

실험적 Amyloidosis 형성에 관한 초미형태학적 연구

계명대학교 의과대학 병리학교실

권건영 · 백승조 · 장은숙

서 론

유전분(amyloid)은 병적인 상태에서 볼 수 있는 일종의 단백물질로서 신체 여러 조직 또는 기관의 세포들 사이에 축적되어 유전분증(amyloidosis)을 야기하여 다양한 임상소견을 보여 준다^{1,5)}. 유전분증의 진단은 임상소견이 특이하지 않아 병리조직학적으로 유전분을 관찰 함으로써만 가능하다⁶⁾. 유전분이 침착된 부위는 육안적으로 황색을 띠며 묽은 황산을 적용할 때는 푸른색 혹은 자주빛으로 변하고, 조직학적으로 hematoxylin-eosin 염색에서는 무정형의 호산성 초자질로 세포외에 침착됨을 볼 수 있다. 또한 Congo red 염색을 시행하면 분홍색 또는 적색으로 변하며 특히 편광현미경(polarizing microscope)을 통해서 관찰하면 녹색복굴절(green birefringence)을 나타내는 특성이 있다⁷⁾. 유전분은 그 단백의 화학적인 성상이나 생성 기전에 따라 다양하게 분류되며^{7,9)} 주로 AA(amyloid-associated)형과 AL(amyloid light chain)형으로 대별된다¹⁾. AL형은 면역글로불린을 분비하는 형질세포로부터 만들어지며 흔히 다발성 골수종을 포함하는 B-세포질환(B-cell dyscrasia)에서 관찰된다. AA형은 면역글로불린 형태가 아닌 분자량이 8,500 dalton으로 76 아미노산 잔기를 가지는 단백물질로서 이차성 유전분증에서, 특히 강직성 척추염이나 류마토이드 관절염 등 만성 염증을 가지는 경우 가끔 관찰되며 실험적으로도 야기시킬 수 있다^{10,14)}.

실험적으로는 대체로 카세인(casein) 또는 질산은 (AgNO_3)을 사용하여 생쥐에 피하로 반복주사함으로써 유전분형성을 유발시킬 수 있다^{13,15,16)}. 유전분이 형성되는 초기단계에서는 흔히 혈관투과성의 변화가 일어나며 혈관내 혈장성분이 혈관벽으로 유출됨으로써 시작된다고 보고되어 있다^{11,17)}. 그리고 생쥐에

실험적으로 유전분증을 유발시킨 후 간 및 비장에 발생되는 유전분 생성에 관한 형태학적 연구들에 의하면 유전분생성에 대한 초기변화로서 세동맥성 모세혈관 수준에서 병변이 시작되며 미세혈관의 손상이 있을 경우 손상받지 않은 부위보다 유전분 침착이 더 잘 일어남이 보고되었다^{11,13)}. 그러나 유전분 형성의 초기단계에 대한 초미형태학적 연구에 있어서는 많은 보고가 되어있지 않으며 유전분 단백의 종류가 다양하고 그 형성기전이 각각 상이하여 유전분의 발생기전에 대해서는 연구자들에 따라 달리 보고되고 있는 실정이다^{10,13,16,18,19)}.

저자는 상기한 문헌적 지견들을 기초로 하여 실험적으로 유전분 형성을 야기시키는 물질인 카세인과 혈관내피세포에 손상을 초래하는 내독소(endotoxin)를 생쥐에 피하로 반복 주사하여 AA 원섬유(AA fibril)의 형성을 유도하였다. 그리고 초기 과정에서 미세혈관계 및 실질세포내에서 어떤 형태학적 변화가 일어나는가를 광학 및 전자현미경으로 관찰하고, 고밀도 전자표지 물질인 ferritin과 india ink를 사용하여 손상받은 혈관에 있어서 혈관벽으로 혈장의 유출정도와 유전분형성 정도를 비교하고 유전분형성에 관한 형태학적 기전을 알아보기 위해서 본 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

1) 실험동물 :

체중 20g 내지 30g되는 ICR생쥐 85마리를 사용하여 대조군 및 실험군의 재료로 제공하였다. 대조군(5마리)은 생리식염수 0.5ml를 배부피하조직에 매일 1회 씩 4주간 반복주사하였다. 실험군은 카세인 단독투여군(40마리)과 카세인-내독소(casein-endotoxin) 투여군(40마리)으로 나누고 카세인 투여군은 카세인 용액 0.5ml를, 카세인-내독소 투여군은 카세인과 내

독소 혼합용액 0.5ml를 배부피하조직에 매일 1회씩 주사하였으며, 각각 2주, 3주, 4주 및 6주간씩 시행하였다(Table 1).

Table 1. Protocol for induction of casein-induced amyloidosis in mice

Group	No. of animal	Soln.(g)	Weeks
Control	5	saline	4
Experimental			
Casein(GI)	(40)		
Ia	10	casein, 0.05	2
Ib	10	casein, 0.05	3
Ic	10	casein, 0.05	4
Id	10	casein, 0.05	6
Ca-ET(GII)	(40)		
IIa	10	casein, 0.05	2
IIb	10	casein, 0.05	3
IIc	10	casein, 0.05	4
IId	10	casein, 0.05	6

Soln. (g): dosage of injected solution, Ca-ET: casein-endotoxin, GI: group I, GII: group II

2) 실험방법 :

카세인 용액의 제조는 10g의 카세인(Casein, Aldrich Chemical Co., USA)에 90ml의 중류수와 10ml의 0.5N NaOH를 혼합하였다. 카세인-내독소용액의 제조로는 이미 만들어진 카세인용액에 내독소(E. coli 026: B6, Bacto-lipopolysaccharide, Difco, USA)를 혼합하여 최종 용액을 15 μ g/ml로 만들었다.

(1) 간 및 비장의 in situ주입: 혈관외로 혈장의 유출정도가 유전분형성과 관련이 있는가를 알아보기 위해 ferritin과 india ink를 사용하여 in situ주입을 실시하였다. 생쥐를 Nembutal로 마취시킨 후 흉강 및 복강을 열고 즉시 좌심실로 heparin 150 unit를 주입하고 흉부대동맥에 20-gauge polyethylene cannula를 넣은 후 5% ferritin(horse spleen ferritin, Sigma Chemical Co., USA) 2.5ml를 cannula를 통해 주입하였다. India ink(Pelikan AG, Hanover, West Germany)의 주입을 위해서는 0.5ml의 india ink원액을 흉부 대동맥의 cannula를 통하여 서서히 주입하면서 간의 전면 가장자리에 india ink가 도달하여 간의 표면이 약간 팽대될 때 그 주입을 중지하였다. Ferritin과 india ink주입을 각각 마친 후 간과 비장을 생쥐에서 적출한 후 광학현미경적 관찰과 전자현미경적 관찰을 위한 시료로 제공하였다.

(2) 광학현미경적 관찰: 적출된 간 및 비장 조직을 10% 중성포르말린에 고정하고 탈수한 후 침투과정을 거쳐 파라핀 포매를 실시한 후 4 μ m의 박절편을 만들어 hematoxylin-eosin염색 및 iron염색을 하였고, Congo red염색을 실시하여 편광현미경으로 관찰하였다.

(3) 면역조직화학적 관찰: 카세인 반복투여로 형성된 유전분 원섬유가 AA 원섬유임을 증명하기 위해 AA에 대한 단일클론성 항체(Dako-Amyloid A)를 사용하여 면역조직화학적 겹색을 실시하였다²⁰⁾. 포르말린 용액으로 고정되고 파라핀 포매된 간 및 비장 조직을 4 μ m두께로 잘라 슬라이드에 부착하여 탈파라핀과 함수 과정을 거친 후 0.3% H₂O₂와 혼합한 메탄올(Merck, W. Germany)이 담긴 Coplin jar에 슬라이드를 30분간 담구어 내인성 과산화효소에 대한 반응을 차단시키고 0.01M 인산염 완충용액에서 10분간 세척하였다. 정상 마혈청(Vector ABC kit)으로 20분간 실온에서 방치시킨 후 마혈청을 제거하고 1차 항체로 amyloid A component (Dako Amyloid A), 1:50을 사용하여 37°C에서 30분간 부란하였다. Anti-mouse IgG, 1: 200을 사용하여 상온에서 30분간 부란시킨 후 ABC 복합체로 30분간 실온에서 방치후 DAB로 발색하고 Mayer hematoxylin으로 대비염색을 한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

(4) 투과전자현미경적 관찰: 투과전자현미경용으로 제공된 간 및 비장조직 절편을 1mm³의 크기로 세절하여 2.5% glutaraldehyde용액 (0.1M phosphate buffer, pH 7.4)으로 1~4°C에서 2시간 전고정을 하고 0.1M 인산염 완충용액으로 세척한 후 1% OsO₄용액에서 2시간 후 고정을 실시하고 같은 완충용액으로 세척을 하여 계열에탄올로 탈수를 하였다²¹⁾. Propylene oxide로 치환한 후 Luft방법²²⁾에 의한 epon혼합물로 포매하여 37°C에서 12시간, 45°C에 12시간, 60°C에 48시간동안 방치하여 열중합을 시켰다. 포매된 조직을 1 μ m두께로 박절하여 toluidine blue염색을 하여 관찰 부위를 결정한 다음 초박절은 Sorvall MT 5000형 초박절기에 Dupont diamond 칼을 부착하여 회백색(40~60nm)의 간접색을 나타내는 초박절편을 얻어서 grid에 부착하여 Watson²³⁾ 및 Reynolds방법²⁴⁾에 의한 uranyl acetate와 lead citrate로 이중전자염색을 실시하여 Hitachi H-600형 투과전자현미경으로 관찰하였다.

