

# 抗体利用による病原糸状菌の簡易検出法の開発

## 第2報 *Fusarium solani* のモノクローナル抗体の作出

草野成夫・平島敬太・下村克己

病原糸状菌の簡易検出を目的として、*Fusarium solani* 菌糸破砕液を抗原としたモノクローナル抗体 (Mab) を作出した。得られた Mab を間接酵素結合抗体法 (間接 ELISA) で検定したところ、ポリクローナル抗体 (Pab) と比較して感度が2～4倍向上し、*Fusarium* 及び *Gibberella* 属菌以外の他属菌株に対する交差反応が低下し、特異性が高くなった。抗原に対する特異性は、アイソタイプ IgG の Mab が IgM の Mab より高かった。また、Dot Immunobinding Assay (DIBA) では間接 ELISA よりも感度が劣る傾向にあった。罹病組織からの ELISA による *Fusarium* 属菌の検出については、作出した Mab のうち3G1のみが、超音波処理したトマト罹病組織の磨砕抽出液からの検出に有効であった。

[キーワード: モノクローナル抗体, *Fusarium solani*, 間接 ELISA, DIBA, 特異性]

Simple and Rapid Detection of Pathogenic Fungi Using Antibodies (2) Production of Monoclonal Antibody against *Fusarium solani*. KUSANO Nario, Keita HIRASHIMA and Katsumi SHIMOMURA. (Fukuoka Agric. Res. Cent., Chikushino, Fukuoka 818, Japan) *Bull. Fukuoka Agric. Res. Cent.* 14: 159-162 (1995)

Monoclonal antibodies (Mab) for the detection of *Fusarium* were produced by fusing spleen cells of mice immunized by mycelia suspension of *Fusarium solani* with myeloma cells. We obtained 2 to 5 times higher sensitivity in the detection of *Fusarium* by indirect ELISA using Mab rather than polyclonal antibody (Pab). The specificity of Mab for other genera except the genus *Fusarium* and *Gibberella* was higher than that of Pab. In the isotype of immuno globulin produced from Mab, immuno globulin G's specificity was slightly higher than immuno globulin M. The sensitivity of indirect ELISA was higher than Dot Immunobinding Assay (DIBA) in detecting fungi. Using only the 3G1 of Mab in indirect ELISA, it was also possible to detect *Fusarium* from the ultrasonic extraction of the fungal infected tomato plants.

[Key words: Monoclonal antibody, *Fusarium solani*, Indirect ELISA, DIBA, Specificity]

## 緒 言

血清学的手法を植物病原糸状菌の分類・同定・検出や病害の診断に利用しようとする試みは、ウイルスや細菌に比べると極めて少なく、*Phytophthora*, *Pythium* 属などで行われているにすぎない<sup>1,7)</sup>。筆者らは、本研究の第1報で *Fusarium solani* の抗血清を作成し、免疫期間とその力価、血清学的特異性並びに罹病組織からの検出について報告した。しかし、抗血清を利用する場合、抗原濃度が高くなると非特異反応を起こし易く、吸収操作等の工夫も必要となる。そこで、抗原認識部位の特異性が高く微量タンパク質の高感度検出が可能であるモノクローナル抗体 (Monoclonal Antibody: Mab) を作出し、酵素結合抗体法 (Enzyme-linked Immunosorbent Assay: ELISA) 及び Dot Immunobinding Assay (DIBA) の手法を用いて、各種糸状菌に対する反応特性及び罹病組織からの検出について検討を行ったので、その結果について報告する。

## 試 験 方 法

### 1 Mab の作成

免疫源 (抗原) として供試した *Fusarium solani* (元農林水産省果樹試験場口之津支場久原重松氏より分譲) は、ジャガイモ寒天培地 (PDA) 上で2～4週間培養し、その菌層をかきとり、0.15M NaCl 加用りん酸緩衝液 (PBS,

