

牛アミロイドーシスにおける血清アミロイドA蛋白の  
臨床的意義に関する研究

2006年

岐阜大学大学院連合獣医学研究科

(帯広畜産大学)

高橋 英二

## 目次

緒言	1
第1章 アミロイドーシス牛の血清アミロイドA (SAA) 濃度の検討	5
緒言	6
材料および方法	6
1. 供試牛	6
2. SAA濃度の測定	7
3. 血清Hp濃度の測定	7
4. 統計処理	8
成績	8
1. アミロイドーシス牛のSAA濃度	8
2. アミロイドーシス牛の血清Hp濃度	8
3. アミロイドーシス牛および慢性炎症牛のSAA濃度と血清Hp濃度間 の相関関係の比較	9
考察	9
小括	12
図表	13
第2章 抗ウシSAA抗体の作成およびそれを用いたimmunoblottingによる アミロイドーシス牛血清のSAAバンドパターンの分析	18
緒言	19
材料および方法	20
1. 材料	20

2. ウシSAAの精製	20
3. 抗ウシSAAウサギ血清の作成	23
4. SDS-PAGE	23
5. Immunoblotting	23
6. SAAバンドパターンの解析	24
7. 統計処理	24
成績	24
1. ウシSAAの精製	24
2. 精製ウシSAAに対する市販の抗ヒトSAAウサギポリクローナル抗体と 作成した抗ウシSAAウサギ血清の反応性の比較	26
3. アミロイドーシス牛, 慢性炎症牛および健康牛血清のimmunoblotting所見	26
4. アミロイドーシス牛血清と慢性炎症牛血清のSAAバンドパターンの 比較	26
考察	27
小括	29
図表	30
第3章 二次元電気泳動およびimmunoblottingによるアミロイドーシス牛血清の SAAアイソフォーム分析	39
緒言	40
材料および方法	40
1. 材料	40
2. 一次元目電気泳動 (等電点電気泳動)	41
3. 二次元目電気泳動 (SDS-PAGE)	41

4. Immunoblotting	41
5. SAAアイソフォームスポットの同定	42
成績	42
1. SAAアイソフォームスポットの検出	42
2. アミロイドーシス牛, 慢性炎症牛および健康牛血清のSAAアイソフォーム パターン	42
考察	43
小括	46
図表	47
総括	51
謝辞	54
引用文献	55

# 緒 言

牛アミロイドーシスは、アミロイドA（以下 AA）と呼ばれる分子量約9 kD の蛋白質が重合し、 $\beta$ 構造を持つアミロイド線維となって全身諸臓器に高度に沈着することにより引き起こされる疾患で、人での分類における全身性反応性 AA アミロイドーシスと同じタイプに属すると考えられている（17, 19, 21, 23）。臨床的には持続性かつ難治性の下痢および全身の浮腫を特徴とし、直腸検査により多くの例で腎臓の腫大を認め、臨床病理学的には高度の低蛋白質血症および蛋白尿といったネフローゼ症候群様の所見がみられる。また、病理組織学的検査により全身諸臓器、特に腎臓および肝臓に高度のアミロイド沈着が認められる。疫学的調査では、基礎疾患として結核や慢性乳房炎、慢性関節炎のような慢性炎症性疾患を持つ例が多いこと、高齢牛に多いことなどが報告されている（8, 17, 21, 23, 31, 33）が、発病機序については全く解明されていない。

AA 蛋白質の前駆物質は、血清中に含まれる急性相反応蛋白質のひとつである、分子量約12~14 kD の血清アミロイドA（SAA）である。SAA の機能についてはほとんど明らかにされていないが、人では炎症時の血清リポ蛋白質、特に HDL<sub>3</sub> の中に多く含まれ、アポ蛋白質の一つとして働くこと、炎症反応により損傷した組織の修復に関与することなどが報告されている（12, 18, 38, 43）。アミロイド沈着臓器から精製した AA 蛋白質と SAA の N 末端側のアミノ酸配列は非常に高い相同性を示すことが、牛を含めた各種動物で証明されており（18, 34）、SAA が何らかの原因で部分分解にとどまる結果、AA 蛋白質という不完全なフラグメントが形成され、アミロイド沈着がおこると考えられている（12, 18, 29）。

Gillmore ら（11）は、AA アミロイドーシス患者の SAA 濃度を低くコントロールすることで臓器のアミロイド沈着量を減らすことができたと報告し、SAA 濃度の高値持続が AA アミロイドーシスの発症および病状悪化の大きな要因であると推察した。また、SAA にはアミノ酸配列の一部異なる複数のアイソフォームが存在することが、

人を含めた各種動物で明らかにされており (4, 16, 20, 22, 32, 37), Shiroo ら (35) は、マウスにおける AA 蛋白の前駆蛋白が、SAA アイソフォームの一つである SAA<sub>2</sub> のみであることを突き止め、アミロイド原性 SAA アイソフォームの存在が AA アミロイドーシス発症と深く関与するのではないかと推察している。さらに Lavie ら (25) は、健康人の単球が SAA を完全に分解したのに対し、アミロイドーシス患者の単球は SAA を完全には分解できず、AA というフラグメントを残したと報告し、マクロファージ系細胞の SAA 分解活性の低下がアミロイドーシス発症に関与するのではないかと推察している。これらの研究成績から、現在までに、①血中 SAA 濃度の持続的な増加 ②アミロイド原性 SAA アイソフォームの存在③マクロファージ系細胞の機能異常による SAA 分解活性の低下、の三つが AA アミロイドーシスの主要原因と考えられているが、いまだ確証を得られるまでには至っていない。

牛アミロイドーシスは治療法がないため、できるだけ早期に診断することが重要と考えられるが、現在のところ早期確定診断法はなく、ネフローゼ症候群様の症状を呈する末期的段階になるまで臨床診断がつかないのが実情である。Cui ら (6) は、牛、人、マウスのアミロイド線維を粗精製し、マウスに経口投与したところ、アミロイドーシス発症が誘発されたと報告し、異種動物のアミロイド沈着臓器の経口摂取が、人全身性反応性 AA アミロイドーシスのリスクファクターのひとつとなりうる可能性を指摘している。藤永 (10) は、と畜場に搬入された 6 歳以上の牛についてアミロイド沈着の有無を調査したところ、ホルスタイン種で 1,800 頭中 22 頭 (1.2 %) にアミロイド沈着を認め、臓器別沈着率は腎臓で 100 %, 肝臓および腸管で 50 %以上であったと報告している。また Tojo ら (39) は、と畜場に搬入された 4 歳以上の牛について同様の調査をしたところ、302 頭中 15 頭 (5.0 %) の腎臓にアミロイド沈着がみられたと報告している。さらに Yamada ら (42) は、アミロイドーシス牛 25 例の全身諸臓器について詳細に検索した結果、筋肉および肝臓を含めた多くの食用臓器に広範囲

にアミロイド沈着がみられたと報告している。以上のことから、近年、牛アミロイドーシスは牛の経済性のみならず公衆衛生上も重要な疾患であると考えられている。しかしながら、本疾患の発病機序の解明および早期診断法を開発するために重要と考えられる、アミロイドーシス牛の SAA に関する研究は、Alsemgeest ら (1) が行った、わずか 1 例についてのもののみである。

以上のことをふまえ、本研究では、牛アミロイドーシスにおける SAA の分析は本症の発病機序解明および早期診断のために意義があるのではないか、という仮説を立て、それを検証するために以下の実験を行った。まず、第 1 章ではアミロイドーシス発症牛の SAA 濃度を測定し、本症に特異的な SAA 濃度の変化がみられるか検討した。次に、第 2 章ではアミロイドーシス発症牛血清について SDS-PAGE による一次元電気泳動と immunoblotting を行い、本症に特異的な SAA バンドパターンがみられるか検討した。また、第 3 章では二次元電気泳動法を用いてアミロイドーシス発症牛血清の SAA アイソフォームを分析し、本症に特異的なアイソフォームパターンがみられるか検討した。



# 第1章

アミロイドーシス牛の血清アミロイドA (SAA)

濃度の検討

## 緒言

人全身性反応性 AA アミロイドーシスの基礎疾患として最も重要である慢性関節リウマチ (RA) に罹患した患者の SAA 濃度をモニタリングした成績などから、SAA 濃度の持続的な増加は AA アミロイドーシスの重要な発症および進展要因と考えられ、アミロイドーシス患者に対する SAA 測定の臨床的意義は大きい (7, 8, 18, 43)。しかしながら、AA アミロイドーシス合併 RA 患者と、非合併 RA 患者の SAA 濃度を比較したところ、有意な差はなかったとする成績などから、SAA 濃度の増加は単に合併している炎症を反映しているにすぎず、人では AA アミロイドーシス診断に対する意義は少ないとも考えられている (28, 43, 45)。一方、牛については、アミロイドーシス発症牛 1 例の SAA 濃度を測定した報告 (1) があるのみで、本症における SAA 濃度の変化についてはほとんど不明である。そこで本章では、アミロイドーシス牛の SAA 濃度が特異的な変化を示すのではないかという仮説を立て、それを検証するためにアミロイドーシス発症牛の SAA 濃度を測定した。また、アミロイドーシス牛の SAA 濃度が高値を示した場合、それが人と同様、単に合併炎症によるものであるかを明らかにするため、SAA と同様、牛における最も鋭敏な炎症マーカーの一つである血清ハプトグロビン (Hp) 濃度を同時に測定し、両項目間の相関関係を調査した。

## 材料および方法

### 1. 供試牛

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

血清総蛋白質、血清アルブミンおよび血清 $\gamma$ グロブリン濃度の著しい低下がみられ、尿検査では尿比重の低下ならびに高度の蛋白尿が認められるなど、ネフローゼ症候群様の所見がみられたため、アミロイドーシスを疑い経過観察したが、2日~4ヶ月後、全例が予後不良と診断されたため、安楽死させたのちに病理解剖した。病理解剖では全例で両側腎臓の著しい腫大と退色（図 1-1）ならびに腸間膜の著しい水腫が認められた。また腎臓の病理組織学的検査により全例でアミロイドの沈着を認め（図 1-2）、さらに抗ヒト AA マウスモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学染色により強い反応性が確認された（図 1-3）ことから、全例が AA アミロイドーシスと確定診断された。

対照牛として、慢性炎症性疾患に罹患したホルスタイン種乳牛 18 例（慢性乳房炎 5 例、慢性化膿性関節炎 13 例）、および健康なホルスタイン種乳牛 10 例を用いた。慢性炎症牛の診断には、臨床症状と畜主の稟告および、血液検査による $\gamma$ グロブリン濃度増加（3.0 g/dl以上）といった慢性炎症像の確認を条件とした。また、健康牛としては、臨床検査で異常がみられず、かつ、代謝プロファイルテストにより異常値が認められなかった個体を供試した。

## 2. SAA 濃度の測定

SAA 濃度の測定には、抗ヒト SAA ラットモノクローナル抗体による enzyme linked immuno solvent assay (ELISA 法)を用いた市販の SAA 定量キットを使用した (Serum Amyloid A assay, Tridelta 社) (27)。臨床検査でアミロイドーシスが疑われた時点で頸静脈から血液を採取し、すみやかに血清を分離後、 $-20^{\circ}\text{C}$ で保存し検査に供した。

## 3. 血清 Hp 濃度の測定

アミロイドーシス牛における SAA 以外の炎症パラメーターの変化を調査する目的で、血清 Hp 濃度を同時に測定した。血清 Hp 濃度の測定には、抗ウシ Hp 抗体による single

radial immunodiffusion assay (SRID 法) を用いた市販の定量キットを使用した (ウシ Hp プレート, メタボリックエコシステム研究所) (30)。

#### 4. 統計処理

使用した SAA および Hp 測定キットには低濃度検出限界があるため, アミロイドーシス牛と対照牛の SAA 濃度および血清 Hp 濃度の比較には Mann-Whitney の U 検定による中央値検定法を採用し, 両側危険率 1%以下を有意とした。

アミロイドーシス牛の SAA 濃度が合併炎症の活動状態を反映しているか否かについて検討するため, アミロイドーシス牛の SAA 濃度と血清 Hp 濃度について, Spearman の順位相関係数 ( $r_s$ ) を算出し, 片側危険率 5%以下を有意として両測定値間の相関関係を調査した。また, 対照とした慢性炎症牛についても同じ統計処理を行い, アミロイドーシス牛のデータと比較した。

### 成績

#### 1. アミロイドーシス牛の SAA 濃度

アミロイドーシス牛の SAA 濃度は, 25 例中 24 例が検出限界の  $0.3 \mu\text{g/ml}$  以上であり, 中央値は  $105.1 \mu\text{g/ml}$ , 範囲は  $<0.3 \sim 225.8 \mu\text{g/ml}$  であった。一方, 健康牛は, 10 例中 8 例が検出限界以上を示し, 中央値は  $1.4 \mu\text{g/ml}$ , 範囲は  $<0.3 \sim 13.5 \mu\text{g/ml}$  を示し, 中央値検定により両者間で有意差が認められた。また, 慢性炎症牛の SAA 濃度は, 18 例中 17 例が検出限界以上, 中央値は  $87.6 \mu\text{g/ml}$ , 範囲は  $<0.3 \sim 298.2 \mu\text{g/ml}$  を示し, 健康牛との間に有意差がみられたが, アミロイドーシス牛との間に有意差は認められなかった (表 1-1)。

## 2. アミロイドーシス牛の血清 Hp 濃度

アミロイドーシス牛の血清 Hp 濃度は、25 例中 22 例が検出限界の 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上であり、中央値は 950  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、範囲は <20 ~1,860  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であった。一方、慢性炎症牛では、18 例中 16 例が検出限界以上、中央値は 455  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、範囲は <20 ~2,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であり、中央値検定によりアミロイドーシス牛との間に有意差はみられなかった。健康牛の血清 Hp 濃度は全例が検出限界の 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  未満であり、アミロイドーシス牛、慢性炎症牛よりも有意に低値であった (表 1-1)。

