

カンキツタターリーフウイルス検出のための ELISA の改良

草野成夫・下村克己

カンキツタターリーフウイルス (CTLV) の ELISA による検定について、サンプル磨砕から発色操作に至るまでの検出に最適な条件を検討した。サンプルを磨砕する際の緩衝液は、0.1 %チオグリコール酸加用 0.1M クエン酸緩衝液 (CB-T) が良く、0.15M NaCl 加用 0.1M・pH7.2 リン酸緩衝液 (PBS) と比較して検出感度が3倍以上に向上した。検査するサンプルは、発芽後から30日程度経過の新梢では検出が可能であるが、50日以上硬化葉及び旧葉では検出が困難であった。凍結サンプルからの酵素抽出は、希釈率250倍まで検出可能であった。また、サンプル磨砕液と酵素結合抗体液を同時に分注することにより、従来法に比べ、大量の検体を検査するときに利用する凍結サンプルや凍結磨砕液での検出感度が向上した。同時分注後の静置温度及び時間は、37℃では極端に検出感度が低下したが、4℃で4時間以上行うことで、希釈率が810～2,430倍まで判定が可能となった。なお、市販抗体をビオチン標識抗体に作り替えることで検出感度が向上し、発芽後50日以降の検定が可能となった。

[キーワード: カンキツタターリーフウイルス, ELISA, 分注法, 静置温度]

Improvement of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Detection of Citrus Tatter Leaf Virus. KUSANO Nario and Katsumi SHIMOMURA (Fukuoka Agric. Res. Cent., Chikushino, Fukuoka 818, Japan) *Bull. Fukuoka Agric. Res. Cent.* 14: 163-166 (1995)

Several conditions were examined for the detection of citrus tatter leaf virus (CTLV). The best buffer for homogenization of leaves was 0.1M citric acid containing 0.1% thioglycolic acid (CB-T) and the dilution end point using CB-T was 3 times higher compared to 0.1M phosphate buffered saline (PBS). In CTLV, young leaves of 30 days after sprouting were detectable, but old leaves more than 50 days after sprouting were not detectable. Dilution tests for CTLV using enzyme extract from frozen leaves proved that the detectable dilution end point was 250 times higher. The sensitivity of detection was higher with pouring sample extract and enzyme conjugated antibody solution. The best result was obtained with incubation period for more than 4 hours at 4 °C. This operation made the detectable dilution end point higher and the dilution end point was 810 ~ 2,430 times. The virus detection on the leaves of 50 ~ 70 days after sprouting was possible by modifying commercially available antibodies specially biotinylated conjugate.

[Key words : Citrus tatter leaf virus, ELISA, Pouring method, Incubation temperature]

結 言

カンキツタターリーフウイルス (citrus tatter leaf virus, CTLV) は、WALLECEら⁹⁾が1962年に最初に発見して以来、わが国においてもカンキツ栽培地域や苗木生産地で発生する、接ぎ木部異常症の病原として知られている。近年、カンキツ品種の多様化や高接ぎによる品種更新にともない、その被害は増加傾向にあり、県内カンキツ産地においても高接ぎ後3年でCTLVの被害により廃園に追い込まれたほ場が発生している。そのため、苗木生産時の採穂母樹や一般栽培樹の保毒の有無の検定が重要となっている。

CTLVは、ラスクシトレンジ等の接ぎ木接種や汁液接種による検定が従来行われてきたが、温度等の環境条件や検定植物の生育ステージによる病徴の発現にやや安定性を欠くこと、多量の検体を迅速に処理できない等の問題がある。

このため、各試験研究機関でCTLVの純化と酵素結合抗体法 (ELISA) の開発が急がれていたが^{1,6)}、1992年に日本植物防疫協会研究所より抗血清の配布が開始された。当試験場において予備試験を実施したところ、サンプル採取時期の差による検出感度の不良やマイクロプレート上での発色不足等が発生したため、従来の方法では問題があることが判明した。そこで、その検出法についての改良を行い知見を得たので報告する。

試 験 方 法

1 材 料

(1) 供試サンプル

1981年に農林水産省門司植物防疫所から導入し、無加温網室ハウスに保存中のCTLV (名称: BD44) 保毒のウンシュウミカン '興津早生' 及び1991年に上記保存樹の新梢を採取し-80℃で保存しているものを利用した。新梢については、発芽後の各生育ステージ毎及び旧葉を採取し、対照として、ウイルス無毒の '今村温州' の新梢を各種試験に供試した。なお、特に記載のない試験については、BD44の発芽後10日目新梢の凍結磨砕10倍希釈液を利用した。

