

## ELISA 用マイクロプレートの有機溶媒による前処理と カンキツモザイクウイルス検出の安定性

太田孝彦 (長崎県果樹試験場)

OTA, T. : The Improvement of Microplates Used in the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Detection of Citrus Mosaic Virus

カンキツモザイクウイルス (CiMV) の ELISA 検定では用いるプレート (ポリスチロール製) の種類や製造番号によって、その結果が左右され、検定を行う場合の大きな障害となっている。そこでプレートの種類などに関係なく安定した結果が得られる方法を見出すため、プレートの前処理の方法について検討した。

### 1. 試験方法及び結果

試験 1 検定不能を確認したプレートを用い、酸、アルカリ、熱、有機溶媒 (クロロホルム) 等で処理した結果、有機溶媒の短時間洗浄で若干の損傷は生じるものの検定可能となることが分かった。そこで、損傷を与えず発色を良くする有機溶媒を知るため、CK-1-221-24-1 と CK-223-24 の発色不良プレートをを用いて検討した。いずれのプレートも室温 (25℃) 条件で、そのマイクロウェルに 0.2 ml の各有機溶媒を入れ 10 秒後に取り除いた。溶媒乾燥後各ウェルの損傷程度を調べ、そのウェルを用いて CiMV の保毒と無毒のサンプルを ELISA で検定した。その結果、第 1 表に示すようにクロロホルム、キシレン、ジエチルエーテル、酢酸エチル、ベンゼン、アセトンではいずれも発色は良好となったが、ウェルの損傷が著しく、とくにアセトンで激しかった。石油エーテルではウェルの損傷はなかったが、発色は少し良くなる程度で不十分であった。メタノールとエタノールではウェルの損傷は無いが発色も無処理と同等で効果はなかった。以上のように、単一の有機溶媒による 10 秒洗浄においては、損傷が軽く、かつ発色良好なプレートを得ることは出来なかった。

**第 1 表 各種有機溶媒処理と発色程度および損傷程度 (10秒間処理)**

溶 媒	発 色 (CiMV/無毒)		プレートの損傷程度 (溶解)	
	CK-223-24	CK-1-221-24-1	CK-223-24	CK-1-221-24-1
クロロホルム	++/-	++/-	+++	++
キシレン	+++/-, ±	++/-	+++	++
石油エーテル	+/-	+、-/-	-	-
ジエチルエーテル	+++/-	++/±	+++	++
酢酸エチル	++/+	++/+	+++	++
ベンゼン	+++/-	++/-	++	+
アセトン	+++/>++	+++/>+	++++	+++
エタノール	±/-	-/-	-	-
メタノール	±/-	-/-	-	-
無処理	±/-	-/-	-	-

試験 2 10 秒処理では作用が弱かった石油エーテルについて、処理時間及び他の有機溶媒との混用について検討した。試験 1 と同様の方法で、リンプロ、CK-1-221-

24-1, CK-221-24-1, CK-223-24 のプレートを用いて行った。石油エーテル単剤による処理時間と発色との関係については、第 2 表に示すように発色は処理時間が 1 分では不十分であったが、3 分及び 5 分ではいずれのプレートにおいても良好であった。プレートの損傷はリンプロが他のプレートに比べ大きかったが、3 分処理での傷は検定の障害とはならなかった。従って、石油エーテルによるプレート洗浄は 3 分程度が適当と思われる。石油エーテルに混用する溶媒についてはキシレンとクロロホルムについて、その混合比を検討した結果、第 3 表に示すように、石油エーテル/キシレン (99.5 : 0.5, V/V) や石油エーテル/クロロホルム (98 : 2, V/V) で 10 秒程度の洗浄で良好な結果が得られた。

**第 2 表 石油エーテルによる処理時間と発色およびプレートの損傷程度**

プレート	Cat. No.	発 色 (CiMV/無毒)				プレートの損傷		
		1	3	5分処理	無処理	1	3	5分処理
リンプロ		+/-	#/-	#/-	-/-	±	+	#
CK-1-221-24-1		+/-	#/-	#/-	-/-	-	±	±
CK-221-24-1		+/-	#/-	#/-	-/-	-	±	±
CK-223-24		+/-	#/-	#/-	±/-	-	±	±

