

Immunoassay による Aggregate Amyloid β Protein($A\beta_{1-42}$)の検出法に関する研究

日大生産工(院) ○中村 紘士・清水 武則
 (株)イムノ・プローブ 秋山 雄大・佐藤 健司
 日大生産工 小森谷 友絵・吉宗 一晃・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、 $A\beta$ の脳内蓄積が Alzheimer's disease(AD)を引き起こしていると考えられている。

正常な人の脳内では 40 個のアミノ酸からなる $A\beta_{1-40}$ が主体で、42 個のアミノ酸からなる $A\beta_{1-42}$ は $A\beta_{1-40}$ のおよそ 10%である。しかし、細胞実験において $A\beta_{1-42}$ は $A\beta_{1-40}$ に比べて神経毒性が高いことが確認されており、AD の病理的特徴である記憶の喪失や認知障害の原因となっている。さらに、AD 患者は $A\beta$ 濃度や $A\beta_{1-40}$ に対する $A\beta_{1-42}$ の比率が高いと言われている。 $A\beta_{1-42}$ は $A\beta_{1-40}$ より蓄積しやすく、蓄積した $A\beta_{1-42}$ は、凝集して強い神経毒性を持つと言われているオリゴマー状の構造を形成することも確認されている。

医療の現場においても、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は AD の進行を一時的に抑制させることができるだけであり、根本的な医療手段は確立されていない²⁾。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。本研究では、AD の原因物質と言われている凝集 $A\beta_{1-42}$ を検出することを目的として、凝集 $A\beta_{1-42}$ に対する高

感度かつ特異的なモノクローナル抗体を作製する。

【実験方法】

1. 抗原作製

1000 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、さらにオリゴマー状への凝集促進性があるとされている $A\beta_{16-20}$ を 10 mol 過剰(1436 μg)加え、16 時間 37℃で攪拌した。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、ThT 法および AFM 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。

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. 抗体作製

作製した凝集 $A\beta_{1-42}$ を抗原としてマウスに免疫した。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。マウス 1 匹に対して、抗原量 50 μl をアジュバンドと 1:1 の割合で混合し、2 週間に 1 回の頻度で免疫した。免疫したマウスの脾臓細胞をミエローマ細胞(マウス癌細胞 P3U1 株)と細胞融合し、96 ウェルプレートを用いて培養した。目的のハイブリドーマのスクリーニングには ELISA 法を用い、ハイブリドーマを樹立した。上記の免疫実験は(株)イムノ・プローブの協力を得た。

得られたモノクローナル抗体は Protein A カラムを用いて精製し、SDS-PAGE にて確認した。また、精製したモノクローナル抗体は、ELISA 法により力価評価を行った。

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

Hiroshi NAKAMURA, Takenori SHIMIZU, Takahiro AKIYAMA, Kenji SATO, Tomoe KOMORIYA, Kazuaki YOSHIMUNE 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 4.5 kDa 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。これらの結果から、 $A\beta_{1-42}$ サンプルは線維状、 $A\beta_{16-20}$ 添加サンプルはオリゴマー状に凝集していることが推測される。

2. 抗体作製

ハイブリドーマの培養上清からモノクローナル抗体の精製を行った。精製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 では還元サンプルを使用し、50 および 25 kDa 付近にバンドが検出された。一方、Lane 4-6 では非還元サンプルを使用し、150 kDa 付近にバンドが検出された。このことから、モノ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、精製した抗体を用いて ELISA 法により反応性を確認した結果を Fig. 3 に示す。Fig. 3 より、抗原濃度 50 ng/ml まで有用な吸光度が得られ、1 μ g/ml においても吸光度に有意な差が得られたので、交差率約 10% の高感度かつ特異的なモノクローナル抗体が作製できた。

【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, (2000), 21-26
- 2) WARD A. PEDERSEN et al, Amyloid beta-protein reduces acetylcholine synthesis in a cell line derived from cholinergic neurons of the basal forebrain., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **93**, (1996), 8068-8071

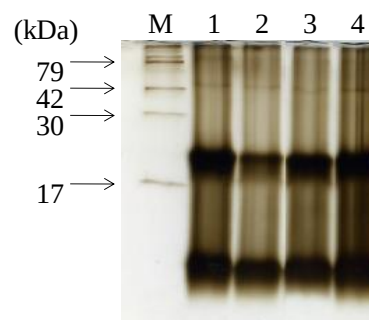


Fig. 1 SDS-PAGE による凝集 $A\beta_{1-42}$ の分子量の確認

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%

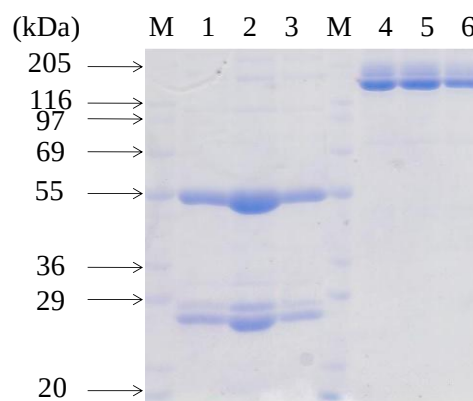


Fig. 2 SDS-PAGE によるモノクローナル抗体の精製確認

M : 分子量マーカー

Lane 1-3 : モノクローナル抗体(還元)

Lane 4-6 : モノクローナル抗体(非還元)

※ゲル濃度 : 20%

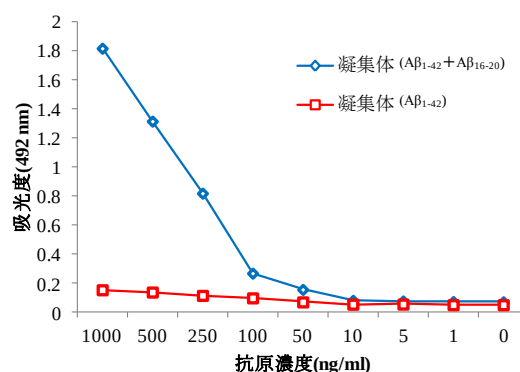


Fig. 3 ELISA 法を用いたモノクローナル抗体の力価測定