

博士論文

実験的 AA アミロイドーシスの病理発生と伝達性に関する研究

渡邊 謙一

緒論.....	3
第1章 実験的AAアミロイドーシスモデルとしてのIL-1raKOマウスの有用性	
序.....	10
材料と方法.....	12
結果.....	16
考察.....	17
要約.....	21
図表.....	22
第2章 IL-1raKOマウスにおけるAAアミロイドの分解と再沈着の機序	
序.....	30
材料と方法.....	32
結果.....	36
考察.....	39
要約.....	43
図表.....	44
第3章 AAアミロイド沈着に伴う脾臓濾胞辺縁帯の組織学的変化	
序.....	57
材料と方法.....	60
結果.....	61
考察.....	63
要約.....	67
図表.....	68
第4章 IL-1raKOマウスへのウシおよびネコAAアミロイドの伝達性	
序.....	79
材料と方法.....	81
結果.....	85
考察.....	88
要約.....	91
図表.....	92
総括.....	104
謝辞.....	110
引用文献.....	111

緒論

アミロイドーシスは、蛋白質の立体構造が変化し β シートに富む線維状蛋白質のアミロイドとして細胞外に沈着することで、多様な臓器に機能障害をおこす疾患の総称である。ヒトにおけるアミロイドーシスはその前駆蛋白質により現在約 31 種に分類されており、そのうちの 9 種については動物でも報告がある (表 1) ⁷⁹。アミロイドーシスは、全身へのアミロイド沈着を伴う全身性アミロイドーシスと、局所にのみ沈着する限局性アミロイドーシスとに分類される。

AA アミロイドーシスは急性期炎症蛋白である serum amyloid A (SAA) を前駆蛋白質とする全身性アミロイドーシスであり ¹⁰⁰、主に慢性炎症疾患に続発する ^{41, 70}。ヒトの AA アミロイドーシスでは、ピリンをコードする MEFV 遺伝子の変異によって生じる家族性地中海熱に続発するもの ⁵⁹、結核や関節リウマチなどの慢性の炎症性疾患に続発するものが大半を占める ⁴⁰。AA アミロイドーシス発症の背景には前駆蛋白質である SAA の持続的高値が必須とされているが、生体内において AA アミロイドが形成される機序は依然として解明されていない。また、基礎疾患のコントロールにより病状の進行を遅らせることは可能になったものの ⁵¹、根本的な治療法は確立されていない。AA アミロイドーシスはヒト以外の様々な動物種でも発生が報告されており、結核 ⁷⁵、重度の慢性化膿性炎症 ^{17, 42}、水禽類の趾瘤症 ⁹³ などに続発することが知られている。自然例の AA アミロイドーシスでは肝臓・腎臓・消化管・甲状腺など、特定の臓器にアミロイドが沈着しやすい傾向がみられ、特に糸球体や消化管粘膜下織への重度のアミロイド沈着は患者の予後に影響することから、臨床的意義の大きな病変である ⁷³。

アミロイドーシスは硝酸銀 ¹² やアゾカゼイン ⁸⁰、フロイント完全アジュバント (FCA) ⁶⁸ を皮下投与することで人為的に急性炎症を惹起し、血中 SAA 濃度を高めることで誘発することが可能である。実験的に作出された AA アミロイドーシスでは、アミロイド沈着は主に脾臓や肝臓に限局し、自然例の病態を忠実に再現することは極めて困難であることから、病態モデルとしての有用性が

疑問視されている。そのため、この実験モデルは主に生物アッセイのツールとして用いられる事が多く^{12, 77}、その病態に関する考察は殆どなされていなかった。

Westermerkらは、このモデルにおいてAAアミロイド沈着臓器から抽出したAAアミロイド線維を別の動物に投与することにより、発症までの期間を劇的に短縮できることを見出した(図1)⁴⁷。AAアミロイド沈着臓器から抽出したAAアミロイド線維を含む分画をamyloid enhancing factor (AEF)と称し、微量のAEFによってAAアミロイドーシスが惹起できること、静脈内投与、腹腔内投与、経口投与など、様々な経路によって投与されたAEFがAAアミロイドーシスを誘発しうること¹³、AEFは熱処理や酵素処理してもアミロイドーシス誘発活性を失わないことなどが明らかとなり⁶⁵、病原性プリオンと同様に動物からヒトへのAAアミロイドーシスの伝達が懸念されるようになった。

AAアミロイドーシスの伝達に関する研究には主にマウスの実験的アミロイドーシスモデルが用いられ、ヒト、ウシ¹³、ネコ⁵⁴、ニワトリ⁵⁵等のAAアミロイドーシスがマウスに伝達可能であることが報告された。また、HoriuchiらはウシAAアミロイドの投与によりウサギにAAアミロイドーシスを伝達できることを証明した²⁹。異種動物間でのAAアミロイドーシスの伝達では同種間と比較し、発症率およびアミロイド沈着量が極めて低値であることから、動物からヒトへのAAアミロイドの伝達リスクは極めて低いと想定されている⁹⁹。一方、これらの報告では、投与されたAAアミロイドがどのような機序でアミロイド沈着を起こすかについては言及されていない。AAアミロイドーシスの伝達はこの疾患の発症メカニズムを解明するうえでもきわめて重要な現象である。

本研究では、AEFを用いた実験的アミロイドーシスモデルの病態を解析することによりAAアミロイドーシスの詳細な病理発生と伝達機構とを解明することを目的とした。第1章では実験的アミロイドーシスにおけるinterleukin-1 receptor antagonist knockout (IL-1raKO)マウスの有用性を調べた。第2章で

は、この実験的アミロイドーシスマウスの生体内における AA アミロイドの沈着と分解の機序について検討した。第 3 章では実験的アミロイドーシスにおいて最も AA アミロイドが沈着しやすい脾臓の濾胞辺縁帯に注目し、AA アミロイド沈着の組織学的機序について検討した。そして第 4 章では 1～3 章で得られた知見をもとに IL-1raKO へのウシおよびネコ AA アミロイドの伝達性とその病態について検討した。

表1: アミロイドーシスの分類(2014年)

主な疾患名/略称	前駆蛋白	全身性/ 限局性	先天性/ 後天性	主なアミロイド沈着臓器 (ヒト)	動物での報告
続発性AAアミロイドーシス/AA	血清アミロイドA蛋白(SAA)	S	A	CNS以外の全身臓器	多種
骨髄腫合併ALアミロイドーシス/AL	イムノグロブリン軽鎖	S,L	A,H	CNS以外の全身臓器	イヌ、ネコ、 ウマ等
骨髄腫合併AHアミロイドーシス/AH	イムノグロブリン重鎖	S,L	A	CNS以外の全身臓器	
家族性アミロイドポリニューロパチー・ 老人性全身性アミロイドーシス/ATTR	トランスサイレチン	S	A,H	心臓・関節・ANS等	ベルベットモン キー
透析アミロイドーシス/Aβ 2M	β-2ミクログロブリン	L	A,H	ANS・骨格筋	
家族性アミロイドポリニューロパチー III/ApoAI	アポリポタンパクA I	S	H	心臓・肝臓・腎臓等	イヌ
(遺伝子改変マウスのみ)/AApoAII	アポリポタンパクA II	S	H	腎臓	マウス
(加齢性)/AApoAIV	アポリポタンパクAIV	S	A	CNS以外の全身臓器	
家族性アミロイドポリニューロパチーIV/AGel	ゲルソリン	S	H	PNS等	
家族性腎アミロイドーシス/ALys	リソソーム	S	H	腎臓	
(腎アミロイドーシス)/ALECT2	Leukocyte Chemotactic Factor-2	S	A	腎臓	
家族性腎アミロイドーシス/AFib	フィブリノーゲン	S	H	腎臓	ムナジロテン
遺伝性脳血管アミロイドアンギオパチー (アイランド型)/ACys	シスタチンC	S	H	PNS・皮膚	
家族性英国型認知症/ABri	ABri前駆タンパク	L	H	CNS	
家族性デンマーク型認知症/ADan	ADan前駆タンパク	L	H	CNS	
アルツハイマー病・ 脳血管アミロイドアンギオパチー/Aβ	Aβ 前駆タンパク	L	A,H	CNS	多種
Creutzfeldt-Jakob病・BSE/APrP	プリオン	L	A	CNS	ヒツジ、ウシ、 シカ等
甲状腺C細胞癌/ACal	カルシトニン	L	A	甲状腺	(イヌ、ネコ)*
膵島アミロイドーシス/AIAPP	アミリン	L	A	膵島	ネコ
限局性心房アミロイド/AANF	心房性ナトリウム利尿ペプチド	L	A	心臓	
下垂体腫瘍随伴アミロイドーシス/APro	プロラクチン	L	A	下垂体	
(医原性アミロイドーシス)・ 膵アミロイドーシス/AIns	インスリン	L	A	皮膚(医原性)	デグー
(肺のアミロイドーシス)/ASPC	肺サーファクタントタンパク	L	A	肺	
皮膚アミロイドーシス/AGal7	ガレクチン7	L	A	皮膚	
皮膚アミロイドーシス/ACor	コルネオデスモシン	L	A	毛包	
(大動脈のアミロイドーシス)/AMed	ラクトアドヘジン	L	A	大動脈	
角膜アミロイドーシス/Aker	ケラトエピセリン	L	A	角膜	
角膜アミロイドーシス/ALac	ラクトフェリン	L	A	角膜	
アミロイド産生性歯原性腫瘍/AOAP	Odontogenic Ameloblast-associated Protein	L	A	歯原性腫瘍	(イヌ)*
精囊アミロイドーシス/ASem1	セメノゲリン1	L	A	精囊	
(医原性アミロイドーシス)/AEnf	エンフビルチド	L	A	皮膚(医原性)	
乳腺アミロイドーシス/ACas	カゼイン	L			ウシ

S: 全身性 L: 限局性 A: 後天性 H: 先天性 CNS: 中枢神経系 ANS: 自律神経系 PNS: 末梢神経系

*: 類似病変はみられるが原因タンパクは同定されていない。

出典: Nomenclature 2014: Amyloid fibril proteins and clinical classification of the amyloidosis. (Sipe J D et al. *Amyloid* 2014) を一部改変

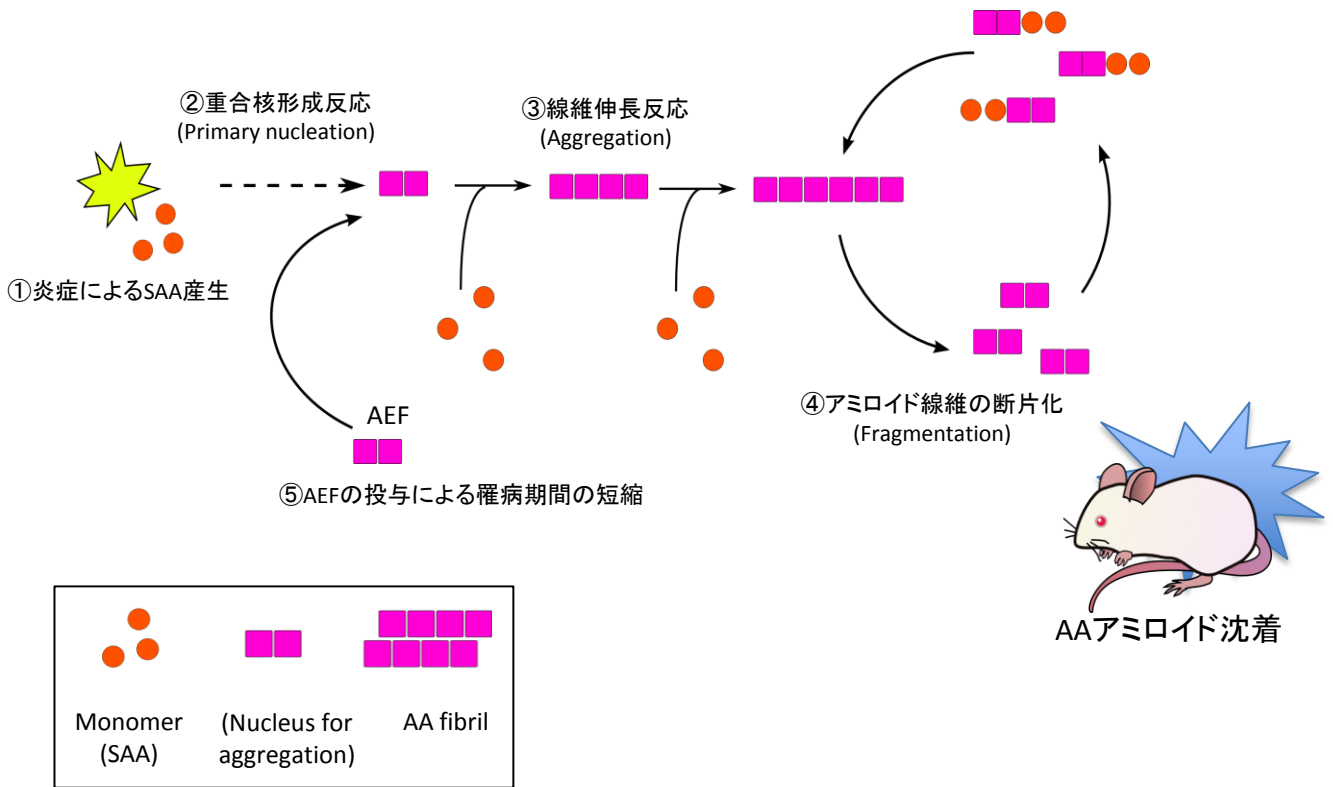


図1; 実験的AAアミロイドーシスの発症機序 (Seedingモデル)

- ①炎症の惹起によりSAA値が上昇する。
- ②長期間高SAA値を持続することによりSAAが構造変換し、アミロイド凝集の核となる重合核が形成される。
- ③SAAが重合核の両端と結合し、断端方向に重合することでアミロイド線維が伸長する。
- ④伸長したアミロイド線維の一部が断片化し、新たな重合核となることでアミロイド線維が増幅する。
- ⑤AEFが重合核の役割を担うことで、重合核形成反応が省略され、AAアミロイドーシス発症までの罹病期間が短縮される。

第1章

実験的AAアミロイドーシスモデルとしてのIL-1raKOマウスの有用性

序

関節リウマチは AA アミロイドーシスの基礎疾患として特に重要であり、Sasamoto らは近年の日本における AA アミロイドーシス患者の約 91%が関節リウマチに続発していると報告している⁷³。疫学的に関節リウマチの罹患期間が長い症例では AA アミロイドーシスの発症率が高く、投薬によるコントロール困難な関節リウマチ患者の大半は AA アミロイドーシスを発症する⁶³。また、近年では、関節リウマチの患者に対しては、AA アミロイドーシス発症を予防するために血中 SAA 濃度を正常値である 4 μ g/ml 以下に抑えることが重要であるとされている⁵⁸。AA アミロイドーシス患者の予後に対しても同様の基準が適応できることから、AA アミロイドーシスの発症および進行を抑えるうえで SAA 値のコントロールが重要である⁴¹。

常染色体劣性遺伝病である家族性地中海熱 (FMF) も AA アミロイドーシスの重要な基礎疾患の一つである⁵⁹。pyrin は pro-IL-1 β を IL-1 β へと変換する caspase-1 の制御因子の一つであり、FMF 患者の約 75%は pyrin をコードする MEFV 遺伝子に変異を有する⁵。MEFV 遺伝子には 10 の exon 領域が存在し、そのうち exon2 または exon10 領域に変異が生じることで pyrin 発現低下や機能障害が生じる¹⁰⁷。現在 FMF の原因として数十種類の pyrin 遺伝子変異が報告されている¹⁶。FMF では精神的ストレスや肉体疲労により IL-1 β 産生が亢進し、発熱や関節の疼痛、漿膜面での炎症などの発作を半日～3日の周期で繰り返す典型例と、発作の周期が不規則な非典型例とがあり、いずれの場合も発作による SAA 値の上昇が AA アミロイドーシスを併発する⁵。

硝酸銀、アゾカゼイン、Freund's 完全アジュバント等の投与により炎症を惹起し、人為的に SAA 値を高めることで実験的に AA アミロイドーシスを発症させることができる^{12, 68, 80}。マウスの SAA には凝集性の高い SAA1.1 と凝集性の低い SAA2.1、恒常的に産生される SAA4 とがあり²⁴、炎症の惹起により SAA1.1 と SAA2.1 の両アイソフォームが産生される⁵²。プロテインシーケンサーによ

る解析から、マウス AA アミロイドは全長型の SAA1.1 を主構成要素とするが、長さの異なる SAA1.1 部分鎖も検出される⁸⁴。実験的 AA アミロイドーシスでは、経験的に一定以上の血清 SAA 値を持続することが重要であるとされるが、マウスの SAA1.1 の生物学的半減期は 90 分～数時間と短いことから²⁷、多くの場合 SAA 値の維持のために定期的に炎症刺激が行われる^{12, 46}。炎症の惹起による SAA 値の変化量は用いるマウスの系統や炎症刺激の頻度によって異なることから^{4, 76}、AA アミロイドーシスを誘発する血清 SAA 値の基準については統一の見解が得られていない。

一方、Interleukin-1 (IL-1) は炎症や自己免疫疾患に関与する炎症性サイトカインの一つである⁹¹。IL-1 はマクロファージ、単球、関節滑膜細胞、血管内皮細胞など多様な細胞が産生する⁹¹。IL-1 ファミリーには IL-1 α 、IL-1 β とそれらの抑制因子である Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) が存在するが、これらはすべて IL-1 1 型受容体と結合する¹⁵。IL-1 1 型受容体は破骨細胞やマクロファージを含む多様な細胞に発現している。特に関節滑膜では恒常的に一定量の IL-1 α 、IL-1 β が産生されるが、Interleukin-1 receptor antagonist knockout (IL-1raKO) mouse は IL-1 β の産生比率が高く、IL-1 シグナルを受けて活性化した破骨細胞は metalloprotease や collagenase を産生し、関節潰瘍を引き起こす^{30, 32}。BALB/c を背景に持つ IL-1raKO は生後約 5 週齢から四肢関節において関節リウマチ様の関節炎を自然発症し、12 週齢にはすべての個体で関節の腫脹や変形を認める²⁸。

本章では AA アミロイドーシスと関節リウマチ、およびそれらの発症における IL-1 β の役割に注目し、AA アミロイドーシスモデルとしての IL-1raKO の有用性を検討した。

材料と方法

動物

実験には 8-12 週齢の IL-1raKO マウスと対照群として同週齢の BALB/c マウスを用いた。マウスには自由給水させ、ペレット状固形飼料(MS 飼料、オリエンタル酵母)を給餌した。設定温度 23 度±3 度、設定湿度 55%±15%、明期 14 時間 (照明午前 8 : 00~午後 10 : 00)、暗期 10 時間に維持された動物室にて飼育した。

実験デザインと群分け

本章は 2 つの実験で構成される。実験 1 では IL-1raKO および BALB/c における AA アミロイドーシス発症の条件について検討した。実験 1 の結果を受け、実験 2 では同様の手技により両マウスに AA アミロイドーシスを誘発し、誘発処置から 60 日目まで定期的に剖検を行うことで AA アミロイド沈着の程度と血清 SAA 値の変化を経時的に観察した。全ての実験は東京大学大学院農学生命科学研究科実験動物委員会及び東京大学バイオサイエンス委員会遺伝子組換え実験等専門委員会の承認を受け、東京大学実験動物規約にもとづいて実施した。

実験 1 ; AA アミロイドーシスの誘発

12 週齢の IL-1raKO マウス(n=27) および BALB/c マウス (n=21) を、投与する AEF の種類 (肝臓乳剤、AA アミロイド抽出物および AEF なし) と炎症刺激の有無に基づき各群 n=3-9 となるように 10 群に振り分けた (表 1)。マウスに 500 μ g の AEF を腹腔内投与し、同時に 500 μ l の 2%硝酸銀水溶液を皮下投与することで AA アミロイドーシスを誘発した。実験開始から 21 日目にイソフルラン深麻酔下にて右心室より全採血を行い、安楽死処置後、肝臓、脾臓、腎臓、心臓、副腎、甲状腺、小腸回盲部を採材し、10%中性緩衝ホルマリンにて固定した。常法に従い、4 μ m 厚のホルマリン固定パラフィン切片を作製し、へ

マトキシリン・エオジン (HE) 染色、コンゴレッド染色、抗マウス SAA1.1 抗体 (1:100, R&D Systems, Minneapolis, MN) による免疫染色を行い、AA アミロイドの分布および沈着量を評価した。沈着各臓器における AA アミロイド沈着量の評価には後述する Amyloid Index (AI) と脾臓におけるアミロイド沈着領域面積を用いた。

実験 2 ; IL-1raKO における AA アミロイド沈着と血清 SAA 値の経時的変化
8 週齢の IL-1raKO マウス (n=42) および BALB/c マウス (n=42) に、500 μ g の肝臓乳剤および 500 μ l の 2%硝酸銀水溶液を投与して AA アミロイドーシスを誘発した。誘発処置から、2 時間 30 分、4 時間、1, 2, 5, 10, 15, 20, 35, 45, 50, 60 日目に 3-6 個体のマウスを安楽死処置し、剖検した。実験 1 と同様、肝臓、脾臓、腎臓、心臓、副腎、甲状腺、小腸回盲部を採材し、10%中性緩衝ホルマリンにて固定した。常法に従い、4 μ m 厚のホルマリン固定パラフィン切片を製作し、HE 染色、コンゴレッド染色、抗マウス SAA1.1 抗体 (1:100, R&D Systems)を用いた免疫染色を行い、AA アミロイドの分布および沈着量を評価した。また、剖検時に心臓より採取した血液から血清を分離し、SAA 濃度を測定した。

AEF の精製

自治医大、山田俊幸教授より提供された AEF 500 μ l を 3 匹の IL-1raKO に腹腔内投与し、同時に 2%硝酸銀水溶液 500 μ l を皮下投与した。投与から 2 週間後、これらの個体をイソフルラン深麻酔下にて全採血し、安楽死処置後、肝臓を採材した。肝臓乳剤および肝臓からの AA アミロイド抽出物を AEF とした。肝臓乳剤は、1g の肝臓に 10ml の 0.01M PBS を加え、氷冷下にてホモジナイザーを用い、各 30 秒間 3 回破碎した。AA アミロイド抽出物は Pras らの方法⁶⁷に改良を加えた以下の手法を用いて精製した。1g の肝臓に 10ml の生理食塩水を加

え、氷冷下にてホモジナイザーを用い、各 30 秒間 3 回破碎した。懸濁液は超遠心機にて 4°C、40,000g、20 分間の条件にて遠心した後、上清を抜去した。得られた沈渣に 10ml の生理食塩水を加え、再度同様の条件にてホモジナイズした。こうして、遠心後の上清の 280nm 波長光の吸光度が 0.075 以下になるまでホモジナイズと超遠心を繰り返した。得られた沈渣は 10ml の蒸留水を加えてホモジナイズし、懸濁状態で 4°C 条件下にて一晚静置した。翌日、同懸濁液を超遠心機にて 4°C、30,000g、20 分間の条件にて遠心し、上清を回収した（分画 1）。沈渣は再度 10ml の蒸留水とともに懸濁し、同様の条件にて超遠心し、上清を回収した（分画 2）。分画 1 と 2 を合わせ、超遠心機にて 4°C、45,000g、1 時間の条件にて遠心し、この沈渣を蒸留水にて総蛋白量が 1mg/ml になるように希釈し、これを AA アミロイド抽出物とした。肝臓乳剤および AA アミロイド抽出物は使用時まで -80°C にて凍結保存した。

ウェスタンブロット

肝臓乳剤および AA アミロイド抽出物は 160g、5 分間遠心し、上清と等量の 5% の 2-メルカプトエタノール加 Laemmler サンプルバッファーとともに 99°C で 5 分間加熱処理した。サンプルは 15% ポリアクリルアミドゲルを用い、室温、20mA 定電圧の条件下にて 90 分間泳動した後、あらかじめメタノールにて親水処理した PVDF 膜に、室温、20V 定電圧の条件下にて 60 分間転写した。転写後、膜を TBST (0.05% Tween-20 および 137mM NaCl を含む 20mM Tris-HCl 緩衝液、pH7.5) にて 10 分 3 回洗浄し、1% スキムミルクを含む TBST にて 1 時間ブロッキングを行った。ブロッキング後、膜は抗マウス SAA1.1 抗体 (R&D Systems, 1:5000) と 4°C にて浸透しながら一晚反応させた。反応後、膜を TBST にて 10 分 3 回洗浄し、HRP 標識抗ヤギ IgG 二次抗体 (1:5000, GE Healthcare, Fairfield, CT) と室温にて浸透しながら 1 時間反応させた。反応後、膜を TBST にて 10 分 3 回洗浄し、ECL Prime 化学発光試薬 (GE Healthcare) と反応さ

せた後、ChemiDoc XRS+ System (Bio-rad Life Science, Hercules, CA) および画像解析ソフト Image Lab (Bio-rad) により陽性バンドを検出した。

組織検索および AI による AA アミロイドの半定量的評価

常法に従い、4 μ m 厚のホルマリン固定パラフィン切片を作製し、HE 染色およびコンゴレッド染色を行った。アミロイド沈着量の評価はコンゴレッド染色を行った切片を偏光顕微鏡下で観察し、各臓器における緑黄色二重屈折性を有するアミロイド沈着量を以下の 4 段階でスコア化した (0; 沈着なし 1; 軽度の沈着 2; 中等度の沈着 3; 高度の沈着)。検索を行った 7 つの臓器におけるスコアの総和を AI とした。

アミロイド沈着面積による定量

脾臓におけるアミロイド沈着量をアミロイド沈着面積によって評価した。抗マウス SAA1.1 抗体 (R&D Systems) とビオチン標識抗ヤギ IgG 抗体 (1:400, BETHYL) を用いた LSAB 法にて免疫染色を行ったのち、顕微鏡下にて 1 個体あたりランダムに 10 視野を撮影し、視野中に占める陽性部分の比率を画像解析ソフト Image J を用いて定量化した。

SAA 濃度測定

血清中の SAA 濃度はメーカーのプロトコルに従い、市販のサンドイッチ ELISA キット (BioSource International, Waltham, MA) を用いて定量した。

データ解析

AI、アミロイド沈着面積、および SAA 濃度の検定には Student の t 検定を用い、 $p < 0.05$ のとき統計的に有意であると判断した。

結果

ウェスタンブロット

AEF および硝酸銀水溶液を投与したマウスの肝臓乳剤中にはマウス SAA1.1 陽性の 12.6kDa, 13.7kDa のバンド以外にも多量の夾雑蛋白が含まれていた。肝臓 AA アミロイド抽出物には 13.4kDa の分画が最も多く存在していた。陰性対照の未処置 IL-1raKO から同様の方法で精製した乳剤には上記のバンドは含まれていなかった (図 1)。

実験 1 ; AA アミロイドーシスの誘発

両系統において AEF および硝酸銀水溶液を投与した全てのマウス (IL-1raKO: n=15, BALB/c: n=12) で AA アミロイド沈着を認めた。AEF 単体、および硝酸銀水溶液単体を投与したマウスには AA アミロイド沈着は認められなかった (表 1)。

AA アミロイドは IL-1raKO では脾臓、肝臓、腎臓、小腸、心臓、甲状腺および副腎に、BALB/c では脾臓、肝臓、腎臓、小腸および甲状腺に沈着した (図 2)。組織学的には、脾臓濾胞周囲、肝臓ディッセ腔、腎臓髄質、小腸の粘膜下織および絨毛先端部の粘膜固有層、甲状腺濾胞周囲、副腎皮髄境界領域へのアミロイド沈着が顕著であった。これらのアミロイドはコンゴレッド染色偏光顕微鏡下にて緑黄色二重屈折光を呈し、免疫染色にて SAA1.1 陽性であった。

IL-1raKO および BALB/c の両系統間の比較で AA アミロイドーシスの発症率には差は認められなかったものの、AI は肝臓乳剤投与群 (グループ 1: 10.22 ± 0.52 、グループ 6: 2.50 ± 0.61)、AA アミロイド抽出物投与群 (グループ 2: 10.17 ± 0.72 、グループ 7: 3.83 ± 0.72) において IL-1raKO は BALB/c よりも有意に高値であった (肝臓乳剤投与群; $p=0.0000007$ 、AA アミロイド抽出物投与群; $p=0.002$)。脾臓濾胞周囲におけるアミロイド沈着面積は、肝臓乳剤投与群 (グループ 1: 4.25 ± 1.94 、グループ 6: 1.80 ± 1.07) においてのみ IL-1raKO は

BALB/c よりも有意に高値であった ($p=0.02$)。

実験 2 ; IL-1raKO における AA アミロイド沈着と血清 SAA 値の経時的変化
8 週齢の IL-1raKO は平常時において約 150 μ g/ml と BALB/c (0-10 μ g/ml) の約 15 倍の SAA 値を示した。硝酸銀処置による SAA 値の上昇は BALB/c では処置 150 分後、IL-1raKO では 4 時間後から認められ、翌日にピークに達した (IL-1raKO: 10,527 \pm 2,079 μ g/ml, BALB/c: 6,600 \pm 428 μ g/ml)。BALB/c では SAA 値は誘発処置の 5 日後から急速に低下したが、IL-1raKO では比較的緩やかに低下し、20 日目においても高値を維持した。IL-1raKO は誘発処置前、処置後 5, 20, 35, 50, 60 日目において BALB/c と比較して有意に高い SAA 値を呈した (表 2、図 3)。

AA アミロイド沈着は、いずれの系統のマウスにおいても誘発処置の 2 日後から認められた。初期の沈着は脾臓、肝臓、小腸回盲部に始まり、徐々に腎臓、甲状腺など全身へと波及した。AI は 2 日目以降徐々に増加し、20 日目にピークに達し、その後 45 日目にかけて徐々に減少した。50 日以降の AA アミロイド沈着の程度には個体差がみられ、約半数の BALB/c では沈着した AA アミロイドの消失を認めた。10 日目以降、IL-1raKO では BALB/c よりも多量の AA アミロイド沈着を認めた。AI を用いた AA アミロイド沈着量の比較では、誘発処置後 15, 20, 45, 50, 60 日目において IL-1raKO は BALB/c よりも有意に高値を示した。IL-1raKO では 20 日目以降も AI は高値を維持したのに対し、BALB/c では 60 日目には AA アミロイドはほぼ消失した。IL-1raKO では BALB/c と比較し、全身臓器での AA アミロイド沈着を認めた (図 4-5)。

考察

IL-1raKO は恒常的に約 150 μ g/ml (BALB/c の約 15 倍) の高 SAA 値を示すものの、AEF のみの投与では AA アミロイドは沈着しなかった。また、硝酸銀

のみを投与したマウスでは SAA 値の上昇を認めたものの、AA アミロイド沈着は認められなかった。以上の結果より、AA アミロイドーシス発症には硝酸銀投与に起因する急激な血清 SAA 値の上昇と AEF の両者が必要であることが示された。また、マウスの週齢、性別、関節炎の有無等は病変形成に影響しなかった。

Westermarck らの提唱した seeding モデルでは、AEF 中の AA アミロイド線維の断片が核となり、その断端にさらに SAA が重合することで AA アミロイド線維が伸長していくと想定されている⁹⁹。AEF 中には AA アミロイド線維の凝集に関与する様々な成分が含まれているため、実際に生体内において AEF がどのように AA アミロイドの凝集に関与するかは依然として解明されていない。例えば、AA アミロイドーシスを発症したマウスの末梢血中の単球や血清など、AA アミロイド線維以外の血液中物質にも AEF 活性があること⁹⁴、AEF から分離した ubiquitin¹が *in vitro* での AA アミロイド線維凝集を促進すること、また、apolipoprotein E⁷⁴や amyloid P component⁸¹、ヘパラン硫酸⁶⁰⁻⁶¹など AA アミロイド線維と共沈着する物質は、AA アミロイドの線維の安定性を高める作用があることなどが報告されている。本研究で AEF として用いた AA アミロイド抽出物は SAA のモノマーに相当する分子量 14kDa 前後の分子を多く含んでいたのに対し、肝臓乳剤では夾雑物が多かった。こうした背景から、AEF の精製法や組成の大きく異なる二種類の AEF を用いた場合、その作用が異なることが想定されたが、作出された病変に有意な違いは認められなかった。マウス肝臓から抽出した AA アミロイド抽出物を IL-1raKO に AEF として投与した場合、数 pg でも AA 沈着を誘発することが可能である。また、AA アミロイド抽出物の投与量が 1 μ g 未満の場合では、AEF 投与量とアミロイド沈着量との間には弱い正の相関が認められたが、1 μ g 以上の AEF を投与した場合はアミロイド沈着の程度に差は認められなかった（データ非掲載）。これは過去の報告と一致するものであり、作出される病変に関しては、十分量の AEF を投与することで高い再

現性が得られることを示している。

再現性の高い実験的アミロイドーシスモデルとして、炎症刺激を用いた急性発症モデル^{12, 80}と遺伝子改変マウスを用いたモデル^{78, 84}の2種類が知られている。いずれのモデルも血清中 SAA 濃度を高めることで AA アミロイド沈着を誘発する。硝酸銀水溶液を用いた急性発症モデルは、用いたマウスの系統による反応性の違いが少なく、一過性の SAA 濃度の上昇を容易に再現できる一方で、SAA 濃度の維持には不向きであることから、AA アミロイド沈着の程度はカゼインや Freund's 完全アジュバントを用いた実験系よりも軽度であることが知られている。一方、ヒト IL-6 遺伝子導入マウスに代表される遺伝子改変マウスモデルでは恒常的に高い SAA 値 (400-4000 μ g/ml) を示し、生後 3 ヶ月から AA アミロイドーシスを自然発症する。同マウスは約 9 ヶ月齢で腎髄質への重度のアミロイド沈着により腎不全を併発し⁸⁴、死亡する。ヒト IL-6 遺伝子導入マウスに AEF を投与した場合、AEF 投与から 6 週間前後で重度の AA アミロイド沈着を呈し、死亡する³⁷。これに対し、著者らは IL-1raKO を 2 年以上飼育したにもかかわらず、AA アミロイドーシスを自然発症した個体は認められなかった。SAA の産生には、TNF- α によって誘導される NF- κ B/p63 を介する経路と IL-6 によって誘導される STAT3 を介した経路とが存在する。Hoshizaki らは SAA 産生には STAT3 の活性化が必須であり、NF- κ B/p63 の活性は SAA 産生を増強する補助的な役割を担っていると推察している²³。IL-1 β は IL-6 よりも上流に位置するサイトカインであり、主に TNF- α の産生を誘導し、間接的に IL-6 の産生を亢進する⁵⁶。すなわち、IL-1raKO では両方の経路が間接的に活性化され、SAA を恒常的に産生するものと考えられる。これに対し、IL-6 刺激は単体で SAA 産生を強く誘導する²²。したがって、ヒト IL-6 遺伝子導入マウスは IL-1raKO よりも高い SAA 値を維持するため、AA アミロイドーシスを自然発症すると考えられる。

