

灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*) 孢子に対する モノクローナル抗体の作出とその特性

下村克己・草野成夫
(果樹苗木分場)

灰色かび病菌(*Botrytis cinerea*) 孢子を免疫源として、モノクローナル抗体 (MAb) を作出した。作出したMAbは、*Botrytis*属以外の5属7種の菌株孢子および*B. cinerea*を含む8属9種の病原糸状菌菌系に対しほとんど反応しないことから、*B. cinerea*孢子に特異的に反応すると考えられた。また、BCIP/NBT染色法による染色程度によって、*Botrytis*属の他の3種の異種菌株孢子との判別が可能であった。

[キーワード：灰色かび病菌，モノクローナル抗体，孢子，BCIP/NBT染色法]

Production of Monoclonal Antibodies for Detection of Conidia of *Botrytis cinerea* and its Characteristics. SHIMOMURA Katsumi, Nario KUSANO (Fukuoka Agric. Res. Cent., Chikushino, Fukuoka 818-8549, Japan) *Bull. Fukuoka Agric. Res. Cent.* 17:146-149 (1998)

Monoclonal antibodies (MAbs) for detection of conidia of *Botrytis cinerea* were produced by using whole conidia of *B. cinerea* as an antigen to raise them. The MAbs recognized conidia of *B. cinerea*, but did not react with conidia of 7 fungi species without *Botrytis* and hyphae of 9 fungi species. These results suggest that our MAbs recognized conidia of *B. cinerea* specifically. It was possible to distinguish conidia of *B. cinerea* from 3 other *Botrytis* species by BCIP/NBT stain method using MAbs.

[Key words: *Botrytis cinerea*, monoclonal antibody, conidium, BCIP/NBT stain method]

緒 言

植物病原菌の血清学的診断は、血清を利用した凝集反応法や沈降反応法を始めとして広く行われてきた⁵⁾。特に、高感度の免疫学的手法である酵素結合抗体法(ELISA)¹⁾等の実用化により、多数の検体について簡易かつ迅速な診断を行うことが可能となった。抗体には、血清中に含まれるポリクローナル抗体(PAb)と細胞融合および細胞培養法によって作出されるモノクローナル抗体(MAb)⁶⁾がある。MAbは、単一の抗原決定基とのみ反応するためPAbよりも特異性が高いとされ、ウイルス病では、系統判別にまで利用した報告もある⁶⁾。また、MAbは、診断に有効な抗体を産生する細胞株を確立すれば、均質な抗体をほぼ永久的にしかも大量に得ることが可能であるという利点もある。

血清学的手法による糸状菌病の診断は、一部の糸状菌で試みられている^{1,2)}ように、植物組織内の菌糸の検出も可能であり、特異性の高い抗体が得られれば、実際の診断において大いに役立つと考えられる。しかし、診断における血清学的手法に関する検討は、*Phytophthora*属菌や*Pythium*属菌等いくつかの属において抗血清を利用した手法が検討されている⁵⁾が、細菌病やウイルス病と比較すると非常に少なく、MAbについても、*Fusarium*属菌や*Pythium*属菌等について報告があるものの少ない^{1,2,12)}。

そこで今回は、各種作物の栽培上問題となる病原糸状菌として一般的な灰色かび病菌(*Botrytis cinerea*)の

診断におけるMAbの利用の可否について検討するために、力価の高い抗体が得られなかった菌系(下村、未発表)ではなく孢子を抗原としてMAbを作出して、その反応特異性について調査した結果を報告する。

材料および方法

1 MAbの作出

(1) 免疫源の調製

免疫源は、以下のようにして調製した。まず孢子は、ブドウより分離され当分場で保存した*B. cinerea*菌株をPDA平板培地で3日間培養後、BLBランプを72hr照射して形成させた。次に、菌叢表面を滅菌蒸留水で3回洗浄した後、2層の滅菌ガーゼで菌糸片等を除いて孢子懸濁液を作成し、 1.0×10^6 個/mlに調整し免疫源とした。

