

<平成 21 年度助成>

## クルクミンのアミロイド結合性とその応用に関する研究

中山 裕 之

(東京大学大学院農学生命科学研究科獣医病理学研究室)

### 要 約

本研究では、様々な老齢動物の老人斑や脳血管アミロイドに対するクルクミンの染色性を検討した。加えて、アルツハイマー病 (AD) 脳に出現する NFT に対するクルクミンの染色性も調べた。AD 患者、老齢のニホンザル、イヌ、ネコ、フタコブラクダ、キツツキの一種アカゲラ、アメリカクロクマおよびヒト APP トランスジェニック (Tg) マウス (APP23) の脳について抗  $A\beta$  アミロイド ( $A\beta$ ) 1-40 抗体、抗  $A\beta$  1-42 抗体を用いた免疫染色、アルカリ・コンゴレッド染色、PAM 染色、クルクミン染色 (0.009%クルクミン溶液) を行った。またギ酸前処理による染色性の変化も検討した。さらに、AD 患者の NFT についてはガリヤス銀染色、抗 PHF-tau 抗体を用いた免疫染色を行い、クルクミン染色の結果と比較した。 $A\beta$  免疫染色により老人斑はアカゲラ以外、脳血管アミロイドはラクダ以外で確認された。ヒト、イヌ、ネコ、ラクダ、クマでは  $A\beta$  42 陽性の老人斑が、 $A\beta$  40 陽性の老人斑より多く認められた。サル、Tg マウスでは  $A\beta$  40 陽性の老人斑と  $A\beta$  42 陽性の老人斑数に差は認められなかった。コンゴレッド染色では成熟斑は陽性、びまん斑は陰性であった。これに対しクルクミン染色では、ヒト、サル、クマおよび Tg マウスの成熟斑、びまん斑は陽性、イヌの成熟斑は陽性、びまん斑は陰性であった。また、成熟斑がみられなかったラクダのびまん斑は陽性、ネコのびまん斑は陰性であった。全動物で脳血管アミロイドはコンゴレッド染色と

クルクミン染色に陽性を示した。クルクミンの染色性はギ酸前処理により失われた。また、ヒトの PHF-tau 陽性、ガリヤス銀染色陽性の NFT もクルクミンで染色された。コンゴレッド染色陰性のびまん斑がクルクミンで染色されたことから、クルクミンはコンゴレッドより鋭敏に、凝集した  $A\beta$  と結合すると考えられた。またギ酸前処理によりこの染色性が失われたことから、クルクミン分子は  $A\beta$  分子の立体構造を認識して結合することが示唆された。加えてクルクミンは NFT も染色することが確認された。さらに、クルクミン染色は AA アミロイド (AA、ウシの肝・腎・副腎)、AL アミロイド (AL、イヌの皮膚・舌腫瘍)、アミロイド産生性菌原性腫瘍のアミロイド (APOT、イヌ)、老齢性心アミロイド (SCA、イヌ) も染色することが明らかになった。

### 1. はじめに

ヒトのアルツハイマー型認知症 (AD) における特徴的な病理組織学的変化として、老人斑、脳血管アミロイド、神経原線維変化 (NFT) がある。老人斑と脳血管アミロイドは  $A\beta$  の異常沈着巣で、アルカリ・コンゴレッド染色、過ヨウ素酸メセナミン銀 (PAM) 染色で検出できる。老人斑は、形態的にびまん斑と成熟斑に分類される。びまん斑は、最も初期的な老人斑と考えられており、コンゴレッド染色に陰性である。成熟斑は、 $A\beta$  の凝集が進んだ段階と考えられており、コンゴレッド染色に陽性で、神経突起の腫大、変性を伴う。一方、NFT は、微小管結合蛋白である tau 蛋白

がリン酸化などの修飾を受け線維化、凝集して形成される神経細胞の異常構造で、ガリヤス銀染色により明瞭に染色される。

老人斑、脳血管アミロイド、NFTは、ヒト以外の動物でも確認されている。老人斑はサル<sup>1,2,3,4)</sup>、イヌ<sup>4,5,6,7)</sup>、ネコ<sup>8)</sup>、ラクダ<sup>9)</sup>、クマ<sup>10,11)</sup>、クズリ<sup>12)</sup>などで、また、脳血管アミロイドはサル<sup>1,2,3)</sup>、イヌ<sup>5,6,7)</sup>、ネコ<sup>8)</sup>、ラクダ<sup>9)</sup>、クマ<sup>10,11)</sup>、クズリ<sup>12)</sup>、キツキ<sup>13)</sup>などで報告されている。これに対し、NFTは、チンパンジー<sup>14)</sup>、ヒツジ<sup>15)</sup>、クマ<sup>10)</sup>、クズリ<sup>12)</sup>などで報告されているものの、その詳細は明らかではない。

一方、クルクミンはカレーの材料であるウコンの主成分である黄色色素で、抗腫瘍、抗酸化、抗炎症などの生理作用を有する<sup>16)</sup>。クルクミンはA $\beta$ と結合しやすく、その摂取によって老人斑の形成が減少すること<sup>17,18,19,20)</sup>から、日常的に摂取すればA $\beta$ の沈着が抑制され、アルツハイマー病の発症または進行を抑制できるのではないかと期待されている。近年ADモデルマウスにおいてクルクミンが老人斑、脳血管アミロイドを染色すること<sup>19)</sup>、またヒトでは、クルクミンがNFTを染色するということが確認された<sup>21)</sup>。しかし、マウスとヒト以外の動物ではクルクミンのA $\beta$ との結合性については明らかにされていない。