IL-1raKO、BALB/c のいずれの系統においても、AA アミロイド沈着は誘発

処置後 2 日目より認められた。Kennel らは、 ^{125}I で標識した AEF を経静脈内投与すると 15 分以内に脾臓濾胞辺縁部に到達し、4 時間以内に細胞内に取り込まれて ^{125}I との結合を失うことを報告している³⁷。この事象は貪食能を有するマクロファージを選択的に排除することで抑制されることから、AA アミロイド凝集の初期反応にはマクロファージによる AEF の貪食が関与しているものと思われる。マクロファージによる AEF の取り込み機構は不明だが、単球由来のマクロファージは CD36 受容体を介して急性炎症期の SAA を HDL-SAA 複合体の形で取り込むことが *in vitro* の研究で解明されたことから²、AEF に含まれる AA アミロイドに関しても類似の機構によってマクロファージに取り込まれるものと推察される。本研究では AEF を腹腔内投与していることから、投与された AEF は腹腔内マクロファージに取り込まれたと思われる。取り込まれた AEF が初期の AA アミロイド沈着部である脾臓濾胞周囲や肝ディッセ腔に達するまでの機序に関してはさらなる検索が必要である。

実験開始から 2 日目までの血清 SAA 値は IL-1raKO と BALB/c との間に有意差は認められず、10 日目までは両系統における AI にも有意差は認められなかった。実験開始から 10 日目以降、IL-1raKO では AA アミロイドが肝臓、脾臓以外の複数の臓器にも広く沈着し、15 日目以降 BALB/c よりも高い AI を示した。IL-1raKO は BALB/c よりも SAA の基礎値が高いことに加え、SAA 値の低下もより緩やかであった。したがって、IL-1raKO は AA アミロイド沈着がピークとなる処置後 20 日目まで一定以上の血中 SAA 値を維持することで、自然例の AA アミロイドーシスに類似した全身臓器への AA アミロイド沈着を引き起こしていると推察された。

IL-1raKO を用いた AA アミロイドーシスモデルは、急性発症モデルと遺伝子改変マウスモデルの特徴を併せ持ち、簡便な手技で自然例の AA アミロイドーシスに近い病態を再現できることから、AA アミロイドーシス研究の有用なモデルであると考えられた。

要約

AA アミロイドーシスはマウスに硝酸銀やアゾカゼイン、FCA を皮下投与することで急性炎症を惹起し、人為的に血中 SAA 濃度を高めることで誘発することが可能である。一方、実験的に作出された AA アミロイドーシスでは全身性の重篤なアミロイド沈着を伴う自然例の病態を忠実に再現することは極めて困難である。Interleukin-1 receptor antagonist knock out (IL-1raKO) マウスはヒトの AA アミロイドーシスの基礎疾患の一つである関節リウマチ様の関節炎を自然発症することから、このマウスに対し AA アミロイドーシスを誘発し、病態モデルとしての有用性を検討した。IL-1raKO および BALB/c に硝酸銀水溶液と AA アミロイド含有肝臓乳剤を投与し、AA アミロイドーシスを誘発した。誘発処置から 60 日間の AA アミロイド沈着量およびその分布、SAA 値の経時変化を BALB/c と比較した。IL-1raKO、BALB/c ともに誘発処置後 2 日目より脾臓、肝臓、小腸回盲部に AA アミロイド沈着を認めた。沈着量は 20 日目に最大となり、IL-1raKO ではその後も高値を維持したのに対し、BALB/c では 20 日目以降著しく低下し、60 日以内にアミロイドはほぼ消失した。IL-1raKO においても、35 日目に脾臓や肝臓のアミロイド沈着量の低下を認めたが、同時期から腎臓、甲状腺、副腎等多数の臓器におけるアミロイド沈着量が増加した。IL-1raKO では全身臓器に広くアミロイドが沈着し、誘発処置から 15, 20, 45, 50, 60 日目において沈着量は BALB/c よりも有意に高値を示した。実験開始から 5 日目以降、IL-1raKO の SAA 値は BALB/c よりも有意に高値を示した。IL-1raKO は BALB/c に比べ SAA の基礎値が高く、SAA 値の低下も緩やかであったことから、血中 SAA 値が長期間高値を示し、BALB/c では再現困難であった全身性の AA アミロイドーシスの病態を再現できることが示された。

表1: 実験1、IL-1raKOマウスおよびBALB/cを用いたAAアミロイドーシスの発症

群	系統	AEF	炎症刺激	発症率 (%)	AI ± SE	AA沈着陽性面積率(%) ± SE
1	IL-1raKO	肝臓乳剤	AgNO ₃	9/9 (100%)	10.22 ± 0.52**	4.25 ± 1.94*
2	IL-1raKO	抽出物	AgNO ₃	6/6 (100%)	10.17 ± 0.72**	3.55 ± 0.99
3	IL-1raKO	肝臓乳剤	無し	0/3 (0%)	0	0
4	IL-1raKO	抽出物	無し	0/3 (0%)	0	0
5	IL-1raKO	無し	AgNO ₃	0/6 (0%)	0	0
6	BALB/c	肝臓乳剤	AgNO ₃	6/6 (100%)	2.50 ± 0.61	1.80 ± 1.07
7	BALB/c	抽出物	AgNO ₃	6/6 (100%)	3.83 ± 0.72	2.39 ± 1.62
8	BALB/c	肝臓乳剤	無し	0/3 (0%)	0	0
9	BALB/c	抽出物	無し	0/3 (0%)	0	0
10	BALB/c	無し	AgNO ₃	0/3 (0%)	0	0

Statistical analysis was performed using Student's *t*-test. *, *p*<0.05 **; *p*<0.01 significantly different from the value of corresponding BALB/c group.

表2: 実験2、IL-1raKOおよびBALB/cにおけるAAアミロイド沈着と血清SAA値の経時変化

系統	実験期間 (時/日)	匹数	発症率 (%)	AI±SE	血清SAA 値 ±SE (µg/ml)
IL-1raKO	0 (no treatment)	3	0/3 (0%)	0	127±22**
	150min	3	0/3 (0%)	0	168±25
	4h	3	0/3 (0%)	0	716±150
	1	3	0/3 (0%)	0	10527±2079
	2	3	3/3 (100%)	2.33±0.33	4580±228
	5	3	3/3 (100%)	2.67±1.36	1383±273**
	10	3	3/3 (100%)	7.67±1.51	179±14
	15	3	3/3 (100%)	9.00±0.47**	215±68
	20	3	3/3 (100%)	10.67±0.72*	250±40**
	35	3	3/3 (100%)	8.33±1.51	73±19*
	45	3	3/3 (100%)	7.00±0.00**	95±41
	50	3	3/3 (100%)	8.33±1.52*	66±19**
	60	6	6/6 (100%)	10.50±1.17**	90±18**
BALB/c	0 (no treatment)	3	0/3 (0%)	0	9±2
	150min	3	0/3 (0%)	0	141±13
	4h	3	0/3 (0%)	0	591±109
	1	3	0/3 (0%)	0	6600±428
	2	3	3/3 (100%)	2.00±0.82	5180±719
	5	3	3/3 (100%)	5.67±1.52	366±57
	10	3	3/3 (100%)	6.00±0.82	98±72
	15	3	3/3 (100%)	5.00±0.00	40±24
	20	3	3/3 (100%)	6.33±0.72	6±1
	35	3	3/3 (100%)	4.00±0.00	5±0
	45	3	1/3 (33%)	0.33±0.27	2±1
	50	3	3/3 (100%)	4.33±0.27	6±3
	60	6	4/6 (67%)	1.00±0.41	3±0

Statistical analysis was performed using Student's *t*-test. *, $p<0.05$ **, $p<0.01$ significantly different from the corresponding value of BALB/c group.

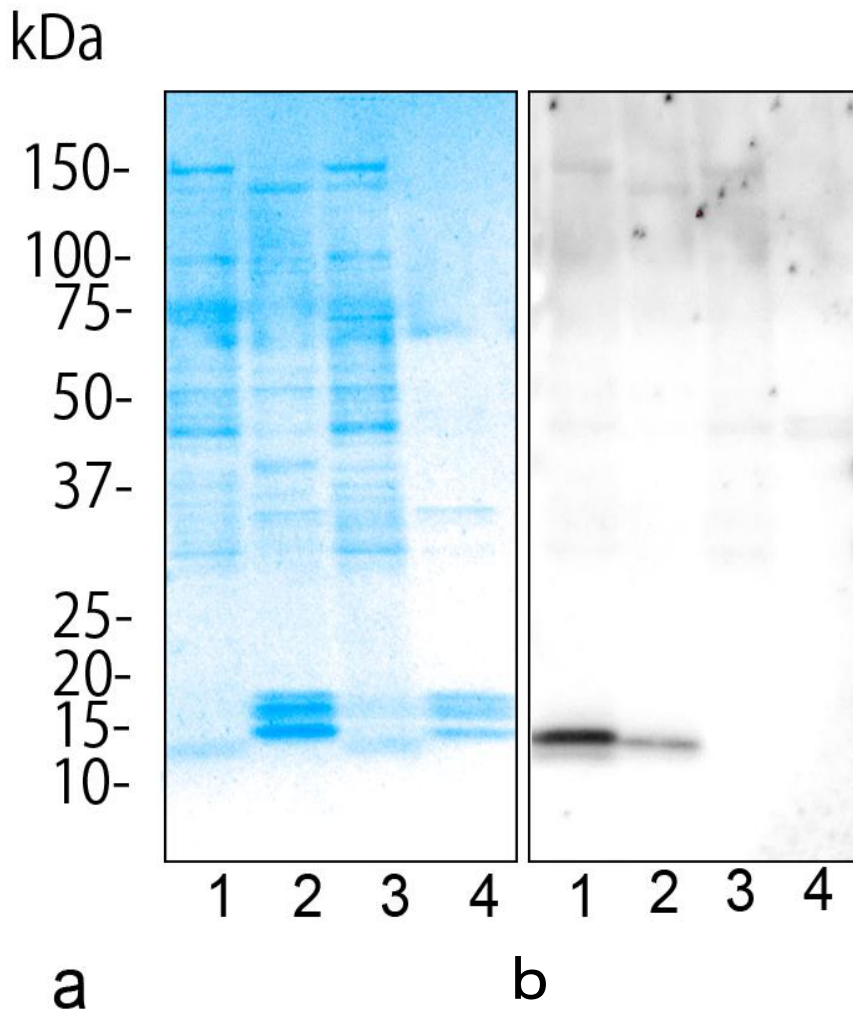


図1 AAアミロイド含有肝臓乳剤およびAAアミロイド抽出物のウェスタンブロット

a) CBB染色 b-c) 抗マウスSAA1.1を用いた染色

レーン1: AAアミロイドーシスマウス肝臓乳剤

レーン2: AAアミロイドーシスマウス抽出物

レーン3: 未処置マウス肝臓乳剤

レーン4: 未処置マウス抽出物

AAアミロイドーシスマウス肝臓乳剤では12.6kDa、13.7kDaの位置に陽性のバンドを、AAアミロイドーシスマウス抽出物では13.6kDaの位置に陽性のバンドを認める。これらのバンドは未処置マウスの肝臓乳剤および抽出物では認められない。

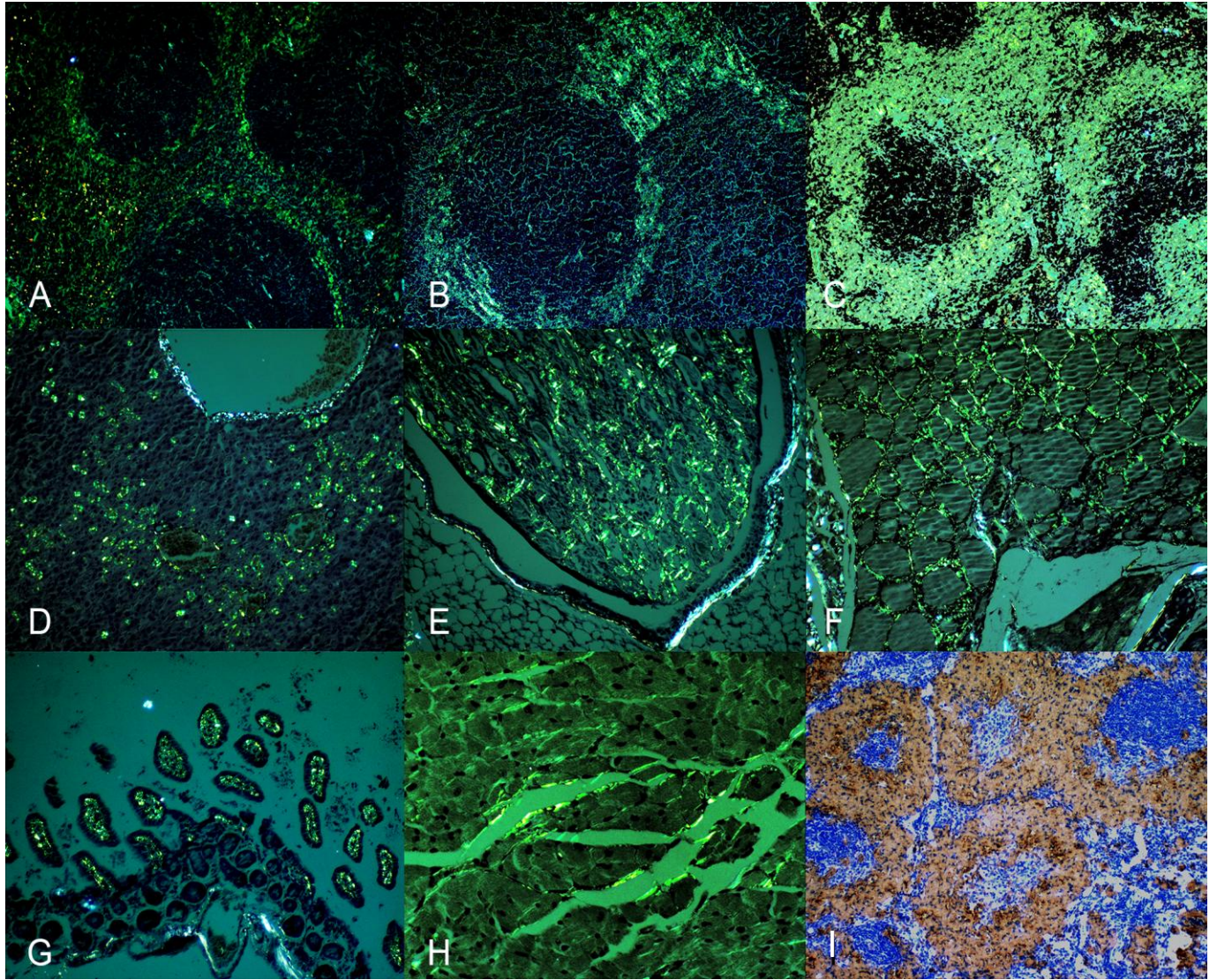


図2 A-H; コンゴレッド染色(偏光観察)、I; 抗マウスSAA1.1抗体を用いた免疫染色(対比染色はヘマトキシリン)

A-C, I; 脾臓濾胞周囲に沈着したアミロイド。A: Score 1, B: Score 2, C: Score 3。

D; 肝臓 E; 腎臓 F; 甲状腺 G; 小腸回盲部粘膜 H; 心臓

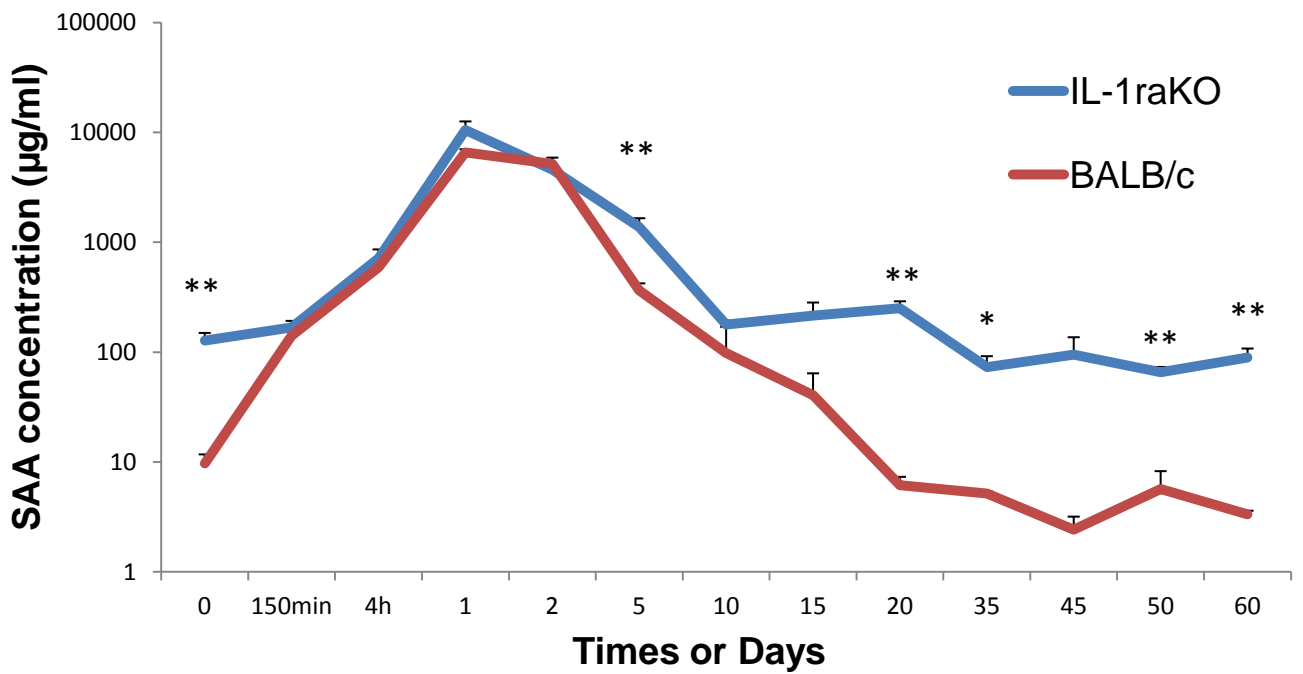


図3 IL-1raKOおよびBALB/cにおける血清SAA値の経時変化
 IL-1raKOは硝酸銀処置前,処置後5, 20, 35, 50, 60日目においてBALB/cよりも有意に高いSAA値を示した。
 **:p<0.01 *;p<0.05

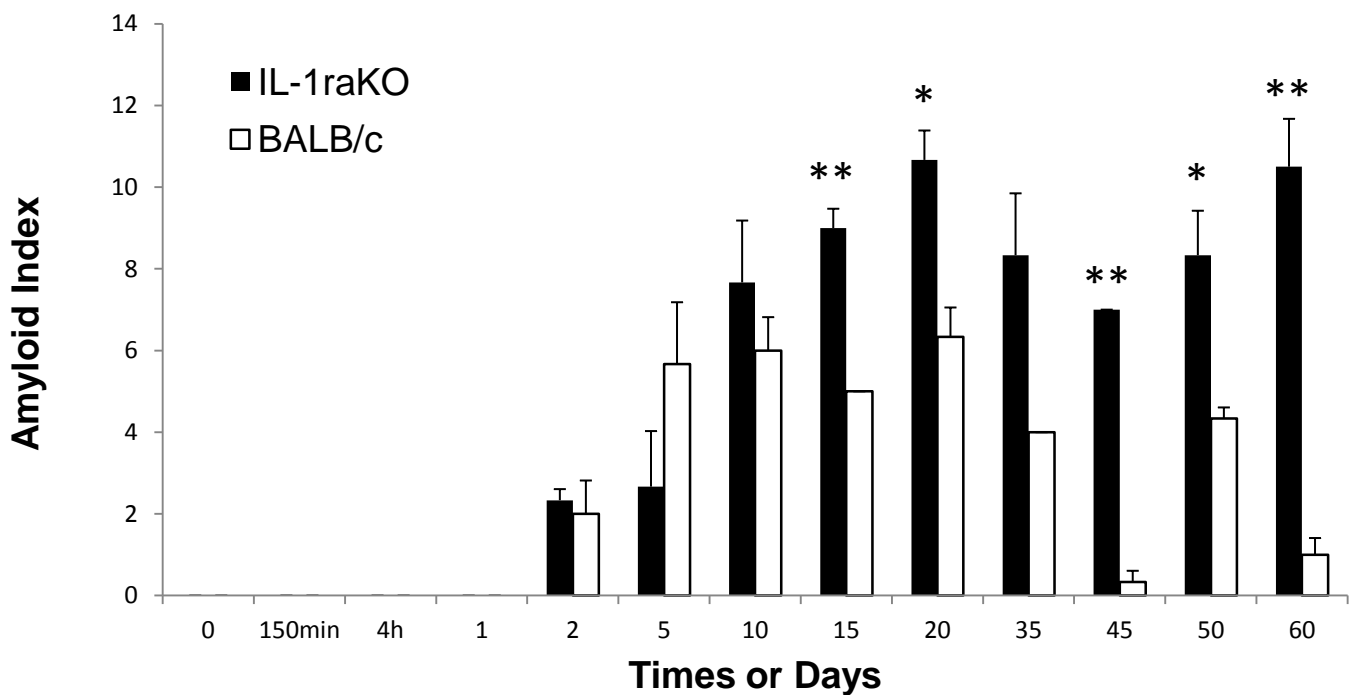


図4 IL-1raKOおよびBALB/cにおけるアミロイド沈着量(AI)の経時変化。
 アミロイド沈着は誘発処置後2日目から認められる。IL-1raKOにおけるアミロイド沈着量は処置後15, 20, 45, 50, 60日目においてBALB/cよりも有意に高値を示した。
 **; $p < 0.01$ *; $p < 0.05$

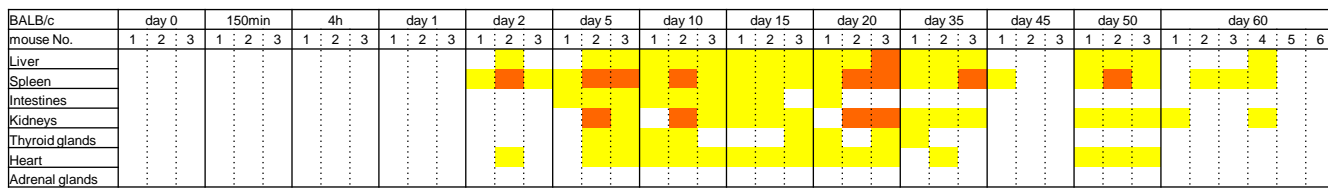
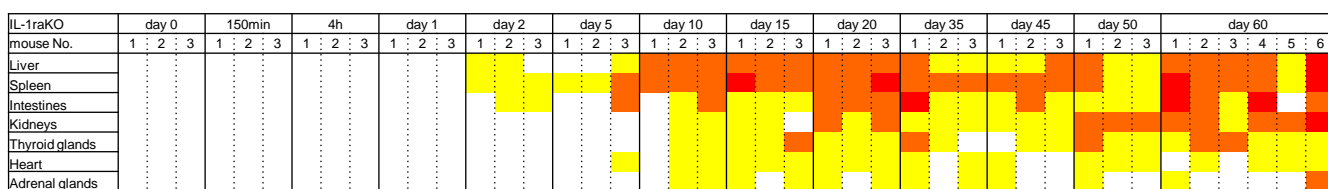





図5 IL-1raKOおよびBALB/cにおけるアミロイドの分布とその経時変化(ヒートマップ)。

a; IL-1raKO、b; BALB/c。

行;上から順に肝臓、脾臓、小腸、腎臓、甲状腺、心臓、副腎。

列; 各個体における臓器別アミロイド沈着スコア。

IL-1raKOでは多数の臓器に重度のアミロイド沈着を認めるのに対し、BALB/cでは35日目以降、アミロイド沈着スコアは顕著に低下する。

 ; Score 1
  ; Score 2
  ; Score 3

第 2 章

IL-1raKO マウスにおける AA アミロイドの分解と再沈着の機序

序

Ram らはカゼインを用いた実験的マウス AA アミロイドーシスにおいて、カゼイン投与を中止すると脾臓や肝臓に沈着したアミロイドが消失することを報告した⁶⁸。また、Skinner らはカゼインと AEF とを併用したマウス AA アミロイドーシスモデルにおいて、沈着した AA アミロイドの分解は肝臓や脾臓では比較的早期から認められる一方で、腎臓に沈着したアミロイドはゆるやかに分解されることを示した⁸⁰。また、肝臓や脾臓に沈着したアミロイドが分解された後に腎糸球体へのアミロイド沈着が起こることも報告している。自然例の AA アミロイドーシスでは沈着したアミロイドを分解・除去する有効な治療法はなく⁸⁹、重合した AA アミロイド線維は酵素処理や化学処理に対し強い抵抗性を示すことから⁶⁵、AA アミロイドの分解は実験的 AA アミロイドーシスに特有の現象であると考えられていた。しかしながら、近年の抗サイトカイン療法の発展により、SAA 値を正常レベル (4 μ g/ml 以下) に抑えることで、沈着した AA アミロイドが分解されることがヒトの AA アミロイドーシスにおいても確認され、生体内において AA アミロイドを分解する機構が存在することが明らかとなった⁴¹。

実験的 AA アミロイドーシスにおいて沈着した AA アミロイド周囲にアミロイドを貪食したマクロファージが散見されること、また、AL アミロイドーシスでもアミロイドを貪食した異物巨細胞が確認されることから^{64, 101}、古くからアミロイドの分解機構とマクロファージなどの貪食細胞との関連が注目されている。Nyströme らは実験的 AA アミロイドーシスにおいて AA アミロイドに対する自己抗体価の上昇を認め、マクロファージの貪食によるアミロイド分解機構には液性免疫が関与していると考察した⁶²。一方、Sponarova らは B 細胞欠損マウス (JH^{-/-}) や補体欠損マウス (C3C4^{-/-}) においても AA アミロイド周囲にマクロファージの集簇を認め、野生型 (WT) マウスと同様に分解されることを確かめた⁸⁶。しかしながら、AA アミロイドの分解機構には依然として解明されていな

い点が多い。

こうした報告の中で、AA アミロイド分解過程において炎症刺激を追加すると、より重度の AA アミロイド再沈着がおこることが報告された^{76, 86}。また、Nyströme らは沈着した AA アミロイドが完全に分解されたマウスは、再度炎症刺激を与えることで重篤な AA アミロイド沈着を再発することを見出した⁶²。再沈着では沈着がより重度になるばかりでなく、AA アミロイドの分布も急性発症モデルと異なり、腎糸球体など肝臓・脾臓以外の臓器でも広範なアミロイド沈着を認めるなどの特徴を有していた。第 1 章では IL-1raKO が全身性の AA アミロイドーシスの病態を再現できることを示した。また、肝臓や脾臓以外の臓器へのアミロイド沈着は血中の SAA 値低下後に進行することから、生体内における AA アミロイドの動態は、血中の SAA 値の変化のみでは説明できないと考えた。

アルツハイマー病や膵島アミロイドーシスなどの病態にはアミロイド前駆蛋白とアミロイド線維との中間体であるオリゴマーやプロトフィブリルが深く関与していることが明らかとなっている^{3, 21, 72}。これらのオリゴマーは強い細胞毒性を示すことから^{8, 18}、アミロイド沈着臓器における機能障害はアミロイドによる物理的圧排よりもオリゴマーの細胞毒性の影響を強く受けている可能性が示唆されている。一方で、AA アミロイドーシスにおいてアミロイド沈着臓器の細胞死が問題となることは稀であり、SAA オリゴマーに関する報告はこれまであまりない^{66, 88}。本章では IL-1raKO の AA アミロイド分解過程における組織学的変化と血清 SAA オリゴマー量の変化を調べ、AA アミロイドの分解機序について考察した。また、炎症刺激を追加することで、アミロイドを再沈着させ、その病態を解析し、生体内における AA アミロイド線維の形成機序について考察した。

材料と方法

動物

マウスには自由給水させ、ペレット状固形飼料(MS 飼料、オリエンタル酵母)を給餌した。設定温度 23 度±3 度、設定湿度 55%±15%、明期 14 時間 (照明午前 8 : 00~午後 10 : 00)、暗期 10 時間に維持された動物室にて飼育した。

実験デザイン

本章では新たに 8 週齢の IL-1raKO を用い、以下の 3 つの実験を行った。各実験における条件設定および個体数の振り分けは表 1-2 に記した通りである。全ての実験は東京大学大学院農学生命科学研究科実験動物委員会及び東京大学バイオサイエンス委員会遺伝子組換え実験等専門委員会の承認を受け、東京大学実験動物規約にもとづいて実施した。

実験 1 : 単回炎症刺激による AA アミロイド沈着パターンおよび血清中の SAA オリゴマーの経時変化

第 1 章実験 2 で採材した肝臓、脾臓、腎臓、心臓、副腎、甲状腺、小腸回盲部について (単回刺激群)、常法に従い、4 μ m 厚のホルマリン固定パラフィン切片を作製し、抗マウス SAA1.1 抗体を用いた免疫染色を行った後、AA アミロイドの沈着パターンを臓器ごとに比較した。

また、剖検時に採材した血清中の SAA オリゴマーをウェスタンブロットおよびドットブロットによって定量した。

実験 2 : AA アミロイドの再沈着

500 μ g の AA アミロイド沈着肝臓乳剤 (AEF) および 500 μ l の 2%硝酸銀水溶液を用いて AA アミロイドーシスを誘発した IL-1raKO に対し、投与から 5, 10, 35, 50 日目 (第 1-4 群) に 300 μ l の 2%硝酸銀水溶液を背部皮下に投与し (再刺

激)、AA アミロイドーシスの再沈着を試みた。再刺激前後における AA アミロイドの沈着パターンを比較するため、再刺激と同日に開腹し、脾臓の一部を切除生検した。コントロール群として、AEF を投与しない群を設けた (図 1、表 1)。全てのマウスは再刺激および脾臓生検の 10 日後に、イソフルラン深麻酔下にて右心室より全採血を行い、安楽死処置後、肝臓、脾臓、腎臓、心臓、副腎、甲状腺、小腸回盲部を採材し、10%中性緩衝ホルマリンにて固定した。常法に従い、4 μ m 厚のホルマリン固定パラフィン切片を作製し、HE 染色、コンゴレッド染色、抗マウス SAA1.1 抗体を用いた免疫染色を行った。標本について、AA アミロイドの分布および沈着量を評価した。各臓器におけるアミロイド沈着量の評価には AI を、脾臓では沈着領域の面積を用いた。実験 1 と同様に、剖検時に採取した血清中の SAA オリゴマーをウェスタンブロットおよびドットブロットによって解析した。

さらに、硝酸銀による再刺激直後の SAA 値、SAA オリゴマー量および AA アミロイドの沈着パターンの変化を捉えるために、再刺激から 1 日毎に剖検を行う群 (第 5-8 群) を設定した (実験開始から 6-8, 11-13, 36-38, 51-53 日目に剖検を行った)。これらの群では各臓器における AA アミロイド沈着と、血清の SAA 値および SAA オリゴマー量を ELISA およびドットブロットによって解析した。

実験 3 : AA アミロイドーシスマウス血清の AEF 活性の検証

AA アミロイドの再沈着では、AEF を投与せず、硝酸銀の投与のみでも複数の臓器への AA アミロイド沈着が生じることから、AA アミロイドの分解過程で生じる何らかの因子が血中に存在し、AEF の代わりに作用するのではないかと考えた。実験 3 では、39 匹の IL-1raKO を 3-6 匹ずつ A-G の 7 つの群に分け、以下に示す様にそれぞれ異なるマウス血清を投与した (表 2)。A-F 群では、第 1 章実験 2 にて剖検時に採取した AA アミロイドーシスマウスの血清 (A-F: 0, 1, 5, 10, 35, 50 日目の血清) および AEF を投与せず硝酸銀による炎症刺激のみを

与えたマウスの血清（G: 5日目血清）を AEF として用いた。マウスに PBS で 3 倍希釈したこれらの血清 300 μ l を腹腔内投与し、背部皮下に 500 μ l の 2%硝酸銀水溶液を投与した。投与から 20 日目にイソフルラン深麻酔下にて右心室より全採血を行い、安楽死処置後、肝臓、脾臓、腎臓、心臓、副腎、甲状腺、小腸回盲部を採材し、10%中性緩衝ホルマリンにて固定した。常法に従い、4 μ m 厚のホルマリン固定パラフィン切片を作製し、HE 染色、コンゴレッド染色、抗マウス SAA1.1 抗体を用いた免疫染色を行った。各臓器に沈着する AA アミロイドの分布および AI による沈着量を評価した。

AEF の精製

AA アミロイドが沈着したマウスの肝臓を用いて、以下の手順に従って肝臓乳剤を作製し、AEF とした。1g の肝臓に 10ml の 0.01M PBS を加え、氷冷下にてホモジナイザーを用い、各 30 秒間 3 回破碎した。肝臓乳剤は使用時まで -80°C にて凍結保存した。

ウェスタンブロット

1 μ l の血清を PBS にて 10 倍希釈し、等量の 5%の 2-メルカプトエタノールを加え、Laemmli サンプルバッファーとともに 99°C にて 5 分間加熱処理した。サンプルは 15%ポリアクリルアミドゲルで、20mA 定電圧の条件下にて室温 90 分間泳動した後、あらかじめメタノールにて親水処理を施した PVDF 膜に、20V 定電圧の条件下にて室温 60 分間転写した。転写後、膜を TBST (0.05% Tween-20 および 137mM NaCl を含む 20mM Tris-HCl 緩衝液、pH7.5) で 10 分 3 回洗浄し、1%スキムミルクを含む TBST にて 1 時間ブロッキングを行った。ブロッキング後、膜は抗マウス SAA1.1 抗体 (1:5000, R&D Systems) または抗マウス SAA1.1 C 末端ペプチドウサギ抗血清 (1:5000, 自作抗血清) と 4°C にて浸透しながら一晩反応させた。反応後、膜を TBST で 10 分 3 回洗浄し、HRP 標識抗

ヤギ IgG 二次抗体 (1:5000, GE Healthcare) および HRP 標識抗ウサギ IgG 二次抗体 (1:5000, GE Healthcare) と室温にて浸透しながら 1 時間反応させた。反応後、膜を TBST で 10 分 3 回洗浄し、ECL Prime 化学発光試薬 (GE Healthcare) と反応させた後、ChemiDoc XRS+ System (Bio-rad) および画像解析ソフト Image Lab (Bio-rad) を用いて陽性バンドを検出した。

