

ELISA 値に及ぼす 2・3 の要因について

長尾 記明・西尾 健

川合 昭

横浜植物防疫所

Some Factors Influencing the Absorbance Values in ELISA. Noriaki NAGAO, Takeshi NISHIO and Akira KAWAI (Yokohama Plant Protection Station). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* 21: 85-87 (1985)

はじめに

近年、酵素結合抗体法（ELISA）が病原体の検出や定量、あるいは病気の診断等に広く使われるようになってきた。種々の ELISA 用改良プレートが市販されるようになってきた。そこで、通常用いているダブルサンドウィッチ法で ELISA 検定を行う場合、プレートの種類、基質用試薬、使用後のプレートの洗浄等がどの程度発色に影響するかを調査し、ELISA 値に及ぼす要因について若干の検討を行なった。なお報告に当り、ジャガイモ葉巻ウイルス（PLRV）抗血清を分譲下さった新潟大学小島誠博士に厚くお礼申し上げる。

材料および方法

1. 供試ウイルスと植物

ブドウファンリーフウイルス（GFV）を保毒したブドウ品種ミッションおよびセントジョージ、PLRV に罹病したジャガイモ品種メイタイーンの各新葉または成葉を供試した。

ブドウ葉に対しては 2% polyvinylpyrrolidone（PVP）を加えた 2.5% ニコチン溶液、またジャガイモ葉には 0.85% NaCl, 0.05% Tween-20, 2% PVP を含

む 0.02M リン酸緩衝液、pH 7.4 を磨砕液として使用し、すり鉢で磨砕後低速遠心（3000×g, 10 分）して、各上清を ELISA 検定用試料とした。

2. プレートおよび試薬

供試プレートの種類は第 1 表に示した通りである。A プレートは通常の検査業務に使用されているものであり、その他は試供品を使用した。

基質用試薬の P-ニトロフェニルリン酸二ナトリウムはシグマ社の sigma 104 錠剤または和光純薬工業 KK の特級を用いた。

3. ELISA の手順

GFV および PLRV 抗血清からの γ -グロブリンの精製、アルカリフォスファターゼ（Sigma, type VII-S）との結合およびその後の手順は CLARK and ADAMS（1977）の方法に準じて行なった。

A プレートにおけるコーティング γ -グロブリンおよびコンジュゲイトの最適濃度はそれぞれ 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 400 倍希釈（ただし PLRV; 200 倍）であった。

検定に際しては、1 検体当たりプレートの 2 穴を用い、最終反応液に 2.5 ml の蒸留水を加えて、405 nm における吸光度を測定し、これを ELISA 値とした。

第 1 表 供試エライザプレート

プレートの略号	商 品 名	生 産 国
A	DYNATECH MICROELISA	西ドイツ
B	DYNATECH IMMULON TM	アメリカ
C	DYNATECH IMMULON TM ²	アメリカ
D	F	不 明 (三光純薬KK取扱い)
E	EFLAB _{0Y} (カートリッジ式)	フィンランド

結果および考察

1. 基質用試薬と ELISA 値

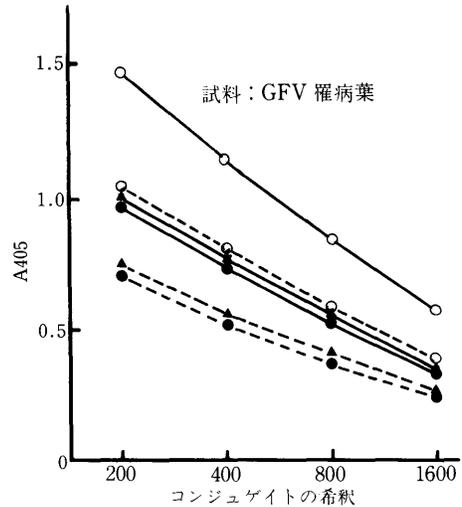
2社のP-ニトロフェニルリン酸を用いて、GFV に対する ELISA 値を比較した結果、和光試薬を用いた方が常に10~20%高く、しかも非特異発色は逆にやや低かった(第1図)。反復試験においても同じ傾向を示した。従って、Sigma社の錠剤は非常に便利ではあるが、秤量する手間をいとわねば、和光試薬は価格も安価であり、基質用試薬として優れているといえる。

2. プレートの種類と ELISA 値

プレートAにおけるELISA値を基準として、5種類のプレートの発色能を比較した。

A, B, Cの材質はポリスチレン“Immulon”であるが、Cは蛋白質等の吸着を良くするために特殊な処理が施されている。

GFV罹病葉を用いて、これら3種のプレートのELISA値をコーティング γ -グロブリンあるいはコン



第2図 3種エライザプレートの発色能の比較
プレートの種類: \blacktriangle ; A, \bullet ; B, \circ ; C
コーティング γ -グロブリン濃度; —2.5 μ g/ml, ---1.25 μ g/ml

ジュゲイトの濃度を変えて比較した結果の1例を第2図に示した。

A, BプレートにおけるELISA値はこの条件下ではほとんど変らなかった。しかしCのELISA値はAのそれより常に40~60%高い値を示し、Aにおけるコーティング γ -グロブリンまたはコンジュゲイト濃度をさらに2倍希釈して使用したとき、CとAのELISA値はほぼ同じとなった。