(5) 주사전자현미경적 관찰: 실험군의 시간별 주입군에서 각각 2마리씩을 임의로 선택하여 양와위로

고정시킨 후 흉부부의 정중선을 따라 개복한 후 흉부대동맥의 cannula를 통해 생리식염수를 주입하면서 좌심방을 절개하여 혈관내의 혈액을 제거한 후 즉시 0.5% glutaraldehyde와 0.5% paraformaldehyde를 혼합한 고정액으로 관류하여 고정시킨 후, 주사전자현미경용으로 제공된 간 및 비장을 절취하여 $1 \times 1 \times 4$ mm 정도 크기로 세절한 후 DMSO(dimethyl sulfoxide) 할단(cracking)을 위한 시료제작과정을 실시하였다²⁵⁾. 할단면 관찰을 위하여 절취된 조직을 1일간 0.5% glutaraldehyde 용액과 0.5% paraformaldehyde 용액을 혼합한 고정액에 더 고정한 후 1% OsO₄ 용액으로 2시간동안 후고정을 하고 0.1M 인산염 완충용액으로 세척한 다음 25% DMSO에 30분간, 50% DMSO에 30분간 담근 다음 액체질소로 동결한 후 조직을 할단하였다. 할단된 조직을 50% DMSO 용액에 녹여서 같은 완충용액에 세척한 후 2% 탄닌산에 12시간 침투시킨 다음 완충용액으로 세척한 후 1% OsO₄ 용액으로 2시간동안 전도염색을 실시하고 계열에탄올로 탈수를, isoamyl acetate로써 침투를 시켜 Hitachi HCP-2형 임계점전조기로써 이산화탄소를 사용하여 임계점전조를 실시하였다²⁶⁾. 전조된 시료를 시료판에 부착한 후 Eiko 회사제 IB-3형 ion-coater로 Pt-Pd를 사용하여 증착한 후 Hitachi S-520형 주사전자현미경으로 관찰하였다.

성 적

1. 광학현미경적 소견

카세인을 2주간 투여한 군에서 간조직에서는 문맥부위를 중심으로 염증세포가 침윤하였고 간실질세포에는 경한 변성소견을 보였다. 비장에서는 백수(white pulp)와 적수(red pulp)에 울혈과 국소적인 출혈만 관찰되었으나 카세인-내독소 투여군에서는 유전분 침착이 방여포지역(perifollicular area)에서 부분적으로 나타나기 시작하였다.

카세인을 3주간 투여한 군에서는 간조직의 문맥부위에 만성 염증세포의 침윤과 함께 유전분이 혈관벽 및 혈관 주위와 동양혈관에 부분적으로 침착되었다. 비장에서는 방여포지역에 세동맥성 모세혈관벽과 동양혈관벽에 미만성으로 침착되면서 적수로는 부분적으로 확장되었다(Fig 3, 4). 이때 유전분이 침착한 부위에 인접해서 흔히 대식세포와 다핵성 거대세포들이 발견되었다.

4주간 투여군에서는 염증세포의 침윤이 여전하였고 유전분 침착은 보다 현저하면서 간에서는 확장된 동양혈관을 따라 미만성으로 관찰되었고 비장에서는 적수로 확장되었으며 대식세포의 침윤도 더 뚜렷하였다(Fig 5, 6).

6주간 투여군에서는 유전분 침착이 4주군에 비해 간조직에서는 감소되었으며 주로 문맥주위의 혈관벽과 동양혈관에 부분적으로 관찰되었으나 비장에서는 유전분 침착이 여전하였다.

카세인-내독소를 투여한 군에서는 카세인 단독투여군에 비해 출혈소견이 더 현저하였고, 유전분도 보다 많이 침착되었다(Table 2). Ferritin과 india ink를 흉부대동맥을 통해 주입한 후 간 및 비장을 관찰하였을 때 카세인-내독소 투여군에서는 카세인 단독 투여군에 비해 혈관벽으로 유출된 ferritin과 india ink입자들이 더 뚜렷하였다(Fig 7). 그리고 비장에서 카세인 투여 후 기간별로 비교하였을 때 2주군에서 ferritin 및 india ink입자들이 적수에서 많이 관찰되었으나 3주 및 4주군으로 갈수록 점차 감소되었다(Fig 8). Congo red염색을 하여 편광현미경으로 관찰하였을 때 2주군 및 3주군에서 주로 간문부위에서 혈관벽을 따라서 경하게 녹색 복굴절을 나타내었으며 비장에서는 방여포지역에 원섬유성으로 나타나고 4주군 및 6주군에서는 간조직의 동양혈관으로, 비장에서는 적수에 미만성으로 나타났다(Fig 9).

2. 면역조직화학적 소견

카세인을 투여한 2주군에서 Disse강에 연한 간세포의 세포막을 따라 AA형 유전분이 경하게 염색되었고 문맥부위의 혈관벽에도 보였는데 카세인-내독소군에서 더 뚜렷한 염색상을 보였다. 3주 및 4주군에서는 점차로 문맥벽과 간조직내 동양혈관에 미만성으로 성상 또는 등근 세포소(round nests)로 나타났으며 6주군에서는 문맥주위에 부분적으로 유전분이 염색되었다(Fig 10a). 비장에서는 2주군에서 방여포지역에 국소적으로 경한 염색상을 보였으며 카세인-내독소 군에서는 더 뚜렷하였고 3주 및 4주군에서는 적수쪽으로 진하게 염색되는 유전분 물질을 볼 수 있었으며 6주군에서도 적수에 미만성으로 침착됨을 보였다(Fig 10b).

3. 투과전자현미경적 소견

카세인을 2주간 투여한 군에서 간조직의 Disse강

Table 2. Light microscopic findings of casein-induced amyloidosis in mice

Fidings \ Group	Ia	IIa	Ib	IIb	Ic	IIc	Id	IId*
Liver								
Inflammatory infiltration								
Portal	++	+++	+	++	+	++	++	+++
Parenchymal	+	+/++	+	+	+	+	+	++
Degeneration of hepatocytes								
Swelling	-	-/+	-/+	+	-/+	+	-	-/+
Nuclear atypia	-/+	+	-/+	+	+	++	+	++
Hemorrhage	-	+	-	++	-	+	-	++
↑ Kupffer cells	-	+	+	+/++	++	+++	+	++
Amyloid deposits								
Portal-periportal vessels	-/+	+	+	+/++	++	++	+/-	++
Sinusoids	-/+	-/+	+F	+F	+D	+D	+F	+F
Spleen								
Congestion & hemorrhage	+	++	+/++	++	+	++	++	++
↑ Macrophages	-/+	+	+	+/++	++	++	++	++
Amyloid deposits								
White pulps	-	-	-	-	+	+	+	+
Arterioles	-	+	+	+/++	++	++	++	++
Perifollicular	+	+F	+/++	++	++	++	++	++
Red pulps	-	-/+	+F	+F	+F	+D	+D	+D

*see table 1, F: focal deposit, D: diffuse deposit

- : absent, + : mild, ++ : moderate, +++ : severe, ↑ : increase in number

내로 유전분 원섬유가 성글게 침착되었고 Kupffer 세포에서는 한계막으로 둘러싸인 리소솜과 다양한 형태를 가지는 고전자밀도의 과립들이 관찰되었다 (Fig 11, 12). 또한 india ink를 주입하였을 때 india ink 입자들이 혈관외로 잘 유출됨을 볼 수 있었다. 비장에서는 모세혈관벽과 인근 조직에 유전분이 침착되기 시작하였고 모세혈관의 내피세포 간격에서는 흔히 틈(gap)이 관찰되었다. 대식세포의 세포질에는 다수의 리소솜과 다양한 형태를 가지는 고전자밀도의 과립들이 관찰되었다. 카세인-내독소 투여군에서는 대식세포내에 유전분 원섬유를 형성하였고 세포외로도 배출되었다. 카세인 투여 3주군에서 간조직에서는 Disse강내와 모세혈관벽과 동양혈관에 유전분 원섬유의 침착이 증가하였다. 침착된 유전분은 비분지성 원섬유(nonbranching fibril) 형태를 보였다. 비장에서는 대식세포내에 조면내형질세망(rough endoplasmic reticulum)과 골지 복합체가 잘 발달되어 있으며 일차성 리소솜이 흔히 관찰되고 이와 인접하여 방추상의 고전자밀도의 원섬유와 유전분 원섬

