

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 吉宗 一晃 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して予測されている。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°C 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 に調製し、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°C)。また、 $A\beta_{16-20}$ を添加せずに 16 時間インキュベートを行い線維状 $A\beta_{1-42}$ を作製した。その凝集を確認するためチオフラビン T アッセイ、原子間力顕微鏡 (AFM) により解析を行った³⁾。

2. AFM による凝集 $A\beta_{1-42}$ の画像解析

作製した $A\beta_{1-42}$ の表面形状を確認するため AFM による解析を行った。フレッシュマイカ上に $A\beta_{1-42}$ (with $A\beta_{16-20}$)、 $A\beta_{1-42}$ (without $A\beta_{16-20}$) それぞれ 10 μ l を滴下し、デシケータで乾燥させた。その後、それぞれの溶液を反応後 0 時間、反応後 8 時間、反応後 16 時間で測定を行った。測定は空气中で AC モードにより行った。約 170 kHz の典型的な共鳴周波数で測定され、4.5 N/m のスプリングコンスタントを使用した。

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 $A\beta_{1-42}$ (with $A\beta_{16-20}$) を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. AFM による凝集 $A\beta_{1-42}$ の画像測定

AFM を用いて凝集 $A\beta_{1-42}$ (with $A\beta_{16-20}$)、 $A\beta_{1-42}$ (without $A\beta_{16-20}$) それぞれの表面形状の測定を行った。 $A\beta_{1-42}$ (without $A\beta_{16-20}$) では、反応時間とともに方面形状が変化し、16 時間後には線維状形成が確認できた。 $A\beta_{1-42}$ (with $A\beta_{16-20}$) では、時間経過とともに球状に変化し 16 時間後には aggregate 形成が確認できた。 $A\beta_{1-42}$ (without $A\beta_{16-20}$) では、高さヒストグラムにより反応後 16 時間のとき 0~1.5 nm であった。一方、 $A\beta_{1-42}$ (with $A\beta_{16-20}$) では、高さヒス

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

Takenori SHIMIZU, Tomoe KOMORIYA, Kazuaki YOSHIMUNE and Hideki KOHNO

トグラムより反応後 16 時間のとき 0~300 nm であった。

2. 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 $A\beta_{1-42}$ (with $A\beta_{16-20}$) のモノクローナル抗体では、3 種類の有効なクローン、31-2、37-11、42-5 が得られた。Iso Strip によるこのモノクローナル抗体のサブクラスの決定を行った結果、3 種類とも IgG1 クラス (L 鎖 : κ) であった。なお、陽性の基準としてブランクの 3 倍以上吸光度が高いものを陽性としクローニングを行った。得られたモノクローナル抗体がオリゴマー状に特異的であることを確認するために、固相化抗原として fibril $A\beta_{1-42}$ (without $A\beta_{16-20}$)、aggregate $A\beta_{1-42}$ (with $A\beta_{16-20}$)、monomer $A\beta_{1-42}$ 、 $A\beta_{16-20}$ を用い、ELISA 法により反応性の比較を行った。それらの結果を Fig. 1 に示す。その結果、aggregate 状である $A\beta_{1-42}$ (with $A\beta_{16-20}$) に対する反応性では、 $A\beta_{1-42}$ 濃度との相関性が確認できた。一方、線維状 $A\beta_{1-42}$ およびモノマー $A\beta_{1-42}$ に対する反応性は低く、その交差反応性は約 10% であった。また、今回得られた aggregate 凝集 $A\beta_{1-42}$ に対するモノクローナル抗体の検量線の範囲は、10~500 ng/ml であり相関係数はいずれも >0.98 であった。

【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 aggregate 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 $A\beta_{1-42}$ およびモノマー $A\beta_{1-42}$ に対する交差性は約 10 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)
- 2) Minako Hoshi, et al. *PNAS*. 100, 6370-6375 (2002)
- 3) Yuji Yoshiike, et al. *J. Biol. Chem.* 278, 23648-23655 (2003)

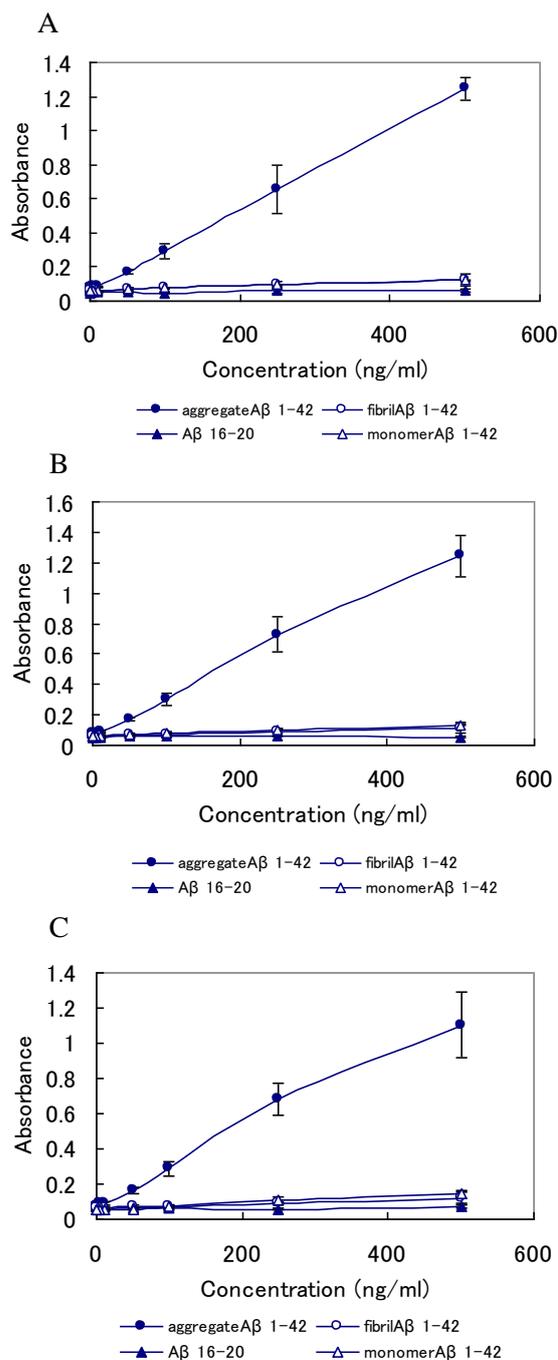


Fig. 1 Reaction of monoclonal $A\beta_{1-42}$ antibody by ELISA. (A) Quantification by ELISA of 31-2 as antigen, aggregate $A\beta_{1-42}$ (with $A\beta_{16-20}$) and fibril $A\beta_{1-42}$ (without $A\beta_{16-20}$) (B) Quantification by ELISA of 37-11 as antigen, aggregate $A\beta_{1-42}$ (with $A\beta_{16-20}$) and fibril $A\beta_{1-42}$ (without $A\beta_{16-20}$). (C) Quantification by ELISA of 42-5 as antigen, aggregate $A\beta_{1-42}$ (with $A\beta_{16-20}$) and fibril $A\beta_{1-42}$ (without $A\beta_{16-20}$). Range of antigen concentration was 0 – 500 ng/ml.