キュウリモザイクウイルスおよびその D-protein に 対する抗血清の性質

前田孚憲*・井上成信*

Takanori MAEDA* and Narinobu INOUE* : Some Properties of
Antisera to Cucumber Mosaic Virus and Its D-protein

Abstract

Antibody activities of the antisera As-V-IM and As-Dp-IM which were obtained by injecting rabbits intramuscularly with cucumber mosaic virus and its D-protein, respectively, were associated with IgG class immunoglobulin. In addition to IgG class activity, the antiserum As-VF-IV which was obtained from the rabbit injected intravenously with formaldehyde-fixed virus had low levels of IgM class activity. Antibodies to the virions were isolated from the antisera by acid dissociation of virion-antibody immune complexes. Antibodies to D-protein were also purified by affinity chromatography on D-protein coupled Sepharose 4B. Cross-absorption tests with the unfractionated antisera and the isolated antibodies demonstrated that (1) antiserum As-VF-IV contained virion-specific and cross-reactive antibodies, (2) antiserum As-V-IM contained virion-specific, D-protein-specific and cross-reactive antibodies, and (3) antiserum As-Dp-IM contained D-protein-specific and cross-reactive antibodies.

IgG antibodies to virion and D-protein were also measured by F(ab')₂-based enzyme-linked immunosorbent assay.

(Received June 21, 1984)

Key Words: cucumber mosaic virus, serology, antibody determination.

緒 言

さきに、筆者らはキュウリモザイクウイルス(CMV)とそれを CaCl₂ 処理することによって得られた D-protein, およびホルマリン固定した CMV を供試して作成した抗血清は各抗原に対する反応性においてそれぞれ異なることを報告した⁶⁾。すなわち、ホルマリン固定した CMV-Y (CMV 黄斑系)¹¹⁾ を家兎に静脈注射して作成した抗血清 (As-VF-IV) はウイルス粒子とよく反応したが、D-protein とは反応しなかった。一方、無固定のウイルスをアジュバントとともに筋肉注射して得た抗血清 (As-V-IM) はウイルス粒子と D-protein の両者と反応した。また、D-protein

を筋肉注射して得た抗血清 (As-Dp-IM) は同種抗原とは反応したが、ウイルス粒子とは反応しなかった。

本報告は上述の抗血清間の反応性の違いを明らかにするために、これらに含まれる抗体の反応性の解析を行った結果について記述したものである。

実験材料および方法

供試抗血清および抗原の調製 抗血清は前回報告した⁶⁾ As-VF-IV, As-V-IM および As-Dp-IM を用いた。いずれも凍結乾燥して -20℃ で保存していたものである。抗原にはホルマリン固定 CMV-Y 粒子 (Vp) および CaCl₂ 処理により調製した D-protein (Dp) を供試した。ウイルスの純化、ホルマリン固定

* 岡山大学農業生物研究所 Institute for Agricultural and Biological Sciences, Okayama University, Kurashiki 710, Japan

および Dp の調製は前報⁶⁾の方法に従った。ELISA には 3 M NaCl を含む 0.005 M ほう酸緩衝液, pH 8.0 に溶解した Dp を用いた。

免疫グロブリンの分画 免疫グロブリン各成分は Sephadex G-200 によるゲル濾過法^{7,8,10)}により分離した。ゲルを充填した下降式カラム (21×900 mm) に抗血清 2 ml を重層し, 0.01 M リン酸緩衝液, pH 7.2 (0.15 M NaCl, 0.02% NaN₃ を含む) を用い, 流速 8~12 ml/hr で室温で溶出した。IgM および IgG 分画はそれぞれ濃縮後, 同じカラムを用いて再クロマトグラフィーを行った。その2回目の分画で得られた IgM および IgG は 0.15 M NaCl を含む 0.005 M ほう酸緩衝液, pH 8.0 (BBS) に対して透析したのち, 分画前の抗血清と同容量まで濃縮した。

