

# イネ縞葉枯病抗体感作赤血球凝集反応の改良法について

木谷 清美・木曾 皓

(農林省四国農業試験場)

## I は じ め に

安尾ら(1963, '64)は、イネ縞葉枯病ウイルス保毒虫の血清による判定法を解明し、これを用いることにより、従来困難とされていた保毒虫の判定に簡便で迅速かつ確実な技法を開拓した。

筆者らはこれらの報告を参考にして、1964年～1966年の3年間にわたり保毒虫の判定や罹病イネの病態生理学的試験に応用をこころみたところ、2, 3不備あるいは不便を感じたところがあり、その改良につとめた結果、その目的を達することができたのでここにその改良法をとりまとめ報告する。

本研究に使用した新鮮な緬羊血液は、国立善通寺病院検査科のご好意によるところ多く、また本研究を遂行するにあたり、当病害研究室の山本孝純技官の援助をえた。記して深謝の意を表する。

なおイネ縞葉枯病ウイルスの血清による判定方法に関する反応の原理や具体的な実施法については、安尾ら(1963, '64)により詳述されているのでここでは省略する。

## II 不便あるいは不備な点

安尾らによる方法に従い、イネ縞葉枯病ウイルス抗体の調製および調製された抗体を用いて抗体感作赤血球凝集反応による罹病イネや媒介虫におけるウイルスの検定を実施したが、つぎのような諸点で不備を感じた。すなわち、① 抗体の調製に際し、普通ウサギに注射する注射材料(抗原)の調製過程でウイルスの損失が相等あり、かつ、健全蛋白を含む度合が高く、したがってウイルス抗体とともに健全蛋白抗体の生産がみられる。② FreundのAdjuvant法(木村, 1965)を用いても1回の注射では抗体価の高い血清がえられない。③ 抗体感作の手技の中では、新鮮な緬羊赤血球が常時必要であるが、その入手と保存が困難であり、とくに夏期の高温時には一層の不便を感じる。④ 抗体感作赤血球の保存途中および凝集反応過程において、夏期では感作赤血球の溶血をおこす場合が多い。とくに採血してから日時経過した緬羊赤血球を用いて抗体感作をした場合はなおさらである。

## III 改 良 法

### (1) 抗体作成用抗原(注射材料)の調製法の改良と注射回数

病葉を中性洗剤で充分洗滌後、蒸留水でよく水洗し、水分を除いた生葉100gをできるだけ細断し、M/100 磷酸緩衝液(pH 6.8)200mlを加える。磨碎は乳鉢でもよいが、病葉の葉令が進んだものでは磨碎が困難なので、ホモゲナイザー(回転数20000回転、容量500ml)を使用し、低温下(5℃下)で氷冷しつつ、時間をかけて十分に磨碎する。完全に繊維が切断されたら磨碎液をとり出し、ガーゼでろ過してろ液をしぼり取る。ろ液は180ml位とれる(A液)。これをジープフリーザ(-10℃～-20℃)で凍結させ、1夜放置後溶解させる。この操作で細胞内容物が完全に抽出される。その後汁液を5000rpmで30分間遠心分離(氷冷下)し、細胞破壊物残渣を除き上清をとり、この上清に20%量のクロロホルムを加え、シエカーで10分間振盪させる。これを5000rpmで20分間遠心分離すると3層に分離するから、最上清の淡黄褐色液を注意して取り除く(B液)。この液にPolyethylen glycol Carbowax 6000(PEG・6000)の24%液と4.3%NaCl液を加えて、最終PEG溶液が8%、NaCl液0.43%になるようにする(最上清液2に対して24%PEG液1, 4.3%NaCl1/10量の割合に加えればよい)。PEG 8%およびNaCl 0.43%を含むウイルス含有液を5℃下において25000rpm(15000rpmでも収量は少し低いが使用はできる)で60分間遠心分離し、上清(C液)と沈澱(ウイルスを含む)に分ける。沈澱を40mlのM/100 磷酸緩衝液に溶解し、4000rpmで10分間低温下で遠心分離し、不溶物を除去し、上清をとる。上清に再び24%PEG液と、4.3%NaCl液を加え、終

