

カンキツタターリーフウイルスに対する モノクローナル抗体の作製*

川合 昭・小林 慶範・塚本 貴敬・台 喜吉
君島 悦夫・木村 茂・後藤 正昭
横浜植物防疫所

Production of Monoclonal Antibodies Against Citrus Tatter Leaf Virus. Akira KAWAI, Yoshinori KOBAYASHI, Takanori TSUKAMOTO, Kiyoshi DAI, Etsuo KIMISHIMA, Shigeru KIMURA and Masaaki GOTO (Yokohama Plant Protection Station, 1-16-10, Shinyamashita, Nakaku, Yokohama, Japan). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* 27: 55-60 (1991).

Abstract: The method for production of monoclonal antibodies (MCA) against citrus tatter leaf virus (CTLV) was studied. Hybridomas secreting MCA for CTLV were screened by indirect double antibody sandwich ELISA in which the polyclonal antibody was used as trapping antibody and partially purified sap of *Chenopodium quinoa* infected with CTLV in phosphate buffer that was treated with carbon tetrachloride and Mg-bentonite was used as antigen. Each isotype of MCA secreted by three selected hybridoma cell lines was IgG1, and these MCAs were confirmed to react with all virus isolates tested (including 20 isolates of CTLV and 2 isolates of apple stem grooving virus). The homologous viral antigen could be detected by direct double antibody sandwich ELISA using 3 MCAs in 1:516 diluted sap of the infected *C. quinoa* leaves and in 1:64 diluted sap of the infected citrus leaves, respectively.

Key words: citrus tatter leaf virus, monoclonal antibody

はじめに

カンキツタターリーフウイルス (citrus tatter leaf virus, CTLV) は、我が国のカンキツにおいて接ぎ木部異常病の病原とされており (MIYAKAWA and MATSUI, 1976)、また、輸入果樹類の隔離検疫においては、中国本土および台湾から導入されるカンキツ苗木・穂木から高率に検出されることも明らかにされている (西尾ら, 1982)。このため、CTLV は果樹母樹検疫、隔離検疫の重要な対象ウイルスとされており、簡便で精度の高い検定法の開発が望まれている。

著者らは既に CTLV 抗血清を作製し (西尾ら, 1989)、ペルオキシダーゼ (HRP) を用いた酵素結合抗体法 (ELISA) が CTLV の検定に有効であることを示した (川合・西尾, 1990)。しかし、CTLV は純化が比較的困難で収量も少なく、抗体価の高い血清を得るのが難しいため、ポリクローナル抗体 (PCA) を用いた CTLV 検定用試薬を長期に渡り安定供給するのが困難である。このため、抗体価の高いモノクローナル抗体 (MCA) を産生するハイブリドーマ (HM) の確立

が望まれる。そこで、CTLV に対する MCA の作製を試みた。

モノクローナル抗体の作製については農業生物資源研究所野津祐三博士の御指導を賜った。果樹試験場柳瀬春夫博士、徳島県果樹試験場辻 雅人氏、USDA・ARS M.S. Garnsey 博士からは貴重なウイルス株の分譲を賜った。また、当所前病菌課長西尾健博士からは有益な助言を受けた。記して深謝の意を表す。

材料および方法

供試ウイルス

MCA を作製するための抗原ウイルスには中国産カンキツ“大紅甜橙”から *Chenopodium quinoa* (キノア) を用いて単一局部病斑分離法により分離した K-1 株 (西尾ら, 1982) を供試した。当株をキノアで増殖し西尾ら (1989) の方法で純化して抗原ウイルスとした。MCA の反応特異性の調査には、日本産および中国産カンキツから分離した CTLV15 株、USA 産 CTLV4 株、日本産ユリの CTLV1 株、apple stem grooving virus (ASGV) では柳瀬博士から分譲を受けた P-208 および中国産ウメから分離した U-42 (高橋ら, 1989) の2株を供試した。

