

ELISA 法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) によるカンキツモザイクウイルスの検出

誌名	日本植物病理學會報 = Annals of the Phytopathological Society of Japan
ISSN	00319473
著者名	宇杉, 富雄 土崎, 常男
発行元	日本植物病理學會
巻/号	48巻3号
巻号補足	
掲載ページ	p. 330-332
発行年月	1982年7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



ELISA 法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) によるカンキツモザイクウイルスの検出

宇杉富雄*・土崎常男*

Tomio USUGI* and Tsuneo TSUCHIZAKI*: Detection of Citrus Mosaic Virus by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Abstract

Citrus mosaic virus (CiMV) was easily detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in various parts of satsuma orange plants, especially in newly sprouted leaves. Two to twenty ng/ml of CiMV and satsuma dwarf virus which is closely related serologically to CiMV could be detected by this technique. However, in the case of heterologous combination of coating γ -globulin and conjugate the ELISA values were reduced.

Key Word: serological diagnosis, ELISA, citrus mosaic virus.

最近、植物ウイルスの研究に用いられるようになった Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA 法) は極めて鋭敏なため、植物体内で低濃度のウイルス、特に果樹ウイルスなどの検出には有効な手法としてわが国でも使用されている^{1,2,3)}。著者らは抗温州萎縮ウイルス (SDV) 血清を用いて ELISA 法による温州萎縮病およびカンキツモザイク病の血清学的診断を試み、SDV は罹病樹新芽から容易に検出されるが、カンキツモザイクウイルス (CiMV) は発色が弱いので、確実な診断を行うには、さらに検討する必要があることを報告した¹⁾。その後の研究から CiMV は SDV との共通抗原の他に特異抗原をも有していることが明らかになった⁴⁾。Koenig は ELISA 法においては共通抗原を持つウイルスの間でも使用した抗血清に対し heterologous なウイルスの発色は homologous なウイルスの発色よりもかなり弱くなると述べている⁵⁾。以上の理由から、ELISA 法による CiMV の検出には homologous な抗血清を使用する必要があると考え、抗 CiMV 血清を作成し、これを用いて CiMV の ELISA

法による検出を検討した。ここにその結果を報告する。

本実験で用いた CiMV は和歌山県果樹園芸試験場・山本省二氏より分譲されたカンキツモザイク病罹病ウンシュウミカンより分離されたものである⁴⁾。CiMV 罹病 *Physalis floridana* を材料とし、SDV に用いたと同様の純化方法⁶⁾によって CiMV を純化した。純化 CiMV を家兎にアジュバント法による筋肉注射 4 回、静脈注射 1 回を行い抗血清を作成した。得られた抗血清は補体結合反応で CiMV および SDV に対し、ともに 4,000 倍まで反応した。また、10 倍希釈した本抗血清を用いて CiMV および SDV と寒天ゲル拡散法による血清反応を行ったところ、両ウイルスの間に spur の形成が認められた。本抗血清は健全 *Physalis floridana* 汁液にも若干反応したので健全汁液と反応させ、健全汁液との反応成分を吸収した後、試験に用いた。試験に当って γ -グロブリンの精製、酵素結合抗体 (conjugate) の作成法は Clark & Adams の方法⁷⁾に従い、ELISA 法は Clark & Adams の方法⁷⁾を一部変えて行った。

* 農林水産省植物ウイルス研究所 Institute for Plant Virus Research, Tsukuba Science City, Yatabe, Ibaraki 305, Japan

1) 宇杉富雄・斎藤康夫 (1980). 日植病報 46: 106. 2) 久原重松 (1980). 同上 46: 68-69. 3) 西尾 健・小林敏郎・加藤幹雄 (1981). 植防研報 17: 43-50. 4) 宇杉富雄・土崎常男 (1981). 日植病報 47: 413-414. 5) Koenig, R. (1978). J. gen. Virol. 40: 309-318. 6) 宇杉富雄・斎藤康夫 (1977). 日植病報 43: 137-144. 7) Clark, M. F. and Adams, A. N. (1977). J. gen. Virol. 34: 475-483.

