

キュウリ緑斑モザイクウイルス(スイカ系)に対するIgMおよびIgG特異抗体の産生様式

誌名	日本植物病理學會報 = Annals of the Phytopathological Society of Japan
ISSN	00319473
著者名	松本, 勤
発行元	日本植物病理學會
巻/号	47巻5号
巻号補足	
掲載ページ	p. 611-617
発行年月	1981年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター

Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



キュウリ緑斑モザイクウイルス（スイカ系）に対する IgM および IgG 特異抗体の産生様式

松本 勤*

Tsutomu MATSUMOTO*: The Mode of Formation of IgM and IgG Antibodies to Cucumber Green Mottle Mosaic Virus (Watermelon Strain) in Rabbits

Abstract

The relative activities of IgM and IgG antibodies against cucumber green mottle mosaic virus-watermelon strain (CGMMV-W) in rabbits were examined by complement fixation test at different stages during the course of immunization. The immunogen was administered at one week intervals by three different methods; intramuscular injection with Freund's complete adjuvant, intravenous injection with PolyA•PolyU as adjuvant and intravenous injection without adjuvant. Regardless of the immunization methods used, the antibody activities of IgM and IgG fractions were almost the same, and/or the IgM antibodies were a little less on the third week after the first injection. Later on the fourth week, as the activity of IgG increased, that of IgM markedly declined or was not detected. These results thus suggest that early bleeding at 3 weeks after the first injection would produce relatively more specific IgM antibodies by intravenous injection, whereas late bleeding after hyperimmunization is better for the IgG antibodies against CGMMV-W.

(Received May 6, 1981)

緒 言

近年、幾つかの植物ウイルスについてIgMとIgG抗体の反応性が研究され、特異抗体がいかなる免疫グロブリンクラスに属するかが報告された^{1-4,8,11,17,22,23}。特に、Bercks ら（1974, 1976）は異種ウイルス間またはウイルス系統間の交叉反応について研究し、供試ウイルスとそれらに対する抗体の組み合わせによって特異抗体がIgMに属する場合、IgGに属する場合、あるいは両方の免疫グロブリンクラスに属する場合であることを明らかにした^{4,17}。このことは、今後、研究目的によっては、IgMとIgG抗体を使い分けるべきであることを示唆しており、そのためには、植物ウイルスに対するIgMとIgG抗体の産生の特徴を明らかにして、必要とする免疫グロブリンクラスをより多く調製する免疫方法を研究する必要がある。しかしながら、植物ウイルスでは、免疫グロブリンクラスレベルにおける抗体産生の推移についてのくわしい報告はき

わめて少ない^{1,3,23}。そこで本研究では、キュウリ緑斑モザイクウイルス-スイカ系（CGMMV-W）に対する抗体を免疫方法をちがえてウサギに産生せしめ、免疫過程におけるIgMとIgG抗体の活性の変化を比較した。その結果、IgMまたはIgG特異抗体をより多く調製するための免疫方法ならびに免疫開始後の採血時期を明らかにすることができたので報告する。

本研究を行うにあたり、CGMMV-Wの接種源を分譲して下さった農林水産省植物ウイルス研究所栃原比呂志博士に感謝の意を表する。また、実験に協力していただいた元当短大学生、佐藤憲保ならびに川越政美の両氏に御礼申し上げる次第である。

実験材料および方法

精製ウイルスの調製 CGMMV-Wはスイカ（品種、綺王）に汁液接種して増殖させた。罹病葉は、接種後、15～20日目に収穫し、ウイルスの精製材料として使用するまで-20℃で凍結保存した。ウイルスの精

* 秋田県立農業短期大学 Akita Prefectural College of Agriculture, Ohgata-mura, Akita-ken 010-04, Japan

