

タバコ矮化病抗原に対するマウス抗体の作製とその診断への応用

誌名	日本植物病理學會報 = Annals of the Phytopathological Society of Japan
ISSN	00319473
著者	桐山, 清
巻/号	41巻4号
掲載ページ	p. 373-377
発行年月	1975年10月

タバコ矮化病抗原に対するマウス抗体の作製と その診断への応用

桐山 清*

Kiyoshi KIRIYAMA*: Preparation of Mouse Ascitic Antibody
against Tobacco Stunt Disease Antigen and
its Application for Serodiagnosis

Abstract

Tobacco stunt disease (TSD) antigen was partially purified by differential centrifugation from infected tobacco leaves showing typical symptoms of TSD. The partial purified preparation was mixed with equal volume of Freund's complete adjuvant, and was injected three times to mice weekly followed by tumor injection. Ascitic fluids in immunized mice contained both TSD antibody and healthy tobacco antibody. The ascitic fluid absorbed with healthy tobacco antigen react with TSD antigen only. Mouse antibody against Hatano isolate of TSD formed a precipitin line between the antigen of Iwate isolate as same as Hatano isolate of TSD by agar diffusion test. It was shown that serodiagnosis of naturally infected TSD can be used by agar diffusion tests using absorbed mouse ascite.

(Received October 10, 1974)

タバコ矮化病 (TSD) は、わが国だけに発生が認められ¹⁾、その発生生態については日高らにより明らかにされ、また病土中の残存、温度と病徴ならびに媒介者 (*Olpidium brassicae*) との関係などについて、広く研究されている^{3,5,6,7,9,10,17)}。しかしこの病原体については、なお多くの疑問が残されている。日高らは矮化病罹病葉の分画遠心による純化試料の電顕観察で 19 nm の球形粒子を記載し²⁾、また最近病葉中にマイコプラズマ様の粒子を認めたとの報告もあり、この病原体についてはさらに検討が必要と思われる。ここに TSD 罹病葉汁液のウイルス学的方法による純化とその抗体の作製を試みた。その結果純化試料中に、ウイルス様粒子は認められなかったが、純化試料を抗原として作製したマウス腹水抗体と TSD 汁液との間に特異反応を認め、またそれを用いて、畑で発生した矮化病罹病株の抗原を検出することができたので、その結果について報告する。本研究を行うに当たり、TSD 罹病葉の作製にご協力いただいた宇都宮たばこ試験場、多川因氏に深謝する。

実験材料および方法

病原体: TSD は秦野たばこ試験場保存の病土にタバコ (品種: プライトエロー) を播種し、17 C のガラス室においたものを用いた。典型的病徴を示した病葉を純化試料とし、また病頂部を健全プライトエローに接木し、これらの接木タバコの病葉も以後の実験の材料とした。

TSD 抗原の純化: 純化の手順は Fig. 1 に示した。17 C ガラス室で病徴をよく現わした病葉を切取り、-20 C で凍結後、0.1% チオグリコール酸と 0.01 M DIECA を含む 0.1 M 燐酸緩衝液 pH 7.0 およびクロロホルムを 1:1:1 に混じて磨砕し、4,000 rpm 10 分の低速遠心後、その水層をとり 10,000 rpm 10 分間遠心し (Spinco L 型遠心機 rotor 30)、その上清を 28,000 rpm 120 分間遠心して、沈渣を 1/10 量の 0.1 M 燐酸緩衝液 pH 7.0 に溶解し、10,000 rpm 10 分と 38,000 rpm 90 分の遠心 (rotor 40) を 2 回反覆し、1/20 量の部分純化液を得た (Fig. 1)。健全タバコ汁液も同様の手順で処理し、吸収および反応用抗原として用いた。

* 日本専売公社中央研究所, 生物実験センター Biological Research Center, Central Research Institute, Japan Tobacco and Salt Public Corporation, Hatano, Kanagawa-ken, Japan.