(2) 抗血清

日本植物防疫協会研究所 (日植防) より購入したELISA用 (コーティング用IgGとアルカリフォスファターゼ (ALP) 標識IgGのセット) 抗CTLV血清を用いた。なお、コーティング用IgGはポリクローナル抗体 (Pab), ALP標識IgGはモノクローナル抗体 (Mab) であり、指定濃度は共に400倍であった。

2 検定方法及び抗体の標識

(1) 緩衝液の種類

サンプルを磨砕する際の緩衝液の種類は、0.15M NaCl 加用 0.1M・pH7.2 リン酸緩衝液 (PBS), 0.1 %チオ

グリコール酸加用PBS (PBS-T), 0.1M クエン酸緩衝液 (CB) 及び 0.1% チオグリコール酸加用CB (CB-T) の4種類とした。

(2) 同時分注後の静置温度と時間

サンプル液と酵素結合抗体液を同時分注したプレートをしールして、4℃、37℃の温度条件下で、1、2、4、6、8、12、16時間静置した。

(3) 検定時のサンプルの状態

発芽後10日、30日、50日、70、90日後及び2年目の旧葉について、生葉と凍結保存試料でウイルス検出を行った。

(4) サンプル磨砕液、酵素結合抗体液の同時分注

サンプル磨砕液をマイクロプレート上で100μl/ウェルで段階希釈し、その後直ちに酵素結合抗体液を100μl/ウェル分注した。酵素結合抗体液の分注は、単に上に重ね合わせる方法とウェル中で3回ピペッティングする方法の2条件とした。

(5) 添加酵素と抽出時間

植物組織の細胞壁を分解する酵素としてセルラーゼ (オノズカR-10)、マセロザイム (オノズカR-10)、ペクトリアーゼ (Y-23) を利用し、その各々の添加濃度を無添加、0.5%、1%、2%の4条件とし、それぞれ組み合わせて従来の磨砕法と比較した。また、酵素抽出時間は、室温条件下 (22~25℃) で0.5、1.0、2.0時間とした。

(6) ビオチン標識抗体の作成

従来の抗体に直接アルカリフォスファターゼ (ALP) を標識したものに比べて、ウイルス検出が高感度になるといわれているアビジン・ビオチン・システムに応用するため、抗体にアビジンを標識した。作成方法は、日植防のコーティング及び標識抗体をグレース社のマイクロコン30で限外ろ過法により濃縮し、N-hydroxy-succinimidobiochin (BNHS) を加えて1時間室温で静置して、標識後PBS中で3回透析し、腐敗防止としてアジ化ナトリウムを添加して標品とした。

3 ELISAの手順

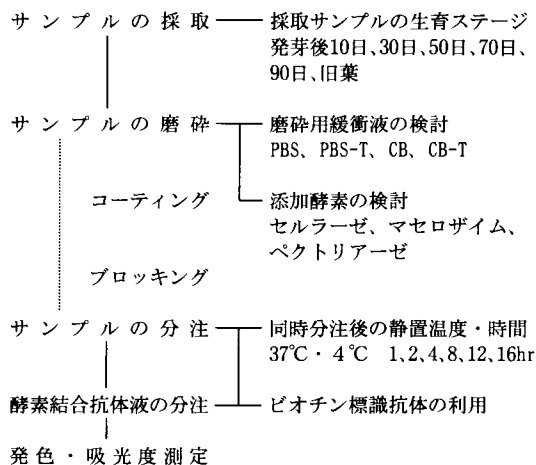
ELISAには、ヌンク社の96穴のマイクロプレートを利用し、静置時間別試験のみはグライナー社のイミュロン600のマイクロプレートを使用した。マイクロプレートリーダー (SLT社, EAR400FW) により、2時間後に吸光度 (O.D405nm) を測定した。具体的には、第1図のとおりである。なお、各ステップの間には、PBS-Tによる3回の洗浄を行なった。

