

酵素結合抗体法 (ELISA) によるキュウリ モザイクウイルスの検出

—二重抗体法における種々の酵素標識抗体の評価—

前田 孚 憲・井上 成 信

Voller et al.¹²⁾ および Clark and Adams³⁾ により酵素結合抗体法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) が植物ウイルスの検出に極めて有効な手法であることが示されて以来、本法は種々の植物ウイルスの検出、診断に広く用いられている。ELISA の測定系は直接法と間接法とに大別されるが、現在植物ウイルス学の分野でもっとも普及しているのは直接法の double antibody sandwich method (二重抗体法, DAS ELISA) である。ELISA においては用いる酵素標識抗体の種類によって、ウイルスの検出感度や特異性が大きく異なることが予想されるが、これらに関する研究はほとんどなされていない。本報告は DAS ELISA における種々の酵素標識抗体の特性を明らかにするために、キュウリモザイクウイルス (CMV) に対する IgG 抗体およびそのフラグメントとペルオキシダーゼとを種々の方法により結合させて作成した標識抗体の活性、感染葉からのウイルスの検出効率、CMV の 2, 3 の serotype に対する反応について調べた結果を記述したものである。

本研究を行うにあたり実験に協力いただいた光如興二技官に感謝の意を表する。

実験材料および方法

1. 供試ウイルス

CMV 黄斑系 (CMV-Y)¹⁰⁾、ヒャクニチソウおよびエビネから分離された系統 (CMV-Z および CMV-C)^{5,9)} を用いた。ウイルスはタバコ (品種, White Burley) の接種葉から前報⁹⁾ の方法に従って純化した。

2. 供試抗血清

純化した CMV-Y を家兎に 4 回筋肉注射して作成した抗血清を用いた。本抗血清は寒天ゲル内二重拡散法で 1:256 の力価を有するものである^{7,9)}。抗血清は、あらかじめ健全タバコ葉より抽出した蛋白をグルタルアルデヒド処理して作成した不溶化抗原で吸収した⁴⁾。

3. IgG およびそのフラグメントの調製

IgG は抗血清より硫酸塩析法および DEAE-セルロース カラム クロマトグラフィーに

昭和61年1月10日受理

より精製した。F(ab')₂ は IgG をペプシン (Sigma, 1:60,000) で消化後¹⁾, Sephadex G-200 カラムクロマトグラフィーにより精製した。Fab' は 1 mM EDTA を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) 1 ml に溶解した F(ab')₂ 3 mg に還元剤として 0.1 M 2-メルカプトエチルアミン 0.1 ml を加え 37°C に 90 分間置いて作成した。

4. 酵素標識抗体の作成

標識用酵素には西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) (Type I-C, 261-264 u/mg, RZ: 3.29-3.41, 東洋紡) を用いた。

(a) グルタルアルデヒド一段階法 (GA 法)³⁾

0.15 M NaCl を含む 0.02 M リン酸緩衝液, pH 7.4 (PBS) に溶解した IgG (1 mg/ml) および HRP (2 mg/ml) にグルタルアルデヒドを最終濃度が 0.05 % になるように加え, 室温に 4 時間置いた。標識抗体は PBS に対して透析したのち, ウシ血清アルブミン (1 %) および微生物の繁殖を防ぐためにメルチオレートナトリウム (0.01 %) を添加して 4°C で保存した。

(b) 過ヨウ素酸法 (PO 法)

過ヨウ素酸法による HRP と IgG, F(ab')₂ あるいは Fab' との結合は基本的には Barbara and Clark¹⁾ の方法に従った。1 ml の蒸留水に溶解した HRP (4 mg) に 0.1 M 過ヨウ素酸ナトリウム 0.2 ml を加え 25°C に 20 分間置いたのち, 1 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0) に対して 1 夜透析した。アルデヒド・HRP 溶液に 0.2 M 炭酸緩衝液 (pH 9.5) 0.2 ml を加えて pH を 9.0-9.5 にすると同時に 1 ml の 0.01 M 炭酸緩衝液, pH 9.5 に溶解した IgG (8 mg), F(ab')₂ (6 mg) あるいは Fab' (5 mg) を加え, 室温に 2 時間置いて両者を給合せた。シッフ塩基による結合を安定にするために, この液に水素化ほう素ナトリウム溶液 (4 mg/ml) 0.1 ml を加え還元した。標識抗体は PBS に対して透析したのち, GA 法で作成した標識抗体と同様の方法で保存した。