* 本報告の一部は、日本植物病理学会平成2年度夏季関東部会において発表した。

免疫方法

約8週齢のBALB/cマウス腹腔内に抗原を投与してマウスを免疫した。第1回目の免疫は、ウイルス懸濁液(0.26 A₂₈₉/ml)と当量の Freund's complete adjuvant を混合して投与し、第2回目からは、ウイルス懸濁液のみを2~5日間隔で投与した区と、ウイルス懸濁液と Freund's incomplete adjuvant を混合して1週間間隔で投与した区を設定した。

ハイブリドーマの作出

マウスミエローマ細胞は農業生物資源研究所から譲を受けた PAI 株を用いた。細胞融合、クローニングの方法は、GODING (1986) に準じて行った。すなわち、最終免疫3日後のマウス脾細胞(2.7×10⁸個)とマウスミエローマ細胞(1.1×10⁸個)をポリエチレングリコール(M.W. 4000, Merk 社)を用いて細胞融合を行い、MCA 産生 HM をスクリーニング後、限界希釈法によりクローニングを行った。

スクリーニングの方法

HM のスクリーニングはマイクロウェルプレート(ダイナテック社 U 底形イミュロン1プレート)を用いた間接 ELISA をアビジン-ビオチン法(Vecton 社ベクタステイン ABC キット)で行った。

スクリーニング用の抗原吸着プレートは次のようにして作製した。

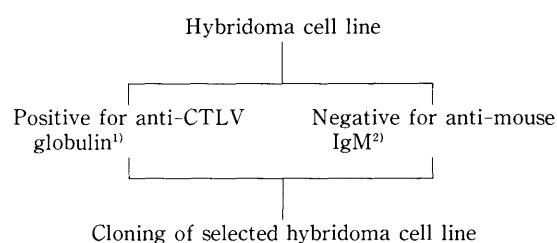


Fig. 1. Screening procedure for anti-CTLV globulin secreting hybridoma. Antigen absorption indirect-ELISA using Bectastain ABC Kit¹⁾ and alkaline phosphatase labelled goat anti-mouse IgM conjugate²⁾ were employed for detecting specific antibodies for CTLV. Antigen absorption microplate were prepared using the polyclonal antibody for CTLV as the trapping antibody and partially purified CTLV-infected Chenopodium quinoa leaf extract.

CTLV・K-1 株病キノア葉を葉重量の2倍容量の0.01 M 燐酸緩衝液(メルカプトエタノール0.1%, L-アスコルビン酸0.1%を含む, pH 7.6)で磨碎し、四塩化炭素・Mg-ベントナイト処理して低速遠心後の上清(4B 処理液)を PCA をコーティングしたプレートに投入して CTLV をプレートに吸着させ、スクリーニング用の抗原吸着プレートとした。

スクリーニングには抗原吸着プレート2枚を1組として HM 培養上清を反応させ、ABC キットで陽性で、抗マウス IgM ヤギ IgG-アルカリフォスファターゼ(AP) 標識抗体(コンジュゲート・Kirkegaard & Perry, LaB. Inc.)で陰性の Cell line を選択した(Fig. 1)。

イソタイプの判別

HM の産生する抗体のイソタイプは、マウスモノクローナルタイピングキット(Binding Site 社)を用いて HM の培養上清を調査し判定した。

MCA を用いた ELISA

HM をマウス腹腔内に接種して得られた腹水からプロテイン A を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより IgG を鈍化し、CLARK and ADAMS (1978) に従って、AP を用いたコンジュゲートを作製した。そして、二抗体サンドイッチ法 ELISA (DAS-ELISA) により、キノア葉およびカンキツ葉から CTLV の検出を試みた。

結 果

免疫方法

二通りの方法で免疫を行ったマウス血清の抗体価の測定は、ニトロセルロースメンブランに純化 CTLV 標品をプロットし、その上に段階希釈したマウス血清を反応させる Dot immunobinding assay (日比, 1984) により行った。その結果、第1回目の免疫後、純ウイ