ドットプロット

血清は PBS にて 1000 倍希釈し、DHM-96 dot blot hybridization manifolds (Scie-Plas Ltd, Cambridge, UK) を用いてあらかじめメタノールにて親水処理を施した PVDF 膜上に吸着させた。膜は TBST (0.05% Tween-20 および 137mM NaCl を含む 20mM Tris-HCl 緩衝液、pH7.5) で 10 分 3 回洗浄し、1% スキムミルクを含む TBST で 1 時間ブロッキングを行った。ブロッキング後、膜は抗 Amyloid oligomer 抗体 A11 (1:5000, Millipore) と 4°C にて浸透しながら一晩反応させた。反応後、膜を TBST で 10 分 3 回洗浄し、HRP 標識抗ウサギ IgG 二次抗体 (1:5000, GE Healthcare) と室温にて浸透しながら 1 時間反応させた。反応後、TBST で 10 分 3 回洗浄し、ECL Prime 化学発光試薬 (GE Healthcare) と反応させた後、ChemiDoc XRS+ System (Bio-rad) および画像解析ソフト Image Lab (Bio-rad) を用いてスポットの発光強度による半定量を行った。

AI による評価

常法に従い、4 μ m 厚のホルマリン固定パラフィン切片を作製し、抗マウス SAA1.1 抗体 (1:400, R&D Systems) および 2 次抗体に抗ヤギ IgG 抗体 (1:400, BETHYL) を用いた LSAB 法にて免疫染色を行った。各臓器におけるアミロイド沈着量を以下の 4 段階でスコア化し、評価した (0; 沈着なし 1; 軽度の沈着 2; 中等度の沈着 3; 高度の沈着)。なお、腎臓におけるアミロイド沈着スコアで

は、糸球体へのアミロイド沈着を伴うものをスコア 3 とした。検索を行った 7 つの臓器におけるスコアの総和を AI とした。

アミロイド沈着面積による評価

脾臓におけるアミロイド沈着量をアミロイド沈着面積によって評価した。抗マウス SAA1.1 抗体 (1:400, R&D Systems) および 2 次抗体に抗ヤギ IgG 抗体 (1:400, BETHYL) を用いた LSAB 法にて免疫染色を行ったのち、顕微鏡下にて 1 個体あたりランダムに 10 視野を撮影し、視野中に占める陽性部分の比率を画像解析ソフト Image J を用いて定量化した。

SAA 濃度測定

血清中の SAA 濃度はメーカーのプロトコルに従い、市販のサンドイッチ ELISA キット (BioSource International) を用いて定量した。

データ解析

AI、アミロイド沈着面積、および SAA 濃度に関しては Student の t 検定を用い、 $p < 0.05$ のとき統計学的に有意であると判断した。

結果

実験 1: 単回炎症刺激による AA アミロイド沈着パターンおよび血清中の SAA オリゴマーの経時変化

AA アミロイドの沈着過程は組織学的特徴から沈着初期：(誘発処置後 0-5 日目)、沈着早期：(誘発処置後 10-20 日目)、沈着中期 (誘発処置後 35-45 日目)、沈着後期 (誘発処置後 50-60 日目) の 4 段階に分けた (図 2)。沈着初期 (0-5 日目) では、AA アミロイドは脾臓濾胞辺縁帶領域、肝臓ディッセ腔、小腸回盲部絨毛先端部の毛細血管周囲に局限して認められ、AI は低値であった。脾臓濾

胞周囲のアミロイドは濾胞の一部を薄い層状に取り囲み、肝臓では肝細胞に近接するように微細な顆粒状のアミロイドがびまん性に沈着していた(図 2、A, E, I, M)。沈着早期(10-20 日目)では、アミロイド沈着は著しく進行し、心臓、甲状腺、副腎などに沈着し、AI は上昇した。脾臓濾胞周囲のアミロイドは均質な幅の層状を呈し、ほぼすべての濾胞がアミロイドによって被包された。肝臓では、ディッセ腔に顆粒状にアミロイドが沈着し、徐々に顆粒は大型化した(図 2、B, F, J, N)。沈着中期(35-45 日目)では AI の緩やかな低下を認めた。脾臓濾胞周囲のアミロイドに対して単核細胞の軽度浸潤がみられ、肝臓では顆粒状に沈着したアミロイドが小葉中心静脈周囲や肝三つ組周囲に集中する特徴的な沈着パターンを示した(図 2、C, G, K, O)。沈着後期(50-60 日目)では脾臓濾胞周囲のアミロイドは粗雑になり、間質への単核細胞浸潤がより顕著であった。濾胞構造は不整となり、一部の個体では赤脾髄領域にも結節状のアミロイド沈着を認めた。肝臓ディッセ腔に沈着したアミロイドの一部は消失し、小葉中心静脈および小葉間静脈周囲に限局して認められた。肝臓、脾臓におけるアミロイド沈着量が低下する一方で、腎臓髄質、甲状腺濾胞周囲など他の臓器へのアミロイド沈着量が増加したため AI は軽度には上昇した(図 2、D, H, L, P)。

血清中の SAA 値は AEF および硝酸銀の投与から 1 日目を最高値とし、以降急激に低下する一方で、血清 A11 陽性オリゴマー量は 1-2 日目から増加し、60 日目まで高値を維持した(図 3)。抗 SAA1.1 抗体(R&D systems)を用いたウェスタンブロットでは、4 時間-20 日目の血清で 12.6kDa, 13.5kDa, 19.2kDa の位置に明瞭なバンドが検出された。12.6kDa のバンドは抗 SAA1.1 C 末端抗血清を用いた反応にも陽性であった。12.6kDa, 13.5kDa のバンドは SAA のモノマーであると考えた。抗 SAA1.1 C 末端抗血清を用いたウェスタンブロットでは、15 日目以降の血清において、28kDa 付近にやや不鮮明な、一部スメア状のバンドを認めた。このバンドは 45-60 日目の血清において明瞭であった。分子量より同バンドは SAA のダイマーであると思われた(図 4)。

実験 2 : AA アミロイドの再沈着

AA アミロイドーシス誘発処置後に再刺激を行った全てのマウスにおいて重度の AA アミロイド沈着を認めた。一方、誘発時に AEF を投与せず、炎症刺激のみを行った群では AA アミロイド沈着は認められなかった (表 1)。AEF と硝酸銀で AA アミロイドーシスを誘発し、5, 35 および 50 日目に再刺激を行った群 (1, 3, 4 群) で、単回刺激群と比較し AA 沈着量の有意な増加を認めた。単回刺激群を基準とした AI 増加率は特に第 3 群において最大であった (232%)。脾臓濾胞周囲のアミロイド沈着面積を生検時と剖検時にて比較したところ、再刺激前後における AA アミロイドの沈着量は第 2, 3 群において有意に増加した (図 5)。

再刺激の時期にかかわらず、アミロイド沈着量は顕著に増加したが、アミロイド沈着パターンは群ごとに異なるパターンを示した。再刺激群では単回刺激群と比較し、腎臓へのアミロイド沈着が顕著であった。腎臓は肉眼的に高度に萎縮し、表面は不整であり、皮質は褪色し黄色調を呈した。特に第 3, 4 群では、腎髄質および腎糸球体に重度のアミロイド沈着を認め、遠位尿細管の圧迫により拡張した近位尿細管が多数認められた。糸球体へのアミロイド沈着は第 2, 3, 4 群において高頻度に認められた。実験 1 の単回刺激群において認められた脾臓・肝臓でのアミロイド沈着パターンの経時変化と同様の変化が再刺激群においても観察された。すなわち、第 1, 2 群では、肝臓におけるアミロイド沈着はびまん性の沈着パターンを呈したのに対し、第 4 群では血管周囲性の沈着パターンを呈した (図 6)。脾臓におけるアミロイド沈着パターンには個体差がみられたが、同一個体の再刺激前後でパターンは保持されていた (図 7)。

再刺激による急激なアミロイド沈着亢進は、再刺激の時期にかかわらず再刺激の翌日から認められた (図 8)。再刺激による SAA 値のピークはいずれの群においても単回刺激群のものより低値であった。特に第 3 群ではその傾向が顕

著であり、再刺激 1 日後、2 日後の SAA 値はそれぞれ $393\pm 64\mu\text{g/ml}$, $573\pm 118\mu\text{g/ml}$ と低値であった。一方、第 4 群では単回刺激群とほぼ同等の値を示した ($6236\pm 2867\mu\text{g/ml}$) (図 9)。

実験 3 : AA アミロイドーシスマウス血清の AEF 活性の検証

AEF として AA アミロイドーシスマウスの血清を投与した B-F 群では、33-83%のマウスで AA アミロイド沈着を認めた。特に 35, 50 日目の血清を投与した E-F 群では 83%と高い沈着率を示した。対照として非 AA アミロイドーシスマウスの血清を投与した A, G 群で、AA アミロイドの沈着は認められなかった。

考察

生体内における AA アミロイドの凝集機構モデルとしては、**seeding** モデルが一般的である。このモデルでは、*in vitro* における線維形成と同様、①前駆蛋白である SAA モノマーが構造変換し、AA アミロイドへ凝集するきっかけを作る重合核形成反応、②短いアミロイド線維の断端方向にモノマーが重合し、アミロイド線維が伸長する線維伸長反応、③伸長したアミロイド線維が崩壊し、断片化したものが分散し、新たな線維伸長反応を誘導する線維の断片化の 3 つの反応が繰り返されることでアミロイド沈着が進行する。全身性アミロイドーシスでは、病態の進行とともに他の臓器にアミロイド沈着が波及する現象を臓器間におけるアミロイドの伝達と表現するが、**seeding** モデルにおける臓器間でのアミロイドの伝達は断片化した線維が他臓器に移動し、そこで再凝集するためと解釈される。**seeding** モデルでは、アミロイド沈着はアミロイド線維あるいは重合核と SAA モノマーとの反応として定義されるため、アミロイドーシスが進行する過程では SAA 値が常に高い必要がある。今回の AA アミロイドーシス急性発症モデルでは SAA 値の上昇は沈着初期 (誘発処置から 0-5 日目) に概ね終

息したにもかかわらず、脾臓や肝臓におけるアミロイド沈着量は SAA 値が低下した沈着早期（10-20 日）に急速に増加した。アミロイドオリゴマーの立体構造を認識する anti-amyloid oligomer 抗体³⁵を用いたドットプロットによって SAA オリゴマーの半定量を行ったところ、AA アミロイドーシス誘発処置から 1 日後に血中の SAA オリゴマーは増加し、SAA 値低下後も、高値を維持したことから、SAA モノマー減少後の急速なアミロイド沈着の進行は SAA オリゴマーが SAA の供給源となっているためと考えられた。

脾臓および肝臓に沈着した AA アミロイドの分解は IL-1raKO においても認められ、特に誘発処置後 35 日以降で顕著であった。これまでの報告ではアミロイドの分解はマクロファージによる貪食作用によって生じると考えられており⁸⁶、Nyströme らは実験的 AA アミロイドーシスにおいて肝臓に沈着したアミロイドに隣接するクッパー細胞の細胞質内に AA アミロイド線維が存在していることを示し、AA アミロイドを貪食したマクロファージが血液循環を介して他の臓器へと AA アミロイドを伝達すると考察している⁶²。また、同研究グループは AA アミロイドーシスマウスの末梢血から分離した単核細胞のうち、約 5% が細胞質内に SAA/AA 陽性の物質を含んでいることも報告している⁸⁷。今回の検索では沈着したアミロイド周囲におけるマクロファージの分布は沈着の時期を問わず一様であり、アミロイドの貪食像もわずかにみられるのみであった。また、小腸絨毛部粘膜固有層に沈着した AA アミロイド周囲では目立ったマクロファージの浸潤はみられず、同部の AA アミロイドも脾臓や肝臓におけるアミロイドとともに減少したことから、アミロイドの分解はマクロファージの貪食作用だけでは説明出来ないと考えた。肝臓と脾臓におけるアミロイドの分布は時間の経過とともに血液流路に沿って上流部から下流部へと、連続性を保ちつつ流動的に推移していくことから、血中 SAA モノマーと SAA オリゴマー、組織に沈着する AA アミロイドは平衡状態を保ちながら常に沈着と分解を繰り返しており、この平衡が SAA から AA アミロイドに傾くことでアミロイド沈着量

が増加するものと考えた。アミロイドの分布の変化は、血流の上流部で分解された AA アミロイドの分解産物の一部がオリゴマーとして血中ないし組織液中に溶出し、下流部に沈着している AA アミロイド周囲で再凝集することで生じたと推察される。

単回刺激により AA アミロイドーシスを誘発したマウスではアミロイドの沈着が認められなかった副腎、腎臓、甲状腺などの臓器においても、再刺激により最短で6日目から顕著なアミロイド沈着が認められた。単回刺激後、多臓器に AA アミロイドが沈着し始める時期には既に血中の SAA モノマー量が減少しているため、これらの臓器における AA アミロイド沈着は、AA アミロイドや SAA オリゴマーの分解によって供給される SAA モノマーが凝集することでゆっくりと進行していくと考えられた。一方、再刺激群では、既に広域に分布している SAA オリゴマーを核として再刺激によって産生された SAA が沈着し、短期間で広範囲にアミロイドが沈着したものと考えられた。再刺激を行う時期と AA アミロイドの増加量との関係を調べたところ、誘発処置後 35 日目に再刺激を行ったマウスにおいて最も重度のアミロイド沈着を認めた。これは単回刺激群において AA アミロイドの分解が更新し AA アミロイドの伝達が進行し始める時期と一致しており、血中 SAA オリゴマー量も多いことから、AA アミロイドの分解によって生じた SAA オリゴマーが血中に多く存在し、再刺激による平衡の移動のためこれらが AA アミロイドとして沈着したものと想定された。また、実験3の結果から、AA アミロイドーシスマウス血清の AEF 活性は AA アミロイドの分解時に高まることが示唆された。Tasaki らは AA アミロイドーシスマウスの誘発処置後 6 日目血清に、AEF 活性を有する SAA オリゴマーがエクソソームとして含まれており、AEF として AA アミロイドの個体間伝達に作用することを報告している⁹⁴。今回、ウェスタンブロットによって 45 日目以降の血清中に SAA ダイマーを検出した。この SAA ダイマーは AA アミロイドの分解の際に産生された SAA オリゴマーの一部であり、病態初期の血清中には検

出されないことから、病態の進行に伴い血中の SAA オリゴマーの組成も変化していることが示された。

近年、Cohen らは A β 42 の凝集過程に関する動力学的研究から、アミロイド凝集は primary nucleation, secondary nucleation, fragmentation の 3 つの段階によって進行すると主張した¹⁰。primary nucleation は重合核形成反応に、fragmentation は線維の断片化にそれぞれ対応する。secondary nucleation は線維伸長反応に変わる新しいモデルであり、アミロイドーシスの病態が進行する上で、最も重要な段階であると述べている。この反応では、凝集したアミロイド線維、前駆蛋白のモノマーおよびオリゴマーが共存している状況下において、アミロイド線維が触媒様の役割を果たすことでアミロイド凝集に必要な反応エネルギーが低下し、沈着しているアミロイドの近傍で優先的に新たなアミロイド線維やオリゴマーが形成される。さらに新生したアミロイド線維が新たな触媒となることで反応が繰り返され、fragmentation を介さずにアミロイド沈着量が急激に増大すると説明している。secondary nucleation の概念は、アミロイド線維の近傍では新規のアミロイド沈着が起りやすいことを意味しており、AA アミロイドの分解や再沈着における沈着パターンの変化は AA アミロイドーシスにおいても同様であることを示唆している。

今回の結果から、AA アミロイドーシスの進行過程において、SAA はモノマーと AA アミロイド線維以外の中間体である SAA オリゴマーとして長期間血中に存在すると考えられる。本章の結果から、SAA オリゴマーの①AA アミロイドの重合過程における SAA 供給源としての作用、②臓器間での AA アミロイド伝達における重合核としての作用、③個体間での AA アミロイド伝達における AEF としての作用が想定された。AA アミロイドーシスの病態と SAA オリゴマーとの関連に関してはより詳細な検討が必要である。

要約

実験的 AA アミロイドーシスモデルでは、炎症刺激の中止により沈着したアミロイドが分解されること、さらには分解過程における再刺激によって多量の AA アミロイドが再沈着することが報告されている。そこで、AA アミロイドの分解と再沈着の過程における各臓器の組織学的変化および血清中の SAA オリゴマー量を経時的に調べ、生体内における AA アミロイドの動態について考察した。SAA 値の低下後、肝臓および脾臓に沈着した AA アミロイドは血液流路の上流側で沈着量が減少し、下流側では沈着量が増加した。最終的にアミロイドは血管周囲に限局した。血中の SAA オリゴマーは AA アミロイドの沈着が始まる誘発処置後 2 日目に増加し、以降 60 日目まで高値を維持した。特にアミロイドの分解が進行する 45 日目以降の血清中では SAA ダイマーが検出された。この SAA ダイマーは AA アミロイドの分解産物の一部であると推察された。また、誘発処置後 5, 10, 35 および 50 日に硝酸銀水溶液投与による再刺激を行ったところ、再刺激の翌日にはすべての個体において全身臓器に重篤な AA アミロイド沈着を認めた。アミロイド沈着量の増加率は 35 日目に再刺激を行ったマウスで最も高かった。また、SAA オリゴマーに富む AA アミロイドーシスマウスの血清を他のマウスに接種し、炎症を惹起したところ、高率に AA アミロイドーシスを発症した。本章の結果から、AA アミロイドーシスの進行過程において血液中の SAA モノマー、オリゴマー、および組織に沈着した AA アミロイドの 3 者が常に平衡状態にあり、これらの平衡が傾くことでアミロイドの沈着と分解が生じると考えられた。さらに SAA オリゴマーには①AA アミロイドの重合過程における SAA 供給源としての作用、②臓器間での AA アミロイド伝達における重合核としての作用、③個体間での AA アミロイド伝達における AEF としての作用があると想定された。

表1: 実験2、再刺激によるAAアミロイドの再沈着

群	匹数	再刺激 (日)	剖検(日)	AEF	発症率 (%)	AI±SE	生検時のAA沈着陽性 面積率(%) ± SE(%)	剖検時のAA沈着陽性 面積率(%) ± SE(%)
1	4	5	15	+	4/4 (100%)	*a 12.0±0.6	0.84 ±0.03	0.72 ±0.16
2	3	10	20	+	3/3 (100%)	14.7±1.0	0.42 ±0.15	*b 1.16 ±0.21
3	3	35	45	+	3/3 (100%)	**a 16.3±0.7	1.26 ±0.27	2.85 ±0.49
4	3	50	60	+	3/3 (100%)	**a 17.0±0.5	1.23 ±0.14	1.46 ±0.48
Control 1	3	5	15	-	0/3 (0%)	0	0.00	0.00
Control 2	3	10	20	-	0/3 (0%)	0	0.00	0.00
Control 3	6	35	45	-	0/6 (0%)	0	0.00	0.00
Control 4	4	50	60	-	0/4 (0%)	0	0.00	0.00
5	3	5	6	+	3/3(100%)	**a 12.3±0.5	ND	ND
	3	5	7	+	3/3(100%)	**a 11.7±0.5	ND	ND
	3	5	8	+	3/3(100%)	*a 13.0±2.0	ND	ND
6	3	10	11	+	3/3(100%)	10.3±0.7	ND	ND
	3	10	12	+	3/3(100%)	12.3±0.3	ND	ND
	3	10	13	+	3/3(100%)	*a 15.0±0.9	ND	ND
7	3	35	36	+	3/3(100%)	10.7±1.0	ND	ND
	3	35	37	+	3/3(100%)	13.7±0.5	ND	ND
	3	35	38	+	3/3(100%)	14.3±1.0	ND	ND
8	3	50	51	+	3/3(100%)	*a 13.0±0.5	ND	ND
	3	50	52	+	3/3(100%)	**a 17.0±0.5	ND	ND
	3	50	53	+	3/3(100%)	**a 17.0±0.5	ND	ND

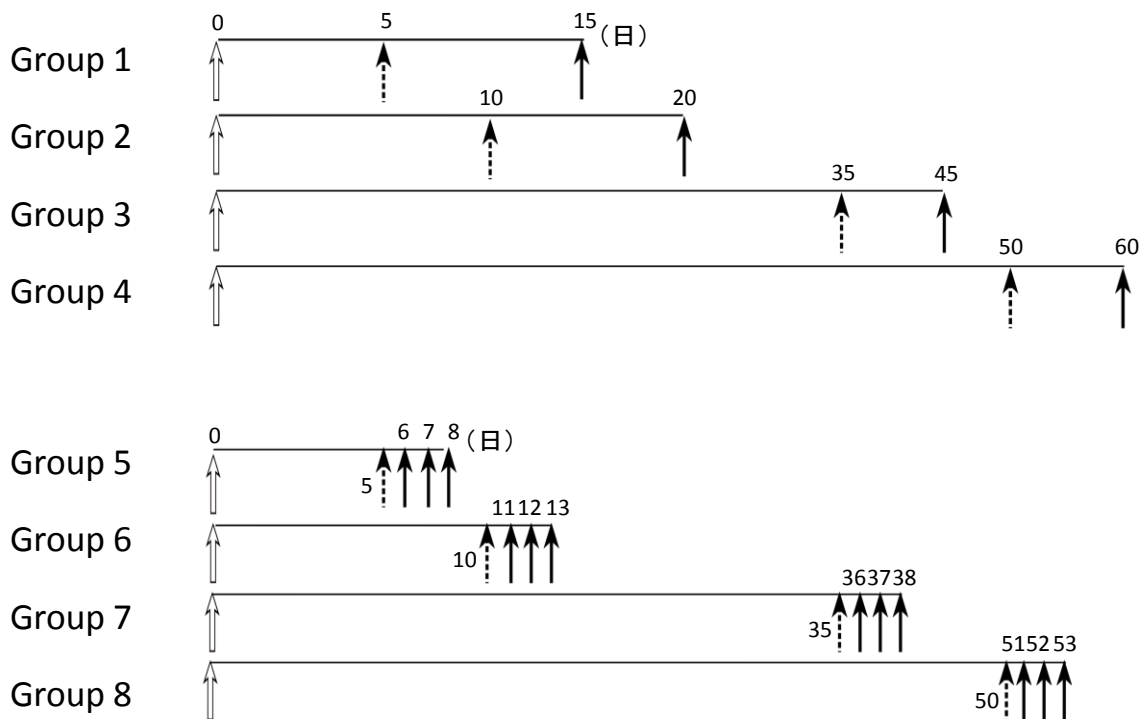
Statistical analysis was performed using Student's *t*-test. *: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$ significantly different from the corresponding value of (a)date-matched group or (b)biopsy score. ND: Not detected.

表2:実験3、AAアミロイドーシスマウス血清のAEF活性

群	匹数	投与した血清	発症率 (%)	AI ±SE
A	6	Day 0 血清	0/6(0%)	0
B	3	Day 1 血清	2/3(66%)	1.6±0.7
C	6	Day 5 血清	2/6(33%)	2±1.6
D	6	Day 10 血清	3/6(50%)	0.7±0.3
E	6	Day 35 血清	5/6(83%)	2.3±0.7
F	6	Day 50 血清	5/6(83%)	2.7±0.8
G	6	Day5 血清 (no amyloid 対照)	0/6(0%)	0

実験1; 単回炎症刺激によるAAアミロイド沈着パターンおよび血清中のSAAオリゴマーの経時変化 (第1章実験2と同様)

実験 2: AAアミロイドの再沈着



実験 3: マウス血清のAEF活性に関する検討

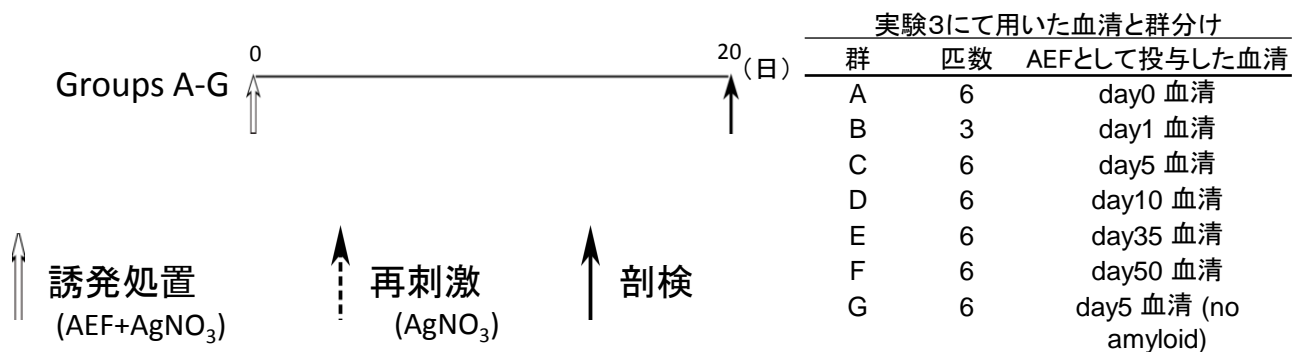


図1 実験の概要と群分け

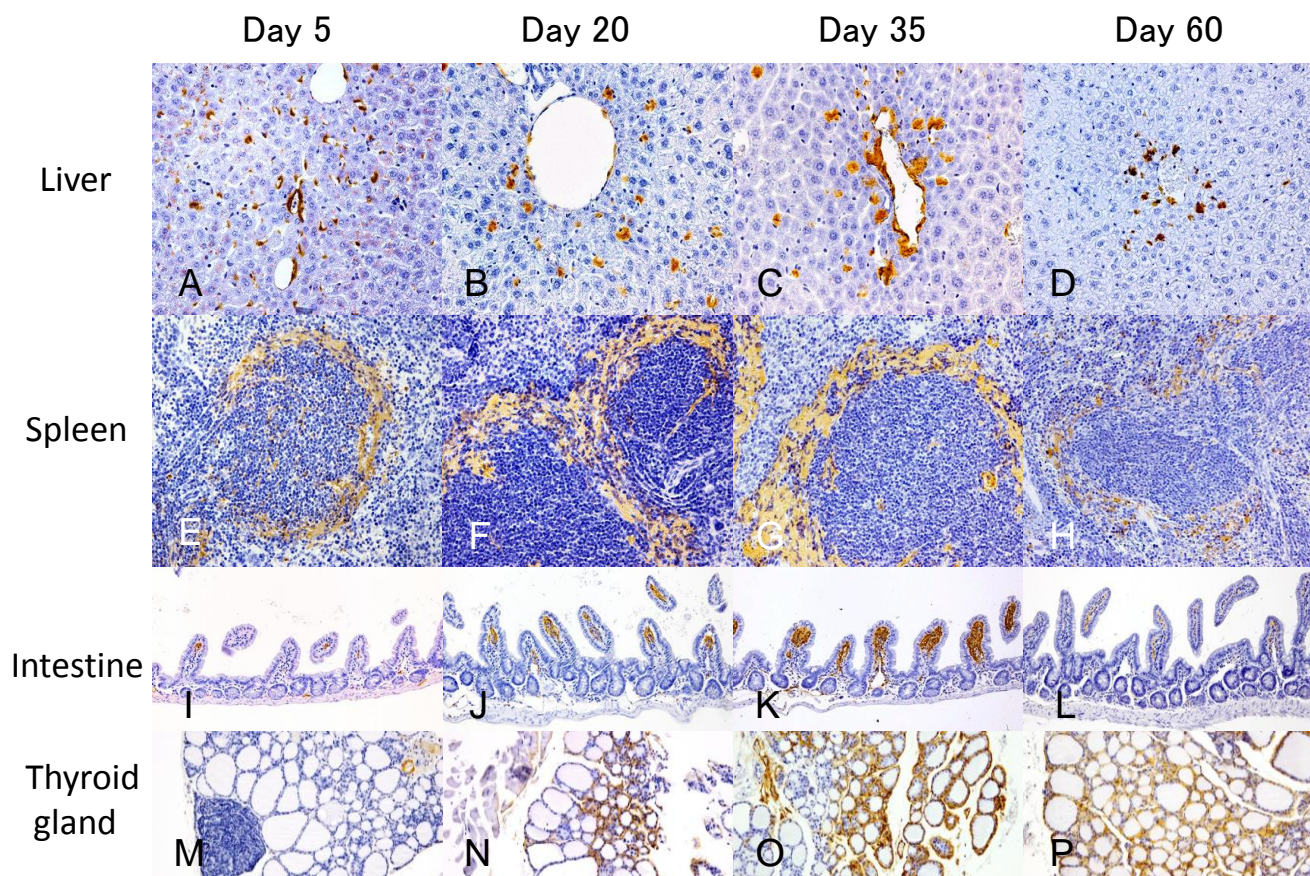


図2 各臓器におけるAAアミロイド沈着パターンの経時変化

実験1: 単回刺激群、A-D: 肝臓、E-H: 脾臓、I-L: 小腸回盲部、M-P: 甲状腺。
抗マウスSAA1.1を用いた免疫染色。

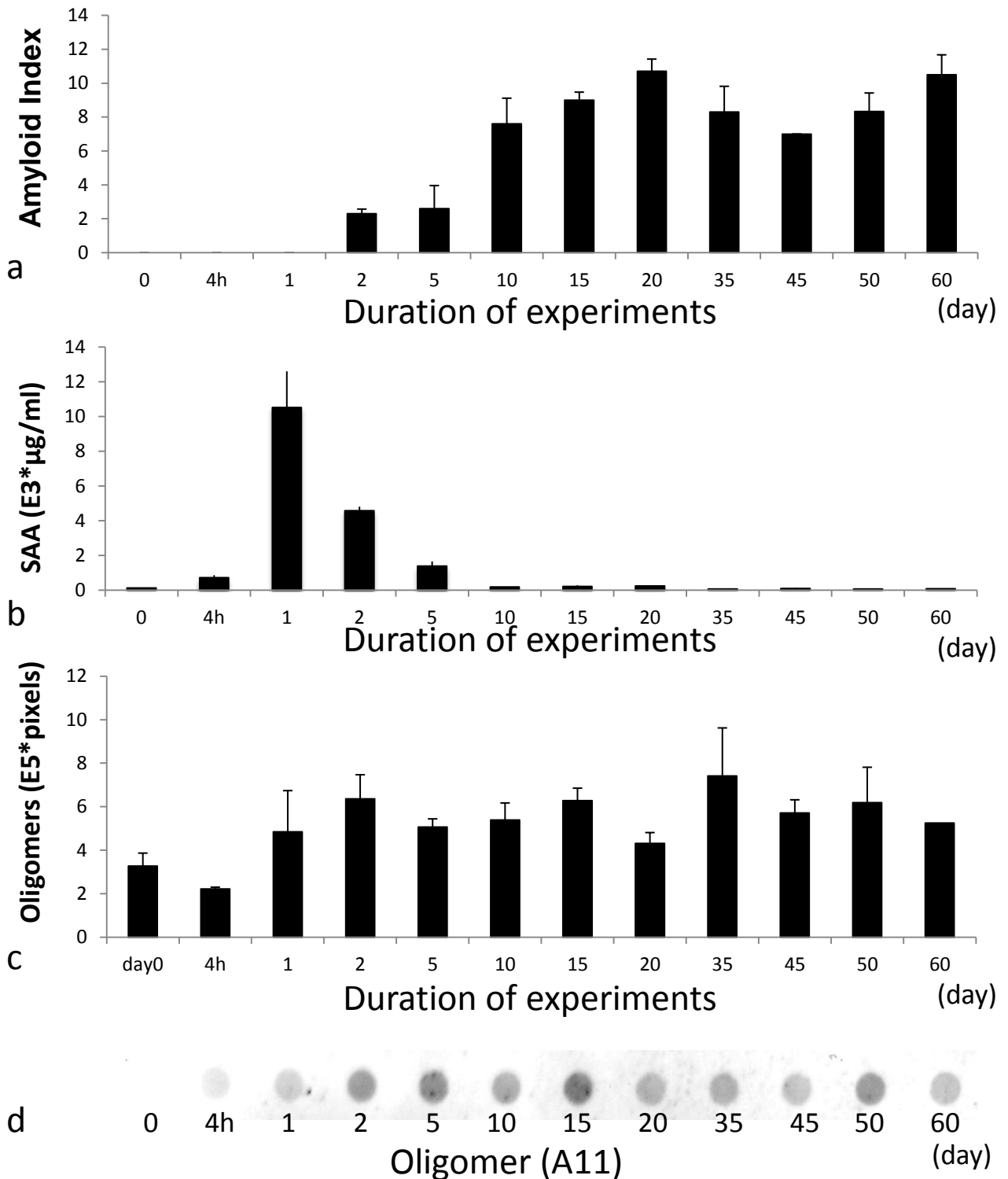


図3 単回刺激群におけるAI、血清SAA値および血清中アミロイドオリゴマーの経時変化
a) AI(再掲)、b) SAA値(再掲)、c-d) 抗アミロイドオリゴマー抗体(A11)を用いたドットブロットの結果と相対的オリゴマー量
アミロイド沈着量はSAA値低下後も上昇する傾向を示す。炎症惹起によるSAA値上昇後、オリゴマー量は高値を維持する。

