

【産業動物】 原著

血清アミロイド A アイソフォーム解析による
牛アミロイドーシス診断の可能性高橋 英二¹⁾ 松井 高峯²⁾ 猪熊 壽³⁾

1) 十勝農業共済組合 (〒089-1182 帯広市川西町基線59番地28)

2) 帯広畜産大学基礎獣医学研究部門 (〒080-8555 帯広市稲田町西 2 線11)

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

要 約

アミロイドーシス罹患牛の血清を材料に、SDS-PAGE と抗血清アミロイド A (SAA) 抗体を用いたイムノブロット法により、SAA アイソフォームバンドパターンの解析を行い、その診断的意義を検討した。その結果、アミロイドーシス罹患牛および慢性炎症牛ではどちらも約14-kDa の位置に2本の SAA バンドが観察された。しかし、2本のバンドの濃度比率を分析したところ、アミロイドーシス牛では高分子量側バンドの濃度比率が慢性炎症牛に比較して有意に高く、牛アミロイドーシス診断に有用である可能性が考えられた。

キーワード：牛アミロイドーシス、血清アミロイド A、アイソフォームバンドパターン

-----北獣会誌 55, 457~459 (2011)

牛アミロイドーシスは、高度の低蛋白質血症および蛋白尿を特徴所見とし、難治性下痢および浮腫を呈する疾患である^[1-4]。本症の確定診断には腎生検による病理組織学的検査が必須であり、臨床現場では生前の確定診断が困難である。

本症ではアミロイド A (AA) 前駆物質である血清 AA (SAA) の正常な分解が阻害されるため、不完全な AA フラグメントが大量に生成され、それらが重合してできたアミロイド線維が全身諸臓器に高度に沈着すると考えられている^[5-8]。SAA は炎症時に血清中に増加する急性相反応蛋白質のひとつであり、複数のアイソフォームが存在する^[9-12]。近年、二次元 (2D) 電気泳動法を用いた SAA アイソフォームの解析により、アミロイドーシスを発症した牛に特異的な SAA アイソフォームパターンの存在が明らかになっている^[13]。この所見は牛アミロイドーシスの生前診断法確立の可能性を示唆するものであるが、2D 電気泳動法は特殊な機器を必要とするなど、時間とコストがかかる。そこで本研究では、より簡便な方法として、アミロイドーシス発症牛の血清に対して、SDS-PAGE とイムノブロット法を用いた SAA バンドパターンの解析を行い、その診断的意義を

検討した。

材料と方法

供試材料として、病理学的にアミロイドーシスと診断された牛の血清7検体 (No. 1-7)、臨床的に慢性炎症性疾患と診断され、かつ血清 γ -グロブリン濃度の著しい増加 ($>3.0 \text{ g/dl}$) を示した牛の血清5検体 (No. 8-12) および臨床的に異常が認められない健常牛の血清2検体 (No. 13, 14) を用いた。血清は使用するまで -20°C に保存した。

SDS-PAGE はミニプロテイン III システム (BIO-RAD Japan、東京) で実施し、15%アクリルアミドゲル (BIO-RAD Japan) を使用した。供試血清をサンプルバッファーで10倍に希釈後、3分間煮沸した。得られた試料 $5 \mu\text{l}$ をゲルにアプライし、 20 mA/ゲル の定電流で泳動した。泳動後のタンパク質はセミドライ式ブロッキング装置 (トランスプロット SD セル、BIO-RAD Japan) を用いてポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜に転写後、トリス緩衝生理食塩水 (TBS) で洗浄し、3%ゼラチン加 TBS 中で 37°C 1時間ブロッキングした。その後、0.1%ウシ血清アルブミン加 TBS (A-TBS) で1,000