Table 1. Screening of hybridomas for CTLV

Reaction in screening micro-plate	Numbers of hybridomas
Reactive in anti-IgM and anti-immunoglobulin plates	90
Reactive in anti-immunoglobulin plate and not reactive in anti-IgM plates	12

ルス液のみを短い間隔で連続して免疫したマウスの血清は 10^{-6} まで陽性、incomplete adjuvant を混合したウイルスを1週間間隔で免疫したマウス血清は、 10^{-3} まで陽性で、CTLV のマウスへの免疫は Adjuvant を用いた第1回目の免疫後は純化ウイルス液のみを短い間隔で連続して免疫した方が抗体価が顕著に高くなることが確認された。そこで、抗体価の高い方のマウスを用いて HM の作製を行った。

ハイブリドーマのスクリーニングおよび MCA の性質

Fig. 1 に示す方法でスクリーニングを行った結果、CTLV 抗体産生を示す HM 株が 102 株あった。このうち、抗マウス IgM-AP コンジュゲートに反応しなかった株は 12 株であった (Table 1)。

これらの 12 株をクローニングし、抗体価の高い MCA を産生すると考えられた株を選び 4B6, 9A3, 9E10 の 3 株の HM を確立した。これら 3 株の産生する MCA のイソタイプは、すべて IgG₁ であった。これら 3 株の HM をマウス腹腔に接種し MCA を含む腹水を採取した。HM の培養上清および MCA を含むマウス腹水の抗体価は、スクリーニングと同様の間接

ELISA で行った結果、第2表の通り、培養上清は 10^{2-4} 倍、腹水は 10^{5-7} 倍であった (Table 2)。

ゲル内2重拡散法

OHKI and INOUE (1987) の方法に従いゲル内二重拡散法による MCA の抗原抗体反応を調べた。その結果、3 株の産生する MCA はすべて CTLV 純化標品と反応して沈降帯を生じ、健全キノア汁液とは反応しなかった (Fig. 2)。

各ウイルス株に対する MCA の反応

CTLV-PCA をコーティングしたプレートに各ウイルス分離株罹病キノア汁液を 4B 処理してウイルスをトラップし、MCA を含む腹水を PBS で希釈して反応させ、ABC キットによる間接 ELISA を行った。また、同一試料は PCA-HRP コンジュゲートによる DAS-ELISA で検定した。その結果、3 クローンの産生する MCA は、Fig. 3 の通り、供試した CTLV 全株のほか、ASGV2 株にも反応することが確認された。

MCA を用いた ELISA

3 株の HM が産生する MCA を純化して AP コンジュゲートを作製し、固相化抗体 (コーティング IgG) とコンジュゲートを同一抗体とした場合、および異なる抗体を用いた場合で DAS-ELISA を行った。

その結果、4B6, 9A3 とも固相化抗体とコンジュゲートを同一抗体とした場合 K-1 株り病キノア汁液を PBS で段階希釈し、葉重量の 516 倍希釈液まで肉眼的に基質液の変色が確認された (Fig. 4)。また、K-1 株り病 'Cuban shaddock' 葉汁液を PBS で段階希釈した場合、4B6 では葉重量の 32 倍希釈、9A3 では 64 倍希釈まで肉眼的に基質液の変色が確認された (Fig. 5)。

また、4B6 を固相化抗体とし 9A3 のコンジュゲートを作用させた場合、あるいは逆の組み合わせでも、CTLV 検出感度は固相化抗体とコンジュゲートを同一抗体とした場合とほとんど相違は認められなかった。

なお、9E10 の産生する MCA をコーティングしたプレートには、K-1 株ウイルス罹病キノア葉汁液を反応させても、4B6, 9A3, 9E10 のいずれのコンジュゲートも陽性反応を示さなかったが、固相化抗体に 4B6, 9A3 を使用し、9E10 をコンジュゲートとした場合は、4B6, 9A3 コンジュゲートと同等の検出感度が得られた。

Table 2. Ig types and titers of monoclonal antibodies

Monoclonal antibody	Ig type	Titer in cultured fluid	Titer in ascitic fluid
4B6	IgG ₁	10^{3-4}	10^{6-7}
9A3	IgG ₁	10^{3-4}	10^{6-7}
9E10	IgG ₁	10^{2-3}	10^{5-6}

Dot immunobinding assay was used to determine the antibody titer.