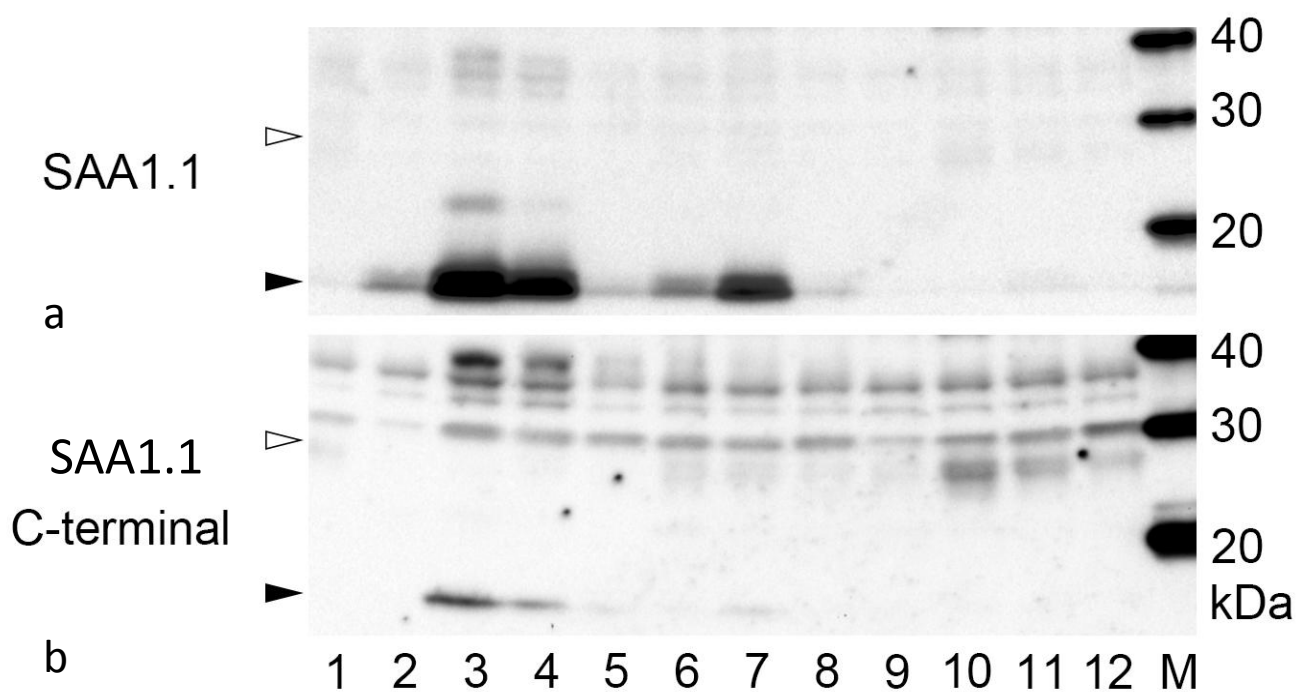


図4 単回刺激マウスにおける血清中SAAの泳動パターン

a) 抗マウスSAA1.1抗体 (R&D system) を用いたウェスタンブロット

b) 抗マウスSAA1.1 C-terminal抗血清を用いたウェスタンブロット

c) レーン1-12: (順に) 0日目(未処置), 4時間後, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 35, 45, 50, 60日後の血清。

炎症惹起によって産生されるSAAモノマーは抗SAA1.1抗体を用いたウェスタンブロットにより12.6kDa, 13.5kDa, 19.2kDaの位置に明瞭なバンドを呈する(レーン2-8、黒矢頭)。AAアミロイドの分解が進行する45日目以降(レーン10-12)抗マウスSAA1.1 C-terminal抗血清を用いてSAAダイマーに相当する28kDaのバンドが検出された(白矢頭)。

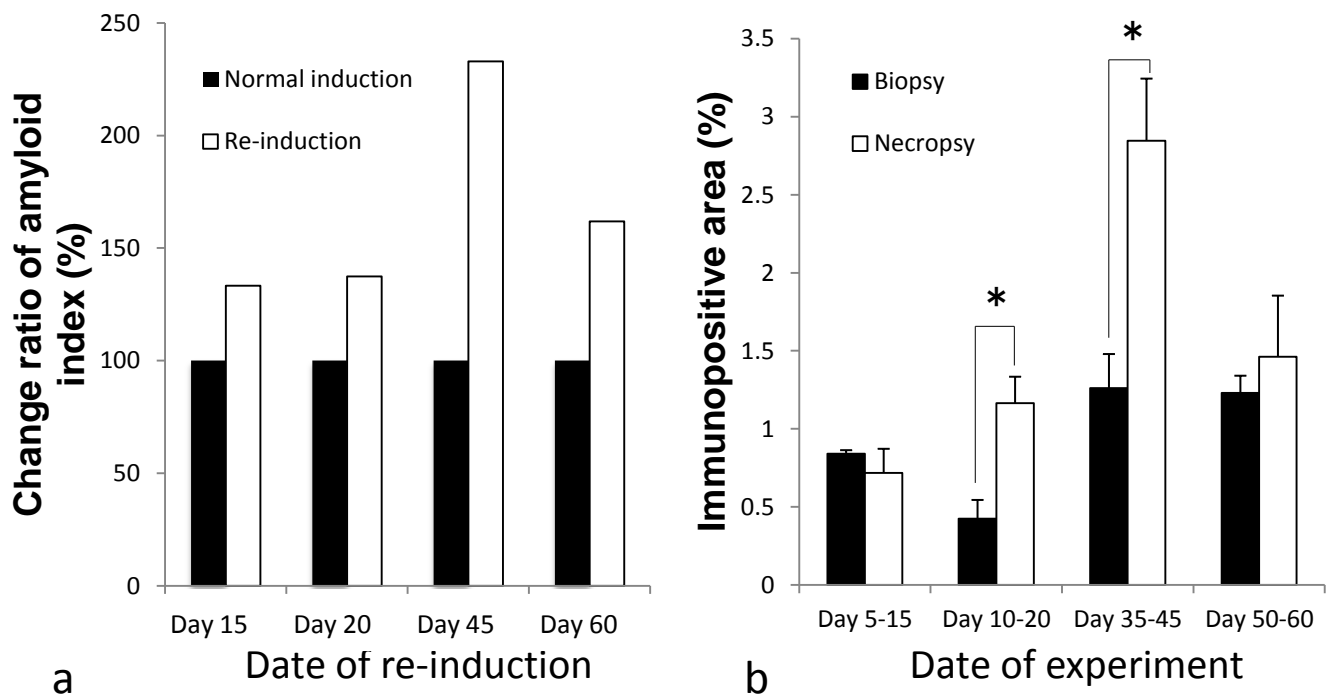


図5 再刺激の時期によるアミロイド沈着量の変化

a)再刺激の時期とAIの変化率

b)脾臓濾胞周囲におけるアミロイド沈着面積

35日目に再刺激を行った群において最も顕著なアミロイド沈着量の増加を認める。

*; $p < 0.05$

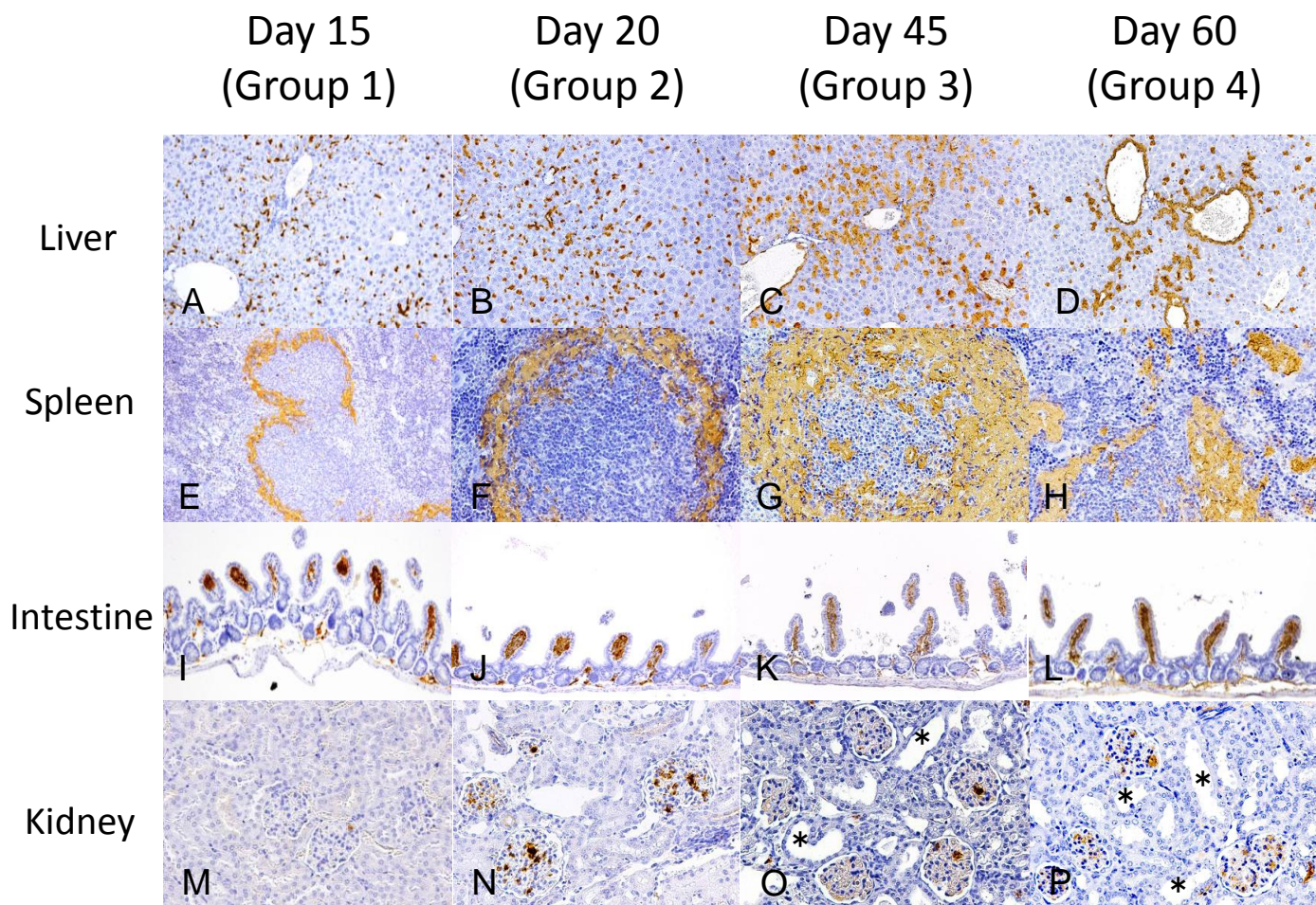


図6 再刺激によるAAアミロイドの沈着パターン

実験2: 再刺激群(1-4群)、A-D: 肝臓、E-H: 脾臓、I-L: 小腸回盲部、M-P: 腎臓
抗マウスSAA1.1抗体を用いた免疫染色。

*) 拡張した尿細管

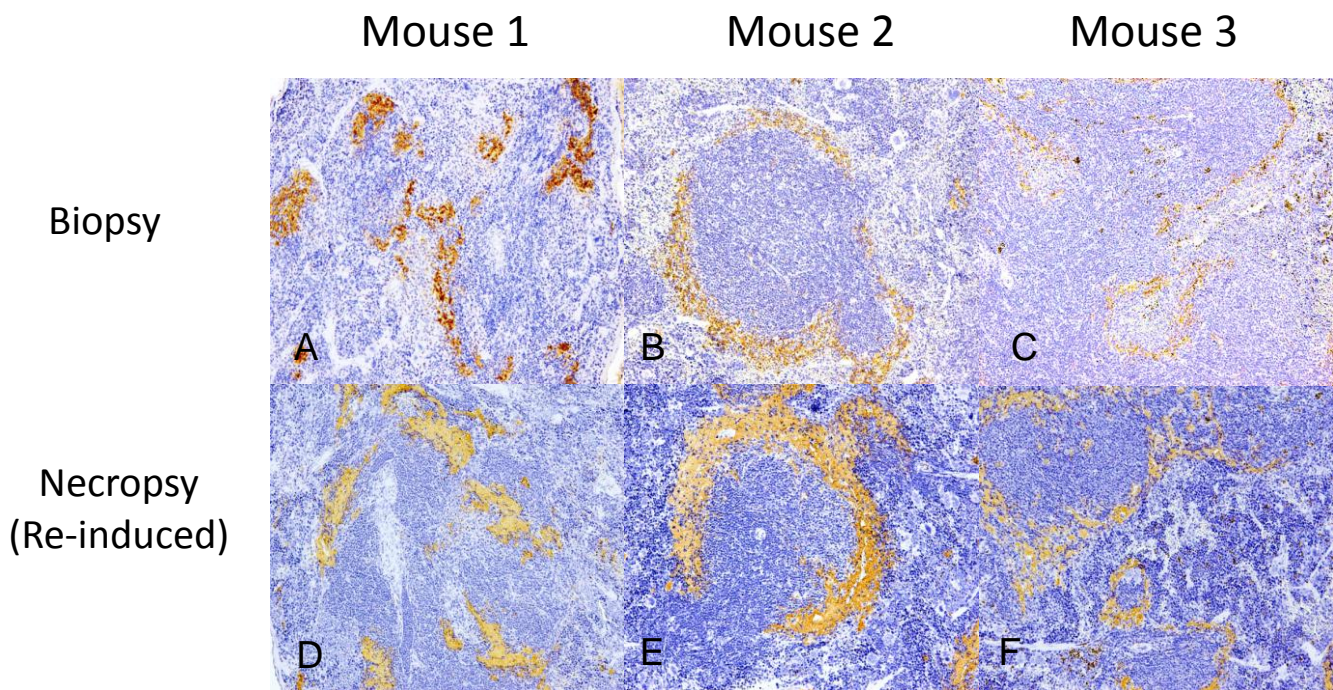


図7 再刺激の前後でのアミロイド沈着パターンの変化
 実験2、再刺激群、第4群 上段: 生検時(50日目) 下段: 剖検時(60日目)、A-F: 脾臓
 同一個体でのアミロイド沈着パターンは再刺激の前後において類似した沈着パターン
 を呈する。抗マウスSAA1.1抗体を用いた免疫染色。

単回刺激群
(再刺激前)

再刺激群

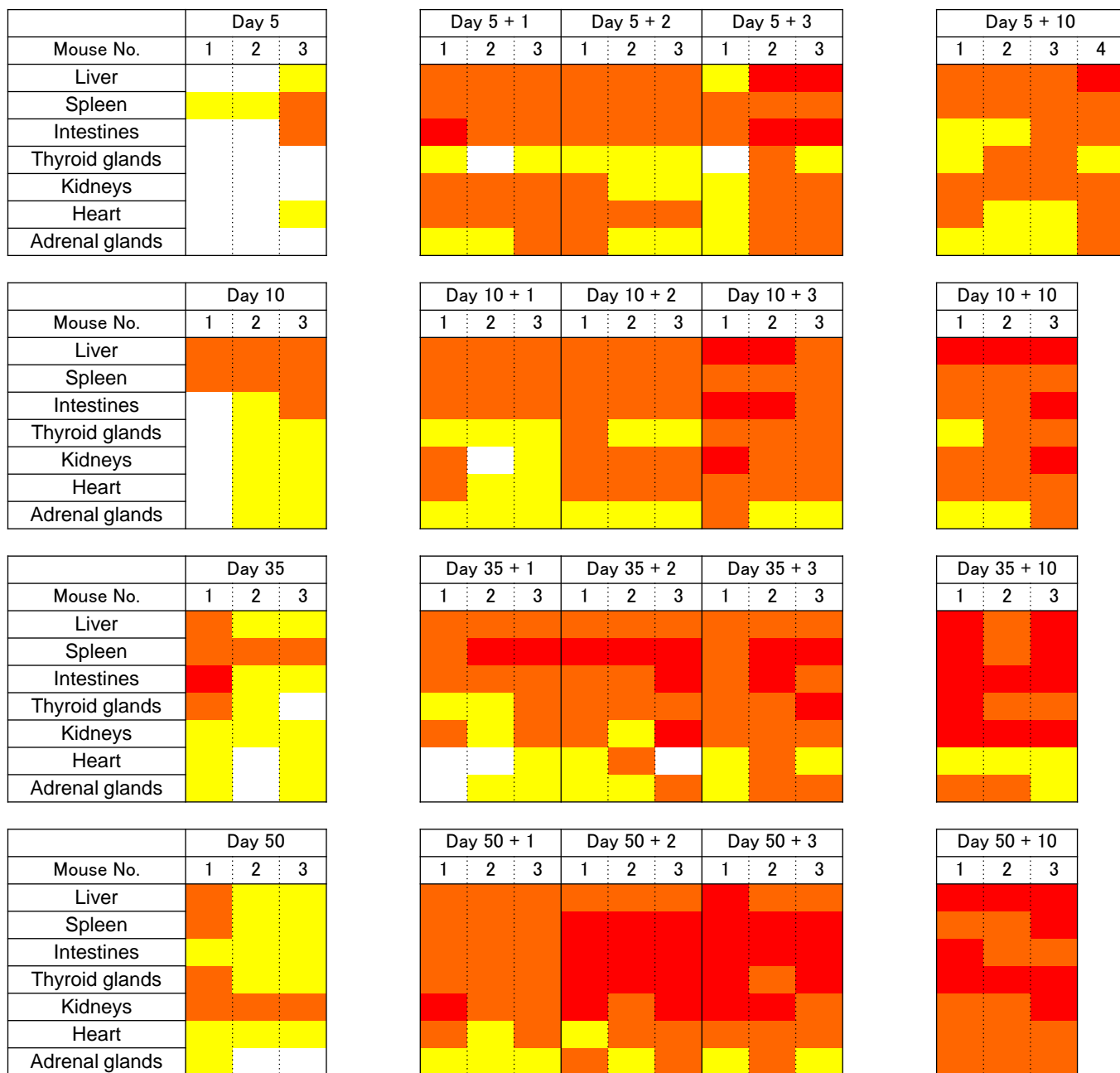


図8 再刺激によるアミロイドの分布の変化(ヒートマップ)

実験2、行:上から順に肝臓、脾臓、小腸、腎臓、甲状腺、心臓、副腎。 列: 各個体。
再刺激の翌日から全身臓器におけるアミロイド沈着スコアの顕著な上昇を認める。

■; Score 1 ■; Score 2 ■; Score 3

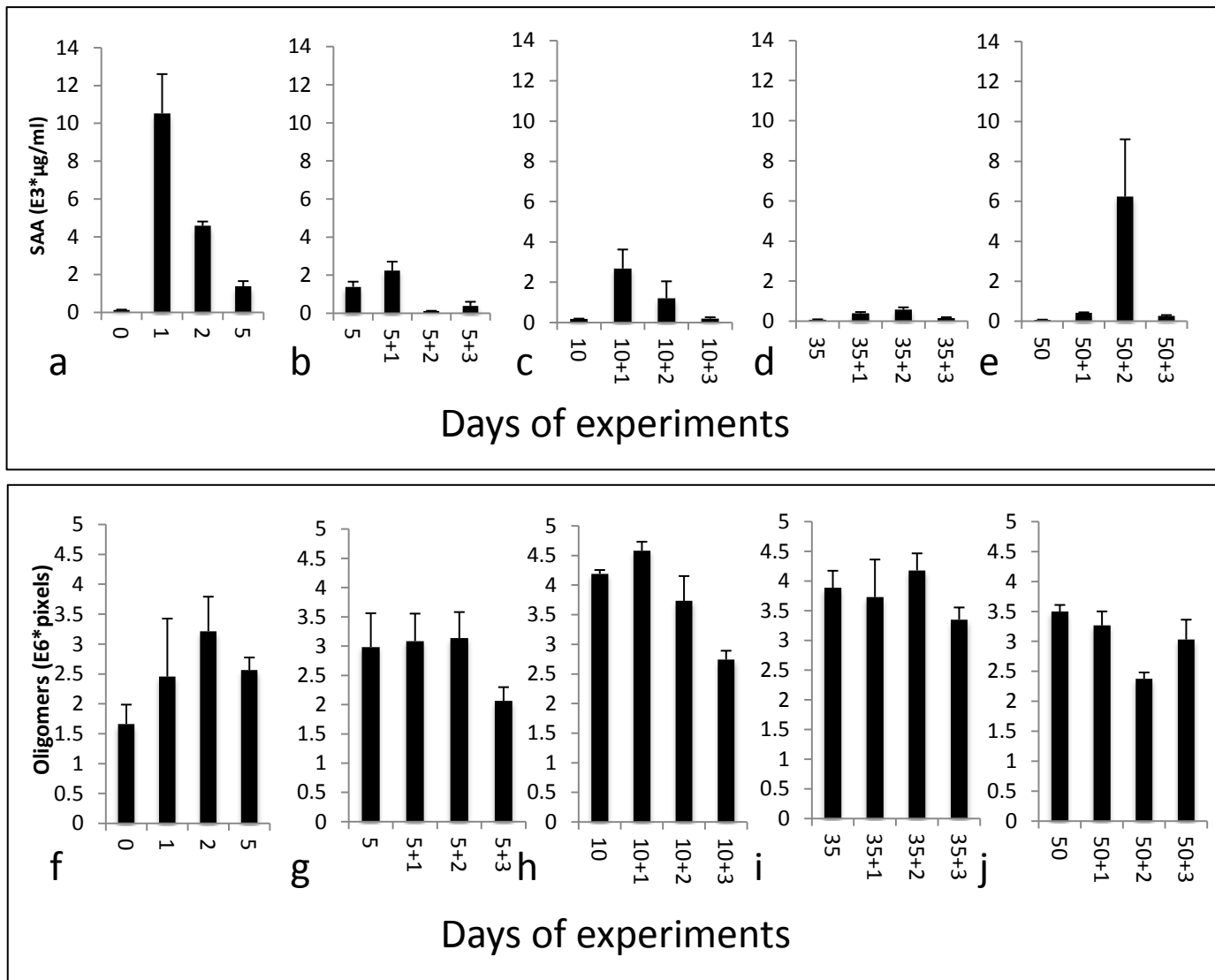


図9 再刺激の前後における血清中のSAA値およびオリゴマー量の変化

実験2、上段：SAA値、下段：相対的オリゴマー量

a): 単回刺激群、b-e):それぞれ第5-8群、f): 単回刺激群、g-j):それぞれ第5-8群

再刺激マウスは単回刺激マウスと比較し、炎症惹起による明確なSAA値のピークを呈さない。

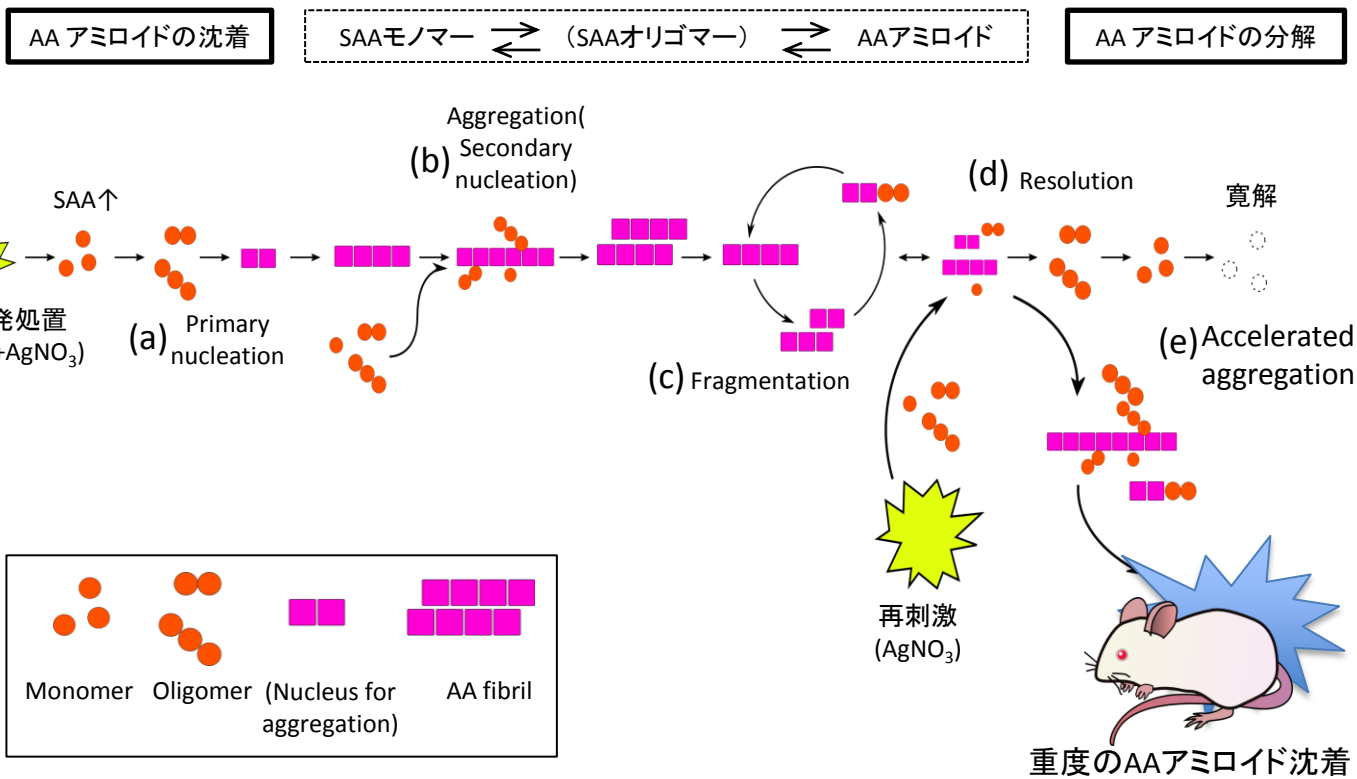


図10 生体内におけるAAアミロイドの沈着と再沈着、分解機序

第 3 章

AA アミロイド沈着に伴う脾臓濾胞辺縁帯の組織学的変化

序

AEF 投与による実験的 AA アミロイドーシスにおいて、脾臓はアミロイドが最も早くから沈着し始める臓器の一つである⁶⁸。脾臓はリンパ球の成熟の場である白脾髄と血液を蓄えた有窓血管に富む赤脾髄からなり、実験的 AA アミロイドーシスでは、白脾髄と赤脾髄の境界部にアミロイドが沈着する⁴⁶。この領域は傍濾胞領域 (marginal zone、MZ) と呼ばれ、中心動脈の分枝である毛細血管が辺縁洞 (marginal sinus) に開口する³⁹。

血中の蛋白抗原や不溶化抗原は貪食能の高い脾臓固有のマクロファージである MZ macrophages (MZMs)、MZ metallophilic macrophages (MZMMs) に、糖質抗原や水溶性抗原は MZ B cell によって捕捉される⁹。MZMs は細胞膜上にスカベンジャー受容体である macrophage receptor with a collagenous structure (MARCO)³¹、C 型レクチン受容体である specific ICAM-3-grabbing non-integrin receptor-1 (SIGN-R1)²⁰ を発現しており、それぞれが特定の抗原と結合する⁶。MZ B cell は MARCO に選択的に結合する性質を有し、定常状態において MARCO を介して MZMs と結合している⁵⁰。また、MARCO は MZ および濾胞 B cell 領域に分布する細網線維、濾胞樹状細胞の突起上にも少量発現し、それぞれの細胞と相互に結合・解離することで MZ B cell の MZ への局在、濾胞内への遊走に関与している³⁶。MZMs には MARCO および SIGN-R1 を共発現する MARCO⁺SIGN-R1⁺ と MARCO のみを発現する MARCO⁺SIGN-R1⁻ の 2 種類のサブタイプがある¹⁰⁹。SIGN-R1 の発現量は、MARCO を介して MZMs と結合する MZ B cell によって調節を受けているので、血中抗原への暴露により MZ B cell と MZMs が解離し、2 つのサブタイプの比率が変化する²⁰。MZMMs は細胞膜上に免疫グロブリンスーパーファミリーに属する sialic acid binding Ig-like lectin 1 (siglec-1, CD169) を発現し、血中の死細胞やウイルス抗原を捕捉する⁶⁹。MZ B cell はマウスでは脾臓 MZ に分布し、T 細胞依存性免疫では自身が IgG₁ 抗体を産生する形質細胞へと分化するだけで

なく、T細胞非依存性免疫においては細胞膜上のIgMによって補足した抗原を濾胞樹状細胞へ移送する抗原提示細胞様の役割も有する⁵⁰。これらの膜蛋白は免疫染色の際の細胞マーカーとしても有用であり、MZMsはMARCOおよびSIGN-R1に陽性、MZMMsはCD169に陽性、MZ B cellはIgMに強陽性を示す。

Kennelらは静脈内に投与したAEFが15分以内にMZに到達し、4時間後には上述の細胞に取り込まれることを示した³⁷。このAEFの取り込み作用はchondronate liposomeによりMZMMs、MZMsおよびred pulp macrophage (RPMs)を排除した場合に消失することから、静脈内に投与されたAEFは早期にMZに集簇し、周囲のマクロファージによって貪食されると推察される。また、同様の手技によりMZMs、MZMMsおよびRPMsを排除したマウスではアミロイド沈着が軽減されたことから、これらのマクロファージによるAEFの取り込みがAAアミロイドーシス発症の初期反応ではないかとも考えられている。

一方、MZへのAAアミロイド沈着は病変周囲のマクロファージにも影響を与えることが報告されている。Lundmarkらは、MZに沈着したアミロイドの周囲ではアミロイドを貪食するMZMMs、MZMsおよびRPMsが観察されること、および、アミロイドの沈着と同時期にMZMsが消失することを報告し、これらのマクロファージはMZに沈着したアミロイドを貪食により分解していると推察した⁴⁶。さらに、MZMsが消失した原因は沈着したアミロイドによる物理的圧迫、あるいは貪食したAAアミロイドの細胞毒性による細胞死ではないかとも推察しているが、細胞死に至る機序およびその意義は十分解明されていない。

AAアミロイドーシスでは一般的に沈着したアミロイドに対する生体反応が乏しく、アミロイド沈着臓器による周囲組織への影響についてはほとんど報告がない。MZはAAアミロイド沈着の好発部位であるだけでなく、血中分子の変化による影響も受けやすいことから、MZMsの消失にSAAオリゴマーが関与し

ているとも考えられる。このため第3章では、AEF と硝酸銀の投与により AA アミロイドーシスを誘発した IL-1raKO における MZMMs、MZMs、および MZ B cell の動態を経時観察し、MZ の組織学的変化と生体内における AA アミロイドの動態について考察した。

材料と方法

動物

マウスには自由給水させ、ペレット状固形飼料(MS 飼料、オリエンタル酵母)を給餌した。設定温度 23 度±3 度、設定湿度 55%±15%、明期 14 時間 (照明午前 8 : 00~午後 10 : 00)、暗期 10 時間に維持された動物室にて飼育した。

実験デザイン

AA アミロイドーシス群として、第 1 章において経時的に収集したマウス脾臓を用いた。新たに 8 週齢の IL-1raKO に 2%硝酸銀水溶液 500 μ l のみを皮下投与する群および AEF のみを腹腔内投与する群を設け、硝酸銀投与群は炎症刺激から 30 分、4 時間、1, 2, 3, 5, 10, 20, 35, 50 日目に、AEF 投与群は、AEF 投与から 30 分、4 時間、1, 2, 3 日目にそれぞれ 3 匹ずつ安楽死処置し、剖検を行った。常法に従い、10 μ m 厚の脾臓の凍結切片を作製し、各種細胞マーカーおよび抗マウス SAA1.1 C-terminal 抗血清を用いた蛍光免疫染色を行い、MZMs, MZMMs および MZ B cell の動態と AA アミロイドの沈着動態を観察した。全ての実験は東京大学大学院農学生命科学研究科実験動物委員会及び東京大学バイオサイエンス委員会遺伝子組換え実験等専門委員会の承認を受け、東京大学実験動物規約にもとづいて実施した。

蛍光多重染色

採材した脾臓は Tissue-Tek O.T.C Compound (SAKURA, Tokyo, Japan) にて包埋後、-80°C に冷却したヘキサン内で凍結し、クリオスタットにて 10 μ m 厚の凍結切片を作製した。作製した切片は、表 1 に示す 1 次抗体および 2 次抗体、蛍光色素を組み合わせた蛍光多重染色を行った。全ての抗体および蛍光色素とは室温で 1 時間反応させた。染色後、Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA) にて封入後、共焦点レーザー顕微鏡 LSM700 (ZEISS, Jena,

Germany) を用いて観察した。

MZMs および MZMMs の定量

AA アミロイド沈着に伴う MZMMs, MZMs の増減を MZMMs, MZMs のマーカーである CD169, MARCO および SIGN-R1 の陽性面積を用いて定量した。MZMs については SIGN-R1 陽性面積/MARCO 陽性面積比の変化を調べた。誘発処置から 30 分、1, 2, 3, 5, 10, 20, 35, 50 日目の脾臓の凍結切片を作製し、常法に従い、①抗 mouse SAA1.1 C-terminal 抗血清と抗 CD169 抗体、②抗 SIGN-R1 抗体と抗 CD169 抗体、および③抗 MARCO 抗体と抗 CD169 抗体を用いた蛍光二重染色を行った。共焦点レーザー顕微鏡の 200 倍視野にて 1 個体につき 5 個の濾胞を撮影し、陽性部の面積を Image J にて定量した。

結果

MZ の構造と各種細胞のマーカー

IL-1raKO における MZ の正常構造および模式図を図 1 に示す。

MZMMs は CD169、MZMs は SIGN-R1 および MARCO にそれぞれ陽性のマクロファージ、MZ B cell は IgM に強陽性（濾胞 B cell は弱陽性）で、濾胞辺縁洞より外側のリンパ球と判断した。

AA アミロイド沈着に伴う MZMs の変化

誘発処置後 30 分から 1 日目まではアミロイド沈着は認められず、MZMs にも形態的に著変は認められなかった。アミロイド沈着の始まる処置後 2 日目以降、MZMs は急激に減少し、アミロイド沈着量が増加する処置後 10 日目にはほぼ消失した(図 2)。残存する MZMs のサブタイプは、処置後 1 日目では MARCO+SIGN-R1+と MARCO+SIGN-R1^{high} の MZMs とが混在したが、MZMs が減少し始める 2 日目から MZMs がほぼ消失する 10 日目にかけて、残存する

MZMs の大半は MARCO+SIGN-R1^{high} であった。35 日目以降、MZ に沈着したアミロイドは徐々に粗鬆化し、50 日目には MZ の細網線維に沿っての微量沈着のみになると、粗鬆化したアミロイドの隙間に MZMs が再出現した。硝酸銀のみ、および AEF のみを投与したマウスではアミロイド沈着は認められず、処置 2 日目以降も MARCO+SIGN-R1+ と MARCO+SIGN-R1^{high} の MZMs とが混在し、MZMs 数の減少は認められなかった (図 3)。MARCO 陽性面積および SIGN-R1 陽性面積は処置後 2 日目に増加し、MZMs の減少に伴い 2 日目以降、減少した。MARCO 陽性面積は処置 5 日目以降、未処置のマウスよりも有意に減少したが、MZMs の再出現に伴い、35 日目以降徐々に増加した。アミロイド沈着が顕著であった 2-20 日の間、SIGN-R1 陽性面積/MARCO 陽性面積比は高値を示し、特に 2, 5, 10 日目には未処置のマウスよりも有意に高値を示した (図 4、表 2)。

AA アミロイド沈着に伴う MZ B cell の変化

アミロイド沈着が開始した 2 日目以降、MZMs の消失に伴い、MZ B cell も減少した。MZ B cell はアミロイド沈着量が顕著に増加する 10 日目にはほぼ消失したが、MZMs の再出現がみられた 35 日目以降、MZ B cell も粗鬆化したアミロイドの間隙に再出現した (図 5)。50 日目にはアミロイドの層を再び置換するように MZ B cell が集簇した (図 6)。