(c) ピリジル・ジスルフィド法 (PDS 法)^{2,6)}

HRP 2 mg (0.1 M リン酸緩衝液, pH 7.5, 0.3 ml に溶解) に 60 μl の 95.5% エタノールに溶解した *N*-succinimidylyl 3-(2-pyridyldithio) propionate (Sigma) 780 mg を加え 25°C に 30 分間置いた。ピリジル・ジスルフィド基を導入した HRP は 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) に対して透析したのち, 5 mM EDTA を含む上記の緩衝液に溶解した Fab' 2 mg を加え 37°C に 2.5 時間置いた。標識抗体は PBS に対して透析したのち上記と同じ方法で保存した。

以下, GA 法で作成した HRP 標識 IgG は IgG-GA, PO 法で作成した標識 IgG, F(ab')₂, Fab' はそれぞれ IgG-PO, F(ab')₂-PO, Fab'-PO, および PDS 法で作成した標識 Fab' は Fab'-PDS と呼ぶことにする。それぞれの標識抗体の原液の濃度 (HRP と抗体の合計量) は 4 mg/ml に調整した。

4. ELISA

DAS ELISA は Clark and Adams³⁾ の方法に従いポリスチレンプレート (U ディスボプレート, 220-24K, 三光純薬) を用いて行った。IgG のコーティングは 30°C, 3 時間, 抗原の反応は 4°C, 16 時間, 標識抗体の反応は 30°C, 3 時間とした。純化ウイルスは

0.05% Tween 20 を含む PBS (PBST) にウシ血清アルブミンを0.2%添加した液で希釈した。植物葉は2%ポリビニルピロリドンを含む上記の緩衝液で磨砕後、ろ紙でろ過して用いた。標識抗体はウシ血清アルブミンを含む PBST で希釈した。それぞれの溶液は1穴あたり150 μ l ずつ入れた。HRP は基質として0.025M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) に *o*-phenylenediamine (0.5 mg/ml) および過酸化水素 (0.05%) を溶解した液を1穴あたり200 μ l ずつ注入し、暗黒下で30°C、20分間反応させて検出した。反応は1穴あたり50 μ l の3M 硫酸溶液を加えて停止したのち、490 nm での吸収を分光光度計で測定した。1試料あたり3穴を用い、測定時に1本の小試験管にまとめ、蒸留水で2倍に希釈した液を光路0.5 cm のセルを用いて測定した。

実験結果

1. 酵素標識抗体の活性

種々の標識抗体の活性を純化ウイルスを用いて比較した。IgG をコーティングしたポリスチレンプレートに純化ウイルス (1, 10, 100, 1,000 ng/ml) をトラップさせたのち、1,000 および2,000 倍に希釈したそれぞれの標識抗体を反応させ、それらの活性を調べた。実験結果のうち代表的な1例を Table 1 に示した。IgG-GA と IgG-PO とを比較した場合、いずれのウイルス濃度においても IgG-PO の方が高い活性を示した。また、IgG およびそのフラグメントと HRP とを PO 法により結合させて作成した標識抗体を比較した場合、IgG-PO と F(ab')₂-PO とはほぼ同じ活性を有していたが、Fab'-PO はそれらよりかなり低かった。本実験で用いた5種の標識抗体のうち、Fab'-PDS はウイルス濃度が

Table 1. Comparison of various conjugates in DAS ELISA for detection of CMV*

Conjugate**	Concentration of virus (ng/ml)				
	0	1	10	100	1,000
IgG-GA	0.018***	0.048	0.100	0.385	0.693
IgG-PO	0.023	0.068	0.264	0.882	1.255
F(ab') ₂ -PO	0.016	0.057	0.227	0.761	1.110
Fab'-PO	0.014	0.040	0.111	0.413	0.576
Fab'-PDS	0.016	0.045	0.179	0.865	1.763

* Polystyrene plates were coated with IgG (2 μ g/ml) and then reacted with purified virus. Trapped virus was detected with respective conjugate at a dilution of 1:2,000.