Purified CTLV was used as the trapping antigen.

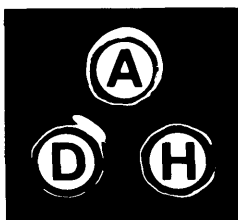


Fig. 2. Immunodiffusion test in Gelrite/SDS gel. Well contain: top (A), ascitic fluid of 4B6 clone; bottom left (D), purified preparation of CTLV; bottom right (H), healthy sap of *C. quinoa*.

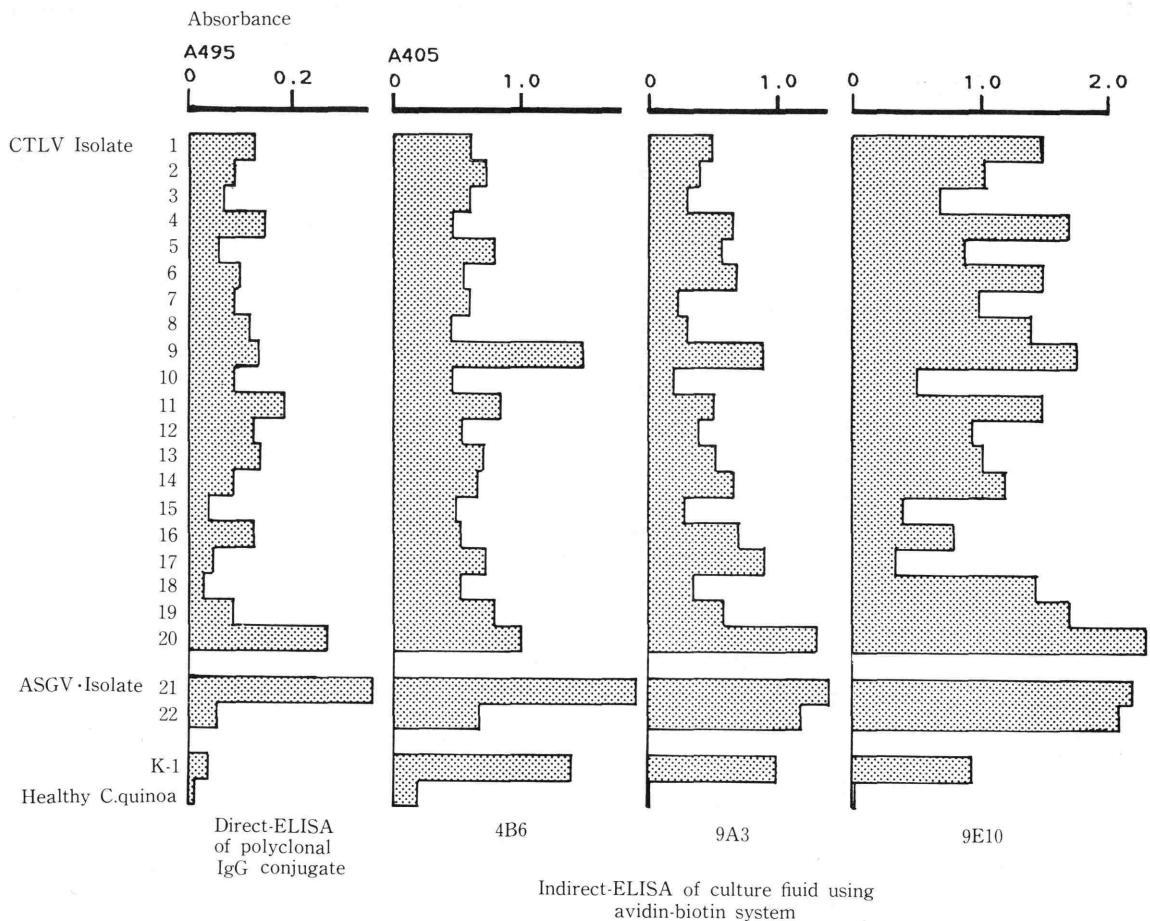


Fig. 3. Reactions of 3 monoclonal antibodies in culture fluid with virus isolates. Virus isolates in infected *C. quinoa* were absorbed in microplate coated with polyclonal antibody of CTLV. The reactions of monoclonal antibodies in culture fluid were confirmed by indirect-ELISA using avidin-biotin system in the microplate absorbed with virus isolates. The another microplate absorbed with virus isolates was checked simultaneously by direct-ELISA using the peroxidase labeled