

アルツハイマー病における Amyloid beta protein₁₋₄₂ の検出

日大生産工 (院) ○ 清水 武則
日大生産工 神野 英毅

【緒言】

現在、わが国の 65 歳以上の老年人口が全人口に占める割合は 16 %であるが、西暦 2050 年には先進国の中では、イタリアとともに 30 %を超えると見込まれている。このように平均寿命が延びたことによる痴呆症患者の増加が懸念され始めている。「痴呆性老人」は厚生省の調査によると、1990 年で約 100 万人、2002 年で 150 万人となっており、2050 年には、400 万人を超える可能性があると予測されている。このようにわが国では、高齢化社会による様々な問題が生じつつあり、今後国家単位での対策が必要とされるであろう。¹⁾

Alzheimer disease (AD)の主要な病理変化は老人斑と神経原線維変化である。老人斑は、発症の早期から認められ、その主要構成成分は Amyloid beta protein(Aβ)₁₋₄₂ である。Aβ₁₋₄₂ は、Aβ タンパク前駆体から β および γ セクレターゼが働くことにより脳内で生成され、42 のペプチドが会合したタンパクであり、毒性を惹起することが知られている。このタンパクが蓄積することにより脳内の神経細胞が破壊され、AD が発症すると考えられている。AD 患者における Aβ₁₋₄₂ の構造は、毒性の低い線維状のものが集合した凝集体であると考えられている。本研究では、血液中の凝集体 Aβ₁₋₄₂ を検出することを目的とし、ポリクローナル抗 Aβ₁₋₄₂ 抗体を用いて、感作ラテックス試薬を作製し、その反応性を LPIA-S 500 を用いて検討した。

【実験方法】

1. 凝集体 Aβ₁₋₄₂ の作製²⁾

使用した Aβ₁₋₄₂ は、ペプチドを修飾すること

により合成した。2.0 mg/ml~2 ng/ml の Aβ₁₋₄₂ 溶液 250 μl を調製し、4℃で 30 分間インキュベートした。その後、それぞれの溶液を 2 倍希釈して 1.0 mg/ml~1 ng/ml に調製し、反応促進性を持つ Aβ₁₆₋₂₀ をそれぞれ 10 モル過剰加え、約 9 時間攪拌させた(4℃)。凝集前と凝集後の分子量を比較するためにそれぞれの Aβ₁₋₄₂ を超遠心分析装置を用いて測定した。

2. ポリクローナル抗 Aβ₁₋₄₂ 抗体作製および感作ラテックス試薬の作製

ポリクローナル抗 Aβ₁₋₄₂ 抗体は、ウサギに免疫をかけることにより作製し、アフィニティークロマトグラフィーにより精製を行った。その後 ELISA により抗体の確認を行った。³⁾

濃度 10 (w/v) %で保存されているカルボキシル化ポリスチレンラテックスを容量 10 ml のポリプロピレン共重合体遠沈管に 0.1 ml 分取し、pH 5.6、0.05 M MES 緩衝液を 1.9 ml 加え、濃度 0.5 %とし、粒子洗浄のため遠心分離(16000 rpm, 277 K, 20 min)した。洗浄後粒子は 20 mg/ml に同じ MES 緩衝液で調製した WSC 溶液に懸濁し、50 mg/ml に MES 緩衝液で調製した NHS 緩衝液を 0.23 ml 加え、298 K で 30 min 攪拌しラテックス表面のカルボキシル基を活性化させた。活性化後 MES 緩衝液で洗浄し、同じ MES 緩衝液 1.0 ml に懸濁した。これに濃度調製した抗 Aβ₁₋₄₂ 抗体溶液を加え、310 K で 30 min 攪拌し結合させた。結合後遠心分離(16000 rpm, 277 K, 20 min)し、上清と沈殿に分けた。沈殿は、同じ MES 緩衝液 2 ml に懸濁し、粒子洗浄のため 1 回遠心分離(16000 rpm, 277 K, 20 min)を行った。遠心分

Detection of Amyloid beta protein₁₋₄₂ in Alzheimer's disease

Takenori SHIMIZU and Hideki KOHNO

離後同じ MES 緩衝液 1 ml に懸濁し、1 %dn BSA を 1 ml 加え 298 K で 30 min 攪拌し、ラテックス粒子表面の抗 $A\beta_{1-42}$ 抗体未結合部位のブロッキングを行った。

