

蛍光基質あるいは酵素サイクリング法を用いたELISAによるキュウリモザイクウイルスの高感度検出

前田 孚憲・佐古 宣道*・井上 成信

Highly Sensitive Detection of Cucumber Mosaic Virus by Using
Fluorogenic Substrate or Enzyme-Amplified Assay in
Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Takanori MAEDA, Nobumichi SAKO*
and Narinobu INOUE

Monoclonal antibody (MAb) was applied to a double-antibody sandwich ELISA (DAS ELISA) for highly sensitive detection of cucumber mosaic virus. Alkaline phosphatase-labeled MAb with high activity was used to raise the ratio of specific- and nonspecific-adsorption of conjugate (S/N ratio) on polyclonal antibody coated solid phase. Also the assay with a fluorogenic substrate or an enzyme-amplified assay which is highly sensitive for measurement of enzyme activity was employed to increase the sensitivity of the assays. This ELISA systems proved to be more sensitive than the conventional assay using *p*-nitrophenyl phosphate, and could detect 100 pg/ml of purified virus.

Key words: Cucumber mosaic virus, Monoclonal antibody, DAS ELISA, Fluorogenic substrate, Enzyme-amplified assay.

緒 言

Double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS ELISA) の検出感度は種々の要因により左右されるが、高感度検出を行うには酵素標識抗体（コンジュゲ

Research Institute for Bioresources, Okayama University, Kurashiki 710, Japan

平成5年1月14日受理 (Received January, 1993)

本研究の一部は昭和61～63年度文部省科学研究費（試験研究 I）によって行われた。課題名「モノクローナル抗体を利用する植物病原ウイルスの診断技術の確立と実用化」（代表者、佐古宣道），課題番号「61860005」

* 佐賀大学農学部。

蛍光基質あるいは酵素サイクリング法を用いたELISAによるキュウリモザイクウイルスの高感度検出

ート)の固相への特異的吸着量(S)と非特異的吸着量(N)の比(S/N比)が高いこと、及び酵素活性を高感度で測定できることの2点が必須条件である。

前報(Maeda *et al.*, 1988)において、我々はキュウリモザイクウイルス(CMV)に対するモノクローナル抗体を用いて作製した酵素標識抗体はウサギのポリクローナル抗体のそれよりも活性が約8倍高いことを報告した。本実験では高活性の酵素標識モノクローナル抗体を用いることによりS/N比を大きくするとともに、酵素活性の高感度測定に蛍光法あるいは酵素サイクリング法を適用することにより、DAS ELISAによるCMVの超高感度検出を試みた。

蛍光分光光度計の使用にあたり、便宜をはかっていただいた岡山大学資源生物科学研究所松本英明教授に謝意を表する。

材料及び方法

1. 供試ウイルス

本実験にはすべてCMV黄斑系(CMV-Y, 都丸・日高, 1960)を用いた。ウイルスはタバコ(品種, White Burley)あるいはツルナの接種葉から前報(前田ら, 1983)の方法に従って精製した。

2. ポリクローナル抗体(PAb)

抗血清は精製したCMV-Yをウサギにアジュバントとともに4回筋肉注射して作製した。本抗血清は寒天ゲル内二重拡散法で1:256力価を有するものである(前田ら, 1985)。抗血清はあらかじめ健全タバコ葉より抽出したタンパク質をグルタルアルデヒド処理して作製した不溶化抗原で吸収した(Clark and Bar-Joseph, 1984)。IgGは抗血清より硫酸塩析法及びDEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーにより精製した。

3. モノクローナル抗体(MAb)

精製したCMV-Yで免疫したマウスの脾臓細胞と同系マウス由来の骨髄腫細胞(P3U1)とをポリエチレングリコール法により融合させ、限界希釈法により抗体産生単一クローンを得た(Maeda *et al.*, 1988)。MAbはハイブリドーマをマウスの腹腔内に注射して産生させた。本実験には高力価のMAb-2を供試した。MAb-2の腹水中の力価は間接ELISAで1:1,562,000であり、抗体のサブクラスはIgG_{2a}である。また、MAb-2はCMVの粒子及びD-proteinの両者と反応するとともに、CMVのYとP serotypeに共通のエピトープを認識する抗体である(Maeda *et al.*, 1988)。

