

# 植物防疫

昭和五十五年三月二十五日  
昭和二十四年九月九日  
第三十三号  
印刷  
第三十四卷  
第三号  
每月一回  
三日發行  
郵便物認可

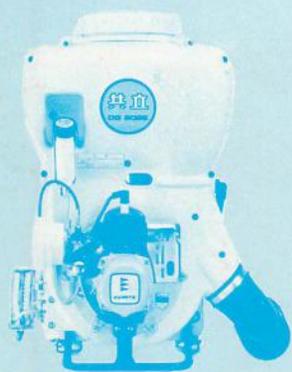
1980

3

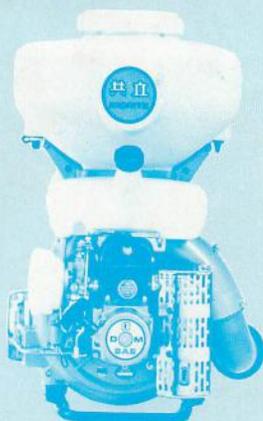
VOL 34

特集 ウイルス病の抗血清診断

優れた散布効率.....  
**肥料散布はDM**



**DG-202E**



**DM-9AE**



**DMD-11E**

電子エンジン付

## 共立背負動力散布機

防錆対策も万全。肥料・除草剤・農薬散布に抜群の散布効率を発揮します。

豊かな農林業をめざす.....

 株式会社 **共立**

 **共立エコ物産株式会社**  
〒160 東京都新宿区西新宿1-11-3 (新宿8ビル) ☎03-343-3231(代表)

りんごの病害防除に!

黒点病・斑点落葉病

**ピルリックス** 水和剤

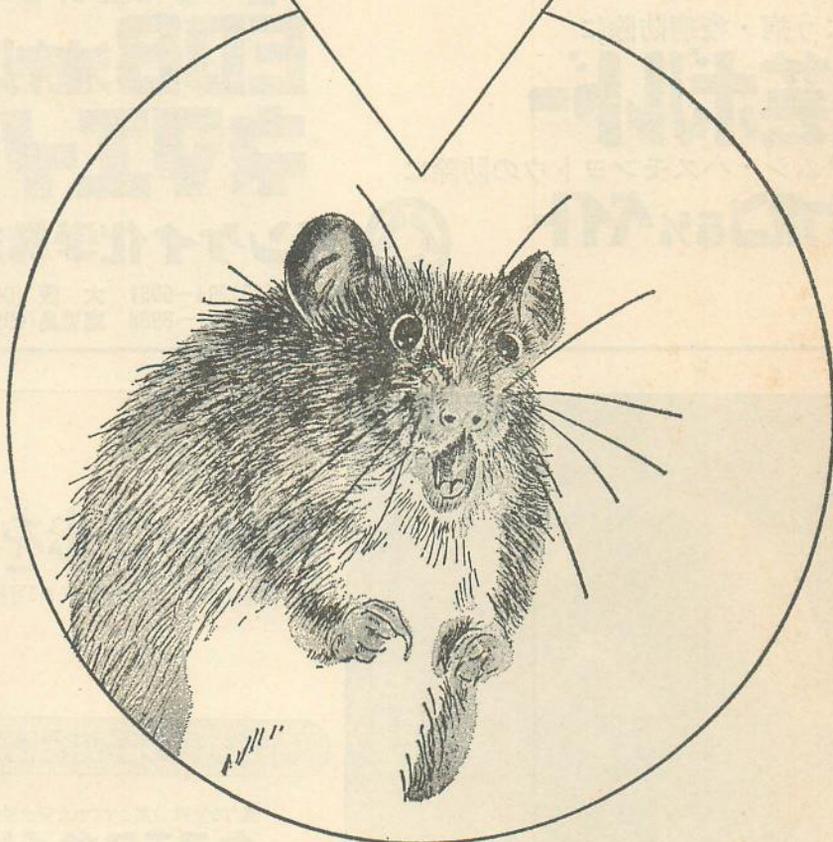


大内新興化学工業株式会社  
 〒103 東京都中央区日本橋小舟町 7-4

# クミアイ 鼠とり

雨雪に耐えられる防水性小袋完成

ラテミン小袋  
タリウム小袋



クマリン剤

固形ラテミンS=家鼠用  
水溶性ラテミン錠=農業倉庫用  
ラテミンコンク=飼料倉庫用  
粉末ラテミン=鶏畜舎用

燐化亜鉛剤

強力ラテミン=農耕地用  
ラテミン小袋=農耕地用

タリウム剤

液剤タリウム=農耕地用  
固形タリウム=農耕地用  
タリウム小袋=農耕地用

モノフルオール酢酸塩剤(1080)

液剤テンエイテイ=農耕地用  
固形テンエイテイ=農耕地用



取扱 全 農・経済連・農業協同組合  
製造 大塚薬品工業株式会社

本社：東京都豊島区西池袋3-25-15 1Bビル TEL 03(986)3791  
工場：埼玉県川越市下小坂304 TEL 0492(31)1235

きれいで安全な農産物作りのために！

 マークでおなじみのサンケイ農薬

★水田の多年生雑草の防除に

**バサグラン** 粒剤  
水和剤

★果樹園・桑園の害虫防除に  
穿孔性害虫に卓効を示す

**トラサイド** 乳剤

★かいよう病・疫病防除に

**園芸ボルドー**

★ネキリムシ・ハスモンヨトウの防除に

**デナボン5%ベイト**



★ナメクジ・カタツムリ類の防除に

**ナメトックス**

★線虫防除に

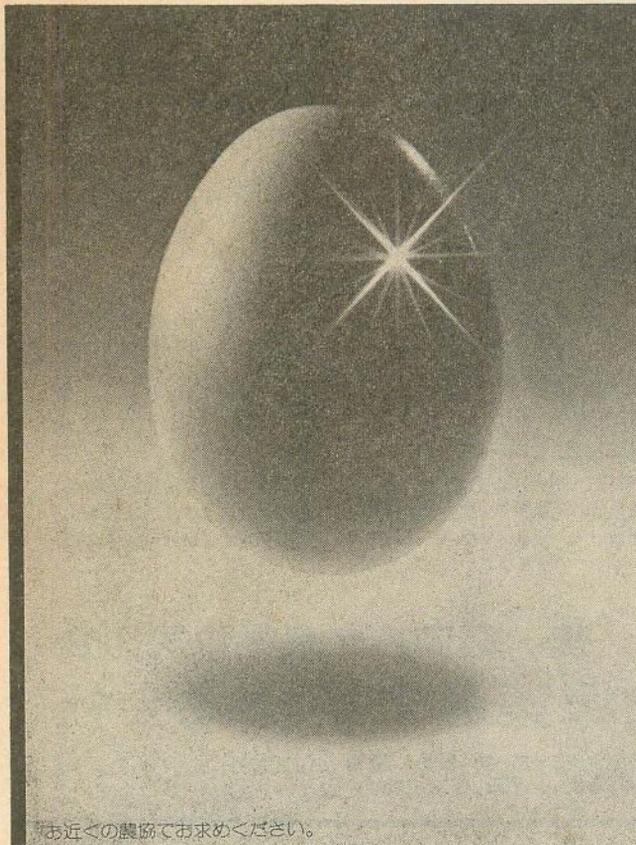
**ネマホルン**

**EDB** 油剤30

**ネマエイト**

**サンケイ化学株式会社**

東京 (03)294-6981 大阪 (06) 473-2010  
福岡 (092)771-8988 鹿児島 (0992) 54-1161



挑戦が進歩をうむ。

よりよい農薬を求めて、ホクコーはあらゆる可能性に挑みます。

いもち病の予防と治療に！

強力な防除効果とすぐれた安全性

**カスラフサイド** 粉剤  
水和剤  
ゾル

いもち病の省力防除に効きめのながーい

ホクコー **オリゼメート** 粒剤



取扱い  
農協・経済連・全農



北興化学工業株式会社  
〒103 東京都中央区日本橋本石町4-1-2  
支店：札幌・東京・名古屋・大阪・福岡

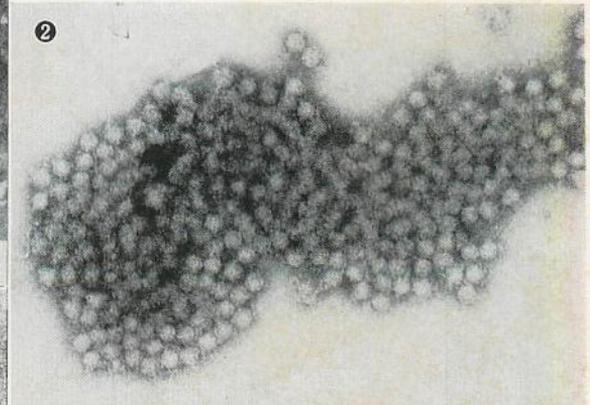
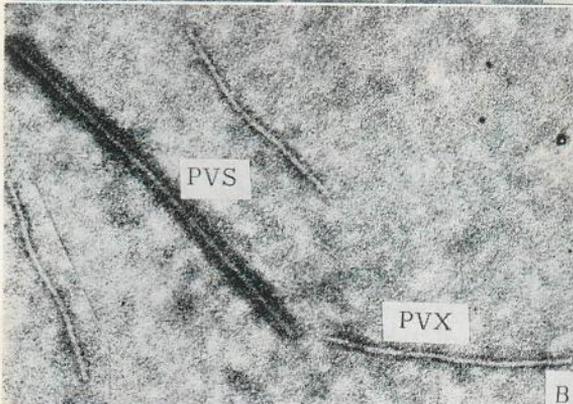
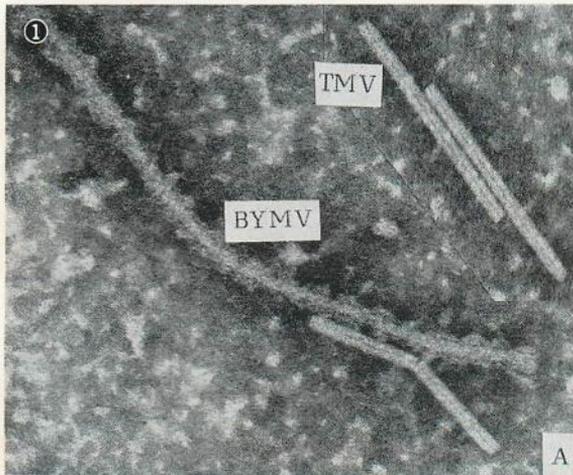
お近くの農協でお求めください。