## 3. アミロイドーシス牛および慢性炎症牛の SAA 濃度と血清 Hp 濃度間の相関関係の比較

アミロイドーシス牛の SAA 濃度と血清 Hp 濃度間で有意な相関関係はみられなかった ( $r_s=0.04$ ,  $p>0.05$ )。一方、慢性炎症牛では両項目間で有意な正の相関関係が認められた ( $r_s=0.74$ ,  $p<0.01$ ) (図 1-4)。

## 考察

人全身性反応性 AA アミロイドーシスにおいては、SAA 濃度が高値を持続することが発症および病状悪化の最大のリスクファクターであり、SAA 濃度測定の臨床的意義は大きい (7, 8, 18, 43)。しかしながら、人全身性反応性 AA アミロイドーシスの最も重要な基礎疾患である RA のみに罹患している患者と、AA アミロイドーシス合併 RA 患者の SAA 濃度を比較したところ、どちらも異常高値を示したが、両者の SAA 濃度間で有意な差はみられなかったという成績から、SAA 濃度は単に合併している炎症性疾患の活動状態を反映しているにすぎず、AA アミロイドーシス診断の指標とはなら

ないとも考えられている (28, 43, 45)。今回、アミロイドーシス牛の SAA 濃度に特異的な変化がみられるのではないかという仮説を検証するため、アミロイドーシス発症牛 25 例の SAA 濃度を測定したところ、健康牛と比較して有意に高値を示したが、本症における基礎疾患として重要と考えられている慢性炎症性疾患に罹患した牛の SAA 濃度との間に有意差がみられなかったことから、人と同様、アミロイドーシス牛の SAA 濃度は本症に特異的な高値を示すわけではないことが明らかになり、牛アミロイドーシスにおける SAA 濃度測定の診断的意義も低いと考えられた。

Hp は SAA と同様、牛における最も鋭敏な炎症マーカーである (2, 3, 9, 13, 15, 36)。今回アミロイドーシス牛にみられた SAA 濃度の増加が、単に合併している炎症の活動性のみを反映したものか、あるいはそれ以外の要因が関与したかを調べるため、血清 Hp 濃度を同時に測定した。その結果、アミロイドーシス牛の血清 Hp 濃度は健康牛と比較して有意に高値を示し、また、慢性炎症牛との間に有意な差がみられなかったことから、今回アミロイドーシス牛でみられた SAA 濃度の増加は、主として合併している炎症に起因すると考えられた。しかしながら、SAA 濃度と Hp 濃度との相関関係を調べた結果、慢性炎症牛では有意な正の相関がみられたが、アミロイドーシス牛では相関がみられなかったことから、牛アミロイドーシスにおいては、合併している炎症以外に SAA 濃度を変化させる要因がある可能性が示唆された。

SAA には、アミノ酸配列の一部異なる複数のアイソフォームが存在し、それぞれが異なった等電点を持つため、等電点電気泳動により複数のバンドとして検出される (32, 37)。これを用いて、Maury ら (26) は人全身性反応性 AA アミロイドーシスおよび他の炎症性疾患における SAA アイソフォームパターンを調査した結果、疾患ごとの特異的なパターンは検出されなかったと報告している。一方、Alsemgeest ら (1) は人と同じ手法を用いて、牛 SAA にも複数のアイソフォームが存在することを明らかにしたが、その中で、疾患によってアイソフォームパターンが異なっていたこと、ま

た、アミロイドーシス発症牛では、他の疾患牛でみられなかった1種類のアイソフォームしか検出できなかったことなど、人のデータとは異なる結果を報告している。したがって、今回みられたアミロイドーシス牛の SAA 濃度の増加要因として、慢性炎症牛にはみられない、本症に特異的な SAA アイソフォームの増加がある可能性が示唆され、それを証明するためには、アミロイドーシス牛血清の SAA アイソフォーム分析が必要と考えられた。

## 小括

アミロイドーシス牛の SAA 濃度が特異的な変化を示すか否かを明らかにするため、病理組織学的検査により本症と確定診断された牛 25 例の SAA 濃度について検討した。

その結果、以下のことが確認された。

1. アミロイドーシス牛 25 例の SAA 濃度は、25 例中 24 例が検出限界の  $0.3 \mu\text{g/ml}$  以上、中央値は  $105.1 \mu\text{g/ml}$ 、範囲は  $<0.3 \sim 225.8 \mu\text{g/ml}$  であり、健康牛と比較して有意な高値を示した。しかしながら、慢性炎症牛の SAA 濃度と比較して有意差はみられなかった。
2. 慢性炎症牛の血清 Hp 濃度と SAA 濃度間で有意な正の相関関係がみられたのに対し、アミロイドーシス牛では相関がみられなかった。

以上の成績から、アミロイドーシス牛の SAA 濃度は高値傾向がみられるが本症に特異的な変化ではないこと、および、アミロイドーシス牛の SAA 濃度の増加には、炎症以外の要因も関与している可能性が示唆された。





図 1-1 アミロイドーシス牛の腎臓。著しい腫大と退色が認められる。

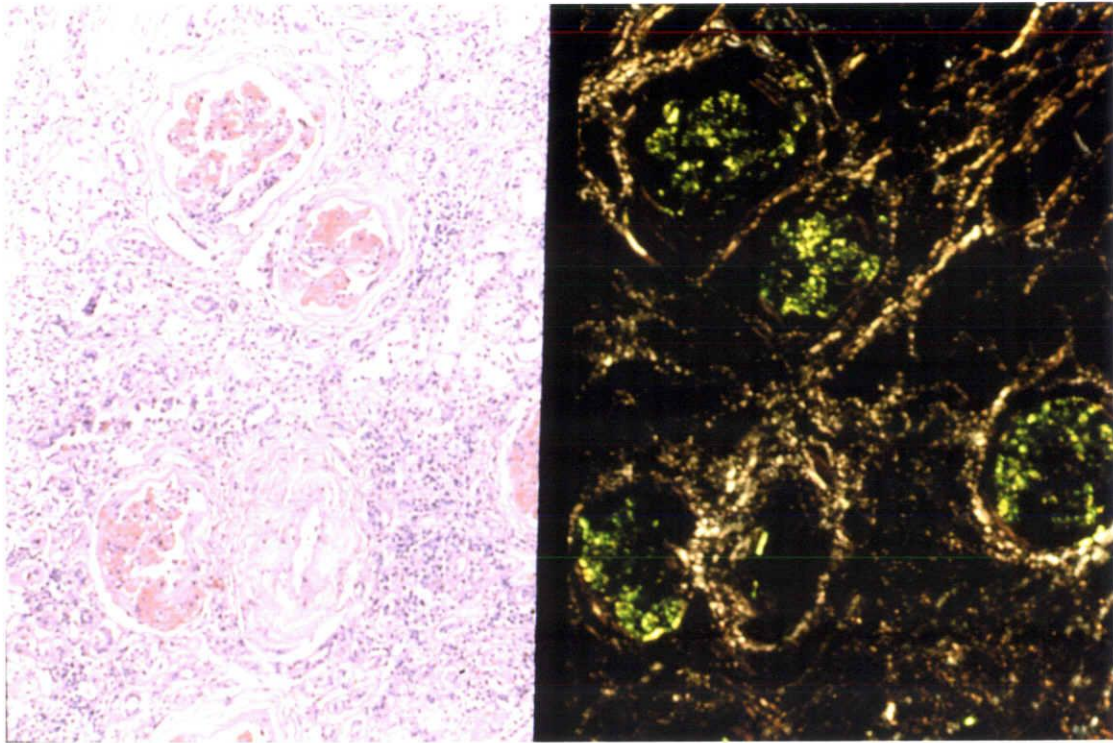


図 1-2 アミロイドーシス牛の腎臓の病理組織学的検査所見。左：HE 染色 右：  
コンゴレッド染色。HE 染色により糸球体にエオジン好性・均一無構造  
のアミロイド沈着を認め、コンゴレッド染色標本の偏光顕微鏡による観  
察で、アミロイドは緑色偏光を示す（× 50）。

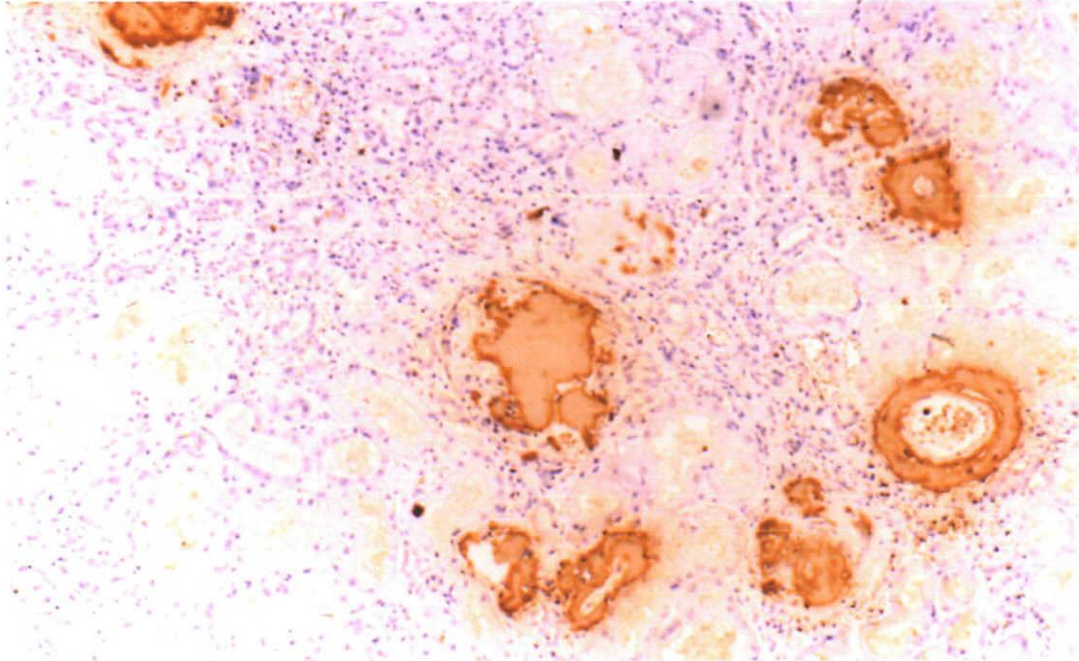


図 1-3 抗ヒト AA マウスモノクローナル抗体を用いたアミロイドーシス牛の腎臓の免疫組織化学的検査所見。糸球体および血管壁に一致して、抗 AA 抗体と反応するアミロイドの沈着が認められる (× 50)。

表1-1 アミロイドーシス牛, 慢性炎症牛および健康牛の血清アミロイドA (SAA) および血清ハプトグロビン (Hp) 濃度

群	血清アミロイドA (SAA)			血清ハプトグロビン (Hp)			
	検出限界* 以上の例数 (%)	中央値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	範囲 ( $\mu\text{g/ml}$ )	検出限界** 以上の例数 (%)	中央値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	範囲 ( $\mu\text{g/ml}$ )	
アミロイドーシス牛	(n=25)	24 (96)	105.1 <sup>a</sup>	<0.3 - 225.8	22 (88)	950 <sup>c</sup>	<20 - 1860
慢性炎症牛	(n=18)	17 (94)	87.6 <sup>a</sup>	<0.3 - 298.2	16 (89)	455 <sup>c</sup>	<20 - 2000
健康牛	(n=10)	8 (80)	1.4 <sup>b</sup>	<0.3 - 13.5	0 (0)	ND <sup>d</sup>	ND

慢性炎症牛は慢性化膿性関節炎牛 (n=13) および慢性乳房炎牛 (n=5) を含む

a - b 間および c - d 間で有意差あり ( $p < 0.01$ , Mann-Whitney test)

\*:  $0.3 \mu\text{g/ml}$  \*\*:  $20 \mu\text{g/ml}$

ND: 検出できず

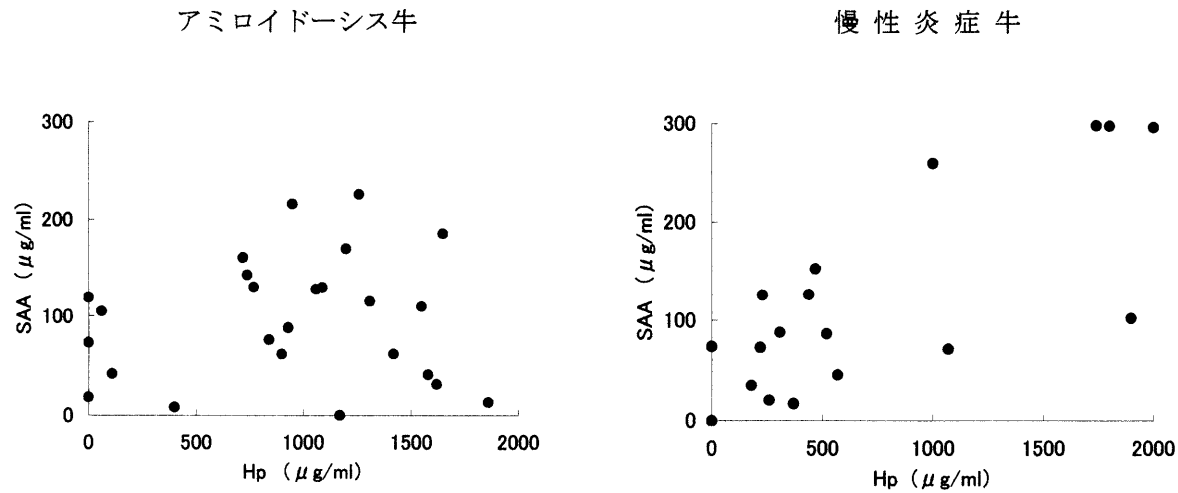


図 1-4 アミロイドーシス牛 (n=25) および慢性炎症牛 (n=18) の血清アミロイドA (SAA) 濃度と血清ハプトグロビン (Hp) 濃度の関係。アミロイドーシス牛の SAA 濃度と血清 Hp 濃度間で相関はみられなかった ( $r_s=0.04$ ,  $p>0.05$ ) が, 慢性炎症牛では両測定値間で高い正の相関 ( $r_s=0.74$ ,  $p<0.01$ ) がみられた。