結果及び考察

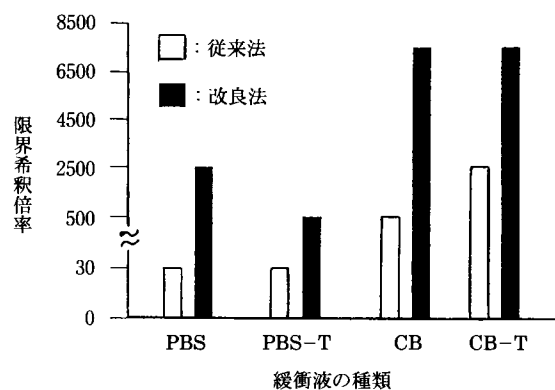
1 緩衝液の種類

試料の磨砕用緩衝液は、通常PBSまたは0.05% Tween 20加用PBSが多いが、検定対象によってpHの変更や添加物の種類を検討する必要があるとの指摘がある⁸⁾。

第2図に示すように、4種類の緩衝液ではPBS及びPBS-Tに比べてCB及びCB-Tが良く、特にCB-Tでは従来法で2,400倍、サンプル液と酵素結合抗体液の同時分注を行う改良法では、7,000倍のサンプル希釈までCTLVの保毒の判定が可能であった。そこで、その後の試験ではCB-Tを利用することとした。



第1図 CTLV検出のためのELISA法改良の概要

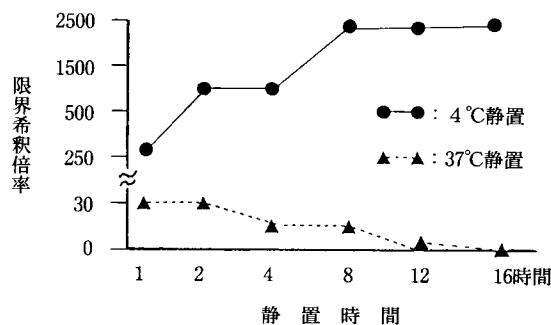


第2図 磨砕緩衝液と酵素結合抗体液の分注法 (1993)

- 1) 従来法: 同時分注無し, 4℃で16時間静置
- 2) 改良法: " 有り, "
- 3) サンプルは1991年の凍結新梢利用

2 同時分注後の静置温度と時間

一般的にELISAによるウイルス検定での静置温度は、37℃の2時間と4℃の16時間はほぼ同一の結果を示すと言われており、急ぐときには37℃の2時間の静置が多用されている。そこで、同時分注と静置温度と時間について比較検討した。



第3図 静置温度と静置時間 (1993)

結果は、第3図に示しているように、37℃の1~2時間静置では、サンプル液が30倍希釈まで判定可能であったが、4時間以上になると10倍希釈のみ判定可能であった。しかし、4℃の静置では、1時間でサンプル液の限界希釈

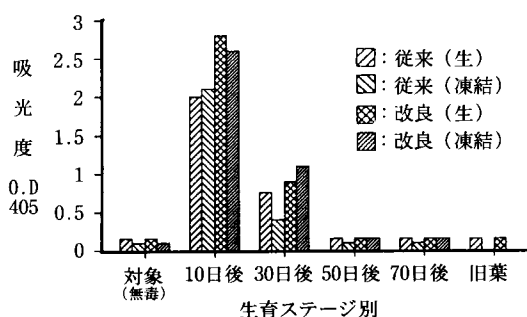
率 270 倍, 2 時間で 810 倍, 4 ~ 16 時間以上で 810 ~ 2,430 倍となり, 4 時間以上の静置で最大限の検出感度を引き出すことができたので, 以後は, 4℃で一晩静置する方法がルーチ的に適当と考えられた。

3 検定時のサンプルの状態

一般的には, ウイルス検定は若い新梢が良いとされているが, 検査用に持ち込まれるサンプルは色々である。そこで, 葉の生育ステージ別の検出限界について試験を行った。

生サンプルの状態で検定を行うと, 従来法でも 10 日目新梢では吸光度が 1.96 とかなり高くなり, 対照のウイルスフリーサンプルの吸光度が低いことから, 供試した市販の抗血清は非特異が少なく感度が高い ELISA キットであった。また, 生育ステージは, 発芽後の新梢が若いほどウイルス検出が容易であったが, 発芽後 50 日, 70 日葉及び旧葉では検出できなかった (第 4 図)。

しかし, 一度凍結したサンプルを従来法によって検定を行うと, 30 日目新梢では検出感度が生サンプルと比較して半分程度に低下する (第 5 図)。数千点に及ぶサンプルを一度に検定をする場合, 生サンプルの凍結が必須になるため, 同時分注を行うことにより検出感度の低下を防止することが可能となると考えられた。