유가 보다 많이 관찰되고 어떤 대식세포에는 조면내형질세망이 상당히 확장되면서 중등도의 전자밀도를 가지는 물질이 차여져 있었다. 카세인 투여 4주군에서 간세포는 융모를 따라 유전분 물질이 세포외로 배출됨을 보였으며 융모의 형태는 전반적으로 불규칙하고 일부에서는 소실되었다(Fig 13). 간세포내에서는 리소솜과 고전자밀도 원섬유과립들을 관찰할 수 있었다. 카세인-내독소 군에서는 혈관내피세포의 손상이 뚜렷하면서 내피세포 간격의 틈이 넓어지고 혈관 밖으로는 유전분이 침착되면서 기저막을 잘 관찰되지 않았다(Fig 14). 그리고 종종 Kupffer 세포내에서는 변성된 세포 소기관을 탐식하는 소견도 관찰되었다. 비장에서는 적수의 동양혈관벽을 따라 유전분이 침착하였고 모세혈관과 대식세포 사이에 유전분 원섬유가 침착하였으며 혈관내 혈장은 유전분이 침착된 부위로 유입되었다(Fig 15). 카세인 투여 6주군에서 간세포와 Kupffer세포 및 대식세포에서는 유전분 생산과 함께 교원질 삭도 만들어 배출하였고 대식세포내에는 탄식한 물질을 다수 포함

하였고 탐식한 공포(autophagic vacuole)내에는 변성된 리소솜 구조와 세포 소기관을 포함하였다(Table 3, Fig 16). 본 실험에서 유전분이 왕성하게 침착되는 시기에 공통적으로 관찰된 소견으로는 간세포, Kupffer세포 및 비장의 대식세포내에 잘 발달된 조면내 형질세포 또는 골지 복합체에서 만들어진 다수의 리소솜 과립들을 볼 수 있었고 이들은 둥글거나 타원형 또는 길쭉한 형태로 한계막에 둘러싸인 채 중등도의 전자밀도를 가졌다(Fig 17). 다양한 형태의 고전자밀도를 가진 과립들내에는 흔히 원섬유성 구조가 나타나고 이들은 유전분 원섬유의 형태를 보이면서 세포외로 배출되었다(Fig 1, 18).

4. 주사전자현미경적 소견

카세인 투여 3주군에서 간실질내의 동양혈관은 전반적으로 확장되어 있으며 Kupffer 세포의 수가 증가되어 있고 동양혈관내에 방사상의 원섬유 형태를 정하는 유전분 물질이 덩어리를 이룬 채 관찰되었다. 문맥부위에서 혈관벽은 부분적으로 불규칙하게 비후되었다(Fig 19). 비장에서는 세동맥 및 동양혈관 벽이 불규칙하게 비후되어 있으며 방여포지역과 때때로 적수쪽으로 유전분이 덩어리를 만들며 침착하였다. 카세인 투여 4주군에서 문맥의 혈관벽에 유전분이 덩어리형태로 침착하였으며(Fig 20), 간실질의

Table 3. Transmission electron microscopic findings of casein-induced amyloidosis in mice

Fidings \ Group	Ia	IIa	Ib	IIb	Ic	IIc	Id	IIId*
Common(liver & spleen)								
Degeneration(CEC)								
Widening of CEC gap	+	++	++	+++	++	+++	+	++
Swelling	+	+	+	++	++	+++	+	++
Loss of basement membrane	+	+	+	++	+++	+++	++	+++
Extravasation of Fe and In particles	++	+++	+	++	-/+	+	-	-
Liver								
↑ Primary lysosome**	+	+	++	+++	++	++	+	++
↑ Secondary lysosome**	-	-	-	-	-	+	+	++
Excretion of amyloid fibrils**	+	++	++	+++	+++	+++	++	++
Amyloid deposits								
Space of Disse	+	+	++	++/+++	+++	+++	++	++
Sinusoid	-	-/+	+	++	+++	+++	++	++
Portal vessel wall	+	+	++	++	+++	+++	++	++
Spleen								
↑ Primary lysosome**	+	++	++	+++	++	+++	+	++
↑ Secondary lysosome**	-	-	-	-	-	+	+	++
Dense fibrillar inclusion**	-	+	++	+++	++	+++	++	++
Excretion of amyloid fibrils**	+	++	++	+++	++	+++	++	++
Amyloid deposits								
White pulp	-	-/+	-/+	+F	+F	+F	-	-
Arteriolar wall	-/+	+	+	++	++	+++	++	++
Sinusoidal wall	-	+F	+	++	+++	+++	+++	+++
Perifollicular	-	+F	+	++	++D	++D	++D	++D
Red pulp	-	-/+	+	++F	++D	++D	++D	++D

*see table 1, F: focal deposit, D: diffuse deposit, Fe: ferritin, In: india ink.

CEC: capillary endothelial cell, -: absent, +: mild, ++: moderate, +++: severe,

↑: increase in number, **: present in hepatocytes and Kupffer cells,

**: present in splenic macrophages



Fig 1. Schematic representation of the process in intracellular formation of amyloid associated fibrils.
1: primary lysosomes, 2: elongated electron dense inclusions, 3: membrane bounded fibrillar inclusions,
4: AA fibrils.

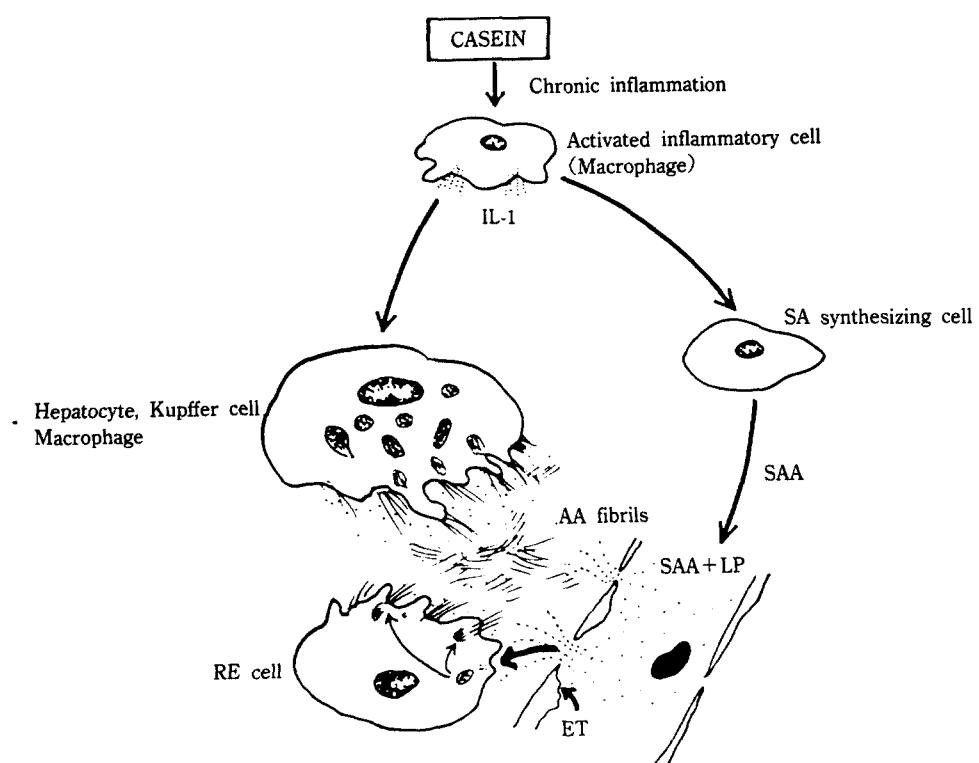


Fig 2. Schematic representation of the mechanism involved in casein-induced amyloid formation.
IL-1: interleukin-1, SAA: serum amyloid associated, AA: amyloid associated, LP: lipoprotein, RE: reticuloendothelial, ET: endotoxin.

