

課題名	159 果樹のウイルスフリー樹の育成と苗木大量増殖技術	分類	③
	2) カンキツ温州萎縮ウイルスのモノクローナル抗体の作成		
試験研究年次	62～1年(完了)		

I 目的

従来の血清中の抗体を利用したウイルスの診断法での問題点(非特異抗体の存在と均質抗体の供給持続性)を解決するために、温州萎縮ウイルス(SDV)に対するモノクローナル抗体を作成し、抗体利用診断法の検出精度向上と安定化を図る。

II 試験方法

1 モノクローナル抗体の作成方法

(1) 温州萎縮ウイルス(SDV)の増殖と純化行程

ウイルス増殖用草本植物(フィザリス)へのSDV接種→発病→病葉採取
→磨砕→不溶物除去(遠心分離)→硫酸塩析→有機溶媒処理→分画超遠心分離
→ショ糖密度勾配遠心分離→電子顕微鏡観察→純化ウイルス

(2) マウスへの免疫と血清中抗体の確認

純化ウイルスを乳化剤で乳化し、マウスの腹腔内に投与した。3週後に同様に追加投与し、その1週後に血中抗体価の上昇を間接ELISA法で確認した。

(3) 脾臓細胞の摘出と細胞融合

純化ウイルスを投与3日後に脾臓細胞を摘出し、対数増殖期の骨髓腫細胞とPEG法にて細胞融合した。融合細胞は培養器に播き込み、温度37℃、炭酸ガス濃度5%の条件で培養した。

(4) 融合細胞の選抜と単細胞増殖株化

選択培地を2～3日毎に交換して融合細胞のみを選抜した。細胞融合10日後に増殖コロニーが認められた株の培養液上清を採取し、SDVに対する抗体の有無をELISA法で調べ、抗体産生株のみを選抜し、更に単細胞増殖株を作成した。

III 主要成果の概要

1 SDVの純化

ショ糖密度勾配遠心分離操作により相対濃度の高い純化SDVが得られた。

2 SDVモノクローナル抗体産生融合細胞の確保

融合細胞のコロニーは約67%で認められ、そのうちSDV抗体を産生するものは40株であった。これらの株は単細胞増殖株化の過程において抗体産生能が消滅するものが多かったが、最終的にはSDV抗体産生株が10株得られた。

3 モノクローナル抗体の特性

10株の抗体生産量は、1日当たり0.56～2.75 μ g/株であった。抗体の種類はIgG 3株、IgM 7株であった。SDV検出が可能な抗体の下限濃度は10～100ng/株で、市販の抗体と比較してかなり高感度であった。10株中では3D2の株が抗体生産量、検出可能下限濃度、上限濃度すべてに優れていた。

以上のことから、人工培養によって無限に抗体の生産が可能になり、得られるSDVのモノクローナル抗体は、市販の抗体より高感度にSDVの検出が可能である。

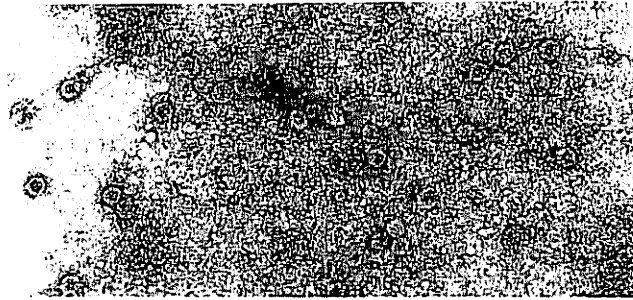
IV 主要成果の具体的データ

第1表 純化過程におけるH'-オキシセ'活性とウイルス含量(1年)

純化過程	H'-オキシセ' 活性	総タンパク 量 $\mu\text{g}/\text{ml}$	S D V	
			濃度	相対純度
磨砕液上清	180	3,860	240	0.065
有機溶媒処理	489	288	248	0.861
超遠心沈殿	33	489	482	0.986
沈殿懸濁	65	446	306	0.686
密度勾配遠心	26	560	991	1.770

注) ① S D V 濃度は吸光値 $\times 100$

② 相対純度 = 濃度 / 総タンパク量



第1図 純化した温州萎縮ウイルス粒子(12万倍)

第2表 抗体産生細胞の特性(1年)

N O	細胞		モノクローナル抗体			
	株	倍化時間 時間	抗体の 種類	抗体の	ウイルス検出可	ウイルス検出可
				生産量 $\mu\text{g}/\text{ml}$	能下限濃度 ng/ml	能上限濃度 $\mu\text{g}/\text{ml}$
1	1F4	19.2	I g G	0.56	100	10
2	2A10	20.0	I g M	----	10	10
3	3D2	26.4	I g M	2.75	10	100
4	3D3	22.0	I g G	----	---	---
5	3E1	15.2	I g M	2.30	100	10
6	3H9	22.0	I g M	----	10	10
7	4F10	20.4	I g M	1.71	100	10
8	4G6	28.8	I g M	1.96	100	10
9	5D7	18.0	I g G	----	---	---
10	5G10	27.3	I g M	----	100	100

注) ① 抗体生産量は 1×10^5 個/1日

② ---- は未調査

V 成果の評価と取扱上の留意点

作成したモノクローナル抗体は温州萎縮病ウイルスの高精度検出診断に利活用できる。

VI 今後の研究上の問題点

- 1 他のウイルスやウイルス以外の物質と交叉反応性を確認する必要がある。
- 2 得られた抗体の特性及びウイルス性状解明への利用

VII 資料名

- 1 63年度 福岡県農業総合試験場果樹苗木分場試験成績書
- 2 1年度 九州農業試験研究成績・計画概要集(バイオテクノロジー)