# 免疫電子顕微鏡法による植物ウイルス病の診断

新潟大学農学部植物病理学教室

小島 誠

(原図)



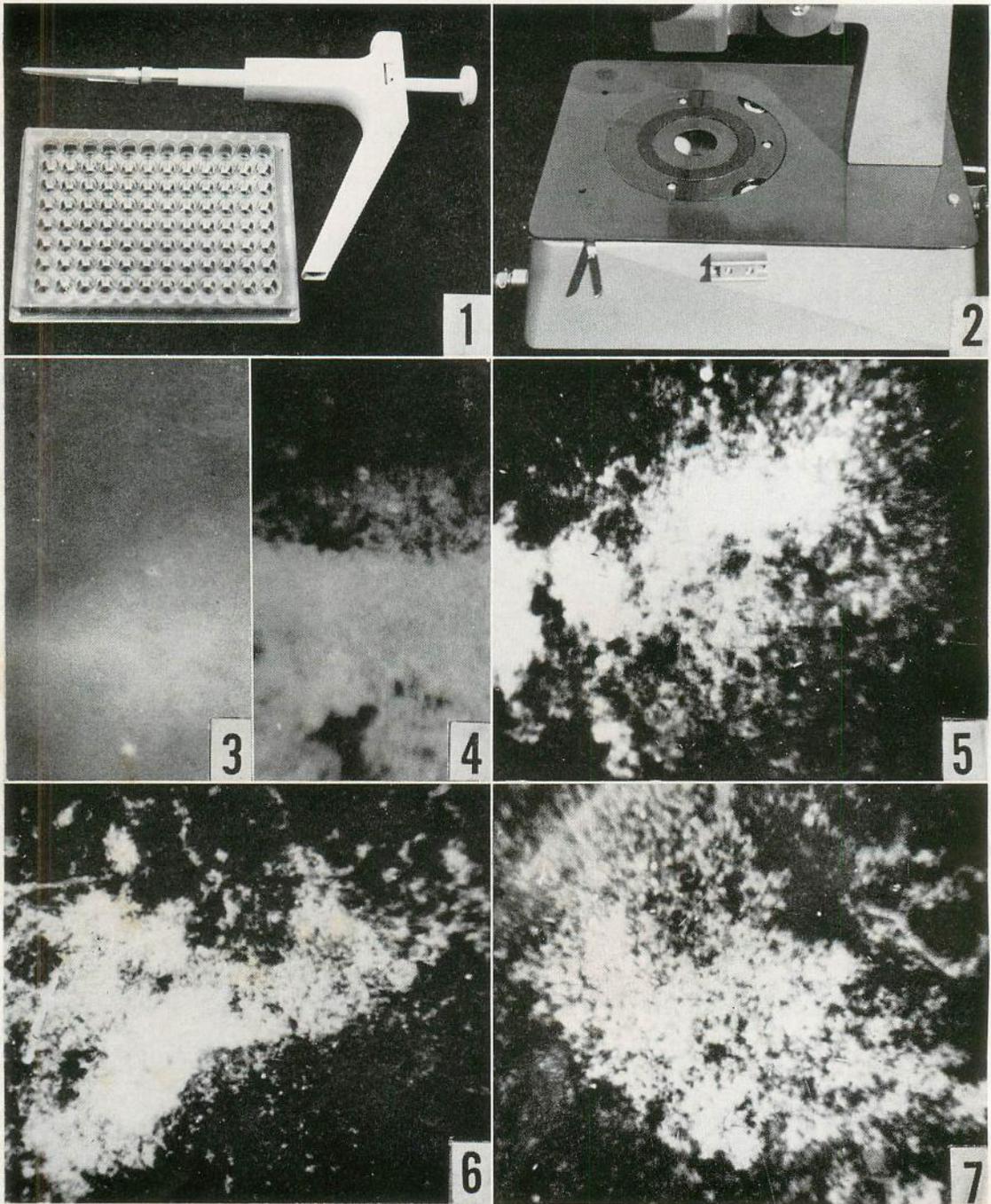
## <写真説明>

- ① leaf-dip serology の反応像 (A : BYMV 抗体にコートされた BYMV 粒子。TMV 粒子はコートされない。B : PVS 抗体にコートされた PVS 粒子。PVX 粒子はコートされない。)
- ② PLRV 抗体による PLRV 粒子のクランプ
- ③ PLRV 抗体にトラップされた PLRV 粒子 (A) と抗体によって装飾された PLRV 粒子 (B)。A, B とも同倍率。

—本文 11 ページ参照—

# 微量沈降反応法による植物ウイルス病の診断

北海道大学農学部植物学教室 仙北俊弘 (原図)



<写真説明> 一本文 16 ページ参照一

- 1 Micro selectapette (Clay Adams 社製) と Multi-dish tray (Linbro Chemical 社製)
- 2 試料台の部分を平滑にした改良暗視野顕微鏡 (オリンパス JMTr)
- 3 健全ジャガイモ粗汁液 (4 倍希釈) と PVS 抗血清 (8 倍希釈) との反応
- 4 PVS 罹病ジャガイモ粗汁液 (4 倍希釈) と PVS 抗血清 (8 倍希釈) との反応
- 5 純化 PVX 抗原 ( $OD_{260}=0.3$ ) と抗血清 (32 倍希釈) との反応
- 6 純化 PVY 抗原 ( $OD_{260}=0.15$ ) と抗血清 (16 倍希釈) との反応
- 7 純化 RDV 抗原 ( $OD_{260}=0.16$ ) と抗血清 (16 倍希釈) との反応

特集：ウイルス病の抗血清診断

植物ウイルス病の抗血清診断法の普及のために.....	井上 忠男.....	1
寒天ゲル内拡散法による植物ウイルス病の診断.....	匠原監一郎.....	6
免疫電子顕微鏡法による植物ウイルス病の診断.....	小島 誠.....	11
微量沈降反応法による植物ウイルス病の診断.....	仙北 俊弘.....	16
蛍光抗体法のカンキツトリステザウイルスへの利用の現状.....	佐々木 篤.....	22
ラテックス凝集反応による温州萎縮病の診断.....	宇杉 富雄.....	25
酵素結合抗体法 (ELISA) による植物ウイルス病の診断 .....	久原 重松.....	29
新しく登録された農薬 (54.12.1~12.31) .....		37
同 上 (55.1.1~1.31) .....		38
新刊紹介.....		36

緑ゆたかな自然環境を...

## 「確かさ」で選ぶ……バイエルの農薬



●いもち病・穂枯れを防いでうまい米を作る

® **ヒノザン**

●カメムシ・メイチュウなど稲作害虫に

® **バイジット**

●アブラムシ・ウンカなど吸汁性害虫を省力防除する

® **タイシストン**

●ドロオイ・ハモグリ・ミズウムシなどに

® **ガンサイド**

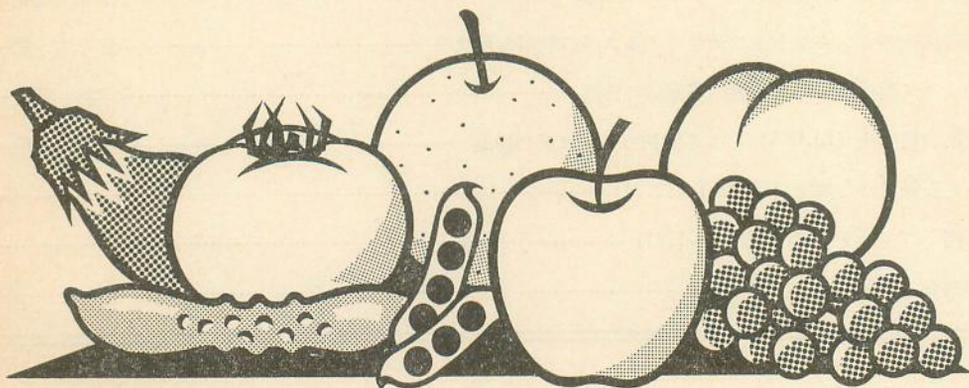
●各種作物のアブラムシに

® **エストックス**

日本特殊農薬製造株式会社

東京都中央区日本橋室町 2 - 8 巻 103

正しく大切に使って、  
より良い効果——！



新発売

# 武田 **ロブロール**<sup>®</sup> 水和剤

① 各種作物の重要病害に卓効

ロブロールは、(りんごの斑点落葉病、なしの黒斑病)、(野菜、ぶどうの灰色かび病)、および(野菜の菌核病、もも・おうとうの灰星病など)の各種病害に優れた効果を示します。