ブロッキング後、pH 8.2、0.1 M Tris-HCl 緩衝液に懸濁し、未反応活性化カルボキシル基を加水分解した。加水分解後粒子洗浄のため同じ Tris-HCl 緩衝液に懸濁して 2 回遠心分離(16000 rpm, 277 K, 20 min)を行った。最終的に Tris-HCl 緩衝液 2 ml に懸濁し 0.5 % (w/v)にしたものをポリクローナル抗 $A\beta_{1-42}$ 抗体化学結合ラテックス試薬とした。抗原との反応性を調べるために LPIA-S 500 を用いて測定を行った。

【結果および考察】

1. 超遠心分析

実験 1 で凝集させた $A\beta_{1-42}$ を超遠心分析装置で解析したところ分子量が約 130000 Da となった。この解析結果を Fig. 1 に示す。このことから実験 1 で行った反応により $A\beta_{1-42}$ は凝集体であると考えられる。

2. ポリクローナル抗 $A\beta_{1-42}$ 抗体の確認

ELISA を行った結果、吸光度が 0.8655 となり、ポリクローナル抗 $A\beta_{1-42}$ 抗体が作製されたと考えられる。また、アフィニティークロマトグラフィーにより精製を行った結果、吸光度は 1.0531、抗体濃度は 0.85 mg/ml となり、精製が行われた。

3. LPIA-S 500 によるラテックス試薬の評価

ポリクローナル抗 $A\beta_{1-42}$ 抗体化学結合ラテックス試薬を作製し、LPIA-S 500 により測定を行った。抗体量、スパーサーの有無、ラテックス濃度を検討し、ラテックス試薬の反応性を評価した。そのグラフを Fig. 2 に示す。この結果より、わずかではあるが抗原濃度との相関性が確認された。

【結論】

本研究では、ポリクローナル抗 $A\beta_{1-42}$ 抗体を作製し、ラテックス試薬に感作させることにより抗原である $A\beta_{1-42}$ の検出を行った。結果より、

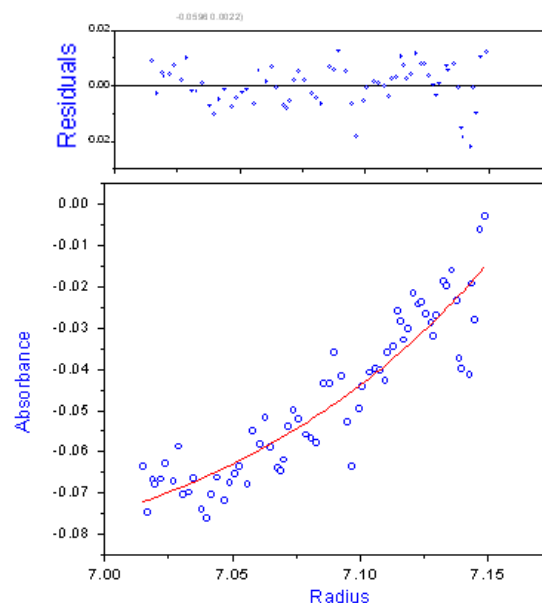


Fig.1 超遠心分析における半径と吸光度の関係

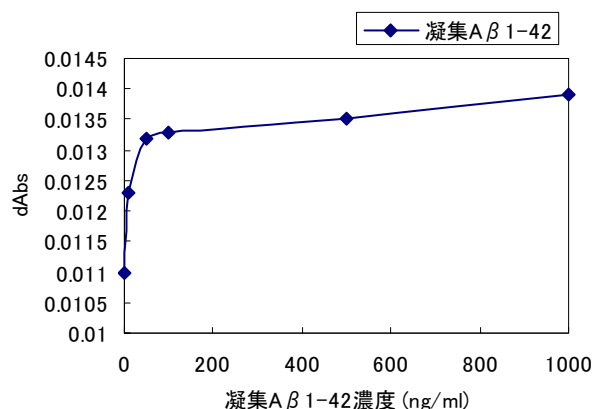


Fig.2 凝集 $A\beta_{1-42}$ 濃度と吸光度の関係

わずかな反応性は示されたが、血中レベルの反応性に達していないため今後条件検討を行い、反応性を高めていく必要がある。

【参考文献】

- 1) 涌谷 陽介ら、アルツハイマー病の疫学、脳の科学, 21-26 (2000)
- 2) Minako hoshi, et al. PNAS. 100, 6370-6375 (2002)
- 3) はじめての抗体作製ハンドブック, Amersham Biosciences