吸収試験 BBS で希釈した抗血清に各種の量の Vp (0.005 M ほう酸緩衝液, pH 9.0 に懸濁) あるいは Dp (0.2 M CaCl₂, pH 7.0 に溶解) を加え, 37°C に1時間置いたのち, 5,000×g, 20分遠心分離して生じた沈殿を除去した。Vp で吸収した場合には, この遠心分離後の上清を吸収抗血清としてそのまま用いた。Dp で吸収した場合には, 遠心分離後の上清を BBS に対して透析したのち, 低速遠心分離を行って, その上清を用いた。精製抗体を用いた試験では, 抗体と吸収抗原との混合液を低速遠心分離した上清を吸収抗体としてそのまま用いた。

ウイルス粒子に対する抗体の精製 Vp に対する抗体は, Vp と抗体との反応沈降物を酸性条件下で分離させることにより精製した^{5,9)}。BBS に溶解した部分精製 IgG に Vp を加え, 37°C に1時間置いたのち, 5,000×g, 20分遠心分離して生じた沈降物を集めた。沈降物を BBS で3回, 次に蒸留水で2回洗浄したのち, 少量の蒸留水に懸濁した。懸濁液を 0.1N HCl で pH 2.3 に調整したのち, 容量 10 ml の遠心チューブに 2 ml ずつ入れ, 100,000×g, 60分遠心分離を行って, 分離したウイルスを沈殿させ除去した。抗体を含む上清はただちに 0.1N NaOH で中和したのち, キャリヤーとして bovine serum albumin (Sigma Chem. Co.) を最終濃度 1% になるように加えた。精製抗体はコロジオンバッグを用いて BBS に対して透析したのち, 所定の容量まで濃縮した。

D-protein に対する抗体の精製 Dp に対する抗体はアフィニティクロマトグラフィーにより精製した。3 M NaCl を含む 0.02 M ほう酸緩衝液, pH 8.3 に溶解した Dp (10 mg) を 2 ml の CNBr-activated Sepharose 4B (Pharmacia Fine Chem.) に加

え, 室温に1時間, 4°C に16時間置いてカップリングを行った。ゲルを上記の緩衝液で洗浄したのち, 0.4 M トリス塩酸緩衝液, pH 8.0 (0.5 M NaCl を含む) に懸濁して残存する活性基をブロックした。ゲルを 0.02 M ほう酸緩衝液, pH 8.0 (0.5 M NaCl を含む) と 0.1 M 酢酸緩衝液, pH 4.0 (0.5 M NaCl を含む) とで交互に3回洗浄して, 共有結合していない Dp を除いた。ゲルを内径 9 mm のガラスカラムに充填し, BBS に溶解した IgG を流したのち, 溶出液の 280 nm での吸光度が 0.04 以下になるまで, カラムを BBS (0.5 M NaCl を含む) で洗浄した。ゲルに吸着した抗体は 0.2 M グリシン塩酸緩衝液, pH 2.3 で溶出し, ただちに 0.1N NaOH で中和した。以後の手順は Vp に対する抗体の精製の場合と同じである。

寒天ゲル内二重拡散法 供試した寒天ゲルは BBS に寒天 (Difco Lab., Agar Noble) を 0.8% の濃度になるように溶解したものである。他の条件は前報⁶⁾と同一である。

ELISA による IgG 抗体の測定 Vp および Dp に対する IgG 抗体は基本的には Barbara and Clark (1982) の F(ab')₂ ELISA により測定した。F(ab')₂ は IgG をペプシン (Sigma Chem. Co., 1:60,000) で消化して作成した²⁾。二次抗体の検出のための conjugate はウサギ IgG の Fc fragment に対するヤギ抗血清 (Miles Lab.) から得た IgG と alkaline phosphatase (Sigma Chem. Co., Type VII-S) とを Clark and Adams (1977) の方法により結合させて調製した。