AA アミロイド沈着に伴う MZMMs の変化

誘発処置後 30 分から 1 日目まで、MZMs と同様に MZMMs にも形態学的に変化は認められなかった。AA アミロイドは誘発処置後 2 日目から認められた。初期の沈着は濾胞内 B cell 領域の細線維に沿う様に始まり、翌日には MZ へと波及した。濾胞内 B cell 領域を走る細線維上には MARCO が顆粒状に発現しており、濾胞内に沈着した細線維状のアミロイド沈着のパターンは細線維の分布

と同様であった(図 7)。誘発処置後 10 日以降、濾胞へのアミロイド沈着は軽微となり、アミロイドは MZ の MZMMs と MZMs の間に限局して沈着した。アミロイド沈着量がピークに達する処置後 20 日目には MZ はアミロイドによりほぼ置換された。アミロイド沈着が濾胞から MZ へと移行する処置後 5 日目前後では、MZMMs の配列に乱れが生じ、不連続な配列を呈するのに対し、濾胞内に沈着したアミロイドが血管周囲に限局する 10 日目以降では MZMMs は濾胞周囲を取り囲むように整然と配列した(図 8)。処置後 15 日目以降、アミロイドが沈着する濾胞内の血管周囲にも CD169 陽性細胞が散見された。20 日目以降、MZMMs には目立った変化は認められなかった。CD169 陽性面積は誘発処置後からわずかに減少し、10 日目を境に再び上昇した。

考察

脾臓 MZ における AA アミロイドの沈着に関するこれまでの報告によると、MZMs が消失する機序としてアミロイド沈着による物理的圧迫あるいはアミロイドの細胞毒性が想定されている⁴⁶。アミロイド沈着に伴う MZMs の消失の場合、アポトーシス小体を貪食するマクロファージなどは認められず、Caspase-3 や Bcl-2, p53 などのアポトーシスマーカーを用いた免疫染色でも陽性像を確認できなかった(データ非掲載)ことから、MZMs の消失がアポトーシスに起因する細胞死である可能性は低いと考えた。また、MZMs の消失はアミロイド沈着量の少ない沈着開始直後から認められたことから、アミロイドによる物理的圧迫に起因する可能性も低いと考えた。

MZMs の表面に発現した SIGN-R1 および MARCO は血中抗原に鋭敏に反応し、抗原を捕捉した MZMs は赤脾髄領域に遊走し、抗原提示を行う¹⁰⁹。同様に補体と結合した可溶性抗原を捕捉した MZ B cell は濾胞内に移行することで濾胞樹状細胞に対し抗原提示を行う⁵⁰。また、MZMs は MARCO を介し、MZ B cell と結合しており、MZMs か MZ B cell のいずれか一方が抗原を認識し、MZ か

ら離脱するともう一方も遊走あるいは消失することが知られている⁵⁰。例えば、マウスの静脈内に *Staphylococcus.aureus* の死菌を投与すると、SIGN-R1 が *S.aureus* と結合し、感作された MZMs は 4-8 時間以内に赤脾髄領域へと遊走することが知られている^{20, 109}。同様に MZ B cell に対する濾胞内移行シグナルである FTY720 を投与すると、4 時間以内に MZ B cell が MZ から消失（濾胞内に移行）し、投与翌日には MZMs の一部も消失することが知られている¹⁰⁹。さらに、MZ B cell の消失よりも MZMs の減少が先行したことから、MZMs がアミロイド沈着時に血中に特異的に生じる何らかの物体を捕捉し、赤脾髄領域へと遊走したものと考えた。You らは MZ B cell の濾胞内移行に伴う MZMs の消失の際には MARCO+SIGN-R1+ の比率が低下することを報告している¹⁰⁹。AA アミロイド沈着に伴う MZMs の減少の際にも SIGN-R1 陽性面積/MARCO 陽性面積比が上昇したことからも、MZMs の変化が先行し、それについて MZ B cell の濾胞内移行が起こったものと推察される。AEF のみ、または硝酸銀のみを投与したマウス脾臓では MZMs の減少がみられなかったことから、同変化は AEF や炎症刺激に付随するものではなく、アミロイド沈着に特異的な変化であると思われた。さらに、第 2 章の結果から、アミロイド沈着が生じる誘発処置後 2 日目には、血中の SAA オリゴマー量が増加することが明らかとなった。したがって、MZMs は SAA オリゴマーに反応したものと考えたが、抗 SAA1.1 C-terminal 抗血清および抗アミロイドオリゴマー抗体による免疫染色では SAA オリゴマーの局在は認められなかった。

アミロイド分解が進む誘発処置後 35 日目以降、沈着したアミロイドの間隙に MZMs の再浸潤を認めた。MZMs は通常では抗原への暴露から数日で再浸潤することから^{46, 109}、重度のアミロイド沈着は MZMs および MZ B cell の回復を妨げるものと推察される。MZ のアミロイドが分解される際にはアミロイドの粗鬆化と単核細胞浸潤を認め濾胞構造は不明瞭になる。また、MZ が消失することにより、赤脾髄に存在する red pulp macrophage (RPMs) が沈着したアミロイド付

近に集簇することから、これまでこの組織像は MZMs, MZMMs および赤脾髄に分布する red pulp macrophage (RPMs) の浸潤による貪食像であると考えられていた⁸⁶。今回の結果より、粗鬆化したアミロイドの間隙に浸潤する細胞の大半は MZ B cell であり、アミロイド沈着によって遊走した MZMs および MZ B cell が MZ に回復し、アミロイドの分解により生じた間隙に再浸潤する組織像であることが示唆された。

抗 SAA1.1 C-terminal 抗血清による蛍光免疫染色により従来のコンゴレッド染色や DAB 発色による免疫染色では検出できなかった微小アミロイドを検出することが可能となった。本章の結果から、脾臓への AA アミロイド沈着は濾胞内部の B 細胞領域の細網線維に沿って始まり、MZ へと波及していくことが明らかとなった。沈着開始時の濾胞へのアミロイド沈着は、濾胞内に MZ B cell が移行する際に MZMMs の配列が乱れ、辺縁洞から濾胞内に流入した血清 SAA が濾胞内の細網線維を足場としてアミロイド凝集巣を形成したと考えた。濾胞内部のアミロイド沈着は MZMMs が濾胞周囲に配列するのと同時期に減少し、それまで間質にびまん性に沈着していたアミロイドは血管周囲へと限局したと思われる。これは、MZMMs が濾胞を取り囲むことで濾胞内への新たなアミロイド沈着を防いだためと推察される。Lundmark らは chlodronate liposome により排除された MZMMs が再生する際に、MZMMs に隣接してアミロイドが沈着したこと、MZMMs の再生とアミロイド沈着とが同時期に起こったことなどから、MZMMs は MZ へのアミロイド凝集に寄与するのではないかと推察している⁴⁶。本章の結果から、MZMMs に隣接するアミロイド沈着は MZMMs によって濾胞内への流入を妨げられた AA アミロイドや SAA オリゴマーが MZ で凝集することで形成されたと考えた。

今回の結果から、アミロイド沈着に伴う MZMs および MZ B cell の減少は AA アミロイドーシスの発症機序に関わる変化ではなく、アミロイド沈着の結果起こる二次的な変化であることが示唆された。また、実験的マウス AA アミロイ

ドーシスに特徴的な MZ へのアミロイド沈着パターンは MZMMs の動態による
ものと考えられた。

要約

実験的アミロイドーシスにおける AA アミロイド沈着は脾臓濾胞辺縁帯 (marginal zone: MZ) に始まる。マウスの MZ には脾動脈の分枝が開口し、血中抗原を捕捉する MZ macrophage (MZMs), MZ metallophilic macrophage (MZMMs) および MZ B cell が分布する。AA アミロイドーシスを誘発したマウスでは静脈内に投与された AEF は一旦 MZ に集積し、アミロイド沈着前に代謝される。また、アミロイド沈着と同時期に MZMs が消失することから、MZMs の消失と AA アミロイドーシス発症との関連が疑われている。そこで、AA アミロイド沈着に伴う MZ の組織学的変化について経時観察し、MZMs、MZMMs および MZ B cell の動態と AA アミロイドーシスの病態との関係性を検討した。

AA アミロイド沈着は誘発処置後 2 日目に濾胞内部から始まり、翌日には MZ に波及した。MZ への沈着は 20 日をピークとし、35 日以降沈着量の低下とともに沈着したアミロイドは粗鬆化した。MZMs は処置後 2 日目に軽度増加し、5 日目以降有意に減少した。その後、アミロイド沈着巣の粗鬆化に伴い、35 日目に再び MZ に出現した。MZ B cell は処置後 5 日目以降減少し、10 日目には消失したが、35 日目には粗鬆化したアミロイドの間隙に再出現した。MZMMs は処置後 10 日目にかけてわずかに減少し、その後再び増加した。平常時 MZMMs は MZ を内張りするように整列するが、処置後 2 日目から 10 日目にかけて配列に乱れが生じた。その後 MZ を内張りするように再び整列した。処置後 10 日目まで、アミロイドは濾胞内外にびまん性に沈着したが、MZMMs の整列とともに濾胞内部の沈着量は低下し、MZ に限局する典型的な沈着パターンを呈した。これらの結果から、MZMs、MZ B cell の消失はアミロイド沈着の結果起こる二次的な変化であり、発症機序との関連は乏しいと推察した。MZMMs についても発症機序との関連は乏しいと思われたが、MZMMs に沿ってアミロイドが沈着することから、濾胞周囲への特徴的な沈着パターンの形成に寄与していると思われた。

表1; 蛍光免疫染色に用いた抗体および蛍光色素

一次抗体	種類	希釈倍率	対象	販売元, 製品番号
Anti-CD169 (MOMA-1) FITC	Rat, m	1:100	MMMs	AbD Serotec, Kidlington, UK, #MCA947F
Anti-SIGN-R1(ER-TR9) Biotinated	Rat, m	1:100	MZMs	BMA Biomedical, Rheinstrasse, Switzerland, #T-2024
Anti-MARCO	Rat, m	1:300	MZMs	AbD Serotec, Kidlington, UK, MCA1849T
Anti-mouse IgM	Goat, p	1:1000	MZ B cell	Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, A90-101A
Anti-SAA C-terminal	Rabbit, p	1:500	AA Amyloid	自作

蛍光標識二次抗体および蛍光色素	種類	希釈倍率	販売元, 製品番号
Anti-goat IgG Alexa 488	Donkey, p	1:200	Invitrogen, Carlshad, CA, #A11055
Anti-goat IgG Alexa 594	Donkey, p	1:200	Invitrogen, Carlshad, CA, #A11058
Anti-rabbit IgG Alexa 488	Goat, p	1:200	Invitrogen, Carlshad, CA, #A11034
Anti-rat IgG Biotinated	Rabbit, p	1:400	Vector Laboratories, Buckingame, CA, #BA-4001
Streptavidin FITC			Vector Laboratories, Buckingame, CA, #SA-5001
Streptavidin Texas Red			Vector Laboratories, Buckingame, CA, #SA-5006
Streptavidin Cy5			Invitrogen, Carlshad, CA, #92008

m; Monoclonal, p; Polyclonal

表2; 抗MARCO抗体、抗SIGN-R1抗体および抗CD169抗体を用いたMZMs, MZMMsの定量

Times or Days	MARCO陽性面積比率±SE	SIGN-R1陽性面積±SE	CD169陽性面積±SE	SIGN-R1 /MARCO±SE
Control (No treatment)	1.17±0.04	0.45±0.07	1.33±0.08	0.38±0.04
30min	1.04±0.13	0.36±0.07	1.60±0.09	0.34±0.06
4h	0.78±0.33	0.37±0.09	1.16±0.30	0.47±0.54
Day1	0.78±0.18	0.28±0.03	1.22±0.14	0.37±0.13
Day2	1.32±0.09	1.31±0.32	0.88±0.22	0.99±0.18*
Day3	1.03±0.23	0.79±0.25	0.98±0.22	0.76±0.46
Day5	0.62±0.07*	1.05±0.14*	1.03±0.09*	1.68±0.47*
Day10	0.34±0.02**	0.38±0.05	0.69±0.10**	1.13±0.22*
Day20	0.49±0.16*	0.45±0.15	1.01±0.12	0.92±0.27
Day35	0.64±0.02**	0.24±0.09	1.13±0.12	0.38±0.14
Day50	0.85±0.07*	0.46±0.06	1.11±0.17	0.54±0.09

*; p<0.05 **; p<0.01 Significantly different from control.

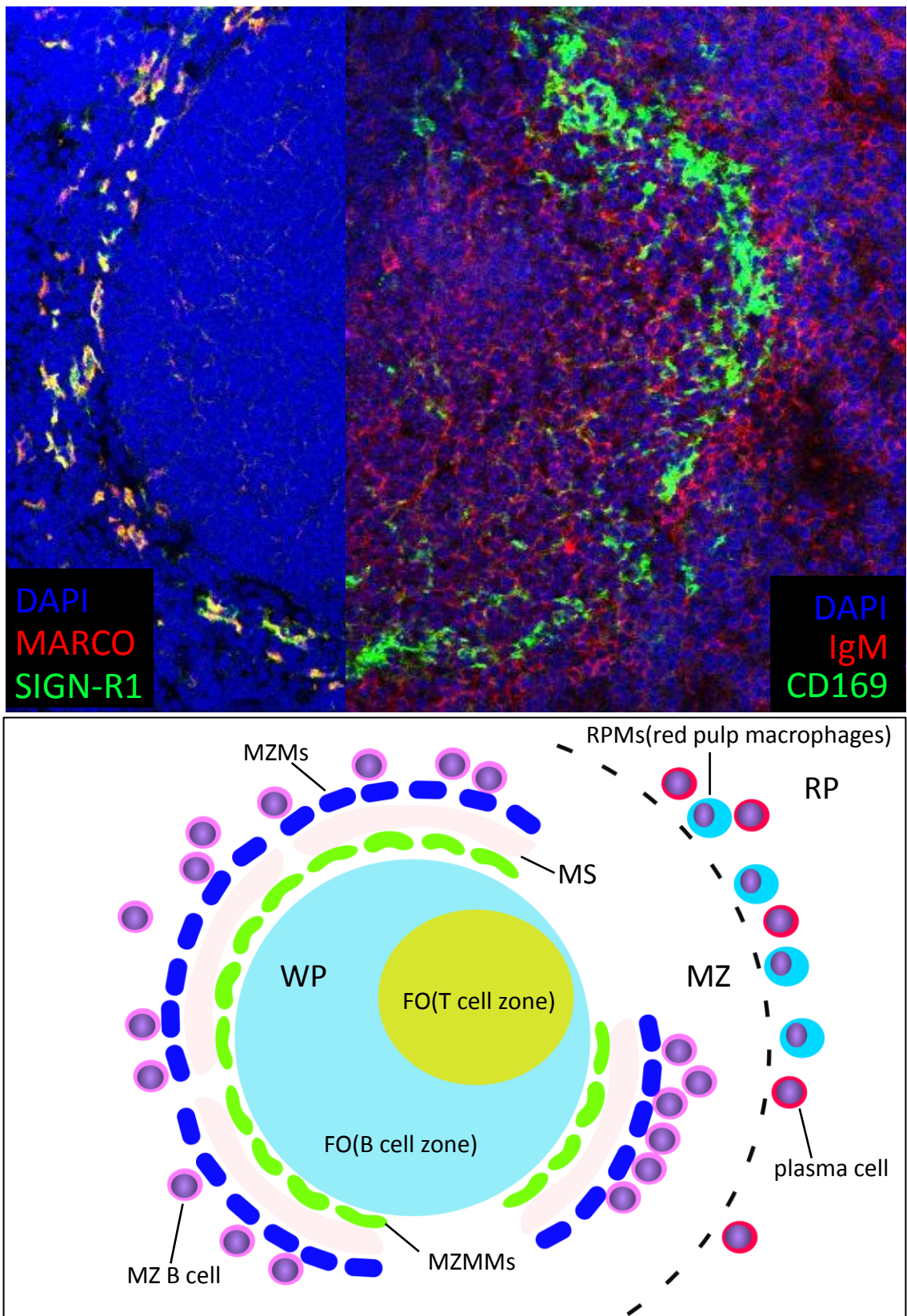


図1 ;正常な脾臓濾胞における各種マーカーの染色性と濾胞構造の模式図
 WP; 白脾髄 RP; 赤脾髄 MZ; 濾胞辺縁帯 FO; 濾胞 MZMMs; marginal zone metallophilic macrophages、MZMs; marginal zone macrophages、MZ B cell; marginal zone B cell、MS; marginal sinus MZMsはMARCO, SIGN-R1陽性、MZMMsはCD169陽性。

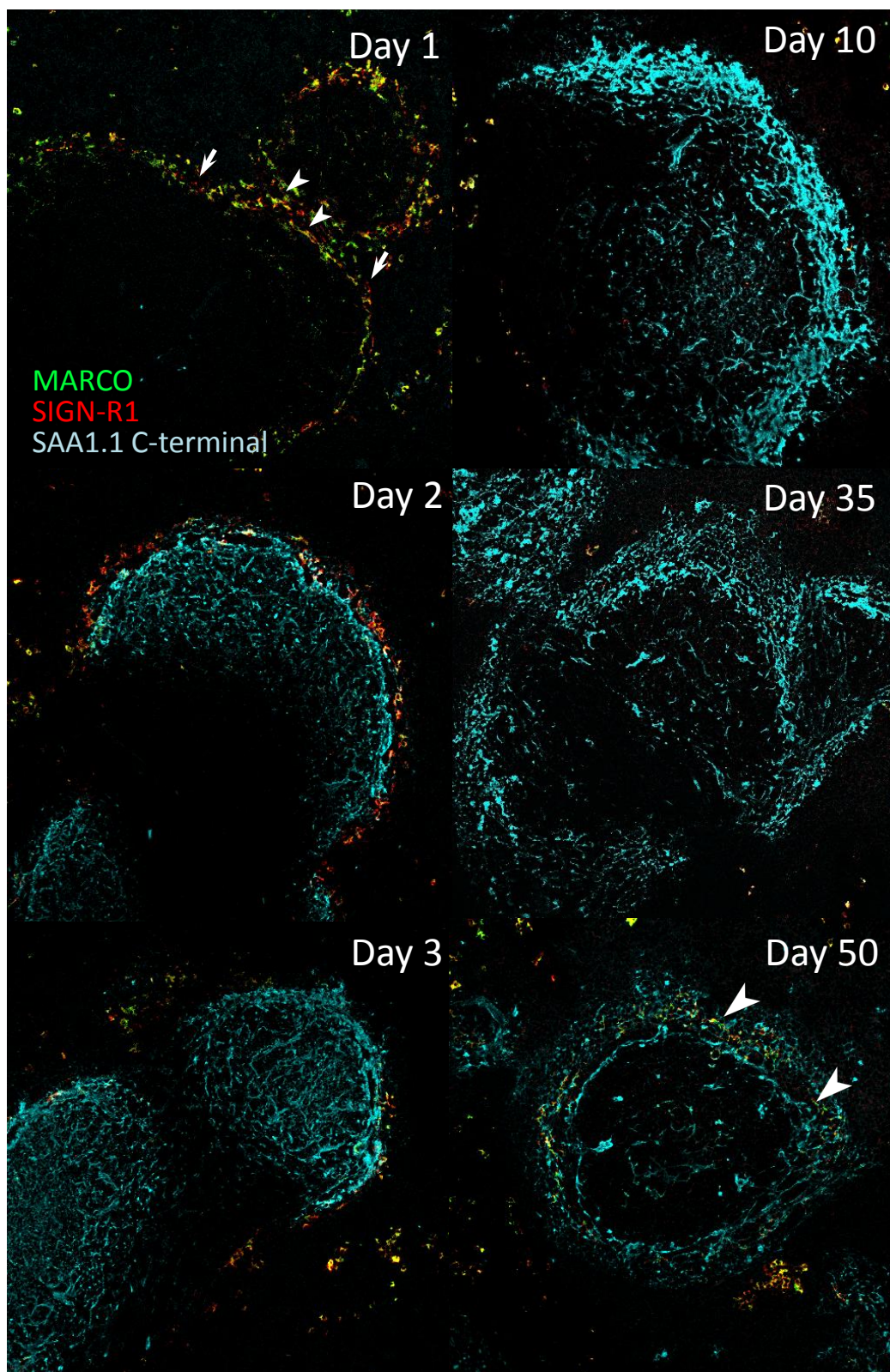


図2 ; AAアミロイド沈着に伴うMZMsの減少

白小矢頭; MARCO⁺SIGN-R1⁺のMZMs、白矢印; MARCO⁺SIGN-R1^{high}のMZMs
 アミロイド沈着が始まる2日目以降、の割合が高まる。アミロイド沈着量の増加に伴い、
 両タイプのMZMsは消失する(誘発処置後10日目)。アミロイド沈着巣が粗鬆化する50
 日目にはMZに沈着したアミロイドの間隙にMZMsが再出現する。(白大矢頭)

AgNO₃のみ

AEFのみ

AgNO₃ + AEF

Day 1

Day 1

Day 1

MARCO
SIGN-R1

Day 2

Day 2

Day 2

Day 3

Day 3

Day 3



図3; AAアミロイドーシスの誘発によるMZMsの減少

AgNO₃のみ、またはAEFのみを投与したマウスではMZMsが保持されているのに対し、AgNO₃とAEFの同時投与によりAAアミロイドーシスを誘発したマウスでは誘発処置後3日目頃からMZMsの減少を認める(白矢頭)。

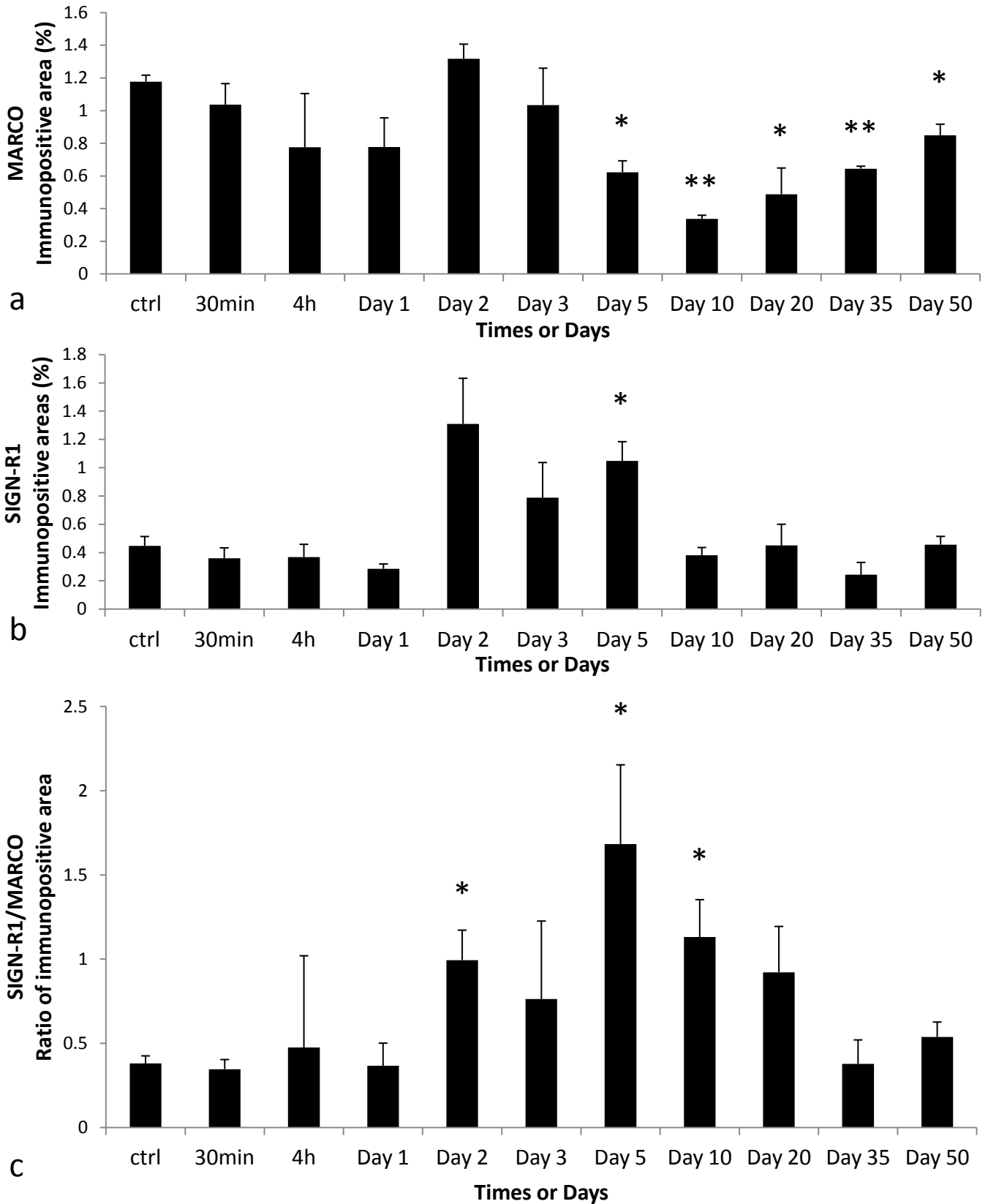


図4; MARCO陽性面積およびSIGN-R1陽性面積の経時変化

a; MARCO陽性面積、b; SIGN-R1陽性面積、c; SIGN-R1陽性面積/MARCO陽性面積

アミロイド沈着が生じる誘発処置後2日目にMARCO, SIGN-R1陽性面積は増加し、沈着量の増加とともに徐々に減少する。陽性面積の低下は処置後10日目が最も顕著であり、MZMsの回復に伴い、20日目以降徐々に増加する。**, $p < 0.01$, *, $p < 0.05$

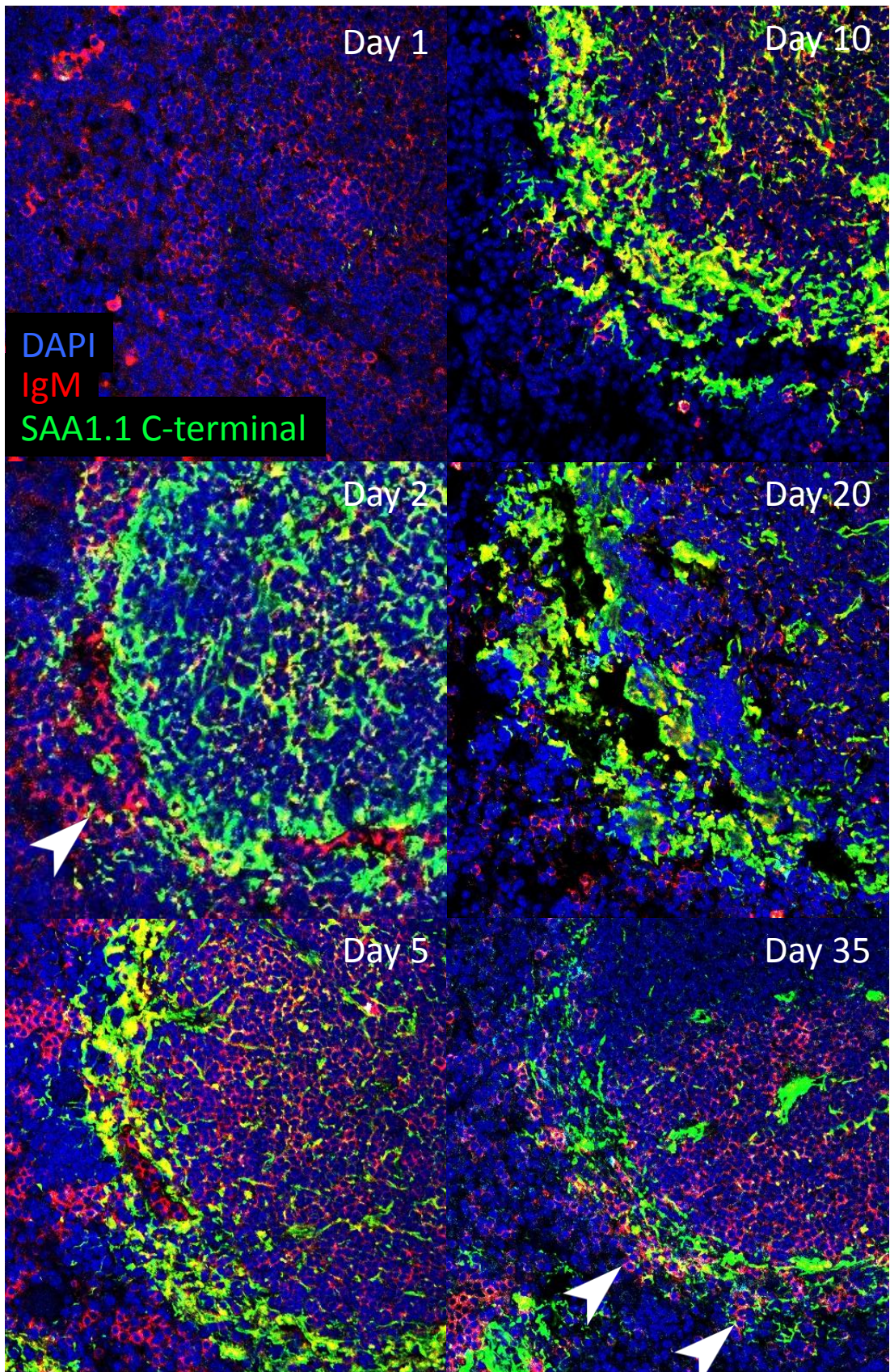


図5; AAアミロイド沈着に伴うMZ B cellの減少

白矢頭; MZ B cell

MZ B cellは処置後10日以降消失し、アミロイド沈着巣の粗鬆化する35日目以降、再度出現する。

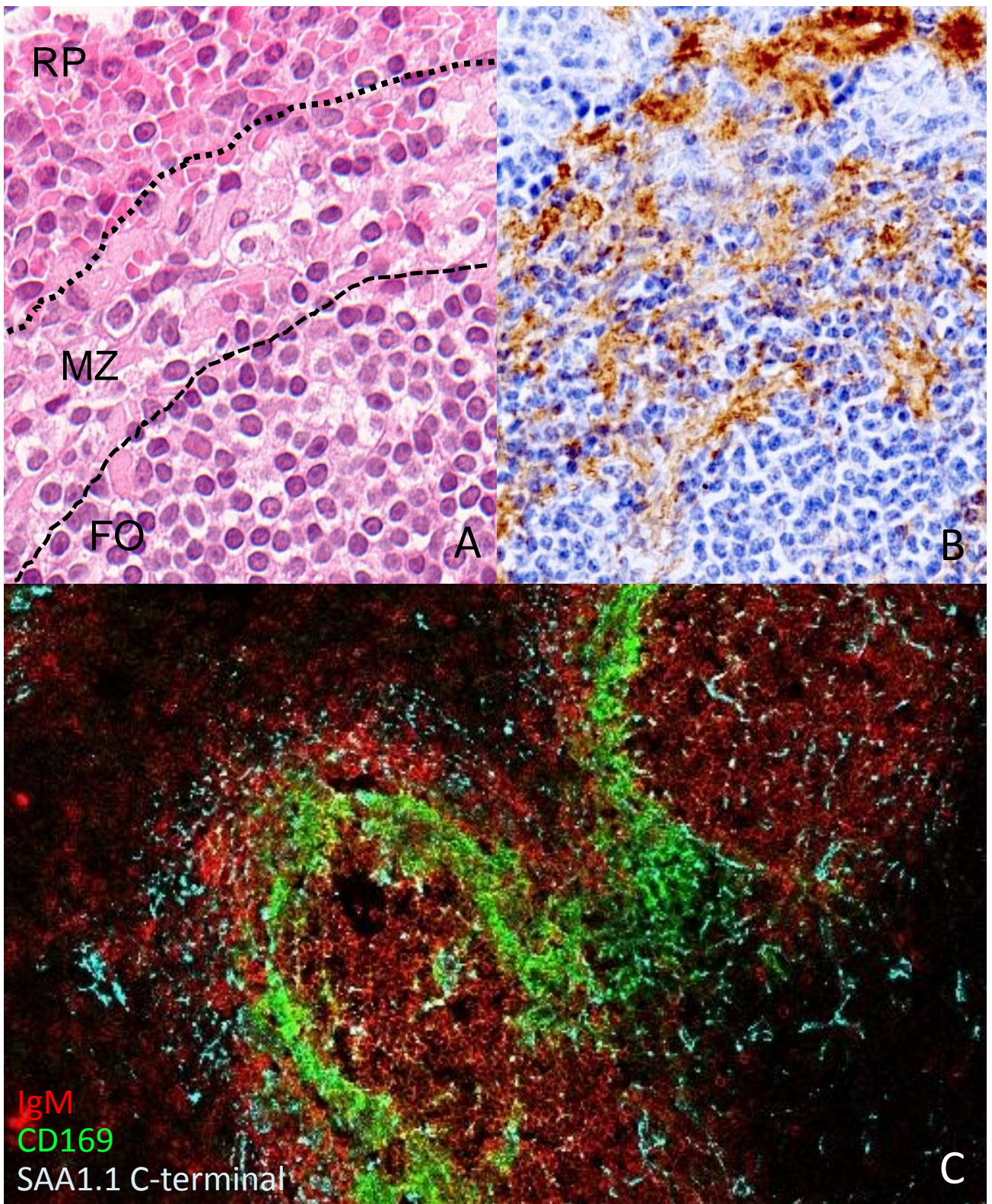


図6; アミロイド消失期のMZの組織像(誘発処置後50日)

A; パラフィン包埋切片、HE染色 B; 抗SAA1,1抗体を用いた免疫染色(DAB発色)