** IgG antibody and its fragments were conjugated with horseradish peroxidase by various procedures.

IgG-GA: IgG conjugate prepared by one-step glutaraldehyde procedure.

IgG-PO, F(ab')₂-PO and Fab'-PO: IgG, F(ab')₂ and Fab' conjugates, respectively, prepared by periodate oxidation procedure.

Fab'-PDS: monomeric Fab' conjugate prepared by reaction of thiol groups in the hinge of Fab' and 2-pyridyl disulphide groups introduced into peroxidase by using *N*-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate.

*** Absorbance values at 490nm for twofold dilutions of reacted substrates in cells of 5 mm light path length. Each value is the average for two experiments.

1,000 ng のときには、もっとも高い活性を示したが、ウイルス濃度が低い場合 (1 ng および 10 ng) には IgG-PO や F(ab')₂-PO より低い ELISA 値を示した。

それぞれの標識抗体の CMV の検出感度を比較するために、0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 50, 100 ng/ml の純化ウイルスをトラップさせたのち、400 および 1,600 倍に希釈したそれぞれの標識抗体を反応させた。その結果、IgG-PO および F(ab')₂-PO の検出感度は 0.25-0.5 ng/ml, IgG-GA, Fab'-PO および Fab'-PDS では 0.5-1 ng/ml であった。それらのうち、もっとも活性の高かった IgG-PO の反応を Fig. 1 に示した。

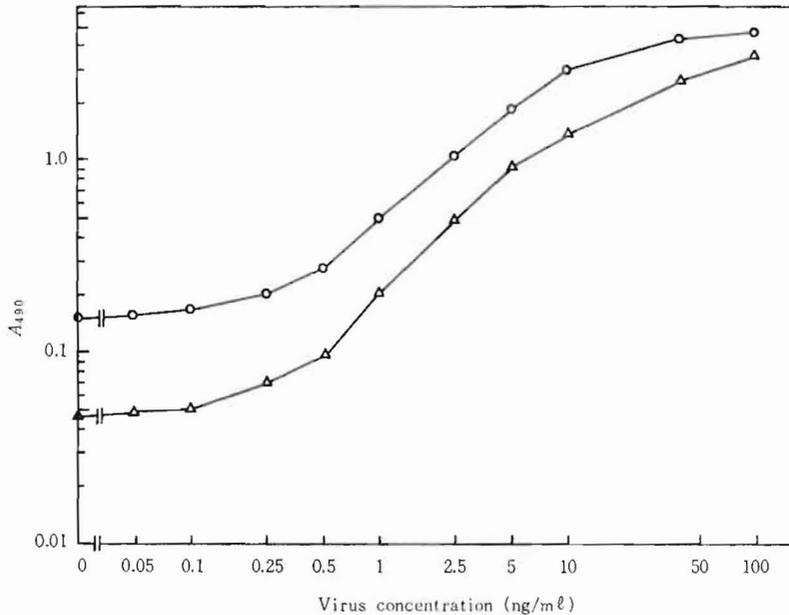


Fig. 1. Reaction of IgG-PO conjugate with purified CMV in DAS ELISA. Purified virus (CMV-Y) was trapped on IgG antibody coated polystyrene plates and then reacted with conjugate at 1:400 (○—○) and 1:1,600 (△—△) dilutions. After adding enzyme substrate, absorbance values at 490 nm for undiluted reaction mixtures were measured.