F(ab')₂ ELISA は以下に述べる手順により行った。0.05 M 炭酸緩衝液 (pH 9.6) に溶解した 2 μg/ml の濃度の F(ab')₂ をポリスチレンプレート (Corning, Cell Wells) に一穴当り 200 μl ずつ入れ, 30°C に3時間置いてコーティングを行った。次に 0.05% Tween, 0.15 M NaCl および 0.02% NaN₃ を含む 0.02 M リン酸緩衝液, pH 7.4 (PBST) で希釈した Vp あるいは Dp を入れ, 4°C に16時間置き抗原をトラップした。それぞれの抗血清から調製した被検定 IgG を 0.2% bovine serum albumin を含む PBST で希釈して穴に入れ, 30°C で3時間反応させた。次に上記の緩衝液で800倍に希釈した conjugate を加え, 抗原に吸着した IgG と反応させた。それぞれの操作に移る前に, プレートは PBST で3回洗浄した。alkaline phosphatase は基質として 10% diethanolamine (pH 9.8) に溶解した p-nitrophenyl phosphate 溶液 (1 mg/ml) を 300 μl ずつ加え, 室温に1時間置いて検出し

た。反応は 50 μ l の 3M NaOH を加えて止め、405 nm での吸収を分光々度計で測定した。

実験結果

Sephadex G-200 により分離した **IgM** および **IgG** の抗体活性
それぞれの抗血清から分離した各イムノグロブリン

の Vp および Dp に対する抗体活性を調べた。As-V-IM および As-Dp-IM では IgG のみに抗体活性が認められ、IgM には活性がなかった。一方、As-VF-IV では IgG に強い活性があったが、IgM にも弱い活性が検出された。また、それぞれの抗血清から分離した抗体活性を有するイムノグロブリンの Vp および Dp に対する反応性は未分画の抗血清のそれらと同じであった。

Table 1. Effect of absorption with homologous and heterologous antigens on antibody activities of antisera against CMV and its D-protein

Antiserum ^{a)}	Absorbing antigen ^{b)}	Antibody activity against ^{c)}	
		Virus	D-protein
As-VF-IV	none (BBS, CaCl ₂)	32	0
	virus	50 μ g	32
		150	16
		450	4
		1,350	0
	D-protein	50	32
		150	32
		450	32
		1,350	16
As-V-IM	none	32	8
	virus	50	16
		150	8
		450	1
		1,350	0
	D-protein	50	32
		150	16
		450	16
		1,350	16
As-Dp-IM	none	0	4
	virus	50	NT
		150	NT
		450	NT
	D-protein	50	NT
		150	NT

- a) As-VF-IV, As-V-IM and As-Dp-IM were used at a dilution of 1:4, 1:2 and 1:1, respectively.
 b) Various amounts of formaldehyde-fixed virus in 0.005M borate buffer, pH 8.0 or D-protein in 0.2M CaCl₂ were added to a 0.5 ml portion of each antiserum.
 c) Reciprocal of antiserum dilution end point against each antigen determined by double-diffusion tests.
 d) Not tested.

吸収試験

相互吸収試験の結果を Table 1 に示した。As-VF-IV を Vp で吸収した場合、吸収抗原量が多くなるに従って Vp に対する抗体活性は減少し、1,350 μ g で消失した。一方、同抗血清を Dp で吸収した場合には、Vp に対する活性はほとんど減少しなかった。Vp あるいは Dp で吸収した As-V-IM の Vp に対する反応性は、As-VF-IV の場合とほぼ同様の傾向を示した。また、Vp で吸収した同抗血清の Dp に対する活性は吸収抗原量が増加するにつれて減少したが、その吸収による力価の減少割合は、Dp による吸収の場合 (50 μ g で活性が消失) と比較して小さかった。As-Dp-IM の抗体活性は 150 μ g の Vp あるいは 50 μ g の Dp による吸収で消失した。

ウイルス粒子および D-protein に対する精製抗体の反応性

As-VF-IV および As-V-IM から Vp に対する抗体を、また、As-V-IM および As-Dp-IM から Dp に対する抗体を精製し、それらの反応性を調べた。As-VF-IV から得た Vp に対する抗体は Vp と強く反応したが、Dp ともわずかに反応した。また、As-V-IM から得た Vp に対する抗体は Vp と Dp の両者と反応した。As-V-IM および As-Dp-IM から得た Dp に対する抗体は Dp のみならず、Vp とも反応した。また、As-VF-IV から、Dp をリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーで Vp と Dp の両者と反応する抗体が少量得られた。