polyclonal antibody conjugate. Isolate 1~20 were citrus tatter leaf virus. Isolate 1~9 were citrus isolates in Japan. Isolate 10~13 were obtained from Dr. Garnsey, S.M. USDA, ARS. Isolate 14~19 were chinese citrus isolates. Isolate 20 was Easter lily (*Lilium longiflorum*) isolate in Japan. Isolate 21 and 22 were apple stem grooving virus. K-1 was the homologous antigen for 3 monoclonal antibodies and the polyclonal antibody.

考 察

ELISA を用いたスクリーニングのためのウイルス抗原吸着プレートの作製法としては、各種の方法が考えられている (OSIHMA and SHIKATA, 1990)。

CTLV の場合、当初は、ウサギ・PCA をトラッピング抗体として CTLV り病キノア葉のリン酸緩衝液粗汁液からウイルス抗原吸着プレートを作製し、一方、健

全キノア葉を炭酸緩衝液で磨砕した粗汁液による健全葉抗原プレートを作製して、ウイルス抗原吸着プレートに陽性で健全葉抗原プレートに陰性の cell line を選択した。しかし、この方法で得た HM18 株はすべて IgM 産生株であった。現在までの著者等の経験では IgM の酵素結合抗体作製が困難であったため、IgM 産生 HM を拾わず、また、同時に健全葉抗体産生 HM も拾うことの無いスクリーニング方法の検討を行った。