0.02M, pH7.4) に0.8～1.0mg/mlの菌糸を浮遊させ、超音波ホモジナイザー (日本精機製作所, US-300T) で10分間破砕した。マウス (生後4週齢, BALB/c) への免疫は、第1～3回目については抗原と等量の Freund's complete adjuvant を加えて乳化し、2週間おきに0.3mlを腹腔内に投与することにより行った。第4～7回目については、0.3mlの抗原原液を2週間おきに同様に追加投与した。抗体価の上昇が確認されたマウスより脾臓を摘出し、常法により細胞融合操作及びHAT選択培地による処理後、ハイブリドーマのコロニーが確認されたウエルの培養上清を採取した。スクリーニングは、第1図のように間接 ELISA により行ったが、プレートは96穴のマイクロプレート (ヌンク社製) を利用し、マイクロプレートリーダー (SLT 社, EAR400FW) により吸光度 (O.D405nm) を測定した。また、培養上清からの Mab の調整は、飽和硫酸利用による塩析と透析によった。

各種菌株に対する Mab の利用濃度は、免疫源として用いた菌糸破砕液を利用し、間接 ELISA によりほぼ同一の力価になるようにして決定した。なお、Mab に対する対照として、草野ら<sup>5)</sup>が作成したポリクローナル抗体 (Pab) を利用した。

### 2 Mab のアイソタイプ

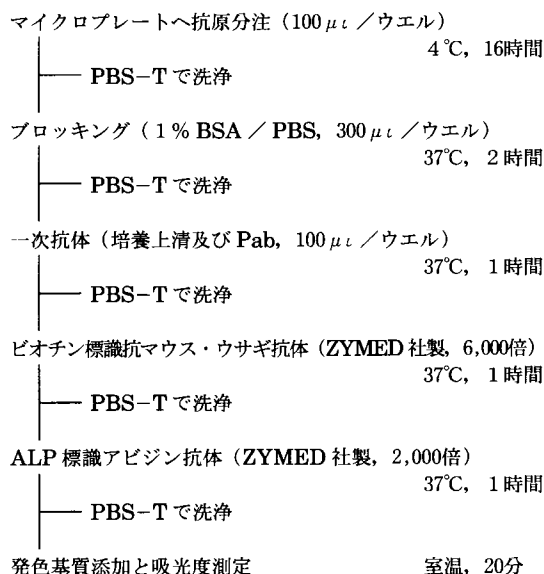
アイソタイプングキット (Amersham 社製) を用いて、ELISA によりアイソタイプを決定した。

### 3 Mab の特異性調査のための供試菌株

*Fusarium oxysporum* の分化型 23 菌株及び *Fusarium*

*solani* の分化型 2 菌株は東日本学園大学富永史朗博士より、その他の菌株は福岡県農業総合試験場病害虫部、池田弘、梶谷裕二両氏より分譲を受けたものを使用した。ELISA に用いた各種菌株は、上記の免疫源と同一の手法で作成し、吸光度がコントロール区とした PBS の 3 倍以上になったものを抗体との反応陽性の基準とした。

また、Mab と各種菌株との反応性を見るための菌糸可溶性分画 (S 分画) は、第 1 報に準じて作成した。

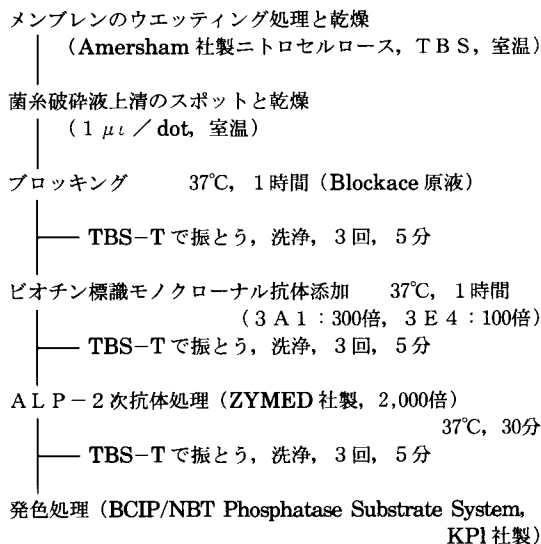


第 1 図 抗体産生ハイブリドーマのスクリーニング法

#### 4 ELISA 及び DIBA の手法

特異性調査のための ELISA については、第 1 図のスクリーニング法に準じ、必要な場合は Biotin-N-Hydroxy-succinimide (BNHS) によりビオチン標識した抗体を作成して利用した。

