

抗メダカビテログニンモノクローナル抗体の樹立とその特性

○西川智浩¹、丸尾直子²、鰐迫典久¹、白石寛明¹、森田昌敏¹

(¹ 国立環境研究所、² 東ソー(株))

目的 卵黄タンパク前駆体ビテログニン (VTG) はエストロゲンによって合成が誘導されることから、エストロゲン様活性を評価する指標として注目されている。VTG の定量は一般的に ELISA 法によって行われているが、ELISA 法には抗原に特異性の高い抗体が必要となる。そこで、本研究では、一般的な試験魚であるメダカの VTG モノクローナル抗体を樹立しその特性を検討した。

方法および結果 成魚雄メダカにエストラジオールを 1mg /g 含むテトラフィンを 1 週間投与して VTG 合成を誘導した。腹水から POROS-HQ カラムにより VTG 各分を分離精製後、PBS に溶解し等量のフロインドアジュバントとエマルジョンを調製してマウス (BALB/c メス 6 週齢) に 14 日ごとに 3 回免疫した。このマウスの脾臓細胞とミエローマ細胞をポリエチレングリコール法で融合したのち、HAT 選択培地でハイブリドーマを培養した。抗原に特異性の高い抗 VTG 抗体を産生するハイブリドーマを選択した後、雄の全身および肝臓ホモゲネート、血清に反応しない独立した複数のクローン株 (MVP25、MVP47、MVP49、MVP51) を樹立した。得られたモノクローナル抗体を使ってウェスタンブロット解析を行った結果、これらの抗体は E2 曝露雄あるいは産卵期の雌において血中に誘導されるビテログニンおよびその分解物と思われるいくつかのフラグメントと反応すること、また、すべてのモノクローナル抗体のエピトープがリポビテリンの重鎖 (VTG の N 末端約 120kDa) に存在することが示された。これらのモノクローナル抗体を用いて、ELISA 法によりメダカ VTG の ELISA 法の構築を検討したところ、MVP25-MVP47 系および MVP47-MVP49 系などにおいて VTG の測定が可能であることが示され、MVP25-MVP49 系では測定系は構築できず、MVP25 と MVP49 は同一あるいは近傍のエピトープを認識していると考えられた。

Establishment and Characterization of Medaka Vitellogenin Monoclonal Antibodies

○Tomohiro Nishikawa¹, Naoko Maruo², Norihisa Tatarazako¹, Hiroaki Shiraishi¹, Masatoshi Morita¹ (¹National Institute of Environmental Studies, ²TOSOH Corporation, Japan)

We established Medaka (*Oryzias latipes*) vitellogenin (VTG) monoclonal antibodies for ELISA application. Medaka was fed by 1mg 17 β -estradiol/g tetrafin for seven days to collect ascite fluids containing VTG. After purification of VTG using POROS-HQ column chromatography, VTG in PBS was mixed with equal volume of Freund's adjuvant and mice (6 weeks BALB/c females) were immunized 3 times per every 14 days. Spleen cells from immunized mouse and myeloma cells were fused using polyethylene glycol, then hybridoma cells were subjected to HAT selection. Hybridoma producing monoclonal antibodies specific to Medaka VTG were selected and four clones (MVP25, MVP47, MVP49, MVP51) were established, of which these four monoclonal antibodies did not show any reactivity to male blood and whole body and liver homogenates. Western blot analysis revealed that each of these antibodies recognized lipovitellin heavy chain (120kDa protein existed in VTG N-terminal region) as an epitope. It was possible to construct sandwich ELISA system for Medaka VTG using MVP25-MVP47 or MVP47-MVP49, but not MVP25-MVP49, indicating MVP25 and MVP49 bind the same or near epitope.