② 予防散布がより効果的

特に予防効果が優れているので、早めに散布するのが効果的です。

③ 耐性菌に対しても有効

現在問題になっている各種耐性菌に対しても高い防除効果を示します。

④ 各種の殺菌、殺虫剤との現地混用が可能

⑤ 環境に対する影響が少ない

魚介類、蚕、蜜蜂、野鳥などに対して、安全性の高いことが確認されています。

●園芸作物病害の基幹防除に

●園芸作物の病害に

武田 **ダゴニール**<sup>®</sup> テュボン **ベンレート**<sup>®</sup> 水和剤

# 植物ウイルス病の抗血清診断法の普及のために

大阪府立大学農学部植物病理学研究室 <sup>いの</sup>井 <sup>うえ</sup>上 <sup>ただ</sup>忠 <sup>お</sup>男

## はじめに

近年、特に 1960 年代以降、我が国における植物ウイルスの同定、判別に関する研究は、電子顕微鏡によるウイルス粒子観察法が確立したことなどによって、多くの業績が蓄積されてきている。また、この間、植物ウイルス分類の面でも、約 20 のウイルスグループが設けられるほどに顕著な進展をみたこともあって、ウイルスの種類判別は専門の研究者にとって必ずしも困難なことではなくなっている。主として宿主範囲や病徴観察だけに頼っていた以前の状況を今改めて想起すると、隔世の感に堪えないものがある。

しかしながら、このことを一面から見ると、ウイルスを迅速、確実に判別するためには、例えば電子顕微鏡のような特殊な実験設備や、ウイルスの種類や性質についてのかんりの経験と知識を必要とするようになってきているとも言えよう。したがって、このような設備や技術、知識などの条件を備えずに、的確、迅速にウイルス判別を行うことは、極めて豊富な研究上の情報があるにもかかわらず、専門家以外の一般にとってはかえって困難さを増してきているとも考えられる。また、一方、ウイルス病の防除の視点から診断、判別の効果を考える場合、更に次のような問題もある。それは、今仮に適切な診断、判別ができたとしても、ウイルス診断の手段を判別植物への接種試験だけに頼る場合には、診断結果を得るまでに日時を要して、実際の病害対策としては効果があがりにくいということ、加えて、いったん発生したウイルス病に対してはいまだに有効な治病法がないことなどである。このような諸理由から、的確な診断が病害対策の基本であることはよく理解されているにもかかわらず、現在のところ、ウイルスの診断、判別が積極的に広く行われているとは言い難い。

本号は、植物ウイルスの診断に有力な利器である血清学的手法について、特に実用的診断、更にはほ場検診への利用を目指す技術という観点からの特集号として企画されているが、本文ではウイルスの血清診断法全般に関して筆者の私見の一端を述べてみたい。

## I 血清診断の普及、実用化の必要性

ウイルスの診断、判別法の中で、血清学的方法には種

種の利点があり、場合によってはウイルス病専門家でなくても十分にこれを活用することができる。血清診断の有用性は、これまでにパレイシヨの PVX 病、イネの縞葉枯病、キュウリやスイカでの緑斑モザイク病などにおける経験から、かなり広く理解されており、その他のウイルス病についても抗血清を利用した診断法の確立と普及の要望が強くなってきている。

血清診断の要望に対応して、上記の例など、ウイルスの診断に広く利用する目的での抗血清作成法、血清診断技法の検討が行われ、その成果がある程度広く活用されて効果をあげたものである。しかしながら、他の多くのウイルスの場合、抗血清作成の目的が、従来主としてウイルスの類縁関係の検討など、純研究用の目的に片寄っていたうらみがあり、血清反応の手法にしても、これをウイルス診断に広く利用するための検討という点では、必ずしも積極的に研究されてきたとはいえなかった。

我が国では昭和 43 年当時でも、既に 26 種のウイルス抗血清が作られていた（植物ウイルス保存目録：日本植物病理学会刊による）。そしてそれ以後、更に数多くのウイルスに対する抗血清が作られてきている。したがって、これらのウイルス抗血清及び抗血清作成技術の蓄積を、たんに純研究用だけに止めず、少なくとも実際面で要望の多い主要ウイルスについて、広く診断に活用する方策を推進、開発しなければならない時期が既に来ているといえよう。

## II 実用的診断の観点に立った各種血清試験法の評価

ウイルス診断、判別のための血清試験法には種々のものがある。表に実用的血清診断技術という立場からみた、各種血清試験法の持つ利点及び難点を略記して示した。血清診断技法として望ましいのは、ウイルス病防除に直結するほ場検診に利用できる技術であることはもちろんである。しかし、現時点では一挙にこれを確立するにはまだ困難な面も多いので、当面は血清診断法をできるだけ実用化に近づけ、普及を試みる努力がなされる段階であろう。したがって、実用的診断法として当面目指す方向は、必ずしも直ちにはほ場検診に持っていきけるような技術に至らなくてもやむを得ないのではなからうか。この観点からすれば、血清学的諸技法を有効に活用して

各種血清試験法の特長 (ウイルス診断技術としての見地から)

血清試験法	利 点	植物汁液の清澄化	難 点
スライド法	手法簡単, 判定は迅速	不 要	パレイショの PVX 以外は非特異凝集で判定困難なことが多い
混合法 <sup>1)</sup>		要	弱い反応の判定やや困難
重層法 <sup>2)</sup>		要	ウイルス検出精度が低い
微量沈降反応法 <sup>3)</sup>	比較的簡便, 多数検体処理が可能, 抗血清は比較的少量で可	要	弱い反応の判定やや難
ラテックス凝集反応法	ウイルス検出精度が高い	要	手法がやや複雑
赤血球凝集反応法	ウイルス検出精度が高い	要	手法がやや複雑
寒天ゲル内拡散法 (放射拡散法, 二重拡散法及び各種変法)	反応の読み取りが容易	必須でない	長形ウイルスなどは粒子崩壊処理を要す. ウイルスによっては D-protein 抗血清を要す. ウイルス検出精度検討を要す
補体結合反応法	反応の特異性が優れる	要	手法が複雑
蛍光抗体法	組織内ウイルス分布が分かる		蛍光顕微鏡を要す. 切片作成の要あり. 微量ウイルスは検出困難
ELISA (酵素結合抗体) 法	ウイルス検出精度は極めて高い	要	手法が複雑, 分光光度計または肉眼判定
免疫電子顕微鏡及び関連技法	ウイルス検出精度, 特異性が高い. 混合感染検出可能		電子顕微鏡を要す
SSEM 法	低濃度ウイルス検出可能		電子顕微鏡を要す

1) 沈降法, tube test などともいう, 2) リングテストともいう, 3) ミクロプレシピンテスト, 微凝集反応法ともいう.

直接, 間接にウイルス病対策に役立てるために, 診断実施者や対象ウイルスの条件を考慮して二つの方向から検討されてよいものと筆者は考える。

その一つは, ウイルス病研究のための特別な設備, 器具を利用する条件のない関係者にも広く普及して実施でき, 更には防除を目的としたほ場検診にも活用できるような技術を確立するという方向である。また, もう一つは, 電子顕微鏡その他の設備, 器具を利用できる試験研究機関で, 設備などを有効に活用してウイルス診断の精度と能率を格段と向上させることによって, 実用的診断の要望に積極的に対応するための技術と体制を確立するという方向である。

#### 1 一般に広く普及して利用できる血清試験法

血清診断が専門家だけに止まらず, 一般にも広く普及して活用されるためには, その技法は次のような条件を満たしていることが望ましいであろう。

(1) 特殊な設備, 器具及び熟練を要せず, できるだけ簡便に, しかも多数の検体を迅速に処理できること。

(2) 血清反応の判定を確実, 容易に, かつ短時間内に行えること。

(3) 少なくとも発病植物については確実に診断でき

るほどのウイルス検出精度があること。

従来の各種の血清試験法の多くは, 必ずしもこれらの全条件を満たすものとはいえない。特に, ほ場検診技術としてみた場合, 多くの血清試験法で必須とされる遠心分離操作など, 抗原試料作成に当たっての植物汁液清澄化処理は, 手法の簡便さならびに多数検体処理という点で必ずしも有利とはいえない。したがって, 抗原試料の遠心操作を省ける手法があるとすれば, 簡便化の面では最も望ましいものであろう。比較的簡便であり, ある程度多数の検体も取り扱うことができ, ここに挙げた (2), (3) の条件もほぼ備えている微量凝集反応法 (ミクロプレシピンテスト) にしても, 抗原植物汁液の清澄化処理が一般には必要であり, 簡便さの程度からすれば必ずしも十分ではないかもしれない。

植物汁液の遠心操作 (清澄化処理) 不要, または必ずしも要しないことを特長とする方法としては, 現在のところスライド法及び寒天ゲル内拡散法がある。

スライド法は極めて簡便で, 血清反応の判定もその場で迅速に行うことができ, ほ場検診技術としては理想的ともみられる方法である。そして, パレイショの PVX のほ場検診に利用されて効果をあげていることは周知の

とおりである。しかしながら、この方法は PVX 以外の多くのウイルスに適用する場合には、非特異凝集を生じて判定が混乱しやすいという大きな難点があり、この点の改善がなければ残念ながら利用範囲を広げることにはできない。

寒天ゲル内拡散法の代表的な手法は、二重拡散法である。標準的な寒天ゲル内二重拡散法は、結果の判定までにやや時間（多くは数日程度）を要すること、ウイルス検出精度が必ずしも優れていないことを除けば、肉眼観察で血清反応の沈降帯の有無を見ることができるので、小球形ウイルスなどの場合にはかなり好都合である。この手法は、従来、ウイルスの抗原分析、類縁関係調査など、実用的な診断用としてではなく、むしろ精密な研究用のものとして理解されていた印象が強い。この方法には寒天ゲルの調製や寒天への穴開けなどが必要であって、専門家以外の人にとってはやや煩わしい方法と受け取られやすい。更に、標準的な二重拡散法では、前述のようなウイルス検出精度の問題、長形ウイルスではなんらかのウイルス粒子崩壊手段を用いなければならないなどの問題があり、これらの難点についての改善なしには実用化の期待は持ちにくい。