本研究では、様々な老齢動物の脳を用いてクルクミンが老人斑、脳血管アミロイド、NFTと結合するかどうかを調べた。また、クルクミンがA $\beta$ のどの段階の凝集状態と結合するかについても検討した。さらに、 $\beta$ アミロイド以外のアミロイドに対するクルクミンの染色性についても様々な動物のアミロイド症の組織標本を用いて検討した。

## 2. 材料と方法

### 2-1. 組織切片の作製と染色

AD患者、ニホンザル、イヌ、ネコ、フタコブ

ラクダ、キツキの一種アカゲラ、アメリカクマ、およびヒトAPPトランスジェニック(Tg)マウス(APP23)の脳皮質について調べた。用いた動物の年齢、性別、品種はTable 1に示す。脳組織は10%緩衝ホルマリンで固定し、パラフィン切片(4-6 $\mu$ m)にした。加えて、AAアミロイド(AA,ウシの肝・腎・副腎)、ALアミロイド(AL,イヌの皮膚・舌腫瘍)、アミロイド産生性菌原性腫瘍(APOT,イヌ)、老齢性心アミロイド(SCA,イヌ)の各組織についても同様にパラフィン切片を作製した。

老人斑と脳血管アミロイドを検出するために、アルカリ・コンゴレッド染色、過ヨウ素酸メセナミン銀(PAM)染色を行った。さらに、NFTを検出するために改良ガリヤス・ブランク法<sup>22)</sup>による銀染色を行った。

### 2-2. 免疫染色法

上述した脳組織切片について、一次抗体として抗A $\beta$ 1-42(BC05; Amyloid  $\beta$ -Protein Immunohistostain Kit, Wako)抗体、抗A $\beta$ 1-40(BA27; Amyloid  $\beta$ -Protein Immunohistostain Kit, Wako)抗体、抗Paired helical filament-tau (PHF-tau) (AT8; 10 $\mu$ g/ml, Thermo)抗体を用いた免疫染色を行った。脱パラフィンした組織切片を抗原性の賦活化のために10 mMのクエン酸バッファーで、120度10分オートクレーブした。組織切片は、Tris-buffered-saline(TBS)で3回洗ったあと、内因性のペルオキシダーゼ活性を抑えるために、1%過酸化水素を加えたメタノールに3分間ひたした。その後、非特異的な反応を抑えるために、8%スキムミルクを加えたTBSに37 $^{\circ}$ C 30分インキュベートした。その後上述した一次抗体をのせ、4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。TBSで3回洗った後、組織切片はビオチン化した抗マウス抗体をのせて37 $^{\circ}$ C 60分インキュベートした。次いで、ストレプトアビジン-ビオチン抗体法で標識し、最後に0.05% 3,3'-diaminobenzidine と

0.03%の過酸化水素で発色させた。ヘマトキシリンで核を染色し、脱水、透徹、封入したのち光学顕微鏡で観察した。

### 2.3. クルクミン染色

脱パラフィンした切片を80%エタノールにつけた後、0.3%トリトンX100、3%Bovine Serum Albumin(BSA)と0.5%Tween20を含む0.1M TBSにそれぞれ10分つけた。3%BSA、0.5%Tween20を含む0.1M TBSに0.0245  $\mu$ Mのクルクミン(Cayman Chemical, USA)を溶かしてクルクミン溶液(クルクミン濃度0.009%)を作った。このクルクミン溶液に切片を37°C 1時間つけた。TBSで3回洗ってDWに浸し、無蛍光封入剤で封入した後、共焦点レーザーキャン顕微鏡(LSM510, Zeiss)を使って観察した。さらに、組織切片でギ酸前処理<sup>17)</sup>を行いアミロイドの立体構造を破壊した後のクルクミンの染色性を調べた。ギ酸処理を行う際には、脱パラフィン後に99%ギ酸(WAKO, Osaka, Japan)に5分つ

ける操作を加えた。さらに過マンガン酸カリウム(KMnO<sub>4</sub>)前処理による染色性の変化も検討した。

### 2.4. 画像解析法

画像解析ソフトウェアとして、Image J(NIH)を用いた。組織切片の脳皮質領域内において無作為に5か所を選択し、200倍視野で写真をとった。それぞれの写真において、抗体陽性を示した老人斑、脳血管アミロイドの面積をImage Jを用いて測定した。測定したデータはt検定を用いて分析した。

## 3. 結果

### 3-1. $\beta$ アミロイド

#### 3-1-1. 免疫染色

抗A $\beta$ 1-42抗体、および抗A $\beta$ 1-40抗体を用いた免疫染色により、老人斑がアカゲラ以外の動物の脳に確認された。老人斑の面積をimage Jで画像解析した結果を、Fig. 1に示した。ヒト、サル、ラクダ、クマでは、コットンウール状の老人