慢性炎症牛は慢性化膿性関節炎牛 (n=13) および慢性乳房炎牛 (n=5) を含む。

$r_s$  : Spearman の順位相関係数

## 第 2 章

抗ウシ SAA 抗体の作成およびそれを用いた immunoblotting  
によるアミロイドーシス牛血清の SAA バンドパターンの分析

## 緒言

第1章では市販の SAA 定量キットを用いてアミロイドーシス牛の SAA 濃度を測定した。その結果、アミロイドーシス牛の SAA 濃度は健康牛と比較して有意に高値を示したが、対照とした慢性炎症牛と比較して有意差はなく、その増加は本症に特異的な変化ではないことが明らかになった。しかしながら、血清 Hp 濃度との相関関係を調べた結果、アミロイドーシス牛の SAA 濃度の増加には、炎症以外の要因が関与している可能性が示唆され、それを証明するためには SAA の質的分析が必要と考えられた。

Ogata (32) は、炎症性疾患に罹患した人の血清に対し SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) による一次元電気泳動および免疫ブロット法 (immunoblotting) を行った場合に、複数の SAA バンドが検出されることに着目し、急性炎症人血清から等電点電気泳動により複数の SAA アイソフォーム蛋白質を単離し、それぞれについて SDS-PAGE を行い分子量を推定した。その結果、各 SAA アイソフォームはそれぞれ分子量にわずかな違いがあり、急性炎症人血清の一次元電気泳動による複数の SAA バンドの出現は、この SAA アイソフォームの多様性に起因すると結論づけている。そこで本章では、もしアミロイドーシス牛血清の SAA アイソフォームパターンに特異性があるとするならば、SDS-PAGE による一次元電気泳動および immunoblotting により、本症に特異的な SAA バンドパターンがみられるのではないかという仮説を立て、それを検証するため、抗ウシ SAA 抗体を作成し、それを用いて SDS-PAGE および immunoblotting を行うことにより、アミロイドーシス牛血清の SAA バンドパターンを分析した。

## 材料および方法

### 1. 材料

ウシ SAA の精製には、慢性関節炎および慢性乳房炎に罹患し、SAA 濃度が高値を示した牛のプール血清、計 264 m $l$  を用いた。SAA バンドパターンの分析には、第 1 章で使用したサンプルのうち、アミロイドーシス牛血清 7 検体 (No. 1 ~ 7)、慢性炎症牛血清 5 検体 (No. 8 ~ 12)、および健康牛血清 2 検体 (No. 13, 14) を無作為に抽出して用いた。SAA 濃度は No. 1 から 14 の順にそれぞれ 41.9, 105.1, 110.4, 119.5, 130.4, 142.7, 160.8, 86.9, 88.2, 126.0, 126.5, 260.0, <0.3, <0.3  $\mu\text{g}/\text{m}l$  であった。

### 2. ウシ SAA の精製

#### 1) アポ HDL の精製

アポ HDL の精製は、Uchida ら (40) の方法に準じて行った。血清 264 m $l$  を超遠心分離用チューブ 6 本に 44 m $l$  ずつ分注し、その上に、密度を 1.006 g/ $m^3$  に調整した比重液 A (0.195 M NaCl / 0.01 % EDTA / 1 mM NaOH) 22 m $l$  を重層した。天秤で正確にバランスをとり、チューブにキャップをした後、超遠心機のローター (Type 45 Ti, Beckman 社) にセットし、25 °C 下、26,500 r.p.m で 45 分間遠心分離した。終了後、上清 22 m $l$  をパスツールピペットにて静かに除去し、再び比重液 A 22 m $l$  を重層し、25 °C 下、42,000 r.p.m で 25 時間以上遠心分離した。終了後、上清 22 m $l$  を除去した後、チューブにマグネットを入れ、スターラーを用いて約 30 分間攪拌し沈殿物を溶解後、さらに密度を 1.182 g/ $m^3$  に調整した比重液 B (0.195 M NaCl / 2.44 M NaBr / 0.01 % EDTA / 1 mM NaOH) を 22 m $l$  ずつ加え、よく攪拌し、20 °C 下、42,000 r.p.m で 31 時間 30 分以上遠心分離した。終了後、上清 22 m $l$  を除去し、再度スターラーにて沈殿物を溶解させた後、密度 1.478 g/ $m^3$  の比重液 C



(0.195 M NaCl / 7.65 M NaBr / 0.01 % EDTA / 1 mM NaOH) を 22 ml/加え、よく攪拌した後、20 °C下、42,000 r.p.m で 62 時間 45 分以上遠心分離し、終了後上層 11ml/ずつを採取 (計 66 ml) したものを HDL 画分とした。

次に、HDL 画分からの脱脂によるアポ HDL 画分の精製手順を示す。精製した HDL 画分 66 ml を透析用チューブに移し、透析用緩衝液 (10 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  / 5 mM EDTA) 2 l 中に入れ、4 °C下で8時間透析し、さらに緩衝液を交換後8時間透析した。次に、-20 °Cに冷却したメタノール-ジエチルエーテル混合液 (1:2 v/v) を試料に等量加え、分液漏斗にて20分間激しく振とうした後、サンプルを遠心管に移し、-10 °C下、3,500 r.p.m で10分間遠心分離した。上清の黄色脂肪層を静かに除去後、再度、試料と等量のメタノール-ジエチルエーテル混合液を加え20分間激しく振とう後遠心分離し、上清を除去した。この操作をさらに1回繰り返した後、チューブの底に残った沈殿物を残して上清を除去した。沈殿物に適量のエーテルを加え、ボルテックスミキサーで十分攪拌した後、サンプルをビーカーに移し、吸引デシケーターで3時間吸引し乾燥させたものを精製アポ HDL 画分とした。

## 2) 低速ゲルろ過クロマトグラフィー

低速ゲルろ過クロマトグラフィー操作は、すべて4 °C下で行った。精製したアポ HDL 画分を 20 ml のゲルろ過緩衝液 (6 M Urea / 0.5 % Tween20 / 0.01 % Tris-HCl pH 8.6) に完全に溶解した後、15,000 r.p.m で 10 分間遠心分離した。上清を採取し、同緩衝液で平衡化した Sephadex G-200 カラム (2.5×100 cm) に添加し、流速約 0.2 ml/分でゲルろ過を行った。得られたフラクションについて SDS-PAGE および immunoblotting を行い、SAA とと思われる約 14 kD の蛋白質を多く含む画分をプールし、透析用緩衝液 (10 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  / 5 mM EDTA / 0.1 mM benzamidine) 2 l 中にて 24 時間×3回透析した後、凍結乾燥した。

## 3) 逆相高速液体クロマトグラフィー (逆相 HPLC)

低速ゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した凍結乾燥サンプルに適量の 0.1 %トリフルオロ酢酸 (TFA) を加えて溶解し、4 °C下、15,000 r.p.m で 15 分間遠心分離した後の上清をサンプルとした。カラムは Aquapore RP-300 (Brownlee Labs 社) を使用した。溶媒として、A液 (0.1 % TFA/DW) およびB液 (0.1 % TFA / 60 %アセトニトリル) を作成し使用した。カラムを平衡化した後、A: 100% B: 0% → A: 0% B: 100%のグラジエントプログラムを 60 分で設定し、サンプルを添加後、流速 1 ml /分でグラジエント溶出した。得られたフラクションについて SDS-PAGE と immunoblotting を行い、SAA を含むと考えられる画分をプールし、吸引乾燥させた。

#### 4) ゲルろ過高速液体クロマトグラフィー (ゲルろ過 HPLC)

緩衝液には 30 %アセトニトリル / 0.1 %TFA を使用した。吸引乾燥したサンプルに適量の緩衝液を加えて溶解後、同緩衝液にて平衡化した GCL-1000 カラム (7.5 × 600 mm) に添加し、流速 0.1 ml /分にてゲルろ過を行った。得られたフラクションについて SDS-PAGE と immunoblotting を行い、SAA を含むと考えられる画分をプールした。

#### 5) イオン交換クロマトグラフィー

緩衝液には 6 M Urea / 10 mM Tris-HCl pH 8.0 / 50 mM NaCl を使用した。ゲルろ過 HPLC で得られたサンプルを同緩衝液で 4 回透析した後、同緩衝液で平衡化した DEAE-Sephacel カラム (8×100 mm) に添加した。一つ目のピークが完全に終わった時点で、緩衝液を 6 M Urea / 10 mM Tris-HCl pH 8.0 / 0.125 M NaCl に代えて再度溶出を行った。得られたフラクションについて SDS-PAGE と immunoblotting を行い、SAA と思われる画分をプールし、10 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> で 4 回透析した後、凍結乾燥した。

### 3. 抗ウシ SAA ウサギ血清の作成

クロマト操作により精製したウシ SAA 200  $\mu\text{g}$  を PBS に溶解し 500  $\mu\text{l}$  としたものを Fleund's Complete Adjuvant 500  $\mu\text{l}$  と混合し、日本白色種のウサギの背部数ヶ所に皮内接種した。その後 10 日間隔で、初回の 1/10 量の抗原液を合計 5 回皮内接種し、2 週間後に全採血を行い抗ウシ SAA ウサギ血清を得た。

### 4. SDS-PAGE

SDS-PAGE はミニプロテインⅢシステム（バイオラッド社）を用い、Laemmli 法（24）に準じた緩衝液システムで行った。ゲルは市販の 15 % 平板ミニゲル（レディゲル J, バイオラッド社）を用いた。サンプル希釈用緩衝液（60 mM Tris-HCl pH 6.8 / 10 % glycerol / 2 % SDS / 5 %  $\beta$ -mercaptoethanol, 微量の bromphenol blue を含む）により SAA 精製過程のフラクションについては 2 倍、また血清については 10 倍に希釈したものを泳動用サンプルとした。泳動条件はゲル 1 枚あたり 20 mA 定電流で行った。

### 5. Immunoblotting

SDS-PAGE 終了後のゲルを転写用緩衝液（25 mM Tris / 192 mM Glycine / 20 % methanol）で洗浄後、PVDF 膜に転写（0.8 mA/cm<sup>2</sup> 定電流）した。転写後の PVDF 膜を TBS（Tris- buffered saline : 20 mM Tris-HCl pH 7.5 / 0.15 M NaCl）で 2 回洗浄後、3 % グラチン / TBS 中で 37 °C 下、1 時間ブロッキングした。ブロッキング終了後の PVDF 膜を TBS で洗浄し、0.1 % 牛血清アルブミン / TBS で希釈した一次抗体と室温で 16 時間反応させた。一次抗体として、SAA 精製過程のフラクションについては、市販の抗ヒト SAA ウサギポリクローナル抗体 [Amyloid A (SAA; human), Biogenesis 社] を 400 倍に希釈して用い、また精製ウシ SAA, アミロイドーシス牛

血清，慢性炎症牛血清および健康牛血清については作成した抗ウシ SAA ウサギ血清を 1,000 倍に希釈して使用した。一次抗体反応終了後，PVDF 膜を TTBS (0.05 % Tween-20 / TBS) で 3 回洗浄した後，0.1 % 牛血清アルブミン / TBS で 2,000 倍に希釈した市販の HRP 標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体 [Goat anti-Rabbit IgG (HRP), Affinity Purified, Biomedical Technologies Inc. 社] と室温で 1 時間反応させた。反応終了後，TTBS で 3 回洗浄し，DAB (diaminobenzidine) 法または化学発光法 (ECL westernblotting detection reagents, GEヘルスケアバイオサイエンス社) によりバンドを検出した。

## 6. SAA バンドパターンの解析

アミロイドーシス牛，慢性炎症牛の SAA バンドパターンの解析には，画像解析ツール (Scion Image, Scion 社) を用いた。

## 7. 統計処理

アミロイドーシス牛血清と慢性炎症牛血清の SAA バンドパターンの違いを，各 SAA バンドの濃度比率を比較することにより検討した。両疾患における各 SAA バンドの濃度比率の有意差検定には Student の t 検定法を用い，両側危険率 1 % 以下を有意とした

## 成績

### 1. ウシ SAA の精製

超遠心法により得られたアポ HDL 画分の，SDS-PAGE による一次元電気泳動および immunoblotting 所見を図 2-1 示す。精製前の炎症牛プール血清の SDS-PAGE では，

SAA の明瞭なバンドは判別できなかったが、精製アポ HDL 画分の SDS-PAGE では、14 kD 付近に SAA を含むと考えられる 2 本の明瞭なバンドが確認された。また immunoblotting では、両サンプル共に、抗ヒト SAA 抗体と反応する幅の広い 1 本のバンドが確認された。Sephadex G-200 カラムを用いたゲルろ過クロマトグラフィーでは、A～D の 4 つのピークが得られ (図 2-2)、それぞれのフラクションについて SDS-PAGE を行ったところ、ピーク C フラクションで SAA を含むと思われる約 14 kD の 2 本のバンドが確認され、immunoblotting においても SAA と思われるバンドが確認された (図 2-3) が、SDS-PAGE におけるどちらのバンドが SAA であるかは不明であったため、次にこの C フラクションをサンプルとする逆相 HPLC を行った。Aquapore RP-300 カラムを用いた逆相 HPLC では複数のピークが認められ、SDS-PAGE および immunoblotting によりピーク A が SAA 含有フラクションと推定された (図 2-4) ため、今度はこの A フラクションをサンプルとするゲルろ過 HPLC を行った。GCL-1000 カラムを用いたゲルろ過 HPLC では、A～C の 3 つのピークが確認され (図 2-5)、SDS-PAGE および immunoblotting によりピーク B のフラクションで SAA と推定される約 14 kD のバンドと、6 kD 以下の微細なバンドが認められたことから、さらにこの低分子量の交雑蛋白を除去するため、イオン交換クロマトグラフィーを行った。DEAE-Sephacel カラムを用いたイオン交換クロマトグラフィーでは 2 つのピークが認められ、SDS-PAGE および immunoblotting によりピーク A が SAA、ピーク B は低分子量の交雑蛋白であることが確認された (図 2-6) ため、このピーク A フラクションを集めて透析し、凍結乾燥したものを精製ウシ SAA とした。