標識抗体の希釈が 1,600 倍の場合、ウイルスの検出感度は 0.25-0.5 ng/ml であったが、その 4 倍量の標識抗体 (400 倍希釈) を加えても検出感度は高くならなかった。すなわち、標識抗体の量が多くなると相対的な ELISA 値は高くなったが、同時に標識抗体の固相への非特異的吸着量も増加した。

2. 感染葉からのウイルスの検出

5 種の標識抗体を用いて、CMV-Y に感染したタバコ (品種, White Burley) 葉からのウイルスの検出を行った。それぞれの標識抗体は 1,600 および 3,200 倍に、抗原は汁液を 10⁻²-10⁻⁸ まで 10 倍ずつ段階希釈したものを供試した。それぞれの標識抗体の ELISA 値は、抗原に純化ウイルスを用いた場合とほぼ同様の傾向を示した。ウイルスの検出限界

はいずれの標識抗体でも、約 10^{-6} 希釈であった。また、対照として健全タバコ葉を用いたが、いずれの標識抗体を用いた場合にも ELISA 値は低く、ウイルスの検出には支障はなかった。

3. 血清型を異にする系統の検出

血清学的にそれぞれ異なる CMV 3 系統 (CMV-Y, CMV-Z および CMV-C) の純化標品を用いて、5 種の標識抗体のそれぞれの系統に対する反応を調べた。いずれの標識抗体を用いた場合にも homologous な組み合わせである CMV-Y の ELISA 値がもっとも高く、次いで CMV-Z, CMV-C の順であった (Fig. 2)。Fab'-PDS を除く 4 種の標識抗体

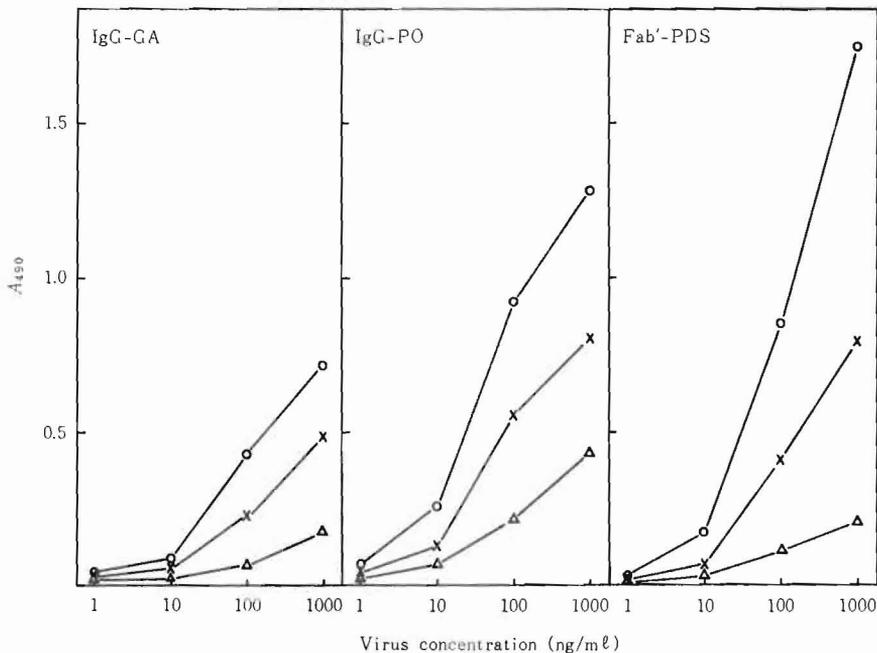


Fig. 2. Reaction of CMV serotypes with IgG-GA, IgG-PO and Fab'-PDS conjugates in DAS ELISA. Polystyrene plates were coated with IgG from CMV-Y antiserum and then reacted with purified CMV-Y (○-○), CMV-Z (×-×) and CMV-C (△-△). Trapped virus were detected with conjugates at 1:2,000 dilution.

