

ラジオイムノアッセイ (RIA) 法による アミロイド β プロテインの測定

松崎正晴*・茅原 紘・只左弘治

信州大学農学部生物資源科学科生物制御化学講座

*岐阜大学大学院連合農学研究科 (株) SRL

Simple Radio Immunoassay Method for Amyloid β protein

Masaharu MATSUZAKI*, Hiroshi KAYAHARA and Koji TADASA

Division of Bio-organic Chemistry, Department of Bioscience
and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shinshu University

* The United Graduate School of Agricultural Sciences, Gifu University. SRL Inc.

Summary

Antibody against amyloid β protein was raised by immunizing rabbits with synthetic peptide. Investigation of the binding pattern of antibody raised against β protein by peroxidase-labeled antibody immunocytochemistry revealed that, it is strongly positive in amyloid plaque in Alzheimer brain.

We have developed simple methods for measuring amyloid β protein. It was measured by a competitive binding radio immunoassay using standard amyloid β protein synthetic peptide consisting of 10 amino acid residues, ^{125}I labeled amyloid β protein synthetic peptide as isotope-labeled antigen, and anti-rabbit IgG goat immunoglobulins (second antibody).

Radio immunoassay permits the determination of amyloid β protein in the serum and cerebrospinal fluid within the range of 0.1-10 ng/ml. Amyloid β protein content increased in the serum of aged controls, but in the serum and cerebrospinal fluid samples tested, the data showed no significant difference between the Alzheimers patients and the other diseases.

(Jour. Fac. Agric. Shinshu Univ, 29 : 27-36, 1992)

Key words: β protein, Alzheimer, Radio immunoassay (RIA),

緒 言

アルツハイマー病 (AD) の分子生物学的解析は主に二つの神経病理学的病変に集中して

行われている。軸索斑 (neuritic plaque) や脳髄膜血管のアミロイド沈着 (老人斑) と神経原繊維変化と呼ばれるねじれた細胞骨格構成物の濃縮塊である^{1,2)}。AD 患者の脳にみられるこれらの特徴は、両方ともタンパク質性のフィラメントを含むことである。このフィラメントは神経細胞の構造を全く変えてしまうとともに神経細胞の萎縮や細胞死にも関与している。アミロイド斑の現れる頻度と AD の特徴である認識力の低下、神経細胞の消失、神経伝達の減少等の現象とはよく相関すると報告されている³⁾。 β プロテインは脳アミロイドの主要構成成分の一つとして同定されたポリペプチドであり⁴⁾、現在ではその cDNA から分子量 91,000-112,000dalton の膜タンパク様の構造をもつ前駆体の存在が明らかにされている^{5,6)}。この前駆体の mRNA は脳及び他臓器に広く発現している⁷⁾。 β プロテイン前駆体が全身で造られた後に血行性に脳に運ばれてアルツハイマー病における脳アミロイドの形成に関与しているという仮説もあり、我々は β プロテインもしくはその関連する物質の生体内における量的な変動をみる目的で、このタンパクの推定されるアミノ酸配列に相当する合成ペプチドを作製した。そして、このペプチドに対する抗体の作製を行い免疫化学的な手法の開発を、AD の診断やその病態の検索等の補助手段の一部として利用することができるのかどうかをみる目的で行った。

材料及び方法

1. 合成ペプチドの作製

β プロテインの N 端 10 アミノ酸残基 (DAEFRHDSGY) は DuPont/NEN 社の RaMPS system (Fmoc アミノ酸合成法) で合成した。抗体の作成を考えて一部のペプチドは C 末端にシステインを導入した。FMOC 合成後ピペリジンで FMOC 保護基を除去しチオアニソール、トリフルオロ酢酸にて側鎖の保護基 (OtBu, Trt, Mtr 基) の除去およびレジンからの切り出しを行った。その後水-エーテルより再結晶した後 ODS カラムにより精製した。合成ペプチドは逆相高速液体クロマトグラフィー (ODR カラム) で精製した。合成ペプチドの確認はガスマスとアミノ酸シーケンサーによって行った。