また、DIBA については、第 2 図の方法により行った。



第 2 図 DIBA による菌の検出

#### 5 罹病植物からの検出

- (1) 福岡県農業総合試験場病害虫部、吉永文浩氏より分譲を受けたトマト幼苗 (*Fusarium oxysporum* J3 に感染) の基部を採取し、上記手法に準じて PBS 中で磨砕後超音波による破碎を 5 分間行い、上清を検出試験に用いた。
- (2) カンキツ生育不良苗木の接ぎ木部に発生し、褐変を引き起こす病原<sup>4)</sup>と考えられる *Fusarium solani* の分生孢子約  $10^6/\text{ml}$  をカンキツ穂木の接ぎ木部分に接種し、接ぎ木後 2 ヶ月目に褐変した接ぎ木部の罹病組織及び無接種接ぎ木部の健全組織を 20mg 削り取り、1 ml の PBS 中で超音波による破碎を 5 分間行い、上清を検出試験に用いた。

### 結果及び考察

#### 1 モノクローナル抗体の特性

4 回の細胞融合操作とスクリーニングにより、最終的に 8 種のハイブリドーマをクローニングし、ITES-ERDF 培地を用いたスピナーフラスコ培養を行った後、培養上清から硫酸濃縮法及び 3 回の透析により Mab を粗精製した。

糸状菌に対する Mab を作成した過去の事例をみるとアイソタイプは IgM が多い<sup>1), 6)</sup>。今回得られた Mab のアイソタイプの調査結果を第 1 表に示した。得られた 8 種類の Mab のなかで 6 種が IgM, 2 種が IgG であり、糸状菌では免疫期間がかなり長くても IgM タイプの Mab が作られると考えられた。また、全ての Mab はアンチカッパ鎖の抗体であった。

第 1 表 Mabs のアイソタイプ (1993)

| アイソタイプ                 | 3A1         | 3B1         | 3D1         | 3E1         | 3E4         | 3G1         | 4A1         | 4B1         |
|------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Anti IgG <sub>1</sub>  | 0.03        | 0.04        | 0.04        | 0.04        | <u>1.05</u> | 0.04        | <u>1.08</u> | 0.08        |
| Anti IgG <sub>2a</sub> | 0.06        | 0.05        | 0.05        | 0.04        | 0.04        | 0.06        | 0.04        | 0.04        |
| Anti IgG <sub>2b</sub> | 0.04        | 0.06        | 0.11        | 0.04        | 0.04        | 0.06        | 0.03        | 0.03        |
| Anti IgG <sub>3</sub>  | 0.04        | 0.06        | 0.06        | 0.03        | 0.11        | 0.09        | 0.04        | 0.04        |
| Anti IgA               | 0.04        | 0.03        | 0.04        | 0.04        | 0.05        | 0.04        | 0.04        | 0.03        |
| Anti IgM               | <u>0.55</u> | <u>0.23</u> | <u>0.52</u> | <u>0.56</u> | 0.04        | <u>0.37</u> | 0.03        | <u>0.38</u> |
| Anti IgL (κ)           | 0.46        | 0.31        | 0.74        | 0.67        | 0.78        | 0.45        | 0.78        | 0.50        |
| Anti IgL (λ)           | 0.05        | 0.04        | 0.06        | 0.04        | 0.05        | 0.05        | 0.25        | 0.05        |