C; 凍結切片、抗IgM抗体、抗CD169抗体および抗SAA1.1 C-terminal 抗血清を用いた蛍光免疫染色

粗鬆化したアミロイドの間隙に再生したMZ B cellおよびMZMsを認める。

RP; red pulp、MZ; marginal zone、FO; follicle

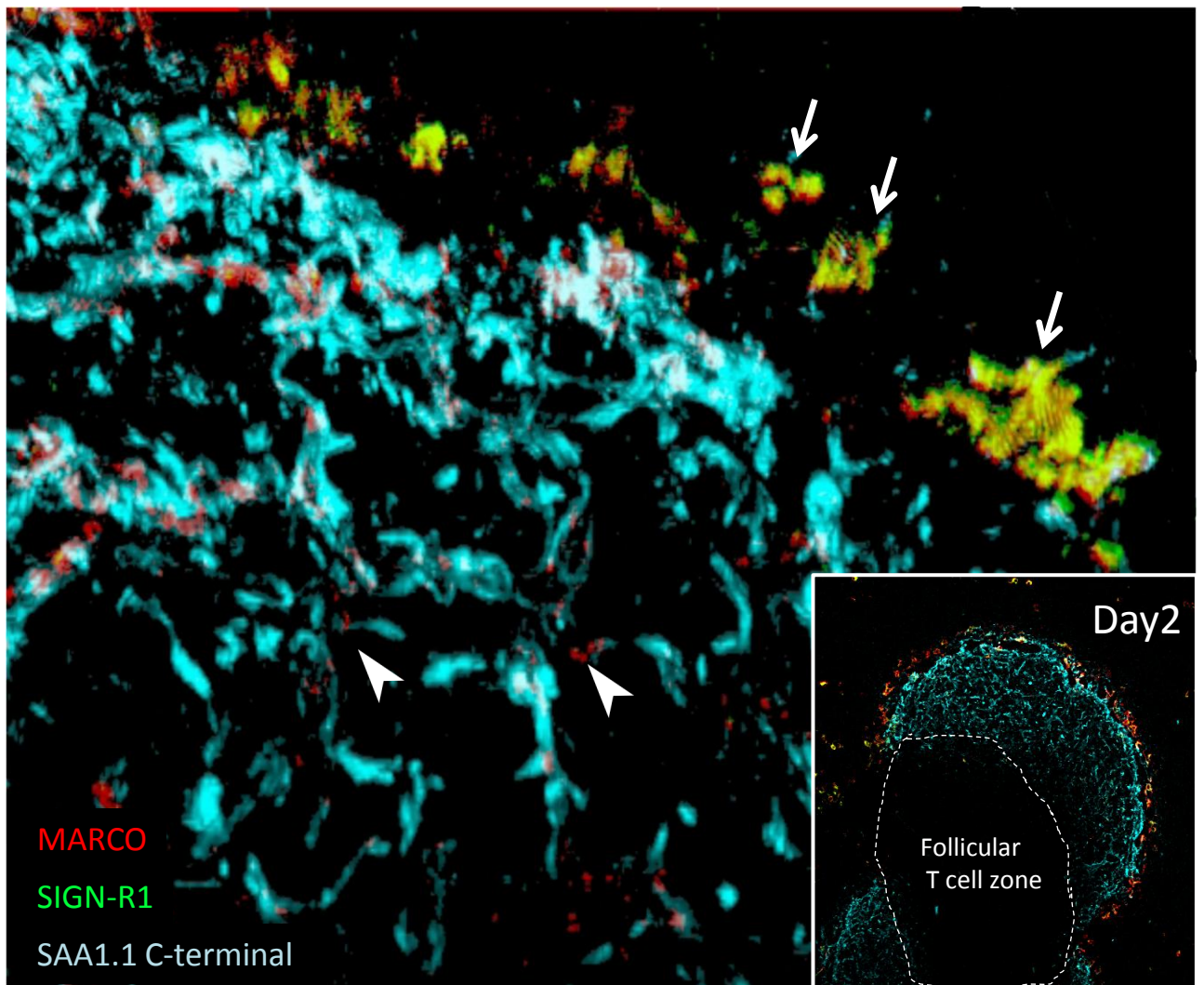


図7; 濾胞に沈着したアミロイド(誘発処置後2日目)

右下挿入図; 脾臓濾胞の弱拡大。写真は濾胞辺縁部の強拡大像。点線で囲われた濾胞T cell領域にはアミロイドが沈着していない。

白矢頭; 濾胞B細胞領域の細線維上に顆粒状に発現するMARCO

白矢印; MARCO⁺SIGN-R1⁺のMZMs

アミロイドの沈着パターンは濾胞B細胞領域の細網線維の走行と同様のパターンを示す。

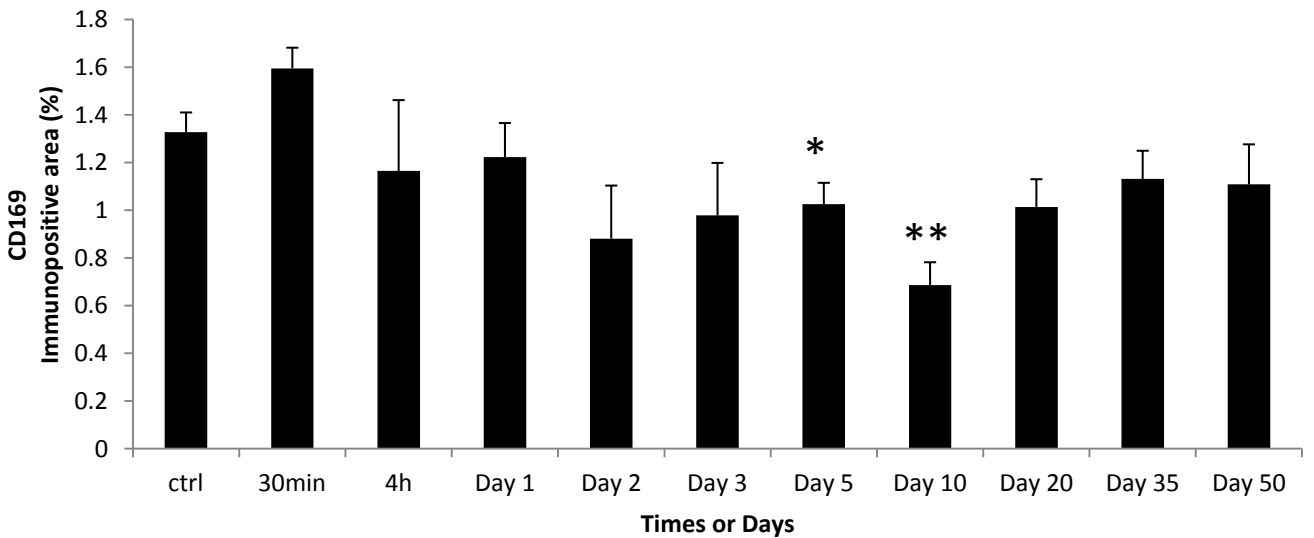
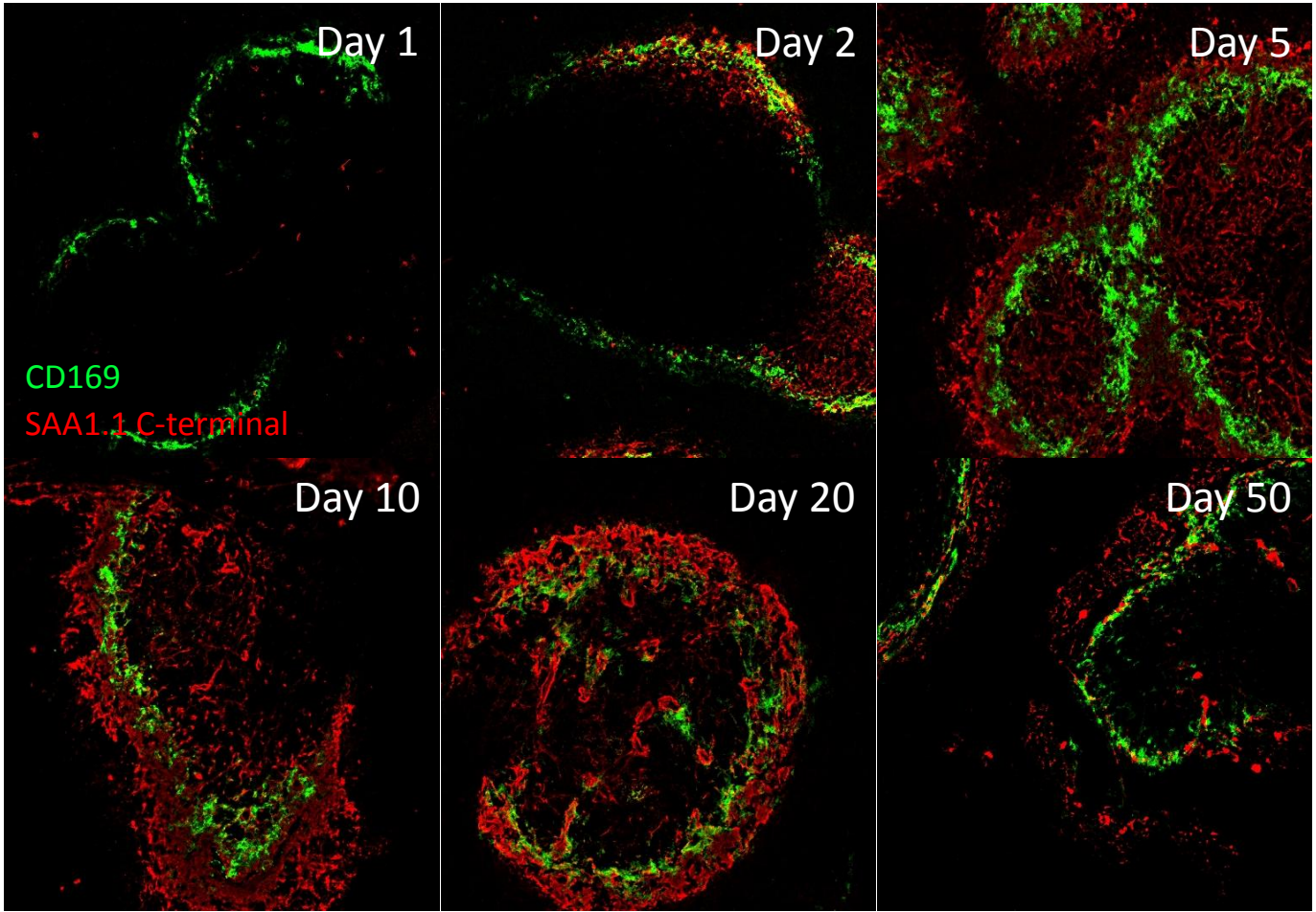


図8; AAアミロイド沈着に伴うMZMMsの変化

MZMMsはアミロイド沈着に伴い軽度減少し、濾胞周囲の配列が乱れる誘発処置後10日目に最も減少する。**, $p < 0.01$, *, $p < 0.05$

第4章

IL-1raKO マウスへのウシおよびネコ AA アミロイドの伝達性

序

これまで報告されている約 31 種のヒトのアミロイドーシスのうち、伝達性が報告されているものはプリオン病のみである^{79, 98}。Westermarck らは AA アミロイドも強い AEF 活性を有することから、プリオン病の病態モデルを踏襲した AA アミロイドーシスの病態モデルを提唱した (seeding モデル)⁴⁷。これを裏付けるように、各種の動物モデルにおいて AA アミロイドーシスの伝達が報告された。Cui らはウシ AA アミロイドがマウスに伝達することを報告し、異なる動物種に由来する AA アミロイドがマウスに伝達する可能性を推察した^{13, 83}。マウスは AA アミロイド伝達に感受性が高いことから、異種間の AA アミロイド伝達はマウスに特有の現象ではないかと考えられていた。しかし、近年、ウシ AA アミロイドがウサギや家禽にも伝達することが示され²⁹、げっ歯類以外の動物においても AA アミロイドーシスの異種間伝達を確認された⁵⁵。

Tojo らが行った食肉検査場における調査により、約 5% のウシ臓器に AA アミロイド沈着が見つかった^{95, 104, 105}。また、Murakami らは特定品種の家禽とワクチンとの組み合わせにより、高率で AA アミロイドが沈着することを報告している^{53, 55}。こうした背景から、AA アミロイドーシスの伝達は、動物実験モデルにおける罹病期間の短縮という現象ばかりでなく、AA アミロイドの摂取による AA アミロイドーシス発症のリスクといった公衆衛生上の問題点としても改めて認識されるようになった^{25, 98}。

AA アミロイドーシスの異種間伝達は、実験系においても再現性が極めて低く、作出される病変も同種間の伝達と比較し、極めて軽度である^{29, 99}。同様の現象はプリオン病においても確認されており、罹病期間や病変分布、感染率などが種によって異なっている^{38, 49}。例えばヒツジのプリオン病であるスクレイピーはヒトに伝達しないとされているのに対し⁹⁶、ウシのプリオン病である BSE は vCJD としてヒトに伝達する^{7, 11, 26}。このような異種間におけるアミロイドーシスの伝達性の違いは「種の壁」と表現される。プリオン病における「種の壁」

はわずか数アミノ酸残基の違いによる立体構造の差と考えられている⁴⁹。一方、AA アミロイドーシスでは、AA アミロイド以外のアミロイド蛋白や^{33, 48}、一次構造が異なる異種由来の AA アミロイド¹⁹、さらには *in vitro* において凝集性を示さない合成ペプチド¹⁰³ の投与によっても AA アミロイドーシスを誘発できる。Higuchi らはこの現象を *cross-seeding* と表現し¹⁰⁶、様々な型のアミロイドの摂取が AA アミロイドーシス発症の新たなリスク因子となるのではないかと提唱しているが²⁵、現在のところ実験系以外ではアミロイド摂取による AA アミロイドーシスの発症を証明する事例はない。さらに、従来の AA アミロイドーシスモデルには異種間の伝達を効率的に再現できるものは存在しない^{29, 99}。そこで本章では、ウシおよびネコの AA アミロイドを用い、IL-1raKO における AA アミロイドーシスの異種間伝達を試み、その病態を解析した。

材料と方法

動物

実験には 8 週齢の IL-1raKO と、対照群として同週齢の BALB/c を用いた。マウスは自由に給水させ、ペレット状固形飼料(MS 飼料、オリエンタル酵母)を給餌した。設定温度 23 度±3 度、設定湿度 55%±15%、明期 14 時間 (照明午前 8 : 00~午後 10 : 00)、暗期 10 時間に維持された動物室にて飼育した。

実験デザインと群分け

本章は 3 つの実験で構成される。実験 1 では IL-1raKO および BALB/c へのウシおよびネコ AA アミロイドの伝達性について検証した。実験 1 の結果を受け、実験 2 ではウシおよびネコ AA アミロイドの伝達により作出される病変を誘発処置から 60 日目まで経時的に観察した。実験 3 ではウシおよびネコ AA アミロイドによって AA アミロイドーシスを誘発したマウスに対し、第 2 章同様、再刺激による AA アミロイドの再沈着を試みた。全ての実験は東京大学大学院農学生命科学研究科実験動物委員会及び東京大学バイオサイエンス委員会遺伝子組換え実験等専門委員会の承認を受け、東京大学実験動物規約にもとづいて実施した。

実験 1 ; AA アミロイドーシスの誘発

8 週齢の IL-1raKO (n=28) および BALB/c (n=25) を、投与する AA アミロイド抽出物の種類 (ウシ AA アミロイド沈着肝臓乳剤、ウシ AA アミロイド抽出物、ネコ AA アミロイド沈着肝臓乳剤およびネコ AA アミロイド抽出物) に基づき各群 n=6-8 となるように 8 群に振り分けた (表 1)。マウスに 500 μ g の AA アミロイド抽出物を腹腔内投与し、同時に 500 μ l の 2%硝酸銀水溶液を皮下投与することで AA アミロイドーシスを誘発した。実験開始から 21 日目にイソフルラン深麻酔下にて右心室より全採血を行い、安楽死処置後、肝臓、脾臓、腎臓、

心臓、副腎、甲状腺、小腸回盲部を採材し、10%中性緩衝ホルマリンにて固定した。常法に従い、4 μ m 厚のホルマリン固定パラフィン切片を作製し、HE 染色、コンゴレッド染色、抗マウス SAA1.1 抗体 (1:100, R&D Systems) を用いた免疫染色を行い、AA アミロイドの分布および沈着量を評価した。各臓器における AA アミロイド沈着量の評価には AI と脾臓におけるアミロイド沈着領域面積を用いた。

実験 2 ; AA アミロイド沈着量の経時変化

8 週齢の IL-1raKO (n=45) に、500 μ g のウシおよびネコの AA アミロイド沈着肝臓乳剤および 500 μ l の 2%硝酸銀水溶液を投与し、AA アミロイドーシスを誘発した。誘発処置から、5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 日目に 3-5 匹のマウスを安楽死処置し、剖検した。肝臓、脾臓、腎臓、心臓、副腎、甲状腺、小腸回盲部を採材し、10%中性緩衝ホルマリンにて固定した。常法に従い、4 μ m 厚のホルマリン固定パラフィン切片を作製し、HE 染色、コンゴレッド染色、抗マウス SAA1.1 抗体 (1:100, R&D Systems) を用いた免疫染色を行い、AA アミロイドの分布および沈着量を AI により評価した。

実験 3 ; 再刺激による AA アミロイドの再沈着

8 週齢の IL-1raKO (n=9) および BALB/c (n=6) に対し、500 μ g のウシおよびネコの AA アミロイド沈着肝臓乳剤および 500 μ l の 2%硝酸銀水溶液を投与し、AA アミロイドーシスを誘発した。誘発処置から 50 日目に 300 μ l の 2%硝酸銀水溶液を皮下投与した (再刺激)。再刺激と同日に開腹し、脾臓の一部を切除生検した。誘発処置から 60 日目に安楽死処置後、肝臓、脾臓、腎臓、心臓、副腎、甲状腺、小腸回盲部を採材し、10%中性緩衝ホルマリンにて固定した。常法に従い、4 μ m 厚のホルマリン固定パラフィン切片を作製し、HE 染色、コンゴレッド染色、抗マウス SAA1.1 抗体 (1:100, R&D Systems) を用いた免

疫染色を行い、AA アミロイドの分布および沈着量を評価した。AA アミロイド沈着量の評価には AI と脾臓におけるアミロイド沈着領域面積を用いた。

AA アミロイド抽出物 (AEF) の作製

ウシおよびネコの AA アミロイドーシス症例の肝臓より、肝臓乳剤および AA アミロイド抽出物の 2 種類の AEF を作製した。肝臓乳剤は、1g の肝臓に 10ml の 0.01M PBS を加え、氷冷下にてホモジナイザーを用い、各 30 秒間 3 回破碎した。AA アミロイド抽出物は Pras らの方法⁶⁷に改良を加えた以下の手法を用いて作製した。1g の肝臓に 10ml の生理食塩水を加え、氷冷下にてホモジナイザーを用い、各 30 秒間 3 回破碎した。懸濁液は超遠心機にて 4°C、40,000g、20 分間遠心した後、上清を抜去した。得られた沈渣に 10ml の生理食塩水を加え、再度同様の条件でホモジナイズした。遠心後の上清の 280nm 波長光の吸光度が 0.075 以下になるまでホモジナイズと超遠心を繰り返した。最終的に、得られた沈渣は 10ml の蒸留水を加えてホモジナイズし、懸濁状態で 4°C 条件下にて一晩静置した。同懸濁液を超遠心機にて 4°C、30,000g、20 分間遠心し、上清を回収した (分画 1)。沈渣は再度 10ml の蒸留水とともに懸濁し、同様の条件にて超遠心し、上清を回収した (分画 2)。分画 1 と 2 を合わせ、超遠心機にて 4°C、45,000g、1 時間の条件にて遠心し、この沈渣を蒸留水にて総蛋白量が 1mg/ml になるように希釈し、これを AA アミロイド抽出物とした。肝臓乳剤および AA アミロイド抽出物は使用時まで -80°C にて凍結保存した。

ウェスタンブロット

肝臓乳剤および AA アミロイド抽出物は 160g、5 分間遠心し、上清と等量の 5% の 2-メルカプトエタノール加 Laemmli サンプルバッファーとともに 99°C で 5 分間加熱処理した。サンプルは 15% ポリアクリルアミドゲルを用い、室温、20mA 定電圧の条件下にて 90 分間泳動した後、あらかじめメタノールにて親水

処理した PVDF 膜に、室温、20V 定電圧の条件下にて 60 分間転写した。転写後、膜を TBST (0.05% Tween-20 および 137mM NaCl を含む 20mM Tris-HCl 緩衝液、pH7.5) にて 10 分 3 回洗浄し、1%スキムミルクを含む TBST にて 1 時間ブロッキングを行った。ブロッキング後、膜は抗ヒト AA 抗体 (1:5000, Kyowa)、抗マウス SAA1.1 抗体 (1:5000, R&D Systems) と 4°Cにて一晩反応させた。膜を TBST にて 10 分 3 回洗浄し、HRP 標識抗マウス IgG 二次抗体 (1:5000, GE Healthcare)および HRP 標識抗ヤギ IgG 二次抗体 (1:5000, GE Healthcare) と室温にて 1 時間反応させた。反応後、膜を TBST にて 10 分 3 回洗浄し、ECL Prime 化学発光試薬 (GE Healthcare) と反応させた後、ChemiDoc XRS+ System (Bio-rad Life Science) および画像解析ソフト Image Lab (Bio-rad Life Science) を用いて陽性バンドを検出した。

組織検索および AI による沈着アミロイドの定量化

各臓器におけるアミロイド沈着量の評価は、コンゴレッド染色を行った切片を偏光顕微鏡下で観察し、各臓器におけるアミロイド沈着量を以下の 4 段階でスコア化することで行った (0; 沈着なし 1; 軽度の沈着 2; 中等度の沈着 3; 高度の沈着)。検索した 7 つの臓器におけるスコアの総和を AI とした。

アミロイド沈着面積による定量

抗マウス SAA1.1 抗体 (1:400, R&D Systems) および 2 次抗体にビオチン標識抗ヤギ IgG 抗体 (1:400, BETHYL) を用いた LSAB 法にて免疫染色を行ったのち、顕微鏡下にて 1 個体あたりランダムに 10 視野を撮影し、視野中に占める陽性部分の比率を画像解析ソフト Image J を用いて定量化した。

ウシ、ネコおよびマウス AA アミロイドの同定

投与したウシおよびネコ AA アミロイドとマウスに沈着した AA アミロイドと

の関係性を確認するため、ウシ AA アミロイドに特異的なラット抗ウシ AA アミロイド抗血清 (1:200, 自作抗血清)、ネコ AA アミロイドに特異的なウサギ抗ネコ SAA23-32 抗血清 (1:300, 自作抗血清)、マウス AA アミロイドに特異的なウサギ抗マウス SAA1.1 C-terminal 抗血清 (1:500, 自作抗血清) を用いた免疫染色を行い、これら AA アミロイドを同定した。

SAA アミノ酸配列

データベース上に報告されているマウス SAA1.1(#P05366)^{14, 44}、SAA2.1(#P05366)²⁴、ウシ SAA (#P35541)^{71, 102} およびネコ SAA (#Q1T770)^{34, 92} の配列をもとに、アライメント作製ソフト Clustal X を用いて SAA アミノ酸配列を比較した。

データ解析

AI、アミロイド沈着面積および血清中の SAA 値に関しては Student の *t* 検定を用い、 $p < 0.05$ のとき統計学的に有意であると判断した。

結果

ウェスタンブロット

ウシおよびネコ AA アミロイド抽出物では、抗ヒト AA 抗体との反応により 13.5kDa, 15.3kDa, 16.7kDa のバンドが検出された。ウシ肝臓乳剤との反応では 28.0kDa、ネコ肝臓乳剤との反応では 13.0kDa の位置に陽性バンドを認めた。これらのバンドパターンは、マウス肝臓乳剤およびマウス AA アミロイド抽出物のバンドパターンと類似していた (図 1)。

実験 1; AA アミロイドーシスの誘発

IL-1raKO ではウシ肝臓乳剤投与群で 5/6 (83%)、ウシ AA アミロイド抽出物

投与群では 3/8 (38%)、ネコ肝臓乳剤投与群で 2/6 (33%)、ネコ AA アミロイド抽出物投与群で 7/8 (88%) の個体において肝臓および脾臓にアミロイド沈着を認めた。

BALB/c ではウシ肝臓乳剤投与群で 1/6 (17%)、ネコ AA アミロイド抽出物投与群で 2/7 (29%) の個体において脾臓にアミロイド沈着を認めた。ウシ AA アミロイド抽出物投与群およびネコ肝臓乳剤投与群ではアミロイド沈着は認められなかった (表 1)。

AA アミロイドは脾臓濾胞周囲に限局して沈着していた。ウシ AA アミロイド投与群では沈着量はごく僅かで、ネコ AA アミロイド投与群でも沈着量は僅かであったが、ウシ AA アミロイド投与群と比較すると、アミロイド沈着を認める濾胞が多かった。これらのアミロイドはコンゴレッド染色偏光顕微鏡下にてアップルグリーンの二重屈折偏光を呈し、免疫染色にてマウス SAA1.1 陽性であった (図 2)。ラット抗ウシ AA 抗血清およびウサギ抗ネコ SAA23-32 抗血清を用いた免疫染色の結果、沈着した AA アミロイドは陰性であった (図 3)。マウス AA アミロイドを AEF として投与した群と比較したところ、IL-1raKO および BALB/c のいずれにおいてもウシおよびネコ AA アミロイド投与群の AI は有意に低かった (図 4)。

また、IL-1raKO は BALB/c よりも高い発症率を示した。AI による評価では、ウシ肝臓乳剤投与群間 (IL-1raKO: 1.05 ± 0.51 、BALB/c: 0.17 ± 0.15) およびネコ AA アミロイド抽出物投与群間 (IL-1raKO: 1.05 ± 0.51 、BALB/c: 0.17 ± 0.15) において IL-1raKO は BALB/c よりも有意に高い AI を示した。脾臓濾胞周囲におけるアミロイド沈着面積を用いた評価では有意差は認められなかった (図 4)。

実験 2 ; AA アミロイド沈着量の経時変化

ウシ AA アミロイド投与群では、誘発処置から 20 日目までアミロイド沈着は認められなかったが、誘発処置後 20 日~30 日に若干のアミロイド沈着を認め、

45 日目以降アミロイド沈着は認められなかった。一方、ネコ AA アミロイド投与群では、誘発処置から 15 日目まではすべての個体においてアミロイド沈着を認めたが、沈着量はわずかであり、病変も概ね脾臓に局限していた。20 日目に AI は一時低下したものの、30 日以降沈着量は再び顕著に増加し、複数臓器への沈着も観察された。60 日目まではすべての個体においてマウス AA アミロイド投与群と同等レベルのアミロイド沈着を認めた (図 5)。

実験 3 ; 再刺激による AA アミロイドの再沈着

IL-1raKO の、ウシおよびネコ AA アミロイド投与群では、それぞれ 3/4 (75%) および 5/5 (100%) のマウスで全身臓器に重度のアミロイド沈着を認めた (表 3、図 6)。再刺激によって作出された病変の組織学的特徴は、第 2 章においてマウス AA アミロイド投与後に再刺激を行ったものと同様であった。ウシ AA アミロイド投与群のうち、再刺激時にアミロイド沈着を認めなかった 1 個体についても、再刺激処置 10 日後 (誘発処置から 60 日目) の剖検時には重度の AA アミロイド沈着を認めた。ネコ AA アミロイドおよびウシ AA アミロイド投与群において再刺激から 3 日以内に全身への重度のアミロイド沈着を伴い急死する個体が各 1 例ずつ認められた。これらの個体は死後変化により正確な病態の評価が困難であったことから評価からは除外したが、いずれも重篤なアミロイド沈着を伴っていた。再刺激群では、単回刺激群と比較し、ウシ AA アミロイド投与群、ネコ AA アミロイド投与群ともに有意な AI の増加を認めた (表 3、図 7) が、沈着面積では、両群に有意差は認められなかった。

一方 BALB/c では、ウシ AA アミロイド投与後に再刺激を行ってもアミロイド沈着は認められなかったが、ネコ AA アミロイド投与群では 3 個体のうち 2 個体において、再刺激による重度のアミロイド沈着を認めた。これらの個体では、再刺激時において極めて微量のアミロイド沈着がみられた。再刺激によるアミロイド沈着量は IL-1raKO 同様増加する傾向にあったが、AI および沈着面

積において、有意差は認められなかった（図 7）。

SAA アミノ酸配列

マウス SAA のうち、アミロイド原性の高い SAA1.1 (#P05366) とアミロイド原性の低い SAA2.1 (#P05366) とのアミノ酸レベルでの相同性は 93%であり、8 箇所のアミノ酸残基が異なっていた。一方、マウス SAA1.1(#P05367)とウシ SAA (#P35541) およびネコ SAA (#Q1T770) とのアミノ酸レベルでの相同性はそれぞれ 64%および 68%であり、マウス SAA1.1 の 89 番目の Gly と 90 番目の Arg との間にはネコ SAA では-Phe-Phe-Arg-His-Gly-Asn-Ser-Gly-の 8 アミノ酸残基が、ウシ SAA では-Pro-Leu-Phe-Lys-Gly-Thr-Thr-Ser-Gly-の 9 アミノ酸残基が挿入されていた（図 8）。

考察

これまでの AA アミロイドーシスの異種動物間伝達実験の結果から、その発症率および沈着するアミロイドの程度は極めて低いとされている。前章までのマウス AA アミロイドによる誘発実験の結果から、IL-1raKO は誘発処置後 20 日前後で AI 値がピークになると予想し、本章の実験 1 を行ったが、結果は既報と同様で、ウシおよびネコ AA アミロイドの投与ではいずれも微量のアミロイド沈着を認めるのみであった。しかしながら、経時観察を行った実験 2 の結果から、ネコ AA アミロイドでは誘発処置後 20 日でアミロイド沈着量が一旦減少し、30 日以降急激に増加することが明らかとなった。ネコ AA アミロイド投与群では、誘発処置から 15 日目まではアミロイド沈着は脾臓に局限していたが、30 日目以降は全身臓器に沈着したことから、初期に脾臓に沈着した AA アミロイドが一旦分解され、分解されたアミロイド（組成はマウス AA アミロイドと同等）が重合核として全身へのアミロイド沈着を誘発したものと考えられた。第 2 章で、沈着したアミロイドは動的平衡状態にあり、分解と再沈着を繰り返

すことで病態が進行するという仮説を立てたが、本結果はそれを支持するものであった。一方で、ウシ AA アミロイド投与群では、軽微かつ散発的に脾臓濾胞の一部へのアミロイド沈着を認めたのみであった。これらの病変は誘発処置から 20 日目、30 日目に見付き、以降、全身性の AA アミロイドーシスを発症した個体はみられなかった。

再刺激時にアミロイド沈着が認められず、再刺激後の剖検時に重度のアミロイド沈着を認めたマウスでは、単回刺激により沈着した少量のアミロイドが再刺激時には既に分解された状態であったと思われる。また、BALB/c においても再刺激により重度のアミロイド沈着が認められたことから、再刺激によるアミロイド沈着の増強は、軽度の AA アミロイドーシスの個体や、アミロイドが既に消失した個体を検出する際に非常に有用な手段であることが示唆された。また、異種間伝達の場合、沈着するアミロイドは軽微であるにもかかわらず、再刺激によって SAA 値が再度上昇することで致死性的かつ重篤な AA アミロイドーシスを発症したことから、伝達性の低い異種のアミロイドに関してもアミロイドの摂取が AA アミロイドーシス発症のリスクファクターとして重要であることが示唆された。

本章の結果から、ウシ、ネコおよびマウス AA アミロイドでは、マウスに対する伝達性がそれぞれ異なることが示された。ヒトでは SAA1.3 のアイソタイプを有する関節リウマチ患者は AA アミロイドーシスを早期に発症し易いこと⁹³、SAA1.1 に相当する SAA を有さないラットや炎症時に主として SAA3 が産生されるブタで AA アミロイドーシスの報告が極めて少ないこと⁸²などから、SAA の一次配列とアミロイド原性には密接な関係があると言われている。アミロイド原性の高い SAA1.1 と SAA2.1 とでは 8 箇所のアミノ酸配列が異なっていた^{14,52}。特に 46 番目のグリシンが SAA2.1、ウシ SAA およびネコ SAA ではアスパラギンであり、120 番目（アライメント上では 129 番目）のアラニンが SAA2.1、ウシ SAA およびネコ SAA ではアスパラギン酸であった。ウシ SAA

とマウス SAA1.1、ネコ SAA とマウス SAA1.1 とのアミノ酸レベルでの相同性はそれぞれ 64%、68%と両者の違いは4ポイントとわずかであった。ネコ SAA とマウス SAA に共通し、ウシ SAA とはアミノ酸配列が 6 箇所異なっていたが、これらはアミロイド原性の異なるマウス SAA1.1 と SAA2.1 の両方に共通しており、アミロイドの伝達性との関連は低いと思われた。ヒトでは 104 アミノ酸残基からなる SAA1 のうち C 末端側のペプチドが切断された、N 末端側から 76 アミノ酸残基が AA アミロイドの主たる構成成分であることから^{45, 105}、現在では SAA のアミロイド原性は N 末端側の変異によって生じると考えられているが⁹⁷、不明な点も依然として多い。マウスでは全長型の SAA1.1 が主に凝集するが、沈着した AA アミロイドからは長さの短い SAA ペプチドも検出されることから⁸⁶、凝集および分解の過程に SAA の C 末端側が関連している可能性も考えられる。ウシおよびネコの場合、マウス SAA1.1 の 89-90 番目に挿入された 8-9 のアミノ酸残基が、マウス SAA1.1 の C 末端側の変化に関与する可能性も含め、SAA アミノ酸残基の違いが動物種間のアミロイド伝達性に関与していると思われた。

IL-1raKO は AA アミロイドーシスの異種間伝達においても高い再現性を有することが示された。特にネコ AA アミロイドを投与したマウスの AA アミロイドーシス発症率はほぼ 100%であり、異種間伝達モデルとしての利用が期待される。異なる動物種の AA アミロイドによる AA アミロイドーシスは同種の AA アミロイドを用いた場合と比べて初期の病相が異なることから、この時期について詳細に検討することにより、AA アミロイドーシス発症のメカニズムを解明する上で有用な知見が得られると予想される。

要約

AA アミロイドーシスの伝達はこの疾患の発症メカニズムを解明する上で重要な現象である。異種動物間における AA アミロイドーシスの伝達は実験的に成立するものの、これを効率的に再現できるモデルは存在しない。そこで、IL-1raKO へのウシおよびネコ由来の AA アミロイドの伝達を試み、その病態を検討した。AA アミロイドが沈着したウシおよびネコの肝臓乳剤と硝酸銀とを用いて IL-1raKO および BALB/c に AA アミロイドーシスを誘発した。誘発処置から 20 日目のウシアミロイド投与群(cow 群)およびネコアミロイド投与群(cat 群)におけるアミロイド沈着率および沈着量はマウス AA アミロイドを投与した場合よりも低値を示した。IL-1raKO は BALB/c と比較し、高率に異種間における AA アミロイドーシス伝達を再現可能であった。さらに誘発から 60 日目までのアミロイド沈着の過程を経時観察したところ、cat 群では、5 日目と 10 日目、45 日目以降では全ての個体で AA アミロイド沈着が認められ、特に 45 日目以降では重度のアミロイド沈着を認めた。cow 群ではいずれのタイミングにおいてもアミロイド沈着は軽度であった。誘発後 50 日目において再刺激を行った結果、cow 群、cat 群ともに AA アミロイドの重度の再沈着が認められた。これらの結果から、異種由来の AA アミロイドによって誘発される AA アミロイドーシスは軽度であるが、このアミロイドが分解されることで同種間伝達と同様に病状が進行することが示された。また、IL-1raKO は AA アミロイドーシスの異種間伝達モデルとしても有用であることが示された。

表1: 実験1、異種由来のAAアミロイド抽出物の伝達

系統	実験期間 (日)	アミロイド抽出物	発症率 (%)	AI ± SE	AA沈着陽性面積率 (%) ± SE
IL-1raKO	20	ウシ 肝臓乳剤	5/6 (83%)	1.50 ± 0.51*	0.64 ± 1.11
	20	ウシ AAアミロイド抽出物	3/8 (38%)	0.38 ± 0.17	0.37 ± 0.50
	20	ネコ 肝臓乳剤	2/6 (33%)	0.33 ± 0.19	0.04 ± 0.05
	20	ネコ AAアミロイド抽出物	7/8 (88%)	1.25 ± 0.23*	0.41 ± 0.39
BALB/c	20	ウシ 肝臓乳剤	1/6 (17%)	0.17 ± 0.15	0.25 ± 0.55
	20	ウシ AAアミロイド抽出物	0/6 (0%)	0	0
	20	ネコ 肝臓乳剤	0/6 (0%)	0	0
	20	ネコ AAアミロイド抽出物	2/7 (29%)	0.50 ± 0.29	0.44 ± 0.68

Statistical analysis was performed using Student's *t*-test. *, *p*<0.05 significant difference from the corresponding value of BALB/c group.