MAbは腹水よりProtein A-Affi-Gelカラム(Bio-Rad)を用いたアフィニティクロマトグラフィーにより精製した。

4. 酵素標識抗体

1mlのPBSに溶解したPAbあるいはMAb(1mg)に2.5mgのアルカリホスファターゼ(ALP)(Type VII-S, Sigma)を溶解し、PBSに対して透析後、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3時間置いた。標識抗体はPBSに対して透析したのちBSA (1%) 及びNaN₃ (0.02%) を加え4℃で保存した。

5. DAS ELISA

ELISAはClark and Adams (1977)の方法に従い、ポリスチレンプレート(Nunc-Immunoplate I, Inter Med)を用いて行った。コーティング抗体にはすべての実験にウサギのPAb (2 μ g/ml)を用いた。ウイルスをトラップさせたのちMAbコンジュゲートあるいはPAbコンジュゲートを反応させた。IgGのコーティングは30℃, 3時間, 抗原の反応は4℃, 16時間, コンジュゲートの反応は30℃, 3時間とした。ALP活性の検出は以下に述べる蛍光法あるいは酵素サイクリング法により行った。なお、一部の実験では比較のため

-nitrophenyl phosphate (NPP)を用いる比色法も行った。

6. 蛍光法

蛍光法ではALPの基質として4-methylumbelliferyl phosphate (MUP)を用いた(Torrance and Jones, 1982)。0.1M diethanolamine (pH 9.8)に溶解したMUP (15 μ g/ml)を1穴当たり200 μ lずつ入れ30℃で1時間反応させた後、1穴当たり50 μ lの3M K₂HPO₄-KOH緩衝液(pH 10.4)を加えて反応を停止させた。3穴の反応液を集め、蒸留水で4倍に希釈した液をダブルビーム蛍光分光光度計(島津RF-503型)を用いて、励起波長:368nm, 蛍光波長:448nmの条件で測定した。

7. 酵素サイクリング法

酵素サイクリング法は最近Stanley *et al.* (1985)によって開発されたALP活性の高感度測定法である。本法の原理をFig. 1に示した。実験操作を簡易化するために所定の量のアルコール脱水素酵素及びジアホラーゼの混合溶液にキャリアーとしてBSAを加え、バイアルビンに小分けして凍結乾燥したものを使用した。

0.05M diethanolamine, pH 9.5に溶解した0.2mM NADP⁺を1穴あたり80 μ l加え、25℃で10-20分間反応させた。次にamplifierとして12 mlの3%エタノールを含む0.025 M リン酸緩衝液, pH 7.2に3mg アルコール脱水素酵素, 3mg ジアホラーゼ, 1mM INT-バイオレットを溶解した液を、1穴あたり160 μ l入れ、25℃で5-10分間反応させた。0.2M 硫酸を加えて反応を停止したのち、492nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー(MPR-A4型, 東洋曹達工業)で測定した。

実験結果

1. 蛍光法によるCMVの検出

PAbをコーティングしたプレートに段階希釈した0, 0.1, 1, 10 ng/mlの精製CMVを加え反応させた。次に、2段階希釈したPAbコンジュゲート(800~6,400倍)あるいはMAbコンジュゲート(3,200~25,600倍希釈)を反応させ、蛍光法により検出した。この場合ウイルス濃度0区における蛍光強度を1とし、それぞれのウイルス濃度区の相対的蛍光強度はそれに対する比で表した。