近年、寒天ゲル内拡散法での上記のような難点のある程度解消するとみられる幾つかの有望な手法が開発されてきている。例えば、本号記事にも紹介されている、キュウリモザイクウイルス (CMV) 診断のために筆者の研究室で開発した二つの方法、特に簡易二重拡散法は手法が極めて簡便であり、ウイルス検出精度はササゲを用いる生物検定と同程度かそれ以上で、発病株の診断にはほぼ十分なものとみられるものである。これは一部の地方の農業試験場などで試験的に利用されて評価を受け、今後実用化の可能性のある安定した技術とみてよいであろう。また、この方法はウイルス検定時期などの検討を行えば、キク微斑ウイルスにも適用できる可能性もあるとみられている。

長形ウイルス、特に potyvirus グループや closterovirus グループなどの各種ウイルスへの適用が有望な方法としては、SDS-immunodiffusion test (SDS-寒天二重拡散法) が挙げられる。この手法の簡便化、実用的診断技術への発展の可能性については筆者の研究室でも検討中であるが、いましばらくの基礎研究の結果を待ちたい。

## 2 試験研究機関などでウイルス診断の精度、能率を高めるための血清試験法

各種の設備、器具を備えた試験研究機関では、本来の研究目的だけでなく、ほかからの依頼を受けて実際のな

ウイルス診断の面に貢献する必要も多いわけである。試験研究機関が更に多くの実際の要望に対して能率よく、しかも確実に対応するためには、そこで用いられる血清診断の手法は次のような条件をできるだけ満たすようなものになるであろう。

(1) 特殊な設備、器具ならびに技術を要し、ある程度複雑な手法であるにしても、多数の検体でも能率よく処理できること。

(2) 診断結果が確実に、しかも迅速に得られ、ウイルス検出精度は十分に高いこと。

このような条件をある程度満たすものとしては、前にも挙げた微量凝集反応法があり、更に高いウイルス検出精度が期待されるものとしては、ラテックスあるいは赤血球凝集反応法、ELISA 法 (enzyme-linked immunosorbent assay, 酵素結合抗体法) などがある。

微量凝集反応法の手法や判定の安定化のために、手法や器具の改善についての考案が北海道大学で行われ、本特集号の記事でも詳述されている。赤血球を介して凝集反応を増幅することにより、ウイルス検出精度を高める赤血球凝集反応法は、以前にもイネ縞葉枯ウイルスの保毒虫検査などに応用して経験されているところであり、本号の記事で紹介されるラテックス凝集反応法でも、同様の高いウイルス検出精度が期待される。これらの凝集反応法はある程度の設備があり、手法に習熟すれば、かなり多数の検体でも処理することができるので、普及して実用化に結び付ける可能性を期待してよいであろう。

ELISA 法の詳細は本号記事で紹介されているが、これは血清反応を酵素を媒体とした呈色反応に置き換え、反応の程度を分光光度計または肉眼的に測定するという、従前にはなかった特殊な方法である。この方法はウイルス検出精度が極めて高く、かなり多数の検体の診断も可能である。我が国では ELISA 法の利用例はまだそれほど多くはないが、一部の外国 (例えばイスラエルなど) では積極的に利用して、特にカンキツのトリステザウイルスなどについては防除面でも顕著な効果が期待されている例もある。

カンキツのトリステザウイルス保毒検定のために、土崎・佐々木によって開発された蛍光抗体法による診断は、局在性のウイルスを組織学的に検出する点で他の方法に比べて特色がある (本号記事参照)。果樹のような永年作物のウイルス保毒検定では、ウイルス検出精度が優れて信頼度の高いことが特に必要となるので、現時点では、診断手法はある程度複雑であるにしても、できるだけ精度の高い上述の各種方法の活用を検討すべきであろう。

血清反応を電子顕微鏡下で観察し、ウイルスを粒子レベルで特異的に検出する方法として発達したのが各種の免疫電子顕微鏡法 (leaf dip serology 及びその関連技法) である (本号記事参照)。また、SSEM法 (serologically specific electron microscopy) はウイルス粒子を抗血清処理した電顕試料支持膜上に捕捉、濃縮して、ウイルス検出精度を高めようとする点で特長がある。電顕的なこれらの方法はウイルス特異性や検出精度の点で優れており、混合感染の識別ができる場合もあるので、電子顕微鏡を備えた試験研究機関で各種ウイルスの診断に十分利用できるものである。このような技術を活用すればウイルス診断能率を格段と向上させることができるので、各地の試験研究機関における設備の一層の活用が可能になり、実際の診断要望に対しても更に適切、迅速に対応できるようになるであろう。

### III 血清診断の普及、実用化に当たり検討すべき関連事項

血清診断法を実用化技術として普及しようとするに当たり、更に検討して解決すべき問題として、以下に挙げるような事項が考えられる。

#### 1 実用化技術を目標とした血清試験法の開発

実用的血清診断を目指した手法の持つ簡便さの程度やウイルス検出精度は、既述のように、診断実施者、機関によって、現時点では必ずしも一様でなくてもよいと考えられる。しかし、ウイルス検出精度の向上だけを特に重視する立場をとるとすれば、いきおい簡便化の方向とは逆に、特殊な設備や器具、技術を必要とする複雑化の方向に進みやすい。広く普及すべき実用化技術を目指すならば、ウイルス検出精度はある程度のレベルで満足することとし、特別な設備や器具なしでも診断実施者が十分に活用できるよう、簡便化の方向を見いだすことも現時点では重要であろう。そのためには、既存の諸方法を精度の向上、簡便化の方向で改良する研究も含めて、新しい実用化技術に目標を置いた基礎研究が今後とも強く押し進められなければならない。

近年、相次いで開発された種々の血清試験法も、多くは新しい発想と明確な目標の中から生まれたものとみられ、新しい技術の開発には今後とも関係者の努力が必要であろう。このためには関係研究者間での研究材料、技術、情報などの交換、連絡を有効に行い、更に利用価値の高い血清診断技術の開発を目指した研究班組織などの体制を作ることも考えてよいであろう。

#### 2 ウイルス抗血清の作成、保存、品質管理、輸送

従来、多くのウイルス抗血清はこれを作成した研究者

の研究上の必要性の範囲で作られることがほとんどであった。そのため、これまでに作られた抗血清のすべてが血清診断に適したものばかりとはいえなかった。抗血清をウイルス診断に広く利用するとすれば、診断の需要に応じて必要な品質 (力価、健全抗体の有無などの) を備え、十分な量のウイルス抗血清を準備しなければならない。そのためには、多くのウイルスで今後改めて抗血清を作り、質、量ともに十分な診断用抗血清の確保と供給の体制を検討する必要がある。

ウイルス抗血清 (場合によってはウイルス D-protein 一崩壊処理したウイルスタンパク質一の抗血清) の作成には、まず免疫抗原ウイルスの純化が必要であり、そのための設備と十分な技術が必要である。したがって、ウイルスの純化と診断用抗血清の作成はそれぞれのウイルスの取り扱いに熟達した特定の研究者 (機関) の協力を得て委託するのが当面の適切な方向と考えられる。また、こうして作成された抗血清は、後述する配布体制とも関連するので、特定の機関 (例えば日本植物防疫協会など) に登録、または寄託するのも一つの方法であろう。血清診断用に準備された抗血清は、それぞれの品質や診断に用いる血清試験の方法を明らかにしておくことはもちろんであるが、実際の要望に応じて配布するまでの貯蔵の条件や場所などについての検討も必要である。

各地で血清診断が広く行われることになれば、抗血清の輸送形態についても当然研究されなければならない。抗血清の輸送形態としては、通常、グリセロールと 1:1 に混合したもの、あるいは凍結真空乾燥したものなどが考えられるが、用いる試験方法などによっては紙に吸着、乾燥させたもの (本号記事の簡易二重拡散法参照) のほうがより便利な場合も多いであろう。

#### 3 抗血清の配布及び技術の普及

ウイルス抗血清を入手するには、従来、その抗血清を作成した研究者 (機関) に対して個人的に分与を申し入れる場合がほとんどであった。このことも、強い要望はありながら血清診断が必ずしもこれまで一般化しなかった理由の一つと考えられる。したがって、せっかく優れた血清診断手法が開発されたとしても、抗血清の入手方法が今後も従前どおりであるとすれば、実用診断に普及するという目的は達せられにくい。このことから、前述のウイルス抗血清の作成、確保の体制と並行して、診断用抗血清の一般への配布体制の整備も必要となってくる。診断用抗血清の配布はある特定の機関 (例えば日本植物防疫協会など) がこれに関連した業務を取り扱うようにするのが望ましく、抗血清も適正な価格で有償入手できるようにするのがよいと考えられる。

ウイルスの血清診断を広く一般に実施し、その効果を十分にあげるためには、診断技術を一般に普及する方法も考える必要がある。血清試験法の解説の印刷物を作成して抗血清とともに配布することはもちろんであるが、せっかくの診断技術が有効に活用されるために、実際の手技についての講習会など、技術普及の機会を設けることも考慮してよいであろう。

### おわりに

以上、植物ウイルス血清診断の実用化を推進させるために私見の一端を述べてきた。本文でも触れたように、实用診断技術を目指すにしても、現段階では、その技法が対象ウイルスや診断の必要度などに応じて、ほ場検診用から研究室用までにわたりある程度多様なものであることは免れない。