では、3 系統間の相対的な ELISA 値の差はほぼ同じであったが、Fab'-PDS では homologous な系統である CMV-Y と他の系統間、および CMV-Z と CMV-C 間の ELISA 値の差は他の標識抗体に比較して大きかった。

考 察

近年、ELISA は種々の植物ウイルスの検出、診断に広く用いられるようになった。この方法の測定系は直接法と間接法とに大別されるが、一般には直接法の 1 種である二重抗体法 (DAS ELISA) がもっとも普及している。これまでに、DAS ELISA におけるコー

テンググロブリンの濃度、標識抗体の濃度、試料の作成方法、それぞれのステップにおける反応条件等の検討は多くなされている。ELISA においては用いる標識抗体の種類がウイルスの検出感度や特異性を大きく左右することが予想されるが、これらに関する報告はみあたらないようである。標識抗体の性質は酵素、イムノグロブリンの種類、標識方法によって決定されるものと考えられる。従来、DAS ELISA の標識抗体にはグルタルアルデヒド一段階法により IgG とアルカリホスファターゼとを結合させたものが広く用いられている。本実験では標識用酵素として西洋ワサビのペルオキシダーゼ (HRP) を用いた。HRP はアルカリホスファターゼに比べて入手が容易でしかも低価格である。また、種々の標識方法が可能であるなどの利点を有している。

本実験では5種の標識抗体を作成し、それらの活性を純化ウイルスを用いて調べた。IgG-GA と IgG-PO とを比較した場合、IgG-PO の方が活性がかなり高かった。このことは GA 法では IgG と HRP との重合の度合いが強いために標識抗体が巨大になることや、self-coupling が起きやすいために抗体活性や酵素活性が著しく損なわれることによるものと思われる⁶⁾。一方、PO 法では HRP の活性と関係のない糖部分にアルデヒド基を導入し、それを介して抗体と結合させているために酵素活性が比較的よく保たれていることや、標識抗体の重合度が GA 法に比較して低いことから⁶⁾、得られる標識抗体の活性が高いものと推察された。PO 法により作成した3種の標識抗体を比較した場合、IgG-PO と F(ab')₂-PO はほぼ同程度の活性を有していたが、Fab'-PO はこれらに比べてかなり低かった。このことは Fab' は結合部位が1価であるため、2価の IgG や F(ab')₂ と比較して抗原との結合力が弱いことによるものと思われた。Fab'-PDS は1価のイムノグロブリンであるにもかかわらず、ウイルス濃度が高い場合には最も高い活性を示したが、ウイルス濃度が低い場合 (1 ng, 10 ng) には Fab'-PDS は IgG-PO や F(ab')₂-PO に比較して低い ELISA 値を示した。この理由は明らかではないが、ウイルス濃度が低い場合には IgG-PO 等の高重合の標識抗体はウイルスと有効に結合するが、ウイルス濃度が高い場合には立体障害を起し多量の標識抗体が結合できないのかもしれない。一方、PDS 法では Fab' のヒンジ部分に存在するチオール基を介して酵素と結合させているため抗体活性がほとんど損われておらず、酵素と抗体とが1対1の割合で結合したモノマーの標識抗体であるため、ウイルス濃度が高い場合にも標識抗体が有効に結合できるのかも知れない。本実験で作成した5種の標識抗体による純化ウイルスの検出感度を調べたところ、いずれの標識抗体も検出感度は0.25-1 ng の範囲にあり大差はなかった。しかし、活性の高い IgG-PO, F(ab')₂-PO, Fab'-PDS は IgG-GA, Fab'-PO よりもやや検出感度が高かった。ELISA によるウイルスの検出感度は種々の要因により左右されるが、標識抗体のみに着目すれば、その活性が高く、固相への非特異的吸着量が少ないほど高感度となりうる。固相への非特異的吸着量は標識抗体の重合度が高いほど多いことが知られている⁶⁾。また、IgG と F(ab')₂ あるいは Fab' とを比較した場合、Fc 部分を有する IgG の方が固相への非特異的吸着量が多いことが知られている⁶⁾。一般に種々の抗原の蛍光測定法による超高感度 ELISA では、Fab' と酵素とを PDS 法あるいはマレイミド法により結合させて作成したモノマーの標識抗体を用いる必要があるとされている^{6,11)}。しかし、本実験では標識抗体の種類と非特異的吸着量との関係を明らかにできなかった。これは化学的発色法では蛍光測定法に比べて多量の標識抗体を用いているために固相への非特異的吸着量