これらの精製抗体を用いた吸収試験の結果を Table 2 に示した。As-VF-IV および As-V-IM から得た Vp に対する抗体の Dp による吸収で消失した。As-V-IM および As-Dp-IM から得た Dp に対する抗体の Vp に対する活性は Vp あるいは Dp による吸収で消失した。さらに、これらの抗血清から得た Dp に対する抗体を Vp で吸収した場合、Vp に対する活性は消失したのに対し、Dp に対する活性は残った。しかし、これらの抗体を多量の Vp で吸収すると、それらの Dp に対する活性は消失した。

ELISA による IgG 抗体の測定

As-V-IM の IgG から調製した F(ab')₂ で Vp あるいは Dp をトラップし、二次抗体として、それぞれの抗血清から精製した IgG を加えて、それらの反応性を比較した。各抗血清の IgG の Vp に対する反応を調べた結果、As-VF-IV および As-V-IM は高い ELISA 値を示したが、As-Dp-IM ではこれらに比較して低かった。また、As-V-IM および As-Dp-IM は Dp に対して高い値を示したが、As-VF-IV は 0.2 μ g/ml の IgG 濃度で抗体はほとんど検出されず、2 μ g/ml を用いた時に検出された。

考 察

前報で、筆者らは CMV の無固定粒子、ホルマリン固定粒子およびその D-protein を抗原として作成した 3 種の抗血清の反応性がそれぞれ異なることを報告

Fig. 1. Serological reactions of the isolated antibodies to CMV and its D-protein with homologous and heterologous antigens in the double-diffusion tests.

1 and 2: Isolated antibodies to CMV from antisera, As-VF-IV and As-V-IM, respectively. The antibodies were isolated from CMV-antibodies immune complex by acid dissociation.

2 and 4: Isolated antibodies to D-protein obtained from antisera, As-V-IM and As-Dp-IM, respectively, by affinity chromatography on D-protein coupled Sepharose 4B.

Vp: Formaldehyde-fixed virus, 1 mg/ml.

Dp: D-protein, 0.5 mg/ml.

B: 0.005M borate buffer, pH 8.0.

Table 2. Activities of isolated antibodies to CMV and its D-protein after absorption with homologous and heterologous antigens

Antiserum	Isolated antibodies to ^{a)}	Absorbing antigen ^{b)}	Reaction to ^{c)}	
			virus	D-protein
As-VF-IV	virus	none	+++	+
		100 μ g	+++	—
		500	++	—
		1,000	++	—
		5,000	—	—
		D-protein 100	+++	—
		500	+++	—
As-V-IM	virus	none	+++	++
		100	+++	+
		500	++	—
		1,000	++	—
		5,000	—	—
	D-protein	100	+++	+
		500	+++	—
		none	++	+++
		100	+	+++
		500	—	++
As-Dp-IM	D-protein	1,000	—	+
		100	++	++
		500	+	—
		1,000	—	—
		none	++	++
		100	+	++
		500	—	+
		1,000	—	—
		D-protein 100	+	+
		500	—	—

a) Antibodies were isolated from 4 ml of each antiserum by the methods described in Fig. 1 and dissolved in 0.5 ml of 0.005M borate buffer, pH 8.0.

b) See Table 1.

c) Antibody activities were determined by double-diffusion tests.

した⁶⁾。本実験は、これらの抗血清に含まれる抗体の反応性の解析を行ったものである。それぞれの抗血清から IgM および IgG を分離し、それらの抗体活性を調べたところ、As-VF-IV では IgG に強い活性が認められたが、IgM にも弱い活性があり、As-V-IM および As-Dp-IM では IgG のみが活性を有してい

た。一般に、家兎を免疫した場合、免疫初期には主に IgM 抗体が産生されるが、後にその活性は減少し、逆に IgG 抗体の活性が上昇してくることが知られている。このような抗体産生様式は southern bean mosaic virus¹²⁾, tomato bushy stunt virus¹³⁾, cucumber green mottle mosaic virus⁸⁾ などで報告されて

Fig. 2. Measurement of IgG antibodies to CMV and its D-protein by $F(ab')_2$ -based indirect ELISA (Barbara and Clark, 1982). Formaldehyde-fixed CMV (A, B, C) or D-protein (D, E, F) was trapped with $F(ab')_2$ fragment (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) prepared from antiserum As-V-IM and incubated with IgG (— Δ —: 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, — $\circ$ —: 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) from antisera, As-VF-IV, As-V-IM and As-Dp-IM. Bound IgG antibody was detected with Fc-specific goat IgG-alkaline phosphatase conjugate at a dilution of 1:800.