多くの試験法の中で、今仮に寒天ゲル内二重拡散法を発展させることとして考えた場合、抗血清の作成、供給、配布の体制に比較的早く乗せることができるとみられるウイルスとしては、各種の野菜や花に発生する広いキユウモザイクウイルス (CMV) がある。このほか、

農業上重要なウイルスで血清診断の要望も強いもの、例えば、タバコ、トマトなどのタバコモザイクウイルス (TMV)、パレイショの X (PVX) や Y (PVY) などのウイルス、ウリ類でのカボチャモザイクウイルス (WMV) や緑斑モザイクウイルス (CGMMV)、主としてアブラナ科野菜でのカブモザイクウイルス (TuMV)、マメ類その他でのインゲン黄斑モザイクウイルス (BY-MV)、各種野菜などでの broad bean wilt virus (BB-WV)、各種ランにおけるシンビジウムモザイク (CyMV) や odontoglossum ringspot (ORSV) などのウイルス、更にカンキツのトリステザ (CTV) をはじめとする果樹ウイルスなどについても、できるだけ早い機会に実用的な血清診断が可能となるように、診断用抗血清の確保や試験方法の確立が必要であろう。そして、より適切なウイルス防除対策のために血清診断技術が有効に役立って行くことを期待したい。

(本稿では、本特集号の各記事との重複を避けるために、特に参考文献は挙げなかった。それぞれ関係の各記事を参照されたい。)

## 農 薬 要 覧

農林水産省農蚕園芸局植物防疫課監修

農薬要覧編集委員会編集

好評発売中! 御注文はお早目に!

— 1979年版 —

B 6判 589 ページ タイプオフセット印刷

2,800 円 送料 200 円

— 主 な 目 次 —

- I 農薬の生産、出荷  
種類別生産出荷数量・金額、 製剤形態別生産数量・金額  
主要農薬原体生産数量、種類別会社別農薬生産・出荷数量など
- II 農薬の流通、消費  
県別農薬出荷金額 農薬種類別県別出荷数量 など
- III 農薬の輸出、輸入  
種類別輸出数量 種類別輸入数量 仕向地別輸出金額など
- IV 登録農薬  
53年9月末現在の登録農薬一覧
- V 新農薬解説  
関連資料
- VI 農作物作付(栽培)面積 水稻主要病害虫の発生・防除面積  
空中散布実施状況 防除機械設置台数 など
- VII 付 録  
法律 農薬関係主要通達 年表 名簿 登録農薬索引

- 1977年版— 2,400円 送料160円
- 1976年版— 2,200円 送料160円
- 1975年版— 2,000円 送料160円
- 1974年版— 1,700円 送料160円
- 1973年版— 1,400円 送料160円
- 1972年版— 1,300円 送料160円
- 1971年版— 1,100円 送料160円
- 1970年版— 850円 送料160円
- 1966年版— 480円 送料160円
- 1965年版— 400円 送料160円
- 1964年版— 340円 送料160円

—1963, 1967, 1968, 1969,  
1978 年版— 品切れ版

お申込みは前金(現金・小為替・振替)で本会へ

# 寒天ゲル内拡散法による植物ウイルス病の診断

大阪府立大学農学部植物病理学研究室 匠 原 監 一 郎\*

## はじめに

血清学的手法が、ウイルス病の迅速、確実な診断法であることは一般に広く認められており、種々の技法が開発されてきた。しかし、それら技法の多くは主として純研究用に工夫され、ウイルス検出の精度向上だけを目的としたものもあるために、方法が複雑であったり、血清反応の判定に熟練を要する場合もある。一方には、ウイルス抗血清の供給、配布の問題もあって、今日でもなお血清診断法が、実用的な現場検診技術として広く用いられているとはいえない。

従来行われてきた血清学的手法の中でも、沈降反応スライド法、微量凝集反応法、寒天ゲル内拡散法などは比較的簡便な方法<sup>1)9)</sup>であるが、実用技術として一般に用いられるためにはなお幾つかの難点がある。それについては本特集号の巻頭に述べられているとおりである。

血清試験法を実用化するためには、①手法が簡便で多数検体が同時に処理できること、②血清反応が迅速、明瞭に現れ、判定が容易なこと、③少なくとも発病検体では必ずウイルスが検出されるだけの精度を有すること、などが当面必要な条件であろう。これらを満たす試験法として、特殊な器具や遠心操作を必要とせず、血清反応の判定が容易であるということから、寒天ゲル内拡散法には多くの利点があると考えられる。

筆者の研究室では、寒天ゲル内拡散法をより簡便に行う方法について検討しており、少なくともキュウリモザイクウイルス (CMV) の診断法<sup>6,16)</sup>については、ほぼ実用化できる見通しがついている。本稿では、CMV 診断用の簡易二重拡散法 (Simple Double Diffusion, SDD 法) を中心にして、実用的検診技術としての寒天ゲル内拡散法について記す。

## I 免疫拡散法について

通常の免疫拡散法 (immunodiffusion test) には、大別して一元拡散法 (single diffusion test, または放射拡散法 radial diffusion test) と二重拡散法 (double diffusion test) があり、標準的な手法ではシャーレ内で行った寒天平板を用いる<sup>2)</sup>。

放射拡散法は、抗血清を混ぜた寒天平板に穴を開けて

抗原試料を入れ、穴の周辺に拡散させる方法である。拡散した抗原は穴の周りで血清と反応し、ハロー状の白色沈降輪ができる。二重拡散法は、寒天平板に抗原と抗血清用の穴を開け、試料と抗血清をそれぞれの穴に入れて同時に拡散させる方法であり、両者が出合う寒天中に白色の沈降帯ができる。

これらの基本的方法のほかに、スライドグラスに寒天平板を作る<sup>7)</sup>とか、穴を開ける代わりに抗原や抗血清をろ紙などに含ませて寒天に置いたり<sup>4)</sup>、被検植物の葉片を直接寒天平板に差し込んで抗原を拡散させるなどの修正法<sup>17)</sup>がある。寒天ゲル内拡散法では、ウイルス抗原がある程度植物成分から分離して寒天内へ拡散するために、必ずしも試料を遠心清澄化する必要がなく、更に1枚の寒天平板で多数の検体を同時に検定できる利点がある。この利点を生かして、多数の標本についてのウイルス検出を行った例が幾つか報告されている。主なものを第1表に示す。

寒天ゲル内拡散法は、これまでにオオムギの斑葉モザイクウイルス (BSMV) 保毒検定や、ジャガイモウイルスの検定などに利用しようとした試験例などが、主として国外で報告されてきている。しかしながら、これらの桿状やひも状ウイルスの場合には、ウイルス粒子はそのままでは通常の寒天内へ拡散しにくいために、種々のウイルス粒子崩壊剤が検討されてきた<sup>8,10,12)</sup>。

HAMILTON<sup>3,4)</sup> は、BSMV 保毒オオムギ種子検定のために、Leonil SA などの洗浄剤を混ぜた寒天平板を用い、胚の汁液を含ませたる紙片を平板に置いて二重拡散法を行った。ジャガイモのウイルス検診のために、SHEPARD は放射拡散法を導入した<sup>12)</sup>。この場合には、抗血清を混ぜた寒天平板に穴を開け、アルカリ剤 (ウイルス崩壊用) で処理した抗原を入れてウイルス検定が行われた (1枚のシャーレで約 50 検体が一度に処理できる)。なお、ジャガイモウイルスの中には、ウイルス抗血清と崩壊ウイルスとの間に抗原的な差異があって、血清反応が著しく弱まることが知られており<sup>15)</sup>、この場合にはウイルス抗血清の代わりにウイルス粒子を崩壊処理して得られたタンパク質 (D-protein) で抗血清を作る必要があるとされている<sup>14)</sup>。

SLACK and SHEPHERD によって開発された BSMV 検診のための簡易放射拡散法は<sup>17)</sup>、SHEPARD らの方法

\* 現在 日本植物防疫協会

第1表 寒天ゲル内拡散法によるウイルス診断例

ウイルス	方法	抗原処理剤	報告者
BSMV	二重拡散法 <sup>a)</sup>	Leonil SA	HAMILTON (1964) <sup>3)</sup>
BSMV	二重拡散法 <sup>a)</sup>	Igepon T-73	HAMILTON (1965) <sup>4)</sup>
PVX	放射拡散法 <sup>c)</sup>	ピロリジン	SHEPARD (1970) <sup>12)</sup>
PVS	放射拡散法 <sup>c)</sup>	ピロリジン	SHEPARDら (1971) <sup>13)</sup>
PVM	放射拡散法 <sup>c)</sup>	ピロリジン	SHEPARDら (1971) <sup>13)</sup>
PVX	二重拡散法	—	北海道中央馬鈴薯 原原種農場 (1972) <sup>5)</sup>
PVF			
PVY			
BCMV	放射拡散法	ピロリジン SDS	UYEMOTOら (1972) <sup>18)</sup>
BYMV			
BSMV	放射拡散法 <sup>b,c)</sup>	Leonil SA	SLACK and SHEPHERD (1974) <sup>17)</sup>
球形ウイルス 長形ウイルス 封入体	二重拡散法 <sup>d)</sup>	SDS	PURCIFULL and BATCHELOR (1977) <sup>10)</sup>

a) 抗原をろ紙片に含ませる. b) 葉片を寒天に差し込む. c) ウイルス D-protein 抗血清を使用.

d) 一部のウイルスに D-protein 抗血清を使用.