注)    : 決定されたアイソタイプ

#### 2 *Fusarium* 属菌に対する Mab の特異性

*Fusarium oxysporum* の分化型 23 菌株 *Fusarium solani* の分化型 2 菌株について、菌糸 S 分画に対する Mab の特異性を検討した。

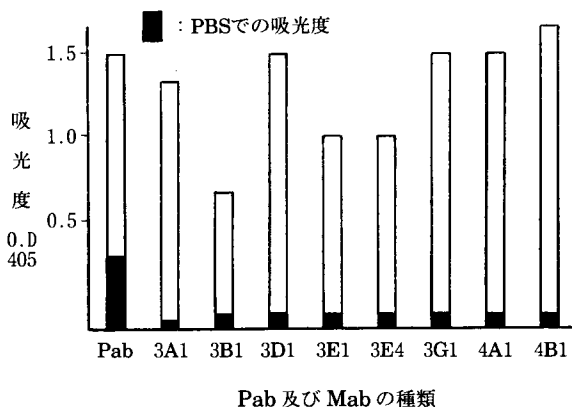
第 3 図に示すように免疫源である *Fusarium solani* に対しては、PBS のコントロール区と比較して Pab では 5 倍程度の吸光度であったが、Mab では 10 ~ 20 倍の吸光度となり検出感度が向上した。これは、Mab では非特異吸着が減少することにより、バックグラウンドが低下したためと考えられた。

また、供試したほとんどの Mab は、*Fusarium* 属菌に対してホモロガスな反応を示したが、3B1, 4A1 及び 4B1 で一部の菌株と反応しなかった。この原因としては、他の Mab と比較して吸光度が 1/5 から 1/10 の値になったことから、抗原物質や抗原決定基が異なるためと考

えられた (第2表)。

### 3 他属菌株に対する Mab の特異性

第3表で示すように、Pabと比較して全体的に特異性が高い結果となったが、3A1では *Phytophthora* 属及び *Phythium* 属と反応し、3B1では *Verticillium* 属及び *Rhizoctonia solani* と反応した。また、他の Mab も他属菌株と反応するものもあったが、IgG タイプの Mab は特異性が高い傾向にあった。



第3図 *Fusarium solani* (免疫源) に対する各抗体の吸光度 (1993)

第2表 *Fusarium* 属菌の各分化型に対する Pab 及び Mabs の反応 (DAS-ELISA) NO.1 (1993)