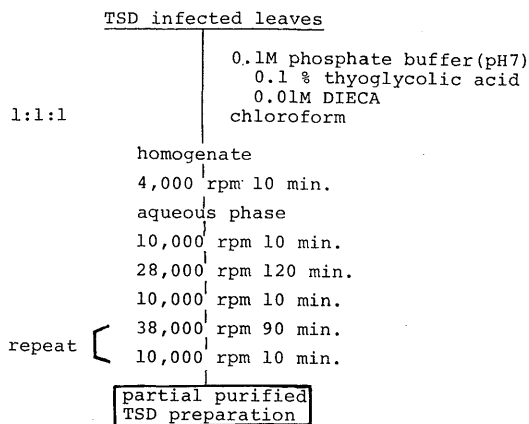


Fig. 1. Purification procedure of tobacco stunt disease antigen

マウス抗体の作製: 予研系 ddY の4週齢のマウスを用い、腹水抗体を作製した^{14,15)}。

部分純化した TSD は等量の Freund's complete adjuvant と混じ、マウス1頭当たり TSD 1 mg ずつを1週間間隔で3回腹腔に注射した¹³⁾。注射に用いた抗原および adjuvant との混合物は、注射の都度新しく作製した。最後の抗原注射1週間後に Ehrlich 腹水癌の原液を 0.2 ml 注射した。7~10日後にマウスの腹部の肥大が最大になった。なお皮膚の紅潮が認められる時期に腹水を採取した。この腹水は直ちに 4,000 rpm 10 分の低速遠心を行い、細胞片を除き、殺菌した共栓試験管に入れ、氷室に保存した。

血清反応: 試験管内沈降反応は腹水の階段希釈液と等量の純化抗原を混合して、水槽に入れ、37°C に2時間おき、結果を読んだ¹²⁾。健全抗原による腹水の吸収は、腹水と等量の純化抗原の原液で行なった。

ゲル内沈降反応は 0.5% Difco agar, 0.85% NaCl, 0.02% 窒化ナトリウムで寒天液をつくり、ペトリ皿に

金属カップをおき寒天が固まった後、それを抜取って穴をつくった。中央の穴に抗体を、周囲の穴に抗原を入れ、室温におき沈降線の出現を観察した。

血清診断用抗原の調製: 血清診断に用いた抗原は、病葉に等量の 0.1 M 磷酸緩衝液を加え乳鉢ですりつぶし、2重のガーゼで濾過し低速遠心した上清を用いた。

実験結果

典型的病徴を示す病葉から Fig. 1 に示す純化法を行なったところ、蛋白光をしめず部分純化液が得られた。その紫外線吸収曲線は Fig. 2 に示すように、260 nm で最高、235 nm で最低のカーブとなり、その比は

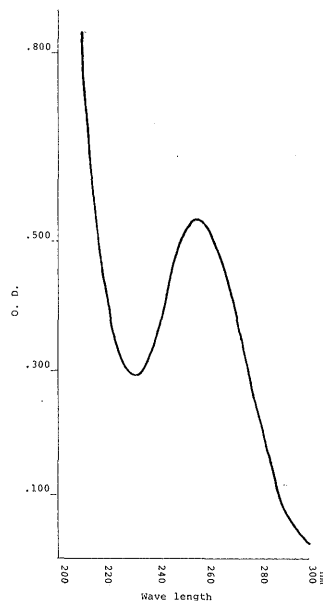


Fig. 2. UV absorption curve of partial purified TSD preparation

Table 1. Yields of TSD antigen obtained by various purification procedures

Samples	Methods for pretreatment	Conc. of samples	UV absorption max./min.	Yields ^{a)}	
				Total	per kg
TSD	Chloroform	10 ml/70 g ^{e)}	258/240	2 mg	28 mg
TSD	PTC ^{b)}	10 ml/70 g	258/245	3.7	53
TSD	DIECA	10 ml/155 g	258/235	14.0	90
Healthy tobacco	DIECA	5 ml/80 g	258/235	2.0	25

a) Calculated as OD index=6

b) 0.01 M phenylthiosemicarbazide

c) Final volume/original tissue weight

1.74 であった。260 nm における紫外線吸収値から計算するとその収量は 90 mg/kg (OD index=6) であった。また純化法を変えたときの収量は 12~24 mg であった (Table 1)。

これらの抗原をマウスに注射し、1 頭当り 15~25 ml の腹水を採取した。低速遠心後の腹水は、健全および罹病タバコ汁液との間に共通の沈降線を生ずるが、両者の間に spur を形成し、罹病タバコ抗原には、健全タバコにない抗原をもつことを示した (Fig. 3)。この抗体を健全タバコ汁液の精製液で吸収した。試験管内沈降反応では、未吸収のマウス腹水抗体は TSD 抗原と腹水希釈 512 倍まで陽性結果を示したが、健全抗体

とも 64 倍まで反応した。これに比べ健全タバコ汁液の精製液によって吸収したマウス腹水抗体では、TSD 抗原と抗体希釈 128 倍まで陽性結果を示し、健全抗原とは全く反応しなかった (Table 2)。

ゲル内沈降反応でも、健全抗原で吸収したマウス腹水は TSD 抗原とだけ反応した。これらの結果は、TSD 抗原のマウスへの腹腔注射により、その腹水中に TSD 抗原に特異的に反応する抗体の産生を示した。