製はつぎの手順で行った。罹病葉の生体重に対し、0.2%アスコルビン酸ならびに 0.005M Na-EDTA を含む 0.1M 磷酸緩衝液 (pH 7.3) を 2 倍量加えて磨砕し、2 枚重ねのガーゼを用いて搾汁した。この搾汁液は熱処理 (60°C で 10 分間) とクロロホルム・ブタノール処理 (汁液の 1/2 量加えて 15 分間攪拌) によって清澄化され、つぎにポリエチレングリコール 6000 (PEG # 6000) を 3% と NaCl を 0.2% の濃度になるように加えて 2 時間攪拌し、低速遠心 (3,000 回転, 15 分間) によってウイルスを沈殿させた。沈殿させたウイルスは適量の 0.01M 磷酸緩衝液 (pH 7.3) を加えてとかし、超遠心分離機 (International/B-60) を用いて、 $10,000 \times g$ で 15 分と $100,000 \times g$ で 60 分の分画遠心を 2 回くり返してウイルスを精製した。精製ウイルスは使用時まで -20°C で凍結保存し、抗原として使用した。

免疫方法 供試動物には体重 2.5~3kg のウサギ (日本白色種) を使用した。筋肉注射による免疫方法では、ヤトロン社製の Freund's complete adjuvant (FCA と略記) を免疫補助剤として用い、0.5ml の各濃度のウイルス抗原 (2mg/ml, 10mg/ml, 40mg/ml) に等量の FCA を加え、よく混合してから大腿部に筋肉注射した。静脈注射による方法では、筋肉注射の場合と同じウイルス抗原量に等量の Poly A・Poly U (2mg/ml) を免疫補助剤として混和して耳の静脈に注射した。なお、Poly A・Poly U の合成は等重量の Poly A と Poly U (Miles 社製) を別々に 0.15M NaCl にとかし、つぎに両者を混合して 100°C , 10 分間熱処理した後、室温で徐々に冷して調製した²⁰⁾。免疫補助剤を使用せずに、ウイルス抗原のみでウサギを免疫した時は耳からの静脈注射によった。なお、いずれの免疫方法においても、注射は、1 週間間隔で行い、得られた抗血清は 56°C , 30 分間の非動化の後、使用時まで -20°C で凍結保存した。

セファデックス G-200 カラムクロマトグラフィーによる免疫グロブリンクラスの分画 内径 2.64cm × 高さ 30cm のカラムを使用し、1ml の抗血清をカラムにのせて室温で分画した。溶出液は 0.02% の NaN_3 を含む 0.15M NaCl-0.05M 磷酸緩衝液 (pH 7.3) を用い、溶出速度は 5ml/hr で行った。溶出した液は 3ml ずつ試験管に集め、各分画における波長 280nm の吸光度と抗体活性を測定した^{7,12)}。

抗体活性の測定 免疫中の経時的な抗体価の変化は簡便な重層法によって調べた。反応は内径 3mm の小試験管を用いて 37°C の湯浴中で 15 分間行い、抗原と抗血清との境界に生ずる沈降物の有無で反応の結果を

判定した。なお、反応に用いたウイルス抗原の濃度は 0.1mg/ml である。

免疫グロブリンクラス (IgM ならびに IgG) の抗体活性は補体結合反応によって測定した。すなわち、0.1ml の抗血清に 0.1ml のウイルス抗原 (0.01mg/ml) を加え、さらに 0.2ml の補体 (2 単位) を加えてから、これを 4°C で一夜放置する。翌朝これに溶血素 (3 単位) によって感作したヒツジ赤血球浮遊液 (1.25%) を 0.2ml 加えてよく混和し、 37°C で 30 分間反応させた²⁴⁾。反応の判定は反応後の遠心上清中のヘモグロビン分光光度計によって測定する方法によった¹²⁾。