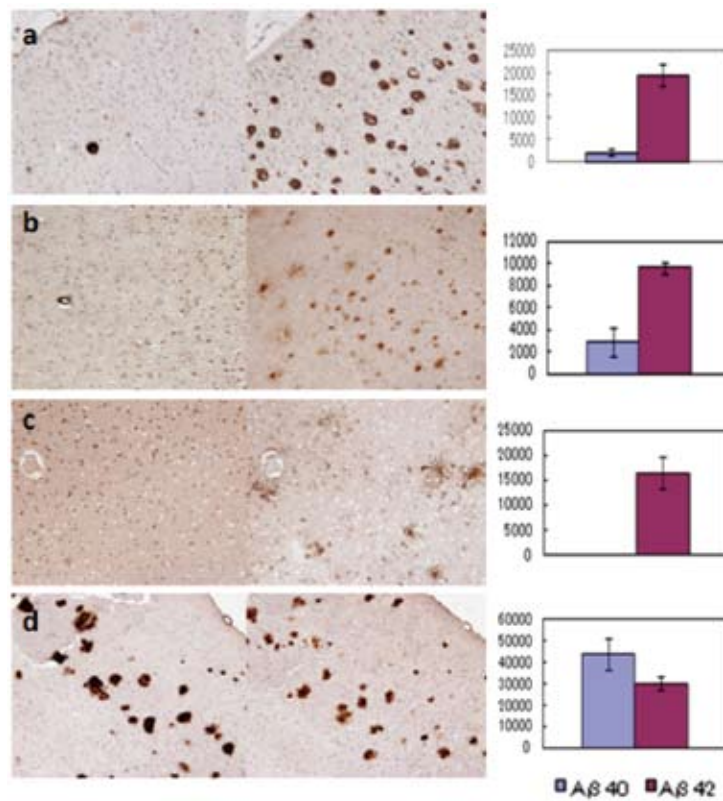


Fig. 1 老人斑の免疫染色

AD患者、b.イヌNo.9、c.ネコ、d.Tgマウスの大脳皮質。左がA $\beta$ 40、右がA $\beta$ 42の免疫染色。グラフは、切片の任意の場所5か所(200倍視野)における老人斑の面積を、image Jを使って画像解析した結果。

斑が観察され、APP Tg マウスでは、花びら状の老人斑が観察された。またイヌ、ネコでは、境界不明瞭な老人斑が観察された。ヒト、イヌ、クマでは A  $\beta$  42 陽性の老人斑が、A  $\beta$  40 陽性の老人斑より多かった。ラクダとネコの老人斑は全て A  $\beta$  42 陽性で、A  $\beta$  40 陽性老人斑は認められなかった。サル、Tg マウスでは A  $\beta$  40 陽性の老人斑と A  $\beta$  42 陽性の老人斑の面積に差は認められなかった。

抗 A  $\beta$  1-42 抗体、抗 A  $\beta$  1-40 抗体を用いた免疫染色により、脳血管アミロイドがラクダ以外の

脳で確認された (Table 1)。脳血管アミロイドは髄膜血管壁、実質の中小および毛細血管壁に認められた。脳血管アミロイドの面積を image J で画像解析した結果を Fig. 2 に示す。ヒト、サル、ネコ、Tg マウスでは A  $\beta$  40 陽性の脳血管壁面積は A  $\beta$  42 陽性のそれより多かった。クマでは A  $\beta$  42 陽性の脳血管アミロイドのみ認められた。キツツキでは、A  $\beta$  40 陽性の脳血管壁面積は A  $\beta$  42 陽性のそれとほぼ同等であった。また PHF-tau の免疫染色により、ヒトのみで NFT が確認された。(Table 1)

Table 1 調べた動物の脳病変

SP は老人斑、DP はびまん斑、MP は成熟斑、CAA は脳血管アミロイド、NFT は神経原線維変化を示す。y:years, m:months, ND: データ不明

No of Cases	Species	Sex	Age	SPs		CAA	NFT
				DP	MP		
1	Human	AD patient	Female	73y	+	+	+
2	Japanese macaque	-	ND	>26y	+	+	-
3	Dog	Miniture dax	Female	13y	+	-	-
4	Dog	Beagle	Male	14y	+	-	-
5	Dog	Mongrel	Male	14y	+	+	-
6	Dog	NR	ND	14y	+	+	-
7	Dog	NR	ND	18y	+	+	-
8	Dog	Maltese	ND	18y	+	-	-
9	Dog	Mongrel	Female	20y	+	-	-
10	Cat	Mongrel	Female	20y	+	-	-
11	Bactrian camel	-	Female	>20y	+	-	-
12	Great spotted woodpecker	-	Male	>16y	-	-	-
13	American black bear	-	Female	>20y	+	+	-
14	Mouse	APP23Tg	Female	30m	+	+	-

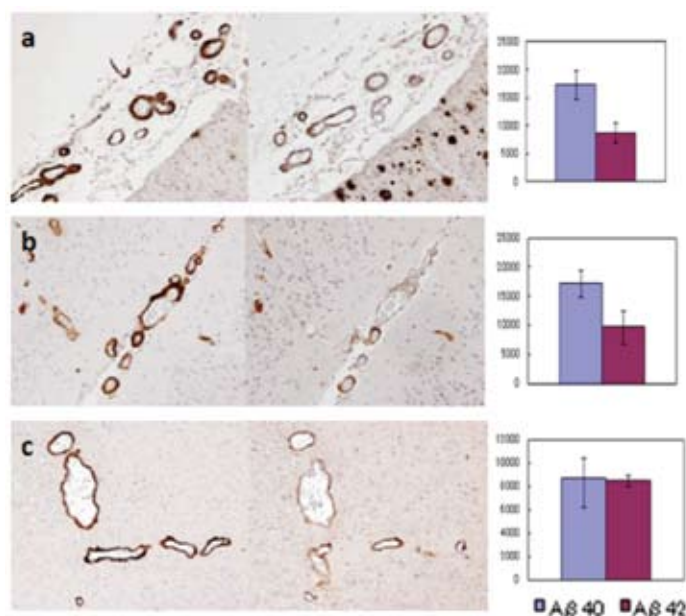


Fig. 2 脳血管アミロイドの免疫染色

a. AD 患者、b. ニホンザル、c. アカゲラの 大脳皮質。左が A  $\beta$  40、右が A  $\beta$  42 の免疫染色。グラフは、切片の任意の場所 5 か所 (200 倍視野) における脳血管アミロイドの面積を、image J を使って画像解析した結果。