동양혈관은 여전히 확장되면서 구형(global)의 유전분이 침착되고 때때로 동양혈관내를 폐쇄하고 있었다 (Fig 21). 비장의 적수에는 미만성으로 유전분이 덩어리 형태로 침착되었고 혈관벽도 전반적으로 비후를 보였다(Fig 22). 6주군의 간조직에서는 유전분 침착물이 다소 감소되었으나 비장에서는 적수 부위에 유전분 침착물이 여전히 관찰되었다.

고 칠

실험적으로 유전분증을 만드는 경우 관찰되는 유전분 원섬유는 amyloid A(AA)로서 그 전구물질은 혈청 AA단백(SAA)이며^{27,28)} SAA의 합성은 주로 간세포에서 이루어진다는 사실이 여러 실험적 연구를 통하여 밝혀졌다²⁹⁻³¹⁾. 형태학적 연구로는 Shirahama 및 Cohen³²⁾과 Takahashi 등³³⁾이 면역효소화학적 방법을 이용한 전자현미경적 연구를 통해 SAA가 간세포의 조면내형질세망과 골지 복합체에서 만들어지고 혈류를 통해 분비된다고 보고하였다. 이때 카세인 투여로 인해 혈관 손상이 야기되고 손상된 부위를 통하여 혈장이 혈관외로 유출되는 경우 혈장내에 포함된 SAA가 혈관외로 빠져나가 유전분 침착을 초래할 수 있다¹¹⁾. 유전분이 혈관벽에 침착하는 곳은 주로 세동맥성 모세혈관에서 먼저 시작되고 이때 혈관의 형태학적 변화가 동반되며 혈장이 혈관외로 유출됨으로써 초래된다¹³⁾. Ferritin과 india ink입자를 사용하여 광학 및 전자현미경적으로 관찰하면 ferritin 및 india ink입자들이 혈관내에서 볼 수 있을 뿐만 아니라 혈관외에 유전분이 침착된 부위에서도 나타나고 있음을 보아 혈장의 유출이 유전분의 생성과 밀접한 관계가 있음을 보여주는 소견으로 생각된다¹¹⁾. 본 실험에서 간 조직에서 유전분이 침착되는 부위는 주로 문맥 내피세포하와 간세동맥벽, Disse강 및 동양혈관이었으며 ferritin 또는 india ink를 주입했을 때 혈관내와 혈관주위의 유전분 침착부위 모두에서 ferritin 또는 india ink입자를 관찰할 수 있었다. 이는 혈관내피세포의 결손부위를 통하여 혈관내의 고분자물질(macromolecules)이 혈관밖으로 빠져나간 것으로 해석할 수 있다.

광학현미경상 혈관의 형태학적 변화는 뚜렷하지 않았으나 전자현미경적 소견에서는 혈관내피세포의 변성과 더불어 기저막이 불분명하거나 소실되었다. 유전분 침착이 보다 뚜렷하게 나타나는 3주 및 4주군에서는 간조직에서 문맥 내피세포하와 Disse강내에

침착된 유전분이 동양혈관까지 광범위하게 확장되었으며 이때 혈관 내피세포에는 뚜렷한 변성소견이 관찰되고 전자현미경상 기저막은 관찰되지 않았다. 비장에서는 유전분이 형성되는 초기에는 일반적으로 방여포지역에서 시작되며 인접한 혈관내피세포의 연결부분에서는 흔히 틈이 관찰된다^{15,34)}. 비장의 방여포지역에서는 유출된 카세인이 가장 잘 걸리는 장소이며 주로 세동맥성 모세혈관에서 침착되어 여기에서 면역반응이 일어나 혈관내피세포에 손상을 초래하게 된다¹³⁾.

본 실험에서 카세인 용액의 반복주입 기간과 유전분 형성정도를 비교했을 때 광학현미경상 간조직에서는 2주군에서 염증세포 침윤의 특기할 소견이 없었고 3주군부터 문맥부위를 중심으로 유전분이 혈관벽에 침착하면서 동양혈관에도 부분적인 침착을 보였고 4주군에서는 문맥 및 동양혈관에 미만성으로 광범위한 침착을 보였으며 6주군에서는 유전분 침착이 다소 감소된 소견을 얻었다. 비장에서는 2주군에서 방여포지역에 부분적인 유전분 형성외에 뚜렷한 소견이 없었고 3주 및 4주군에서는 유전분 형성과 침착이 방여포지역과 적수에서 왕성하게 일어났으며 6주군에서도 유전분 침착이 다소 감소된 소견을 얻었다. 비장에서는 2주군에서 방여포지역에 부분적인 유전분 형성외에 뚜렷한 소견이 없었고 3주 및 4주군에서는 유전분 형성과 침착이 방여포지역과 적수에서 왕성하게 일어났으며 6주군에서도 유전분 침착이 다소 감소된 소견을 얻었다. 그러나 전자현미경적 소견에서는 카세인투여 2주군에서부터 유전분 원섬유가 활발히 만들어지면서 혈관벽과 혈관에 인접한 부위로 침착되었고 간세포, Kupffer세포 및 비장의 대식세포내에는 리소솜파립들이 다수 관찰되면서 세포내에서 만들어진 유전분 원섬유는 주로 세포막에 인접한 세포질내에서 발견되었다. 간에서는 간세포막을 따라서 유전분 원섬유가 세포외로 배출되며 이들 원섬유는 Disse강내에 침착되었다. 이러한 소견은 유전분 A에 대한 단일클론성 항체를 사용하여 면역조직화학적 검색을 실시해서도 일치하였다. 즉 유전분 형성의 초기과정에서는 간세포막을 연하여 동양혈관벽을 따라 미만성으로 AA에 대한 염색상이 경하게 양성으로 나타남을 볼 수 있었다. 카세인투여 3주군과 4주군에서는 유전분의 조직내 침착이 활발하였으며 간세포, Kupffer세포 및 비장의 대식세포에서 리소솜파립과 다양한 형태의 고전자밀도 과립들과 유전분 원섬유가 세포내에서 다수 관찰되었고

세포외로 배출도 왕성하였다. 6주군에서는 이를 각 세포내에 유전분 원섬유의 합성과 함께 교원질의 생산도 활발하였고 세포질내에는 흔히 변성된 세포 소기관들을 포함한 이차성 리소솜의 구조물들이 흔히 관찰되었다. 그리고 6주군에서 간 및 비장조직에서 유전분 침착이 감소된 것은 간세포, Kupffer세포 및 대식세포들이 유전분 생성과 동시에 탐식기능도 활발했음을 뜻한다³⁵⁾. 또 한편으로는, 본 실험 성적에서 india ink를 혈관내 주입한 후 얻은 성적을 근거로 할 때 2주군에 비하여 3주 및 4주군에서 혈장의 혈관외 유출이 점차 감소되면서 6주군에서는 india ink 입자들의 혈관외 유출이 거의 관찰되지 않음을 보아 혈장의 혈관외 유출이 감소되어 유전분 침착의 감소를 초래했다고도 볼 수 있다¹³⁾. 따라서 본 실험 성적을 근거로 유전분 형성의 과정을 살펴볼 때 카세인투여 2주 및 3주군에서는 유전분 형성을 활발히 유도하는 시기(induction stage)이며 4주군에서는 형성된 유전분을 세포외 간질조직에 왕성하게 침착하는 시기(deposition stage)로 특징지울 수 있고 6주군에서는 침착된 유전분의 흡수가 일어나는 시기(resorption stage)로 정리할 수 있다.

유전분 형성에 관해서는 지금까지 많은 연구가 실시되었고 새로운 발견들이 축적되어 왔으나 유전분 형성의 정확한 기전에 대해서는 아직도 완전히 규명되어 있지 않다. 이것은 유전분의 생화학적 특성이 다양하고 또한 그 형성기전이 각기 상이하기 때문이다^{2,36,37)}. 실험적으로 만든 유전분중을 포함하여 이차성 유전분중에 있어서 유전분이 형성되는 기전은 대체로 다음과 같이 보고되어 있다³⁸⁾. 즉 만성적인 조직의 파괴가 진행되거나 염증이 지속되는 경우 대식세포의 수가 증가되며 대식세포에서 interleukin-1(IL-1)을 분비하고 IL-1은 주로 간세포로 하여금 SAA의 합성을 촉진시킨다. 합성된 SAA는 단핵세포 관련 serine효소(monocyte-associated serine enzyme)에 의해 분해되어 가용성 종산물로 대사되는데 만일 처리효소(processing enzyme)의 결여가 있거나 다른 원인들로 인해 완전분해가 되지 못하면 불용성 종산물인 AA가 생성된다. 전구단백물질인 SAA에서 원섬유성 단백물질인 AA로 전환하는데 무엇이 중요한 역할을 하는가에 대해서 다소 이견이 있으나 Smetana³⁹⁾가 망상내피세포가 관여한다고 주장한 이래 여러 연구자들이 Kupffer세포가 유전분 원섬유 형성에 있어서 중요한 역할을 함을 보고하였고^{40,42)}, 카세인 반복투여로 형성된 간 및 비장의 유전분증에서는 Ku-

pffer 세포와 대식세포가 그 역할을 하는 것으로 알려져 있다³⁰⁾. 이와 관련된 연구로서 Gueft 및 Ghidoni⁴³⁾는 생쥐를 대상으로 한 실험적 연구에서 조직구 내에서 유전분 원섬유를 직접 관찰하였고 Shirahama 및 Cohen¹⁰⁾은 대식세포의 리소솜내에서 유전분의 존재를 알아내었다. 본 실험에서는 비장의 방여포지역에 유전분이 침착한 장소와 인접하여 대식세포와 단핵성 거대세포가 흔히 관찰되었고 대식세포의 세포질내에는 유전분 원섬유를 흔히 볼 수 있었다. 이것은 대식세포의 세포막과 관련된 효소에 의해 SAA가 분해되어 생긴 유전분 원섬유의 중합(polymerization)으로 설명할 수 있다^{35,44)}.