実験結果

免疫方法を異にした抗 CGMMV-W 抗体の産生

異なる免疫方法によって抗 CGMMV-W 抗体を産生せしめ、経時的に抗体価を測定して免疫方法のちがひによる抗体産生の特徴を比較した。

ウイルス抗原と FCA の懸濁液を 1 週間間隔で筋肉

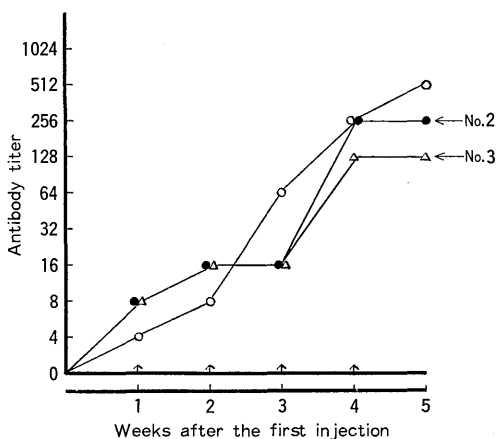


Fig. 1. Patterns of antibody formation to cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV-W) by immunizing with intramuscular injections. At points indicated by arrows, five rabbits received 20mg (○), 5mg (●) or 1mg (△) of antigen emulsified with an equal volume of Freund's complete adjuvant. Antibody titers were determined by the precipitin ring test using 0.1mg/ml of the purified virus as antigen, and expressed as reciprocal dilution of antiserum.

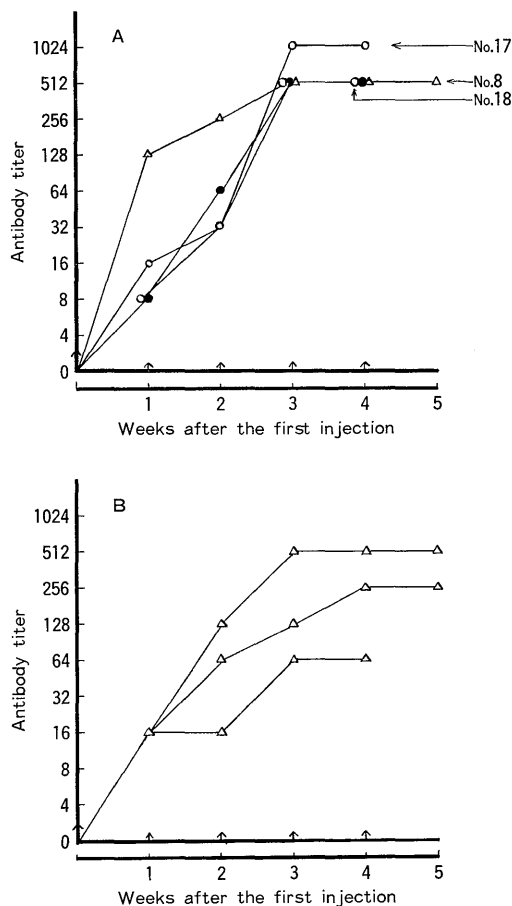


Fig. 2. Patterns of antibody formation to CGMMV-W by immunizing with intravenous injections.

A: At points indicated by arrows, six rabbits received 20mg (○), 5mg (●) or 1mg (△) of antigen containing 1mg of poly A·poly U as adjuvant.

B: Three rabbits received 1mg (△) of antigen without poly A·poly U. Antibody titers were determined as described in Fig. 1.

注射したウサギでは、免疫開始後2～3週間目までは抗体価が緩やかに上昇し、その後急上昇する傾向が認められた。また、最高抗体価に達するまでの時間は4～5週間であった (Fig. 1)。なお、この実験には Fig. 1 に示したウサギの他に2頭のウサギを供試した。最高抗体価は512倍 (1頭)、256倍 (1頭)、128倍