3-1-2. クルクミン染色

i) 老人斑 (Fig. 3)

ヒト、サル、クマ、APP Tgマウスでは、コンゴレッド染色陽性、PAM染色陽性の MP、また、コンゴレッド陰性、PAM陽性の DPの両方が確認された。クルクミンは PAM染色で染色された同一の老人斑を染色した。全てのイヌで、コンゴレッド陰性、PAM陽性の DPが確認され、イヌ NO5, 6, 7では、コンゴレッド陽性、PAM陽性の MPも少数確認された。イヌの MPは全てクルクミンで染色されたが、DPはクルクミンで染色されなかった。ラクダでは、コンゴレッド陰性、PAM陽性の DPのみが見られたが、これらはクルクミン陽性であった。ネコの老人斑は、コンゴレッド、PAM、クルクミンのいずれでも染色されなかった。

ii) 脳血管アミロイド (Fig. 4)

ヒト、サル、イヌ、ネコ、アカゲラ、クマ、APP Tgマウスではコンゴレ

ド陽性の脳血管アミロイドが確認され、これらはすべてクルクミンで明瞭に染色された。また、アカゲラでは、毛細血管の周りに Aβが放射状に沈着する変化が観察され、これもコンゴレッドとクルクミンで染色された。(Fig. 4-h)

iii) 神経原線維変化 (NFT) (Fig. 5)

抗 PHF-tau 抗体の免疫染色により、ヒトのみで NFT が確認された。他の動物では NFT は確認されなかった。ヒトの抗 PHF-tau 抗体陽性、ガリヤス銀染色陽性の NFT は、クルクミンでも染色されたが、クルクミン染色よりガリヤス銀染色の方がより鋭敏に NFT を染色した。

iv) ギ酸前処置 (Fig. 6)

組織切片にギ酸前処理を施し、アミロイドの構造を破壊した後にクルクミン染色を行ったところ、いずれの動物の老人斑、脳血管アミロイドも染色されなかった。

3-2. 他のアミロイド

アルカリ・コンゴレッド染色で、AA、AL、APOT は明瞭に、SCA は弱く染色された。ク

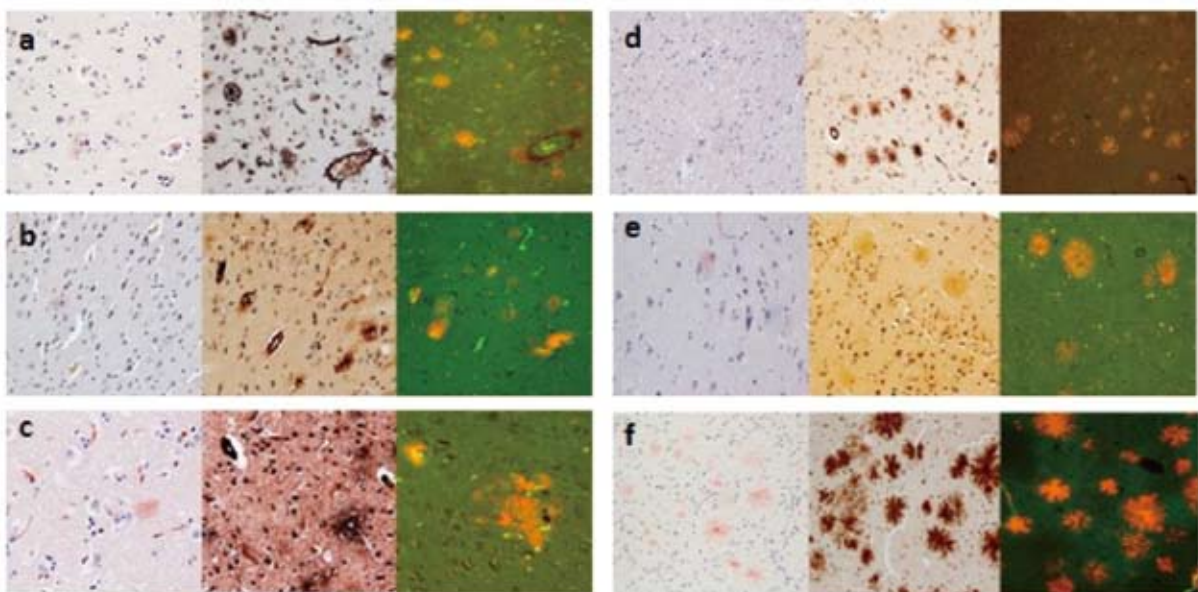
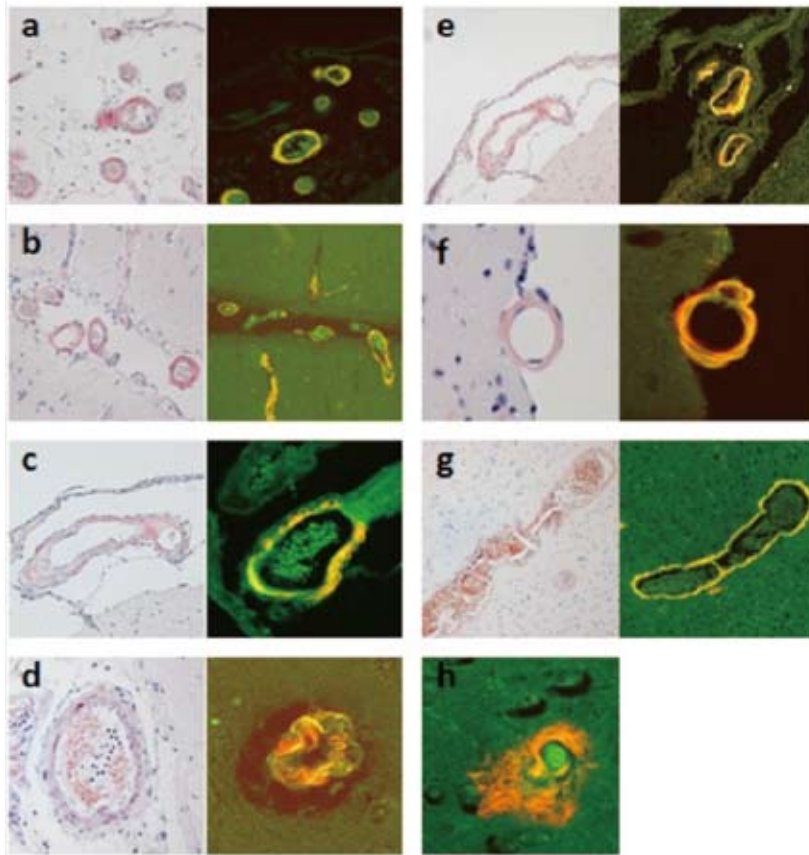
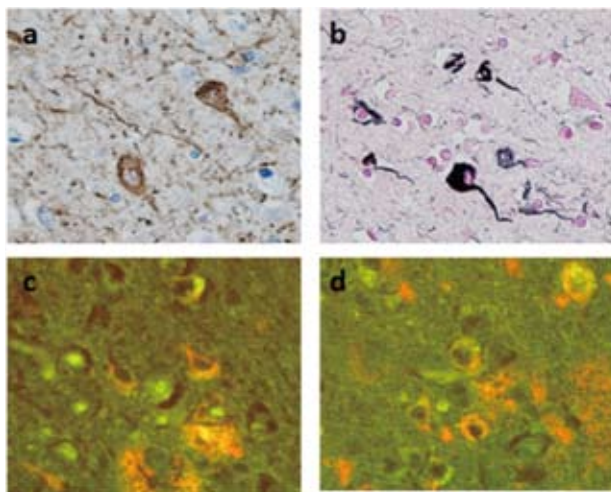