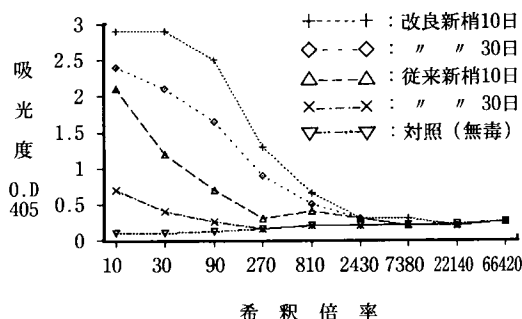


第 4 図 春芽新梢の発芽後のステージと吸光度 (1993)

- 1) サンプルは 30 倍希釈
- 2) 従来: 同時分注無し, 4℃で 16 時間静置
- 3) 改良: " 有り, "
- 4) 生, 凍結: 検定時のサンプルの状態

4 サンプル液と酵素結合抗体液の同時分注

検出感度は, サンプルを凍結すると低下したので, 改良法としてサンプル液をウェルの中に分注後, すぐに酵素結合抗体液を重ねるか, またはウェル中で 3 回ピペッティン



第 5 図 同時分注と従来法での検出感度の推移 (1993)

- 1) 従来: 同時分注無し, 4℃で 16 時間静置
- 2) 改良: " 有り, "
- 3) 新梢 10 日, 30 日: サンプルの発芽後日数

グする方法を検討した。

同時分注により各希釈倍率でも吸光度が高くなり, 結果として, 2,430 倍まで検出可能となった (第 5 図)。また, 重ね合わせと 3 回のピペッティングでは, 大きな差は認められなかった (データ省略)。

5 添加酵素と抽出時間

平島ら⁴⁾が行った酵素による抽出法に準じて 3 種類の酵素によるウイルス抽出を行った。その結果, PBS ではセルラーゼ及びペクトリアーゼの濃度が高くなるにしたがって吸光度が低くなった。凍結サンプルを PBS の緩衝液に投入して, 1 時間後の抽出液はサンプル希釈率で 90 ~ 270 倍まで判定が可能であった (第 1, 2 表)。なお, 抽出時間が長くなるほど, 吸光度は低下する傾向にあり, 抽出用の酵素に利用する緩衝液については, PBS と CB で明確な

第 1 表 PBS 中における酵素の種類と検出限界希釈倍率¹⁾ (1993)

セルラーゼ濃度 (%)	マセロザイム濃度 (%)			
	0	0.5	1.0	2.0
0	90	270	270	270
0.5	— ²⁾	—	—	—
1.0	—	—	—	—
2.0	—	—	—	—

マセロザイム濃度 (%)	ペクトリアーゼ濃度 (%)			
	0	0.5	1.0	2.0
0	270	90	90	10
0.5	270	90	90	90
1.0	270	90	90	NT ³⁾

- 1) 抽出 1 時間後に判定
- 2) 未検出
- 3) 未調査

第 2 表 CB 中における酵素の種類と検出限界希釈倍率¹⁾ (1993)

セルラーゼ濃度 (%)	マセロザイム濃度 (%)			
	0	0.5	1.0	2.0
0	270	270	270	270

マセロザイム濃度 (%)	ペクトリアーゼ濃度 (%)			
	0	0.5	1.0	2.0
0	90	270	270	90
0.5	270	270	90	30
1.0	270	90	90	NT ²⁾

- 1) 抽出 1 時間後に判定
- 2) 未調査

差は認められなかった。カンキツのウイルス検定は, サンプルの 10 倍希釈濃度で検出を行っているが, ウイルスの濃度やサンプルの良否があることから, 判定時の標準陽性サンプルで, 500 倍から 1,000 倍程度の希釈でも判定が可能である方法のルーチン化が望ましく, 現状では, 従来の磨砕法が良いと考えられた。

6 ビオチン標識抗体利用による高感度検出

一般的に, 市販の抗血清の場合, 指示されたルーチンに従ってウイルス検定を行う必要がある。しかし, 従来のグ

第3表 ビオチン標識抗体利用によるCTLVに対する吸光度¹⁾(1994)

抗体の種類 サンプル希釈度		ポリクローナル抗体 ²⁾					モノクローナル抗体 ³⁾				
		10	30	90	270	810	10	30	90	270	810
発芽後											
葉の生育 ステージ	10日	1.10	1.37	1.53	1.78	1.45	2.03	2.56	2.30	1.77	0.97
	30日	1.55	1.75	1.60	1.20	0.85	1.47	1.83	1.27	0.66	0.30
	50日	0.90	0.77	0.44	0.35	— ⁴⁾	0.48	0.31	0.18	0.12	—
	70日	0.78	0.52	0.32	—	—	0.30	0.19	0.12	—	—
	90日	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
旧葉 ⁵⁾		0.17	—	—	—	—	0.19	—	—	—	—

