

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 26 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22380165

研究課題名（和文）異種動物に伝達する牛 AA アミロイドーシスの発症機構と伝達増強因子に関する研究

研究課題名（英文）

Study on pathogenesis and transmission of animal AA amyloidosis and their enhancing factors

研究代表者

石黒 直隆 (ISHIGURO NAOTAKA)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：00109521

研究成果の概要（和文）：

アミロイドA (AA) アミロイド症は、血清アミロイドAを前駆蛋白として形成されるAAが全身諸臓器に沈着して発症する疾患であり、ウシとニワトリに観察される。本研究では、ウシとニワトリのAAアミロイド症の病態を解析し、ウサギとニワトリへのアミロイド症の伝播性について解析した。牛のアミロイド症を臨床所見やアミロイドの蓄積度からクラスIとクラスIIに分類した。牛アミロイド症は、実験的にウサギに伝播することを明らかにした。また、養鶏場でのワクチン接種が鶏アミロイド症を誘発することを見出し、ワクチン接種により実験的にアミロイド症が鶏群間で伝播することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Amyloid A (AA) amyloidosis is induced in animals with high plasma concentration of precursor serum amyloid protein A (SAA), and characterized by the extracellular deposition of AA proteins in different organs and tissues. AA amyloidosis is observed by mainly in cows and table birds. In this study, several tissues from AA amyloidosis affected cows and chickens were histologically examined, and the transmission mechanism of AA amyloidosis was analyzed using chicken and rabbit models. Bovine AA amyloidosis was classified by two types Class I of typical and Class II of atypical amyloidosis by amyloid deposition and clinical symptoms. Bovine AA amyloid developed experimental AA amyloidosis in rabbits. We observed fatal outbreaks of AA amyloidosis in white hens inoculated by vaccine. Chicken AA amyloidosis was shown to be transmitted within same species inoculated with vaccine and chicken amyloid.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2011年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2012年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用獣医学

キーワード：疾病予防・制御

## 1. 研究開始当初の背景

アミロイド症は、古くから知られた疾患であるが、ヒトを含め多くの動物が発症する致死性の疾患である。動物の全身性アミロイド症は、炎症反応に刺激された急性期炎症蛋白質である血清アミロイドA蛋白 (SAA) が $\beta$ アミロイド線維を形成して伸長し、肝臓や腎臓に沈着してAAアミロイド症を発症する。AAアミロイド症は、SAAのアミロイド化を促進する因子 (Amyloid Enhancing Factor:AEF)により促進すると言われていたが、最近、AEFはアミロイド自身であることが明らかとなった。また、動物のAAアミロイド症は、同種や異種の動物に伝達することが明らかとなり、新たに公衆衛生上の問題が危惧し始めた。動物アミロイド症は、重篤になれば、臨床的に検知が可能であるが、疾患の初期やアミロイド沈着の軽度の場合は、潜在的な疾患であり、検出が困難であった。

## 2. 研究の目的

動物アミロイド症は、上記の研究の背景にも述べたように、臨床的に見逃しやすい疾患であるとともに、剖検後の免疫組織化学検査でのみ検出が可能であるなど、動物アミロイド症は、詳細な病態解析が必要な疾患であった。また、動物アミロイド症は、同種間での伝達や異種動物への伝播が実験的に可能であるが、宿主の免疫状態により、伝播性が左右されるなど不明な点が多かった。本研究では、動物アミロイド症の病態と伝達性を明らかにする目的で、以下の事項に関して検討した。

- (1) ウシAAアミロイド症の発症機構の解明
- (2) ウシAAアミロイド症の異種動物への伝達性
- (3) 養鶏場での鶏アミロイド症の発生と病態解析
- (4) 鶏群間での鶏アミロイド症の伝播性

## 3. 研究の方法

動物アミロイドの病態解析として、ウシAAアミロイド症と鶏AAアミロイド症を中心に解析を行った。

(1) 動物に特異的なモノクローナル抗体の分離と解析：ウシAAアミロイドに特異的な抗体として、以前、当教室で作成したSAA-1特異抗体25BF12とSAA-4特異抗体30HC7を用いた。鶏に特異的な抗体はなかったことから、鶏SAA-1に特異的なモノクローナル抗体を作成した。

(2) ウシAAアミロイド症の14検体の解析：臨床的にウシAAアミロイド症と診断さ

れた11検体と典型的なウシAAアミロイド症の症状を示さない3検体を検査に用いた。

(3) 鶏アミロイド症の発生と病態解析：本研究で、鶏アミロイド症が発生した養鶏場の調査に偶然遭遇し、鶏アミロイド症の病態解析と検査材料を得ることができた。

(4) 動物アミロイド症の診断と病態検査：組織に沈着したアミロイドの検出法として、コンゴレッド染色と、モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学検査を行った。

