

Immunoassay による凝集アミロイド β タンパク ($A\beta_{1-42}$) の検出法に関する研究

日大生産工(院) ○中村 紘士・大田 貴紀・清水 武則

日大生産工 小森谷 友絵・神野 英毅

【緒言】

日本は世界で最も平均寿命の高い国であるが、同時に高齢化のスピードも最も速い国でもある。その一方で痴呆は年齢の増加と共に急速に増え、65 歳以上では 4～5 %、85 歳以上にいたっては 4 人に 1 人が痴呆であると言われている¹⁾。脳神経細胞の損傷による脳の活動の低下が痴呆の原因であり、Alzheimer's disease(AD)と脳血管性痴呆が 90 %程度を占めている。最近の調査では AD の方が多いと言われるようになってきている。

AD が発症する原因として、 $A\beta$ というタンパク質の脳内蓄積が考えられている。通常、 $A\beta$ は脳内でアミロイド前駆体タンパクから分解酵素によって $A\beta$ の中程の位置で切断され、速やかに分解除去され消失する。しかし、高齢化により分解酵素活性が低下し、切り出される $A\beta$ の量が増加すると共に、脳から $A\beta$ を排出する機能の低下により、脳内の $A\beta$ の濃度が増大して $A\beta$ が凝集する。この凝集した $A\beta$ が神経細胞に作用して、神経細胞死を引き起こすと考えられている。

このようなメカニズムにより AD が発症するとされているが、現在有効とされているアセチルコリンエステラーゼ阻害薬でさえ、軽度・中度の患者の何割かのみ、しかも部分的にしか効果を示していない。さらに、これは AD を根本から治す治療薬ではないため、服用を中止すると元の症状に戻るといった問題もある。このことから AD の治療は現在の

我が国では極めて重要な問題となっており、今後の大きな課題と言える。そこで、新しい治療薬として抗体医薬治療が注目されている²⁾。本研究では AD の原因物質と言われている凝集 $A\beta_{1-42}$ を作製し、その特異抗体を用いた凝集 $A\beta_{1-42}$ の検出および測定を目的とする。

【実験方法】

1. 抗原作製

500 μg の $A\beta_{1-42}$ と 500 μl の超純水をマイクロチューブに入れ、30 分間 4℃でインキュベートした。その後 Dulbecco PBS を 500 μl 加え、さらに反応促進性があるとされている $A\beta_{16-20}$ を 10 mol 過剰(724 μg)加え、24 時間 37℃でインキュベートした。並行して、 $A\beta_{16-20}$ を加えずに同様の操作を行ったものも調製した。その後、SDS-PAGE を用いて凝集の確認を行い、抗体作製のための抗原とした。ThT 法を用いて構造の確認も行った。

また、 $A\beta_{1-42}$ および $A\beta_{16-20}$ は、AnyGen(Korea) のものを使用した。

2. 抗体精製

作製した凝集 $A\beta_{1-42}$ を抗原としてウサギに免疫した。本研究では $A\beta_{16-20}$ 添加の凝集体を用いて抗体作製を行った。上記の免疫実験は Immuno Probe 社の協力を得た。作製した抗血清からポリクローナル抗体の精製を行った。Protein A カラムにより精製を行い、SDS-PAGE を用いて確認した。また、精製したポリクローナル抗体を用いて、ELISA 法によりポリクローナル抗体の評価を行った。

Study on Method for Detection Aggregated Amyloid β Protein ($A\beta_{1-42}$) by Immunoassay

Hiroshi NAKAMURA, Takanori Ota, Takanori SHIMIZU, Tomoe KOMORIYA and Hideki KOHNO

【結果および考察】

1. 抗原作製

作製した凝集 $A\beta_{1-42}$ の分子量を SDS-PAGE により測定した。その結果を Fig. 1 に示す。Fig. 1 より、各サンプルで 20 kDa 付近と小さい部位にバンドが 2 本現れていることがわかる。それぞれのサンプルから同様のバンドが確認でき、単量体の分子量が約 4500 g/mol であることから 20 kDa 付近のバンドは凝集 $A\beta_{1-42}$ であると考えられるが、小さい部位のバンドは未反応の $A\beta_{1-42}$ が現れたものと思われる。

また、ThT 法において $A\beta_{1-42}$ サンプルでは蛍光強度が増加し、 $A\beta_{16-20}$ 添加サンプルでは蛍光強度が減少した。このことから、本実験方法で凝集体が作製できると考えられる。

2. 抗体精製

作製したウサギの血清からポリクローナル抗体の精製を行った。精製の確認のために行った SDS-PAGE の結果を Fig. 2 に示す。Fig. 2 より、Lane 1～3 では非還元サンプルを使用し、200 kDa 付近にバンドが検出された。一方、Lane 4～6 では還元サンプルを使用し、60 および 50 kDa 付近にバンドが検出された。このことから、ポリクローナル抗体が精製できていることが考えられる。

また、この抗体を用いて ELISA 法により反応性を確認した結果を Table 1 に示す。Table 1 より、抗原希釈率約 1000 倍まで有用な吸光度が得られたので、高感度なポリクローナル抗体が作製できた。

今後、モノクローナル抗体と組み合わせてサンドイッチ法を用いた ELISA を行い、より高感度な測定を目指す。

【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*, (2000), 21-26
- 2) Fukumoto H. et al., Primary cultures of neuronal and non-neuronal rat brain cells

secrete similar proportions of amyloid beta peptides ending at A beta40 and A beta42. *Neuroreport*, **10**, (1999), 2965

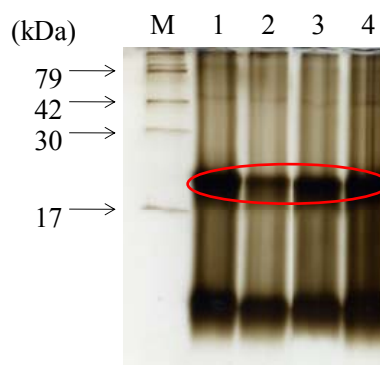


Fig. 1 SDS-PAGE による凝集 $A\beta_{1-42}$ の分子量の確認

M : 分子量マーカー

Lane 1, 2 : 凝集 $A\beta_{1-42}$

Lane 3, 4 : 凝集 $A\beta_{1-42}$ ($A\beta_{16-20}$ 添加)

※ゲル濃度 : 20 %

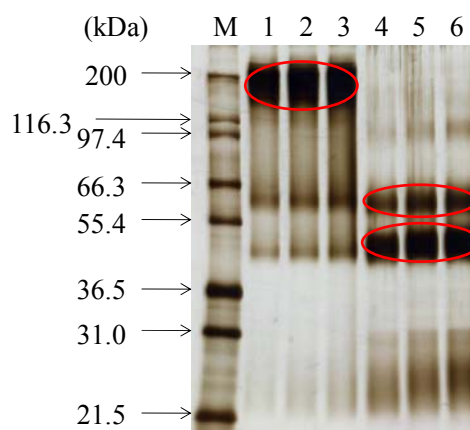


Fig. 2 SDS-PAGE によるポリクローナル抗体の精製確認

M : 分子量マーカー

Lane 1～3 : ポリクローナル抗体(非還元)

Lane 4～6 : ポリクローナル抗体(還元)

※ゲル濃度 : 15 %

Table 1 ELISA 法を用いた抗体の力価測定

抗原濃度	吸光度(492nm)
10 μ g/ml	0.727
1 μ g/ml	0.445
500ng/ml	0.314
Negative control	0.176