BSMV : barley stripe mosaic virus

PVF, PVM, PVS, PVX, PVY : potato virus F, M, S, X, Y

BCMV : bean common mosaic virus

BYMV : bean yellow mosaic virus

を修正したものであり、ウイルス崩壊剤と D-protein 抗血清を混ぜた寒天にオオムギ葉片を直接差し込んでウイルス検定を行う方法である。この場合には更に多数の検体が同時に処理できる。

最近 PURCIFULL and BATCHELOR によって総括された SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) を使った寒天ゲル内二重拡散法 (SDS 寒天平板法)<sup>10)</sup> は、中には D-protein 抗血清を準備する必要のあるウイルスもあるものの、今後、更に多種類のウイルス検定に適用できる可能性がある。

当研究室でも SDS 寒天平板法によるウイルス検定について検討を行っているが、closterovirus をはじめ、potyvirus, potexvirus, tobamovirus, その他球形ウイルスを含む数種のウイルスについては、比較的容易に検定できることが示唆されている (当研究室、寺見ら)。

CMV のような小球形ウイルスは、特に粒子の崩壊処理を行わなくても寒天中へよく拡散するのであるが、崩壊処理すれば抗原の拡散は一層早くなることが期待される<sup>11)</sup>。

CMV の場合、食塩処理したウイルスは寒天中での拡散が速いだけでなく、抗原性も十分に保持されることから、我々は CMV 血清診断の実用化を意図して手法の検討を行い、以下に紹介するような SDD 法 (簡易二重拡散法) を開発した。

## II CMV 検出のための SDD 法

### 1 準備する薬品及び器具

#### (1) 寒天スライド用

粉末精製寒天 (Difco, Bacto agar), 食塩, アジ化ソーダ, トリスアミノメタンと塩酸 (緩衝液用), 50 ml ビーカー, スライドグラス (通常のもの, 7.6×2.6 cm), 5ml ビベット (または注射筒), 湯煎容器, 湿室容器 (寒天スライド, 試験スライド保存用, プラスチック製菓子箱など適当な容器に水を張ったもの)。

#### (2) 抗原試料用

飽和食塩水, ろ紙円盤 (直径 6.5 mm, 書類パンチで打ち抜いたもの), ガラス棒 (試料磨砕用, 先端を丸めたもの), ピンセット, パラフィルム。

#### (3) CMV 抗血清

純化 CMV (ペポカボチャ株) を家兔に筋肉注射して作った抗血清 (力価 2048)。これを 2 倍に希釈 (力価 1024) し, ろ紙テープ (幅 2 mm) に吸わせて直ちに使用するか, またはこの血清をろ紙に吸着乾燥<sup>9, 16)</sup> したものをテープ状に切って使用。

#### (4) 判定用

試験スライドの沈降帯を見るための観察台 (黒布または黒厚紙を背景にして, スライドの裏側から逆光線が当たるようにしたもの)。

### 2 手順

#### (1) 寒天スライドの作成

1) 0.1M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) に 0.5% 粉末寒天と 0.2% アジ化ソーダを添加し、湯煎上で攪拌しながら寒天を溶解する。

2) 寒天が熱いうちにピペット (注射筒) に採り、水平に並べたスライドグラスに約 1.5 ml ずつ均一に広げて固化させる。

3) 寒天スライドを湿室容器に水平に入れ、室温で保存する。容器を密封しておけば、寒天が乾燥しない間 (少なくとも3か月間) は使用できる。

#### (2) 試料の作成と配置

1) 試料を磨砕する前に、試料をのせるためのろ紙円盤と抗血清を含ませたる紙テープを検体数に応じて寒天平板に配置する。ろ紙円盤は抗血清テープの両側に約 5 mm 離して置き、円盤の間隔は約 2 mm とする。

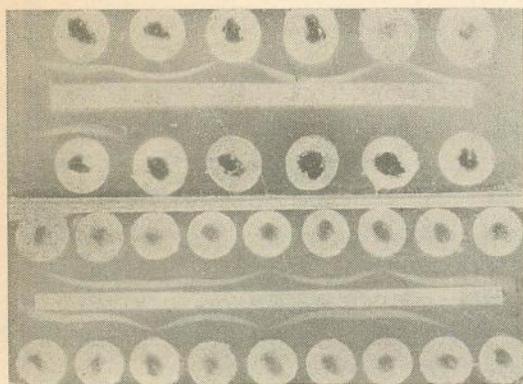
2) 被検植物の葉 (花卉, 果実でも可) から、病徴明瞭な部分の小片 (約 1 cm 角) を採り、パラフィルムにのせて飽和食塩水を 2~3 滴加える。ガラス棒先端で軽くたたきようにして葉片を十分に磨砕する。

3) 磨砕組織をピンセットで小さくまとめ、汁液を含ませたままる紙円盤にのせる。

4) 試験スライドを湿室容器に入れて 1 晩静置 (室温) し、翌日血清反応の判定を行う。

#### (3) 血清反応の判定

検体が CMV に罹病していれば、抗血清テープと試料円盤との間に白色の沈降帯が現れる (第1図)。沈降帯は、試験スライドの裏側から光線を当て、その背景に黒布を置けば容易に観察される。当研究室では黒いビロード布に蛍光灯用リングライトを置き、約 20 cm 上方に試験スライドを支えるために、孔 (7.2×6.0 cm) を開けた黒い厚紙を置いて観察台を作っている。沈降帯の観察や写真撮影のために便利である。



第1図 SDD 法  
寒天スライド上での CMV 検出例

第2表 SDD 法による CMV の検出限度

病葉希釈度 <sup>a)</sup>	血清反応 <sup>b)</sup>		生物検定 <sup>c)</sup> (局部病斑数) (ササゲ葉)
	蒸留水	飽和食塩水	
2	++	+++	162.9
4	++	+++	120.8
8	+	+++	74.3
16	+	++	39.5
32	±	++	20.4
64	—	+	8.6
128	—	+	2.5
256	—	+	0.7
512	—	±	0.2

a) CMV 感染タバコ葉を健全葉汁液で希釈した。

b) 沈降帯の濃さと幅を比較し、最も明瞭なものを +++ とした。

c) 感染葉粗汁液を 1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> で希釈し、6 枚のササゲ葉で検定した。

### III 検出精度と検診例

#### 1 検出精度

CMV の場合、植物によってはたとえ病徴があってもウイルス濃度が低いこともある。そこで SDD 法によるウイルス検出精度を知るために、CMV 罹病タバコ葉を健全葉で希釈し、血清反応が肉眼で認められる限界の抗原希釈度を調べた。同時に行ったササゲによる生物検定の結果と比較した 1 例を第 2 表に示す。

試料磨砕用に飽和食塩水を使えば、より微量な抗原を検出できることは既に述べた<sup>16)</sup>。SDD 法によって CMV が検出される抗原希釈限度は 256~512 倍 (推定ウイルス濃度は約 10 μg/ml) であり、ほぼ生物検定の結果に匹敵している。しかし、生物検定法による場合には、検定条件によって結果が大きく左右されることもあり、病斑数が少ないときには判定を迷うこともあることからすれば、SDD 法はササゲでの生物検定法より確実であるともいえる。

SDD 法では、CMV 以外の cucumovirus (キク微斑ウイルスや peanut stunt virus) とは反応しないので、これらのウイルスを誤って判定する心配はない。また、これまでに調べた限りでは、分離株や系統に関係なく CMV として検出できることが分かっている。

#### 2 CMV 検診例

特定の場合において、CMV の発生頻度を血清試験法と生物検定法 (ササゲ) によって調べた結果を第 3 表に示す。

多数検体の生物検定に比べて、SDD 法では短時間内に容易に検定できた。更に CMV 検出成績についてみ

第3表 CMV 発生頻度調査例<sup>a)</sup>  
(1977 年春～1978 年秋)

野菜 (調査地)	CMV 罹病株数/検定株数	
	SDD 法	生物検定 (ササゲ) <sup>b)</sup>
トマト (大阪)	19/34	19/34
ナス (大阪)	14/25	10/25
トウガラシ (和歌山)	52/58	49/58
キュウリ (大阪)	25/56	19/56
フキ (大阪)	8/32	4/32

- a) 資料の一部は日植病報<sup>16)</sup>に報告した。  
b) 血清試験とともに、ササゲ2本に接種し、病斑数が一つでも CMV 罹病とした。

第4表 CMV 発生調査を行った作物<sup>a)</sup>  
(1976 年春～1979 年秋, 大阪府)

CMV が検出されたもの	キュウリ, カボチャ, スイカ, メロン, トマト, ナス, トウガラシ, ダイコン, ササゲ, フキ, ホウレンソウ, ショウガ, ミョウガ, サトイモ, トウモロコシ
CMV が検出されなかったもの	ハクサイ, キャベツ, カブ, アブラナ, タカナ, ブロッコリー, エンドウ, ソラマメ, ナタマメ, ゴボウ, レタス, セルリー, バセリ, ミツバ, イチゴ, シソ, ハッカ, サツマイモ, ジャガイモ

- a) SDD 法による血清試験とともに、ササゲ・タバコによる生物検定ならびに電顕観察も行った (当研究室, 前田による調査資料を含む)。

ると、トマト以外の野菜では、生物検定よりも SDD 法での結果が良好であった。

SDD 法によって CMV 検診を行う場合に、一部の雑草や樹木では非特異沈殿を生じたり、血清反応を阻害するものがある (未発表資料)。主要野菜でもこのようなことがあるかどうかを調べるために、13 科 34 種の露地及びハウス栽培野菜について、病徴の有無にかかわらず CMV 検定した結果を第4表に示す。