2. 合成ペプチドに対する抗体の作製

ペプチドと抗体として用いた Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) (SIGMA 社製) を架橋剤としてグルタルアルデヒドおよび C 末端の Cys 残基を介する N- (m-マレイミドベンゾイルオキシ) サクシンイミド (MBS) (PIERCE 社製) を用いて常法どおり架橋させ⁸⁾、ウサギに Freund's Complete Adjuvant と共に皮下に免疫した。2 週間隔で 10 回の免疫を行った後全採血した。

3. 抗体の力価、特異性および RIA 測定系

合成ペプチドは N 末端より 10 番目に Tyr 残基を有するためラクトパーオキシダーゼ法でペプチドを ¹²⁵I 標識した⁹⁾。この標識抗原に対する結合率を求めて抗血清の力価とした。また、抗体による脳の免疫組織染色を行い抗体が AD 患者脳の老人斑を特異的に染色することで抗体の特異性を求めた。

用いた材料は Senile Dementia of Alzheimer's Type (SDAT) のアンモン角で免疫組織化学の方法は表 1 に示したとおりである。

表 1. 抗 β プロテイン免疫組織化学の手順

1	脱パラ—流水—90%蟻酸10min 処理—流水—Tris Buffer Saline(TBS)
2	10%Normal Human Serum(NHS)30min
3	洗 浄 (TBS) 3回
4	抗 β プロテイン抗体 (ウサギ) 1:250 1:500 1:1000 1:2000
5	洗 浄 (TBS) 3回
6	Biotin 化抗ウサギ IgG(Vector 社製 ABC キット)50min
7	洗 浄 (TBS) 3回
8	Avidin DH-Biotin 化 Peroxidase(Vector 社製 ABC キット)60min
9	洗 浄 (TBS) 2回
10	洗 浄 Tris Buffer(TB)
11	0.05%3,3'-Diaminobenzidine (DAB)-0.01% H_2O_2 -TB
12	洗 浄 (水)
13	ヘマトキシリン染色
14	脱 水
15	封 入

β プロテインの定量は RIA 二抗体法を用いた。標識抗原と一次抗体 (抗 β プロテイン抗体; ウサギ) の結合に対しサンプル中の抗原を競合させ、二次抗体 (抗ウサギ IgG) で一次抗体と結合した標識抗原を沈降させそのカウントを求め、標準物質の濃度からサンプル中の抗原量を求めた。標準物質には合成ペプチドを用いた。

4. 血清および髄液

健常者の血清はボランティアより、各種疾患患者の血清、髄液は SRL 社へ免疫、生化学的検査依頼のあった残分を用いた。痴呆の鑑別は CT scan その他により行った。

結 果

1. 合成ペプチドの結果

精製されたペプチドは液クロ上で単一の成分として分離され、その分子量はガスマスにより理論値 (1369.39) と一致した。合成ペプチドのアミノ酸配列は ABI 社477A で求め、正しく合成されていることを確認した。

2. 抗体の諸性質

抗体の力価は¹²⁵I 標識抗原との結合率をみたところ、MBS 架橋によって作製された免疫源では10,000倍でも使用しうる抗体が作製されたが、グルタルアルデヒドで架橋した免疫源の方は2,000倍程度の希釈までしか抗体価が上昇しなかった。MBS 架橋の免疫源によって作製された抗体を用いての免疫組織化学の結果を図 1 に示した。抗 β プロテイン抗体は SDAT 患者脳の老人斑を特異的に染色した。なお免疫組織化学で使用しうる抗体の希釈倍率は2,000倍希釈で用いた。