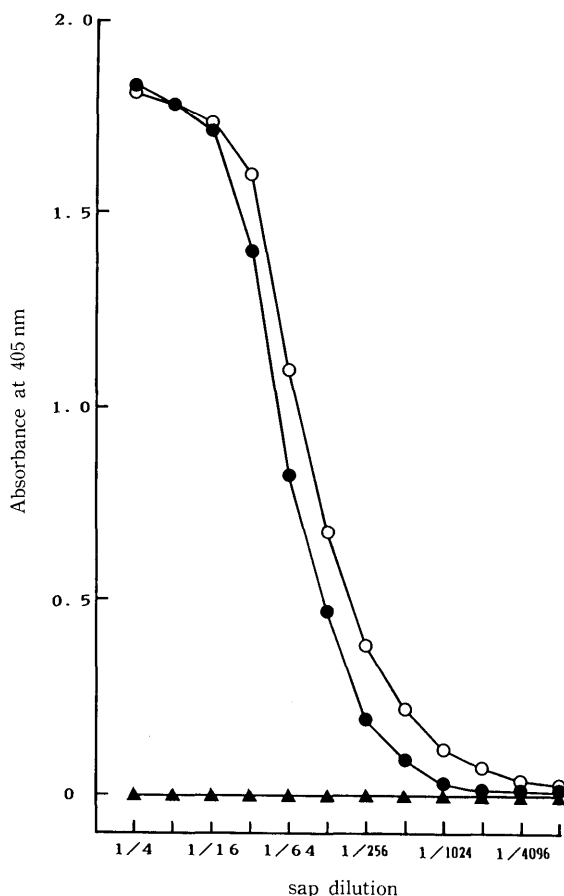


Fig. 4. Detection sensitivity of monoclonal antibody (MCA) double-sandwich direct ELISA in sap from *C. quinoa* leaf tissue infected with the homologous virus isolate (K-1). The same MCA was used as the coating antibody and alkaline phosphatase-labeled antibody. Solid circles (●—●) indicate the detection of infected samples by 4B6 MCA, empty circles (○—○) indicate the detection of infected samples by 9A3 MCA and solid triangles (▲—▲) indicate the healthy samples by both MCAs.

そこで、CTLV・K-1 株病キノア葉粗汁液を 4B 処理し、低速遠心した上清からトラッピング抗体を用いてウイルス抗原吸着プレートを作製した。MCA の F(ab')₂ を用い同様に作製したウイルス抗原吸着プレートについて、抗健全葉ウサギ IgG とプロテイン A-ペルオキシダーゼコンジュゲートを用いて健全葉抗体の反応を調べた結果、4B 処理汁液からウイルスを

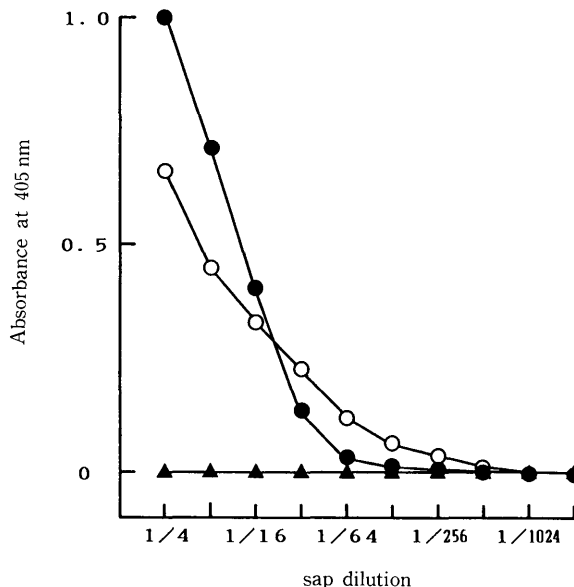


Fig. 5. Detection sensitivity of monoclonal antibody (MCA) double-sandwich direct ELISA in sap from citrus leaf tissue infected with the homologous virus isolate (K-1). The same MCA was used as the coating antibody and alkaline phosphatase-labeled antibody. Solid circles (●—●) indicate the detection of infected samples by 4B6 MCA, empty circles (○—○) indicates the detection of infected samples by 9A3 MCA and solid triangles (▲—▲) indicates the healthy samples by both MCAs.

吸着させたプレートは健全葉抗体にはほとんど反応しないことが確認された。このことから 4B 処理汁液から抗原吸着プレートを作製して用いれば、健全葉抗原プレートを使用しなくとも健全葉に対する抗体を産生する株を拾うことはないと考えられた。そこで、Fig. 1 に示すスクリーニング手順により、CTLV、ASGV 分離株に反応する IgM ではない MCA を産生する HM を得ることが出来た。

MCA による ELISA の試みでは、固相抗体とコンジュゲートの抗体の組合せで、4B6 と 9A3 の組合せではどのような組み合わせでも K-1 株抗原の検出が可能であったが、9E10-9E10 では抗原の検出が認められず、さらに、9E10 を固相とし、4B6, 9A3 コンジュゲートを反応させた場合にも同様に抗原の検出が認められなかった。しかし、9E10 コンジュゲートは、固相が 4B6, 9A3 抗体の場合抗原の検出が可能であった。この