이때 SAA가 대식세포에서 직접 만들어지는지 외부에서 SAA를 공급 받아서 AA를 생산하는지에 대해선 아직 완전히 알려져 있지 않다. 여기에 관해 이미 보고된 연구로서 Takahashi¹⁹⁾는 유전분 생성초기 과정에서 대식세포내의 리소솜에서 유래된 소기관에서 밖에서 들어온 SAA에 단백분해성 분열(proteolytic cleavage)이 일어나서 유전분 원섬유를 만든다고 보고하였다. Takahashi 등⁴⁵⁾은 인간에서 발생한 유전분증에 관한 연구에서 망상내피세포의 탐식기능에 대해 보고하면서 대식세포가 세포외 유전분 원섬유를 탐식하는 것으로 생각하였다. 그러나 Kupffer 세포 자체에서 직접 유전분을 합성한다고 보는 견해로는 Shirahama 및 Cohen¹⁰⁾과 Ishihara 및 Uchino⁴⁶⁾ 등이 연구한 것으로 유전분 원섬유가 Kupffer 세포의 리소솜에서 형성되는 것을 밝혔다. 그리고 Takahashi 등³³⁾은 전포매 면역전자현미경적 방법을 통하여 Kupffer 세포내에서 유전분이 형성되기 이전에 SAA에 대한 면역반응물질을 관찰하였다. 본 실험에서는 간세포와 Kupffer 세포 및 비장의 대식세포내에서 다수의 리소솜과립들이 관찰되었고 그 주변에는 고전자밀도 원섬유성파립들(fibrillar electron dense inclusions)과 함께 유전분 원섬유의 존재를 볼 수 있었다. 그러나 이와 동시에 세포흡수성 소포(pinocytotic vesicles)나 외부물질을 탐식한 구조물 등은 유전분이 활발히 생성되는 2주 및 3주에서 뚜렷하게 관찰되지 않았기 때문에 이들 세포에서 직접 SAA를 합성하고 부분적인 단백분해를 거쳐서 AA가 만들어진 것으로 생각된다.

본 실험에서 카세인-내독소 투여군에서 혈관 주위를 중심으로 유전분 침착이 카세인 단독군에 비해 더 현저하였다. 이는 내독소로 인한 혈관 내피세포의 손상으로 혈관내 혈장이 혈관외로 보다 많이 유출

되어 혈장내 포함된 SAA를 혈관주위에 출현한 망상내피세포에서 받아들여 이들 세포에서 AA 원섬유를 보다 많이 만들어 간질조직으로 배출하였기 때문에 해석할 수 있다⁴⁷⁾. 한편 내독소의 또 다른 작용으로 망상내피세포가 활성화되어 이들 세포에 의해 직접 SAA를 합성하고 이를 재료로 유전분 원섬유를 더 많이 만들어 냄으로써⁴⁸⁾ 상기한 두 가지의 형성 기전이 복합적으로 작용하여 카세인-내독소 투여군에서 유전분 침착을 더 현저하게 했을 것으로 사료된다.

이상의 성적과 이미 보고된 문헌적 지견을 종합하면 실험적으로 카세인 반복투여 후 야기되는 유전분증의 형성기전을 다음과 같이 설명할 수 있다. 즉 카세인을 반복 투여하였을 때 간 및 비장 조직내에 반복적인 염증을 초래하고 활성화된 대식세포에서 IL-1을 분비하며 IL-1은 주로 간세포로 하여금 SAA를 만들어 혈류내로 분비하도록 촉진시킨다. 혈장내에 유리된 SAA는 카세인으로 인한 면역반응의 결과로 손상된 혈관 내피세포를 통해 혈관외로 유출되어 혈관 주위에 존재한 망상내피세포에 의해 탐식되어 부분분해(partial degradation)가 이루어져 유전분 원섬유로 바뀌어 세포외로 배출된다. 카세인-내독소 투여군에서는 내독소에 의한 혈관 손상이 더 심하여 혈관외로 유출되는 SAA의 양이 보다 많아짐으로써 유전분 침착이 더 일어날 것으로 생각된다. 유전분 형성의 또 다른 기전으로서는 IL-1의 자극에 의해 간세포, Kupffer세포 및 비장의 대식세포에서 직접 SAA를 만들게 된다. 만들어진 SAA는 리소솜과립들의 형태로 다수 관찰되면서 고전자밀도의 원섬유성과립으로 이행되어 유전분 원섬유형태로 세포외에 배출되며 상기한 두 가지의 경로를 통해서 유전분이 세포외 간질조직에 침착될 것으로 사료된다(Fig 2).

요 악

저자는 실험적 유전분증의 형성기전을 알아보기 위해 카세인과 혈관내피세포에 손상을 초래하는 내독소를 사용하여, 생쥐 85마리를 대상으로 3군으로 나누고 매일 1회씩 피하 주사하여 2주, 3주, 4주 및 6주 경과 후 각각 도살하였다. 간 및 비장 조직을 채취하여 광학현미경과 투과 및 주사전자현미경적 관찰을 실시하였으며 혈관외 혈장유출과 유전분 형성정도를 비교하기 위해 ferritin과 india ink를 사용하여 혈관내 주입을 하였으며 유전분 A를 증명하기

위해 면역조직화학적 검색을 실시하여 다음과 같은 성적을 얻었다.

광학현미경적으로는 카세인을 3주간 반복투여한 군부터 유전분 침착이 분명히 관찰되었으며 간에서는 문맥을 중심으로 시작하였고 비장에서는 방여포지역에 침착되었으며 4주 및 6주군에서는 간에서 동양혈관으로 비장에서는 적수로 미만성으로 유전분이 침착되었다. 카세인-내독소군에서는 유전분 침착이 카세인 단독군에 비해 보다 뚜렷하였고 조직내 출혈과 손상도 동반되었다. Ferritin과 india ink를 주입하였을 때 혈관외 혈장의 유출정도는 카세인-내독소 군에서 더 심하였으며 혈장의 혈관외 유출정도가 유전분 형성과 관계가 있음을 알 수 있었다. Congo red 염색 후 편광현미경하에서 유전분이 침착한 부위와 일치하여 녹색 복굴절을 나타내었고 AA 단일 클론성 항체를 사용하여 면역조직화학적 검색을 통해서 침착된 유전분이 AA형임을 알 수 있었다.

투과전자현미경적으로는 유전분이 침착한 부위에 바로 인접하여 미세혈관 내피세포에서는 변성과 틈을 볼 수 있었고 기저막은 불분명하였다. 침착된 유전분은 비분지성원섬유 형태를 보이면서 혈관벽이나 세포외 간질부위에서 주로 관찰되었다. 유전분이 침착된 부위에 인접한 간세포, Kupffer세포 및 비장의 대식세포내에는 흔히 다수의 리소솜과립들을 볼 수 있었고 이들은 타원형 또는 길다란 고전자 밀도과립 형태로 바뀌면서 과립들 내에는 흔히 원섬유성 구조를 보이며 세포외로 AA 원섬유로 배출되었다. 카세인을 반복투여한 6주군에서는 변성된 유전분원섬유를 포함하여 세포 소기관들을 탐식한 이차성 리소솜들이 다수 관찰되었다.

주사전자현미경으로는 유전분 침착이 뚜렷한 4주 및 6주군에서 간의 문맥혈관과 동양혈관에 유전분 원섬유가 방사형을 나타내며 구형을 이루면서 침착하였고 비장에서도 적수에 모세혈관벽과 동양혈관벽을 따라 덩어리형태로 유전분 원섬유가 미만성으로 침착되었다.