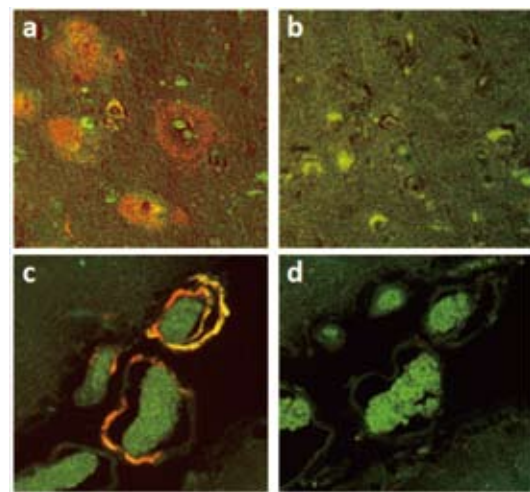
Fig. 3 様々な動物の老人斑のコンゴレッド染色、PAM 染色、クルクミン染色の比較  
a: ヒト, b: サル, c: イヌ, d: ラクダ, e: クマ, f: APP Tg マウス, それぞれ左から順にコンゴレッド染色、PAM 染色、クルクミン染色。



**Fig. 4** 様々な動物の脳血管アミロイドのアルカリ・コンゴレッド染色とクルクミン染色の比較  
 a: ヒト, b: サル, c: イヌ, d: ネコ e: クマ f: Tg マウス, g: アカゲラ。それぞれ左がコンゴレッド染色、右がクルクミン染色を示す。h: アカゲラの脳血管アミロイド重度沈着部位、クルクミン染色。



**Fig. 5** ヒト AD 患者の脳皮質における神経原線維変化 (NFT)  
 a: PHF-tau 免疫染色, b: Gallyas 銀染色, c, d: クルクミン染色。



**Fig. 6** ギ酸処理によるクルクミンの染色性の変化  
 a, b: AD 患者の老人斑, c, d: ニホンザルの脳血管アミロイド  
 a, c: ギ酸未処理コントロール, b, d: ギ酸処理

ルクミン染色では、AA、AL、APOT、SCA のいずれもがアルカリ・コンゴレッド陽性部位に一致して陽性であった (Figs. 7 and 8)。アルカリ・コンゴレッド染色では、 $\text{KMnO}_4$  の前処理により AA と SCA の染色性が失われたが、AL と

APOT の染色性は失われなかった。一方、クルクミン染色では  $\text{KMnO}_4$  の前処理により AA と SCA に加えて AL の染色性も失われたが、APOT の染色性は失われなかった。