(5) 同種間のAA鶏アミロイド症の伝達実験：鶏AAアミロイド症の同種間伝達として、ジュリア系の鶏を用いて伝達実験を実施した。免疫刺激材として、サルモネラ・ワクチン、LPS、FCAを用いた。鶏AAアミロイドの投与方法として、静脈内および経口的にて実施した。

(6) 異種間のウシAAアミロイド症の伝達実験：ウサギをモデルにウシAAアミロイド症の伝達実験を実施した。

## 4. 研究成果

3年間の実験期間中、以下の研究成果を得ることができた。主な研究成果は、4報の原著論文として公表した。

### (1) 特異的なモノクローナル抗体の作成

ウシSAA-1, SAA-4に対するモノクローナル抗体は作成済みであったが、SAA-3に関して、本研究で作成することができた。ウエスタンブロット解析や免疫組織化学検査に有用となった。鶏SAA-1に対するモノクローナル抗体の作成を試みたが、特異的な抗体をクローニングするまでには至らなかった。免疫組織化学検査には、免疫したマウスの血清を用いた。

### (2) ウシAAアミロイド症の分類

ウシAAアミロイド症と思われる検体14サンプルに関して、臨床症状、剖検後の所見、アミロイドの蓄積部位や蓄積量により分類した。その結果、大きく2群に分けることができた。

①典型的なウシAAアミロイド症は、クラスIと分類され、臨床症状に加えて脾臓の腫大と脾臓内での重篤なアミロイド沈着が特徴であった。

②一方、クラスIIと型別した非定型的なアミロイド症は、臨床兆候は見られず、脾臓の腫大やアミロイド沈着も顕著でなかったが、肝臓での蓄積が顕著であった。

③両クラスのアミロイド線維を電子顕微鏡で検査したが、アミロイド線維の長さには変わりはなく、ウエスタンブロットの結果も明確に区別することができなかった (図1)。

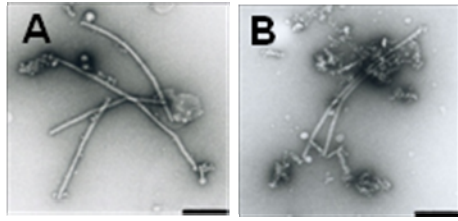


図1、ウシAAアミロイドの顕微鏡写真  
A：クラスIのアミロイド線維  
B：クラスIIのアミロイド線維

今回の研究で、これまで不明であったウシAAアミロイド症の病態を明確に分類することができた（発表論文番号3）。

### (3) ウシAAアミロイド症のウサギモデルでの異種間伝播実験

ウシAAアミロイド症の異種間での伝播性を明らかにする目的で、ウサギを用いた伝播実験を実施した。免疫刺激材として、FCA、ブドウ球菌アジュバントを用いた。その結果は以下の通りである。

①FCAとアミロイドを投与したSore-Hocksを有するウサギ27羽中9羽でアミロイド症が伝播した。一方、ブドウ球菌アジュバントを投与したSore-Hocksウサギ7羽でアミロイド症が伝播した。

②ブドウ球菌アジュバントとSore-Hocks用ウサギでは、僅か3羽のウサギでアミロイド症が観察された。

本実験の結果より、アジュバントの効果より、マウスが有するSore-Hocks症により、アミロイドの伝達が生じることが明らかとなった。生体への絶え間ない炎症刺激が、異種動物へのアミロイドの伝播には効果的であった（発表論文番号4）。

### (4) 養鶏場での鶏アミロイド症の病態解析

本研究期間中、大規模養鶏場で鶏アミロイド症の自然発生に偶然遭遇した。原因を究明する中で、数種類のワクチンを接種することにより、鶏アミロイド症が発生していることを明らかにした。鶏アミロイド症を詳しく検索する中で、以下の結果を得た。

①へい死した育成雛130羽の内109羽で鶏アミロイド症の特徴であるアミロイド沈着が肝臓、脾臓、小腸、ワクチン接種部位の胸筋で確認された（図2）。

②特に肝臓と脾臓でアミロイド沈着が顕著であり、免疫組織化学およびコンゴレッド染色で明らかとなった。

③鶏アミロイド症の発生原因は、ニワトリ胸筋にサルモネラ・ワクチンを接種した鶏群で高率であった。

④サルモネラ・ワクチン接種と鶏アミロイド

症発生との関係を明らかにする目的で、ワクチン接種群25羽と非接種群5羽でアミロイド症発生率を比較したところ、ワクチン接種群25羽中22羽で鶏アミロイド症が観察されて高率であった。（発表論文番号2）