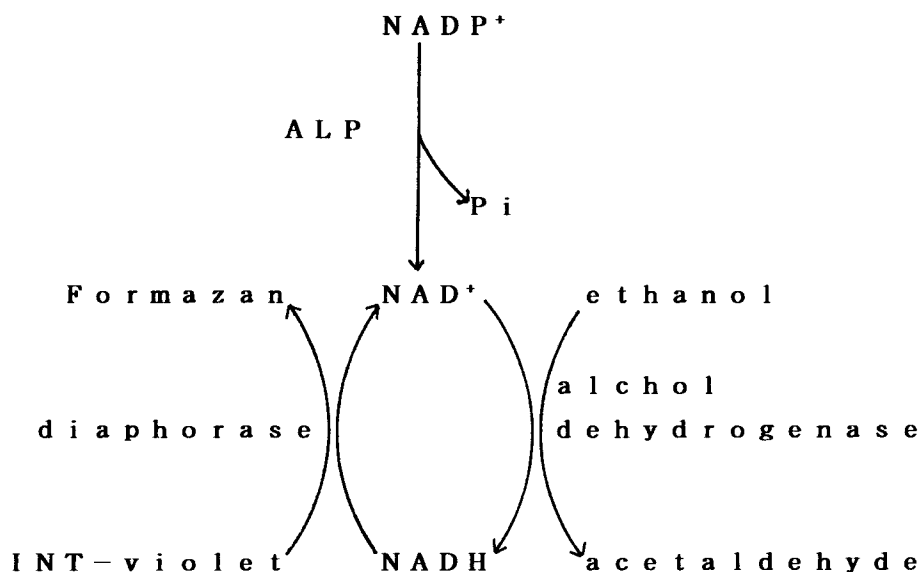


Fig. 1. Enzyme amplification scheme for assay of alkaline phosphatase (ALP) activity (Stanley *et al.*, 1985). ALP catalyses dephosphorylation of NADP^+ to NAD^+ . The cycling of NAD^+ - NADH in a redox cycle reduces tetrazolium salt to an intensely colored formazan dye.

予備実験の結果、コンジュゲートの希釈は MAb では12,800倍, PAb では3,200倍が適当であると思われた (実験結果は示していない)。

上記の条件により MAb コンジュゲートを用いて精製ウイルスの検出を行った。なお、対照として PAb コンジュゲートも供試した。Fig. 2 に示すように、MAb コンジュゲートを用いた場合、ウイルス濃度 0.1 ng/ml で相対的蛍光強度は約 1.6, 1 ng/ml で約 2.2 であったが、PAb コンジュゲートを用いた場合、0.1 ng/ml では蛍光強度はほとんど増加せず、1 ng/ml で 1.2 にすぎなかった。即ち、MAb コンジュゲートでは 0.1 ng/ml のウイルスを検出できたが、PAb コンジュゲートの検出感度は 1 ng/ml であった。

2. 酵素サイクリング法による CMV の検出

予備実験として NPP を用いた比色法と酵素サイクリング法による ALP 活性の測定感度の比較を行った。実験には MAb コンジュゲートを段階希釈した溶液を ALP 活性測定用の試料として使用したが、Fig. 3 に示したように酵素サイクリング法による ALP 活性の測定感度は従来の NPP を用いる比色法に比較してかなり高かった。

次に、MAb コンジュゲートを用いた DAS ELISA に酵素サイクリング法を適用し、精製ウイルスの検出を行った。予備実験の結果より MAb コンジュゲートは10,000及び20,000倍希釈を用いた。 NADP^+ の反応: 20分間, amplifier の反応: 10分間の条件で検出を行ったが、低濃度のウイルス濃度区においても比較的高い ELISA 値が得られ、その検出感度は 0.1 ng/ml であり、NPP を用いる従来の比色法よりも高かった (Table 1)。

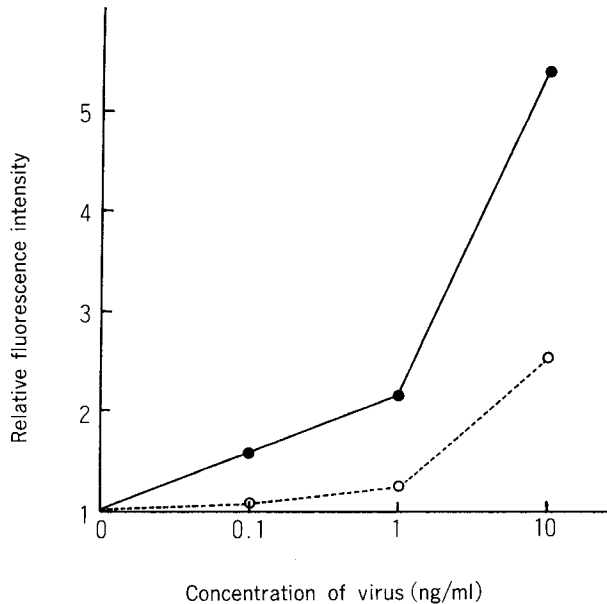


Fig. 2. Detection of cucumber mosaic virus by DAS ELISA using fluorogenic substrate. Polystyrene plates were coated with polyclonal antibody and then reacted with purified virus. Trapped virus was detected with alkaline phosphatase-labeled polyclonal antibody (○ --- ○), at a dilution of 1: 3,200 or monoclonal antibody conjugate (● — ●), at a dilution of 1: 12,800. Enzyme activity was detected with 4-methylumbelliferyl phosphate as an enzyme substrate.