| 供試菌株                             | Rabbit<br>Pab | モノクローナル抗体 |     |     |    |     |     |     |                  |  |
|----------------------------------|---------------|-----------|-----|-----|----|-----|-----|-----|------------------|--|
|                                  |               | 3A1       | 3B1 | 3D1 | E1 | 3E4 | 3G1 | 4A1 | 4B1              |  |
| <i>oxysporum</i>                 | +             | +         | —   | +   | +  | +   | +   | +   | +                |  |
| <i>f.sp.raphani</i>              | +             | +         | —   | +   | +  | +   | +   | +   | +                |  |
| <i>conglutinans</i>              | +             | +         | —   | +   | +  | +   | +   | +   | +                |  |
| <i>melonis</i>                   | +             | +         | +   | +   | +  | +   | +   | +   | +                |  |
| <i>niveum</i>                    | +             | +         | +   | +   | +  | +   | +   | +   | +                |  |
| <i>cucumerinum</i>               | +             | +         | +   | +   | +  | +   | +   | +   | +                |  |
| <i>luffae</i>                    | +             | +         | +   | +   | +  | +   | +   | +   | +                |  |
| <i>gladioli</i>                  | +             | +         | +   | +   | +  | +   | +   | +   | +                |  |
| <i>fragariae</i>                 | +             | +         | +   | +   | +  | +   | +   | +   | +                |  |
| <i>spinaciae</i>                 | +             | +         | +   | +   | +  | +   | +   | —   | —                |  |
| <i>batatas</i>                   | +             | +         | +   | +   | +  | +   | +   | —   | —                |  |
| <i>adzukicola</i>                | +             | +         | +   | +   | +  | +   | +   | NT  | NT <sup>1)</sup> |  |
| <i>melongenae</i>                | +             | +         | +   | +   | +  | +   | +   | +   | +                |  |
| <i>cucumerinum</i>               | +             | +         | +   | +   | +  | +   | +   | NT  | NT               |  |
| <i>lagenaria</i>                 | +             | +         | +   | +   | +  | +   | +   | +   | +                |  |
| <i>asparagi</i>                  | +             | +         | +   | +   | +  | +   | +   | +   | +                |  |
| <i>vasinfectum</i>               | +             | +         | +   | +   | +  | +   | +   | +   | +                |  |
| <i>pini</i>                      | +             | +         | +   | +   | +  | +   | +   | NT  | NT               |  |
| <i>apii</i>                      | +             | +         | +   | +   | +  | +   | +   | +   | +                |  |
| <i>narcissi</i>                  | +             | +         | +   | +   | +  | +   | +   | NT  | NT               |  |
| <i>lini</i>                      | +             | +         | +   | +   | +  | +   | +   | +   | +                |  |
| <i>phaseoli</i>                  | +             | +         | +   | +   | +  | +   | +   | +   | +                |  |
| <i>lycopersici</i>               | +             | +         | +   | +   | +  | +   | +   | +   | +                |  |
| <i>ladicis-lycopersici</i>       | +             | +         | +   | +   | +  | +   | +   | +   | +                |  |
| <hr/>                            |               |           |     |     |    |     |     |     |                  |  |
| <i>solani</i> f. sp. <i>pisi</i> | +             | +         | —   | +   | +  | +   | +   | +   | +                |  |
| <i>phaseoli</i>                  | +             | +         | —   | +   | +  | +   | +   | +   | +                |  |
| <i>solani</i> (免疫源)              | +             | +         | +   | +   | +  | +   | +   | +   | +                |  |

1) NT: 未試験

第3表 他属菌に対する Pab 及び Mabs の反応 (IDAS-ELISA) (1993)

| 供試菌株                            | Rabbit<br>Pab    | モノクローナル抗体 |     |     |     |     |     |     |     |
|---------------------------------|------------------|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                                 |                  | 3A1       | 3B1 | 3D1 | 3E1 | 3E4 | 3G1 | 4A1 | 4B1 |
| <i>Gibberella fuzikuroi</i>     | +                | +         | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   |
| <i>G.zeae</i>                   | +                | +         | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   |
| <i>Verticillium</i> sp.         | +                | —         | +   | —   | —   | —   | +   | —   | —   |
| <i>Phytophthora</i> sp.         | ±                | +         | —   | —   | +   | —   | —   | —   | —   |
| <i>Colletotricum fragariae</i>  | ±                | —         | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   |
| <i>Phythium</i> sp.             | ±                | +         | —   | —   | +   | —   | —   | —   | —   |
| <i>Phizoctoniasolani</i>        | ±                | —         | +   | —   | —   | —   | —   | —   | —   |
| <i>R.orizae</i>                 | —                | —         | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   |
| <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> | —                | —         | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   |
| <i>Alternaria rolfsii</i>       | —                | —         | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   |
| <i>Phomopsis</i> sp.            | —                | —         | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   |
| <i>Ceratocystis symbria</i>     | —                | —         | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   |
| <i>Cladosporium fulvum</i>      | —                | —         | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   |
| <i>Botrytis cineria</i>         | —                | —         | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   |
| <i>B.squamosa</i>               | NT <sup>1)</sup> | —         | NT  | NT  | NT  | —   | NT  | NT  | NT  |
| <i>Rosellinia nectatrix</i>     | NT               | —         | NT  | NT  | NT  | —   | NT  | NT  | NT  |