の差が明確にならなかったものと推察された。しかし、IgG-PO 等の高活性の標識抗体は低濃度で使用可能なため、相対的な非特異的吸着量が少なくなり有利である。また、同一の濃度で使用すれば、活性の低いものに比べて ELISA 値が高くなり、ウイルスの検出が容易である。本実験では標識用酵素として HRP を用いたが、従来広く用いられているアルカリホスファターゼと比較した場合⁹⁾、HRP 標識抗体のウイルス検出感度はアルカリホスファターゼのそれと同程度か、それ以上であった。

5種の標識抗体を用いて感染葉からのウイルスの検出を行ったところ、純化ウイルスの場合とはほぼ同様の結果が得られた。ウイルスの検出限界はいずれの標識抗体でも約 10^{-6} 希釈であり、 10^{-2} – 10^{-6} の希釈範囲では非特異的発色は問題とならず、有効にウイルスを検出することができた。この場合にも、IgG-PO のような高活性の標識抗体では、低希釈倍率の試料でも ELISA 値が他のものに比較して高くなり、容易にウイルスを検出できる利点を有している。

血清学的に互いに異なる CMV の3系統を用いて、それぞれの標識抗体の特異性を調べたところ、いずれの標識抗体を用いた場合にも、homologous な抗原である CMV-Y の ELISA 値が最も高く、次いで CMV-Z, CMV-C の順であった。このように、いずれの標識抗体でも CMV 3系統間の ELISA 値に差がみられ、3系統の血清型を区別することができた。Fab'-PDS を除く4種の標識抗体を用いた場合、3系統間の相対的な ELISA 値の差はほぼ同様であったが、Fab'-PDS ではその差が顕著であった。この理由は明らかではないが、前に述べたように、Fab'-PDS は抗体活性がよく保持されていること、および標識抗体が低分子(モノマー)であることによるのかも知れない。従って、DAS ELISA により CMV 系統間の血清学的な差異を明らかにする場合、用いる標識抗体の serotype に対する特異性を考慮する必要があるものと思われる。

摘 要

キュウリモザイクウイルス (CMV) に対する IgG 抗体およびそのフラグメントと西洋ワサビのペルキナーゼ (HRP) とを種々の方法により結合させて作成した標識抗体の性質を DAS ELISA (二重抗体法) で調べた。本実験ではグルタルアルデヒド一段階法により IgG と酵素とを結合させた標識抗体 (IgG-GA)、過ヨード酸法により IgG, F(ab')₂, Fab' と酵素とを結合させた標識抗体 (それぞれ IgG-PO, F(ab')₂-PO, Fab'-PO) およびピリジル・ジスルフィド法により Fab' と酵素とを結合させた標識抗体 (Fab'-PDS) を作成した。

それぞれの標識抗体の活性を純化ウイルスを用いて調べたところ、IgG-PO, F(ab')₂-PO は高い ELISA 値を示したが、IgG-GA, Fab'-PO は低かった。また、Fab'-PDS はウイルス濃度が高い場合 (1,000 ng/ml) には、もっとも高い活性を示したが、ウイルス濃度が低い場合 (1, 10 ng/ml) には IgG-PO および F(ab')₂-PO よりも ELISA 値が低かった。純化ウイルスの検出感度は IgG-PO, F(ab')₂-PO では 0.25–0.5 ng, IgG-GA, Fab'-PO, Fab'-PDS では 0.5–1 ng であった。感染タバコ葉からのウイルスの検出を行ったところ、いずれの標識抗体も 10^{-6} 希釈までウイルスの検出が可能であった。

互いに血清学的に異なる CMV の3系統に対するそれぞれの標識抗体の特異性を調べた

ところ, Fab'-PDS を除く 4 種の標識抗体では, 3 系統間の相対的な ELISA 値の差はほぼ同じであったが, Fab'-PDS ではそれらの差が大きかった.

