

IIA-9

特異的ポリクローナル抗体の低コスト・短時間作製法

若山友彦¹⁾、加藤将夫²⁾、辻彰²⁾、井関尚一¹⁾
 金沢大学¹ 大学院医学系研究科 組織発達構築学、
 大学院自然科学系研究科 薬学系 創剤科学

IIA-10

三次元コラーゲンゲル培養法を用いた毛細血管損傷モデル作成 - メスならびにレーザーマイクロダイセクションによる血管損傷実験 -

藤田恵子¹、田中嘉代子²、小松久美子²、村井則子²、
 松本幸子²、永島雅文¹、穂田真澄²
 埼玉医科大学 解剖学教室¹
 埼玉医科大学 中央研究施設 形態部門²

【目的】免疫組織細胞化学を行うためには、特異的に目的の物質を認識する抗体が必要である。一般に、抗体の作製には多くの時間と費用を要する。我々は、低成本で短時間に特異的なポリクローナル抗体を作製する方法を考案したので報告する。

【方法】免疫動物に10週齢の雌のWistarラットを用いた。マウスc-kitの抗原として、特異的なアミノ酸配列(15アミノ酸残基)を選び、これに対応するオリゴヌクレオチドDNAを合成し、この両端に制限酵素配列を付加した。合成DNAをアニーリングして2本鎖にし、制限酵素で切断した発現ベクターに結合し、蛋白発現用の大腸菌を形質転換した。大腸菌に発現させた蛋白は融合蛋白として産生されるので、これを精製して抗原に用いた。抗原蛋白をアジュバントと混ぜ、ラットの後肢足蹠の皮内に注射した。免疫後2週間目に1度だけ追加免疫し、3週間目に全採血して血清を得た。

【結果と考察】抗原として合成オリゴペプチドを用いる場合、抗原の取得に少なくとも2~3週間必要で、費用もかかる。また、抗原として蛋白質全長を大腸菌に産生させる場合、抗原に適した可溶性蛋白は得にくい。本研究の方法に従うと、オリゴヌクレオチドDNAの設計から1週間以内で抗原を得ることができ、その蛋白も可溶性であった。一方、免疫の2週間後に少量採取した血清を用いた免疫組織化学により、100~200倍希釈でマウス精巣の精祖細胞とライディッヒ細胞に免疫反応を確認できた。さらに、追加免疫後1週間目の採血では、800~1000倍希釈でも同様の結果を得ることができた。この抗体はラットポリクローナル抗体であり、市販のマウスやウサギの抗体との2重染色も可能である。この方法は、特異抗体の低成本・短時間作製方法となりうることがわかった。

【目的】三次元コラーゲンゲル培養法により大動脈片を培養すると、大動脈片から毛細血管様チューブが新生される。メスあるいはレーザーマイクロダイセクション(LMD)を用いて、コラーゲンゲル内に新生した毛細血管を顕微鏡下で切断した後の細胞動態ならびに創傷治癒に関連する遺伝子発現について調べた。今回はとくに血管新生促進因子である FGF-2 とその調節にかかわる転写因子である early growth response gene-1 (Egr-1) の発現について検討した。

【材料と方法】成熟マウスの胸大動脈をコラーゲンゲル内で包埋培養し、10日後、新生毛細血管を顕微鏡下でメスにより切断した実験群あるいは PALM レーザーマイクロダイセクション(窒素レーザー；パルス方式、337 nm)を用いて切断した実験群を作成した。毛細血管切断前後に位相差顕微鏡と電子顕微鏡により観察した。さらに、切断前、切断後 30 分、90 分、18 時間後に、毛細血管および遊走細胞から total RNA を抽出し、cDNA に変換、リアルタイム定量 PCR 法により FGF-2 および Egr-1 の遺伝子発現を検討した。

【結果と考察】メス切断実験群、LMD 切断実験群のいずれにおいても毛細血管切断箇所へのマクロファージの遊走が認められた。また、両実験群で Egr-1 の発現は切断後 90 分で増強し、その後減少するのに対して、FGF-2 の発現は Egr-1 減少後も認められた。LMD 切断実験群では熱による影響を考慮に入れなければならないが、局所的な毛細血管の切断が可能である。Egr-1 は血管傷害時に一過性に発現が認められ、血管損傷によって発現が誘導される遺伝子群の共通の調節因子であると考えられており、本モデルは血管損傷後の細胞動態、さらには創傷治癒の機序の解析に有用なモデルとなり得ると思われる。