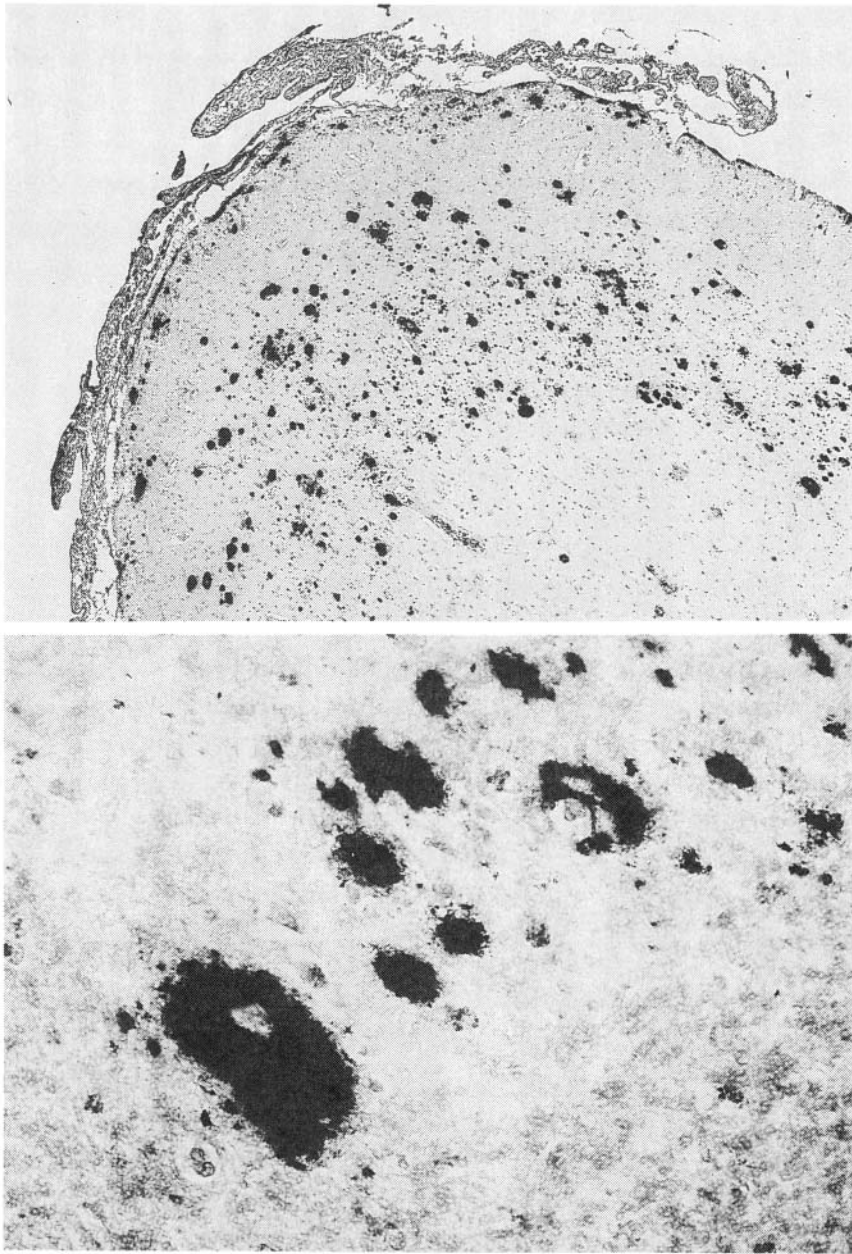


図1. 抗ペプチド抗体によるSDAT患者脳の免疫組織染色
(上; 20倍, 下; 200倍)

3. RIA 測定系

(1) 標識抗原の作製

抗原をラクトパーオキシダーゼで標識した後, 標識物と未標識の NaI^{125} を SephadexG-25

により分離した。そのゲル濾過パターンを図2に示した。標識抗原は更に Sepharose CL6B に吸着させた後 NaCl によって溶出させたフラクションを用いた。(図3)。