倍に希釈した一次抗体（抗ウシ SAA ウサギ抗体^[13]）と室温で16時間反応させた。一次抗体反応終了後は PVDF 膜を0.05% Tween-20加 TBS (TTBS) で3回洗浄後、0.1% A-TBS で2,000倍に希釈した西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体 (Goat anti-Rabbit IgG-HRP, Affinity Purified, Biomedical Technologies Inc., Stoughton, USA) と室温で1時間反応させた。反応終了後、TTBS で3回洗浄し、化学発光法 (ECL westernblotting detection reagents, GE ヘルスケアバイオサイエンス社、東京) によりバンドを検出した。SAA バンドパターンの解析は画像解析ツール Scion Image (<http://www.scioncorp.com/>) を用いて算出した。

アミロイドーシス牛、慢性炎症牛および健常牛の血清 SAA バンドパターンの違いを SAA バンドの濃度比率を比較することにより、アミロイドーシス診断におけるそれらの意義を検討した。両疾患群における SAA バンドの濃度比率の有意差検定には、Student-*t* 検定を用いた。

結果および考察

アミロイドーシス発症牛血清蛋白の2D電気泳動解析により、アミロイドーシス特異的 SAA アイソフォームパターンがみられることが報告されている^[13]。2D電気泳動法は高価で特殊な機器を必要とし、結果を得るまでに最低でも2日間を要する。そこで本研究では、より簡便な方法として、24時間以内に結果が得られる SDS-PAGE とイムノブロット法を用いてアミロイドーシス発症牛 SAA アイソフォームパターンを解析した。

アミロイドーシス牛、慢性炎症牛および健常牛の血清イムノブロットのバンド像を図1に示した。アミロイドーシス牛の血清では約14-kDaの位置に No. 1-6で2本、また No. 7で1本の明瞭な SAA バンドが観察された。健常牛2頭ではバンドがみられなかったものの、慢性炎症牛5頭では、アミロイドーシス牛にみられたものとはほぼ同じ位置に2本のバンドが全例で観察された。このことから、バンドの位置の違いから本症を鑑別診断することは困難と考えられた。

次に、アミロイドーシス牛血清および慢性炎症牛血清でみられた2本の SAA バンドの高分子量側と低分子量側のバンド濃度比率を比較したところ、アミロイドーシス牛では高分子量側バンドの割合が46.8-100.0% (平均76.1%) であったのに対し、慢性炎症牛では35.0-61.9% (平均48.5%) と低く、両疾患群で有意差 ($p < 0.01$) が認められた (表1)。こ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のひとつと考えられた。とくに、高分子量側バンドの割合が65%を超えるものは、アミロイドーシス牛で7頭中6頭 (86.0%)、アミロイド沈着のない慢性炎症牛では5頭中0頭であり、今回アミロイドーシス牛血清にみられた高分子量側バンドの濃度比率の高値は、炎症と無関係な本症特異的 SAA アイソフォームの増加によると考えられ、牛アミロイドーシス診断に有用である可能性が考えられた。本法の牛アミロイドーシス診断における特異性については今後さらに症例数を重ねて検討する必要があると思われた。

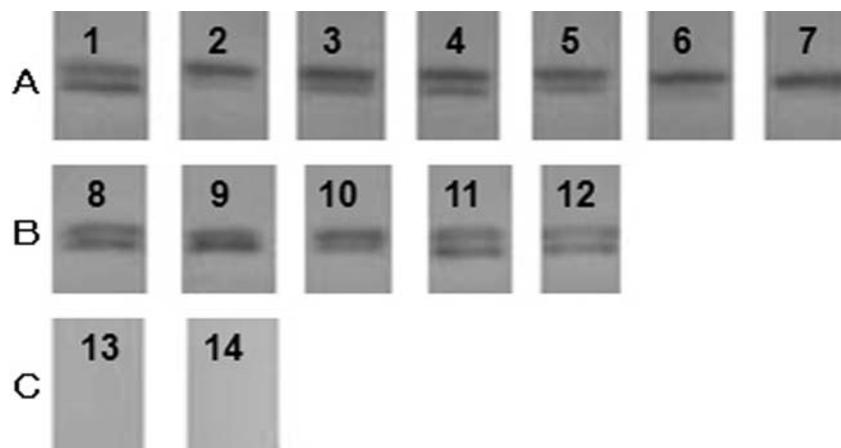


図1 アミロイドーシス罹患牛(A)、慢性炎症牛(B) および健常牛(C)の血清を15%ゲルにアプライして SDS-PAGE 処理後、抗ウシ SAA 抗体を用いてイムノブロットしたときの14kDa 付近の像 No. 1-6と No. 8-12で2本、No. 7で1本の SAA バンドが観察された。健常牛血清ではバンドがみられなかった。

