

---

[成果情報名] リンゴステムグルーピングウイルスに対するモノクローナル抗体の作出と酵素結合抗体法(エライザ法)への利用

[要約] リンゴステムグルーピングウイルス (ASGV) の外皮蛋白由来の発現融合蛋白をマウスに免疫することでモノクローナル抗体 (MAb) を作出できる。作出したMAbは反応性の違いから大きく2種類あり、このMAbを組み合わせることで市販の抗血清と同レベルでカンキツウイルス診断が可能となる。

[キーワード] カンキツ、リンゴステムグルーピングウイルス、モノクローナル抗体、エライザ法

[担当部署] 果樹苗木分場・果樹苗木チーム

[連絡先] 0943-72-2243

[対象作目] 果樹

[専門項目] 病害虫

[成果分類] 新技術

---

[背景・ねらい]

本県は、主要なカンキツ生産県であると共に全国一のカンキツ苗木の生産を行っている。そのため、健全種苗育成のため年間約 3,000~10,000検体のカンキツウイルス検査を実施している。リンゴステムグルーピングウイルス (ASGV、旧カンキツタターリーフウイルス) は、接ぎ木部異常病の病原でありカンキツ樹の枯死を招く、カンキツの重要な病害である。従来より市販の抗血清 (PAb) によりエライザ検定を行っているが、抗血清はウサギから採取するため供給が安定しない。そこで、供給が半永久的なASGVのモノクローナル抗体 (MAb) を作出する。

[成果の内容・特徴]

1. 作出したモノクローナル抗体 (MAb) を産生する融合細胞 (ハイブリドーマ) は、(独) 果樹研究所より分譲を受けたASGVの外皮蛋白に相当する発現融合蛋白を抗原とする(表1)。
2. 作出した7クローンのMAbのアイソタイプは、IgG1、IgG2a、IgG2bであり、MAbの競合処理により、大きく2種類のグループ (パラトープ) に分けることが出来る(表2)。
3. 2種類のMAbをコーティング抗体と酵素標識抗体として組み合わせることにより、検出感度が市販の抗血清と同レベルのエライザ法が可能となる(表3)。

[成果の活用面・留意点]

1. ASGVクロマトキットの開発、並びに本県の果樹ウイルス検定事業におけるカンキツウイルスの診断に活用できる。
2. エライザ法に使用するサンプルは、従来通り発芽して展葉する前の新梢を用いる。

[具体的データ]

表1 モノクローナル抗体作出およびエライザ法の従来法との相違点

| 項目      | 従来法                            | 今回                             |
|---------|--------------------------------|--------------------------------|
| 抗原      | 純化ウイルス                         | 融合蛋白                           |
| 免疫動物    | ウサギ、マウス                        | マウス                            |
| 抗体      | P A b、M A b                    | M A b                          |
| M A b 数 | 1 クローン                         | 7 クローン                         |
| エライザ法   | コーティング抗体：P A b<br>酵素標識抗体：M A b | コーティング抗体：M A b<br>酵素標識抗体：M A b |

表2 作出したモノクローナル抗体のアイソタイプと競合処理による分類

| クローンNo. | 1    | 2      | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     |
|---------|------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| アイソタイプ  | IgG1 | IgG1 I | IgG2a | IgG2a | IgG2b | IgG2a | IgG2a |
| パラトープ   | A    | A      | A     | B     | B     | B     | B     |

- 注) 1. 平成20年に分類  
2. AおよびBは、反応性の違いを示す

表3 作出したモノクローナル抗体を利用したウイルス検出 (エライザ法)

| 抗体の種類    |         | A S G V 系統 (採集地) |        |        |        |        |
|----------|---------|------------------|--------|--------|--------|--------|
| コーティング抗体 | 酵素標識抗体  | 長崎               | 和歌山    | 徳島     | 福岡     | 沖縄     |
| A        | B       | 2268             | 2780   | 2460   | 991    | 1617   |
| (M A b)  | (M A b) | (28.4)           | (34.8) | (30.8) | (12.4) | (20.2) |
| 市販       | 市販      | 824              | 1080   | 863    | 755    | 696    |
| (P A b)  | (M A b) | (22.9)           | (30.0) | (24.0) | (21.0) | (19.3) |

- 注) 1. 数値は吸光度×1,000、( ) はフリー値に対する倍数、陽性はフリー値の 2倍  
以上、磨砕サンプルは10倍希釈液を使用、測定は基質投入1時間後  
2. 平成20年に実施

[その他]

研究課題名：カンキツウイルス簡易診断キットの開発およびカンキツウイロイド感染  
実態の解明  
予算区分：国庫受託 (実用技術開発事業)  
研究期間：平成20年度 (平成19~21年)  
研究担当者：草野成夫、朝隈英昭