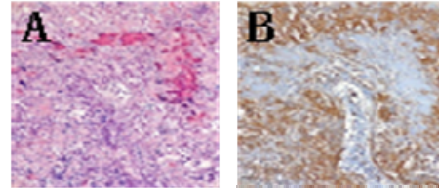


図2. ワクチン接種の鶏で観察されたアミロイド沈着

A：ヘマトキシレン染色

B：免疫組織化学染色

### (5) ワクチンによるアミロイド症の発生と鶏群間での実験的伝達実験

サルモネラ・ワクチンが原因によるアミロイド症の発生を確認する目的で、ジュリア系鶏をモデルに再現実験を行った結果、以下の実験成果を得た。

①サルモネラ・ワクチンと鶏アミロイドを同時に静注したニワトリにおいて、高率に鶏アミロイド症が発生した。一方、マイコプラズマ・ワクチンと鶏アミロイドを同時に接種した鶏群ではアミロイド症が観察されなかった。

②サルモネラ・ワクチンと鶏アミロイドを経口投与したニワトリでも鶏サルモネラ症が観察された。

③FCAとLPSでの免疫刺激やサルモネラ・ワクチンの単独投与では、鶏アミロイド症は誘発できなかった。

④サルモネラ・ワクチンと鶏アミロイドを静脈内に同時投与した鶏群では、肝臓、脾臓、腸管でアミロイドの沈着が顕著であった。

上記の実験結果から、サルモネラ・ワクチンが鶏アミロイド症を誘発する可能性を示した。また、鶏アミロイド症は、鶏群内に持続的な免疫刺激が続く場合、アミロイド症が水平伝播することを示した。（発表論文番号1）

### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計4件）

1. Tomoaki Murakami, Naeem Muhammad, Yasuo Inoshima, Tokuma Yanai, Masanobu Goryo and Naotaka Ishiguro: Experimental induction and oral transmission of avian AA amyloidosis in vaccinated white hens. Amyloid,

DOI:10.3109/13506129.2013.783474, 2013.  
査読 (有)

2. Tomoaki Murakami, Yasuo Inoshima, Eiichi Sakamoto, Hideto Fukushi, Hiroki Sakai, Tokuma Yanai and Naotaka Ishiguro: AA amyloidosis in vaccinated growing chickens. J. Comp. Pathol. DOI:10.1016/j.jcpa. 2013.02.002, 2013. 査読 (有)
3. Tomoaki Murakami, Yasuo Inoshima, Yoshiyasu Kobayashi, Takane Matsui, Hisashi Inokuma and Naotaka Ishiguro: Atypical AA amyloid deposits in bovine AA amyloidosis. Amyloid, 19:15-20, 2012. 査読 (有)
4. Tomoaki Murakami, Yasuo Inoshima, Ken-ichi Watanobe, Yoshiyasu Kobayashi, Takane Matsui, Hisao Kurazono and Naotaka Ishiguro: Pathogenesis of experimental amyloid protein A amyloidosis in sore hocks-affected rabbits. Amyloid, 18:112-118, 2011. 査読 (有)

[学会発表] (計6件)

1. 村上智亮、猪島康雄、石黒直隆: 実験的AAアミロイドーシスの伝播。日本獣医学会、2012年9月15日、岩手大学
2. 村上智亮、猪島康雄、酒井洋樹、福士秀人、石黒直隆: 育成雛に認められたAAアミロイドーシスの病理学的特徴。日本獣医学会、2012年9月14日、岩手大学
3. 村上智亮、猪島康雄、柳井徳磨、御領政信、石黒直隆: ニワトリを用いた実験的AAアミロイドーシスの誘発。日本獣医学会、2012年9月14日、岩手大学
4. Tomoaki Murakami, Yasuo Inoshima, Masakazu Inagaki, Eigo Sakamoto, Syouzou Sakamoto, Takuma Yanai and Naotaka Ishiguro: Potential induction of vaccine-associated amyloid A amyloidosis in white young hens. XIII International Symposium on Amyloidosis. Groningen, The Netherland. May 6-10, 2012.
5. 村上智亮、猪島康雄、古林与志安、松井高峯、猪熊 壽、石黒直隆: 牛AAアミロイドーシスにおけるアミロイド沈着パターンの多様性。日本獣医学会、2011年9月19日、大阪府立大学
6. 小崎慧衣、村上智亮、猪島康雄、石黒直隆: 牛血清アミロイドアイソフォームに対するモノクローナル抗体の作出と牛AAアミロイドの性状解析。日本獣医学会、2011年9月19日、大阪府立大学

[その他]

ホームページ等

<http://www1.gifu-u.ac.jp/~naishigu/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石黒 直隆 (ISHIGURO NAOTAKA)  
岐阜大学・応用生物科学部・教授  
研究者番号: 00109521

### (2) 研究分担者

猪島 康雄 (INOSHIMA YASUO)  
岐阜大学・応用生物科学部・准教授  
研究者番号: 20355184

### (3) 連携研究者

松井 高峯 (MATSUI TAKANE)  
帯広畜産大学・畜産学部・教授  
研究者番号: 40111116