

アルツハイマー病における $A\beta_{1-42}$ の Immunoassay による検出法の研究

日大生産工（院）○清水 武則

日大生産工 小森谷 友絵 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り痴呆症患者の増加が懸念され始めている。「痴呆性老人」は厚生労働省の調査によると、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 ($A\beta$)₁₋₄₂ である。 $A\beta$ ₁₋₄₂ は、 $A\beta$ 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 $A\beta_{1-42}$ 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 $A\beta_{1-42}$ を Immunoassay により検出することを目的とする。

【実験方法】

1. 凝集体 $A\beta_{1-42}$ の作製²⁾

使用した $A\beta_{1-42}$ は、ペプチドを修飾することにより合成した。2.0 mg/ml の $A\beta_{1-42}$ 溶液 500 μ l を調製し、4℃で 30 分間インキュベートした。その後、溶液をダルベッコ PBS により 2 倍希釈して 1.0 mg/ml に調整し、反応促進性を持つ $A\beta_{16-20}$ を 10 モル過剰加え、約 16 時間

攪拌させた(37℃)。また、 $A\beta_{16-20}$ と $A\beta_{1-42}$ の反応性を調べるため、 $A\beta_{16-20}$ を加えずに同様の実験を行った。凝集後の分子量を確認するため、アクリルアミドゲル電気泳動、キャピラリー電気泳動を用いて測定を行った。

2. チオフラビン T アッセイ³⁾

$A\beta_{1-42}$ に対する $A\beta_{16-20}$ の関係性を調べるため、チオフラビン T を用いて蛍光強度変化による構造解析の確認を行った。まず、実験 1 で調製した反応前の $A\beta_{1-42}$ 溶液をさらに 1 mg/ml~1 μ g/ml に調製しチオフラビン T を加え、蛍光強度の測定を行った。

チオフラビン T の終濃度を 10 μ M とし、マイクロプレートリーダーで測定を行った (37℃、12 hour)。測定は 20 min 毎に行い、励起波長 444 nm、吸収波長 485 nm の条件で行った。

3. モノクローナル抗 $A\beta_{1-42}$ 抗体の作製

上記により作製した凝集 $A\beta_{1-42}$ を ($A\beta_{16-20}$ 添加) 抗原としてマウスに免疫を行い、細胞融合を行った。細胞融合後、スクリーニングを行い、限界希釈法を用いてクローニングを行った。精製した抗体を用いて ELISA 法によりモノクローナル抗体の確認を行った。

【結果および考察】

1. キャピラリー電気泳動による $A\beta_{1-42}$ の分子量確認

キャピラリー電気泳動を用いて凝集 $A\beta_{1-42}$ の分子量を測定した結果を Fig. 1、Fig. 2 に示す。Fig. 1 は $A\beta_{1-42}$ の解析結果であり、分子量約 7.8 kDa、約 14.4 kDa、約 17.7 kDa にスペクトルが現れているのがわかる。Fig. 2 は、 $A\beta_{1-42}+A\beta_{16-20}$ の結果であり、分子量約 16.6 kDa と約 24.2 kDa にスペクトルが見られた。以上より各凝集体の調製方法の違いにより分子量の異なる凝集体が形成されることがわか

Study on Immunoassay of $A\beta_{1-42}$ in Alzheimer Disease

Takenori SHIMIZU, Tomoe KOMORIYA and Hideki KOHNO

った。

2. チオフラビン T アッセイによる $A\beta_{1-42}$ の構造解析

$A\beta_{1-42}$ の構造変化を調べるためにチオフラビン T アッセイにより蛍光度変化を観察した。凝集反応開始時に $A\beta_{16-20}$ を添加しない場合と添加した場合のそれぞれの蛍光度変化をマイクロプレートリーダーにより観察した。 $A\beta_{16-20}$ を添加しなかった場合においては、蛍光強度が時間経過とともに上昇した。したがって、線維状構造を形成していることが推測される。

一方、 $A\beta_{16-20}$ を添加した場合では、すべての濃度において時間経過とともに蛍光度が減少した。これは、線維状構造ではなくオリゴマー状の構造を形成しているということが推測される。