いる。As-VF-IV の IgM に弱い抗体活性が検出されたのは、抗血清作成のための免疫期間が短かったことによるものと思われる。一方、As-V-IM および As-Dp-IM は長期間の免疫によって得られているので、この時期には IgM の抗体活性はすでに検出できないレベルに低下していたものと考えられる。

As-VF-IV および As-V-IM をそれぞれ Vp で吸収すると、それらの Vp に対する抗体活性は消失した。一方、両抗血清を Dp で吸収した場合には、それらの活性は消失しなかった。このことから、両抗血清は Vp に特異的な抗体を含むと考えられる。

As-V-IM および As-Dp-IM から得た Dp に対する精製抗体の homologous な抗原に対する活性は、Vp

による吸収で消失しなかった。このことから、両抗血清は Dp に特異的な抗体を含むと判断された。しかし、これらの抗血清あるいは Dp に対する精製抗体を多量の Vp で吸収すると、それらの Dp に対する活性が消失した。このことはホルマリン固定したウイルスの中に少量の Dp が混在していたか、あるいは部分崩壊したウイルスが存在していたかにより、Dp に対する抗体が吸収されたのではないかと考えられる。

As-VF-IV および As-V-IM から得た Vp に対する精製抗体は Dp と反応した。また、Dp をリガンドとしたアフィニティクロマトグラフィーで両抗血清から精製した抗体は Dp と Vp の両者と反応したことから考えて、両抗血清は Vp と Dp とに共通の抗体を

含むと推定された。さらに、As-Dp-IM の Dp に対する精製抗体は Vp とともに反応したことから、およびそれを用いた吸収試験の結果から判断して、同抗血清も Vp と Dp とに共通の抗体を含むものと思われる。

多くの植物ウイルスにおいて、キャプシドと解離した外被蛋白の抗原性は互に異なることが知られている¹³⁾。しかし、両者の抗原性の差異が何に由来するのかについては十分には明らかにされていない。Van Regenmortel¹³⁾ はウイルス キャプシドおよび解離した外被蛋白に存在する抗原決定基 (epitope) を neotope, cryptotope および metatope の3種に分類している。neotope は個々の外被蛋白がキャプシドを形成することにより、その表面に新たに出てくる epitope である。cryptotope は外被蛋白が解離することにより出現する epitope であり、キャプシド内部にかくれている外被蛋白表面に存在すると思われる。metatope はキャプシドと解離した外被蛋白に同一あるいは類似の形態で存在する epitope である。Von Wechmar and Van Regenmortel¹⁵⁾ は brome mosaic virus およびその外被蛋白には上記の3種の epitope が存在することを推察している。また、CMV においても同様の epitope の存在が示唆されている⁴⁾。本実験で得られた結果を Van Regenmortel が提唱した説にあてはめると、Vp に特異的な抗体は neotope に対するものであり、Dp に特異的な抗体、および Vp と Dp とに共通の抗体はそれぞれ cryptotope と metatope に対するものと考えることができる。

ウイルス粒子を CaCl_2 処理して得た Dp は分子形において均一ではなく、外被蛋白の種々のオリゴマーを含むことも考えられる¹⁴⁾。また、Vp 標品にも Dp やこれに関連した抗原が少量混在していたものと思われる。従って外被蛋白のモノマーおよび高純度の Vp を用いて、これらに対する抗体を精製し、それらの性質を詳細に調べることににより、CMV および外被蛋白の抗原決定基がより明確になるものと思われる。