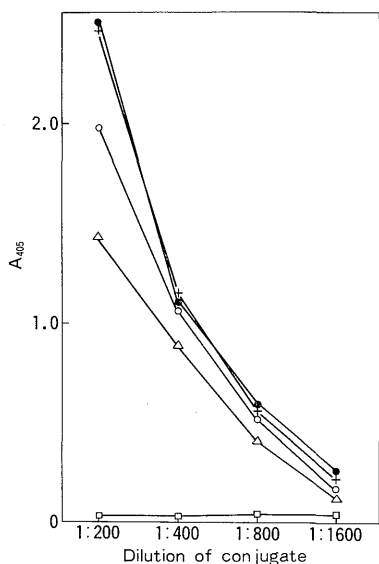


Fig. 1. Effect of concentration of coating γ -globulin and conjugate on ELISA absorbance values. Substrate solutions are diluted 1:4 in distilled water before measuring colorimetrically at 405 nm. ●—●: 10 μ g/ml, +—+: 5 μ g/ml, ○—○: 2.5 μ g/ml, △—△: 1 μ g/ml, □—□: 0.1 μ g/ml.

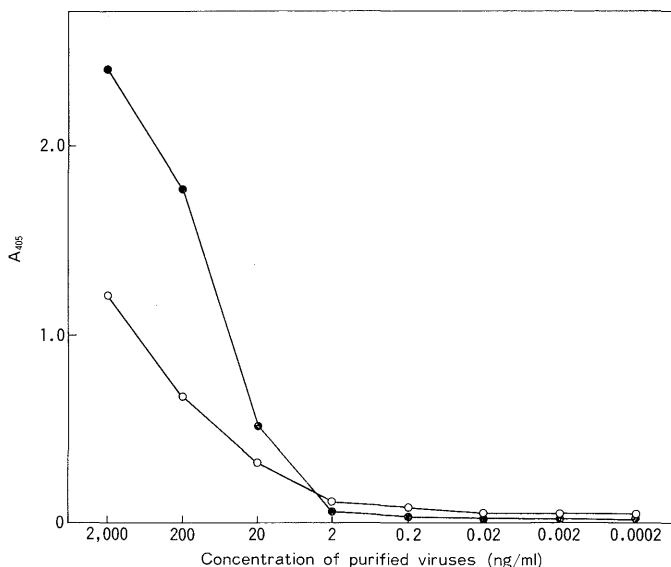


Fig. 2. Relationship between ELISA absorbance values and concentrations of purified CiMV (●—●) and SDV (○—○). Substrate solutions are diluted 1:4 in distilled water before measuring colorimetrically at 405 nm.

主な変更点は酵素基質液を 0.2ml としたこと、マイクロタイタープレートは LINBRO IS-MRS-144 (Flow Laboratories 社製) を用いたことである。本試験においては γ -グロブリンの coating 時間は 2 時間, conjugate の反応時間は 4 時間とした。

ELISA 法における適正な coating γ -グロブリンおよび conjugate の濃度を決定するために種々の濃度の coating γ -グロブリンおよび conjugate を組合せ試験を行った。coating γ -グロブリンの濃度が 10, 5 および 2.5 μ g/ml の場合, ELISA 価はほぼ同じであったが, 1 および 0.1 μ g/ml では低下した。一方, conjugate の濃度は調整原液の 200, 400, 800 および 1,600 倍について検討した。いずれの濃度においても特異的な発色が認められたが, 800 倍以上の希釈では発色が弱くなった (Fig. 1)。従って以下の実験はすべて coating γ -グロブリンの濃度 2.5 μ g/ml, conjugate の濃度 400 倍液を用いた。

純化 CiMV および SDV 標品を用いて ELISA 法による両ウイルスの検出限界濃度を調べたところ, Fig. 2 に示したとおり, 両ウイルスの検出限界濃度は 2 ~ 20 ng/ml で検出感度は極めて鋭敏であった。また, 高濃度 (200 ~ 2,000 ng/ml) における両ウイルスの発色程度を比較すると抗 SDV 血清を用いた場合と同様に heterologous な組合せにおける発色が弱かった。次の

で CiMV と SDV に対する両抗血清を用い, coating γ -グロブリンおよび conjugate の 8 種類の組合せを作り, 各組合せにおける発色の強さを検討した。本実験で使用した抗 SDV 血清は補体結合反応で CiMV および SDV に対しともに 1,280 倍まで反応したものである。使用した両ウイルスの濃度は抗原量を一致させるためにリングテストにおける反応終末点の濃度をさらに 20 倍布積したものを用いた。その結果を Table 1 に示した。いずれの場合においても coating γ -グロブリン, ウィルス, conjugate の 3 者が homologous な場合に最も強い発色が認められた。Koenig⁵⁾は検定するウイルスに対して heterologous な conjugate を使用した場合のみに発色が弱くなり coating γ -グロブリンの種類は発色の強さに影響しないと報告しているが, 本実験の結果では conjugate のみならず coating