1972 年、岩手県紫波町でタバコ (パーレー 21) に矮化病類似の病害が発生したので、その血清診断を行なった。

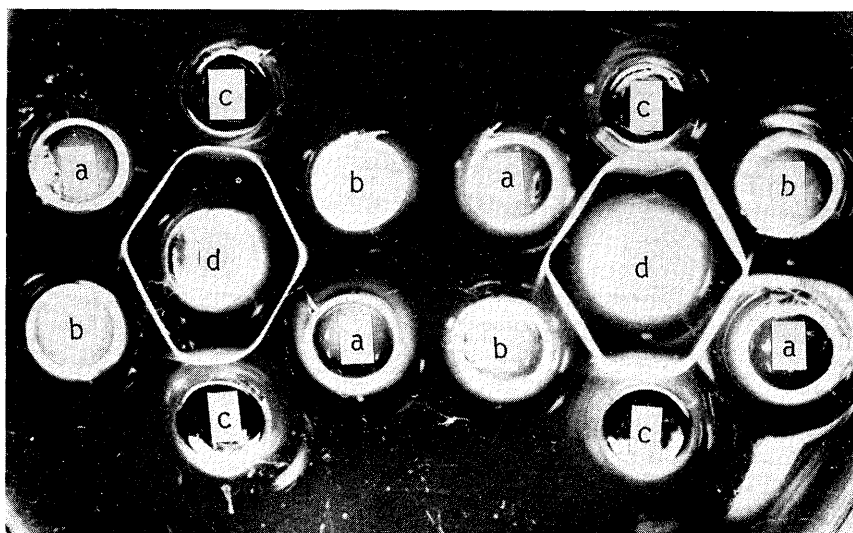


Fig. 3. Immunodiffusion pattern between anti-TSD ascite and TSD infected tobacco sap

- a) TSD-infected Bright Yellow tobacco sap
- b) Healthy tobacco sap
- c) TSD-infected Burley 21 tobacco sap
- d) Anti-TSD mouse ascitic antibody

Table 2. Precipitin reaction between mouse antibody of TSD and homologous antigen

Antigen used for absorption	Antigen tested	Antibody dilution ^{b)}								
		4	8	16	32	64	128	256	512	Cont.
Unabsorbed	TSD	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Unabsorbed	H ^{a)}	+	+	+	+	+	-	-	-	-
H	TSD		+	+	+	+	±	-	-	-
H	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- a) Healthy Bright Yellow tobacco protein
- b) TSD antibody

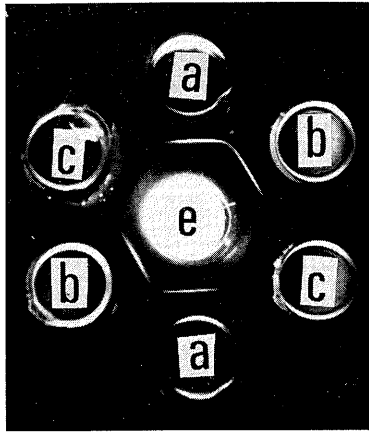


Fig. 4. Immunodiffusion pattern between sap of tobacco stunt disease and homologous mouse ascite

- a) TSD-infected Bright Yellow tobacco sap
- b) TSD-infected Burley 21 tobacco sap
- c) Healthy Bright Yellow tobacco sap
- e) Mouse antibody absorbed with healthy tobacco protein

秦試 TSD 保存株を標準としたゲル内沈降反応は Fig. 4 に示した。ブライトエローの秦野株とバーレー 21 の岩手株の病葉汁液を抗原として、マウス腹水抗体との寒天ゲル内反応では、両者の沈降線は全く重なり、両者は同一の抗原をもつことを示した。同じ寒天上で健全タバコ汁液抗原には全く反応しなかった。また吸収マウス抗体は、タバコモザイクウイルス (TMV)、キウリモザイクウイルス (CMV)、アルファルファモザイクウイルス (AMV) およびタバコ巻葉病ウイルス (LCV) とは反応しなかった (Table 3)。

病土を伝染源として発病した TSD 秦野株も、接木により継代した TSD 株も、同様に TSD マウス抗体と特異的に反応した (Table 4)。

考 察

TSD の純化試料のマウスへの注射により TSD と特異的に反応する抗体の産生が認められた。TSD の病原については、なお検討を要するが、本実験の結果から、少なくとも、TSD 罹病植物体中には、健全タバコ植物にない抗原の存在することが明らかになった。

Table 3. Precipitin reaction between several plant virus antigens and TSD mouse antibody absorbed with healthy tobacco sap