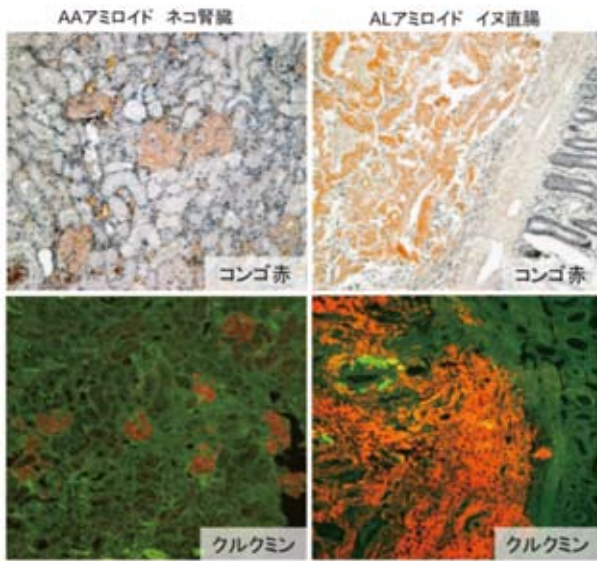


Fig. 7 各種アミロイドの染色 (1)

上: アルカリ・コンゴレッド染色, 下: クルクミン染色。左: AAアミロイド、ネコの腎臓, 右: ALアミロイド、イヌの直腸。

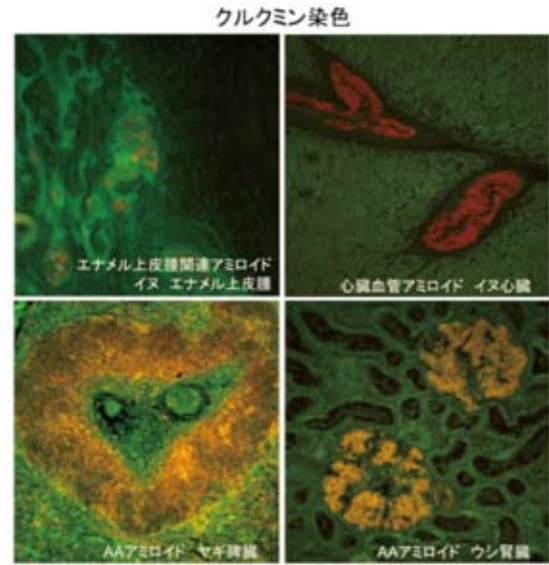


Fig. 8 各種アミロイドのクルクミン染色 (2)

上左: エナメル上皮関連アミロイド、イヌ口腔内エナメル上皮腫。上右: 心臓血管アミロイド、イヌ心臓。下左: AAアミロイド、ヤギ脾臓。下右: AAアミロイド、ウシ腎臓。

#### 4. 考 察

今回の研究は、動物の各種アミロイドのクルクミン染色について初めて検討したものである。

老人斑は形態的に、コンゴレッド染色に陽性で腫大した神経突起をもつ成熟斑<sup>23)</sup>とコンゴレッド染色陰性のびまん斑<sup>24)</sup>に分けられる。びまん斑は老人斑形成過程の初期段階であると考えられている。全ての老人斑はPAM染色もしくは、Aβ免疫染色によって検出される<sup>24, 25)</sup>。今回、コンゴレッド染色、PAM染色、Aβ免疫染色を行うことによって、アカゲラ以外の動物にびまん斑が存在し、ヒト、サル、一部のイヌ、クマ、Tgマウスには成熟斑も存在することが示された。

Tgマウスの老人斑の形態は他の動物種と異なり花びら様であった。これはAPPを人為的に過剰発現させたことにより、その凝集度も高くなったためと考えられた。今回のTgマウスでみられた老人斑は、他の動物の老人斑と比較して最もクルクミンの染色性が強かった。このことから、凝集性の高い老人斑ほどクルクミンが結合しやすくなり、染色性が高くなると考えられた。これに対

し、イヌ、ネコのびまん斑は、クルクミンで染色されなかった。またネコの老人斑は、コンゴレッド染色、PAM染色にも陰性であった。これらの老人斑は形態学的には他の動物種の老人斑に比べて、境界不明瞭であった。犬では老人斑のほとんどがびまん斑である<sup>7)</sup>。ネコの老人斑は18才以上で見られず、PAM染色陰性であることから、びまん斑以前のもと考えられている<sup>8)</sup>。以上のことから、犬、猫の老人斑はヒトやサルの老人斑に比べAβの凝集性が低いのではないかと考えられた。さらに、犬、猫の老人斑にクルクミンが結合しなかったことから、クルクミンはある程度Aβの凝集が進んだ老人斑に結合すると推察された。

ギ酸前処理後のクルクミン染色では、老人斑、脳血管アミロイド、NFT全てにおいて、染色性が失われた。ギ酸の前処理はAβ免疫染色を行う際の前処理として用いられているが、Aβの免疫反応性を回復ないし増強させる効果をもつことが明らかにされている<sup>27)</sup>。これは、ギ酸がアミロイドβの立体構造を破壊し、抗体と反応しやすくするためと考えられている。立体構造を失ったAβはコンゴレッドやクルクミンとはもはや結合

しなくなると考えられる。コンゴレッドはクルクミンと化学構造が似ていることが明らかにされている<sup>17)</sup>。以上のことから、クルクミンはコンゴレッドと同様に、A $\beta$ の立体構造を認識して結合することが示唆された。