(2頭)ならびに32倍 (1頭)であった。

一方、ウイルス抗原に Poly A·Poly U を免疫補助剤として混ぜて1週間間隔で静脈注射したウサギでは、免疫開始後1週間目から連続して抗体価の上昇が認められ、3～4週間目で最高抗体価に達した (Fig. 2-A)。この実験においても図に示したウサギの他に2頭のウサギを供試した。最高抗体価は1024倍 (1頭)、512倍 (3頭)、256倍 (1頭)ならびに128倍 (1頭)であった。なお、免疫補助剤として用いた Poly A·Poly U に対する抗体は検出されなかった。

ウイルス抗原のみを1週間間隔で静脈注射した場合の経時的な抗体産生の推移ならびに最高抗体価は Poly A·Poly U を免疫補助剤に用いて静脈注射した時のそれに類似した (Fig. 2-B)。したがって、本ウイルスの抗体産生に対する Poly A·Poly U の免疫補助効果は明確でなかった。

以上の結果から、ウサギの個体による差異が顕著に認められたが、静脈注射による抗 CGMMV-W 抗体の産生方法は FCA を用いた筋肉注射に比べて、早く抗体を産生し、抗体価もやや高い傾向を示した。しかし、一回の注射当りの抗原量 (20mg, 5mg および 1mg の範囲) は抗体産生の早さならびに抗体産生量にあまり影響がないものと思われる。(Fig. 1 および Fig. 2-A, B)。

CGMMV-W に対する IgM および IgG 特異抗体の産生様式

Fig. 1 ならびに Fig. 2 に示した抗 CGMMV-W 血清について IgM と IgG をセファデックス G-200 カラムクロマトグラフィーによって分画し、それぞれの免疫グロブリンクラスの抗体活性を補体結合反応によって測定した。なお、いずれの供試抗血清も、免疫開始後3週間目と4週間目に採血したものである。

Fig. 3 はウイルス抗原と FCA の懸濁液を筋肉注射して得られた抗血清 (Rabbit No. 2, No. 3) の免疫グロブリンクラスにおける抗体活性を示したものである。なお、波長 280nm の吸光度における最初のピークが IgM 分画、2番目のピークが IgG 分画、3番目のピークがアルブミン分画である^{7,12)}。Fig. 3 に示したとおり、免疫開始後3週間目の抗血清では、IgM の抗体活性は IgG に比べてわずかに低いか (Rabbit No. 2) またはほぼ同じであった (Rabbit No. 3)。しかし、免疫開始後4週間目の抗血清では、IgM の抗体活性は急速に低下し、IgG の抗体活性のみが増加した。