(2) βプロテイン RIA

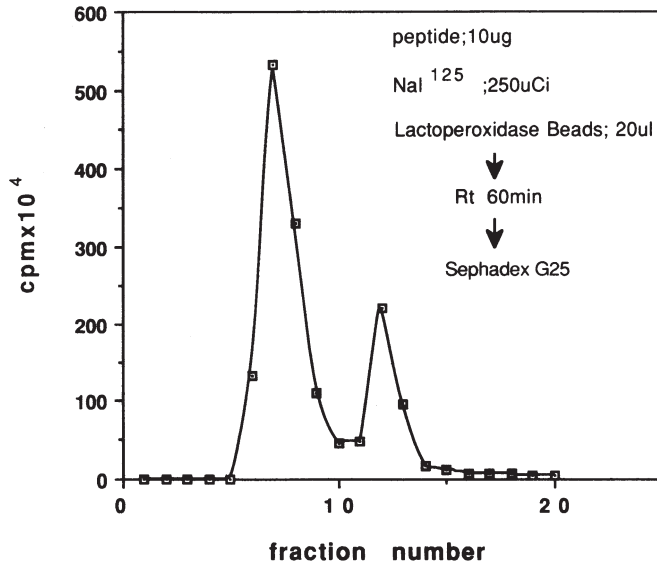


図2. 合成ペプチドの ¹²⁵I 標識パターン

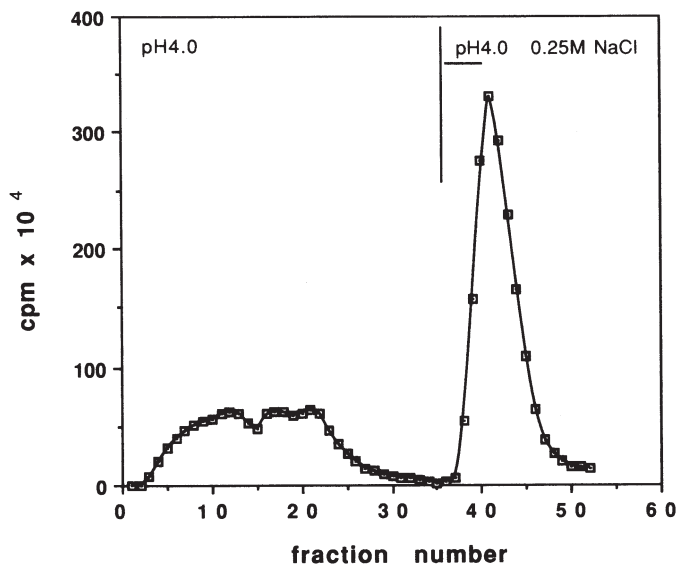


図3. 標識抗原の Sepharose CL6B による精製

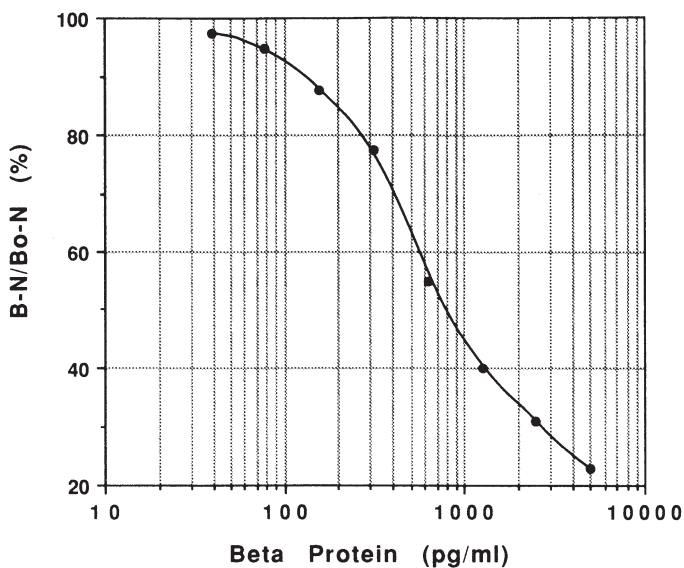


図4. β プロテイン RIA における標準曲線

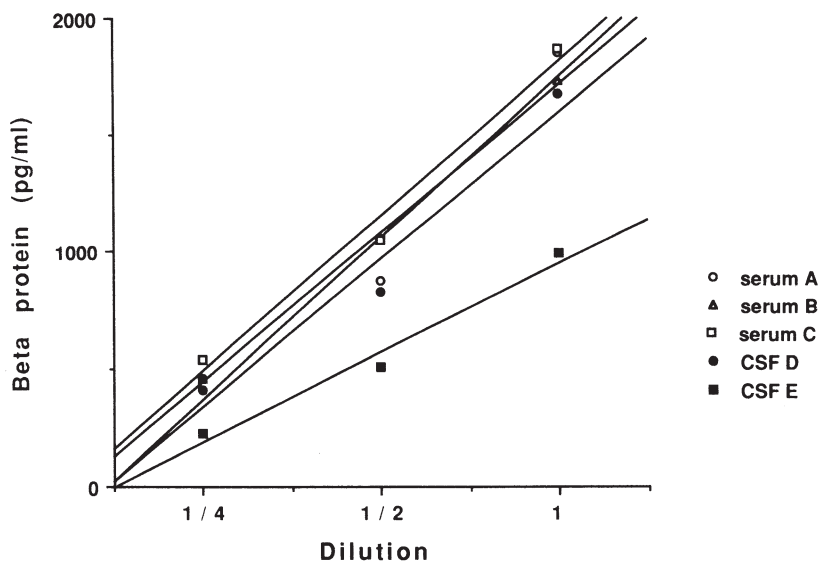


図5. β プロテイン RIA 測定系の希釈試験

RIA に使用する抗体の濃度, Buffer の組成, 反応条件等の検討を行った結果以下に示した条件が最適であった。