表に示す野菜類では、非特異沈殿や反応阻害などの特別な障害はなかったが、中には検定の際に注意を要するものもあるのでそれを以下に記す。

### 3 留意事項

(1) 被検植物に病徴があっても、季節によってはウイルス濃度が SDD 法の検出限度以下になることがある (フキ, ショウガなど)。

(2) CMV による病徴が不明瞭なうえに、ウイルスが葉の一部に局在化されるものがある (サトイモなど)。

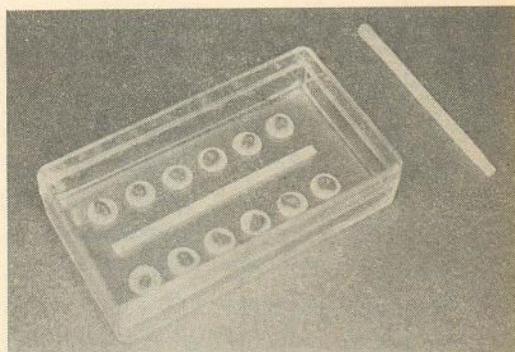
(3) 樹木, 雑草, 花卉などの CMV 検定では、植

物によっては血清反応が完全に阻害される場合がある。

## IV SDD 法の改良法

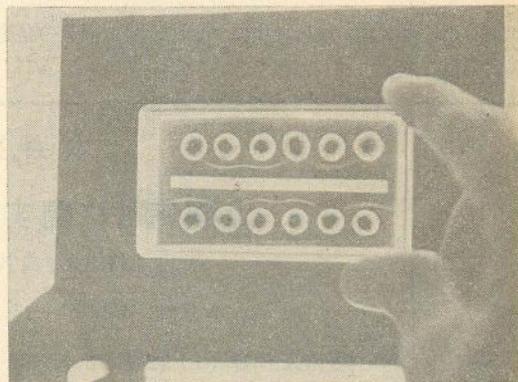
以上に述べた SDD 法は、現場で採集した検体を実験室へ持ち帰ってウイルス検定する場合を基本にしたものである。寒天スライドは湿室容器に入れておけばかなりの期間保存できるが、振動を与えたり傾ければ寒天は容易にスライドから外れる。したがって、寒天スライドをそのままでは持ち運びすることができず、CMV 診断を行う場所もある程度限定されることが予想される。

寒天平板を持ち運び可能な状態にすれば、実験室外の場所でも CMV の血清診断が可能となり、また、要望に応じて遠方へも輸送、配布できるようになって好都合であろう。抗血清はろ紙に吸わせて乾燥すれば、その力価を低下させることなく保存、輸送できる。CMV の血清診断法を実用化する可能性を更に高めるために、我々の研究室では抗血清吸着乾燥ろ紙と寒天平板とをセッ



第2図 SDD-B 法

プラスチック容器 (3.8×6.8×1.5cm) 内に寒天平板を作り、試料と抗血清テープを設置

第3図 SDD-B 法による CMV 検出例  
窓から容器の裏側に逆光線を当て、黒い厚紙を背景にして観察

トにして、輸送、配布するシステムを開発した。

寒天平板の輸送が可能のように、透明なプラスチック容器（フタ付き）に寒天を流し込んで平板を作り、ビニールテープなどで密封したものである（第2図）。この寒天平板は相当な衝撃に耐えるうえに、これまでに2か月間以上保存しても乾燥せず、十分に使用できる状態が保たれている。この寒天容器で血清試験を行ったところ、結果は寒天スライドを用いた場合と全く同様であった（第3図）。

このシステム（SDD-B法と呼ぶことにしている）を用いるとすれば、CMVの血清診断用に必要なものを一式、どこへでも持ち運びまたは送付することが可能であり、しかも手軽にそのままウイルス診断に用いることができるので、実用化技術として利用される可能性が高いと考えている。

### おわりに

SDD法は、当初野外植物のCMV検診を目的として開発された方法である。現在のところ主要野菜類ではほぼ問題なくCMVを検出できるが、樹木や雑草などの種類によってはなお工夫の余地が残されている。

SDD法（あるいはSDD-B法）が、CMV以外の各種ウイルス診断に広く適用できれば好都合であるが、特に長形ウイルスについては本文でも触れたように、粒子の崩壊手段や抗原性などの点でなお研究課題が残っている。長形ウイルスにSDS寒天平板を用いる方法については、我々の研究室でも検討中であり、特に closterovirus や potyvirus についてはあるいは有望な方法と思われる。

ウイルスの種類によっては高力価抗血清の作成に困難があることも予想され、また、D-protein 抗血清を準備する必要のあるウイルスもあろうが、寒天ゲル内拡散法によるウイルス病の検診技術について、更に研究の発展が期待される。

### 引用文献

- 1) BALL, E. M. (1974) : in "Serological test for the identification of plant viruses" (Amer. Phytopatol. Soc. Plant Virology Committee) p. 31.
- 2) CLAUSEN, J. (1973) : in "Immunochemical techniques for the identification and estimation of macromolecules" (佐々木實・村地 孝訳, 免疫化学同定法, 東京化学同人) p. 154.
- 3) HAMILTON, R. I. (1964) : *Phytopathology* 54 : 1290~1291.
- 4) ——— (1965) : *ibid.* 55 : 798~799.
- 5) 北海道中央馬鈴薯原原種農場 (1972) : "馬鈴薯ウイルス病の検定と防除" 北海道中央馬鈴薯原原種農場, p. 72.
- 6) 井上忠男 (1978) : "農林省委託植物ウイルス病対策に関する調査報告" (日本植物防疫協会) pp. 224~226.
- 7) McCrum, R. G. et al. (1971) : *Phytopathology* 61 : 290~292.
- 8) 宮島成寿・田辺仁志 (1976) : *日植病報* 42 : 81 (講要).
- 9) 村山大記 (1960) : "植物ウイルス病", 日高 醇他編 (朝倉書店) pp. 129~152.
- 10) PURCIFULL, D. E. and D. L. BATCHELOR (1977) : *Florida Agr. Expt. Sta. Tech. Bull.* 788. p. 39.
- 11) RONALD, W. P. and J. H. TREMAINE (1976) : *Phytopathology* 66 : 1302~1309.
- 12) SHEPARD, J. F. (1970) : *ibid.* 60 : 1669~1671.
- 13) ——— et al. (1971) : *ibid.* 61 : 873~874.
- 14) ——— et al. (1974) : *Virology* 58 : 464~475.
- 15) ——— and T. A. SHALLA (1970) : *ibid.* 42 : 825~834.
- 16) 匠原監一郎・井上忠男 (1978) : *日植病報* 44 : 619~625.
- 17) SLACK, S. A. and R. J. SHEPHERD (1975) : *Phytopathology* 65 : 948~955.
- 18) UYEMOTO, J. K. et al. (1972) : *Ann. appl. Biol.* 71 : 235~242.

### 本会発行図書

## 土壌病害に関する国内文献集 (II)

北海道大学農学部 宇井格生 編

A 5判 166 ページ 1,200 円 送料 160 円

昭和41年に発行した同書(I)に続いて41年から50年までの10年間に主要学術雑誌などに掲載された文献をすべて網羅して1冊にまとめたもの。内容は、I ウイルス、II 細菌、III 菌類の各々による病害、IV 各種病害、V その他、VI 土壌処理、薬剤防除の分類によって掲載してある。

# 免疫電子顕微鏡法による植物ウイルス病の診断

新潟大学農学部植物病理学教室 小島 誠

## はじめに

ウイルス病を診断するに当たっては、2種以上の異なる方法が併用されることが望ましい。現在、接種による生物検定を除けば、古くから有力な血清学的方法、そして最近の電子顕微鏡（以下電顕）の普及に伴う粒子観察がその主流である。そして、これら二つの方法を同時に組み合わせたものが免疫電顕法（immune electron microscopy, IEM 法）であろう。

さて、ウイルスを用いて、その抗原抗体反応を電顕で観察する試みは、既に40年前、タバコモザイクウイルスでなされている（ANDERSON and STANLEY, 1941）。しかしながら、植物ウイルスの検出、診断のため免疫電顕法が導入されはじめたのは最近のことである。抗原抗体反応を微細構造的に捕らえることは、いわゆるネガティブ染色の開発を待たねばならなかったからである。LAFFERTY ら（1961, 1963）が初めてインフルエンザウイルスを用い、その抗原抗体の結合状態をネガティブ染色により詳細に観察した。1968年、ようやく BRANDES（1957）の開発した dip 法に抗原抗体反応を組み合わせ、直接電顕で観察する“leaf-dip serology”が BALL and BRAKKE により提唱された。続いて DERRICK（1973）により、抗体処理した支持膜を用いる“serologically specific electron microscopy”（SSEM 法）が開発された。その後、MILNE and LUISONI（1975, 1977）により、この免疫電顕法が詳細に検討され、その反応像から“clumping”（クランプ法）、と“decoration”（デコレーション法）とに整理された。

現在の電顕の普及状況を考慮すると、濃度の低いウイルスあるいは接種の困難なウイルスの検出診断にこの免疫電顕法は迅速かつ有効な方法と考えられる。以下、筆者らの試験結果もおり混ぜ、それぞれの手技の解説、また、応用例などを示したい。なお、それぞれの手技につき、現在適当な訳語がないため、原則的には文献上の用語をそのまま使わせていただく。

## I Leaf-dip serology (LDS 法)

BALL and BRAKKE（1968）の方法に準じその手技の手順を説明する。酢酸アンモニウム（以下酢安）で1,000倍に希釈した抗血清をカーボン補強コロジオン膜に1滴