**第 3 表 混合有機溶媒等の処理と発色程度およびプレートの損傷程度**

プレート	Cat. No.	発 色 (CiMV/無毒)			プレートの損傷程度		
		1	2	3	1	2	3
リンプロ		++/-	++/-	++/-	±	±	+
CK-1-221-24-1		+++/-	+++/-	+++/-	±	±	±
CK-221-24-1		++/-	++/-	++/-	±	±	±
CK-223-24		++/-	++/-	++/-	±	±	±

- 1 石油エーテル/キシレン (99.5 : 0.5, V/V) 10 秒処理
- 2 石油エーテル/クロロホルム (98 : 2, V/V) 10 秒処理
- 3 石油エーテル 3 分処理

試験 3 現在、検定に用いたプレートを再使用する場合は必ずクロム硫酸で洗浄しているが、有機溶媒で洗浄する場合もそれが必要か否かについて検討した。発色不良のプレート CK-223-24 を石油エーテル/キシレン (99.5 : 0.5, V/V) で洗浄後 ELISA 検定したプレートを水洗して乾燥後、再び前記有機溶媒で処理し、ELISA 検定を行った。対照区は水洗の前にクロム硫酸に 1 夜浸漬し同様に処理したプレートを用いた。その結果、第 4 表に示すようにクロム硫酸使用の有無にかかわらず良好な発色が認められた。このことから、前記の有機溶媒で処理する場合はクロム硫酸を使用する必要が無いことが分かった。

第4表 ELISA 検定後のプレートの洗浄法と発色及びプレートの損傷程度

プレートの使用回数	プレートの洗浄法	発色(CiMV/無)	プレートの損傷
0	—	±/—	—
0	S	##/—	±
1	Cr→W→D→S	##/—	+
1	W→D→S	##/—	+
2	Cr→W→D→S	##/—	+
2	W→D→S	##/—	+

Cr, クロム硫酸洗浄; W, 水洗浄; D, 乾燥; S, 石油エーテル/キシレン (99.5:0.5 V/V) 10秒洗浄; 使用プレート, CK-223-24

試験4 損傷が全くなく、発色良好なプレートをつくる目的で、プレートのウェルにコーティングする物質について検討した。シーロンフィルム及び塩化ビニルのコーティングは、いずれも10cm×10cm大のフィルムを細片にし、60mlの石油エーテルに浸漬し室温で1夜保った後、ろ過し、そのろ液をプレートのウェルに各々0.15mlずつ分注するか、又は各ウェルに液が良く入るように噴霧した。カナダバルサムの場合は、ガラス棒の先の約1cmにカナダバルサムを十分量附着させ、石油エーテル60ml中でよく攪拌し、ろ過後そのろ液をシーロンフィルムの場合と同様にプレートにコーティングした。いずれも有機溶媒が乾燥した後、CiMVのELISA検定に用いた。

その結果、第5表に示すようにいずれの場合もプレートに全く損傷を与えず、発色良好なプレートをつくる事が出来た。

第5表 プレートのコーティング処理と発色程度

コーティング物質	※	発色(CiMV/無毒)	損傷
シーロンフィルム	100 cm <sup>2</sup>	++/—	—
塩化ビニル	100 cm <sup>2</sup>	++/—	—
カナダバルサム	少量	++/—	—

処理プレート CK-223-24

※ 石油エーテル 60mlに溶解

### 総括

CiMVのELISA検定用プレートは、使用前に石油エーテル/キシレン(99.5:0.5 V/V)などで10秒程度、あるいは石油エーテルで3分洗浄すれば、プレートに若干の損傷を与えるが安定した検定結果が得られることが分かった。検定後のプレートは水洗し乾燥の後、同様に有機溶媒で処理すれば再使用が可能となるためクロム硫酸による洗浄は不要となった。また、発色良好なプレートはシーロンフィルムや塩化ビニル、カナダバルサムをプレートのウェルにコーティングすれば得られることが分かった。