抗体：終濃度で抗血清を10,000倍希釈

スタンダード：合成ペプチド (DAEFRHDSGY-C) を用いた。

HOT：アッセイチューブあたり10,000cpm (約80pg 相当) を用いた。

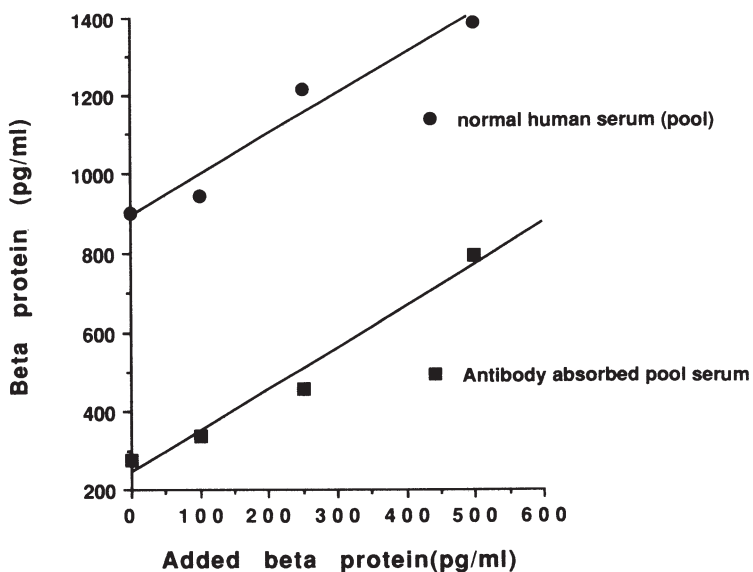


図6. βプロテイン RIA 測定系の添加回収試験

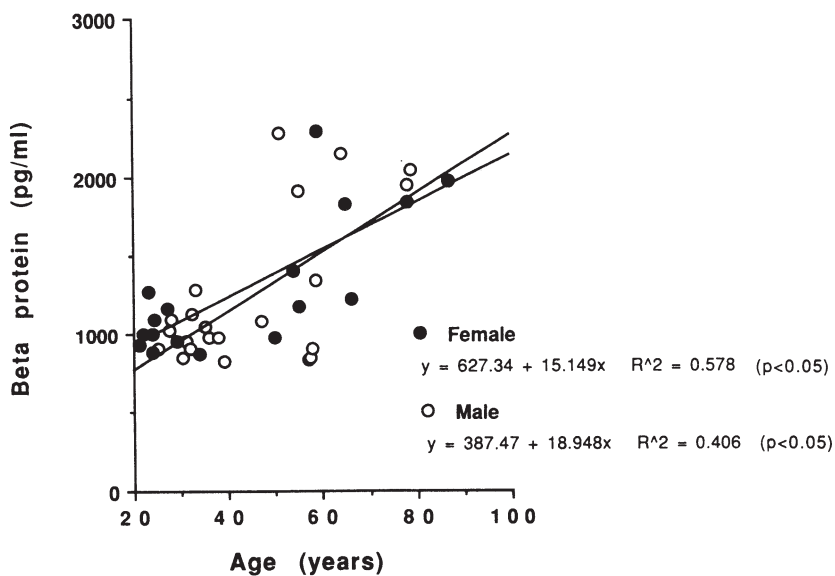


図7. 健常者血清中のβプロテインの定量

Buffer : 50mM トリス緩衝液 pH8.0 1% BSA 1% EDTA 0.01% NaN₃

反応条件 : Competitive RIA (4°C 18hrs)

