

ボラビテロジェニンに対するモノクローナル抗体の作製

尾田 典久¹、平井 政彦¹、藤野 博良¹、天野 春菜²、原 彰彦²

¹片山化学工業㈱、²北大院水

【目的】 ビテロジェニン(Vg)は魚類などの卵生脊椎動物の卵黄蛋白前駆物質であり、エストロジェンの刺激により肝臓で合成され血中に分泌される雌特異血清蛋白質である。Vg は通常にはない雄及び未成熟雌魚でも、エストロジェン刺激により誘導されることから、血中 Vg が外因性エストロジェン様物質（環境エストロジェン）の影響を評価する生物指標（バイオマーカー）となっている。魚類におけるこれまでのエストロジェン様物質に関する影響試験及び調査では、ニジマス、コイ、キンギョ及びメダカを用いた例が多い。一方、ボラ類は広い分布域を有し、清浄海域から汚染海域まで生息可能で、水質・底質の影響を受けやすく、採捕にあたっては河川下流部、内湾河口域、沿岸域等にてサンプリングが容易な魚種である。そこで本研究では、ボラに注目しボラ Vg に反応する特異的なモノクローナル抗体を作製し、その性状を解析した。

【方法】 免疫抗原として、成熟ボラ雌血清よりハイドロキシルアパタイトカラム及びゲル濾過法により分離精製した Vg、成熟卵より精製した Vg 構成タンパクであるリポビテリン(Lv)、並びに卵より調製した egg extract(EE)を用いた。これら抗原を BALB/c マウスに免疫し、マウス血清中の抗体価が十分上昇したことを確認した後、マウス脾細胞とマウスミエローマ細胞をポリエチレングリコール法にて融合しハイブリドーマを作製した。抗原に特異性の高いボラ Vg に反応する抗体を産生するハイブリドーマを選択した。

【結果・考察】 得られたクローンは 4 種類であった。モノクローナル抗体のアイソタイプは、3 種が IgG1 であり、1 種が IgM タイプであった。各抗体を用いてウェスタンブロット解析を行い、Vg、Lv、EE、雄血清及び成熟雌血清との反応性を観察した。その結果、雄血清とは反応は見られなかったが、Vg、Lv 及び雌血清との反応では、認めるバンドに差が観察された。以上の結果より、ボラ Vg に特異的反応を有するモノクローナル抗体が作製され、ELISA 測定系への利用が可能であることを確認した。

Establishment of monoclonal antibodies reacted to mullet vitellogenin

¹ Norihisa Oda, ¹ Masahiko Hirai, ¹ Hiroyoshi Fujino, ² Haruna Amano, ² Akihiko Hara

¹ Katayama Chemical Industries Co., LTD, Japan,

² Graduate School of Fisheries Science, Hokkaido University, Japan

Recently fish vitellogenin (Vg), an estrogen-induced female-specific serum protein, has been used as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. In this study, we focused on generation of the monoclonal antibody that reacted with Vg of mullet, living variety of aquatic habitats all over the world. Mice were injected with three antigen, purified mullet Vg, lipovitellin and egg extracts. The hybridoma colonies were screened for Vg cross-reactivity using an antibody capture ELISA against purified Vg and female serum. Four kinds of colonies were obtained. Isotypes of these antibodies were IgG1 and IgM class. Three monoclonal antibodies (IgG1 class) were useful in the establishment of an ELISA for mullet Vg.