1) 50分後の吸光度

2) 抗体濃度2,000倍

3) 抗体濃度500倍

4) 陰性反応

5) 2月採取

ルターアルデヒド法による抗体へのALP標識は、力価がロット毎に異なったり、利用していく過程で活性が低下するトラブルが発生し易い。

著者らは、温州萎縮ウイルス抗体を作成し温州萎縮病の検定に利用しているが、ビオチン標識抗体に変更して利用したところ、検出感度が高く良好な結果を得ている。そこで、CTLVについても、検出感度が低下しサンプルとして不適な発芽後50日以降の新梢からウイルスを検出するため、ビオチン標識抗体利用の検討を行った。

結果は第3表に示すとおりであるが、ビオチン標識抗体の利用により発芽後50日以降70日目まで、また、旧葉についても磨砕液が10倍であれば検出が可能となった。しかし、高感度の検出のためには、ビオチン標識抗体を利用しても発芽後の柔らかい新梢が良い。

以上の結果から、日植防の抗体では、CTLVのELISA検定時に採取するサンプルは発芽後から30日経過の新梢までは検出が可能であるが、50日以降緑化を開始し、硬化が始まった新梢及び旧葉では検出が困難であった。このことから、CTLVは、サンプルである新梢の葉令について細心の注意が必要であると考えられた。

また、凍結サンプルを利用する際には、サンプル液と酵素結合抗体液の同時分注を行う。さらに、その後の静置には、従来の37℃ではいずれの時間でも検出感度が極端に低下することから、4℃で4時間以上行う必要があることが明らかになった。さらに、磨砕用の緩衝液はCB-Tが良く、磨砕に代わる酵素による抽出法は労力の低減に有効であるが、CTLVはウイルスとして、やや検出に不安定であることから利用を避けた方が望ましい。

従来、川合ら^{1,2)}はコーティング用抗体及び酵素標識抗体にPabを使用した場合、非特異反応が現れ検出感度もサンプルの限界希釈倍率で16倍程度であったと報告している。しかし、市販の抗体にビオチン標識することで検査のステップが1つ増えるものの、検出感度アップと発色時間の短縮化が図られ、発芽後50日以降の検定が可能となった。さらに、小泉ら³⁾は、Mabを酵素標識抗体として利用した

場合、品種、系統が違うサンプルでは、ELISAではほとんど反応しない株の存在を指摘したが、Pabをビオチン標識することにより非特異反応を抑え、ELISAでCTLVの確認が可能となった意義は大きい。

今後、多数の事例についての研究により、系統の存在の有無が明らかになるであろう。

引用文献

- 1) 川合 昭・西尾 健(1990) 酵素結合抗体法(ELISA)によるカンキツタターリーフウイルスの検出. 日植病報 56 : 342-345.
- 2) 川合 昭・塚本貴敬(1992) モノクローナル抗体を用いたカンキツタターリーフウイルスのELISA法による検出方法. 植物防疫 46 : 348-352.
- 3) 小泉銘冊・岩波 徹(1992) 平成3年度常緑果樹試験研究成績概要集. 病害編 : 98-99
- 4) 平島敬太・野口保弘(1989) カンキツウイルス検定におけるELISA法の簡易化(第2報) 酵素利用によるウイルスの抽出法. 福岡県農総試報B-9 : 57-60.
- 5) T.MIYAKAWA and Masato TSUJI (1988) The Association of Tatter Leaf Virus with Budunion Crease of Trees on Trifoliate Orange Rootstock. In. Proc. 10th Cof. IOCV : 360-363.
- 6) 宮川経邦(1975) カンキツの接木部異常症とウイルス. 植物防疫 29 : 371-376.
- 7) 島津 康・宇杉富雄・柏崎 哲・土崎富雄・山本省三・小川正毅(1990) 酵素結合抗体法(ELISA)によるカンキツタターリーフウイルスのウシシュウミカンからの検出. 関西病虫害研究会報 32 : 45-46.
- 8) 高橋義行(1988) 植物ウイルス病の血清学的診断法(2). 植物防疫 42 : 22-26.
- 9) WALLECE, J.M. and R.J.DRAKE (1962) Plant Dis. Repr. 46 : 211-212.