静脈注射によって得た抗血清の IgM と IgG における抗体活性の相対比も Rabbit No. 8 を例外とし

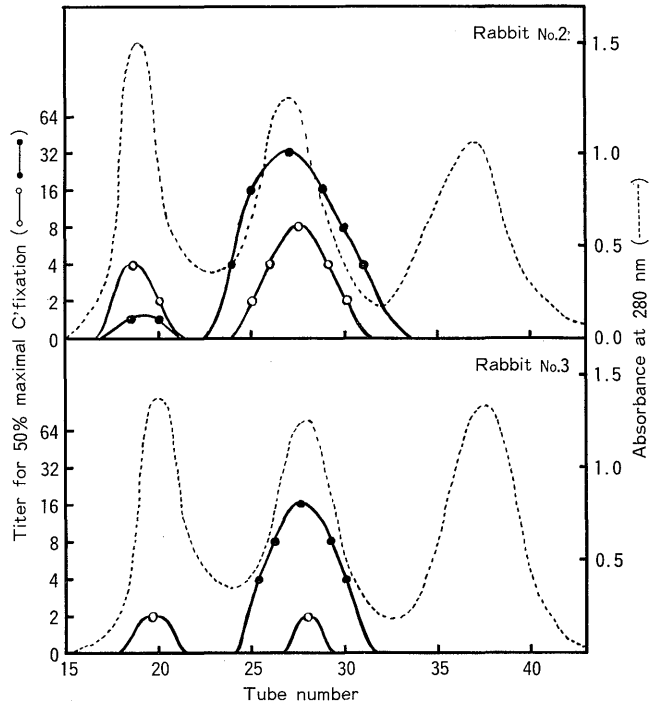


Fig. 3. Antibody activities of IgM and IgG fractionated by Sephadex G-200 column chromatography of anti-CGMMV-W antisera from Rabbit No.2 and No.3 shown in Fig. 1. They were immunized with intramuscular injections by using Freund's complete adjuvant. Open circle shows activity of antisera drawn three weeks after the first injection and closed circle shows activity of antisera drawn four weeks after the first injection. A column (2.64×30 cm) applied with 1 ml of the antiserum was eluted with buffered saline (0.05 M phosphate buffer pH 7.3, containing 0.15 M NaCl and 0.02 % sodium azide) at room temperature. Each fraction was collected with the flow rate of 5 ml/hr.

て、筋肉注射によって得た抗血清と同じ傾向を示した (Fig. 4)。すなわち、免疫開始後3週間に採血した Rabbit No.17 の抗体活性は、IgM が IgG に比べてわずかに低く、Rabbit No.18 では、逆に IgM の抗体活性が IgG のそれよりわずかに高かった。一方、免疫開始後4週間の抗血清では、いずれのウサギにおいても IgG の抗体活性のみが増加し、IgM の抗体活性は激減した。また、Fig. 4 には結果を示さなかったが、他に3頭のウサギについても IgM と IgG の抗体活性の相対比を調べたところ、Rabbit No.17 または No.18 のそれに類似した。

これらの結果から、特に IgM 特異抗体を必要とす

る場合には、免疫開始後3週間に、ほぼ最高抗体価に達する静脈注射法が有利である。一方、IgG 特異抗体を必要とする時は、いずれの免疫方法においても、免疫開始後4週間以上経過したウサギの抗血清から調製すればよいことがわかった。

なお、Rabbit No.8 のみは、免疫開始後3週間に得られた抗血清において、すでに IgM の抗体活性が検出されず、IgG のみに活性が認められた (Fig. 4)。このウサギは Fig. 2-A に示したとおり、他のウサギに比べて特に早く抗体価が上昇しており、そのため、IgM 特異抗体も他のウサギより早く産生され、免疫開始後3週間にはすでにそれが検出できない程

