

温州萎縮ウイルス特異的モノクローナル抗体の作製

平島敬太・野口保弘・*山田耕路・*村上浩紀(福岡県農業総合試験場果樹苗木分場・*九州大学農学部)

Keita HIRASHIMA, Yasuhiro NOGUCHI, Koji YAMADA and Hiroki MURAKAMI :
Production of Specific Monoclonal Antibodies against Satsuma Dwarf Virus

福岡県の果樹種苗産地ではウイルス検定の需要が多く、多量の抗体が必要とされている。ハイブリドーマ法によって得られるモノクローナル抗体は、抗原量に比例した抗体量しか得られない抗血清に比較して、特異性の高い均一の抗体が、多量にそして無限に得られる利点がある。

果樹ウイルスは樹体内濃度が低いために、純化ウイルスを得るにも草本植物での増殖が必要とされるなど、モノクローナル抗体の利点が有効に発揮されると考えられ、温州萎縮ウイルス(SDV)に対するモノクローナル抗体の作出を試みた。

1. 試験方法

1) SDVの増殖と純化

SDV感染温州の新梢を磨砕し、カーボランダム法でフィザリスに接種した。退緑斑モザイク症状を示した接種上位葉を材料に、宇杉らの方法に準じて純化した。ウイルスの純度は、電顕観察及びSDS-PAGEにて確認した。

2) SDV特異的抗体産生細胞の作製

純化SDVをアジュバントと共にマウス(BALB/c)の腹腔内へ3回投与した。抗体価の上昇したマウスから摘出した脾臓細胞(10^8 個)と骨髄腫細胞(P3U1, 10^7 個)をPEG 1,000を用いて細胞融合した。融合細胞(ハイブリドーマ)はHAT培地を用いて選択し、細胞融合10日後に培養上清中のSDVに対する抗体を間接ELISAにて検出した。抗体の産生が確認されたハイブリドーマは、限界希釈法を2度繰り返すことによって、単細胞クローンとした。また、ハイブリドーマの無血清培地(ITES-ERDF)での増殖速度と産生抗体量を測定した。

3) モノクローナル抗体の精製と特性調査

腹水貯留法と無血清培養法(ITES-ERDF培地)で生産した抗体を50%硫酸塩析法で濃縮し、ヒドロキシアパタイト高速液体クロマトグラフィーで抗体純度を比較した。また、SDS-PAGEで分離した純化SDVをウエスタンブロッティングし、硫酸濃縮抗体を反応させて、抗体特異性を調査した。

2. 試験結果

1) 純化ウイルス

SDS-PAGEの結果、純化材料からはウイルス純度の向上と共に濃く検出される4本のバンドが検出され、それぞれの分子量は約23, 46, 59, 63 KDであった。

2) SDV特異的抗体産生細胞の作成

最終的に得られたSDV特異的抗体産生細胞は10株で、産生される抗体種はIgG 3株、IgM 7株であり、 10^5

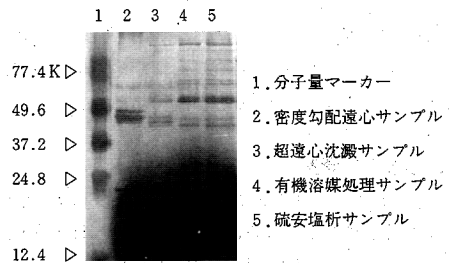
個のハイブリドーマが24時間で生産する抗体量は0.56~2.75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

3) モノクローナル抗体の精製と特性

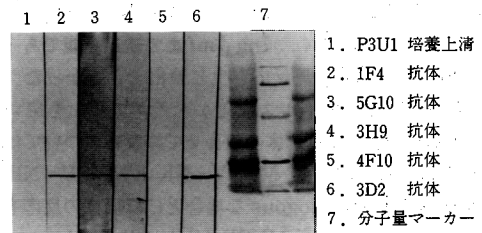
腹水中の抗体濃度はITES-ERDF培養上清に比較して200~300倍高かったが、総タンパク中の活性抗体純度は18%程度で、ITES-ERDF培養上清の50~60%より低かった。SDS-PAGE分離後にニトロセルロース膜に転写した純化SDVに対し、得られた全ての抗体は、23 KDのコンポーネントに特異的に反応した。

3. まとめ

以上のことから、SDVの主な抗原決定基は23 KDコンポーネント上に存在することが示唆され、得られたハイブリドーマの凍結保存とITES-ERDF培養で、均一なSDVモノクローナル抗体を無限に生産が可能となった。



第1図 SDV構成タンパクのSDS-PAGE像



第2図 SDV構成タンパクに反応した抗体