## 2. 精製ウシ SAA に対する市販の抗ヒト SAA ウサギポリクローナル抗体と作成した抗ウシ SAA ウサギ血清の反応性の比較

精製したウシ SAA をサンプルとして SDS-PAGE による一次元電気泳動を行った後、

市販の抗ヒト SAA ウサギポリクローナル抗体および作成した抗ウシ SAA ウサギ血清を一次抗体とする immunoblotting を行い、バンドパターンを比較した。その結果、両者とも 14 kD 付近の同じ位置に明瞭な 1 本のバンドが確認された (図 2-7)。このことから、精製した蛋白質はウシ SAA であり、また作成した抗ウシ SAA ウサギ血清は牛血清中の SAA を検出するのに十分な抗体価を有すると判断された。

### 3. アミロイドーシス牛、慢性炎症牛および健康牛血清の immunoblotting 所見

アミロイドーシス牛血清 (No. 1 ~ 7), 慢性炎症牛血清 (No. 8 ~ 12) および健康牛血清 (No. 13, 14) の immunoblotting 所見を図 2-8 に示す。作成した抗ウシ SAA ウサギ血清を一次抗体とする immunoblotting により、アミロイドーシス牛の血清 No. 1 ~ 6 で 2 本, No. 7 で 1 本の明瞭な SAA バンドが観察された。また、慢性炎症牛血清においてもアミロイドーシス牛にみられたものとほぼ同じ位置に 2 本のバンドが全例で観察された。健康牛血清では SAA のバンドがみられなかった。

### 4. アミロイドーシス牛血清と慢性炎症牛血清の SAA バンドパターンの比較

Immunoblotting で検出したアミロイドーシス牛および慢性炎症牛血清の SAA 2 重バンドのうち、電気泳動での移動度の低いほうを A, 高いほうを B とし、画像解析ソフト (Scion Image, Scion 社) を用いて両バンドの濃度比率を算出し、両疾患におけるバンドパターンの違いを調査した。その結果、アミロイドーシス牛ではバンド A の濃度比率が 46.8 ~ 100.0 % (平均 76.1 %) と高かったのに対し、慢性炎症牛では 35.0 ~ 61.9 % (平均 48.5 %) と低く、両疾患牛でのバンド A の濃度比率に有意な差が認められた (表 2-1)。

## 考察

SAA にはアミノ酸配列の一部異なる複数のアイソフォームが存在するため、炎症時の血清について SDS-PAGE による一次元電気泳動および immunoblotting を行うと複数のバンドが出現することが、人および牛で確認されている (1, 32, 34) が、そのバンドパターンの各種疾患による違いは明らかにされていない。一方、マウスにおいては、主要な SAA アイソフォームである SAA<sub>1</sub> と SAA<sub>2</sub> が immunoblotting により明瞭な二重バンドとして識別され、さらにアミロイドーシス発症過程においては、両アイソフォームの血中濃度が著明に変化するため、その二重バンドの濃度比率が大きく変化すると報告されている (22, 35)。第 1 章では、アミロイドーシス牛血清の SAA 濃度が炎症以外の要因で増加している可能性が示唆され、その要因を明らかにするために、アミロイドーシス牛血清の SAA アイソフォーム分析が必要であると推察した。そこで本章では、もしアミロイドーシス牛血清の SAA アイソフォームパターンに特異性があるとするならば、SDS-PAGE による一次元電気泳動および immunoblotting においても本症に特異的な SAA バンドパターンがみられるのではないかという仮説を立て、それを検証するために精製ウシ SAA に対する抗血清を作成し、それを用いて本症に特異的な SAA バンドパターンがみられるか検討した。

アミロイドーシス牛血清の SAA バンドは検索した 7 検体のうちの 6 検体で 2 本認められ、人と同様、SDS-PAGE による一次元電気泳動によりウシ SAA も複数のバンドに分かれるとする Alsemgeest らの報告 (1) と一致した。一方、対照とした慢性炎症牛血清においても SAA バンドは 2 本検出され、その位置はアミロイドーシス牛血清にみられたものとほぼ同じであったことから、アミロイドーシス牛に特異的な SAA バンドは特定されなかった。しかしながら、両疾患牛血清でみられた SAA の二重バンドのうち、電気泳動での移動度の低いほうをバンド A、高いほうをバンド B とし、両バンドの濃度比率について分析したところ、アミロイドーシス牛ではバンド A の濃度比率

が慢性炎症牛と比較して有意に高かったことから、バンドAの濃度比率が高いことはアミロイドーシス牛における特徴所見と考えられた。また、このバンド濃度比率の違いは、両疾患牛血清におけるSAAアイソフォームパターンの違いによる可能性が高い(32)ため、次の段階として、アミロイドーシス牛血清に特異的なSAAアイソフォームあるいはアイソフォームパターンがみられるか検討する必要があると考えられた。



## 小括

一次元電気泳動によりアミロイドーシス牛に特異的な SAA バンドパターンがみられるか否かを明らかにするため、SDS-PAGE による一次元電気泳動と、精製ウシ SAA を用いて作成した抗ウシ SAA ウサギ血清を一次抗体とする immunoblotting を行い、アミロイドーシス牛血清の SAA バンドパターンについて検討した。

その結果、以下のことが確認された。

1. アミロイドーシス牛血清 7 検体のうち、6 検体で 2 本、1 検体で 1 本の SAA バンドが確認された。
2. 対照とした慢性炎症牛血清 5 検体全てで、アミロイドーシス牛血清にみられたものと同じ位置に 2 本の SAA バンドが確認された。
3. 両疾患牛における SAA の二重バンドの濃度比率を比較したところ、有意な差が認められた。

以上の成績から、一次元電気泳動によりアミロイドーシス牛に特異的な SAA バンドは認められないが、SAA の二重バンドの濃度比率において、アミロイドーシス牛に特徴的なパターンがみられることが明らかとなった。