1) 未試験

### 4 DIBA への利用適性

マイクロプレートを利用する ELISA 以外の方法として DIBA の結果を第4図に示す。陽性反応は沈着性の色素が形成されているが、ELISA と比較して検出感度は 1/3 ~ 1/10 と劣る結果となった。検出感度向上のための改善方法としては、磨砕緩衝液の種類等の検討が必要と考えられた。

| Mab : 3 E 4              | 菌破砕液濃度 (n. pg/μl/dot) |    |     |     |    |     |
|--------------------------|-----------------------|----|-----|-----|----|-----|
|                          | 3                     | 1n | 300 | 100 | 30 | 10p |
| <i>Fusarium oxy.</i>     | ○                     |    |     |     |    |     |
| <i>f.sp.conglutinans</i> | ○                     |    |     |     |    |     |
| <i>Gibberella zeae</i>   |                       |    |     |     |    |     |
| <i>Fusarium solani</i>   | ●                     | ○  | ○   | ○   | ○  | ○   |
| <i>Botrytis cineria</i>  |                       |    |     |     |    |     |
| <i>Colletotricum sp.</i> |                       |    |     |     |    |     |
| <i>Verticillium sp.</i>  |                       |    |     |     |    |     |
| <i>Phytophthora sp.</i>  |                       |    |     |     |    |     |

### 菌破砕液の濃度と検出感度

| Mab : 3 A 1              | 菌破砕液濃度 (n. pg/μl/dot) |    |     |     |    |     |
|--------------------------|-----------------------|----|-----|-----|----|-----|
|                          | 3                     | 1n | 300 | 100 | 30 | 10p |
| <i>Fusarium oxy.</i>     | ○                     |    |     |     |    |     |
| <i>f.sp.conglutinans</i> | ○                     |    |     |     |    |     |
| <i>Gibberella zeae</i>   | ○                     | ○  |     |     |    |     |
| <i>Fusarium solani</i>   | ●                     | ●  | ○   | ○   | ○  | ○   |
| <i>Botrytis cineria</i>  |                       |    |     |     |    |     |
| <i>Colletotricum sp.</i> |                       |    |     |     |    |     |
| <i>Verticillium sp.</i>  |                       |    |     |     |    |     |
| <i>Phytophthora sp.</i>  | ○                     |    |     |     |    |     |

### 菌破砕液の濃度と検出感度

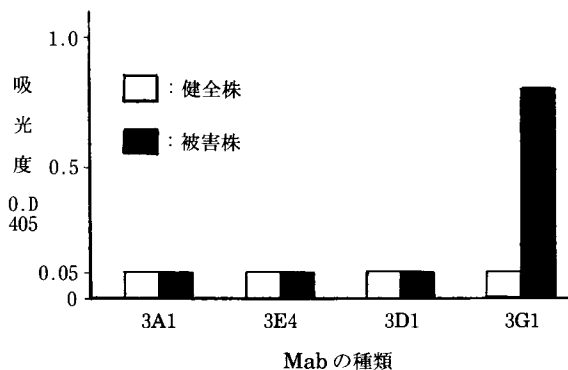
第4図 Mabの3A1及び3E4による DIBAによる菌の検出 (1993)

## 5 罹病組織からの検出

各 Mab を利用してフザリウム病に罹病した組織からの菌の検出を試みた。

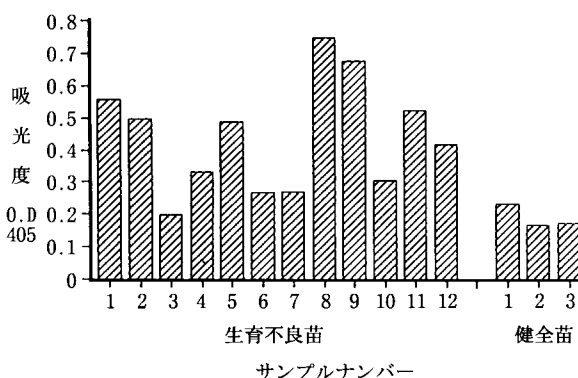
第5図に示しているように、トマト罹病組織からは、Mab の3 G 1のみが特異的に反応し検出が可能であった。しかし、*Fusarium* 属菌の培養菌叢からはどの Mab でも検出できることから、植物組織中の物質に抗原抗体反応を阻害するものがあると想定された。また、トマトの罹病部位が外部病徴として認められないときは ELISA により検出できなかったことから、組織内においてある程度の菌糸の増加が必要と考えられた。