表2: 実験2、異種由来AAアミロイド抽出物の伝達によるAAアミロイド沈着量の経時的変化

系統	実験期間(日)	匹数	AAアミロイド抽出物	発症率 (%)	AI ± SE
IL-1raKO	5	3	ウシ 肝臓乳剤	0/3 (0%)	0
	10	3	ウシ 肝臓乳剤	0/3 (0%)	0
	15	3	ウシ 肝臓乳剤	0/3 (0%)	0
	20	3	ウシ 肝臓乳剤	2/3 (66%)	0.67±0.27
	30	5	ウシ 肝臓乳剤	2/5 (40%)	0.40±0.21
	45	3	ウシ 肝臓乳剤	0/3 (0%)	0
	60	4	ウシ 肝臓乳剤	0/4 (0%)	0
IL-1raKO	5	3	ネコ 肝臓乳剤	3/3 (100%)	1.00±0.00
	10	3	ネコ 肝臓乳剤	3/3 (100%)	2.33±0.27
	15	3	ネコ 肝臓乳剤	3/3 (100%)	2.67±1.36
	20	3	ネコ 肝臓乳剤	1/3 (33%)	0.33±0.27
	30	3	ネコ 肝臓乳剤	2/3 (66%)	6.67±3.31
	45	3	ネコ 肝臓乳剤	3/3 (100%)	8.00±2.16
	60	3	ネコ 肝臓乳剤	3/3 (100%)	7.00±2.83

表3: 実験3、異種由来のAAアミロイド抽出物によるAAアミロイドの再沈着

系統	匹数	AAアミロイド抽出物	再刺激 (日)	剖検 (日)	発症率 (%)	AI±SE	生検時のAA沈着 陽性面積率(%) ± SE(%)	剖検時のAA沈着 陽性面積率(%) ± SE(%)
IL-1raKO	4	ウシ 肝臓乳剤	50	60	3/4 (75%)	9.50±2.86*	0.55±0.17	1.09±0.44
IL-1raKO	5	ネコ 肝臓乳剤	50	60	5/5 (100%)	16.20±0.82**	1.78±0.29	3.63±0.40
BALB/c	3	ウシ 肝臓乳剤	50	60	0/3 (0%)	0	0	0
BALB/c	3	ネコ 肝臓乳剤	50	60	2/3 (67%)	4.67±2.37*	0.71±0.40	0.61±0.44

Statistical analysis was performed using Student's t-test. *: p<0.05 **: p<0.01 significantly different from the corresponding value of date-matched group.

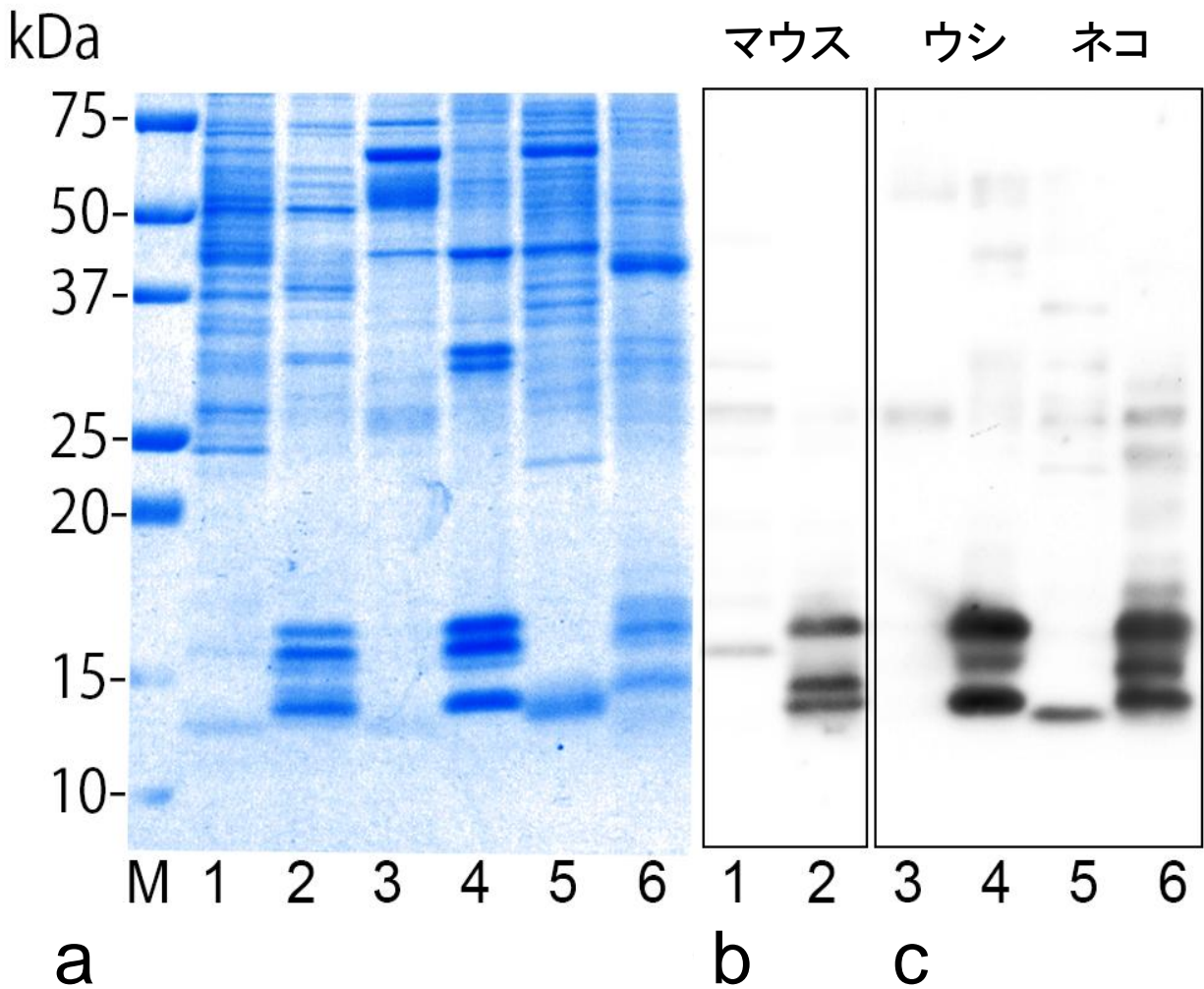


図1 肝臓乳剤およびAAアミロイド抽出物のウェスタンブロット

a; SDS-PAGE b; 抗マウスSAA1.1抗体を用いたウェスタンブロット c; 抗ヒトAA抗体を用いたウェスタンブロット

M: 分子量マーカー

レーン1; マウス肝臓乳剤

レーン2; マウスAAアミロイド抽出物

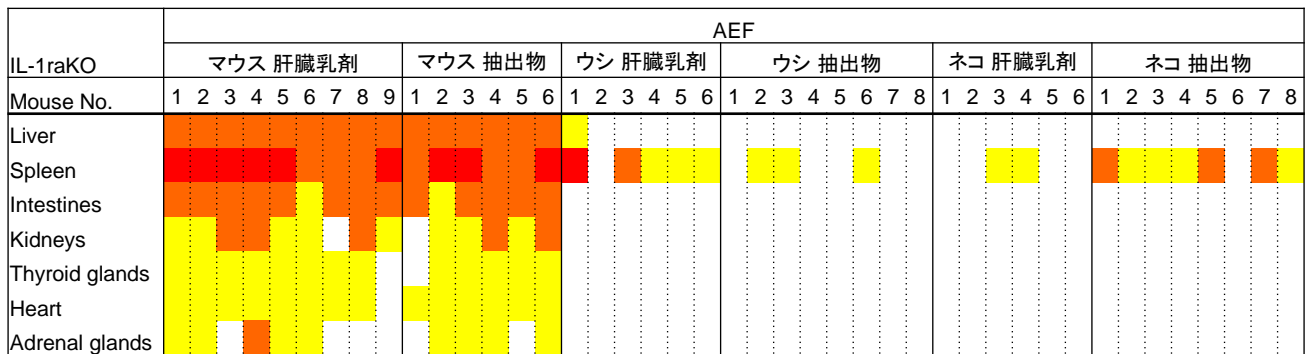
レーン3; ウシ肝臓乳剤

レーン4; ウシAAアミロイド抽出物

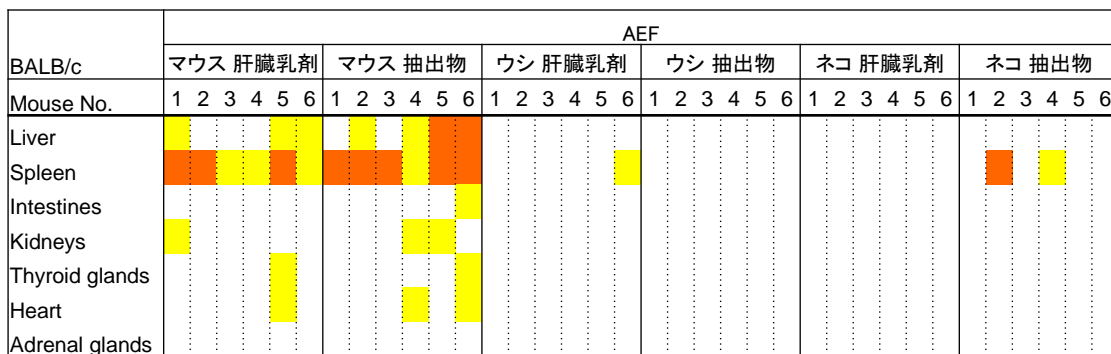
レーン5; ネコ肝臓乳剤

レーン6; ネコAAアミロイド抽出物

ウシとネコのAAアミロイド抽出物には抗ヒトAA抗体と反応する13.5kDa, 15.3kDa, 16.7kDaのバンドを認める。ウシ肝臓乳剤中には28.0kDa、ネコ肝臓乳剤中には13.0kDaの位置に最も明瞭なバンドを認める。これらのバンドパターンはマウス肝臓乳剤およびマウスAAアミロイド抽出物のバンドパターンと類似する。



a



b

図2 ウシおよびネコのAAアミロイドによるAAアミロイドーシスの誘発(ヒートマップ)

a; IL-1raKO、b; BALB/c

各個体における臓器別アミロイド沈着スコア

ウシおよびネコAAアミロイド投与群ではアミロイドは脾臓に限局して沈着する。

■ ; Score 1 ■ ; Score 2 ■ ; Score 3

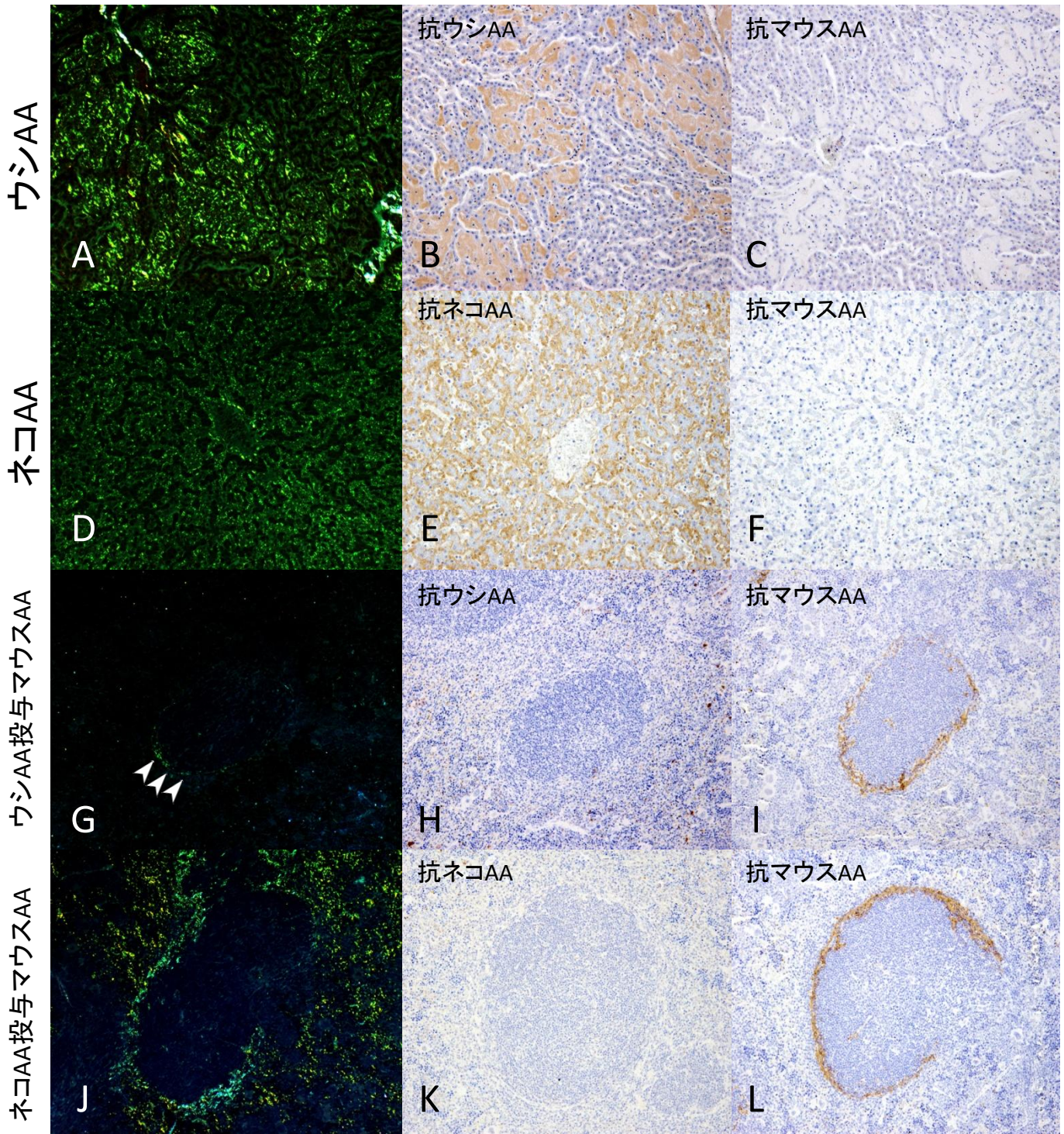


図3 沈着したアミロイドの同定

A-C: ウシAAアミロイド D-F:ネコAAアミロイド G-I: ウシAAアミロイドによって誘発されたマウスのAAアミロイドーシス J-L: ネコAAアミロイドによって誘発されたマウスのAAアミロイドーシス

(A, D, G, J: コンゴールレッド染色偏光観察 B, H: 抗ウシAAアミロイド抗血清を用いた免疫染色 C, F, I, L: 抗SAA1.1C-terminal抗血清を用いた免疫染色 E-K: 抗ネコAAアミロイド抗血清を用いた免疫染色)

ウシおよびネコAAアミロイドによって誘発されたマウスのAAアミロイドーシスではマウスSAA1に由来するAAアミロイドが沈着する。

(白矢頭: 濾胞周囲に沈着したAAアミロイド)

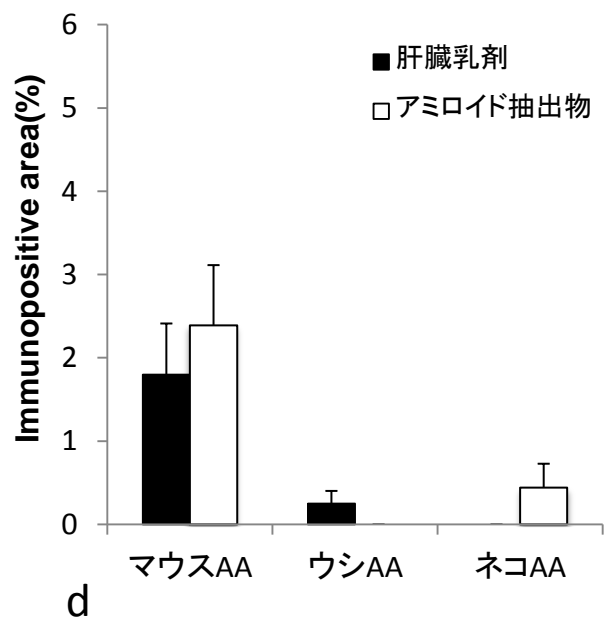
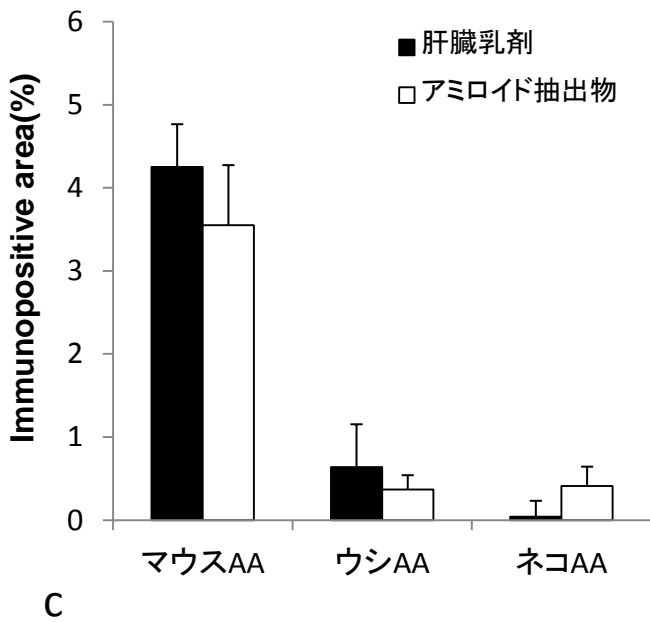
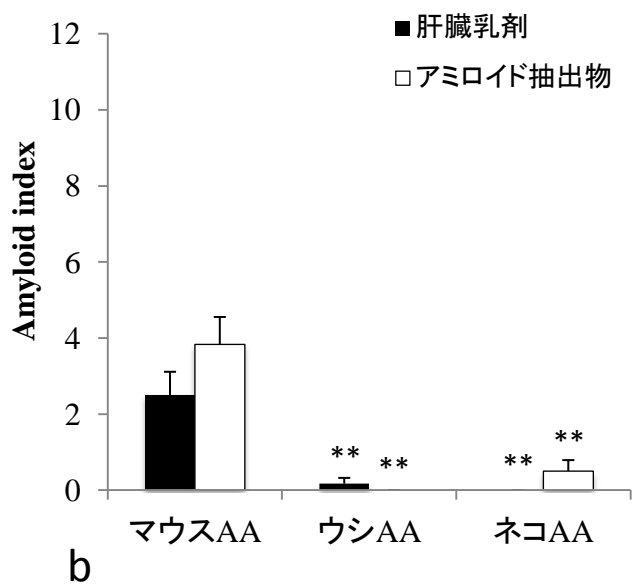
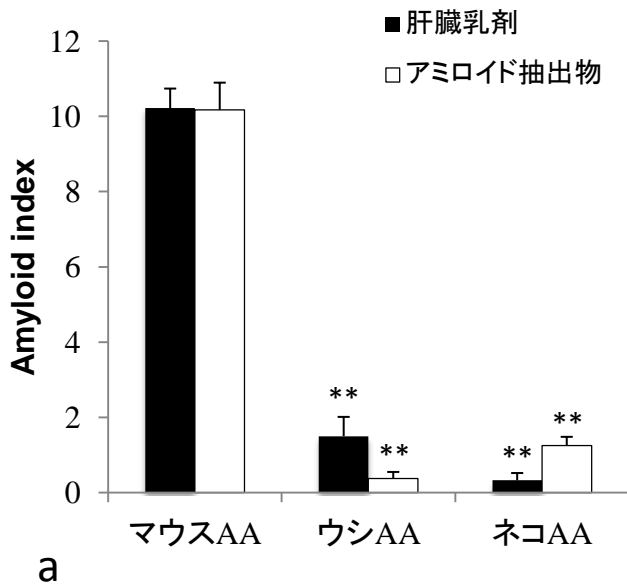


図4 ウシおよびネコのAAアミロイドによるAAアミロイドーシスの誘発

a-b; AIによる評価 (a; IL-1raKO、b; BALB/c)

c-d; 面積定量による評価 (c; IL-1raKO、d; BALB/c)

ウシおよびネコAAアミロイド投与群では、マウスAAアミロイド投与群と比較し、アミロイド沈着量は有意に少ない (**; $P < 0.01$)。

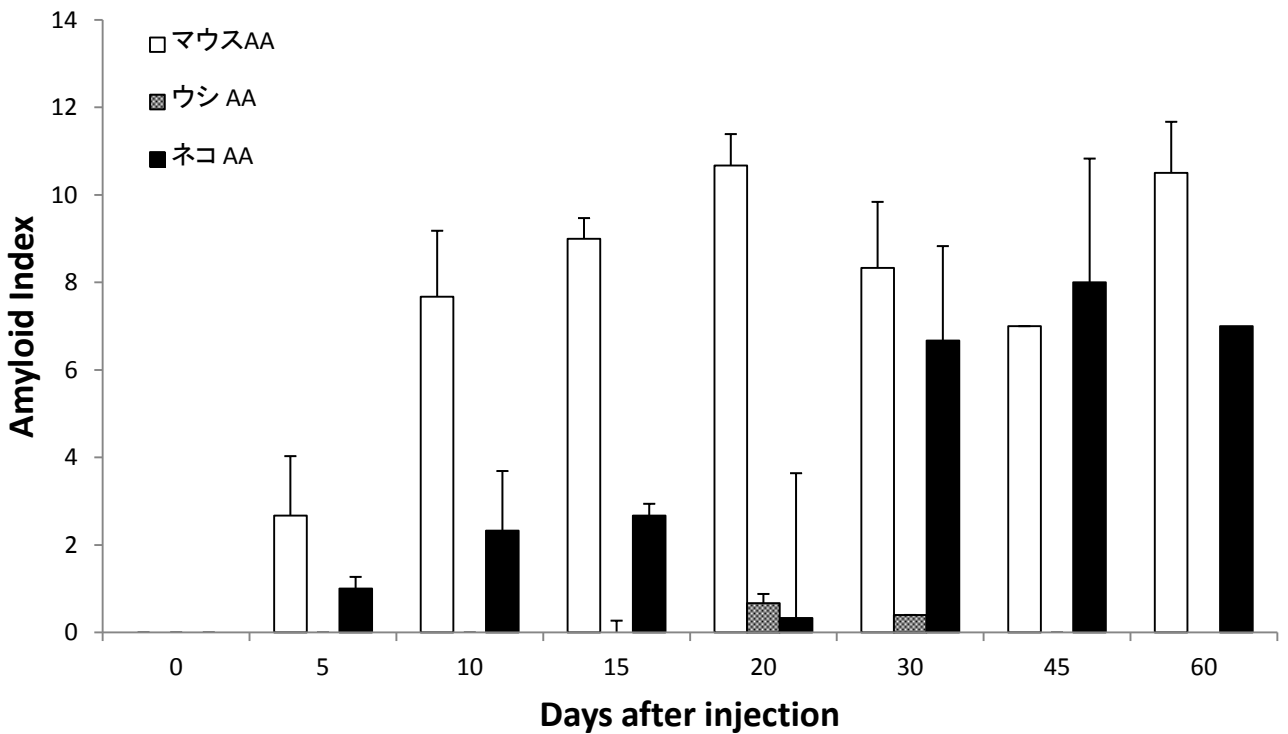


図5 ウシおよびネコAAアミロイドによるAAアミロイドーシスの誘発とアミロイド沈着量 (AI)の経時変化。

ウシAAアミロイド投与群ではマウスAAアミロイド投与群と比較しアミロイド沈着量は軽微であるが、ネコAAアミロイド投与群では誘発処置から30日目以降、マウスAAアミロイド投与群と同等レベルのアミロイド沈着を認める。

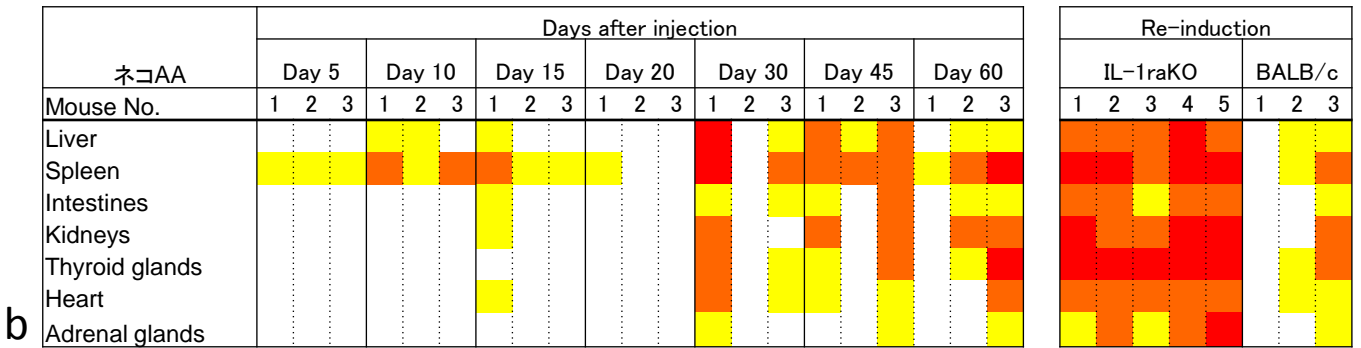
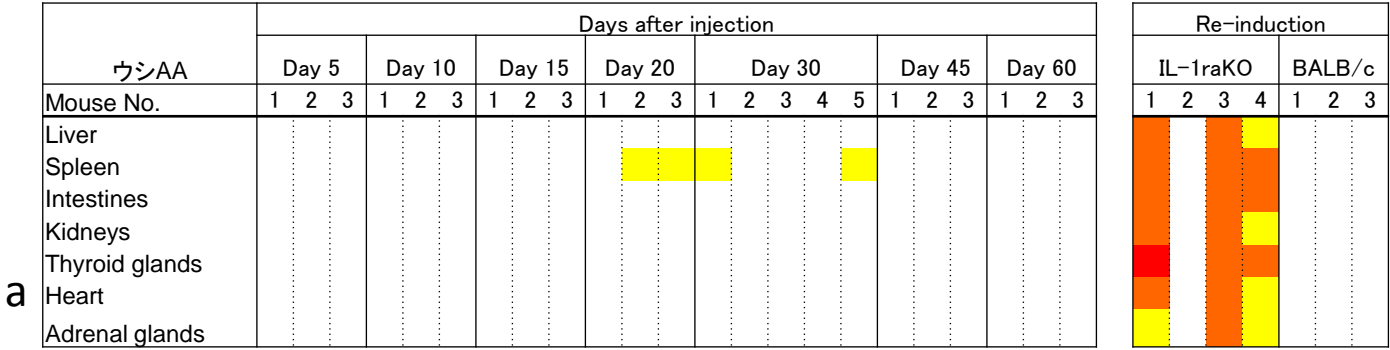


図6 ウシおよびネコAAアミロイドによるAAアミロイドーシスの誘発とアミロイド沈着量 (AI) の経時変化 (ヒートマップ)

a; ウシAA投与群、b; ネコAA投与群

各個体における臓器別アミロイド沈着スコア

ネコAAアミロイド投与群ではアミロイド沈着量の増加する誘発処置後30日以降、アミロイドは全身に沈着する。また、再刺激により重度のアミロイド沈着を認める。

■ ; Score 1 ■ ; Score 2 ■ ; Score 3

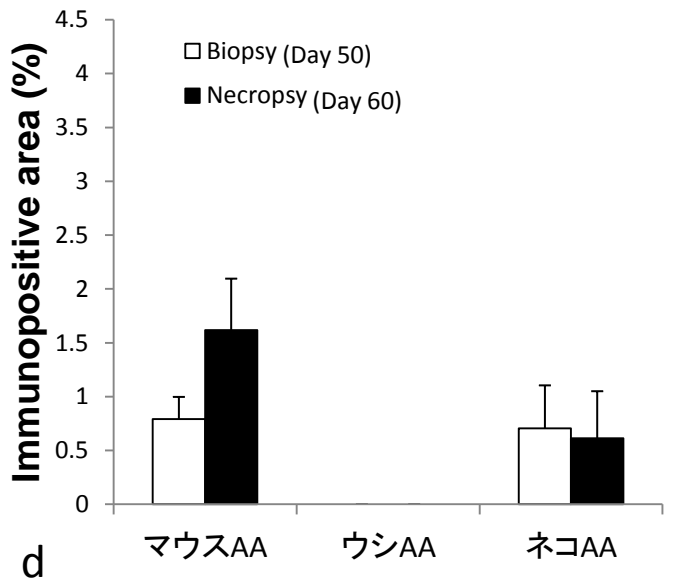
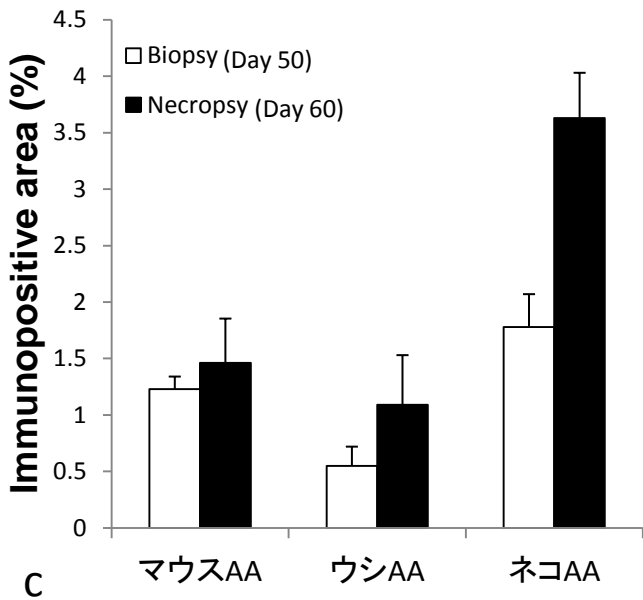
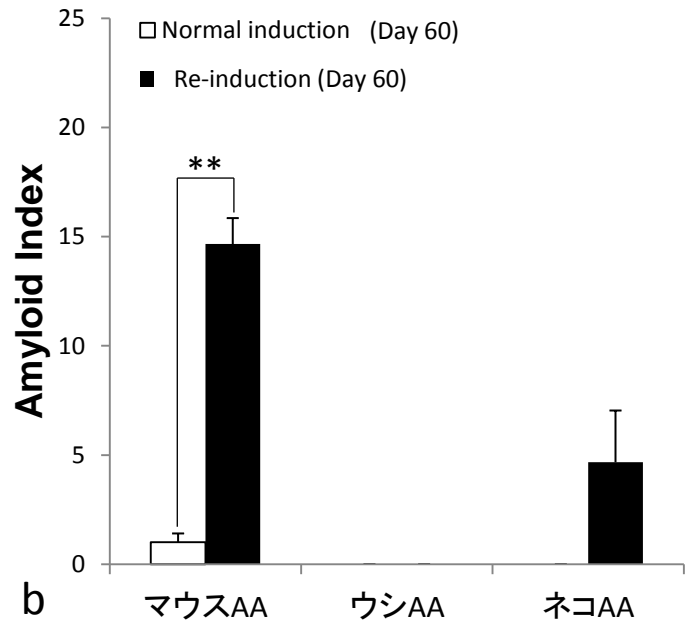
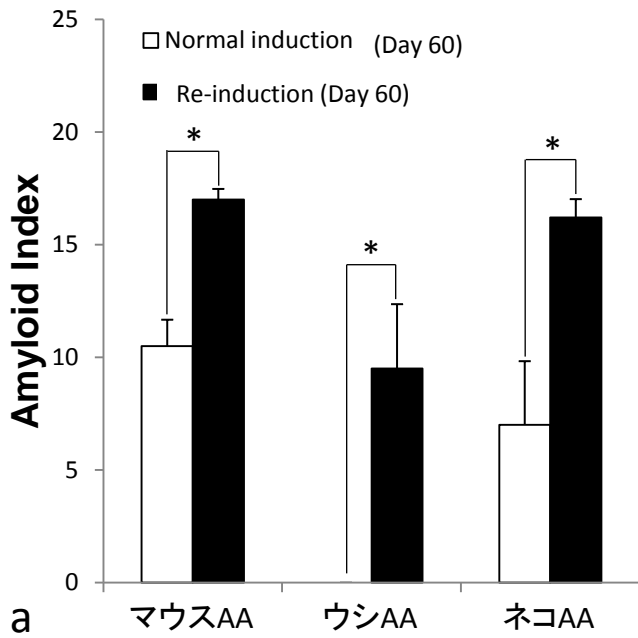


図7; 再刺激によるAIおよびAA沈着陽性面積の変化

a-b; AIによる評価 (a; IL-1raKO、b; BALB/c)

c-d; 面積定量による評価 (c; IL-1raKO、d; BALB/c)

ウシおよびネコAAアミロイド投与群では、IL-1raKOのみに再刺激によるアミロイド沈着量(AI)の有意な増加を認めた。

*; $p < 0.05$ 、**; $p < 0.01$

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	
MOUSE SAA1.1	.	.	.	L	.	S	.	V	F	.	.	.	L	.	.	.	C	H	G	G	F	F	.	.	I	G	.	.	F	Q	.	.	G	T	.	.	K	.	.
MOUSE SAA2.1	.	.	.	L	.	S	.	V	F	.	.	.	L	.	.	.	C	H	G	G	F	F	.	.	V	H	.	.	F	Q	.	.	G	T	.	.	K	.	.
CAT SAA	.	.	.	F	.	G	.	I	F	.	.	.	V	.	.	.	S	S	-	E	W	Y	.	.	L	G	.	.	A	Q	.	.	W	S	.	.	R	.	.
COW SAA	.	.	.	F	.	G	.	V	L	.	.	.	V	.	.	.	H	S	-	Q	W	M	.	.	F	G	.	.	Y	E	.	.	K	S	.	.	R	.	.