ことから、9E10 抗体の確認するエピトープは 4B6、9A3 抗体のそれらとは異なり、ウイルスが固相にトラップされるのに不都合な位置にあるものと考えられる。

前田ら (1988) は固相化と酵素標識に同じ抗体を用いた場合、両相間で競合反応が生じ、抗原の検出感度が低下するが、異なるエピトープを確認する 2 種の抗体を使用すると検出感度が上がることを示したが CTLV の 3 抗体は、トラッピング抗体に 9E10 を使用しないかぎり、どのような組み合わせでも、CTLV・K-1 株に対しては検出感度の変化は顕著には現れなかった。また、各ウイルス分離株に対する MCA の反応を調査した結果、PCA による固相にトラップされたウイルスに対しては 3 抗体のすべてが供試したすべてのウイルス株に反応し、ASGV には CTLV と共通のエピトープの存在することが示された。

CTLV には血清型についての詳細な調査は未だ行なわれていない。今後は、今回得られた MCA による CTLV 各分離株の ELISA における反応等により、CTLV の血清型の異なる株の存在の有無を調査し、MCA の ELISA がカンキツの CTLV 検定に対し有効かどうか確認する必要がある。また、CTLV と ASGV を識別する抗体が得られるかどうかを確認する必要があると考えられる。

摘 要

1. カンキツタターリーフウイルスに対するモノクローナル抗体の作製を試みた。
2. マウスへの免疫は、アジュバンドの混用で 1 回投与した後、純化ウイルス液のみを短期日間隔に投与した場合、マウスの抗体価が高くなった。
3. スクリーニング用の抗原吸着プレートは、ポリクローナル抗体をコーティングしたプレートに抗原ウイルス病 *Chenopodium quinoa* 葉汁液を四塩化炭素-Mg・ペントナイト処理して反応させ作製した。
4. 得られたモノクローナル抗体は、供試した

CTLV20 株、ASGV2 株すべてに反応した。

5. MCA を用いた ELISA では、Homologus のウイルス株に対し、*Chenopodium quinoa* 葉では 512 倍希釈液まで、カンキツ葉では 64 倍液まで検出可能であった。

引用文献

- CLARK, M.F. and A.N. ADAMS (1977) Characteristics of the Microplate Method of Enzyme-Linked Immuno-sorbent Assay for the Detection of Plant Viruses. *J. gen., Virol.* **34**: 475-484.
- GODING, J.W. (1986) *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*. Academic Press, London.
- 日比忠明 (1984) DIBA 法による植物ウイルスの検出法. *植物防疫* **38**: 380-384.
- 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.
- 前田 倅憲・佐古宣道・井上成信 (1988) モノクローナル抗体を用いた ELISA による CMV の高感度検出ならびに迅速・簡易検出. *日植病報* **54**: 403.
- MIYAKAWA, T. and C. MATAUI (1976) A Bud-Union Abnormality of Satsuma Mandarin on *Poncirus trifoliata* Rootstock in Japan. In *Proc. 7th. Conf. IOCV, Univ. Calif. Pl. Path., Riverside*, pp. 125-131.
- 西尾 健・川合 昭・加藤幹雄・小林敏郎 (1982) 隔離検疫中の中国及び台湾産カンキツから分離された汁液伝染性 Closterovirus. *植防研報* **18**: 11-18.
- 西尾 健・川合 昭・高橋 勤・難波成任・山下修一 (1989) カンキツタターリーフウイルスの純化ならびに諸性質. *日植病報* **55**: 254-258.
- OHKI, S. and T. INOUE (1987) Use of gelite as a gelling agent in immunodiffusion test for identification of plant virus antigens. *Ann. Phytopath. Soc. Japan.* **53**: 557-561.
- OHSHITA, K. and E. SHIKATA (1990) On the Screening Procedures of ELISA for Monoclonal Antibodies against Three Luteoviruses. *Ann. Phytopath. Soc. Japan.* **56**: 219-228.