(2) MAb作出法

定法⁹⁾に基づいて、まず、0.1 mlの免疫源を等量のFreundの完全アジュバンド(FCA)で乳化して、5頭の生後8週齢のBALB/cマウスの腹腔内に投与した。その後、10~14日間隔で0.1 mlの免疫源を3回追加投与し、最終免疫から3日目に血液中の抗体価をELISA法によって測定した。次に、抗体価の上昇が確認されたマウスの脾臓細胞を摘出し、 1.0×10^8 個に調整した。それと並行して、対数増殖期のマウス由来のミエローマ細胞(P3-X63-Ag8-U1)を 1.0×10^7 個に調整し、ポリエチレングリコール(分子量1,000)でマウスの脾臓細胞と融合させた。その後、融合細胞を対数希釈法により希釈し、

NUNC社製の96穴平底マイクロタイタープレート(以下マイクロプレート)に1穴当たり1~2個まき込んだ。その後、コロニーを形成したものをスクリーニングし、クローニングを2~3回行ってMAbを産生する融合細胞株を確立した。

(3) スクリーニング法の検討

スクリーニングは、マイクロプレートを利用した直接ELISA法で行った。ELISA法におけるコーティング操作とブロッキング操作の検討は、スクリーニングを行う前に、免疫したマウスから採取した抗血清を100倍希釈して行った。コーティング操作は、マイクロプレートに免疫源を直接固相化する方法と事前にリジン処理を行う方法で検討した。また、ブロッキング操作は、PBSで0.5%に調整したウシアルブミン血清(BSA)とPBSで10倍希釈したブロックエース(UK-B25, 大日本製薬)の2種類で検討した。

2 MAbの特性

(1) MAbのアイソタイプ

作出したMAbのアイソタイプは、ZYMED社製モノクローナル抗体アイソタイプキットを用いて調査した。

(2) MAbの最適希釈濃度

MAbは、融合細胞の培養上清を塩析法¹⁰⁾で精製し、0.05%アジ化ナトリウムを加えて4℃で保存した。精製したMAb溶液の最適希釈濃度は、500倍、1,000倍、1,500倍、3,000倍、5,000倍、10,000倍に希釈した抗体液と免疫源を用いてスクリーニング法に準じて調査した。

3 MAb反応特異性調査法の検討

BCIP/NBT法は、DIBA³⁾やTISSUE PRINT⁷⁾で利用される染色法である。DIBA法やTISSUE PRINT法では、ニトロセルロース製のメンブレンシートに吸着させた抗原に反応した抗体を染色し、その程度によって診断する。したがってこれらの方法も、ELISA法と同様に支持体への抗原吸着の程度が、染色程度に大きく影響するため、今回の*B. cinerea*胞子に対する抗体の反応特異性調査には適さないと考えられた。そこで、支持体への吸着を必要としない遠心操作を利用した染色法を試みた(第1図)。

4 MAbの反応特異性

(1) 供試菌株

MAbの反応特異性を検討するにあたっては、農林水産省農業生物資源研究所から分譲された菌株MAFF 410003を標準菌株として、また、九州大学から分譲された薬剤(チオファネートメチル剤)感受性の異なる2菌株を供試し、免疫源以外の*B. cinerea*菌株に対する反応を調査した。他属菌株に対する反応は、免疫源の*B. cinerea*胞子と形態が同様の*Verticillium*属菌を始め形態や色が異なる胞子を有する*Alternaria*属菌や*Fusarium*属菌等7属の病原系状菌菌株について調査した。また、免疫源と同属異種の菌株に対する反応は、醗酵研究所から分譲された3種の菌株(*B. allii*, *B. fabae*, *B. tulipae*)について調査した。なお、供試菌株の詳細は以下の通りである。

Botrytis cinerea (苗木分場)

Botrytis cinerea (MAFF 410003, 農林水産省)

Botrytis cinerea TM-S (九州大学)

Botrytis cinerea TM-R (〃)

Botrytis allii (IFO No.9430, 醗酵研究所)

Botrytis fabae (IFO No.7171, 醗酵研究所)

Botrytis tulipae (IFO No.5896, 醗酵研究所)

Alternaria mali (苗木分場)

Cladosporium fulvum (苗木分場)

Gibberella zeae (苗木分場)

Gibberella fujikuroi (苗木分場)

Fusarium oxysporum f.sp.*asparagi* (苗木分場)

Fusarium oxysporum f.sp.*melongenae* (苗木分場)