考 察

DAS ELISA の検出感度は種々の要因により左右されるが、高感度検出を行うには、コンジュゲートの固相への特異的吸着量 (S) と非特異的吸着量 (N) の比 (S/N 比) が大きいことが必要である。さらに、S/N 比が大きくてもウイルスに結合したコンジュゲートの酵素活性が高感度で測定できなければ高感度検出は成立しない。本実験では高活性の酵素標識 MAb を用いることにより S/N 比を大きくするとともに、酵素活性の高感度測定法である蛍光法あるいは酵素サイクリング法を適用することにより、CMV の超高感度検出を試みた。蛍光法は NPP の代わりに、ALP の蛍光基質である MUP を用いる方法であり、酵素活性の測定感度は NPP を用いる比色法の数百倍であるとされている (石川, 1982)。また、酵素サイクリング法は ALP の基質として NADP⁺ を用い、酵素反応生成物の NAD⁺ をアルコール脱水素酵素とジアホラーゼによる酸化—還元サイクルにのせ、テトラゾリウム塩 (INT-バイオレット) が還元されて生じたホルマザン型色素を比色定量する方法であり (Stanley *et al.*, 1985; Johansson *et al.*, 1986)、その ALP 測定感度は蛍光法よりさらに数倍高い (石川, 1987)。

MAb コンジュゲート及び PAb コンジュゲートを用いた蛍光法による精製ウイルスの検出を行った結果、PAb コンジュゲートの検出感度は 1 ng/ml であり、比色法と同程度であったが、MAb コンジュゲートでは 0.1 ng/ml のウイルス濃度まで検出することができた。即

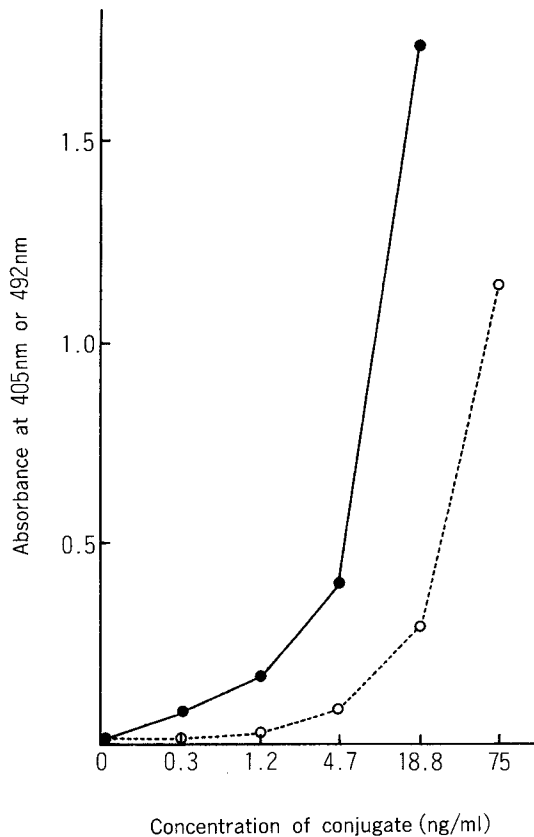


Fig. 3. Comparison of conventional assay with *p*-nitrophenyl phosphate (○---○) and enzyme-amplified assay (●—●) for measurement of enzyme activity of alkaline phosphatase-labeled monoclonal antibody.

ち、MAb コンジュゲートの活性は PAb コンジュゲートよりも高いために、固相への相対的な非特異的吸着が少なくなり、その結果 S/N 比が大きくなることによって低濃度のウイルスの検出が可能となったものと思われた。Torrance and Jones (1982) は PAb と蛍光法を用いた DAS ELISA により数種の植物ウイルスの検出を行っているが、ウイルスの検出感度が比色法に比較して prune dwarf virus, apple mosaic virus では 2 ~ 4 倍, potato leafroll virus では 4 ~ 16 倍増加したことを報告している。本実験において PAb を用いた場合、蛍光基質を使用しても従来の NPP を用いる比色法と比較してウイルスの検出感度が上昇しなかったことから、本実験系では S/N 比がそれほど大きくなかったものと判断された。

一般的に、蛍光法は比色法に比較してウイルスの検出感度が高くなることから、医学分野においては広く用いられている。しかし、その測定には高額機器である蛍光分光光度計あるいは蛍光マイクロプレートリーダーを必要とすることや、反応結果の肉眼判定ができない欠点があり、植物病理学の分野ではほとんど普及していない。今後、これらの機器の低価格化が進めば植物ウイルス学の分野においても普及すると考えられる。

また、MAb コンジュゲートを用いた酵素サイクリング法によっても CMV を高感度で検

Table 1. Detection of cucumber mosaic virus by using enzyme amplified assay in DAS ELISA^{a)}

Virus concentration (ng/ml)	Dilution of MAb-conjugate	
	1: 20,000	1: 10,000
0	<0.01 ^{b)}	<0.01
0.01	<0.01	<0.01
0.1	0.04	0.04
1	0.12	0.17
10	0.65	0.67
100	0.91	1.05

a) The ELISA procedure was the same as in Fig. 2. NADP⁺ was allowed to react for 20 min and then the amplifier was reacted for 10 min at 25 °C.

b) Absorbance values at 492 nm.