3. ELISA 法によるモノクローナル抗 $A\beta_{1-42}$ 抗体の評価

作製したモノクローナル抗 $A\beta_{1-42}$ 抗体の評価を ELISA 法により行った。オリゴマー状の $A\beta_{1-42}$ に対する抗体の特異性を確認するため $A\beta_{16-20}$ を添加したもの、 $A\beta_{16-20}$ を添加しなかったものそれぞれを固相化抗原とし、ELISA 法を行った。この結果を、Fig. 2 に示す。抗体濃度を $4 \mu\text{g/ml}$ とし、抗原濃度を変化させて ELISA 法を行った。 $A\beta_{16-20}$ を添加したものに対しては濃度との相関性が確認でき、吸光度の増加が確認できた。また、 $A\beta_{16-20}$ を添加しなかったものに対しては、反応性が低く、 $A\beta_{16-20}$ を添加した場合に比べ反応性を約 30 パーセントに抑えることができた。

【結論】

ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびチオフラビン T アッセイの結果から、 $A\beta_{16-20}$ を添加することによりオリゴマー状態の凝集体が作製されたということが考えられる。また、今回得られたモノクローナル抗体は、凝集 $A\beta_{1-42}$ に特異的に反応することがわかり、線維状 $A\beta_{1-42}$ に対する交差性は 30 パーセントであることがわかった。

【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)

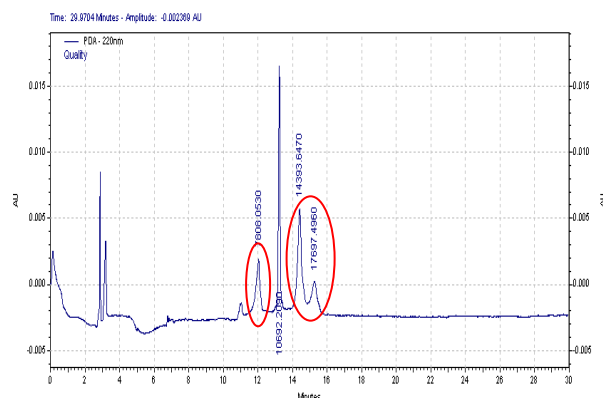


Fig. 1 Analysis of $A\beta_{1-42}$ by Capillary electrophoresis

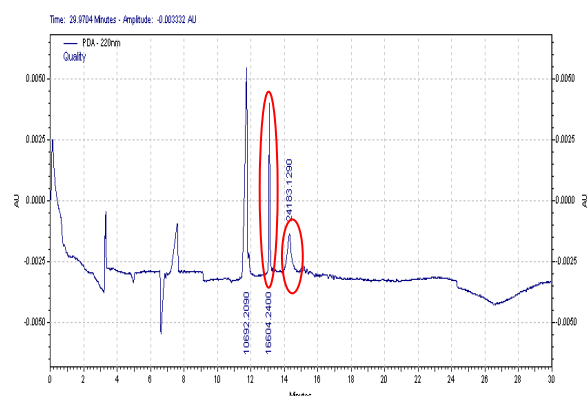


Fig. 2 Analysis of $A\beta_{1-42}+A\beta_{16-20}$ by Capillary electrophoresis

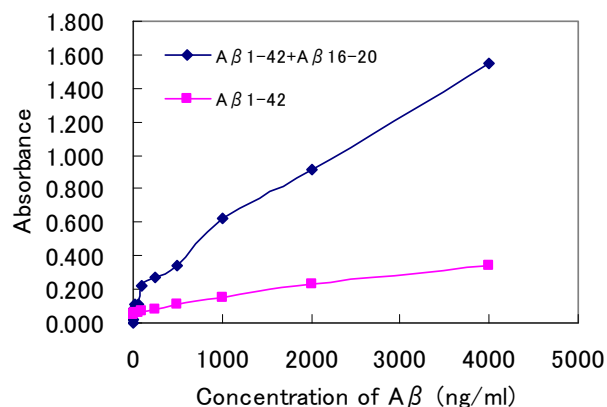


Fig.3 ELISA of $A\beta_{1-42}$ and $A\beta_{1-42}+A\beta_{16-20}$

- 2) Minako Hoshi, et al. *PNAS*. 100, 6370-6375 (2002)
- 3) Yuji Yoshiike, et al. *J. Biol. Chem.* 278, 23648-23655 (2003)