Table 1. Different reaction in ELISA using homologous and heterologous combinations of coating γ -globulin and conjugate for detection of CiMV and SDV

Coating γ -globulin ^{a)}	Antigens ^{b)}	Conjugate ^{c)}	A 405 ^{d)}
Anti-SDV	SDV	Anti-SDV	1.41
Anti-CiMV	SDV	Anti-SDV	0.41
Anti-CiMV	CiMV	Anti-SDV	0.17
Anti-SDV	CiMV	Anti-SDV	0.12
Anti-CiMV	CiMV	Anti-CiMV	1.04
Anti-SDV	CiMV	Anti-CiMV	0.17
Anti-SDV	SDV	Anti-CiMV	0.29
Anti-CiMV	SDV	Anti-CiMV	0.51

a) Concentration of coating γ -globulin 2.5 μ g/ml.

b) The antigens were diluted 1:20 beyond their titres in the ring interface test.

c) Dilution of anti-SDV conjugate 1:100. Dilution of anti-CiMV conjugate 1:400.

d) A 405 values for substrate solution diluted 1:4 in distilled water.

Table 2. Distribution of CiMV in various parts of infected satsuma orange, *Citrus unshiu* Marcovitch

Plant parts ^{a)}	A 405 ^{b)}	
	CiMV infected	Healthy
Spring leaves	0.58	0.01
Old leaves	0.02	0.02
Petals	0.31	0.03
Stamens	0.29	0.09
Gynoecium	0.64	0.03
Small young fruits	0.64	0.03
Calyx	0.42	0.08

a) Extracts were prepared by grinding tissues with twenty volumes of 0.1M sodium citrate (pH 6.4) containing 0.1% thioglycolic acid.

b) A 405 values for substrate solution diluted 1:4 in distilled water.

γ -グロブリンの種類も発色の強さに関与していた。

5月26日、網室に保存した前述のカンキツモザイク病罹病ウンシュウミカンの各部位より試料を採取し、 -80°C に約1か月間保存した後試験に供した。採取部位は新葉(硬化)、雌ずい(子房部を除く)、幼果(直径5mm)、雄ずい、花弁、がくおよび旧葉である。これらに20倍量の0.1%チオグリコール酸を含む0.1Mクエン酸ナトリウム溶液(pH 6.4)を加え、乳鉢内で充分磨砕し磨砕液を抗原としELISA法を行った¹⁾。その結果をTable 2に示した。旧葉を除くすべての部位からCiMVの反応が認められ、新葉、幼果およびがくでは他の部位よりも高い値が得られた。しかし、健全ウンシュウミカンでは雌ずいおよびがくで他の部位よりも高い非特異発色が認められた。以上の結果から検定試料部位は新葉が最適と思われた。また上記のカンキツモザイク病罹病ウンシュウミカンおよび純化CiMVを接種した後、温室内に保存したグレープフルーツ、ウンシュウミカンおよびカラタチの新芽汁液中におけるCiMVの検出限界濃度を調べた。その結果、どの種類のカンキツについてもウイルスの検出限界濃度は160~2,560倍希釈であった。強い発色は試料希釈倍数10~40倍で認められた。また、春から秋にかけて全期間中CiMVの検出が可能であった。さらに、上記の罹病ウンシュウミカンから種々の成熟度の果実を採取しCiMVの検出を試みたところ、5月26日および6月16日に採取した果実(それぞれ直径5mm, 10mm)からCiMVが検出されたが、7月24日に採取したもの(直径25mm)からは検出できなかった。また、SDV感染ウンシュウミカンおよびカラタチを用いて抗CiMV血清によるELISA法で検定を行うとCiMVの場合よりも明らかに発色が弱く、SDV検出限界濃度も100倍希釈程度であった。

以上の結果から、抗SDV血清を使用した場合、従来ELISA法では検出困難であった夏期においても抗CiMV血清を使用すれば本法によって容易にCiMVが検出され、春から秋にかけて長期間にわたるカンキツモザイク病の診断が可能であることが明らかになった。

(昭和56年10月28日受理)