なお、いずれのプレートもコンジュゲイトを400倍以上に希釈すれば健全葉のELISA値は0.04~0.06となり、プレート間に非特異発色の差異は認められなかった。

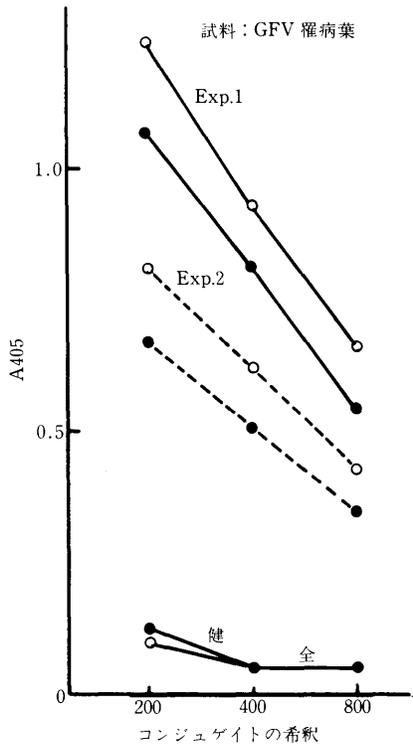
GFVとPLRVの各罹病葉を用いて、同一条件下でAとCにおけるウイルス検出限界を比較した結果の1例を第3図に示した。

葉汁液の10倍希釈区においてはCのELISA値はAのそれより20~30%、場合によっては50%以上高いこともあった。しかし葉汁液の希釈に伴って、CとAとのELISA値の差は小さくなり、2種プレートのウイルス検出限界に有意な差は認められなかった。

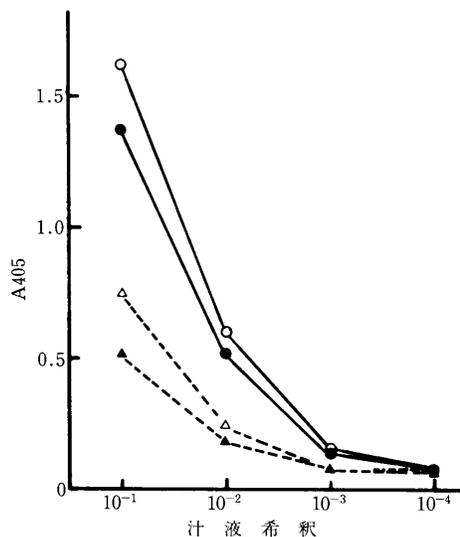
したがって、Cはコーティング γ -グロブリンの吸着が良いために、検体中のウイルス濃度がある一定以上より高い場合にその特性が発揮されると言える。

D, Eについても同様な試験を行なった結果DはAのELISA値の約50%程度、EはAとほぼ同じ発色能を示した。

5種類のプレートのELISA値の比較から、 $C > A \approx$



第1図 P-ニトロフェニルリン酸の2社製品の発色能の比較
 \bullet — \bullet Sigma 104 錠剤, \circ — \circ 和光純薬



第3図 2種エライザプレートのウイルス検出能の比較

●, ▲; Aプレート, ○, △; Cプレート
—; GFV罹病葉, ---; PLRV罹病葉

B≒E>Dの順にプレートの発色は良好であった。

3. プレートの洗浄とELISA値

使用後のプレート, A, B, Cを同一のデボッシュ液(30 g/l)に2日間浸漬し, 通常の洗い方で洗浄した。これらのプレートを用いて, GFVとPLRVをELISA検定した結果, いずれも未使用プレートのELISA値の10~20%に低下し, しかも非特異発色が高くなった。また同液に新しいAを浸漬し, 洗浄後PLRVを検定したとき洗浄プレートのELISA値は未使用プレートの約1/3に低下した。

一度発色の悪くなったこれらのプレートを新しく作製したデボッシュ, シカクリン等で再度洗浄したとき, Aの発色能は80%程度回復したが, Cは全く変わらなかった。

Aのデボッシュによる洗浄はむしろ未使用プレートより発色が良くなるのが明らかにされており(長

尾・西尾, 1983), 今まではこの洗浄法で全く支障を生じなかった。

洗浄プレートの発色能低下の原因について種々検討した結果, 特殊加工されたCと関係があるように思われた。未使用のCを新しいデボッシュ液で洗浄し, ELISA検定に用いても発色能は低下しないので, ELISA検定終了時に加える3M NaOHが関与しているように思われるが, その原因については明らかにできなかった。

いずれにしても同時に浸漬した他のプレートの発色にも影響を及ぼすことがあるため, 新しいタイプのプレートを使用する場合はプレートの特徴を十分把握した上で, 検定業務に用いる注意が必要であろう。

本調査において, プレートの種類や試薬を選ぶことによって, GFVやPLRVのELISA値を数十パーセント高めることは出来たが, 検出感度をさらに高めるためには現在用いている吸光度法を蛍光法などに変える必要がある。蛍光法においては例えばアルカリホスファターゼに対する基質として4-メチルウンベルフェル・リン酸を用い, 分光蛍光光度計で測定する。TORRANCE and JONES (1982)はこの方法を用いて, apple mosaic virusとPLRVの検出を試み, 基質にP-リトロフェニルリン酸を用いる吸光度法に比べて, 2~16倍検出感度が高いことを報告している。

引用文献

- CLARK, M.F. and A.N. ADAMS(1977) Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of Plant viruses. *J. gen. Virol.* **34**: 475-483.
- 長尾記明・西尾 健(1983) 検定後のELISA用マイクロプレートの洗浄法について. *植防研報* **19**: 105-107.
- TORRANCE, L. and R.A.C. JONES(1982) Increased sensitivity of detection of plant viruses obtained by using a fluorogenic substrat in enzyme-linked immunosolvent assay. *Ann. appl. Biol.* **101**: 501-509.