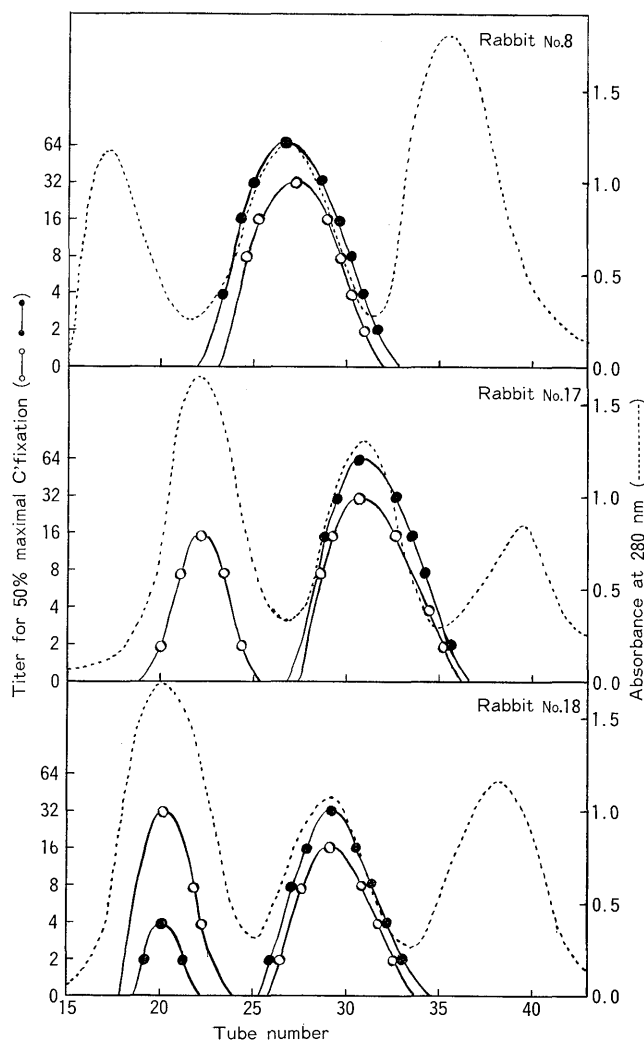


Fig. 4. Antibody activities of IgM and IgG fractionated by Sephadex G-200 column chromatography of anti-CGMMV-W antisera (Rabbit No. 8, No. 17 and No. 18 shown in Fig. 2-A). They were immunized with intravenous injections by using Poly A·Poly U as adjuvant. Other explanation is same as in Fig. 3.

度に低下したものと推察される。

考 察

異なる免疫方法 (FCA を用いた筋肉注射, Poly A·Poly U を免疫補助剤として用いた 静脈注射, ウィルス抗原のみの静脈注射) によって, CGMMV-W に対する抗体をウサギに産生せしめたところ, 静脈注射による方法は FCA を用いた筋肉注射に比べて約 1 週間早く最高抗体価に達し (免疫開始後 3~4 週間目),

抗体価もやや高い傾向を示した。同様の結果は, すでに CMV に対する抗体産生においても報告されている^{8,15,21)}。

Poly A·Poly U の免疫補助 (アジュバント) 効果については, これまでにウシ血清アルブミン, フェリチン, 多糖類および核酸に対する抗体産生において認められている^{5,6,16,19)}。著者らも, 以前に Poly A·Poly U が本ウィルスの抗体産生に対してアジュバント効果を有すると報告した¹³⁾。しかし, この結果を, さらに確

かめるために、供試ウサギの個体数を増やし、マウスも用いて再実験を行ったところ(未発表)、本ウイルスに対するその効果は明確でないことがわかった。小谷は免疫原性の強い抗原はアジュバント作用を受けにくいと報告しており¹⁰⁾、本ウイルスの場合も同じ理由によるのかもしれない。また、ウサギを供試した場合、個体差が大きく、このことも免疫補助効果の判定を困難にした。

本ウイルスに対する IgM 特異抗体の活性は供試したいずれの免疫方法においても、免疫開始後3週間目では IgG 特異抗体とほぼ同じか、やや低い程度であったが、その後、急速に減少し、4週間目には、わずかに検出できるか、すでに検出できない程度に低下することが判明した。一方、IgG の抗体活性は IgM とは逆に免疫開始後3週間目よりも4週間目の抗血清で上昇した。同様の抗体産生様式は Southern bean mosaic virus ならびに Tomato bushy stunt virus に対する抗体およびタバコモザイクウイルス (TMV) の高次構造に特異的な抗体においても報告された^{1,3,23)}。また、動物ウイルスに対する抗体産生様式においても、その多くは、IgM 抗体が IgG 抗体よりも免疫初期に産生され、その後1～3か月で消失して IgG 抗体に取って替わられることが知られている¹⁴⁾。

しかし、TMV の C 末端アミノ酸配列に特異的に反応する抗体³⁾や熱変性1本鎖DNAに対する抗体^{12,18)}ならびにイネ萎縮ウイルス RNA に対する抗体⁹⁾(2頭の供試ウサギ中1頭)は、おもに IgM 抗体に属しており、追加免疫によっても持続的に IgM が産生される

