骨形成を誘導する新規合成ペプチドに対するマウスモノクローナル抗体の作製とその評価

○高永和也

キーワード：再生療法、硬組織形成、抗体作製

【目的】エナメルマトリックスデリバリーティプ（EMD）をラット背部に皮下注射すると軟骨が形成され、その周囲には多数の好酸性円形細胞（好酸体）が観察される。好酸体を解析したところ、アメロジェニン・エクソン8の部分配列をもつペプチドであることと判明した。この部分配列からなるペプチドを人工的に合成（新規合成ペプチド）し、ラット背部に皮下注射すると骨形成および軟骨内骨化が認められた。今回、新規合成ペプチドの動態を観察するため、モノクローナル抗体の作製とその評価を行った。

【材料および方法】Balb/cマウスを用い、フットパッド法による短期間免疫・継続投与法で新規合成ペプチドに対するハイプリドーマを得た。ハイプリドーマの培養上清を利用してELISAおよび免疫染色による反応性評価ののち、限界希釈法によるクローニングを行った。最終的には、好酸体と反応する9種のハイプリドーマから1種を選択し、産生される抗体のサブクラスを同定後、ヌードマウスによる薬理作用。Protein G-SepharoseによるIgG精製を行い、抗体の純度評価のために、12.5%ポリアクリルアミドゲルによるSDS-PAGEを行った。また、EMDを皮下注射したラット背部組織に対し精製抗体を用いて免疫染色を行った。

【結果および考察】精製抗体のSDS-PAGEでは、約50kDaと約28kDaのバンドがみられ、抗体はIgGであることが判明した。EMDを皮下注射したラット背部組織の免疫染色では、背部組織に存在する粘液状のEMDおよび好酸体に陽性像を認めた。