

ミニ特集：PPV（ウメ輪紋ウイルス）の現状と対策

# PPV の簡易迅速な診断技術の開発

東京大学大学院農学生命科学研究科 <sup>まえじま</sup>前島 <sup>けんさく</sup>健作・<sup>はまもと</sup>濱本 <sup>ひろし</sup>宏\*・<sup>やまじ</sup>山次 <sup>やすゆき</sup>康幸・<sup>なんば</sup>難波 <sup>しげとう</sup>成任

## はじめに

ウメ輪紋ウイルス (plum pox virus, PPV) は、欧州全域で核果類生産に重大な被害を及ぼしており、その経済的重要性から、最も診断技術の開発が進んでいる植物ウイルスの一つである (SCHOLTHOF et al., 2011)。検定植物を利用した生物検定に加えて、1980年代からは特異的抗体を用いた ELISA による抗体診断、1990年代からは特異的プライマーを用いた RT-PCR による遺伝子診断が実用化され、2000年代以降もリアルタイム RT-PCR をはじめとする様々な遺伝子診断技術が報告された。これらの中で、現在広く利用されているのは、ELISA と RT-PCR である。

我が国では、2009年4月にPPVの初発生が発表されて以来、農林水産省（以下農水省）による国内検疫措置（以下PPV根絶事業）として、全国の発生状況調査と並行して、発生地域における緊急防除が実施されてきた。当初、喫緊の課題となったのが、大規模な検定事業に最適な診断技術の選定であった。すなわち、海外で採用されている ELISA と RT-PCR は高額な専用機器や複雑な作業工程を要するため、費用と労力の観点から多検体の診断には不向きであったうえ、技術基盤が海外にあるため、国内で発生した PPV に適合するのかが不明であった。これらの課題を解決するため、東京大学植物病院<sup>®</sup>では直ちに PPV 国内分離株の遺伝子情報をもとに簡便・迅速・高感度な診断技術の開発に着手し、同年8月までに、イムノクロマトおよび RT-LAMP による2種類の PPV 診断キットを製品化した。これらは農水省による PPV 根絶事業に採用され、2016年までの8年間に延べ200万樹以上の検定に活用され、2.5万樹の感染植物が特定された。本稿では、各診断キットの概要とともに効果的なサンプリングに向けた PPV の局在特性、診断キットを活用した PPV の防除体制の展望について紹

介する。

なお、PPV に関する基本的な情報や発生の経緯、過去の診断技術（前島ら、2009）や、LAMP の実験操作上の注意点（前島ら、2013）に関しては既に本誌で解説しているため、合わせて参考とされたい。

## I イムノクロマトによる抗体診断

まず、イムノクロマトによる抗体診断キット「プラムポックスウイルス イムノクロマト」について概説する。イムノクロマト法は、抗原が試験紙に吸い上げられる過程で金コロイド標識抗体と結合後、あらかじめ試験紙上に固定された抗体に捕捉されることにより、抗原を介した赤紫色の金コロイドの凝集が起こることで、抗原を検出する技術である（図-1）。本キット用の抗体（ポリクローナル抗体）の開発には、国内で発生した PPV (D 系統) の外被タンパク質が用いられている。PPV にはゲノム配列の差異にもとづき9系統 (D, M, Rec, T, W, EA, C, CR, An) が知られているが、国内で発見された PPV はいずれも D 系統で配列同一性も高いため (MAEJIMA et al., 2010; 2011)、抗原性の差はほぼなく、本キットにより広く検出可能である。また、ヨーロッパで発生している D 系統に加えて、他の主要系統である M, Rec をはじめ、T, W, EA など複数の系統も本キットにより検出可能である (MAEJIMA et al., 2014)。

本キットは ELISA と比較して、簡便性・迅速性に優れ、葉の粗汁液に試験紙を浸すワンステップの操作により完結し、2~15分後には結果を目視判定できる（図-2）。また、感度も海外製 ELISA と比較して同等以上であり (MAEJIMA et al., 2014)、海外製イムノクロマトと比較して、凍結保存試料や落葉期の葉からの検出性能にも優れる (MAEJIMA, 2016)。

特別な実験器具や設備を必要とせず、キット内容物のみで診断が完結するため、現場で使用できることも大きな特徴である。温度条件による影響も受けにくく、筆者らが冬季に雪上で花卉や枝を検定した際にも、問題なく PPV を検出することができた。

## II RT-LAMP による遺伝子診断

次に、RT-LAMP による遺伝子診断キット「プラムポ

Development of Simple and Rapid Diagnostic Kits for Plum Pox Disease. By Kensaku MAEJIMA, Hiroshi HAMAMOTO, Yasuyuki YAMAJI and Shigetou NAMBA

(キーワード：イムノクロマト, LAMP, ウメ輪紋ウイルス, 病害診断, 植物病院, 植物医師)

\*現所属：法政大学生命科学部