表1 SDS-PAGE とイムノブロットにより14-kDa 付近にみられた2本のバンドの濃度比—アミロイドーシス牛と慢性炎症牛の比較

Group	ID	高分子量側バンド(%)	低分子量側バンド(%)
アミロイドーシス	1	46.8	53.2
	2	86.1	13.9
	3	72.4	27.6
	4	67.5	32.5
	5	72.6	27.4
	6	87.5	12.5
	7	100.0	0.0
平均		76.1 ^{a)}	23.9
慢性炎症	8	50.6	49.4
	9	35.0	65.0
	10	61.9	38.1
	11	45.7	54.3
	12	49.5	50.5
平均		48.5 ^{b)}	51.5

a-b 間で有意差あり ($p < 0.01$)

引用文献

- [1] 一条 茂、飯島良朗、三好憲一、山崎大輔、曾部敏夫：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 (1978)
- [2] Jacob W: Spontaneous amyloidosis of mammals, *Vet Path*, 8, 292-306 (1971)
- [3] Johnson R, Jamison K: Amyloidosis in six dairy cows, *J Am Vet Med Assoc*, 185, 1538-1543 (1984).
- [4] Konishi T, Ichijo S, Ogawa S: Clinical and clinic-pathological observation of generalized amyloidosis in cattle, *J Vet Med Sci*, 37, 227-238 (1975)
- [5] Kindy MS, King AR, Yu J, Gerardot C, Whitley J, Beer FC: Adenoviral expression of murine serum amyloid A proteins to study amyloid fibrillogenesis, *Biochem J*, 332, 721-728 (1998)
- [6] 右田俊介、城尾昌宏、山本健一、河原 栄、中西功夫：AA 蛋白の形成・沈着機序、臨床科学、24、202-212 (1988)
- [7] Ogata F: Heterogeneity of serum amyloid A with respect to molecular mass, *Biochem J*, 273, 245-247 (1991)
- [8] Rossevatn K, Andresen PK, Sletten K, Husebekk A, Husby G, Nordstoga K, Johnson KH, Westermarck GT, Westermarck P: The complete amino acid sequence of bovine serum amyloid A and of subspecies of the tissue-deposited amyloid fibril protein A, *Scand J Immunol*, 35, 217-224 (1992)
- [9] Alsemgeest SPM, Horadagoda A, Hulskamp-Koch CK, Tooten PCJ, Kim DH, Niewold TH, Gruys E: First evidence for the existence of multiple isoforms of bovine serum amyloid-A, *Scand J Immunol*, 41, 407-413 (1995)
- [10] Bruun CF, Nordstoga K, Sletten K, Husby G, Marhaug G: Serum amyloid A protein in humans and four animal species, *Comp Biochem Physiol*, 112, 227-234 (1995)
- [11] Jacobsen S, Niewold TA, Kornalijnslijper E, Toussaint MJM, Gruys E: Kinetics of local and systemic isoforms of serum amyloid A in bovine mastitic milk, *Vet Immunol Immunopathol*, 104, 21-31 (2005)
- [12] Strachan AF, Beer FC, Westhuyzen DR, Coetzee GA: Identification of three isoform patterns of human serum amyloid A protein, *Biochem J*, 250, 203-207 (1988)
- [13] Takahashi E, Kuwayama H, Kawamoto K, Matsui T, Inokuma H: Detection of serum amyloid A isoforms in cattle, *J Vet Diag Invest*, 21, 874-877 (2009)