一般的に、老人斑に沈着するA $\beta$ はA $\beta$  42が主体、脳血管アミロイドはA $\beta$  40が主体と考えられている。また、ヒトとイヌのびまん斑ではA $\beta$  42が主体で、成熟斑はA $\beta$  40が主体であることが明らかにされている<sup>5)</sup>。本研究の結果、ヒト、イヌ、ラクダ、クマ、ネコでは、A $\beta$  42を主体とした老人斑、サル、TgマウスではA $\beta$  40、A $\beta$  42両方から構成される老人斑がみられた。また、ヒト、サル、ネコ、Tgマウス、アカゲラでは、A $\beta$  40、A $\beta$  42から構成される脳血管アミロイドが(A $\beta$  40の方がやや優勢)、クマ、イヌでは、A $\beta$  42主体の脳血管アミロイドが多く存在することが示された。クルクミンはA $\beta$  42主体で構成される老人斑と脳血管アミロイド、A $\beta$  40で構成される老人斑と脳血管アミロイドをともに染色した。今回クルクミンはA $\beta$  40、A $\beta$  42どちらのA $\beta$ にも結合したことから、C末端の立体構造の違いは識別しないと考えられた。

今回、NFTはヒトでのみ認められ、クルクミンで染色された。これは過去の研究結果と一致した<sup>21)</sup>。しかし、クルクミン染色よりガリヤス銀染色のほうがNFTをより明瞭に染色したことから、クルクミンは、NFTの検出マーカーとしては、あまり有用ではないと考えられた。以上のことから、クルクミンはA $\beta$ だけでなく異常tau蛋白とも結合するものの、その結合性はA $\beta$ に対する結合性より弱いと考えられた。

以上のようにクルクミンは各種アミロイドの鋭敏な染色試薬として使用できることが判明した。本研究の成果は、アルツハイマー病や難病指定されているアミロイド症の研究に大いに貢献すると考えられた。

## 謝 辞

本研究の遂行にあたり、研究助成を賜った浦上食品・食文化振興財団に心より御礼申し上げます。また、貴重な材料を提供いただいた国立さいがた病院・巻渕隆夫博士、理化学研究所脳科学研究センター・高島明彦博士、帯広畜産大学・松井高峰博士に深く感謝する。

## 文 献

- 1) Nakamura S, Tamaoka A, Sawamura N, Shoji S, Nakayama H, Ono F, Sakakibara I, Yoshikawa Y, Mori H, Goto N, Doi K, Carboxyl end-specific monoclonal antibodies to amyloid  $\beta$  protein (A $\beta$ ) subtypes (A $\beta$  40 and A $\beta$  42(43)) differentiate A $\beta$  in senile plaques and amyloid angiopathy in brains of aged cynomolgus monkeys. *Neurosci. Lett.* 201: 151-154 (1995)
- 2) Nakamura S, Nakayama H, Goto N, Ono F, Sakakibara I, Yoshikawa Y, Histopathological studies on senile plaques and cerebral amyloidosis in cynomolgus monkeys. *J. Med. Primatol* 27: 244-252 (1995)
- 3) Podlisny MB, Tolan DR, Selkoe DJ, Homology of the amyloid beta protein precursor in monkey and human supports a primate model for beta amyloidosis in Alzheimer's disease. *Am.J.Pathol.* 138: 1423-1435 (1991)
- 4) Selkoe DJ, Bell DS, Podlisny MB, Price DL, Cork LC, Conservation of brain amyloid proteins in aged mammals and humans with Alzheimer's disease. *Science* 235: 873-877 (1987)
- 5) Nakamura S, Tamaoka A, Sawamura N, Kiatipattanasakul W, Nakayama H, Shoji S, Yoshikawa Y, Doi, K, Deposition of amyloid beta protein (A $\beta$ ) subtypes [A $\beta$  40 and A $\beta$  42(43)] in canine senile plaques and cerebral amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol* 94: 323-328 (1997)
- 6) Borràs D, Ferrer I, Pumarola M, Age-related changes in the brain of the dog. *Vet Pathol* 36: 202-211 (1999)
- 7) Uchida K, Nakayama H, Goto N, Pathological studies on cerebral amyloid angiopathy, senile plaques and amyloid deposition in visceral organs in aged dogs. *J Vet Med Sci* 53: 1037-1042 (1991)
- 8) Nakamura S, Nakayama H, Kiatipattanasakul W, Uetsuka K, Uchida K, Goto N, Senileplaques in very aged cats. *Acta Neuropathol* 91: 437-439 (1996)
- 9) Nakamura S, Nakayama H, Uetsuka K, Sasaki N, Uchida K., Goto,N, Senile plaques in an aged two-humped (Bactrian) camel (*Camellus bactrianus*). *Acta Neuropathol* 90: 415-418 (1995)
- 10) Cork LC, Powers RE, Selkoe DJ, Davies P, Geyer JJ, Price DL, Neurofibrillary tangles and senile plaques in aged bears. *J. Neuropathol. Exp. Neurol* 47: 629-641 (1988)



