論文の内容を中心に研究紹介とさせていただいた。更に詳細な内容については発表論文を参照されたい^[5-7]。

2002年に山口大学の研究グループであったCuiら^[8]が「AAアミロイドーシス発症牛の臓器から粗精製したアミロイド線維をマウスに経口摂取させたところ、マウスのアミロイドーシス発症が加速化された」という内容の

論文を発表してから、BSEと同様にAAアミロイドの沈着した牛肉を食べるとアミロイドーシスになる危険性が高まるのではないかと騒がれた時期があり、日本でも厚生省後押しのもとで複数の研究機関による調査が行われた。しかしながら、その後の研究で、牛のアミロイド線維は他の動物に対するアミロイド原性が思ったほど高くないことが判り、更に霊長類を用いた伝達実験も成功しなかったことなどから、アミロイドーシス牛の肉を摂取してもそれが直接ヒトアミロイドーシスの原因にはならないというのが最近の見解であり、牛アミロイドーシスに対する研究は一時よりもかなりトーンダウンしてしまった感がある。しかしながら、牛はもちろんヒトでもAAアミロイドーシスの原因や発症メカニズムがまだ完全に解明されてるわけではないので、他種動物のアミロイド沈着の核となる可能性がある、 β -sheet構造に富んだアミロイド線維をヒトが摂取する機会を減らすことは公衆衛生上重要であろう。そのためにも、今後は本症の早期スクリーニング法や遺伝的要因の調査を中心に、ライフワーク的にアミロイドとお付き合いしていけたらと思う。

引用論文

1. Gillmore JD, Lovat LB, Persey MR, Pepys MB, Hawkins PN: Amyloid load and clinical outcome in AA amyloidosis in relation to circulating concentration of serum amyloid A protein, *Lancet*, 358, 24-29 (2001)
2. Shiroo M, Kawahara E, Nakanishi I, Migita S: Specific deposition of serum amyloid A protein 2 in the mouse, *Scand J Immunol*, 26, 709-716 (1987)
3. Lavie G, Zucker-Franklin D, Franklin EC: Degradation of serum amyloid A protein by surface-associated enzymes of human blood monocytes, *J Exp Med*, 148, 1020-1031 (1978)
4. Jacobsen S, Niewold TA, Kornalijnslijper E, Toussein MJM, Gruys E: Kinetics of local and systemic isoforms of serum amyloid A in bovine mastitic milk, *Vet Immunol Immunopathol*, 104, 21-31 (2005)
5. Takahashi E, Kuwayama H, Kawamoto K, Matsui T, Inokuma H: Detection of serum amyloid A isoform in cattle, *J Vet Diagn Invest*, 21, 874-877 (2009)
6. 高橋英二、松井高峯、猪熊 壽: 血清アミロイドAアイソフォーム解析による牛アミロイドーシス診断の可能性、*北獣会誌*、55、457-459 (2011)
7. Takahashi E, Uzuka Y, Tanabe S, Satoh M, Furukawa H: Serum amyloid A and haptoglobin levels in bovine amyloidosis, *J Vet Med Sci*, 69, 321-323 (2007)
8. 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*, 52, 40-45 (2002)