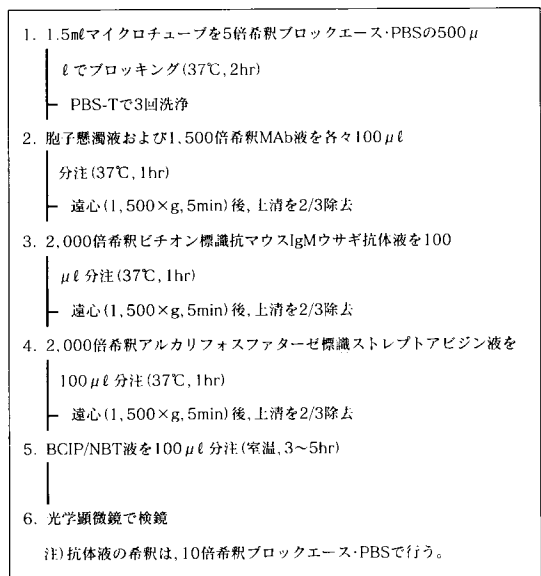
Verticillium sp. (苗木分場)

Aspergillus niger (苗木分場)

Sclerotium cepivorum (苗木分場)

(2) 各種病原系状菌菌糸および胞子に対する反応

供試した各種病原系状菌菌糸および胞子の懸濁液は、各種病原系状菌をPDA平板培地で培養した後、菌糸は採取した菌叢を超音波破碎して、胞子は免疫源胞子懸濁液の調製に準じて調製した。そして、その懸濁液を遠心操作を利用したBCIP/NBT法により染色し、MAbの反応特異性を調査した。



第1図 BCIP/NBT染色法を用いた灰色かび病菌胞子検出手順

結 果

1 MAbの作出

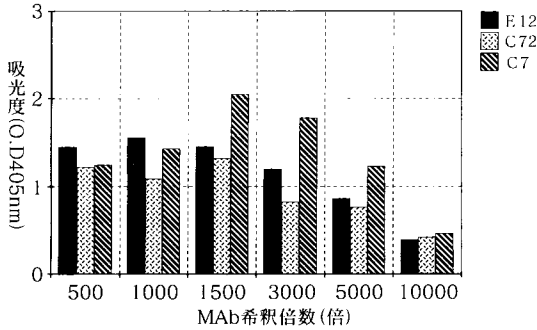
コーティング操作におけるリジン処理は、抗原の吸着を促進する効果があるとされている⁹⁾。しかし、今回の試験では、リジン処理の検出感度向上に対する効果は、ほとんど認められなかった(第1表)。また、ブロッキング剤の検討では、0.5% BSAは非特異反応が強かったのに対し、10倍希釈ブロックエースでは非特異反応が低く抑えられた(第1表)。

以上の結果を踏まえたスクリーニング法により、得ら

第1表 リジン処理およびブロッキング剤の種類と吸光度(1995)

ブロッキング剤の種類	抗原の分注	リジン処理	
		有	無
BSA	有	1.109	1.052
	無	0.596	0.460
ブロックエース	有	1.145	1.170
	無	0.221	0.155

注) 数値は、吸光度計の測定値(O.D 405nm)。



第2図 抗体希釈倍数と吸光度(1995)

れた融合細胞から、免疫源の *B. cinerea* 胞子に反応する MAb を産生する融合細胞株 3 株 (E12, C72, C7) を選抜した (データ略)。

2 MAb の特性

作出した MAb のアイソタイプは、いずれも IgM タイプであった (データ略)。また、精製した MAb 溶液の最適希釈濃度は、E12 は 1,000 ~ 1,500 倍、C72 は 1,000 ~ 1,500 倍、C7 は 1,500 ~ 3,000 倍程度であると考えられた (第2図)。したがって、MAb 反応特異性調査については、3 株の吸光度で共通して高い値が得られた 1,500 倍希釈液で検討した。

3 MAb 反応特異性調査法の検討

写真1は、E12 の MAb を用いた場合の *B. cinerea* 胞子染色像である。MAb を分注した胞子は、対照である MAb 分注なしの胞子と比較して、明らかに強く染色された。このことから、本染色法により作出した抗体の反応特異性を調査することが可能と考えられた。