이상의 성적으로 보아 혈관의 손상은 카세인의 반복적인 주입으로 인한 혈관내피세포에 대한 면역반응의 결과로서 일어나며 또한 내독소에 의한 혈관에 대한 직접적인 손상으로 초래되었다고 본다. 카세인-내독소 투여군에서는 혈관의 손상이 더욱 심하여 혈장의 혈관외 유출정도가 커서 유전분 침착이 더 많이 일어난 것으로 생각된다. 또한 실험적 유전분증의 발생에 있어서 혈장의 혈관외 유출과 함께

간세포, Kupffer 세포 및 비장의 대식세포내에서 직접 유전분의 전구 물질이 만들어지고 이 단백물질을 부분적으로 분해시켜서 유전분 원섬유 형태로 바꾸어 세포외로 배출함으로써 세포외 간질부위에 유전분이 침착되는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Cotran RS, Kumar V, Robbins SL: *Robbins Pathologic Basis of Disease*, ed 4. Philadelphia, WB Saunders Co, 1989, pp 210-220.
- Glenner GG: Amyloid deposits and amyloidosis: The β -fibrilloses(second of two parts). *N Engl J Med* 1980; 302: 1333-1343.
- Kyle RA, Greipp PR: Amyloidosis (AL): Clinical and laboratory features in 229 cases. *Mayo Clin Proc* 1983; 58: 665-683.
- Castano EM, Frangione B: Biology of disease: Human amyloidosis, Alzheimer disease and related disorders. *Lab Invest* 1988; 58: 122-132.
- Shousha S, Lowdell CP, Bull TB, et al: Secondary amyloidosis of the gastrointestinal tract: An electron microscopic study. *Hum Pathol* 1985; 16: 596-601.
- Rubin E, Farber JL: *Pathology*. Philadelphia, JB Lippincott Co, 1988, pp 1180-1193.
- Linke RP, Nathrath WBJ, Wilson PD: Immunoelectron microscopic identification and classification of amyloid in tissue sections by the postembedding protein-A gold method. *Ultrastruct Pathol* 1983; 4: 1-7.
- Cohen A, Connors LE: The pathogenesis and biochemistry of amyloidosis. *J Pathol* 1987; 151: 1-10.
- Linke RP, Huhn D, Casanova S, et al: Immunoelectron microscopic identification of human AA-type amyloid: Exploration of various monoclonal AA-antibodies, methods of fixation, embedding and of other parameters for the protein-A gold method. *Lab Invest* 1989; 61: 691-697.
- Shirahama T, Cohen AS: Intralysosomal formation of amyloid fibrils. *Am J Pathol* 1975; 81: 101-116.
- Schultz RT: Role of altered vascular permeability in amyloid formation. *Am J Pathol* 1977; 86: 321-342.
- Brandwein SR, Sipe JD, Skinner M, et al: Effect of colchicine on experimental amyloidosis in two CBA/J mouse models: Chronic inflammatory stimulation and administration of amyloid-enhancing factor during acute inflammation. *Lab Invest* 1985; 52: 319-325.
- Schultz RT, Pitha JV, McDonald T, et al: Ultrastructural studies of vascular lesions in experimental amyloidosis of mice. *Am J Pathol* 1985; 119: 138-150.
- Sano K: Experimental amyloidosis induced by saponin. *Acta Pathol Jpn* 1988; 38: 1241-1253.
- Kazimierczak J: Ultrastructural observations on the first amyloid to be found in the spleen of casein treated mice. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1972; 80(Suppl): 141-150.
- Snow AD, Willmer J, Kisilevsky R: A close ultrastructural relationship between sulfated proteoglycans and AA amyloid fibrils. *Lab Invest* 1987; 57: 687-698.
- Karnovsky MJ: The ultrastructural basis of capillary permeability: Studies with peroxidase as a tracer. *J Cell Biol* 1967; 35: 213-236.
- Cohen AS: Amyloidosis. *N Engl J Med* 1967; 277: 522-530.
- Takahashi M, Yokota T, Kawano H, et al: Ultrastructural evidence for intracellular formation of amyloid fibrils in macrophages. *Virchows Archiv [A]* 1989; 415: 411-419.
- Taylor CR: Immunoperoxidase techniques: Practical and theoretical aspects. *Arch Pathol Lab Med* 1978; 102: 113-121.
- Fujita H: Procedures from fixation to embedding. *J Clin Electron Microsc* 1989; 21: S31-S35.
- Luft JH: Improvement in epoxy resin embedding method. *J Biophys Biochem Cytol* 1961; 9: 409-417.
- Watson ML: Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J Biophys Biochem Cytol* 1958; 6: 475-479.
- Reynolds ES: The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron micro-

- scopy. *J Cell Biol* 1963; 17: 208-212.
25. Nowell JA, Pawley JB: Preparation of experimental animal tissue for SEM. *Scanning Electron Microsc* 1980; 2: 1-20.
 26. 田中敬一, 永谷隆: 圖說 走査電子顯微鏡·生物試料作製法. 東京, 朝倉書店, 1986, pp 85-104.
 27. Husby G, Natvig JB: A serum component related to nonimmunoglobulin amyloid protein AS, a possible precursor of the fibrils. *J Clin Invest* 1974; 51: 1054-1061.
 28. Uchino F, Takahashi M, Yokota T, Ishihara T: Experimental amyloidosis: Role of the hepatocytes and Kupffer cells in amyloid formation *Appl Pathol* 1985; 3: 78-87.
 29. Selinger MJ, McAdam KPWJ, Kaplan MM, et al: Monokine-induced synthesis of serum amyloid A protein by hepatocytes. *Nature* 1980; 285: 498-500.
 30. Hoffman JS, Benditt EP: Secretion of serum amyloid protein and assembly of serum amyloid protein-rich high density lipoprotein in primary mouse hepatocyte culture. *J Biol Chem* 1982; 257: 10518-10522.
 31. Matsuta E, Shirahama T, Sipe JD, et al: Kinetics of SAP and SAA production by cultured mouse liver cells. *Ann NY Acad Sci* 1982; 389: 467-470.
 32. Shirahama T, Cohen AS: Immunocytochemical study of hepatocyte synthesis of amyloid AA: Demonstration of usual site of synthesis and intracellular pathways but unusual retention on the surface membrane. *Am J Pathol* 1985; 118: 108-115.
 33. Takahashi M, Yokota Y, Yamashita Y, et al: Ultrastructural evidence for the synthesis of serum amyloid A protein by murine hepatocytes. *Lab Invest* 1985; 52: 220-223.
 34. Takahashi M, Adachi M, Akizuki S, et al: Splenic marginal zone in experimental amyloidosis. *Recent Adv RES Res* 1979; 19: 104-124.
 35. Zucker-Franklin D, Fuks A: The role of the macrophage phagocytic system(MPS) in the development of secondary amyloidosis, in Marrink J, van Rijswijk MH(eds): *Amyloidosis*. Dordrecht, Martinus Nijhoff, 1986, pp 329-336.
 36. DiBartola SP, Benson MD, Dwulet FE, et al: Isolation and characterization of amyloid protein AA in the abyssinian cat. *Lab Invest* 1985; 52: 485-489.
 37. Snow AD, Kisilevsky R, Stephens C, et al: Characterization of tissue and plasma glycosaminoglycans during experimental AA amyloidosis and acute inflammation.: Qualitative and quantitative analysis. *Lab Invest* 1987; 56: 665-675.
 38. Kisilevsky R: Amyloidosis: A familiar problem in the light of current pathogenetic development. *Lab Invest* 1983; 49: 381-390.
 39. Smetana H: The relation of the reticuloendothelial system to the formation of amyloid. *J Exp Med* 1927; 45: 619-632.
 40. Sorenson GD, Heefner WA, Kirkpatrick JB: Experimental amyloidosis: II. Light and electron microscopic observations of liver. *Am J Pathol* 1964; 44: 629-644.
 41. Uchino F: Pathological study on amyloidosis: Role of reticuloendothelial cells in inducing amyloidosis. *Acta Pathol Jpn* 1967; 17: 49-82.
 42. Zucker-Franklin D, Franklin EC: Intracellular localization of human amyloid by fluorescene and electron microscopy. *Am J Pathol* 1970; 59: 23-42.
 43. Gueft B, Ghidoni JJ: The site of formation and ultrastructure of amyloid. *Am J Pathol* 1963; 43: 837-854.
 44. Lavie G, Zucker-Franklin D, Franklin EC: Elastase type proteases on the surface of human blood monocytes: Possible role in amyloid formation. *J Immunol* 1980; 125: 175-180.
 45. Takahashi M, Yokota T, Yamashita Y, et al: Unusual inclusions in stromal macrophages in a case of gelatinous drop-like corneal dystrophy. *Am J Ophthalmol* 1985; 99: 312-316.
 46. Ishihara T, Uchino F: Pathological study on amyloidosis: Amyloid formation and resorption in Kupffer cell. *Recent Adv RES Res* 1975; 15: 145-171.
 47. Beeson PB: Tolerance to bacterial pyrogens: II. Role of the reticuloendothelial system. *J Exp Med* 1947; 86: 39-44.
 48. Heilman DH: Effect of dosage on endotoxin induced changes in the reticuloendothelial system of rabbits. *J Reticuloendothel Soc* 1965; 2: 273-286.