末8%PEG液と、0.43%NaCl液とし、25000rpmで5℃下で30分遠心分離する。上清(D液)と沈澱に分け、沈澱はさらに2〜3回上記の操作を反復実施する。この操作で淡黄褐色の不透明液はほとんど無色になり、やや螢光色を呈するようになる。最後の沈澱を少量の蒸留水に溶解し、5000rpmで20分間遠沈した上清を真空冷凍乾燥して保存し、使用に際し5〜10mlの生理食塩水に溶解させるか(静脈注射)あるいは蒸留水に溶解(筋肉注射)させて、Adjuvant法(木村, 1965)による抗原とする。100gの病葉からえられる抗原ウイルスの収量は $40 \pm 10 \text{ mg}$ が普通である。抗体価の完全上昇を望む場合は、上記の方法でえられた抗原(乾燥物として $40 \pm 10 \text{ mg}$ )を、第1回は、Adjuvant法により筋肉注射、第2回は10〜14日後再び筋肉注射、第3回、第4回および第5回はその後7日間隔で静脈注射をし、最後の注射後7〜10日目に全採血(1回注射後採血迄の日数は35〜40日)すればほとんど失敗はなく、非常に高い抗体価をもつ抗血清がえられる(第1表参照)。

#### (2) 抗体の精製、濃縮および脱塩法(安尾ら, 1963. 木村, 1965)

採血してえた抗血清を56℃、30分間非助化後等量の蒸留水を加え、氷冷下で攪はんしながら中性の冷飽和硫酸アンモニウム液(飽和硫酸アンモニウム液をアンモニウム水でpH7.0に調整する)を除々に添加する。稀釈抗血清の2/3量の飽和硫酸液を加え、硫酸濃度を0.4飽和とし、低温下(0〜5℃下)で1夜放置する。沈澱した $\gamma$ -グロブリンを集め、抗血清の1/2〜1/3量の蒸留水に溶解させる。透析して脱塩すると、液量が2倍量位増加し、抗体価が低下し再濃縮が必要なので、脱塩にはSephadex-G-25を用いると、抗体濃度を低下させないで脱塩できる。

#### (3) 長期保存緬羊赤血球液の調製法

イネ縞葉枯病抗体感作赤血球凝集反応の感作手技の過程で最も不便を感じるのは、新鮮緬羊赤血球の入手と保存および抗体感作赤血球の保存が困難なこと、すなわち緬羊赤血球の溶血がおこりやすいことである。これを解決するためには、ホルマリン固定赤血球を作り、感作に際しては生赤血球液と同じように、3.5%血球浮遊液としてタンニン酸処理をすればこの不都合が解決されることを知った(木村, 1965)。すなわち3.7%特級ホルマリンとpH7.0の磷酸緩衝食塩水(食塩1.600g, 磷酸第2ソーダー720g, 磷酸1加里0.82gを蒸留水1000mlに溶解)の等量混合液(固定液)40mlに、上記の半分の濃度の磷酸緩衝食塩水で2倍に稀釈した脱繊維赤血球またはAlsever液(ブドウ糖205g, 最純食塩0.42g, クエン酸ソーダー0.8g, 蒸留水100ml, クエン酸でpH6.1に補正)を等量加えた緬羊血液(市販品の保存血球液に相等)100mlを加え、35℃〜37℃で90分間、ときどき振りながら湯煎すると赤血球は黒褐色に変色して固定される。この場合37℃をこえると溶血する危険があるので絶対に37℃を越えてはならない。固定後、使用した赤血球液の50〜100倍量の磷酸緩衝食塩水でホルマリンが完全に除去されるまで、数回に分けて洗滌する。洗滌後固定赤血球液は0.3%ホルマリンを含む磷酸緩衝食塩水(保存液)に浮遊させて保存する。筆者等は、1回のホルマリン固定血球液の作成に際し、新鮮緬羊血液10mlにAlsever液10mlを加えた保存赤血球液(市販の赤血球)20mlに固定液8mlを加え、35℃で90分間処理した後、磷酸緩衝食塩水を1回に50mlで5〜8回(250〜400ml)洗滌後、保存液10〜15mlに浮遊させて保存している。上述した方法で固定したホルマリン固定赤血球浮遊液は、2〜4℃下の低温下で保存してもよいが、やむをえぬ場合は室温に放置しても溶血は認められないで、完全に感作をおこすことができる。また抗体感作赤血球液も、従来の生赤血球を使用した場合、防腐剤を加えて2〜4℃に保存しても20日前後、加えない場合には10日前後で溶血をきたすが、固定血球を使用すると、長期間にわたって溶血をみないで完全に保存することができる。したがって毎日、相当数の保虫虫を検定するような場合には、一度に相当量の抗体感作血球液を作成しておくので便利である。

一方ウイルス抗原と凝集反応をおこさせた場合、夏期でも低温下で反応を実施する必要がなく、室温で十分凝集反応結果が観察できる。また凝集物はそのまま放置しておいても溶血をきたすことがなく、前後の反応を比較観察できる利点がある。さらに固定赤血球は沈降速度が速いので、凝集反応結果は生血球を用いた場合よりも短時間で観察することができ、さらに陽性、陰性の判定が明瞭である。固定血球液と生血球液を用いた凝集反応感作結果は第2表の通りで、全く差異は認められない。(第2表参照)