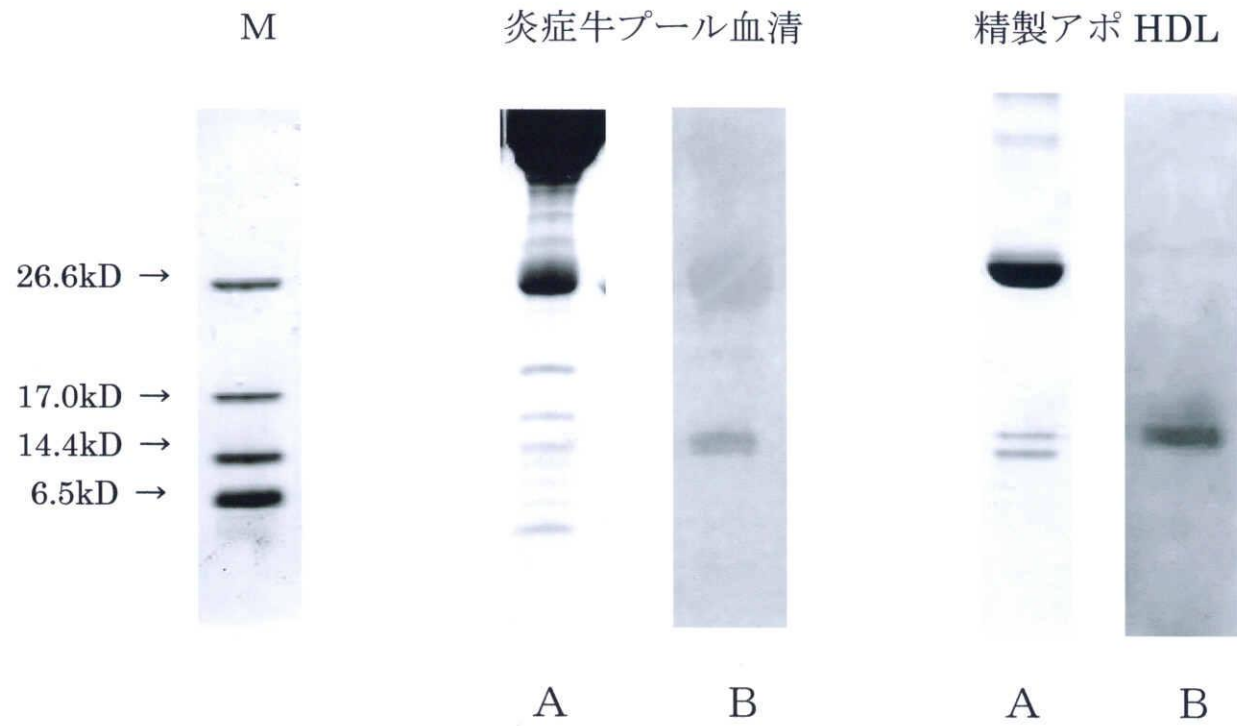


図 2-1 精製前の炎症牛プール血清および精製したアポ HDL の SDS-PAGE および immunoblotting 所見。

Immunoblotting により両サンプルとも SAA とされるバンドが確認された。

M : 分子量マーカー    A : SDS-PAGE    B : Immunoblotting

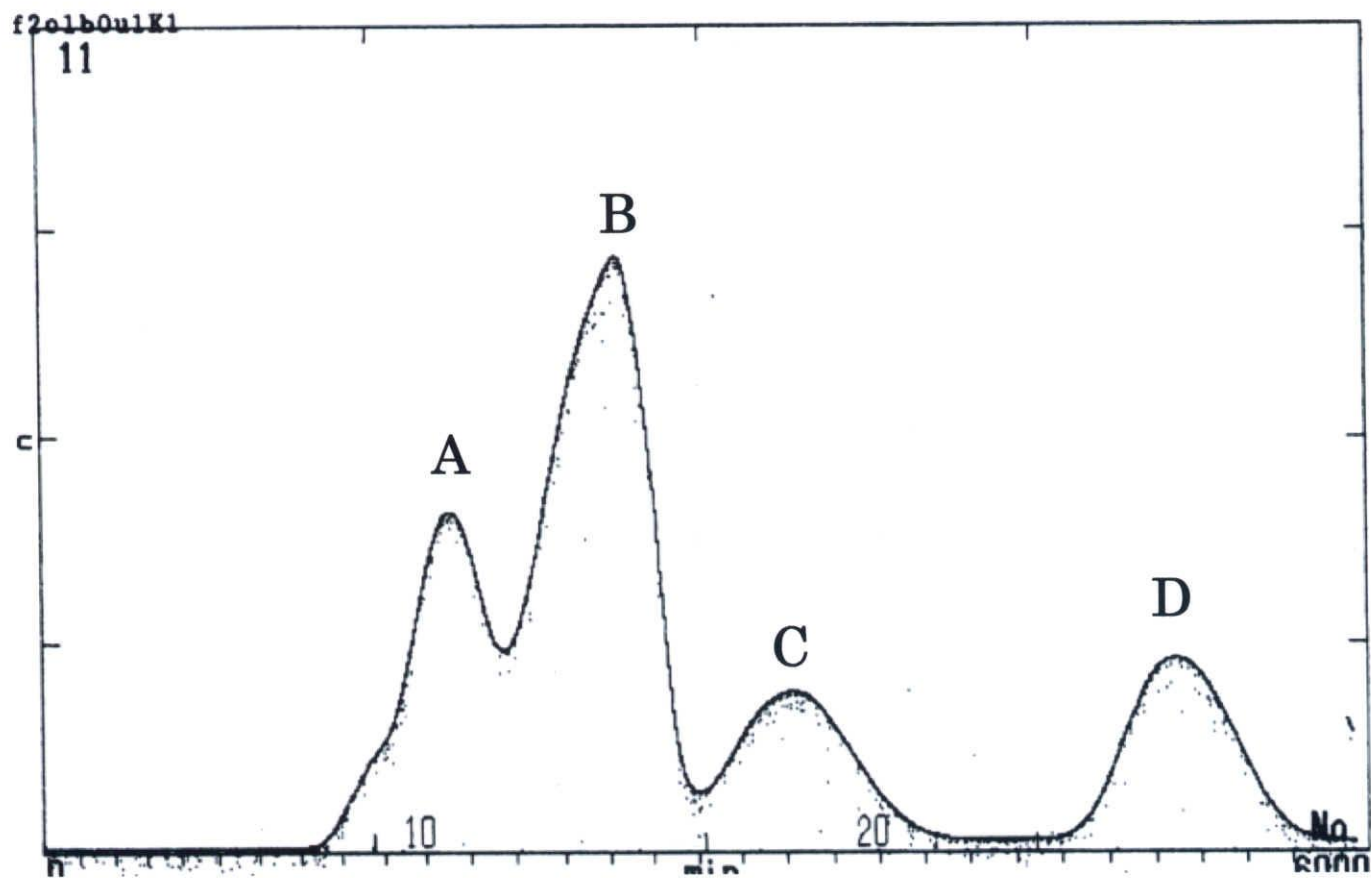


図 2-2 Sephadex G-200 カラムを用いた低速ゲルろ過クロマトグラフィーによる溶出パターン。  
A~D の 4 つのピークが確認された。

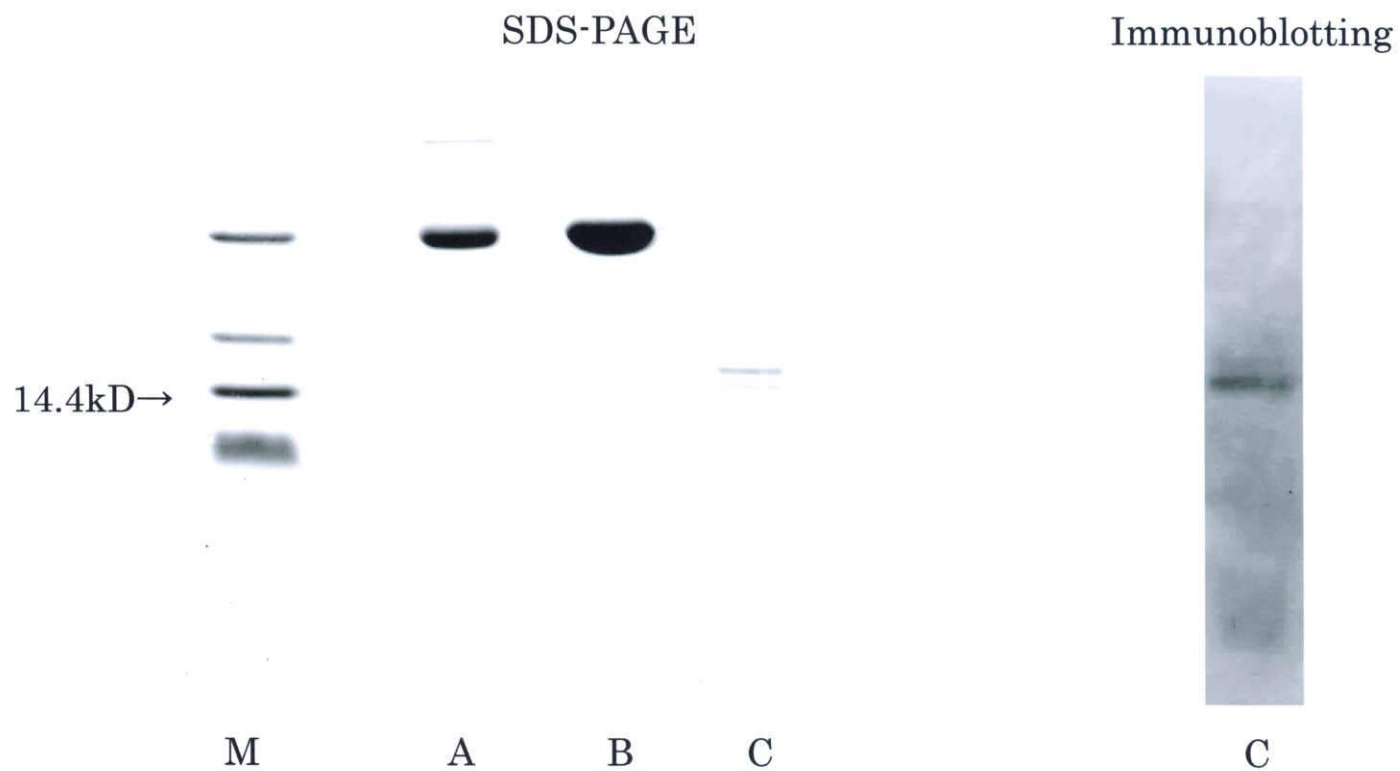


図 2-3 低速ゲルろ過クロマトグラフィーで得られたA~Cの各ピークフラクションの SDS-PAGE およびピーク C フラクションの immunoblotting 所見。ピーク C が SAA 含有フラクションと推定された。ピーク D フラクションは SDS-PAGE によりバンドが確認されなかった。  
M : 分子量マーカー

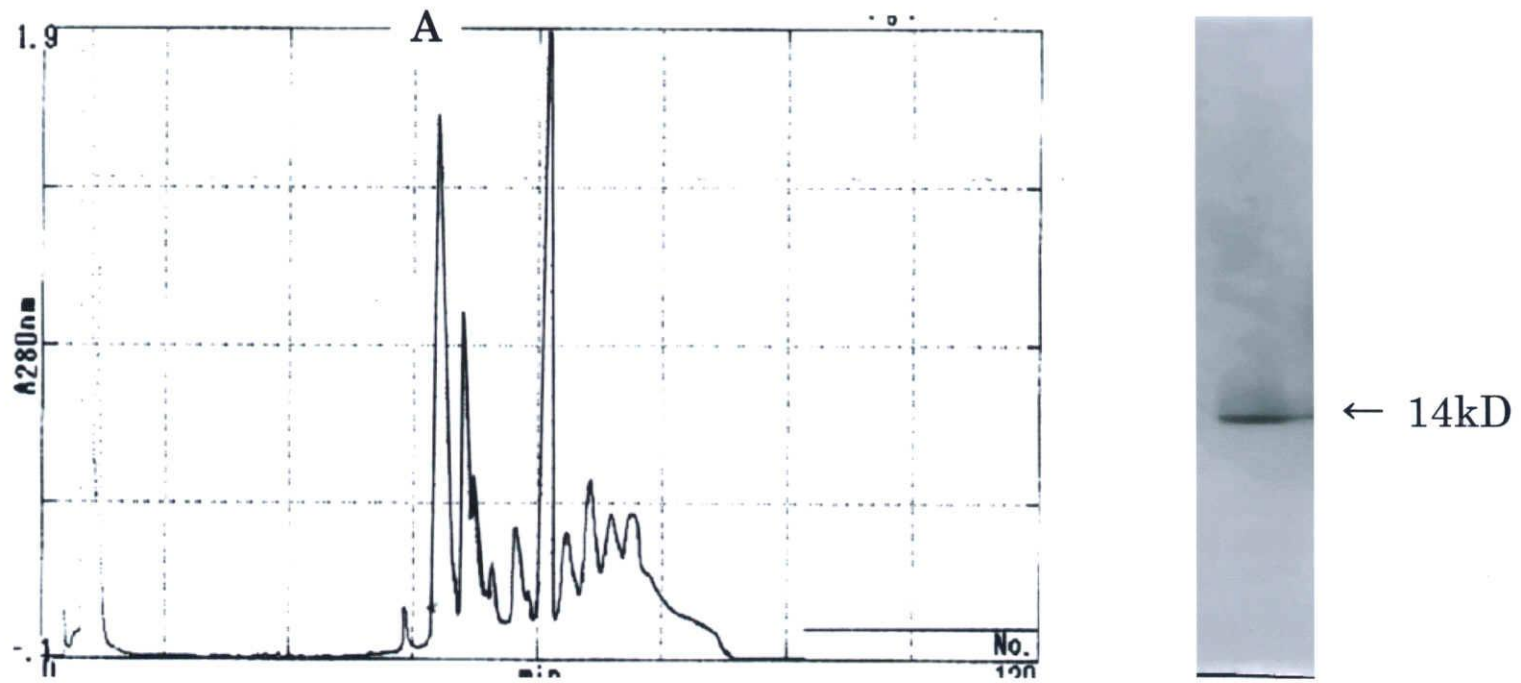


図 2-4 Aquapore RP-300 カラムを用いた逆相 HPLC による溶出パターンとピーク A フラクシヨンの immunoblotting 所見。ピーク A が SAA 含有フラクシヨンの推定された。

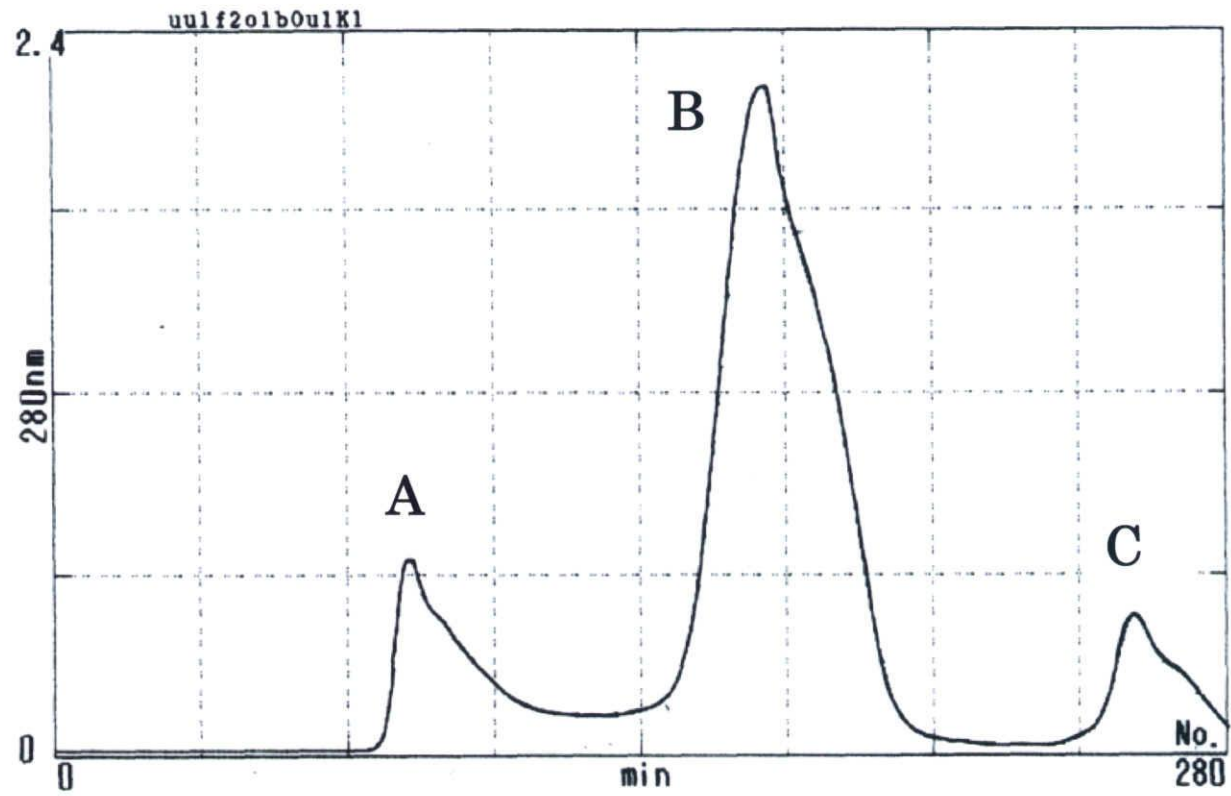


図 2-5 GCL-1000 カラムを用いたゲルろ過 HPLC による溶出パターン。  
A~Cの3つのピークが確認された。

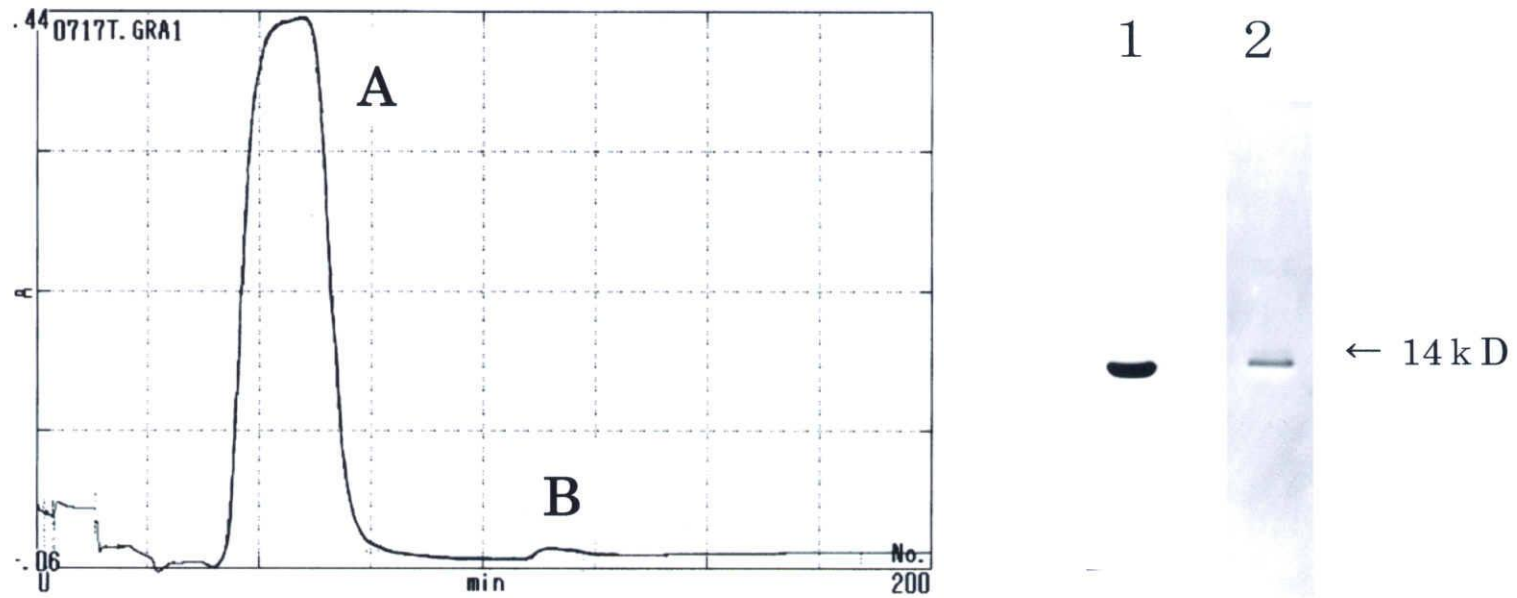


図 2-6 DEAE-Sephacel カラムを用いたイオン交換クロマトグラフィーによる溶出パターンとピーク A の SDS-PAGE および immunoblotting 所見。ピーク A が SAA フラクシオンと推定された。

1 : SDS-PAGE 2 : Immunoblotting

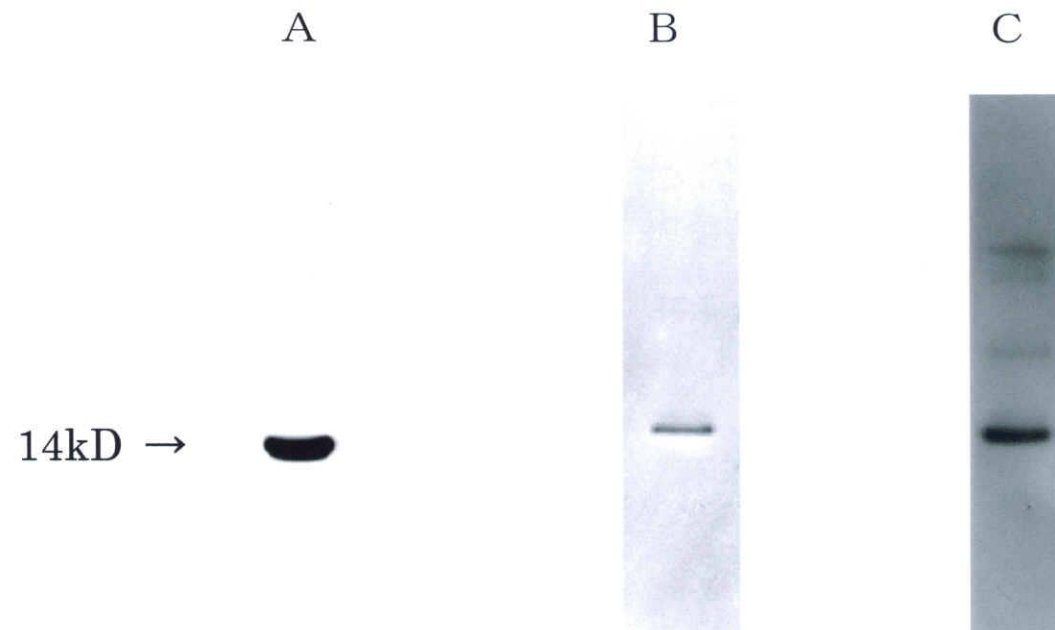


図 2-7 精製ウシ SAA に対する市販の抗ヒト SAA ウサギポリクローナル抗体および作成した抗ウシ SAA ウサギ血清の反応性の比較。作成した抗ウシ SAA ウサギ血清は精製ウシ SAA と強い反応性を示した。  
A：精製ウシ SAA の SDS-PAGE B：市販の抗ヒト SAA ウサギポリクローナル抗体による immunoblotting  
C：作成した抗ウシ SAA ウサギ血清による immunoblotting