=Abstract=

An Ultrastructural Study on the Mechanism of Casein-Induced Amyloidosis in Mice

Kun Young Kwon, MD; Seung Jo Baik, MD; Eun Sook Chang, MD

*Department of Pathology, Keimyung University
School of Medicine, Taegu, Korea*

This study was carried out to investigate the mechanism of experimentally induced amyloidosis in mice treated with casein. Eighty-five ICR mice, maintained on a stock diet, weighing 20-30 g, were divided into a control group and two experimental groups.

Group 1. Control group (5 mice). Daily subcutaneous injection of normal saline for 4 weeks.

Group 2. Casein group (40 mice). Daily subcutaneous injection of a casein solution.

Group 3. Casein-endotoxin group (40 mice). Daily subcutaneous injection of a casein-endotoxin solution.

Ten mice were sequentially sacrificed each at 2, 3, 4 and 6 weeks after casein and casein-endotoxin injections.

The liver and the spleen of sacrificed animals were processed and observed by light microscope, polarizing microscope, and transmission and scanning electron microscopes. Also some of the animals were given intravascular injection of a ferritin and an india ink solution.

The results were as follows:

On light microscopy, deposits of the amyloid protein were clearly demonstrated in the portal-periportal areas of the liver and the perifollicular regions of the spleen after 3 weeks, and by 4 weeks and 6 weeks the deposits were far more wide-spread to hepatic sinusoids and splenic red pulps. The amyloid deposits were similar but more striking findings were seen in the casein-endotoxin group. This group revealed a more prominent extravascular influx of plasma including ferritin or india ink particles than in the casein group. The amyloid fibrils were stained positively with Congo red and they showed green birefringence when viewed under a polarizing microscope.

On immunohistochemistry, amyloid protein associated fibrils were identified.

On electron microscopy (TEM and SEM), damaged blood vessels near the amyloid deposits revealed multiple endothelial gaps, a loss of identifiable basement membrane and variable degree of endothelial degeneration. Amyloid deposits were made up of nodular masses of randomly arranged nonbranching fibrils and seen mainly in extracellular areas. Closely connected with the amyloid deposits, hepatocytes, Kupffer cells and splenic macrophages contained numerous lysosomal dense bodies, elongated dense inclusions and membrane bound fibrillar structure. In a later stage (6 weeks), irregular shaped phagosomes were found in the cytoplasm of amyloid forming cells.

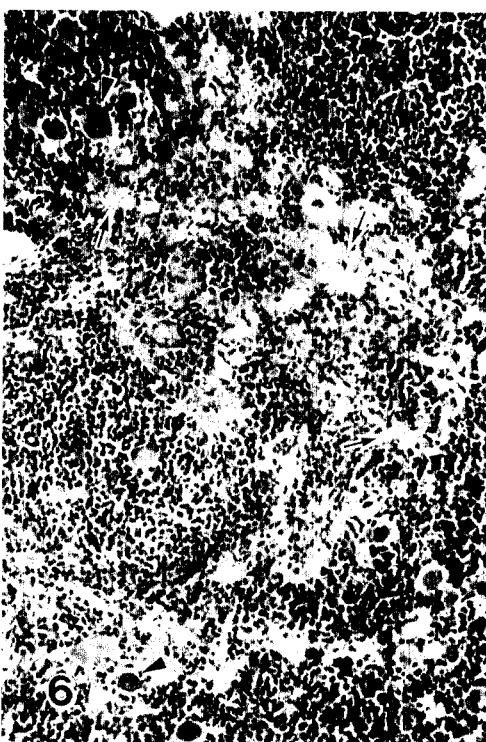
It can be concluded that:

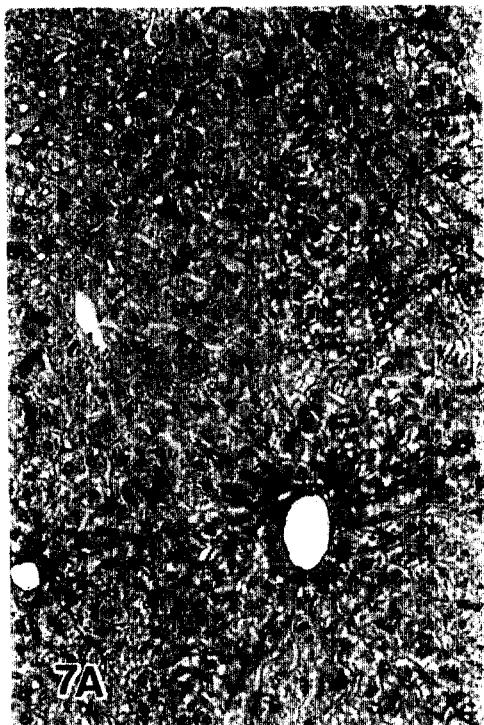
The vascular injury appeared to be caused by an immunologic reaction to casein. An addition of the endotoxin caused vascular damage and promoted amyloid deposition. The hepatocytes, Kupffer cells and splenic macrophages were thought to play an important role in casein-induced amyloid formation. From this study, it is suggested that amyloid associated (AA) fibrils are polymerized in the cytoplasm of the amyloid producing cells by the proteolytic cleavage of previously synthesized or serum derived amyloid A precursor protein.

Key Words: Amyloidosis, Amyloid associated (AA) fibril, Casein, Ultrastructural study