#### (4) 血清、精製濃縮抗体、および抗体感作赤血球に対する防腐剤の選択

血清や精製濃縮抗体の保存は、真空冷凍乾燥によれば完全である。ジープフリーザを使用して冷凍保存すると、

第1表 純化抗体の抗体価

| 抗体 \ 稀釈度 | 5 <sup>0</sup> | 5 <sup>1</sup> | 5 <sup>2</sup> | 5 <sup>3</sup> | 5 <sup>4</sup> | 5 <sup>5</sup> | 5 <sup>6</sup> | 5 <sup>7</sup> | 5 <sup>8</sup> | 5 <sup>9</sup> | 5 <sup>10</sup> | cont |
|----------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|------|
| 抗体 1 *   | -              | +++            | +++            | ++             | ++             | ++             | ++             | +              | +              | +              | +               | -    |
| 抗体 2 **  | -              | +++            | +++            | ++             | ++             | ++             | ++             | +              | +              | +              | +               | -    |

- (註) 1 \* 塩析した硫酸をVisking社製のセロファンチューブで透析脱塩。  
 2 \*\* 塩析した硫酸をセファデックス-G-25で脱塩。  
 3 抗原は病葉3mgに正常血清加用ベロナール緩衝液3ccを加え磨砕4000rpmで10分遠沈した上清を原液(5<sup>0</sup>)として用いた。  
 4 健全葉抗原の場合はいずれの稀釈区においても陰性であった。

第2表 生緬羊赤血球とホルマリン固定緬羊赤血球との抗体感作赤血球力価の比較

| 血球種類 \ 稀釈度   | 5 <sup>0</sup> | 5 <sup>1</sup> | 5 <sup>2</sup> | 5 <sup>3</sup> | 5 <sup>4</sup> | 5 <sup>5</sup> | 5 <sup>6</sup> | 5 <sup>7</sup> | 5 <sup>8</sup> | 5 <sup>9</sup> | 5 <sup>10</sup> | cont |
|--------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|------|
| 生緬羊赤血球       | -              | +++            | +++            | ++             | ++             | +              | +              | +              | +              | +              | +               | -    |
| ホルマリン固定緬羊赤血球 | -              | +++            | +++            | ++             | ++             | +              | +              | +              | +              | +              | +               | -    |

- (註) 1 抗体は四国農試産を用いた。  
 2 抗原は病葉3mgを正常血清加用ベロナール緩衝液3mlで磨砕4000rpmで10分遠沈した上清を用いた。(原液区=5<sup>0</sup>は100倍稀釈となる)  
 3 稀釈度(5<sup>0</sup>)を抗原原液として5段階法で実施した。  
 4 抗体感作赤血球液は夫々0.05ml添加した。

使用時に溶解しなければならない。したがって溶解、凍結を繰返す結果となり抗体価が次第に下る傾向がみられるので、防腐剤を使用する必要に迫られる。防腐剤としてはフェノールを0.5%加えて氷室に貯えるか、終末1万倍液になるように、マーズニン(エチルマーキユリチオサリチル酸ソーダ)を加えるか、フェノール(0.2%)マーズニン(0.01%)を一緒に加える方法がとられているが、マーズニンは価格が高く、一般的でない。ところが窒化ナトリウム(NaN<sub>3</sub>)の1~10%液を抗血清や精製抗体の1/9~1/99量加え、最終濃度を0.1%とし氷室に保存すると上記のフェノールやマーズニンよりも防腐効果が優るので、窒化ナトリウムの利用が最良である。

#### IV む す び

安尾らによって研究された1ネ縞葉枯病抗体感作赤血球凝集反応の技法は縞葉枯病の研究に大きな寄与をしたが、抗体の調整あるいは感作の過程において、多少不備あるいは不便な点がみられたので、本法の改善を試みた。その結果とくに純度および力価の高い抗体の調製が可能となり、また抗体感作の過程で最も困難であった緬羊赤血球液を使用の段階において、ホルマリン固定の赤血球を使用することによって、常に室温で長期にわたって使用が可能となった。

#### V 文 献

- 安尾俊・柳田駿策(1963):植物防疫, 17(6):215-218.  
 農林省農事試験場病害第1研究室(1964):昭和38年夏作, 病害に関する試験成績(稲ウイルス病に関する研究)PP1-9.  
 木村一郎(1965):蛋白質・核酸・酵素, 9:49-50.  
 ——(1965):同上, 9:594.