B/F分離条件 : 二抗体法

この条件下の RIA による標準曲線を図4に示した。本測定系の測定範囲は合成ペプチドを標準スタンダードとしたとき0.1-10ng/mlであった。

表2. 各種疾患患者血中, 髄液中の β プロテイン

No.	診 断 名	年 齢	性 別	β protein (pg/ml)	
				血 清	髄 液
1	SDAT	75	F	661	480
2	SDAT	82	F	388	324
3	SDAT	66	F	556	532
4	SDAT	69	F	341	403
5	SDAT	74	M	520	nd*
6	SDAT	86	M	448	nd*
7	アルツハイマー病	83	F	1650	nd*
8	アルツハイマー病	74	F	nd*	720
9	運動ニューロン疾患	61	M	1100	400
10	脊髄小脳変性症	56	M	487	380
11	脊髄小脳変性症	63	F	516	434
12	脳血管性痴呆	74	F	426	210
13	脳血管性痴呆	70	M	325	230
14	パーキンソン病	67	F	650	445
15	脳 梗 塞	70	M	680	980
16	脳 梗 塞	72	M	1160	748

この測定系での血清, 髄液の希釈試験, 添加回収試験の結果を図5および図6に示した。異なる血清A, B, C (いずれも健常高齢者) とこれらの血清をプールしたもの, および異なる髄液D, E (ともにAD患者の髄液) を用いた希釈試験, 添加回収試験はともに良好な結果であった。

そこで性別, 年齢別血清および各種疾患での血清中, 髄液中の β プロテインの測定を行った(図7, 表2)。サンプルはそのままの状態であsseyし, 特に抽出等の前処理は行わなかった。この結果, 健常者でも加齢とともに血清中の β プロテインの濃度が上昇する傾向が認められた($p < 0.05$)。また血清中, 髄液中の β プロテイン濃度はAlzheimer病やSDAT患者で他疾患に比べて特に高値を示す傾向は認められなかった。しかしSDAT, AD患者と脳血管性痴呆(2例)を比較すると, 脳血管性痴呆では髄液中の β プロテイン濃度は低かった。

考 察

我々の行った実験結果からは限られたサンプル数であるが, 健常高齢者に比べてAD, SDAT患者の血清中で有意に高い濃度の β プロテインを検出することは出来なかった。髄液に関しては健常者でのサンプルが得られないため他疾患との比較をおこなったが, 特にAD, SDAT患者で高値を示す傾向は認められなかった。この限りにおいては血清中 β プロテインの測定は当初の目的を達成するものではないが, β プロテインが血清中や髄液中に存

在しておりその測定が可能であることは今後の新しい知見に発展するものと期待している。特に、血清中での β プロテイン（血小板由来のものと考えられる）は髄液中よりも高値をとることから、全身性に発現された β プロテインおよびその前駆体が脳に運ばれて脳アミロイドの形成に関与するものかどうかを検討するうえでこの測定は有用と考えられる。特に臨床診断上アルツハイマー型痴呆と脳血管性痴呆の鑑別は困難であるが、髄液中の β プロテインの測定はこの鑑別に有用であるかもしれない。今後さらに例数を増やして検討を行いたい。

ここで使用した抗体は β プロテインのN端の10アミノ酸残基のペプチドに対するものであり、血清中や髄液中で測定されるものがどの程度の大きさのものなのかは明らかではない。また、しばしば問題とされるIgGに関しては検討の結果、本測定系には交差しないことが判明しているが、抗体で捕えられているものが β プロテイン以外にもあるのかも気になるところである。本測定系によって示される測定値についての検討を反応条件を変えて行った結果（競合RIAと非競合RIA）では、表示される値に変化はなかった。この結果より、血清中、髄液中で β プロテインとして定量される値は、非特異的に測定系を妨害するような物質である可能性は少ないと考えられる。

