

## 1 緒言

近年、高齢化に伴い、世界中でアルツハイマー病 (Alzheimer Disease : AD) 患者の数が増加しており、現在では認知症患者の過半数を占める。また、AD の進行を抑制する薬は開発されているが、治療法は未だ確立されていない。そのため早期診断方法の確立が重要視されている。AD の病理特徴として、脳内に Amyloid  $\beta$  Protein : ( $A\beta$ ) と呼ばれるタンパク質を主成分とした老人斑が見られる。この  $A\beta$  は約 40 のアミノ酸残基によって構成される膜貫通タンパク質であり、amyloid precursor protein (APP) と呼ばれる前駆体から二種類の酵素の限定分解により脳内で生産される。老人斑は神経細胞に対して毒性を示す。老人斑は AD が進行していくに従って増えていき、その分布を A-C の三段階で表したものとして、Braak stage<sup>1)</sup> がある。 $A\beta$  は神経細胞に対して毒性を示すだけでなく、血管壁にも蓄積しアミロイド血管症 (Cerebral amyloid angiopathy : CAA) と呼ばれる血管症を引き起こすことも知られており、AD 患者の脳内にはしばしば CAA が確認される。AD の早期診断として  $A\beta$  をバイオマーカーとして検出する研究例がいくつか存在しており、脳脊髄液中の  $A\beta$  濃度を検出する方法は AD の早期診断として有効であると期待されている<sup>2)</sup>。しかし脳脊髄液の採取は臨床学的な観点から見て患者へのリスクが高い。そこで、侵襲性の低い例として、血中の  $A\beta$  濃度による診断研究を試みた。しかし、 $A\beta$  は脳髄液と血液を隔て

る脳血液関門を透過できないため血液中では非常に低濃度である。従って AD 患者と健常者の血清中  $A\beta$  濃度には相関が認められていない<sup>3)</sup>。

当研究室では  $A\beta$  凝集体と特異的に反応するモノクローナル抗体を作成し、抗原抗体反応によって非晶質の  $A\beta$  凝集体の検出を行ってきた。これらの抗体は凝集体のサイズごとに異なった反応特異性を示す。本実験では死後 AD と確定診断された患者の血清中の  $A\beta$  凝集体濃度をモノクローナル抗体 37-11, 77-3 を使用して検出した。その結果、健常者と AD 患者の間に有意差が認められた。そして、この結果は AD の血清診断に有効であると考えたので報告する。

## 2 実験方法, 測定方法

### ELISA

本実験の  $A\beta$  検出はすべて直接 ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) によって行われた。ELISA は目的の抗原を、特異抗体で捕捉するとともに、抗体に結合した酵素の反応を利用して検出・定量する方法である。本実験の抗原は死後に確定診断された AD 患者と健常者の血清サンプルを使用した。抗体は当研究室で作成した 2 種類の酵素標識したモノクローナル抗体を用いた。測定は吸光度を 492nm で設定し測定した。得られた結果はマンホイットニーの U 検定 (Mann-Whitney U test) により有意差を確認した。

---

Development of blood diagnostic method for Alzheimer's disease using anti aggregate antibody

Hiroaki FURUYAMA and Kazuaki YOSHIMUNE

### 3 実験結果

抗体 77-3 で A $\beta$  凝集体を検出した 392 の血清サンプルのうち, Braak stage 0 の患者が 36 人, A が 12 人, B が 24 人, C が 53 人であり,

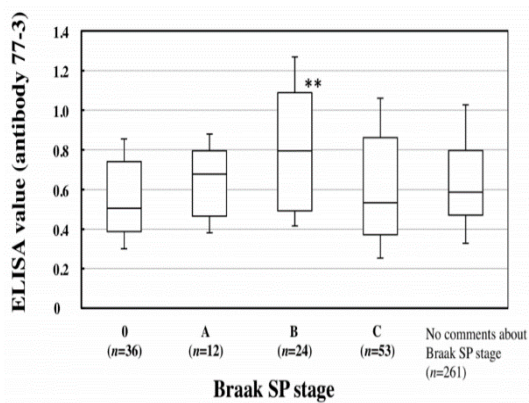


図 1. 抗体 77-3 による, A $\beta$  42 の濃度と Braak stage の相関

残りの 261 サンプルは Braak stage について無記述であった (図 1)。測定後, マンホイットニーの U 検定により比較を行ったところ, Braak stage B と 0, C の間に有意差が認められた。Braak stage 0 から B にかけて血清中 A $\beta$  凝集体の増加が確認されたが, C では低下した。

AD 患者の血清サンプルは 376 サンプル

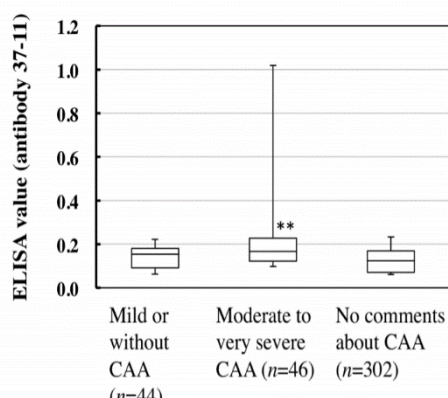


図 2. 抗体 37-11 による, A $\beta$  42 の濃度と CAA の相関

であったが, そのうち CAA を有するのは 74 サンプルであった。これらの 74 サンプルを, 中等度から非常に重度の CAA 46 サンプル, および軽度 24 サンプル, または CAA なし 4 サンプルの 2 つのグループに分け, これに加え, 健常者の血清サンプル 16 をこの比較に加えた (図 2)。中程度から非常に重度の CAA が確認された患者の血清中 A $\beta$  凝集体は抗体 37-11 を用いて高い値で検出された。この値は健常者と比べて有意に高い値であった ( $p = 0.042$ )。

### 4 考察

血液中 A $\beta$  は脳血液関門を透過できないため低濃度であるが, 今回検出された血清中 A $\beta$  凝集体は AD 患者と健常者の間に有意差が認められるほどに高い値を示していた。マウスモデルの実験結果から, A $\beta$  は低密度リポタンパク質と結合し複合体となることで脳血液関門を透過しているのではないかと考えられる。従って, 当研究室で作成した抗体 77-3, 37-11 は血清中の A $\beta$ -リポタンパク質複合体を検出していると考察する。これは血清中に低濃度で存在している A $\beta$  を検出可能にすると考えられる。

### 5 まとめ

本実験では, 作成した 2 種類のモノクローナル抗体を使用し血清中の A $\beta$  を検出した。その結果, AD 患者と健常者の間に有意差が認められた。今回の結果から, 当研究室で作成した 2 種の抗体は AD の診断に有効であると考えた。

### 6 参考文献

- 1) Braak, H, *et al.*, *Acta Neuropathol*, 82, 259, (1991).
- 2) Lewczuk, P, *et al.*, *Journal of Alzheimer's disease*, 43, 191, (2015).
- 3) Mehta, D, P, *et al.*, *Arch neurol*, 57, (2000).