	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87
MOUSE SAA1.1	G	W	K	D	G	Q	V	.	.	.	E	K	.	.	A	.	.	S	F	.	E	F	F	
MOUSE SAA2.1	N	W	K	N	S	Q	V	.	.	.	E	K	.	.	G	.	A	F	.	E	F	F		
CAT SAA	N	Y	I	G	A	R	V	.	.	.	K	V	.	.	A	.	.	N	I	.	R	F	T	
COW SAA	N	Y	K	G	A	Q	A	.	.	.	K	V	.	.	A	.	.	N	S	.	R	V	T	



	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133				
MOUSE SAA1.1	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	.	H	.	.	T	M	.	.	.	E	.	.	R	H	A	.	.	
MOUSE SAA2.1	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	.	H	.	.	T	I	.	.	.	E	.	.	R	H	D	.	.
CAT SAA	D	-	F	F	R	H	G	N	S	G	H	.	A	.	.	S	K	.	.	.	E	.	E	W	D	.	.
COW SAA	D	P	L	F	K	G	T	T	S	G	Q	.	Q	.	.	S	R	.	.	.	A	.	.	E	W	D	.	.



図8 SAAのアミノ酸一次構造の比較

赤矢印; ネコおよびウシSAAに挿入された8-9アミノ酸残基

黒矢印; マウスSAA1.1とマウスSAA2.1との相違点

■; マウスSAA1.1のみ配列が異なる部位

■; ウシSAAのみ配列が異なる部位

マウスSAA1.1とマウスSAA2.1とのアミノ酸配列が異なる8箇所のうち、2箇所のみウシおよびネコSAAとマウスSAA2.1の配列が同じ箇所を認める。一方で、■で示した5箇所ではウシSAA1.1とマウスSAA1.1およびネコSAAとの配列が異なる。

総括

本研究の第1章～第3章では、IL-1raKOを用いた実験的AAアミロイドーシスモデルの病態をもとに、AAアミロイドーシスの病理発生について考察した。第4章では1～3章で得られた知見をもとにIL-1raKOへのウシおよびネコAAアミロイドの伝達性とその病態について検討した。

第1章では、実験的アミロイドーシスモデルにおけるIL-1raKOの有用性を検討した。IL-1raKOおよびBALB/cに硝酸銀水溶液とAEFを投与し、誘発処置から60日間のAAアミロイド沈着量およびその分布、SAA値の経時変化をBALB/cと比較した。IL-1raKO、BALB/cともに誘発処置後2日目より脾臓、肝臓、小腸回盲部にAAアミロイド沈着を認めた。AIは20日目に最大となり、IL-1raKOではその後も高値を維持したのに対し、BALB/cでは20日目以降AIは著しく低下し、60日以内にアミロイドはほぼ消失した。IL-1raKOにおいても、35日目に脾臓や肝臓のアミロイド沈着量の低下を認めたが、同時期から腎臓、甲状腺、副腎等多数の臓器におけるアミロイド沈着量が増加した。IL-1raKOでは全身臓器に広くアミロイドが沈着し、誘発処置から15, 20, 45, 50, 60日目においてAIはBALB/cよりも有意に高値を示した。両系統ともに、SAA値は1日目が正常値の約1000倍と最も高く、20日目にはほぼ平常値まで低下した。実験開始から5日目以降、IL-1raKOのSAA値はBALB/cよりも有意に高値を示した。IL-1raKOはBALB/cに比べSAAの基礎値が高く、SAA値の低下も緩やかであったことから、血中SAA値が長期間高値を示し、BALB/cでは再現困難であった全身性のAAアミロイドーシスの病態を再現できることがわかった。

実験的AAアミロイドーシスモデルでは、AAアミロイドの分解過程における再刺激によってさらに多量のAAアミロイドが再沈着することが報告されている^{76, 86}。第2章ではAAアミロイドの分解と再沈着の過程における各臓器の組織学的変化および血清中のSAAオリゴマー量をもとに生体内におけるAAアミロイドの動態について考察した。SAA値の低下後、肝臓および脾臓に沈着したAAアミロイドは血液流路の上流側では沈着量が減少し、下流側では沈着量が増

加した。最終的にアミロイドは血管周囲に局限した。血中の SAA オリゴマーは AA アミロイドの沈着が始まる誘発処置後 2 日目に増加し、以降 60 日目まで高値を維持した。特にアミロイドの分解が進行する 45 日目以降の血清中では SAA ダイマーが検出された。この SAA ダイマーは AA アミロイドの分解産物の一部であると推察された。また、誘発処置後 5, 10, 35 および 50 日に硝酸銀水溶液投与による再刺激を行ったところ、再刺激の翌日にはすべての個体において全身臓器に重篤な AA アミロイド沈着を認めた。アミロイド沈着量の増加率は 35 日目に再刺激を行ったマウスで最も高かった。また、SAA オリゴマーに富む AA アミロイドーシスマウスの血清を他のマウスに接種し、炎症を惹起したところ、高率に AA アミロイドーシスを発症した。これらの知見から、SAA オリゴマーには①AA アミロイドの重合過程における SAA 供給源としての作用、②臓器間での AA アミロイド伝達における重合核としての作用、③個体間での AA アミロイド伝達における AEF としての作用があると想定された。本章の結果から、AA アミロイドーシスの進行過程において血液中の SAA モノマー、オリゴマー、および組織に沈着した AA アミロイドの 3 者が常に平衡状態にあり、これらの平衡が傾くことでアミロイドの沈着と分解が生じると考えられた。

実験的アミロイドーシスにおける AA アミロイド沈着は MZ に始まり、アミロイド沈着と同時期に MZMs が消失することが知られている⁴⁶。第 3 章では AA アミロイド沈着に伴う MZ の組織学的変化について経時観察し、MZMs、MZMMs および MZ B cell の動態と AA アミロイドーシスの病態との関係性を検討した。AA アミロイド沈着は誘発処置後 2 日目に濾胞内部の間質から始まり、翌日には MZ に波及した。MZ への沈着は 20 日をピークとし、35 日以降沈着量の低下とともにアミロイドは徐々に粗鬆化した。MZMs および MZ B cell は MZ に顕著なアミロイド沈着が生じる処置後 5 日頃から急激に減少し、MZ を置換していたアミロイドが粗鬆化する処置後 35 日目以降、再び出現した。平常時 MZ と濾胞との境界部に整列する MZMMs は、アミロイド沈着に伴い配列に乱れが

生じ、処置後 2 日目から 10 日目にかけて不連続になったが、その後再び整列した。処置後 10 日目まで、アミロイドは濾胞内外にびまん性に沈着したが、MZMMs の整列とともに濾胞内部の沈着は軽微となり、MZ に限局して沈着する典型的なパターンを呈した。これらの結果から、MZMs、MZ B cell の消失はアミロイド沈着の結果起こる二次的な変化であり、発症機序との関連は乏しいと推察した。MZMMs はアミロイド沈着によってほぼ増減せず、発症機序との関連は乏しいと思われたが、MZMMs の分布に沿ってアミロイドが沈着することから、濾胞周囲への特徴的な沈着パターンの形成に寄与していると思われた。

第 4 章ではウシおよびネコ由来の AA アミロイドのマウスへの伝達性について検討した。AA アミロイドが沈着したウシおよびネコの肝臓乳剤を作製し、これらと硝酸銀とを用いて IL-1raKO および BALB/c に AA アミロイドーシスを誘発し、その病態を解析した。誘発処置から 20 日目において、ウシ AA アミロイド投与を投与したマウスおよびネコ AA アミロイドを投与したマウスにおけるアミロイド沈着率および沈着量はマウス AA アミロイドを投与した場合よりも低値を示した。しかしながら、IL-1raKO は BALB/c と比較し、高率に異種動物間における AA アミロイドーシス伝達を再現可能であった。さらにこれらのアミロイドを投与した IL-1raKO におけるアミロイド沈着の過程を、誘発から 60 日目まで経時観察した。ネコ AA アミロイドを投与した IL-1raKO では、5 日目と 10 日目、45 日目以降では全ての個体でアミロイド沈着が認められ、特に 45 日目以降では重度の沈着を認めた。ウシ AA アミロイドを投与した IL-1raKO ではいずれのタイミングにおいても沈着は軽度であった。さらに第 2 章同様、誘発後 50 日目において再刺激を行った結果、ウシおよびネコ AA アミロイド投与による誘発でも再刺激による AA アミロイドの重度の再沈着が認められた。これらの結果から、異種由来の AA アミロイドは弱い AEF 活性を有し、誘発される AA アミロイド沈着は軽度であるが、このアミロイドが分解されることで同種間伝達と同様に AA アミロイドーシスが進行することが示された。

AA アミロイドーシスの病態仮説の基礎となる seeding 仮説では生体内においても *in vitro* における線維凝集と同様の変化が起こることを前提としており⁵⁷、この病態仮説では生体内においても難溶性のアミロイドが瞬間的に凝集すると想定されてきた⁴⁷。血中には凝集体のアミロイドが存在しないことから、この仮説では AEF と SAA とが異なる経路でアミロイド沈着部位に到達し、反応する必要があった。実験的 AA アミロイドーシスでは、アミロイドの沈着が肝臓および脾臓から始まることから、アミロイドーシスの発症機序解明には、なぜこれらの臓器から沈着が始まるかが重要である。これらの臓器にはクッパー細胞や MZMs など、組織固有のマクロファージが分布することから、凝集体である AEF を運搬あるいは分解する担い手として、古くからこれらの細胞と発症メカニズムとの関連性が疑われている⁹⁹。しかしながら現在でも有用な知見は得られておらず、本研究においても MZMs と発症メカニズムとの関連性は乏しいという結論に至った。

実験的アミロイドーシスは AA アミロイドーシスの発症初期の病態を模していると考えられるが、本研究では IL-1raKO を用いることで、さらに進行した病態を観察することが可能となった。病態の進行過程から、AA アミロイドーシスは「SAA 値の上昇」→「アミロイドの沈着」→「SAA 値の低下」→「アミロイドの分解」と一方向性に推移するのではなく、局所レベルにおいて AA アミロイドは血中 SAA およびオリゴマーとの平衡状態にあり、アミロイドの分解と再沈着を繰り返しながら進行することが明らかとなった。すなわち、初期の AA アミロイドーシスにおいて生体内で産生される AA アミロイドは、アミロイドの有する化学的な安定性から想定されるよりもはるかに溶解しやすく、凝集反応は動的平衡状態を保ちながら緩徐に進行することが示唆された。

これらの知見を元に、生体内におけるアミロイド生成機序について以下のよう
に考察した。本研究では AEF を腹腔内に投与しているが、過去の文献と比較しても AEF の投与経路と初期の沈着パターンや病変分布に違いは無く、概ね誘

発処置から 1-2 日で肝臓や脾臓に AA アミロイドが沈着する。さらにアミロイド沈着が生じる前後において AEF の局在を示唆する知見が得られなかったことから、投与された AEF はリンパ管等を経由して血液循環に移行して、全身に拡散するものと推察される。そこで、肝臓や脾臓におけるアミロイド沈着が好発する理由として、血流の影響による SAA の局在が重要であると考えた。肝臓・脾臓は血液プールとしてはたらし、開放血管に類似する特殊な血液循環を行うことから⁴³、血液がうっ滞しやすい。さらにディッセ腔では肝細胞が産生した SAA が停滞しやすいと想定される。こうした組織学的特徴から、肝臓・脾臓へのアミロイド沈着は生理的な SAA の局在が背景にあると想定される。すなわち、これらの臓器では、急性炎症により正常値の数千倍まで血中 SAA 値が上昇する際に、生理的に脾臓 MZ やディッセ腔に多量の SAA が貯留するものと想定される。血液中に拡散した AEF がこれらの区画に到達し、SAA とともに滞留することで局所的に SAA モノマーあるいはオリゴマー、AEF の濃度が高まり、アミロイドが沈着するものと想定される。

一方、ヒトの AA アミロイドーシスにおいて、血管や糸球体、細網線維にアミロイドが沈着する症例では、SAA 値のコントロールによる改善効果が弱い傾向が見られる^{51, 73}。これは血流が乏しい、微細な繊維構造が入り組んでいる等の理由により、これらの部位に沈着したアミロイドは血中へ分解されにくいと予想される。実験的 AA アミロイドーシスにおいても、これらの部位に沈着したアミロイドは長期間残存する傾向がみられた。AA アミロイドーシスの基礎疾患である関節リウマチや結核、家族性地中海熱などの慢性炎症性疾患では、間欠的な発作による周期的な SAA 値の上昇が想定される。再刺激によるアミロイドの沈着では、既に沈着しているアミロイドを核とし、周囲にアミロイドが沈着することで重篤なアミロイド沈着を呈すると推察されることから、自然例における AA アミロイドーシスの病態も再刺激によるアミロイド沈着と同様、周期的な SAA 値の上昇によりアミロイドの分解と再沈着が繰り返され、その結

果治癒困難な末期の病態へと進行するものと思われる。

実験的アミロイドーシスでは線維凝集の過程が短期間に集約されることから、AA アミロイドの凝集や分解を詳細に検討し、動的に解釈した病態モデルはこれまでほとんど存在しなかった。本研究結果は AA アミロイドーシスの病理発生のみならず、アミロイドーシス全般に共通する生体内におけるアミロイド線維形成機序を解明する上で重要な指針となると思われた。

謝辞

本研究を進めるにあたり、御指導・御鞭撻を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科獣医病理学研究室の中山裕之教授、同研究室の内田和幸准教授、ジェームズ・チェンバーズ助教に敬意を表するとともに深く感謝いたします。また、研究環境の支援にご尽力くださった土居千代さんに感謝いたします。

本研究を始めるにあたり不可欠であったAEFを快く提供して下さった自治医科大学の山田俊幸教授に深謝いたします。

最後に、実験や実験動物の維持管理、様々な研究室業務をサポートして下さった獣医病理学研究室の皆様に熱く御礼申し上げます。

参考文献

1. Alizadeh-Khiavi K, Normand J, Chronopoulos S, et al. Amyloid enhancing factor activity is associated with ubiquitin. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1992;420(2):139-148.
2. Baranova IN, Bocharov AV, Vishnyakova TG, et al. CD36 is a novel serum amyloid A (SAA) receptor mediating SAA binding and SAA-induced signaling in human and rodent cells. *J Biol Chem*. 2010;285(11):8492-8506.
3. Benilova I, Karran E, De Strooper B. The toxic Abeta oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat Neurosci*. 2012;15(3):349-357.
4. Benson MD, Scheinberg MA, Shirahama T, et al. Kinetics of serum amyloid protein A in casein-induced murine amyloidosis. *J Clin Invest*. 1977;59(3):412-417.
5. Blank N, Hegenbart U, Lohse P, et al. Risk factors for AA amyloidosis in Germany. *Amyloid*. 2014:1-7.
6. Bradford BM, Crocker PR, Mabbott NA. Peripheral prion disease pathogenesis is unaltered in the absence of sialoadhesin (Siglec-1/CD169). *Immunology*. 2014;143(1):120-129.
7. Bruce ME, Will RG, Ironside JW, et al. Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature*. 1997;389(6650):498-501.
8. Cavallucci V, D'Amelio M, Cecconi F. Abeta toxicity in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*. 2012;45(2):366-378.
9. Clark JM, Weiss L. Effects of a bacterial vaccine on the marginal zone of the spleen. *Am J Anat*. 1971;132(1):79-92.

10. Cohen SI, Linse S, Luheshi LM, et al. Proliferation of amyloid-beta42 aggregates occurs through a secondary nucleation mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(24):9758-9763.
11. Collinge J, Sidle KC, Meads J, et al. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature*. 1996;383(6602):685-690.
12. Cui D, Hoshii Y, Kawano H, et al. Experimental AA amyloidosis in mice is inhibited by treatment with triptolide, a purified traditional Chinese medicine. *Int Immunopharmacol*. 2007;7(9):1232-1240.
13. Cui D, Kawano H, Takahashi M, et al. Acceleration of murine AA amyloidosis by oral administration of amyloid fibrils extracted from different species. *Pathol Int*. 2002;52(1):40-45.
14. de Beer MC, de Beer FC, Beach CM, et al. Mouse serum amyloid A protein. Complete amino acid sequence and mRNA analysis of a new isoform. *Biochem J*. 1992;283 (Pt 3)(Pt 3):673-678.
15. Dinarello CA. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *Int Rev Immunol*. 1998;16(5-6):457-499.
16. Dogan H, Akdemir F, Tasdemir S, et al. A novel insertion mutation identified in exon 10 of the MEFV gene associated with Familial Mediterranean Fever. *BMC Med Genet*. 2014;15:74-2350-15-74.
17. Elitok OM, Elitok B, Unver O. Renal amyloidosis in cattle with inflammatory diseases. *J Vet Intern Med*. 2008;22(2):450-455.
18. Fandrich M. Oligomeric intermediates in amyloid formation: structure determination and mechanisms of toxicity. *J Mol Biol*. 2012;421(4-5):427-440.
19. Ganowiak K, Hultman P, Engstrom U, et al. Fibrils from synthetic

- amyloid-related peptides enhance development of experimental AA-amyloidosis in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;199(1):306-312.
20. Geijtenbeek TB, Groot PC, Nolte MA, et al. Marginal zone macrophages express a murine homologue of DC-SIGN that captures blood-borne antigens in vivo. *Blood*. 2002;100(8):2908-2916.
 21. Haataja L, Gurlo T, Huang CJ, et al. Islet amyloid in type 2 diabetes, and the toxic oligomer hypothesis. *Endocr Rev*. 2008;29(3):303-316.
 22. Hagihara K, Nishikawa T, Isobe T, et al. IL-6 plays a critical role in the synergistic induction of human serum amyloid A (SAA) gene when stimulated with proinflammatory cytokines as analyzed with an SAA isoform real-time quantitative RT-PCR assay system. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;314(2):363-369.
 23. Hagihara K, Nishikawa T, Sugamata Y, et al. Essential role of STAT3 in cytokine-driven NF-kappaB-mediated serum amyloid A gene expression. *Genes Cells*. 2005;10(11):1051-1063.
 24. Hebert L, Gervais F. apo-SAA1/apo-SAA2 isotype ratios during casein- and amyloid-enhancing-factor-induced secondary amyloidosis in A/J and C57BL/6J mice. *Scand J Immunol*. 1990;31(2):167-173.
 25. Higuchi K. Transmission of AA amyloidosis may cause outbreaks of amyloid A amyloidosis in chickens. *Amyloid*. 2013;20(2):59-60.
 26. Hill AF, Desbruslais M, Joiner S, et al. The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature*. 1997;389(6650):448-50, 526.
 27. Hoffman JS, Benditt EP. Plasma clearance kinetics of the amyloid-related high density lipoprotein apoprotein, serum amyloid protein (apoSAA), in the mouse. Evidence for rapid apoSAA clearance.

- J Clin Invest.* 1983;71(4):926-934.
28. Horai R, Saijo S, Tanioka H, et al. Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist-deficient mice. *J Exp Med.* 2000;191(2):313-320.
 29. Horiuchi N, Kotani Y, Koga M, et al. Experimental induction of amyloidosis by bovine amyloid fibrils in Sore Hock rabbits. *Amyloid.* 2008;15(2):84-88.
 30. Huang CM, Tsai FJ, Wu JY, et al. Interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol.* 2001;30(4):225-228.
 31. Ito S, Naito M, Kobayashi Y, et al. Roles of a macrophage receptor with collagenous structure (MARCO) in host defense and heterogeneity of splenic marginal zone macrophages. *Arch Histol Cytol.* 1999;62(1):83-95.
 32. Iwakura Y. Roles of IL-1 in the development of rheumatoid arthritis: consideration from mouse models. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002;13(4-5):341-355.
 33. Johan K, Westermarck G, Engstrom U, et al. Acceleration of amyloid protein A amyloidosis by amyloid-like synthetic fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(5):2558-2563.
 34. Johnson KH, Sletten K, Werdin RE, et al. Amino acid sequence variations in protein AA of cats with high and low incidences of AA amyloidosis. *Comp Biochem Physiol B.* 1989;94(4):765-768.
 35. Kaye R, Head E, Sarsoza F, et al. Fibril specific, conformation dependent antibodies recognize a generic epitope common to amyloid

- fibrils and fibrillar oligomers that is absent in prefibrillar oligomers.
Mol Neurodegener. 2007;2:18.
36. Kellermayer Z, Fisi V, Mihalj M, et al. Marginal Zone Macrophage Receptor MARCO Is Trapped in Conduits Formed by Follicular Dendritic Cells in the Spleen. *J Histochem Cytochem.* 2014;62(6):436-449.
 37. Kennel SJ, Macy S, Wooliver C, et al. Phagocyte depletion inhibits AA amyloid accumulation in AEF-induced huIL-6 transgenic mice. *Amyloid.* 2014;21(1):45-53.
 38. Knowles TP, Vendruscolo M, Dobson CM. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(6):384-396.
 39. Kraal G. Cells in the marginal zone of the spleen. *Int Rev Cytol.* 1992;132:31-74.
 40. Kute VB, Vanikar AV, Patel HV, et al. Renal transplantation in secondary amyloidosis associated with tuberculosis. *Case Rep Transplant.* 2013;2013:353529.
 41. Lachmann HJ, Goodman HJ, Gilbertson JA, et al. Natural history and outcome in systemic AA amyloidosis. *N Engl J Med.* 2007;356(23):2361-2371.
 42. Landman WJ, Gruys E, Gielkens AL. Avian amyloidosis. *Avian Pathol.* 1998;27(5):437-449.
 43. Lauth WW. Hepatic vasculature: a conceptual review. *Gastroenterology.* 1977;73(5):1163-1169.
 44. Lowell CA, Potter DA, Stearman RS, et al. Structure of the murine serum amyloid A gene family. Gene conversion. *J Biol Chem.*

- 1986;261(18):8442-8452.
45. Lu J, Yu Y, Zhu I, et al. Structural mechanism of serum amyloid A-mediated inflammatory amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(14):5189-5194.
 46. Lundmark K, Vahdat Shariatpanahi A, Westermark GT. Depletion of spleen macrophages delays AA amyloid development: a study performed in the rapid mouse model of AA amyloidosis. *PLoS One*. 2013;8(11):e79104.
 47. Lundmark K, Westermark GT, Nystrom S, et al. Transmissibility of systemic amyloidosis by a prion-like mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(10):6979-6984.
 48. Lundmark K, Westermark GT, Olsen A, et al. Protein fibrils in nature can enhance amyloid protein A amyloidosis in mice: Cross-seeding as a disease mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(17):6098-6102.
 49. Lysek DA, Schorn C, Nivon LG, et al. Prion protein NMR structures of cats, dogs, pigs, and sheep. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(3):640-645.
 50. Martin F, Kearney JF. Marginal-zone B cells. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(5):323-335.
 51. Miyagawa I, Nakayamada S, Saito K, et al. Study on the safety and efficacy of tocilizumab, an anti-IL-6 receptor antibody, in patients with rheumatoid arthritis complicated with AA amyloidosis. *Mod Rheumatol*. 2014;24(3):405-409.
 52. Mori M, Tiang G, Higuchi K. AA amyloidosis-resistant CE/J mice have Saa1 and Saa2 genes that encode an identical SAA isoform. *Amyloid*.

- 2014;21(1):1-8.
53. Murakami T, Inoshima Y, Sakamoto E, et al. AA amyloidosis in vaccinated growing chickens. *J Comp Pathol.* 2013;149(2-3):291-297.
 54. Murakami T, Ishiguro N, Higuchi K. Transmission of systemic AA amyloidosis in animals. *Vet Pathol.* 2014;51(2):363-371.
 55. Murakami T, Muhammad N, Inoshima Y, et al. Experimental induction and oral transmission of avian AA amyloidosis in vaccinated white hens. *Amyloid.* 2013;20(2):80-85.
 56. Murata S, Ueda M, Tanabe Y, et al. Inhibitory effects of anti-IL-1beta antibody in murine AA amyloidosis model. *Amyloid.* 2011;18 Suppl 1:38-39.
 57. Naiki H, Nagai Y. Molecular pathogenesis of protein misfolding diseases: pathological molecular environments versus quality control systems against misfolded proteins. *J Biochem.* 2009;146(6):751-756.
 58. Nakamura T. Amyloid A amyloidosis secondary to rheumatoid arthritis: pathophysiology and treatments. *Clin Exp Rheumatol.* 2011;29(5):850-857.
 59. Nakamura T, Migita K, Ando Y, et al. Amyloid A amyloidosis in a Japanese patient with familial Mediterranean fever associated with homozygosity for the pyrin variant M694I/M694I. *Mod Rheumatol.* 2014;24(2):349-352.
 60. Noborn F, Ancsin JB, Ubhayasekera W, et al. Heparan sulfate dissociates serum amyloid A (SAA) from acute-phase high-density lipoprotein, promoting SAA aggregation. *J Biol Chem.* 2012;287(30):25669-25677.
 61. Norling B, Westermark GT, Westermark P. Immunohistochemical

- identification of heparan sulphate proteoglycan in secondary systemic amyloidosis. *Clin Exp Immunol*. 1988;73(2):333-337.
62. Nystrom SN, Westermark GT. AA-Amyloid is cleared by endogenous immunological mechanisms. *Amyloid*. 2012;19(3):138-145.
63. Okuda Y, Yamada T, Matsuura M, et al. Ageing: a risk factor for amyloid A amyloidosis in rheumatoid arthritis. *Amyloid*. 2011;18(3):108-111.
64. Olsen KE, Sletten K, Sandgren O, et al. What is the role of giant cells in AL-amyloidosis?. *Amyloid*. 1999;6(2):89-97.
65. Omoto M, Yokota T, Cui D, et al. Inactivation of amyloid-enhancing factor (AEF): study on experimental murine AA amyloidosis. *Med Mol Morphol*. 2007;40(2):88-94.
66. Patke S, Srinivasan S, Maheshwari R, et al. Characterization of the oligomerization and aggregation of human Serum Amyloid A. *PLoS One*. 2013;8(6):e64974.
67. Pras M, Schubert M, Zucker-Franklin D, et al. The characterization of soluble amyloid prepared in water. *J Clin Invest*. 1968;47(4):924-933.
68. Ram JS, DeLellis RA, Glenner GG. Amyloid. 3. A method for rapid induction of amyloidosis in mice. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1968;34(2):201-204.
69. Ravishankar B, Shinde R, Liu H, et al. Marginal zone CD169+ macrophages coordinate apoptotic cell-driven cellular recruitment and tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(11):4215-4220.
70. Real de Asua D, Costa R, Contreras MM, et al. Clinical characteristics of the patients with systemic amyloidosis in 2000-2010. *Rev Clin Esp (Barc)*. 2013;213(4):186-193.

71. Rossevatn K, Andresen PK, Sletten K, et al. The complete amino acid sequence of bovine serum amyloid protein A (SAA) and of subspecies of the tissue-deposited amyloid fibril protein A. *Scand J Immunol.* 1992;35(2):217-224.
72. Sarroukh R, Goormaghtigh E, Ruyschaert JM, et al. ATR-FTIR: a "rejuvenated" tool to investigate amyloid proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1828(10):2328-2338.
73. Sasatomi Y, Sato H, Chiba Y, et al. Prognostic factors for renal amyloidosis: a clinicopathological study using cluster analysis. *Intern Med.* 2007;46(5):213-219.
74. Sato J, Kotani K, Yamada T. Accumulation and absorption of serum amyloid A and apolipoprotein E fragments in the course of AA amyloidosis: a study in a mouse model. *Ann Clin Lab Sci.* 2014;44(3):249-253.
75. Segales J, Vicente J, Lujan L, et al. Systemic AA-amyloidosis in a European wild boar (*Sus scrofa*) suffering from generalized tuberculosis. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 2005;52(3):135-137.
76. Shirahama T, Cohen AS. Redistribution of amyloid deposits. *Am J Pathol.* 1980;99(3):539-550.
77. Shtrasburg S, Pras M, Rabinovich E, et al. Attempts at suppression of amyloidogenesis in a mouse model by a variety of anti-inflammatory agents. *Autoimmun Rev.* 2012;12(1):18-21.

Simons JP, Al-Shawi R, Ellmerich S, et al. Pathogenetic mechanisms of amyloid A amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(40):16115-16120.

78. Sipe JD, Benson MD, Buxbaum JN, et al. Nomenclature 2014: Amyloid fibril proteins and clinical classification of the amyloidosis. *Amyloid*. 2014;21(4):221-224.
79. Skinner M, Shirahama T, Benson MD, et al. Murine amyloid protein AA in casein-induced experimental amyloidosis. *Lab Invest*. 1977;36(4):420-427.
80. Snow AD, Bramson R, Mar H, et al. A temporal and ultrastructural relationship between heparan sulfate proteoglycans and AA amyloid in experimental amyloidosis. *J Histochem Cytochem*. 1991;39(10):1321-1330.
81. Soler L, Luyten T, Stinckens A, et al. Serum amyloid A3 (SAA3), not SAA1 appears to be the major acute phase SAA isoform in the pig. *Vet Immunol Immunopathol*. 2011;141(1-2):109-115.
82. Solomon A, Richey T, Murphy CL, et al. Amyloidogenic potential of foie gras. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(26):10998-11001.
83. Solomon A, Weiss DT, Schell M, et al. Transgenic mouse model of AA amyloidosis. *Am J Pathol*. 1999;154(4):1267-1272.
84. Sorby R, Espenes A, Landsverk T, et al. Rapid induction of experimental AA amyloidosis in mink by intravenous injection of amyloid enhancing factor. *Amyloid*. 2008;15(1):20-28.
85. Sponarova J, Nuvolone M, Whicher C, et al. Efficient amyloid A clearance in the absence of immunoglobulins and complement factors. *Am J Pathol*. 2013;182(4):1297-1307.
86. Sponarova J, Nystrom SN, Westermark GT. AA-amyloidosis can be transferred by peripheral blood monocytes. *PLoS One*. 2008;3(10):e3308.

87. Srinivasan S, Patke S, Wang Y, et al. Pathogenic serum amyloid A 1.1 shows a long oligomer-rich fibrillation lag phase contrary to the highly amyloidogenic non-pathogenic SAA2.2. *J Biol Chem.* 2013;288(4):2744-2755.
88. Takahashi A, Matsumoto J, Nishimura S, et al. Improvement of endoscopic and histologic findings of AA-type gastrointestinal amyloidosis by treatment with dimethyl sulfoxide and prednisolone. *Gastroenterol Jpn.* 1985;20(2):143-147.
89. Takase H, Tanaka M, Miyagawa S, et al. Effect of amino acid variations in the central region of human serum amyloid A on the amyloidogenic properties. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;444(1):92-97.
90. Takii T. In vitro and in vivo study of regulation mechanisms of type I interleukin-1 receptor. *Yakugaku Zasshi.* 2001;121(1):9-21.
91. Tamamoto T, Ohno K, Ohmi A, et al. Verification of measurement of the feline serum amyloid A (SAA) concentration by human SAA turbidimetric immunoassay and its clinical application. *J Vet Med Sci.* 2008;70(11):1247-1252.
92. Tanaka S, Dan C, Kawano H, et al. Pathological study on amyloidosis in *Cygnus olor* (mute swan) and other waterfowl. *Med Mol Morphol.* 2008;41(2):99-108.
93. Tasaki M, Ueda M, Ochiai S, et al. Transmission of circulating cell-free AA amyloid oligomers in exosomes vectors via a prion-like mechanism. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;400(4):559-562.
94. Tojo K, Tokuda T, Hoshii Y, et al. Unexpectedly high incidence of visceral AA-amyloidosis in slaughtered cattle in Japan. *Amyloid.*

- 2005;12(2):103-108.
95. Wadsworth JD, Joiner S, Linehan JM, et al. Atypical scrapie prions from sheep and lack of disease in transgenic mice overexpressing human prion protein. *Emerg Infect Dis.* 2013;19(11):1731-1739.
 96. Westermark GT, Engstrom U, Westermark P. The N-terminal segment of protein AA determines its fibrillogenic property. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;182(1):27-33.
 97. Westermark GT, Westermark P. Prion-like aggregates: infectious agents in human disease. *Trends Mol Med.* 2010;16(11):501-507.
 98. Westermark GT, Westermark P. Serum amyloid A and protein AA: molecular mechanisms of a transmissible amyloidosis. *FEBS Lett.* 2009;583(16):2685-2690.
 99. Westermark GT, Westermark P, Sletten K. Amyloid fibril protein AA. Characterization of uncommon subspecies from a patient with rheumatoid arthritis. *Lab Invest.* 1987;57(1):57-64.
 100. Westermark P. Localized AL amyloidosis: a suicidal neoplasm?. *Ups J Med Sci.* 2012;117(2):244-250.
 101. Westermark P, Johnson KH, Westermark GT, et al. Bovine amyloid protein AA: isolation and amino acid sequence analysis. *Comp Biochem Physiol B.* 1986;85(3):609-614.
 102. Westermark P, Lundmark K, Westermark GT. Fibrils from designed non-amyloid-related synthetic peptides induce AA-amyloidosis during inflammation in an animal model. *PLoS One.* 2009;4(6):e6041.
 103. Yamada M, Kotani Y, Nakamura K, et al. Immunohistochemical distribution of amyloid deposits in 25 cows diagnosed with systemic AA amyloidosis. *J Vet Med Sci.* 2006;68(7):725-729.

104. Yamada T, Liepnieks JJ, Kluge-Beckerman B, et al. Cathepsin B generates the most common form of amyloid A (76 residues) as a degradation product from serum amyloid A. *Scand J Immunol.* 1995;41(1):94-97.
105. Yan J, Fu X, Ge F, et al. Cross-seeding and cross-competition in mouse apolipoprotein A-II amyloid fibrils and protein A amyloid fibrils. *Am J Pathol.* 2007;171(1):172-180.
106. Yang J, Xu H, Shao F. The immunological function of familial Mediterranean fever disease protein Pyrin. *Sci China Life Sci.* 2014.
107. Yoshida T, Zhang P, Fu X, et al. Slaughtered aged cattle might be one dietary source exhibiting amyloid enhancing factor activity. *Amyloid.* 2009;16(1):25-31.
108. You Y, Myers RC, Freeberg L, et al. Marginal zone B cells regulate antigen capture by marginal zone macrophages. *J Immunol.* 2011;186(4):2172-2181.