4 MAb の反応特異性

(1) 各種病原糸状菌系に対する反応

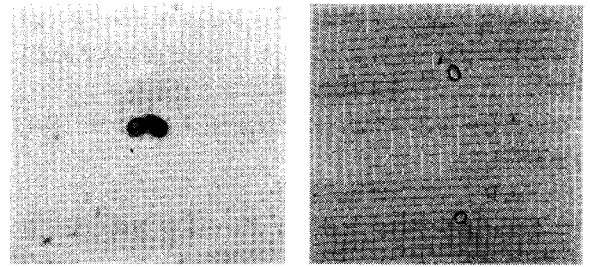
作出した MAb は、*B. cinerea* を含む 8 属 9 種の病原糸状菌系に対しほとんど反応しなかった (第2表)。

(2) 他属の病原糸状菌胞子に対する反応

作出した MAb は、*Botrytis* 属以外の 5 属 7 種の菌株胞子に対しほとんど反応しなかった (第3表)

(3) 同属異種菌株胞子に対する反応

BCIP/NBT 染色法による染色程度によって、*Botrytis* 属の他の 3 種の異種菌株との判別が可能であった (第3表)。特に、C7 は、E12 および C72 と比較して染色程度の違いがより明瞭であった (第3表)。



抗体分注有

抗体分注無 (対照)

写真1 BCIP/NBTによる *B. cinerea* 胞子染色像

第2表 各種糸状菌系に対する MAb の反応(1995)

供試菌株	MAb		
	E12	C72	C7
<i>Botrytis cinerea</i>	- ^{a)}	-	±
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-
<i>Alternaria mali</i>	-	-	-
<i>Gibberella zeae</i>	-	-	-
<i>Gibberella fujikuroi</i>	-	-	-
<i>Cladosporium fulvum</i>	-	-	-
<i>Sclerotium cepivorum</i>	-	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i>	-	-	-
<i>Verticillium sp.</i>	-	-	-

注) a) BCIP/NBT 染色法による染色程度の5段階評価
 +++:非常に強く染色された。 ++:強く染色された。
 +:染色された。 ±:染色されたが薄い。
 -:染色されず。

第3表 各種糸状菌胞子に対する MAb の反応(1996)

供試菌株	MAb		
	E12	C72	C7
<i>Botrytis cinerea</i>	++ ^{a)}	++	+++
<i>Botrytis allii</i>	±	±	±
<i>Botrytis fabae</i>	±	±	±
<i>Botrytis tulipae</i>	±	±	±
<i>Alternaria mali</i>	-	-	-
<i>Cladosporium fulvum</i>	-	-	-
<i>Gibberella zeae</i>	-	-	-
<i>Gibberella fujikuroi</i>	-	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>asparagi</i>	-	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>melongenae</i>	-	-	-
<i>Verticillium sp.</i>	-	-	-

注) a) :第2表と同様

考 察

1 スクリーニング法の検討

スクリーニングは、最終的な使用方法に準じて行うのが望ましいとされている。しかし、多数の融合細胞から目的とする抗体を産生する細胞を効率的に選抜するには、ELISA 法が最も簡便で効率的な場合が多く、実際に広く利用されている。したがって、今回の MAb 作出に当たっては、ELISA 法でスクリーニングを実施した。一般に、ウイルス等微小な抗原蛋白質を ELISA 法で検出する場合、そのコーティング操作は、サンプル汁液を直接コーティングする方法が用いられている。しかし、抗原が胞子のように大きな蛋白質組織の場合は、ELISA 法における洗

淨操作での脱落が懸念される。そこで、リジン前処理による抗原の吸着向上を図ったが、その効果は認められなかった。この理由としては、*B. cinerea* 孢子の大きさや形状が関与していると考えられるが、この点については、リジン以外の抗原吸着向上法と合わせて今後検討する必要がある。また、ブロッキングは、抗体の非特異的な吸着を防ぐ上で重要な操作の一つであり、使用に適する試薬は免疫に用いた抗原や手法によって異なるため、その都度最適な試薬を検討する必要がある。今回検討した2剤は、いずれもELISA法では、一般的な薬剤であるが、*B. cinerea* 孢子の検出には、PBSで10倍に希釈したブロックエースが適すると考えられた。

