

## Protein A sandwich ELISA (PAS-ELISA) による数種ウイルスの検出

宇杉富雄・大貫正俊・林 隆治 (九州農業試験場)

Tomio USUGI, Masatoshi OHNOKI and Takaharu HAYASHI :  
Detection of some Viruses by Protein A sandwich ELISA (PAS-ELISA)

酵素結合抗体法 (ELISA) は植物ウイルスの検出, 診断に重要な役割を果たしている。各種の ELISA のうちで double antibody sandwich ELISA (DAS-ELISA)<sup>1)</sup> が最も多く使われている。DAS-ELISA は感度が高く安定した方法であるが, ウィルスごとに精製特異抗体と酵素結合抗体 (conjugate) を用意しておく必要がある。この短所を補うために Edward and Cooper (1985)<sup>2)</sup> が報告した Protein-A sandwich ELISA (PAS-ELISA) により数種ウイルスの検出を試みた。

## 1. 試験方法

本試験にはサツマイモより分離された4種のひも状ウイルス (M, Mo, C, VC)<sup>5,6)</sup> 及びイネ蒺藜枯ウイルス (RSV) を使用した。PAS-ELISAの手順は Edward and Cooper の方法に従って行った。protein A-alkaline phosphatase (ZYMED laboratories社) は500倍希釈液を用いた。

## 2. 結果及び考察

## 1) サツマイモウイルスの検出

4種のウイルスにそれぞれ単独に感染したアサガオ罹病葉を用い, PAS-ELISA によるウイルスの検出限界濃度を求めた。Mo及びVCの検出に当たっては, Moがサツマイモ斑紋モザイクウイルス (SPFMV) と抗原的に同一であるので, 抗 SPFMV血清<sup>4)</sup> を用い, coating 及び detecting 抗体の濃度は1,000倍希釈液を, M及びCでは抗M及び抗C血清の精製 $\gamma$ -グロブリン, 1 $\mu$ g/ml を用いた。その結果, M, Mo及びVCはいずれも200-2,000倍まで, Cでは健全葉汁液に対する反応が極めて弱かったので, 2,000-20,000倍まで検出可能であった。

## 2) RSVの検出

RSVに感染したイネ (コシヒカリ) 罹病葉を用い, RSVの検出を行った。coating 及び detecting 抗体には抗RSV血清の精製 $\gamma$ -グロブリン, 1 $\mu$ g/mlあるいはマウス腹水抗体1,000倍液を用いた。その結果, いずれの抗体を用いてもイネ罹病葉の200,000倍希釈で高い吸光度が認められた。

これらの結果は PAS-ELISA が DAS-ELISA と同等の感度を有していることを示している。

## 3) coating 及び detecting 抗体の濃度

coating 及び detecting 抗体の濃度を抗血清及び腹水

抗体の場合は1,000-8,000倍,  $\gamma$ -グロブリンの場合は2-0.125 $\mu$ g/mlまで希釈し, PAS-ELISA を行い, その影響を調べた。SPFMV 血清では1,000倍希釈よりも8,000倍希釈の方がより高い吸光度を示した。また, RSV 腹水抗体では8,000倍希釈においても1,000倍希釈と変わらぬ高い吸光度が得られた。抗M及びC血清の精製 $\gamma$ -グロブリンでは2 $\mu$ g/mlで最も高い吸光度が得られ,  $\gamma$ -グロブリンの濃度が低くなるに従って吸光度は減少した。しかし, 抗RSV血清では0.5 $\mu$ g/mlで最高の値が得られた。次に coating 抗体の濃度を一定 (抗SPFMV血清では8,000倍, 抗M血清では1,000倍) とし, detecting 抗体を段階希釈し, PAS-ELISA における detecting 抗体の反応限界濃度を求めた。その結果, Moに対し, 抗 SPFMV血清は625,000-3,125,000倍まで, Mに対し抗M血清は64,000-128,000倍まで反応が認められた。

## 4) サツマイモウイルスの血清学的類縁関係

抗SPFMV血清, 抗SPFMV-RC血清<sup>3)</sup> 及び抗M血清とMo, VC, M及び健全アサガオ葉汁液とを相互に PAS-ELISA により反応させ, 相互間の血清関係を調べた。その結果, Mo及びVCは抗SPFMV及びSPFMV-RC血清に反応した。両抗血清ともMoと強く反応したが, しかし, VCに対しては弱かった。MとMo及びVCとの間には血清関係は認められなかった。PAS-ELISAはウイルスの血清関係の調査にも有用と思われた。

## 引用文献

- 1) Clark, M. F. and Adams, A. N. : J. Gen. Virol. 34, 475-483, 1977.
- 2) Edward, M. L. and Cooper, A. N. : J. Virol. Meds. 11, 309-319, 1977.
- 3) Moyer, J. W., Call, B. B., Kennedy, G. G. and Abou Ghdir, M. F. : Plant Disease 64, 762-764, 1980.
- 4) 中野正明・岩崎真人・新海 昭 : 九病虫研会報 30, 30-32, 1984.
- 5) 宇杉富雄・中野正明・林 隆治 : 日植病報 55, 530, 1989.
- 6) 宇杉富雄・中野正明・新海 昭 : 日植病報 53, 420, 1987.