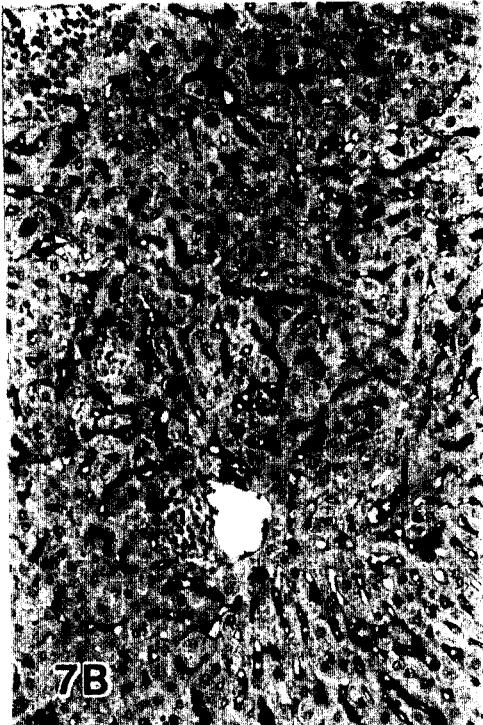
LEGENDS

- Fig 3. Three weeks after daily casein injection. Initial amyloid deposits(arrows) are present in the portal vascular wall and some sinusoids. Inflammatory cells are infiltrated in the portal area (H & E, $\times 100$).
- Fig 4. Three weeks after daily casein-endotoxin injection. The amyloid deposits are found in perifollicular area and extended to focal red pulp areas(arrows) (H & E, $\times 100$).
- Fig 5. Four weeks after daily casein injection. The amyloid deposits(arrows) are far more spread to hepatic sinusoids (H & E, $\times 100$).
- Fig 6. Four weeks after daily casein injection. The red pulp area reveals diffuse amyloid deposition(arrows) and some macrophages(open arrows) (H & E, $\times 100$).
- Fig 7. Two weeks after daily casein (A) and casein-endotoxin (B) injection, respectively. More extensive leakage of the injected india ink particles into extrasinusoidal areas is seen in the casein-endotoxin group (H & E, $\times 100$).
- Fig 8. Comparison of extravascular leakage of india ink two-week group (A) with four-week group (B). More extensive perifollicular leakage of india ink particles(*) is seen in the two-week group (H & E, $\times 100$).
- Fig 9. Green birefringences of the amyloid deposits in portal vascular wall and sinusoids of liver (A) and red pulp areas of spleen (B) and observed under polarizing microscope(Congo red, $\times 200$).
- Fig 10. Immunohistochemical stains using monoclonal AA antibody show diffusely strong positive reactions in the sinusoids of liver (A) and red pulp areas of spleen (B) (PAP, A: $\times 100$, B: $\times 200$).
- Fig 11. Two weeks after daily casein-endotoxin injection. Trace amounts of amyloid fibrils in the space of Disse are present (TEM, $\times 21,600$).
- Fig 12. Numerous electron dense lysosomal bodies with variable size and shape are seen in the cytoplasm of Kupffer cell. A focus of formation of electron dense materials(arrows) is noted (TEM, $\times 18,000$).
- Fig 13. Four weeks after daily casein injection. The amyloid fibrils which are excreted from a liver cell reveal delicate nonbranching fibrils. Also some fibrillar materials(arrows) are found in the cytoplasm of hepatocyte (TEM, $\times 25,500$).
- Fig 14. Four weeks after daily casein-endotoxin injection. A capillary adjacent to amyloid deposits reveals markedly swelling(*) of endothelial cell and loss of basement membrane. The extracellular amyloid fibrils are closely connected to the Kupffer cell processes(arrows) (TEM, $\times 17,000$).
- Fig 15. An amyloid deposit is found around the capillary wall. A splenic macrophage adjacent to the amyloid deposit is noted (TEM, $\times 25,500$).
- Fig 16. Autophagic vacuoles(*) with degenerating cell organelles and lysosomal bodies are found. Also abundant collagen bundles are present (TEM, $\times 20,400$).
- Fig 17. The splenic macrophage reveals numerous lysosomal dense bodies with round or elongated shape(arrow heads) among the abundant rough endoplasmic reticulum($\times 32,300$). Inset: A well-developed Golgi complex producing lysosomal bodies with electron dense materials(*) (TEM, $\times 22,700$).
- Fig 18. Lysosomal dense bodies are arised from the distended rough endoplasmic reticulum. Some of the lysosomal bodies show oval or long fusiform inclusions with fibrillar structure(*) which is comparable to amyloid fibrils. A conglomerated electron dense inclusion (open arrows) containing fibrillar materials(arrow heads) is seen. Extracellular amyloid fibrils are well identified (TEM, $\times 25,500$).
- Fig 19. Three weeks after daily casein-endotoxin injection. The portal vascular wall shows irregular thickening with deposition of electron dense materials(arrows). Also some lymphoid cells(*) are infiltrated around the vessel(SEM, $\times 2,300$).
- Fig 20. Four weeks after daily casein injection. Some lumps of amyloid deposits(*) are found around the portal vessel (SEM, $\times 5,000$).
- Fig 21. The hepatic parenchyma shows activated Kupffer cells and two lumps of radiating amyloid fibrils(*) within the dilated sinusoids (SEM, $\times 2,800$).
- Fig 22. A lump of amyloid fibrils is located adjacent to the sinusoidal wall. A splenic macrophage is migrated between the sinusoid and area of amyloid deposit(arrows). Asterisks: radiating amyloid fibrils (SEM, $\times 11,500$).

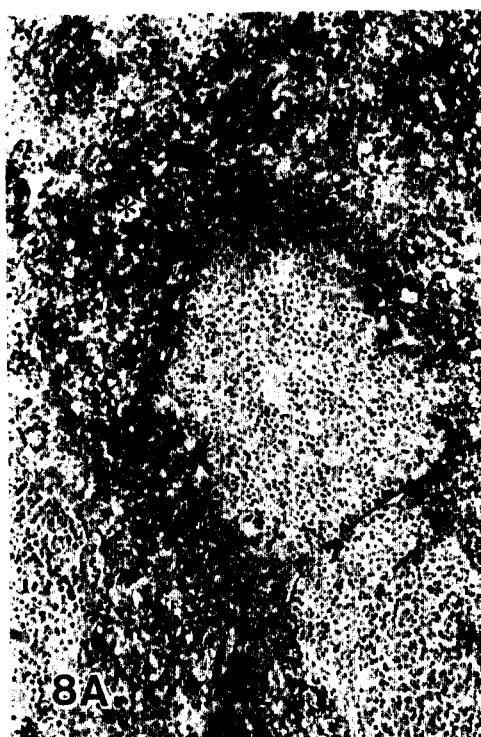




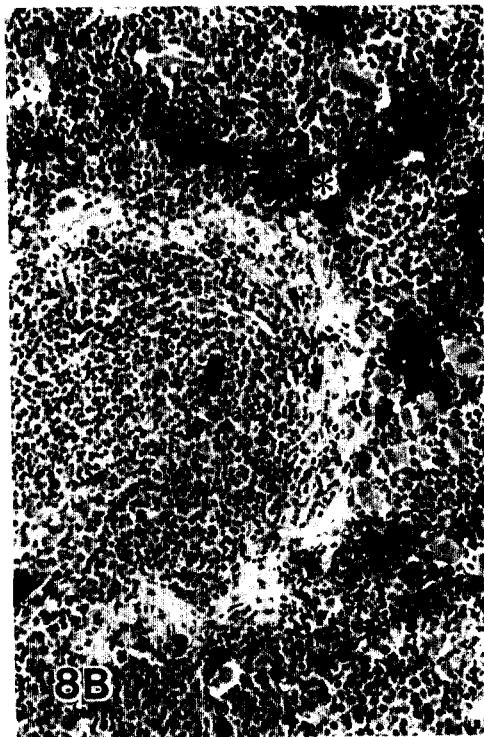
7A



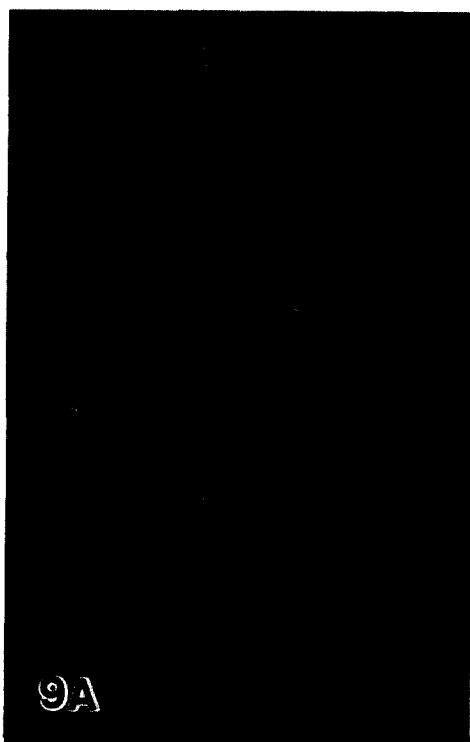
7B



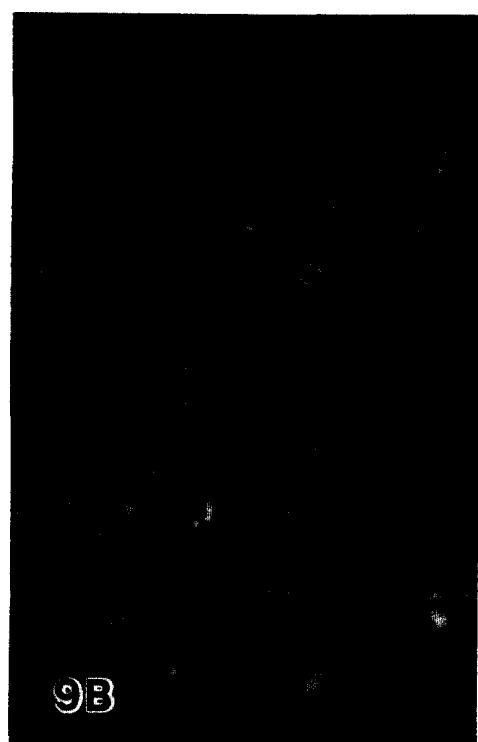
8A



8B



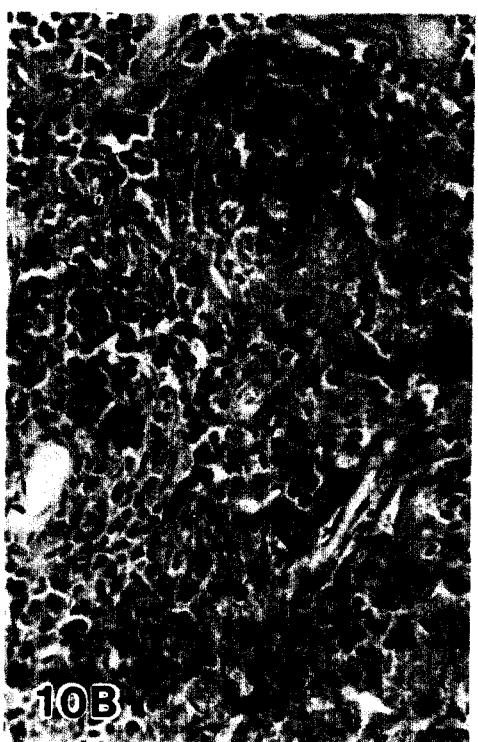
9A



9B



10A



10B