2 MAbの特性

抗体は、その大きさからアイソタイプと呼ばれるいくつかのクラスに分けられ、分子量が小さなクラスに属する抗体ほど特異性が高いとされている¹⁰⁾。また、そのアイソタイプは、免疫期間の長短に関係があるとされ、免疫初期はIgE、その後免疫期間が長くなるにつれ、IgMからIgGへとクラススイッチする¹⁰⁾。このことから、今回得られた抗体がすべてIgMタイプであったのは、免疫期間が約5週間と短かったためと考えられた。

3 MAb反応特異性調査法の検討

BCIP/NBT法により孢子を直接染色する方法は、*B. cinerea* 孢子の同属異種菌株の判定も可能であると考えられ、MAbの反応特異性調査法として十分有効であると考えられた。また、抗体を利用して孢子を染色する方法としては、蛍光抗体法⁴⁾の利用も可能である。しかし、この方法は、蛍光顕微鏡等特別な器材が必要であり、光学顕微鏡を用いるBCIP/NBT法の方がより簡便で実用性があると考えられた。

4 MAbの反応特異性

作出したMAbは、免疫源を含む8属9種の病原糸状菌菌糸および免疫源以外の5属7種の病原糸状菌孢子とは反応しなかった。またこのMAbは、*B. cinerea* のチオフアネートメチル耐性、感受性菌(九州大学保存株)および*B. cinerea* 標準菌株(MAFF 410003) 孢子とも反応した(データ略)。さらにBCIP/NBT染色法による染色程度によって、*Botrytis* 属の他の3種の異種菌株との判別が可能であったことから、作出したMAbは、*B. cinerea* 孢子と特異的に反応し、その特異性は、*B. cinerea* 孢子を判別するのに十分高いと考えられた。

以上のことから、MAbの作出と遠心操作を利用したBCIP/NBT法による孢子の検出は、*B. cinerea* 孢子を判別するのに十分有効であると考えられ、また、この手法

は、他の病原糸状菌にも応用可能であると思われた。

引用文献

- 1) Arie, T., Hayashi, Y., Nagatomi, A., Furuya, M. and Yamaguchi, I. (1991) Production and Partial Characterization of Monoclonal Antibodies against *Fusarium oxysporum* 860956a. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* **57**:696-701
- 2) Arie, T., Hayashi, Y., Yoneyama, K., Nagatomi, A., Furuya, M. and Yamaguchi, I. (1995) Detection of *Fusarium* spp. in Plants with Monoclonal Antibody. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* **61**:311-317
- 3) 日比忠明(1995)植物病理学事典(日本植物病理学会編), 東京:養賢堂, pp.198-199
- 4) 細川大二郎(1995)植物病理学事典(日本植物病理学会編), 東京:養賢堂, pp.201-203
- 5) 君島悦夫・小林慶則・西尾 健(1987)抗血清を利用した糸状菌病の診断. *植物防疫* **41**:442-448.
- 6) 小泉銘册(1993)作物ウイルス病事典.(土崎常男・栃原比呂志・亀谷満朗・柳瀬春男編), 東京:全国農村教育協会, pp.592-593.
- 7) Lin, N.S., Y.H. Hsu and H.T. Hsu (1990) Immunological Detection of Plant Viruses and a Mycoplasma-like Organism by Direct Tissue Blotting on Nitrocellulose Membranes. *Phytopathology* **80**:824-828
- 8) 益子 高・橋本嘉幸(1991)遺伝子・タンパク質実験操作プロットング法(口野嘉幸・平井久丸・櫻林郁之介編), 東京:ソフトサイエンス社, pp.351-356
- 9) Mazia, D., G. Schatten, W. Sale (1975) Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. *J Cell Biol* **66**:198
- 10) 長宗秀明・寺田 弘(1990)化学と生物実験ライン8単クローン抗体, 東京:廣川書店, pp.1-14, pp.69-115
- 11) 高橋義行(1995)植物病理学事典(日本植物病理学会編), 東京:養賢堂, pp.197-198
- 12) YUEN, G.Y., CRAIG, M.L. and AVILA, F. (1993) Detection of *Pythium ultimum* with a Species-Specific Monoclonal Antibody. *Plant Dis.* **77**:692-698