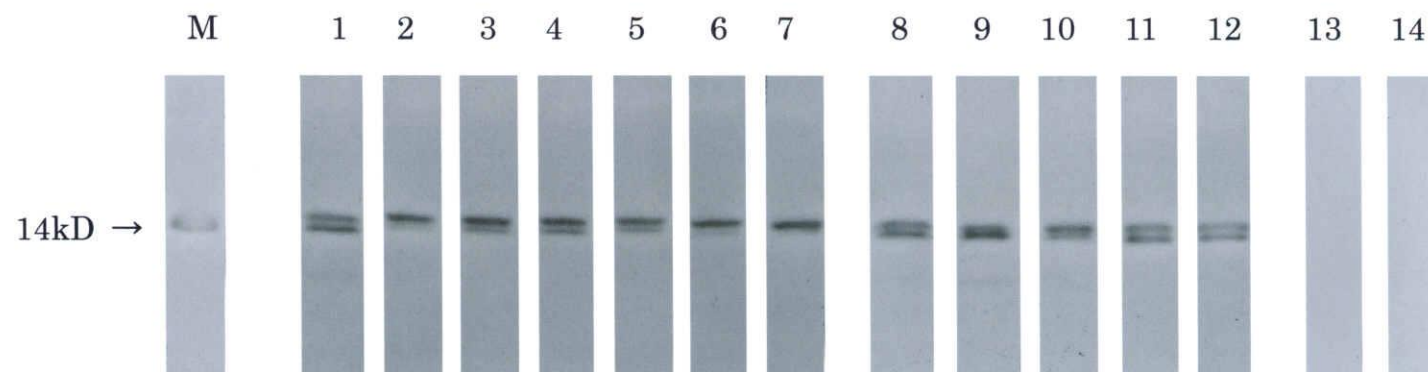


図 2-8 アミロイドーシス牛，慢性炎症牛および健康牛血清の immunoblotting 所見。  
アミロイドーシス牛血清，慢性炎症牛血清共に，SAA の 1～2 本のバンドが認められた。  
1～7：アミロイドーシス牛血清 8～12：慢性炎症牛血清 13，14：健康牛血清  
M：マーカー（精製ウシ SAA）

表2-1 Immunoblottingにより認められたアミロイドーシス牛血清と慢性炎症牛血清における2つのSAAバンド濃度の比率

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

バンドA：電気泳動における移動度の低いSAAバンド

バンドB：電気泳動における移動度の高いSAAバンド

AM：アミロイドーシス牛 C：慢性炎症牛

a-b間で有意差あり (t検定,  $p < 0.01$ )

## 第3章

二次元電気泳動および immunoblotting による  
アミロイドーシス牛血清の SAA アイソフォーム分析

## 緒言

第2章ではアミロイドーシス牛の血清について SDS-PAGE による一次元電気泳動と、作成した抗ウシ SAA ウサギ血清を一次抗体とする immunoblotting を行った結果、特異的なバンドはみられないが、バンドパターンにある特徴がみられることが明らかになった。SAA にはアミノ酸配列の一部異なる複数のアイソフォームが存在し、さらに各アイソフォームは異なった等電点を持つため、等電点電気泳動により分離が可能である (32, 37)。また、一次元電気泳動による複数の SAA バンドの出現は、SAA アイソフォームパターンの多様性に起因すると考えられている (32)。そこで本章では、アミロイドーシス牛に特異的な SAA アイソフォームまたはアイソフォームパターンが存在するのではないかという仮説を立て、これを検証するためにアミロイドーシス牛血清について二次元電気泳動（一次元目：等電点電気泳動，二次元目：SDS-PAGE）および immunoblotting を行い、本症に特異的な SAA アイソフォームおよびアイソフォームパターンについて検索した。

## 材料および方法

### 1. 材料

第1章で使用したサンプルのうち、アミロイドーシス牛血清 10 検体 (No. 1~10)、慢性炎症牛血清 10 検体 (No. 11~20) および健康牛血清 2 検体 (No. 21, 22) を無作為に抽出して用いた。SAA 濃度は No. 1 から 22 まで、順に 13.0, 41.9, 105.1, 110.4, 119.5, 130.4, 142.7, 160.8, 215.9, 225.8, 73.2, 73.9, 86.9, 88.2, 126.0, 126.5, 260.0, 296.6, 296.6, 298.2, <0.3, <0.3  $\mu\text{g/ml}$ であった。

## 2. 一次元目電気泳動（等電点電気泳動）

等電点電気泳動は Ettan IPGphor システム（GE ヘルスケアバイオサイエンス社）を用いて行った。膨潤液 2.0ml（8 M Urea / 2 % CHAPS / 0.002 % bromphenol blue）に IPG buffer（pH 3-10）12.5  $\mu$ l, ジチオスレイトール（DTT）7.0 mg および血清を加え、DDW にて総量 2.5 ml としたものをサンプル含有膨潤液とした。加える血清量はサンプル含有膨潤液の蛋白濃度が 1 mg/ml とするよう調整した。ストリップホルダーにサンプル含有膨潤液を 125  $\mu$ l 入れ、その上に Immobiline Drystrip（pH 3-10, 7 cm, GE ヘルスケアバイオサイエンス社）を乗せ、電気泳動を行った（膨潤時間：12 時間、ステップ 1：500 V 30 分、ステップ 2：100 V 30 分、ステップ 3：5000 V 1 時間 40 分）。泳動終了後、ゲルを SDS 平衡化緩衝液（50 mM Tris-HCl pH 8.8 / 6 M Urea / 30 % glycerol / 2 % SDS / 100 mg DTT）10 ml 中で 15 分×2 回振とうし、平衡化を行った。

## 3. 二次元目電気泳動（SDS-PAGE）

SDS-PAGE はミニプロティアンⅢシステム（バイオラッド社）を用いて行った。平衡化後のゲルを二次元電気泳動用ゲル（レディーゲル J 15 % 2-D, バイオラッド社）にセットし、0.5 % アガロースで封入した後、Laemmli 法（24）に準じた緩衝液システムにより電気泳動を行った。まず 10 mA 定電流で 15 分間泳動し、その後 20 mA 定電流で終了まで行った。

## 4. Immunoblotting

Immunoblotting は一次抗体に第 2 章で作成した抗ウシ SAA ウサギ血清を使用し、第 2 章で述べたのと同じ方法で行った。SAA アイソフォームスポットの検出は化学発光法（ECL western blotting detection reagents, GE ヘルスケアバイオサイエンス社）

により行った。

## 5. SAA アイソフォームスポットの同定

化学発光法により肉眼的に認められた約 14 kD のスポットを，SAA アイソフォームスポットとした。各スポットの等電点 (pI) は，等電点電気泳動における陽極からの移動距離により算出した。なお，微細なスポットについては，等電点電気泳動に用いるサンプル含有膨潤液の蛋白濃度を，各スポットが判別できる限界濃度である 5 mg/ml 程度まで上げて再度実験を行い，可能な限り検出を試みた。

## 成績

### 1. SAA アイソフォームスポットの検出

二次元電気泳動による SAA アイソフォームスポットの検出例として，アミロイドーシス牛血清 No. 10，慢性炎症牛血清 No. 11 および健康牛血清 No. 21 の SAA アイソフォームスポットをそれぞれ図 3-1，図 3-2 および図 3-3 に示す。No. 10 では，pI 5.6，6.1，6.8，7.7 および 8.6 に SAA アイソフォームの明瞭なスポットが観察された。また，サンプル濃度を約 5 倍にして実験を行った結果，pI 5.2 と 6.4 にも微細なスポットが確認された。No. 11 では，pI 6.1，6.4，6.8 および 7.7 に明瞭なスポットが観察されたが，No. 10 でみられた，pI 5.2，5.6 および 8.6 のスポットは，サンプル濃度を上げて検出されなかった。No. 21 では pI 7.7 に微細なスポットが観察されたのみであった。

## 2. アミロイドーシス牛，慢性炎症牛および健康牛血清の SAA アイソフォームパターン

今回検索したアミロイドーシス牛血清 10 検体，慢性炎症牛血清 10 検体および健康牛血清 2 検体の SAA アイソフォームパターンを表 3-1 に示す。アミロイドーシス牛血清では，SAA pI 5.2, 5.6, 6.1, 6.4, 6.8, 7.7 および 8.6 の計 7 種のアイソフォームが検出され，そのうち SAA pI 5.6, 6.1, 6.4, 6.8, 7.7 の 5 種は全検体で共通して認められた。また，SAA pI 5.2 と 8.6 はそれぞれ 4 検体および 9 検体に認められた。一方，対照とした慢性炎症牛血清においても，アミロイドーシス牛血清と同じ 7 種のアイソフォームが検出されたが，共通してみられたのは SAA pI 6.4, 6.8, 7.7 の 3 種のアイソフォームのみであった。また，SAA pI 5.6 と 6.1 はそれぞれ 6 検体および 9 検体に認められたが，SAA pI 5.2 と 8.6 の検出頻度は低く，それぞれわずか 1 検体および 2 検体にみられたのみであった。健康牛血清では SAA pI 7.7 のみが痕跡的に認められた。

### 考察

SAA にはアミノ酸配列が一部異なる複数のアイソフォームが存在することが，人を含むさまざまな動物種において明らかにされている (4, 16, 20, 22, 32, 37)。人では AA アミロイドーシスを含めた各種疾患における SAA アイソフォームパターンの分析が行われているが，現在までのところ，疾患特異的なパターンは見つかっていない (26)。一方，Alsemgeest ら (1) は，牛の SAA にも人と同様，複数のアイソフォームが存在することを等電点電気泳動により初めて明らかにし，また，いくつかの疾患についてアイソフォームパターンを比較した結果，そのパターンに違いがみられたこと，さ

らにアミロイドーシス牛1例の血清中には、他の疾患牛血清ではみられなかった pI 4.8 のアイソフォームしか存在しなかったことを報告している。そこで本章では、アミロイドーシス牛に特異的な SAA アイソフォームあるいはアイソフォームパターンが存在するのではないかという仮説を立て、それを検証するために二次元電気泳動および immunoblotting によるアミロイドーシス牛血清の SAA アイソフォーム分析を行った。その結果、アミロイドーシス牛の血清から7種の SAA アイソフォームが検出されたものの、対照とした慢性炎症牛の血清からも同じアイソフォームが認められたことから、今回の検索では、牛アミロイドーシスに特異的な SAA アイソフォームは特定できなかった。しかしながら、両疾患で各アイソフォームの検出頻度に差が認められ、特に SAA pI 5.2 と SAA pI 8.6 の両アイソフォームの高頻度な出現はアミロイドーシス牛の特徴所見と考えられ、診断的意義もあると考えられた。

部分分解によりアミロイド形成を起こしやすい、いわゆるアミロイド原性 SAA アイソフォームの存在を明らかにするためには、臓器に沈着したアミロイドA蛋白のアミノ酸配列と、各 SAA アイソフォームのアミノ酸配列との比較が重要である。マウスでは両者のアミノ酸配列を比較した成績から、SAA アイソフォームのうちの一つである SAA<sub>2</sub> のみにアミロイド原性があることが明らかにされており (14)、ミンクについても同様の成績 (5) が得られている。また人においても、沈着したアミロイドA蛋白の約 90 %が SAA<sub>1</sub> と呼ばれるアイソフォームに由来することが証明されている (29, 44)。一方、Rossevatn ら (34) は牛のアミロイド沈着臓器から3つの SAA 関連蛋白質を抽出し、そのアミノ酸配列を調べたところ、一つは SAA、他の2つはアミロイドA蛋白であったとし、さらにそれらの N 末端からのアミノ酸配列が完全に一致したことから、牛のアミロイド原性 SAA アイソフォームは1種類であろうと推察している。今回アミロイドーシス牛で検出された SAA アイソフォームのうち、どれがアミロイド原性を持つかを明らかにするためには、各アイソフォームのアミノ酸配列を決定し、



臓器に沈着しているアミロイドA蛋白との相同性を調べる必要があるが、今回得られた成績から、その候補として SAA pI 5.2 と SAA pI 8.6 が特に有力ではないかと考えられた。

人およびマウスでは、SAA アイソフォームの多様性が遺伝子多型によることが明らかにされている (8, 29, 44)。また、人ではアミロイド前駆体として最も重要と考えられる SAA<sub>1</sub>の血中濃度が高値を持続しやすい血統があることが報告され (41)、AA アミロイドーシス発症に遺伝的素因が関与している可能性が指摘されている。さらに Jacobsen ら (20) は、数頭の牛に同じ炎症刺激を与えて SAA アイソフォームパターンの変化を観察したところ、一部の牛で、他の牛と著しく異なったパターンがみられたことから、牛についても遺伝的素因により、発現する SAA アイソフォームパターンに違いがみられるのではないかと推察している。以上のことから、もし、今回アミロイドーシス牛で比較的高頻度に認められた SAA pI 5.2 と 8.6 のようなアイソフォームにアミロイド原性があり、それらの発現が特定の遺伝子に支配されているとすれば、遺伝的にアミロイドーシスを発症しやすい系統が、マウス (35) と同様、牛についても存在する可能性があると考えられた。したがって、牛アミロイドーシスの発病機序の解明および早期診断法の開発のためには、今後、アミロイド原性 SAA アイソフォームを明らかにするとともに、各アイソフォームの発現を誘導している SAA 遺伝子についての検索も重要と考えられる。