- 11) Uchida K, Yoshino T, Yamaguchi R, Tateyama S, Kimoto Y, Nakayama H, Goto N, Senile plaques and other senile changes in the brain of an aged American black bear. *Vet Pathol* 32: 412-414 (1995)
- 12) Roertgen KE, Parisi JE, Clark HB, Barnes DL, O'Brien TD, Johnson KH, A beta-associated cerebral angiopathy and senile plaques with neurofibrillary tangles and cerebral hemorrhage in an aged wolverine (*Gulo gulo*). *Neurobiol Aging* 17: 243-247 (1996)
- 13) Nakayama H, Katayama K, Ikawa A, Miyawaki K, Shinozuka J, Uetsuka K, Nakamura S, Kimura N, Yoshikawa Y, Doi K, Cerebral amyloid angiopathy in an aged great spotted woodpecker (*Picoides major*). *Neurobiol Aging* 20: 53-56 (1999)
- 14) Rosen RF, Farberg AS, Gearing M, Dooyema J, Long PM, Anderson DC, Davis-Turak J, Coppola G, Geschwind DH, Paré JF, Duong TQ, Hopkins WD, Preuss TM, Walker LC, Tauopathy With Paired Helical Filaments in an Aged Chimpanzee. *J Comp Neurol* 509: 259-270 (2008)
- 15) Braak H, Braak E, Strothjohann M, Abnormally phosphorylated tau protein related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads in the cerebral cortex of sheep and goat. *Neurosci Lett* 171: 1-4 (1994)
- 16) Hatcher H, Planalp R, Cho J, Torti FM, Torti SV, Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials, *Cell Mol Life Sci* 65: 1631-1652 (2008)
- 17) Yang F, Lim GP, Begum AN, Ubada OJ, Simmons MR, Ambegaokar SS, Chen PP, Kaye R, Glabe CG, Frautschy SA, Cole GM, Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. *J Biol Chem* 280: 5892-5901 (2005)
- 18) Begum AN, Jones MR, Lim GP, Morihara T, Kim P, Heath DD, Rock CL, Pruitt MA, Yang F, Hudspeth B, Hu S, Faull KF, Teter B, Cole GM, Frautschy SA, Curcumin Structure-Function, Bioavailability, and Efficacy in Models of Neuroinflammation and Alzheimer's Disease. *J Pharmacol Exp Therapeut* :196-208 (2008)
- 19) Garcia-Alloza M, Borrelli LA, Rozkalne A, Hyman BT, Bacskai BJ, Curcumin labels amyloid pathology *in vivo*, disrupts existing plaques, and partially restores distorted neurites in an Alzheimer mouse model. *J Neurochem* 102: 1095-1104 (2007)
- 20) amaguchi T, Ono K, Murase A, Yamada M, Phenolic compounds prevent Alzheimer's pathology through different effects on the amyloid-beta aggregation pathway. *Am J Pathol* 175: 2557-2565 (2009)
- 21) Mohorko N, Repovs G, Popović M, Kovacs GG, Bresjanac M, Curcumin Labeling of Neuronal Fibrillar Tau Inclusions in Human Brain Samples, *J Neuropathol Exp Neurol* 69: 405-414 (2010)
- 22) Braak H, Braak E, Ohm T, Bohl J, Silver-impregnation of Alzheimer's neurofibrillary changes counter-stained for basophilic material and lipofuscin pigment. *Stain Technol* 63: 197-200 (1988)
- 23) Wisniewski HM, Terry RD, Reexamination of the pathogenesis of the senile plaques. *Progress in Neuropathol* 2: 1-26 (1973).
- 24) Yamaguchi H, Hirai S, Morimatsu M, Shoji M, Harigaya Y, Diffuse type of senile plaques in the brains of Alzheimer-type dementia. *Acta Neuropathol*. 77: 113-119 (1988)
- 25) Tagliavini F, Giaccone G, Frangione B, Bugiani O, Preamyloid deposits in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease and nondemented individuals. *Neurosci Lett* 93: 191-196 (1988)
- 26) Stalder M, Phinney A, Probst A, Sommer B, Staufenbiel M, Jucker M. Association of microglia with amyloid plaques in brains of APP23 transgenic mice. *Am J Pathol* 154: 1673-84 (1999)
- 27) Kitamoto T, Ogomori K, Tateishi J, Prusiner SB, Formic acid pretreatment enhances immunostaining of cerebral and systemic amyloids, *Lab. Invest.* 57: 230-236 (1987)

## “Binding property of curcumin to various amyloid proteins of animals”

**Hiroyuki Nakayama**

*Department of Veterinary Pathology*

*Graduate School of Agricultural and Life Sciences*

*The University of Tokyo*

Curcumin, a phenol derivative included in turmeric, binds to amyloid beta protein (A beta) as well as amyloid A (AA), amyloid L (AL), amyloid produced by odontogenic tumors (APOT) and senile cardiac amyloid (SCA). Brain samples from an Alzheimer's patient, aged Japanese monkeys, dogs, cats, a two-humped camel, a great spotted wood pecker, an American black bear and an APP transgenic mouse (APP23) were incubated with 0.009 % curcumine solution and observed with a confocal laser microscope, as well as were stained with alkaline Congo red and observed with a light microscope.

Curcumin stained senile plaques and cerebral amyloid angiopathy in the aged brain of some animal species. Formic acid pretreatment diminished the intensity of curcumine stain. Curcumine also stained neurofibrillary tangles (NFT) seen in the brain of Alzheimer's patients.

Curcumine further stained other types of amyloid proteins including AA, AL, APOT and SCA. Pretreatment of  $\text{KMnO}_4$  diminished the curcumin stain intensity of AA, AL and SCA, but not that of APOT.

It is revealed that curcumine specifically binds to not only various types of amyloid proteins but PHF-tau protein included in NFT, and can detect such amyloids and NFT through its autofluorescence. The structure of the curcumin binding site in an amyloid molecule may be changed by the pretreatment of formic acid or  $\text{KMnO}_4$ , because the intensity of curcumine stain was lost by these pretreatments. Conclusively, curcumin more strongly binds to amyloid proteins than Congo red, and is used as a more sensitive staining reagent for amyloids.