文 献

1. Barbara, D. J. and Clark, M. F. 1982. A simple indirect ELISA using F(ab')₂ fragments of immunoglobulin. *J. gen. Virol.* 58: 315-322.
2. Carlsson, J., Drevin, H. and Axén, R. 1978. Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. *N*-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate, a new heterobifunctional reagent. *Biochem. J.* 173: 723-737.
3. Clark, M. F. and Adams A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. gen. Virol.* 34: 475-483.
4. Clark, M. F. and Bar-Joseph, M. 1984. Enzyme immunosorbent assays in plant virology. *In* *Methods in virology*, Vol. VII (Maramorosch, K. and Koprowski, H. ed.), pp. 51-85. Academic Press, INC.
5. 井上成信, 前田孚憲, 光畑興二. 1982. エビネから分離された cucumber mosaic virus. *農学研究* 60: 1-11.
6. 石川榮治. 1982. 酵素免疫測定法 (石川他編) pp. 50-66, 82-127. 医学書院, 東京.
7. 前田孚憲, 井上成信. 1985. キュウリモザイクウイルスおよびその D-protein に対する抗血清の性質. *日植病報* 51: 8-15.
8. Maeda, T. and Inouye, N. 1985. Insolubilization of cucumber mosaic virus with glutaraldehyde and its use for isolation of specific antibody. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 51: 312-314.
9. 前田孚憲, 脇本 哲, 井上成信. 1983. 日本において分離されたキュウリモザイクウイルスの血清学的性質. *日植病報* 49: 10-17.
10. 都丸敬一, 日高 醇. 1960. タバコからえられたキュウリモザイクウイルスの系統. 第三報, 黄斑系. *奎野たばこ試報* 46: 143-149.
11. 辻 章夫. 1982. 酵素免疫測定法 (石川他編) pp. 67-81. 医学書院, 東京.
12. Voller, A., Bartlett, A., Bidwell, D. E., Clark, M. F. and Adams, A. N. 1976. The detection of viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. gen. Virol.* 33: 165-167.

Detection of Cucumber Mosaic Virus by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

—Evaluation of various conjugates in double antibody sandwich method of ELISA—

Takanori MAEDA and Narinobu INOUE

Summary

An IgG antibody to yellow strain of cucumber mosaic virus (CMV) and its fragments were conjugated with horseradish peroxidase by various conjugation procedures and examined by the double antibody sandwich method of ELISA. The conjugates were 1) IgG conjugate prepared by one-step glutaraldehyde procedure (IgG-GA), 2) IgG, F(ab')₂ and Fab' conjugates prepared by periodate oxidation procedure (IgG-PO, F(ab')₂-PO and Fab'-PO, respectively), and 3) monomeric Fab' conjugate prepared by reaction of thiol groups in the hinge of Fab' and 2-pyridyl disulphide groups introduced into the enzyme by using *N*-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate (Fab'-PDS).

IgG-PO and F(ab')₂-PO showed higher activity against purified virus than IgG-GA and Fab'-PO. Fab'-PDS had the highest activity at a high concentration of virus (1,000 ng/mℓ), whereas it showed lower ELISA values than IgG-PO and F(ab')₂-PO at lower virus concentrations (1, 10 ng/mℓ). Detection limits of purified virus were 0.25-0.5 ng/mℓ for IgG-PO and F(ab')₂-PO, and 0.5-1 ng/mℓ for IgG-GA, Fab'-PO and Fab'-PDS. The virus in tobacco sap was detected up to 10⁻⁶ dilutions regardless of conjugate species used.

All conjugates reacted with two other heterologous serotypes of CMV and could differentiate among the three serotypes. Relative differences between ELISA values for the three serotypes were greater when Fab'-PDS conjugate was used.