## 小括

アミロイドーシス牛に特異的な SAA アイソフォームまたはアイソフォームパターンの存在を明らかにするために、二次元電気泳動による分析を行った。

その結果、以下のことが確認された。

1. アミロイドーシス牛血清 10 検体から、SAA pI 5.2, 5.6, 6.1, 6.4, 6.8, 7.7 および 8.6 の計 7 種の SAA アイソフォームが検出され、そのうち SAA pI 5.6, 6.1, 6.4, 6.8, 7.7 の 5 種は全検体に共通して認められた。また、SAA pI 5.2 および 8.6 はそれぞれ 4 検体および 9 検体に認められた。
2. 対照とした慢性炎症牛血清 10 検体からも、アミロイドーシス牛と同じ 7 種の SAA アイソフォームが検出されたが、全検体に共通してみられたのは SAA pI 6.4, 6.8, 7.7 の 3 種のみであり、SAA pI 5.2 と 8.6 はそれぞれ 1 検体および 2 検体にしか認められなかった。

以上の成績から、アミロイドーシス牛に特異的な SAA アイソフォームは特定されなかったものの、対照とした慢性炎症牛とは各アイソフォームの出現パターンに差があり、特に SAA pI 5.2 および 8.6 の両アイソフォームの高頻度な出現はアミロイドーシス牛の特徴所見と考えられた。

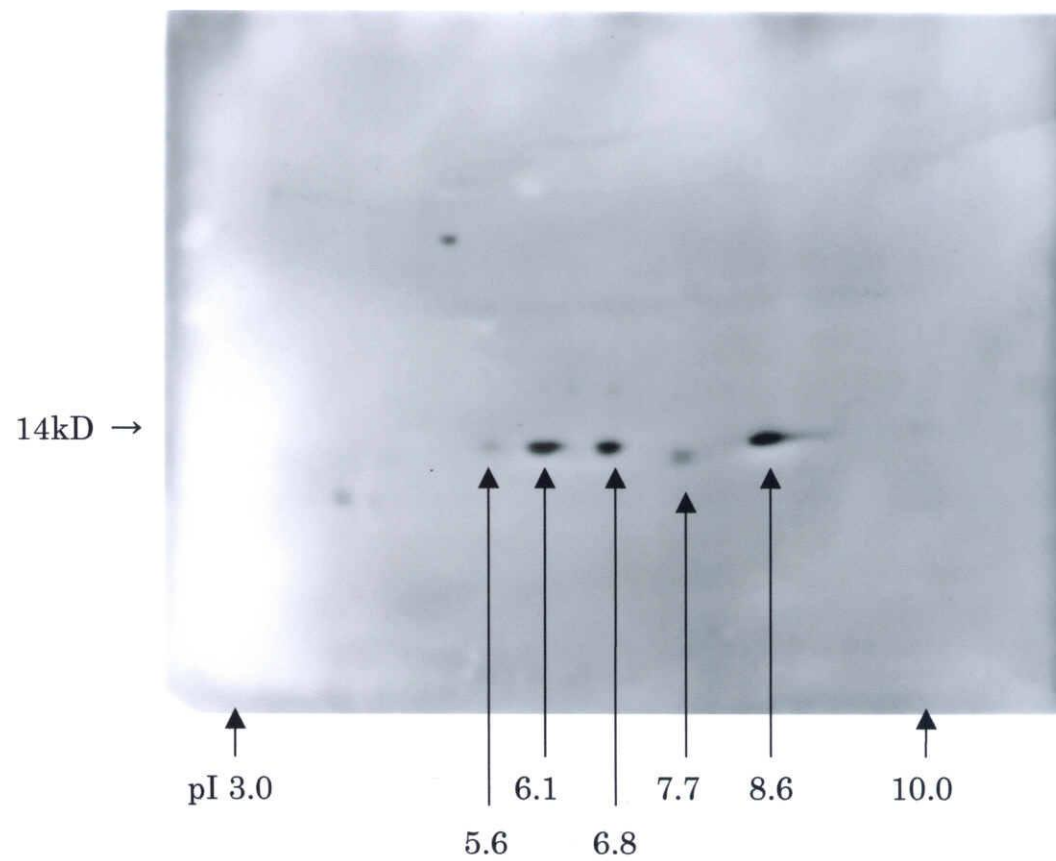


図 3-1 アミロイドーシス牛血清 No. 10 の SAA アイソフォームスポット。  
pI 5.6, 6.1, 6.8, 7.7 および 8.6 に明瞭なスポットが観察された。

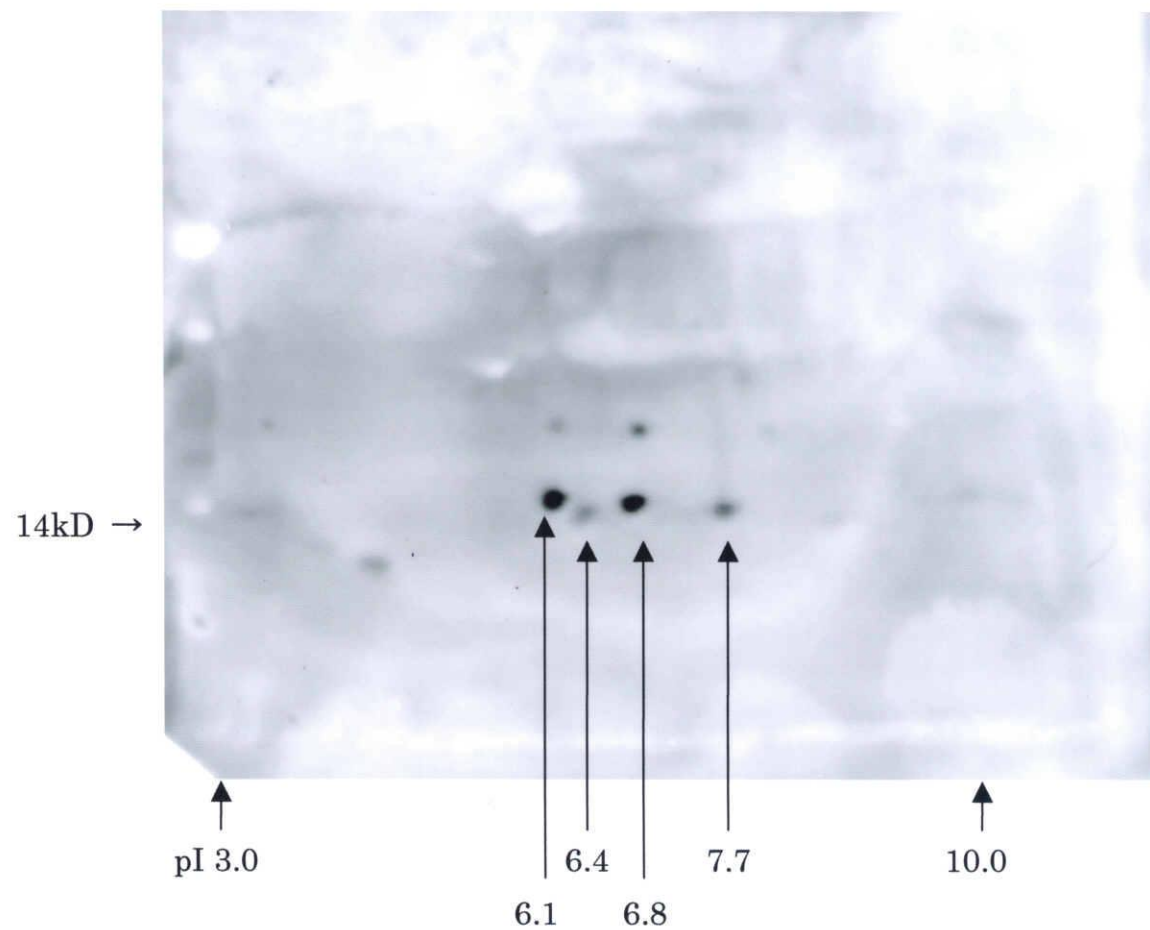


図 3-2 慢性炎症牛血清 No. 11 の SAA アイソフォームスポット。  
pI 6.1, 6.4, 6.8 および 7.7 に明瞭なスポットが観察された。

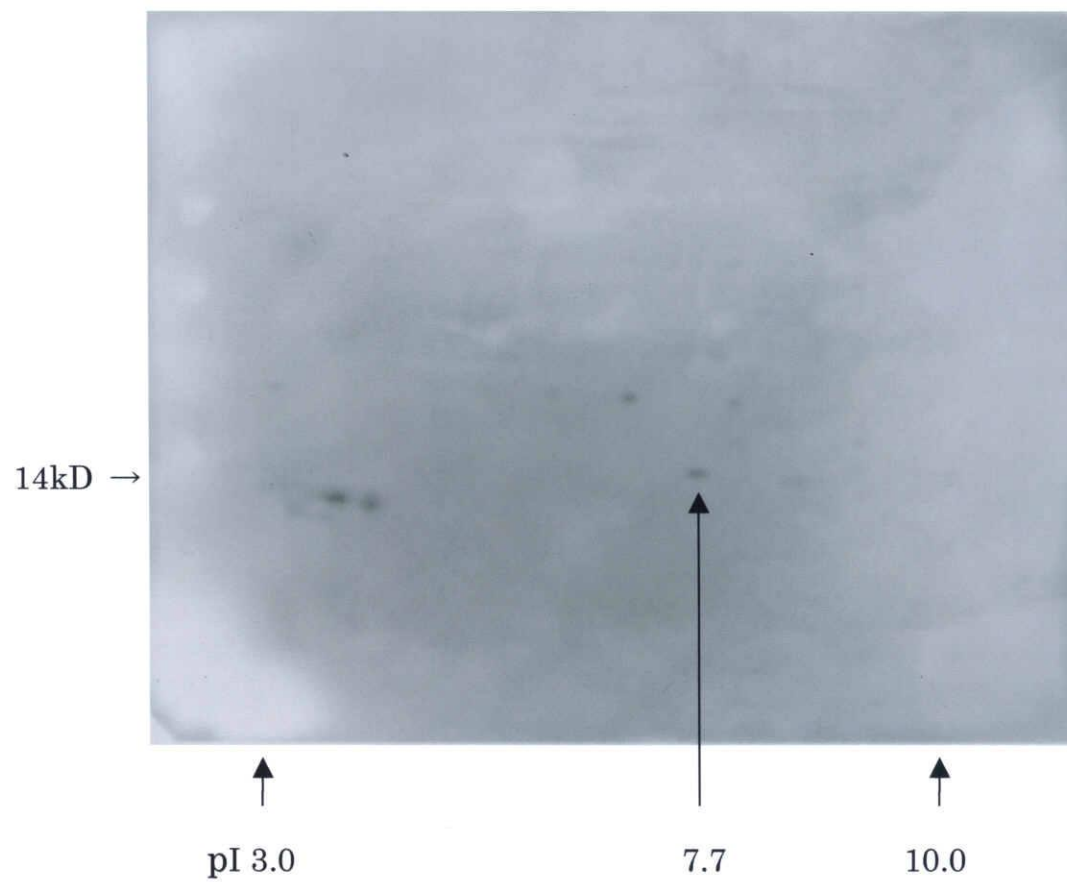


図 3-3 健康牛血清 No. 21 の SAA アイソフォームスポット。  
pI 7.7 のみに微細なスポットが観察された。

表3-1 二次元電気泳動およびimmunoblottingで認められたアミロイドーシス牛,  
慢性炎症牛および健康牛血清のSAAアイソフォーム

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

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

# 総 括

本研究では、牛アミロイドーシスの発病機序の解明および早期診断法の開発のために、アミロイドーシス発症牛の血清を材料として SAA を中心とした検索を行い、その臨床的意義について検討した。

第 1 章では、アミロイドーシス牛の SAA 濃度に特異的な変化がみられるか否かを明らかにするため、アミロイドーシス牛 25 例の SAA 濃度を測定した。その結果、アミロイドーシス牛の SAA 濃度は範囲が  $<0.3\sim 225.8 \mu\text{g/ml}$ 、中央値が  $105.1 \mu\text{g/ml}$  を示し、健康牛（範囲  $<0.3\sim 13.5 \mu\text{g/ml}$ 、中央値  $1.4 \mu\text{g/ml}$ ）と比較して有意に高値であったが、対照とした慢性炎症牛（範囲  $<0.3\sim 298.2 \mu\text{g/ml}$ 、中央値  $87.6 \mu\text{g/ml}$ ）と比較して有意な差がみられなかったことから、疾患特異性は低く、アミロイドーシス診断における SAA 濃度測定の意義も低いことが明らかになった。しかしながら、SAA と同様、牛における最も鋭敏な炎症マーカーである血清 Hp 濃度を同時に測定し、SAA 濃度との相関関係を調べたところ、慢性炎症牛では SAA 濃度と血清 Hp 濃度間で有意な正の相関がみられたのに対し、アミロイドーシス牛では相関関係がみられなかったことから、アミロイドーシス牛の SAA 濃度の増加に、炎症以外の要因が関与していることが示唆され、量的分析以外に、SAA の質的分析が重要と考えられた。

第 2 章では、炎症牛血清から精製したウシ SAA に対する抗血清を作成し、それを一次抗体とする immunoblotting によりアミロイドーシス牛の SAA に対する質的分析を試みた。アミロイドーシス牛の血清 7 検体について、SDS-PAGE による一次元電気泳動および immunoblotting を行い、SAA バンドパターンを調べたところ、6 検体で 2 本の明瞭なバンドが確認され、他の 1 検体では 1 本のバンドが確認された。一方、対照とした慢性炎症牛の血清 5 検体についても同じ実験を行ったところ、アミロイドーシス牛血清でみられたものと同じ位置に、2 本のバンドが観察されたことから、アミロイドーシス牛に特異的な SAA バンドは特定されなかった。しかしながら、両疾患牛血清でみられた SAA の二重バンドのうち、電気泳動での移動度の低いほうをバンド A、



高いほうをバンドBとし、両バンドの濃度比率を画像解析ソフトで算出し、両疾患における違いを調べた結果、アミロイドーシス牛ではバンドAの濃度比率が平均 76.1 % であり、慢性炎症牛の平均 48.5 % と比較して有意に高かったことから、バンドAの濃度比率が高いことはアミロイドーシス牛における特徴所見であることが示唆された。