本実験で用いた3種の抗血清の Vp および Dp に対する IgG 抗体を ELISA で調べたところ、寒天ゲル内二重拡散法で得られた結果とはほぼ同様の傾向を示した。しかし、Dp に対する抗体の ELISA 値は二重拡散法で得られた結果に比較してかなり高かった。このことは Vp と Dp とでは抗原価 (antigenic valence) が大きく異なることによるものと思われる。すなわ

ち、沈降反応においては抗体価の小さい抗原は大きい抗原よりも沈降しにくいために、それに対する見かけ上の抗体の量は小さくなると思われる。したがって、抗体の量およびその反応性の解析には沈降反応に基づく試験方法と ELISA とを併用するのが望ましいと考えられる。また、ELISA では沈降反応で検出できないような少量の抗体の検出も可能であった。F(ab')₂ ELISA は抗原に吸着した抗体を同一の conjugate で検出できるため、同一のウイルスに対する種々の抗血清のみならず、異なるウイルスや系統に対する抗血清間の反応性の比較にも有効であると思われる。

摘 要

ホルマリン固定したキュウリモザイクウイルスを家兔に静脈注射して得た抗血清 (As-VF-IV)、無固定のウイルスを筋肉注射して得た抗血清 (As-V-IM) および CaCl_2 処理により調製した D-protein (Dp) を筋肉注射して得た抗血清 (As-Dp-IM) に含まれる抗体の性質を調べた。

それぞれの抗血清から Sephadex G-200 を用いてイムノグロブリンを分離し、それらの抗体活性を調べた結果、いずれの抗血清も IgG に活性が認められた。なお、As-VF-IV では IgM にも弱い活性が検出された。

これらの抗血清をウイルス粒子 (Vp) あるいは Dp で吸収し、それらの抗体活性を調べた。また、これらの抗血清から、ウイルス-抗体結合物を酸性条件下で解離させることにより Vp に対する抗体を、Dp をリガンドとしたアフィニティクロマトグラフィーで Dp に対する抗体をそれぞれ精製した。抗血清の相互吸収試験、精製抗体の反応性およびそれらを用いた吸収試験の結果から、1) As-VF-IV は Vp に対する特異抗体および少量の Vp と Dp とに共通の抗体を含む、2) As-V-IM は Vp と Dp のそれぞれに特異的な抗体および両者に共通の抗体を含む、3) As-Dp-IM は Dp に特異的な抗体および Vp と Dp とに共通の抗体を含むことが明らかになった。

また、F(ab')₂ ELISA を用いて、それぞれの抗血清に含まれる Vp および Dp に対する IgG 抗体を測定することができた。

引用文献

1. Allen, W. R. (1968). Can. J. Botany 46 : 229-233.
2. Barbara, D. J. and Clark, M. F. (1982). J. gen. Virol. 58 : 315-322.
3. Clark, M. F. and Adams, A. N. (1977). *Ibid.* 34 : 475-483.
4. Devergne, J. C. and Cardin, L. (1970). Ann. Phytopathol. 2 : 639-661.
5. Hardie, G. and Van Regenmortel, M. H. V. (1977). J. Immunol. Methods. 15 : 305-314.
6. 前田孚憲・脇本 哲・井上成信 (1983). 日植病報 49 : 10-17.
7. 松橋 直・成内秀雄・臼井美津子 (1981). 免疫学実験入門, 学会出版センター, 東京. pp. 62.
8. 松本 勤 (1981). 日植病報 47 : 611-617.
9. McLaughlin, M. R., Bryant, G. R., Hill, J. H., Benner, H. I. and Durand, D. P. (1980). Phytopathology 70 : 831-834.
10. 四方英四郎・小島 誠 (1978). 日植病報 44 : 28-34.
11. 都丸敬一・日高 醇 (1960). 秦野たばこ試報 46 : 143-149.
12. Tremaine, J. H. and Wright, N. S. (1967). Virology 31 : 481-488.
13. Van Regenmortel, M. H. V. (1982). In Serology and Immunochemistry of Plant Viruses. Academic Press, New York. pp. 134-143.
14. Van Regenmortel, M. H. V., Hendry, D. A. and Baltz, T. (1972). Virology 49 : 647-653.
15. Von Wechmar, M. B. and Van Regenmortel, M. H. V. (1968). *Ibid.* 34 : 36-45.