出すことができた。酵素サイクリング法は MAb を用いた ELISA によるヒトの甲状腺刺激ホルモン (TSH) に初めて応用され (Stanley *et al.*, 1985), その検出感度は NPP を用いる比色法の約70倍であることが示されている。

Torrance (1987) は barley yellow dwarf virus に感染したエンバク及び保毒アブラムシからのウイルスの検出に本法を用いて好結果を得ている。酵素サイクリング法は蛍光法とは異なり、比色法に用いられるマイクロプレートリーダーの使用が可能であり、反応結果の肉眼判定ができる。その反面、使用する試薬の種類が多いために検出に要する経費が高くなること、及び従来の比色法に比較して操作が煩雑である欠点がある。将来、低価格の検出キットが入手できるようになれば、植物ウイルスの検出、診断に広く用いられるようになるものと思われる。

以上述べたように、高活性の MAb コンジュゲートと高感度の酵素活性測定法を用いることにより、CMV の超高感度検出が可能になることが明らかになった。植物ウイルス学の分野において、ELISA はウイルスの検出、診断に広く用いられており、すでにその有用性が実証されている。しかし、ウイルスの検定や診断をより確実化し、かつ操作を簡易化するため、なお一層の高感度化及び簡易化が望まれている。一般的に、高感度化と簡易化とは相反するものであるため、高感度化が達成されることにより、検出に要する時間の短縮など、より一層の簡易化が可能になると考えられる。

摘 要

DAS ELISA によるキュウリモザイクウイルスの超高感度検出を試みた。コーティング抗体 (捕捉抗体) としてウサギのポリクロナル抗体を、検出抗体 (酵素標識抗体) として高活性の MAb コンジュゲートを用いることにより固相への特異的吸着量と非特異的吸着量の比 (S/N 比) を大きくするとともに、酵素活性の高感度測定に 4-methylumbelliferyl phosphate を用いる蛍光法あるいは酵素サイクリング法を用いた。両法は *p*-nitrophenyl phosphate を用いる比色法よりもウイルスの検出感度が高く、100 pg/ml の精製ウイルスを検出することが

蛍光基質あるいは酵素サイクリング法を用いたELISAによるキュウリモザイクウイルスの高感度検出できた。

キーワード：キュウリモザイクウイルス，モノクローナル抗体，DAS ELISA，蛍光基質，酵素サイクリング法

引用文献

1. 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.
2. 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. eds.), 51-85. Academic Press, INC.
3. 石川榮治. 1982. 測定感度. (石川榮治他編) 酵素免疫測定法. 50-66. 医学書院, 東京.
4. 石川榮治. 1987. 超高感度測定法. (石川榮治他編) 酵素免疫測定法. 126-135. 共立出版, 東京.
5. Johannsson, A., Ellis, D. H., Bates, D. L., Plumb, A. M. and Stanley, C. J. 1986. Enzyme amplification for immunoassays. Detection limit of one hundredth of an attomole. *J. Immunol. Methods.* 87: 7-11.
6. 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.
7. Maeda, T., Sako, N. and Inouye, N. 1988. Production of monoclonal antibodies to cucumber mosaic virus and their use in enzyme-linked immunosorbent assay. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 54: 600-605.
8. 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.
9. Stanley, C. J., Johannsson, A. and Self, C. H. 1985. Enzyme amplification can enhance both the speed and the sensitivity of immunoassays. *J. Immunol. Methods.* 83: 89-95.
10. 都丸敬一・日高 醇. 1960. タバコからえられたキウリモザイクウイルスの系統. 第Ⅲ報, 黄斑系, 秦野たばこ試報. 46: 143-149.
11. Torrance, L. 1987. Use of enzyme amplification in an ELISA to increase sensitivity of detection of barley yellow dwarf virus in oats and in individual vector aphids. *J. Virol. Methods* 15: 131-138.
12. Torrance, L. and Jones, R. A. C. 1982. Increased sensitivity of detection of plant viruses obtained by using a fluorogenic substrate in enzyme-linked immunosorbent assay. *Ann. Appl. Biol.* 101: 501-509.