第 3 章では、アミロイドーシス牛血清について、等電点電気泳動と SDS-PAGE による二次元電気泳動を行い、さらに第 2 章で作成した抗ウシ SAA 抗血清を一次抗体とする immunoblotting により SAA アイソフォームの分析を行い、アミロイドーシス牛に特徴的なアイソフォームパターンがみられるか調査した。その結果、アミロイドーシス牛血清 10 検体から SAA pI 5.2, 5.6, 6.1, 6.4, 6.8, 7.7 および 8.6 の計 7 種の SAA アイソフォームが検出され、そのうち SAA pI 5.6, 6.1, 6.4, 6.8, 7.7 の 5 種は全検体に共通して認められ、SAA pI 5.2 および 8.6 はそれぞれ 4 検体および 9 検体に認められた。一方、対照とした慢性炎症牛血清 10 検体からも、アミロイドーシス牛にみられたのと同じ 7 種のアイソフォームが検出され、そのうち SAA pI 6.4, 6.8, 7.4 の 3 種は全例に共通してみられたが、SAA pI 5.2, 5.6, 6.1 および 8.6 の出現頻度がアミロイドーシス牛と比較して低く、特に SAA pI 5.2 および 8.6 はそれぞれ 1 検体および 2 検体にしか認められなかった。このことから、アミロイドーシス牛に特異的な SAA アイソフォームは特定されなかったものの、SAA pI 5.2 および 8.6 の両アイソフォームの高頻度な出現はアミロイドーシス牛の特徴所見と考えられ、診断的意義もあると判断された。

以上の成績から、牛アミロイドーシスにおける SAA 分析の臨床的意義は大きいことが明らかになり、今後は各 SAA アイソフォームのアミノ酸配列の決定とアミロイド原性 SAA アイソフォームの特定、およびそれらの発現を誘導する SAA 遺伝子の検索が、本症の発病機序解明と早期診断法開発のために重要であることが示唆された。

## 謝辞

本稿を終えるに臨み、御懇篤なるご指導を賜った帯広畜産大学教授 猪熊 壽博士に心から拝謝し、本論文作成にあたり有益な御助言と御校閲をいただいた帯広畜産大学教授 松井高峯博士、岩手大学教授 内藤善久博士、東京農工大学教授 廣田好和博士、岐阜大学教授 北川 均博士に深甚なる謝意を表します。試験研究にあたり終始御指導いただいた、帯広畜産大学教授 佐藤基佳博士、元帯広畜産大学教授 更科孝夫博士、岐阜大学教授 宇塚雄次博士、帯広畜産大学助教授 田邊茂之博士に深甚なる謝意を表します。アミロイドーシス牛の病理解剖ならびに病理組織学的検索をしていただいた帯広畜産大学助教授 古岡秀文博士、抗ウシ SAA ウサギ血清の作成に御協力いただいた帯広畜産大学 堀内雅之先生に深甚なる謝意を表します。二次元電気泳動法について御指導いただいた帯広畜産大学助教授 川本恵子博士、ウシ SAA の精製と SDS-PAGE および immunoblotting について御指導いただいた帯広畜産大学助教授 桑山秀人博士に深甚なる謝意を表します。最後にアミロイドーシス発症牛その他の材料を提供していただいた十勝農業共済組合の獣医師各位に深甚なる謝意を表します。

## 引用文献

1. Alsemgeest, S. P. M., Horadagoda, A., Hulskamp-Koch, C. K., Tooten, P. C. J., Kim, D. H., Niewold, Th. A. and Gruys, E. (1995). First Evidence for the Existence of Multiple Isoforms of Bovine Serum Amyloid-A (apoSAA). *Scand. J. Immunol.* 41, 407~413.
2. Alsemgeest, S. P. M., Kalsbeek, H. C., Wensing, Th., Koeman, J. P., van Ederen, A. M. and Gruys, E. (1994). Concentrations of Serum Amyloid-A (SAA) and Haptoglobin (Hp) as Parameters of Inflammatory Diseases in Cattle. *Vet. Quart.* 16, 21~23.
3. Alsemgeest, S. P. M., Lambooy, I. E., Wierenga, H. K., Dieleman, S. J., Meerkerk, B., van Ederen, A. M. and Niewold, Th. A. (1995). Influence of Physical Stress on the Plasma Concentration of Serum Amyloid-A (SAA) and Haptoglobin (Hp) in Calves. *Vet. Quart.* 17, 9~12.
4. Bruun, C. F., Nordstoga, K., Sletten, K., Husby, G. and Marhaug, G. (1995). Serum Amyloid A Protein in Humans and Four Animal Species : A Comparison by Two Dimensional Electrophoresis. *Comp. Biochem. Physiol.* 112, 227~234.
5. Bruun, C. F., Rygg, M., Nordstoga, K., Sletten, K. and Marhaug, G. (1994). Serum Amyloid A Protein in Mink During Endotoxin Induced Inflammation and Amyloidogenesis. *Scand. J. Immunol.* 40, 337~344.
6. Cui, D., Kawano, H., Takahashi, M., Hoshii, Y., Setoguchi, M., Gondo, T. and Ishihara, T. (2002). Acceleration of Murine AA Amyloidosis by Oral Administration of Amyloid Fibrils Extracted from Different Species. *Pathol. Int.* 52, 40~45.

7. David, C. V. M. and Thomas, J. D. (1996). Amyloidosis. *In*: Bradford, P. S. Large Animal Internal Medicine, 2nd ed., pp. 993~994. Mosby-Year Book, St. Louis.
8. DiBartola, S. P. and Benson, M. D. (1989). The Pathogenesis of Reactive Systemic Amyloidosis. *J. Vet. Intern. Med.* 3, 31~41.
9. Eckersall, P. D., Young, F. J., McComb, C., Hogarth, C. J., Safi, S., Weber, A., McDonald, T., Nolan, A. M. and Fitzpatrick, J. L. (2001). Acute Phase Proteins in Serum and Milk from Dairy Cows with Clinical Mastitis. *Vet. Rec.* 148, 35~41.
10. 藤永良博 (1990). 高齢の雌ウシにおけるアミロイドーシスの頻度とその病理組織学的所見. *山口医学* 39, 293~303.
11. Gillmore, J. D., Lovat, L. B., Persey, M. R., Pepys, M. B. and Hawkins, P. N. (2001). Amyloid Load and Clinical Outcome in AA Amyloidosis in Relation to Circulating Concentration of Serum Amyloid A Protein. *Lancet.* 358, 24~29.
12. Gruys, E. and Snel, F. W. J. J. (1994). Animal Models for Reactive Amyloidosis. *Bailliere's Clinical Rheumatology* 8, 599~611.
13. Heegaard, P. M. H., Godson, D. L., Toussaint, M. J. M., Tjornehoj, K., Larsen, L. E., Viuff, B. and Ronsholt, L. (2000). The Acute Phase Response of Haptoglobin and Serum Amyloid A (SAA) in Cattle Undergoing Experimental Infection with Bovine Respiratory Syncytial Virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 77, 151~159.
14. Hoffman, B. J., Ericsson, L. H., Eriksen, N., Walsh, K. A. and Benditt, E. P. (1984). Murine Tissue Amyloid Protein AA: NH<sub>2</sub>-Terminal Sequence Identity with Only One of Two Serum Amyloid Protein (Apo SAA) Gene Products. *J. Exp. Med.* 159, 641~646.
15. Horadagoda, N. U., Knox, K. M. G., Gibbs, H. A., Reid, S. W. J., Horadagoda, A.,

- Edwards, S. E. R. and Eckersall, P. D. (1999). Acute Phase Proteins in Cattle: Discrimination Between Acute and Chronic Inflammation. *Vet. Rec.* 144, 437~441.
16. Hulsten, C., Sletten, K., Bruun, C. F. and Marhaug, G. (1997). The Acute Phase Serum Amyloid A Protein (SAA) in the Horse : Isolation and Characterization of Three Isoforms. *Vet.Immunol. Immunopathol.* 57, 215~227.
17. 一条 茂, 飯島良朗, 三好憲一, 山崎大輔, 曾部敏夫 (1978). 牛のアミロイドーシスの臨床病理学的所見. *日獣会誌* 31, 707~712.
18. 磯部 敬 (1997). アミロイドーシス, 医学書院, 東京.
19. Jacob, W. (1971). Spontaneous Amyloidosis of Manmals. *Vet. Path.* 8, 292~306.
20. Jacobsen, S., Niewold, T. A., Kornalijnslijper, E., Toussaint, M. J. M. and Gruys, E. (2005). Kinetics of Local and Systemic Isoforms of Serum Amyloid A in Bovine Mastitic Milk. *Vet.Immunol. Immunopathol.* 104, 21~31.
21. Johnson, R. and Jamison, K. (1984). Amyloidosis in Six Dairy Cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 185, 1538~1543.
22. Kindy, M. S., King, A. R., Yu, J., Gerardot, C., Whitley, J. and Beer, F. C. (1998). Adenoviral Expression of Murine Serum Amyloid A Proteins to Study Amyloid Fibrillogenesis. *Biochem. J.* 332, 721~728.
23. Konishi, T., Ichijo, S. and Ogawa, S. (1975). Clinical and Clinico-Pathological Observations of Generalized Amyloidosis in Cattle. *J. Vet. Med. Sci.* 37, 227~238.
24. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage. *Nature (London)* 227, 680~685.
25. Lavie, G., Zucker-Franklin, D. and Franklin, E. C. (1978). Degradation of Serum

- Amyloid A Protein by Surface-Associated Enzymes of Human Blood Monocytes.  
J. Exp. Med. 148, 1020~1031.
26. Maury, C. P. J., Ehnholm, C. and Lukka, M. (1985). Serum Amyloid A Protein (SAA) Subtypes in Acute and Chronic Inflammatory Conditions. *Ann. Rheum. Dis.* 44, 711~715.
27. McDonald, T. L., Weber, A. and Smith, J. W. (1991). A Monoclonal Antibody Sandwich Immunoassay for Serum Amyloid A (SAA) Protein. *J. Immunol. Methods.* 144, 149~155
28. Migita, K., Eguchi, K., Tsukada, T., Kawabe, Y., Takashima, H., Mine, M., Aoyagi, T., Ichinose, Y. and Nagataki, S. (1996). Increased Circulating Serum Amyloid A Protein Derivatives in Rheumatoid Arthritis Patients with Secondary Amyloidosis. *Lab. Invest.* 75, 371~379.
29. 右田俊介, 城尾昌宏, 山本健一, 河原 栄, 中西功夫 (1988). AA 蛋白の形成, 沈着機序. *臨床科学* 24, 202~212.
30. Morimatsu, M., Saricaputi, M., Syuto, B., Saito, M., Shimada, N., Yamamoto, S. and Naiki, M. (1992). Bovine Haptoglobin: Single Radial Immunodiffusion Assay of its Polymeric Forms and Dramatic Rise in Acute-Phase Sera. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 33, 356~372.
31. Murray, M., Rushton, A. and Selman, I. (1972). Bovine Renal Amyloidosis: A Clinico-Pathological Study. *Vet. Rec.* 90, 210~216.
32. Ogata, F. (1991). Heterogeneity of Serum Amyloid A with Respect to Molecular Mass. *Biochem. J.* 273, 245~247.
33. Radostits, O. M., Blood, D. C. and Gay, C. C. (1994). Amyloidosis. *In: Veterinary Medicine*, 8th ed., pp. 103~104. Bailliere Tindall, London.

34. Rossevatn, K., Andresen, P. K., Sletten, K., Husebekk, A., Husby, G., Nordstoga, K., Johnson, K. H., Westermarck, G. T. and Westermarck, P. (1992). 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.* 35, 217~224.
35. Shiroo, M., Kawahara, E., Nakanishi, I. and Migita, S. (1987). Specific Deposition of Serum Amyloid A Protein 2 in the Mouse. *Scand. J. Immunol.* 26, 709~716.
36. Skinner, J. G., Brown, R. A. Li. and Roberts, L. (1991). Bovine Haptoglobin Response in Clinically Defined Field Conditions. *Vet. Rec.* 128, 147~149.
37. Strachan, A. F., Beer, F. C., Westhuyzen, D. R. and Coetzee, G. A. (1988). Identification of Three Isoform Patterns of Human Serum Amyloid A Protein. *Biochem. J.* 250, 203~207.
38. Thomas, C. J., Ronald, D. H. and Norval, W. K. (1997). Amyloidosis. *In: Veterinary Pathology*, 6th ed., pp. 50~55. Williams & Wilkins, Baltimore.
39. Tojo, K., Tokuda, T., Hoshii, Y., Fu, X., Higuchi, K., Matsui, T., Kanetani, F. and Ikeda, S. (2005). Unexpectedly High Incidence of Visceral AA-Amyloidosis in Slaughtered Cattle in Japan. *Amyloid* 12, 103~108.
40. Uchida, E., Katoh, N. and Takahashi, K. (1992). Induction of Fatty Liver in Cows by Ethionine Administration and Concomitant Decreases of Serum Apolipoproteins B-100 and A-1 Concentrations. *Am. J. Vet. Res.* 53, 2035~2042.
41. 和田厚文, 山田俊幸, 伊藤紘一, 猪狩 淳 (2000). 血清アミロイドA遺伝子多型と血清脂質代謝の関連についての研究. *臨床病理* 48, 174~177.
42. Yamada, M., Kotani, Y., Nakamura, K., Kobayashi, Y., Horiuchi, N., Doi, T.,

- Suzuki, S., Sato, N., Kanno, T. and Matsui, T. (2006). Immunohistochemical Distribution of Amyloid Deposits in 25 Cows Diagnosed with Systemic AA Amyloidosis. *J. Vet. Med. Sci.* 68, 725~729.
43. 山田俊幸 (1990). 血清アミロイドA (SAA) 蛋白. *臨床病理* 38, 249~254.
44. 山田俊幸 (1995). 血清アミロイドA (SAA) . *日本臨床* 53, 237~239.
45. 山田俊幸, 内山一晃, 屋形 稔, 中野正明, 下条文武, 荒川正昭 (1988). Serum Amyloid A (SAA) の定量と臨床的意義. *臨床病理* 36, 459~463.