カンキツ生育不良苗木の接ぎ木部に発生し、褐変を引き起こす病原の検出では、第6図に示しているように、12本中7本で健全苗木に対して2倍以上の吸光度があったが、①罹病部位が限られていること、②作成可能なサンプルが極めて少量であり、同一サンプルによる再試験が不可能等の理由により検出はやや不安定となった。



第5図 *Fusarium*属菌罹病トマト抽出液に対するMabの検出感度 (1994)

磨砕抽出液濃度：400倍



第6図 カンキツ生育不良苗の接ぎ木部位抽出液の間接ELISAによる吸光度 (1994)

使用Mabと濃度：3 G 1, 500倍

以上のことから、得られた Mab の反応特異性は、*Fusarium* 属菌に対しては Pab と比較して高く、他属菌及び *Fusarium* 属菌の種間では低いことが明らかとなり、トマトの *Fusarium* 病害に適用が可能となった。しかし、*Fusarium oxysporum* に対するウサギ抗血清 (Pab) と抗原の固相化にアミノ・ダイラック・ボールを利用し、競合法の ELISA で良好な結果を得た報告もあり<sup>3)</sup>、検定手法については改良の余地があると考えられた。

今後は、作出した Mab を有効に利用するため、検定のための対象作物を拡大し、Mab との組み合わせや検出方法の改善等の検討をする必要がある。

## 引用文献

- 1) 有江 力・林 義男・米山勝美・山口 勇 (1992) *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race J2 880621a-1 に対するモノクローナル抗体の反応性状について. 植物病理学会 4 (講要) : 94.
- 2) J.S.GERIK, S.A.LOMMEL and O.C.HUISMAN (1987) A Specific Serological Staining Procedure for *Verticillium dahliae* in Cotton Root Tissue. *Phytopathology*. 77 : 261-266.
- 3) Tsunehiro KITAGAWA, Yuichiro SAKAMOTO, Katsuhiko FURUMI, and Hirosuke OGAWA (1989) Novel Enzyme Immunoassay for Specific Detection of *Fusarium oxysporum* f.sp.*cucumerinum* and for General Detection of Various *Fusarium* Species. *Phytopathology*. 79 : 162-165.
- 4) 草野成夫・平島敬太 (1992) カンキツ苗木生産における生育不良苗 (パバリ) の発生生態. 植物病理学会 4 (講要) : 42.
- 5) 草野成夫・平島敬太 (1993) 抗体利用による病原糸状菌の簡易検出法の開発第1報. 福岡農総試研報 B-12 : 69-72
- 6) 君島悦夫・小林慶範 (1992) *Phytophthora capsici* のモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体の抗原解析. 植物病理学会 4 (講要) : 94.
- 7) 君島悦夫・西尾 健・高山睦雄・長尾記明 (1984) *Phytophthora* 属菌の血清学的検出法および同定法に関する研究Ⅲ. ELISA における植物組織中の *Phytophthora siringae* の検出. 植防研報 20 : 1-6.
- 8) S.A.LOMMEL, A.H.MCCAIN and T.J.MORRIS (1982) Evaluation of Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Viruses. *Phytopathology*. 72 : 1018-1022.
- 9) 宮井 潔 (1982) 酵素免疫測定法 (石川榮治・河合 忠・宮井潔編). 東京：医学書院, pp31-74.