という報告もある。また、異種ウイルス間あるいはウイルス系統間の交叉反応においても、ウイルスと抗体の組み合わせによっては(ただし、ウサギによって個体差はあるが)、持続型の IgM 抗体の関与が報告された^{4,17)}。したがって、今後多くの植物ウイルスについて免疫グロブリンクラスの抗体産生様式を明らかにし、ウイルスに対する反応性を免疫グロブリンクラスのレベルで研究する必要がある。また、このような抗体産生に関する研究では、実験動物の個体差を克服する技術の開発も重要であると考えられる。

摘 要

キュウリ緑斑モザイクウイルス-スイカ系(CGMMV-W)に対する抗体を、免疫方法を違えてウサギに産生せしめ、免疫過程における IgM と IgG 特異抗体の相対的な活性の推移を補体結合反応によって比較した。IgM 特異抗体の活性は、免疫方法に関係なく、免疫開始後3週間目では IgG 特異抗体とほぼ同じか、やや低い程度であったが、4週間目には急速に低下した。一方、IgG 特異抗体の活性は免疫開始後3週間目よりも4週間目の抗血清で上昇した。したがって、本ウイルスに対するより多くの IgM 特異抗体を得るためには、早く抗体価が上昇する静脈注射によってウサギを免疫し、免疫開始後ほぼ最高抗体価に達する3週間目の早い時期に抗血清を得て IgM を調製すると有利である。また、IgG 特異抗体は、いずれの免疫方法においても、免疫開始後4週間以上経過して得られた抗血清から調製すると有利である。

引用文献

- Allen, W. R. (1968). Can. J. Bot. 46: 229-233.
- Anderer, F. A. and Ströbel, G. (1972). Eur. J. Immunol. 2: 274-277.
- Anderer, F. A. and Ströbel, G. (1972). *Ibid.* 2: 278-282.
- Bercks, R., Querfurth, G. and Lesemann, D. (1974). Phytopath. Z. 80: 233-243.
- Braun, W. and Ishizuka, M. (1971). J. Immunol. 107: 1036-1042.
- Ishizuka, M., Braun, W. and Matsumoto, T. (1971). *Ibid.* 107: 1027-1035.
- Killander, J. and Hogman, C. F. (1969). In Basic Exercises in Immunochemistry (Nowotny, A. ed.). Springer-Verlag, Heidelberg. p. 5.
- 桐山 清 (1972). 盛岡たばこ試報告 8: 39-98.
- Kitagawa, Y., Matsumoto, T., Okuhara, E. and Shikata, E. (1977). Tohoku J. Exp. Med. 122: 337-343.
- 小谷尚三 (1976). 生化学 48: 1081-1107.
- 松本 勤・村山大記 (1972). 北大農邦文紀要 8: 132-174.
- Matsumoto, T. and Okuhara, E. (1974). Tohoku J. Exp. Med. 113: 245-255.
- 松本 勤・佐藤憲保・川越政美 (1975). 日植病報 41: 283 (講要).
- Meurman, O. (1979). Laboratoriumsblätter 29: 133-148.
- Moorhead, E. L. (1961). Virology 13: 249-255.

16. Okuhara, E., Igarashi, J. and Matsumoto, T. (1976). *J. Immunological Methods* 10: 177-182.
17. Querfurth, G. and Bercks, R. (1976). *Phytopath. Z.* 85: 193-205.
18. Sandberg, A.L. and Stollar, B.D. (1966). *Immunology* 11: 547-556.
19. Schmidtke, J.R. and Johnson, A.G. (1971). *J. Immunol.* 106: 1191-1200.
20. Schwartz, E.F. and Stollar, B.D. (1969). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 35: 115-120.
21. Scott, H.A. (1963). *Virology* 34: 79-90.
22. 四方英四郎・小島 誠 (1978). *日植病報* 44: 28-34.
23. Tremaine, J.H. and Wright, N.S. (1967). *Virology* 31: 481-488.
24. 国立予防衛生研究所学友会編 (1964). *ウイルス実験学総論*. 丸善, 東京. pp.196-228.