Antigen, tested	Antibody dilution ^{b)}								Control
	4	8	16	32	64	128	256	512	
TSD	+	+	+	+	+	+	-	-	-
TMV	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CMV	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LCV	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AMV	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Healthy tobacco sap ^{a)}	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- a) Bright Yellow tobacco
- b) TSD antibody

Table 4. Serodiagnosis of tobacco stunt disease

Antigen tested	Tobacco variety	Infection route	Agar diffusion ^{a)}	
			No. of line	Degree of reaction
Hatano (TSD)	Bright Yellow	Soil	1	##
Hatano	Bright Yellow	Grafting	1	##
Hatano	Bright Yellow	Grafting	1	##
Iwate (A)	Burley 21	Natural	1	##
Iwate (B)	Burley 21	Natural	1	##

- a) Antigen: Crude extract of infected leaves
- Antibody: Mouse ascitic antibody absorbed with healthy tobacco protein

本実験で TSD 罹病葉の分画遠心による部分純化により、蛋白光を示す試料が得られたが、その電顕観察の結果では、ウイルス様粒子を認めることが出来なかった。これは純化の過程で粒子が崩壊したものか、または全く別の病原によるものか、今後の検討にまたねばならない。比留木らは、キレート化合物の使用により、TSD の機械的接種に成功しているが⁸⁾、純化試料を用いての接種は試みられていない。TSD の病原を明確にするには、その接種法の検討も重要であろう。

マウス腹水抗体の産生手技は、その抗原効率が大きく¹⁶⁾、特に収量の少ないウイルスに有効なことが示されている¹³⁾。TSD の収量も少なかったが (Table 2)、マウスの利用により、抗体産生には充分であった。TSD の病葉の部分純化液を抗原として、ウサギへの反覆注射により、TSD と補体結合反応を示す抗血清が得られているが (桐山, 未発表)、抗原効率はマウスの方がはるかに高かった。

TSD の汁液接種が一般には困難のため、その診断は、単に病徴による場合が多いが、マウス抗体によるゲル内沈降反応で、その診断は容易である。

本実験では抗体の作製とそれによる TSD の血清診断を行なったが、この特異抗体の作製は、TSD の研究に有力な手技を与えるものと思われる。

摘 要

タバコ矮化病 (TSD) の典型的病徴を示すタバコ病葉から、分画遠心法により、ウイルス学的方法による純化を行ない、その試料を adjuvant と混ぜてマウスに注射し、腹水抗体を作製した。この抗体は健全タバコに含まれる蛋白質の抗体を含むことが認められたが、これを健全抗原で吸収したマウス抗体は TSD 抗

原とだけ特異的に反応した。

TSD 秦野株で作製したマウス抗体は、岩手県紫波町のタバコ (バーレー 21) に発生した矮化病株に対し、秦野株と同様の沈降線を生じマウス抗体による TSD の血清学的診断が可能であった。

引用文献

- 1) 日高 醇 (1951). 日植病報 15: 40-41.
- 2) Hidaka, Z. (1956). Proc. 3rd Intern. Conf. Electron Microscopy, London, 1954 p. 256.
- 3) Hidaka, Z. (1960). Proc. Symp. Soil Borne Viruses, Scotland.
- 4) 日高 醇・日高 操 (1973). 日植病報 39: 228-229.
- 5) Hidaka, Z. and Hiruki, C. (1958). Proc. 7th Intern. Cong. Microbiol. Stockholm.
- 6) 日高 醇・比留木忠治・中野惟俊・清水忠夫・魚住哲郎 (1956). 秦野たばこ試報 40: 1-80.
- 7) 日高 醇・多川 閃 (1962). 日植病報 27: 77-78.
- 8) Hiruki, C. (1964). Virology 23: 288-290.
- 9) Hiruki, C. (1965). *Ibid.* 25: 541-549.
- 10) Hiruki, C. (1967). *Ibid.* 33: 131-136.
- 11) 桐山 清 (1972). 日植病報 38: 161-163.
- 12) 桐山 清 (1972). 盛岡たばこ試報 8: 39-98.
- 13) 桐山 清・大隅 斉 (1973). 日植病報 39: 318-324.
- 14) Munoz, J. (1957). Soc. Exp. Biol. and Med. Proc. 95: 757-759.
- 15) Reddecliff, J. M. and Ludwig, E. H. (1966). Appl. Microbiol. 14: 834-835.
- 16) Scott, H. A. (1969). Phytopathology 59: 233-234.
- 17) 魚住哲郎 (1954). ウイルス 4: 359-362.