血中 β プロテインの測定結果は、全身で合成された β プロテイン前駆体あるいはその代謝産物が血中に放出された可能性を示唆する。さらにアルツハイマー病と血液脳関門の破壊との関連を考えると、血清中や髄液中で β プロテインを測定することは今後も興味のある研究と思われる。しかしその一方で、健常高齢者の脳にも見られるものを痴呆の原因と捕えることが可能かどうか、このような物質の測定が臨床診断上有用なのかという疑問もある。

我々は β プロテインについて、その脳への集積がアルツハイマー病の「原因に近い結果」ではないかという考えで β プロテインの測定を行っていきたいと考えている。しかし前駆体タンパクからのいろいろな代謝を考えるとその関連する分子の存在様式をよく知ることが更に重要であると考えられる。そのため β プロテインの上流部分のペプチドに対する抗体を用いて前駆体タンパクの測定も行いたい。

謝 辞 SDAT 患者脳による免疫組織化学を行って頂いた東京都精神医学総合研究所諸治先生、羽賀先生に深謝いたします。

要 約

β プロテインのN末端より10アミノ酸残基の合成ペプチドを合成した。11番目にシステインを導入したものとKLHを結合させた後ウサギに免疫し抗体の作製を行なった。抗体はSDAT患者脳の老人斑を特異的に免疫染色した。そこで合成ペプチドを用いて ^{125}I 標識ペプチドを調整しRIA測定系の開発を行った。

このRIA法は血清や髄液中で0.1-10ng/ml濃度の β プロテインの定量が可能であった。本法を用いて健常者血清中の β プロテインを測定したところ、加齢に伴って血中の β プロテインが上昇する傾向が認められた。アルツハイマー患者と他疾患で血清中、髄液中 β プロテインの定量を行なった結果からは有意な差は認められなかった。

引用文献

- 1) Kidd, M: Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer' s disease, *Nature*, **197**, 192-193,1963
- 2) Terry, R. D: The fine structure of neurofibrillaiy tangles in Alzheimer' s disease, *J. Neuropathol. Exp. Neurol*, **22**, 629-641,1963
- 3) Perry, E. K. Tomlinsos, B. E. Blessed, G. Bergmann, K. Gibson, P. H. and Perry, R. H: Correlation of cholinergic abnormalisies with senile plaques and mental test scores in senile dementia, *Br. Med. J*, **2**, 1457-1459,1978
- 4) Glenner, G. G. and Wong, C. Wh: Initial report of purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein, *Biocher. Biophys. Res. Commun*, **120**, 885-890,1984
- 5) Kang, J. Lemaire, H. G. Unterbeck, A. Salbaum, J. M. Masters, C. L. Grzeschik, K. H. Multhaup, G. Beyreuther, K. and MullerHill, B: The precursor of Alzheimer' s disease amyloiduA₄ protein resembles a cell-surface receptor, *Nature*, **325**, 733-736,1987
- 6) Kitaguchi, N. Takahashi, Y. Tokushima, Y. Shiojiri, S. and Ito, H: Novel precursor of Alzheimer' s disease amyloid protein shows prote-ase inhibitory activity, *Nature*, **331**, 530-532, 1988
- 7) Tanzi, R. E. McClatchey, A. I. Lamperti, E. D. Villa-Komaroff, L. Gusella, J. F. and Neve, R. L: Ptotease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer' s disease, *Nature*, **331**, 528-530,1988
- 8) O' Sullivan, M. J. Gnemmi, E. Morris, D. Chieregatti, G. Simmonds, A. D. Simmons, M. Bridges, J. W. and Marks, V: Comparison of methods of preparing enzyme-antibody conjugates: application of conju-gates for enzyme immunoassay, *Anal. Biochem*, **100**, 100-108,1979
- 9) Miyachi, Y. Vaitukaitis, J. L. Nieschlag, E. and Lipsett, M. B:Enzymatic radioiodination of gonadotropins, *J. Clin. Endocr. Metabol*, **34**, 23-28,1972