採り、それに dip 法同様、病葉の切り口を1~2秒浸し、室温で風乾させるか、40°C で5~10分間風乾させる。

続いて1% vanadatomolybdate と2% リンタングステン酸（PTA）を1:3の割合で混合した液でネガティブ染色し、検鏡する。彼女らの用いた4種類の棒状ないしひも状ウイルスでは、ホモロガな組み合わせでのみ反応が見られ、その反応像は個々のウイルス粒子表面に抗体が付着して太く見えるもの（デコレーションタイプ）、あるいは凝集塊（クランプタイプ）と両方が観察された。ヘテロな組み合わせではそのような変化は見られなかった。

この方法で問題なのは、酢安の使用である。血清反応は一般に0.15M NaCl の存在下で行われるが、電顕試料としてはNaClが観察の障害となる。そこで、彼女らはそうした障害のない酢安を使用したのであるが、酢安使用により抗体の力価が低下するという難点がある。例えば、barley strip mosaic virus での検討によれば、PBS で1:2,048の力価の抗血清が microprecipitin test で0.01M 酢安では1:128に、0.001M 酢安では1:16にそれぞれ低下した。かように本法は簡便かつ迅速で、そのうえ、dip 法では識別困難な同一形態を有する異種ウイルスの識別が可能であるなど優れた手技でありながら、上述のような溶媒についての難点と試料の汚れなどが問題となる。最近、大木ら（私信）は本法を改良して、キュウリモザイクウイルス（CMV）の検出法を考案した。その方法は、パラフィルム上に抗血清（力価1:2,048の抗血清を生理食塩水で500倍程度に希釈して、0.2% 亜硫酸ナトリウム、0.3% EDTA を添加したもの）を採り、その中で病葉をガラス棒で磨砕し、そのドロップの上にグリッドを5分間浮かせ、その後水洗、ドライウエル処理（省略可）し、酢安ウラニル（UA）染色して検鏡するというものである。

この方法により、CMV 粒子の崩壊が防止され、反応像としては、原法同様クランプタイプとデコレーションタイプが同時に見られ、CMV の検出は容易で、その検出能力は生物検定（ササゲ）以上と推定している。彼らはこの方法を SDN (Serologically Direct Negative) 法と呼んでいる。

次に、筆者らがほ場からの材料でインゲンウイルスな

らびにジャガイモウイルスをこの LDS 法で診断を試みた結果を述べたい。ウイルス性症状と思われるインゲン 49 株より、dip 法により 17 株から potyvirus とと思われるひも状ウイルスが検出された。そのうち、インゲン黄斑モザイクウイルス (BYMV) 抗血清を用いた LDS 法で 9 株が BYMV 感染と診断され、接種検定の結果ともよく一致した (中曽根ら, 1978)。一方、ジャガイモについては、PVX, PVS に対するそれぞれの抗血清を用いて LDS 法で診断したところ、46 株中 20 株が PVX 単独感染、9 株が PVS 単独感染、13 株が両ウイルスによる重複感染であることが判明した (李ら, 1979)。口絵写真①は筆者らの行った LDS 法による反応像の一例である。

## II Serologically specific electron microscopy (SSEM 法)

DERRICK (1973) の開発した SSEM 法は先の LDS 法を一步改良したもので、支持膜をあらかじめ抗血清で処理しておくことがポイントとなっている。

手順を示すと、①0.05M トリス緩衝液 (pH 7.2) で 10 倍に希釈した抗血清のドロップの上にグリッドを浮かせ 24°C, 30 分間インキュベートし、②そのグリッドを同トリスで洗浄、③直ちに 0.9%NaCl を含む同トリスで磨砕した植物汁液のドロップの上に抗体処理グリッドを浮かせ 24°C, 60 分間インキュベートする。④その後、トリス-NaCl でグリッドを洗浄し、⑤更に蒸留水で洗浄、⑥ろ紙小片で水滴を吸い取り、⑦風乾後、金属蒸着して、⑧検鏡する。彼はこの方法で対照 (正常血清で被覆したグリッド) に比較し、TMV で 50 倍、PVY で 20 倍のウイルス粒子が支持膜にトラップされることを認め、インキュベートの時間を延長したり、反応温度を 37°C に上げたりすることで更にトラップ率が上昇すると述べている。

その後、彼ら自身により金属シャドーに代わって 1% UA (95% エタノール中) によるポジティブ染色が推奨された (DERRICK and BRLANSKY, 1976)。この SSEM 法ではクランプタイプの反応像は見られず、支持膜上の抗体カーペットにトラップされた個々のウイルス粒子がよく分散して、黒く観察される。

彼らは、実際に種子伝染性のウイルスの検出に本法を応用した。希釈抗血清 (0.05M トリス, pH 7.2 で 5,000 倍) を用い、各罹病株からの種子についてウイルスの検出を試みているが、抗原調製に当たって、各区 50 粒の種子を粉碎し、トリス-NaCl でダイズ、オオムギの場合は 10 倍、レタスの場合は 1,000 倍に各々希

釈して供試した。

その結果、tobacco ring spot virus (TRSV) 罹病ダイズでは 75~80%、ダイズモザイクウイルス (SMV) 罹病ダイズでは 20%、barley stripe mosaic virus (BSMV) 罹病オオムギでは 40~42%、lettuce mosaic virus (LMV) 罹病レタスでは 10% と、各々ウイルスを保有していることが証明された。

また、TRSV, BSMV, SMV では健全種子 1,000 粒に種子伝染粒 1 粒の割合に、LMV では 100 粒に 1 粒の割合に混合してみてもウイルスの検出は可能であったとのことである。

更に、PALIWAL (1977) はこの SSEM 法を用い、検定困難な barley yellow dwarf virus (BYDV) の検定を試みている。結果を示す前に、参考までに彼の場合の抗原調製法などについて触れておきたい。病葉 (2g) を液体窒素中で磨砕し、汁液に対して 1% になるようトリトン X-100 をよく混ぜ、それに 1/3 量のクロロホルムを加え、室温で 10 分間強く振盪し、アイスバスで 5 分間冷却した後遠心 (1,500×g) する。得られた水層を更に遠心 (7,700×g) し、その上清を SSEM の試料とした。力価 1:512 の抗血清を用い、その希釈に伴う抗体カーペットによるウイルス粒子のトラップ率を調べ、640~5,120 倍の間で十分ウイルスを検出できることを認めた (表)。彼は次いで、280 倍の抗血清を用いて自然感染、人工接種のは場ないし温室内のオオムギ、コムギ、エンバク、その他の禾本科植物 24 株につき検定したところ、21 株から BYDV が検出された。その中には診断時には無病微だった株も含まれているところか

抗血清処理支持膜上にトラップされた barley yellow dwarf virus の粒子数 (PALIWAL, 1977)

処理血清の希釈倍数	平均粒子数*
BYDV 抗血清	
80	502
160	532
320	649
640	790
1,280	989
2,560	1,029
5,120	811
10,240	672
20,480	248
40,960	183
正常血清	
640	3
1,280	4.5
トリス-HCl	3

\* 12,200 倍で観察した場合の、5 視野 (1 視野 94×80 mm) の粒子数

ら、この SSEM 法は極めて精度の高い検出法であると述べている。

### III Modified Derrick method (改良 SSEM 法)

前述の SSEM 法 (Derrick 法) を修正した手技で、操作の時間を短縮し、ネガティブ染色を取り入れた方法である (MILNE and LUISONI, 1977)。手順を示すと、①グリッドに希釈抗血清 (10~100 倍) を 1 滴採り、湿室で 5 分間インキュベートし、抗体処理支持膜を得る。②そのグリッドを 0.1M リン酸緩衝液 (PB) 20 滴で洗浄し、ろ紙小片にて吸い取る。③完全に風乾させず、直ちにウイルス抗原液を 1 滴採り、湿室で 15 分間反応させる。④その後、PB (20 滴)、水 (30 滴) で洗浄し、⑤UA (5 滴) で洗浄兼染色を施し、⑥ろ紙小片で吸い取り風乾させる。

彼らによると、このように抗体カーベットのグリッドでは、対照に比較して 30~50 倍も多くウイルス粒子がトラップされるとのことである。また、この抗体処理グリッドを保存したり、郵送の必要があるときは、PB で洗浄した後水で洗浄し、風乾すればよい。使用に際しては、まず 0.1M PB を 1 滴採り、膜面を湿潤にして、余分な水分を吸い取ってからウイルス試料をかける。

この方法は従来の dip 法より、より多くのウイルス粒子が特異的に支持膜面にトラップされ、Derrick の原法より短時間で試料ができるなどの利点がある。

### IV Clumping (クランプ法)

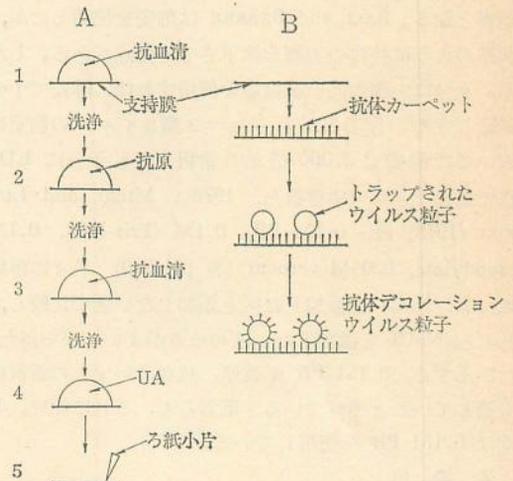
MILNE and LUISONI (1977) に従いこの手技の手順を説明する。力価が 1:1,000 である抗血清を使用するとする。①抗血清を 0.1M PB, pH 7.0 で 100~1,000 倍に希釈し、②スライドガラス上にその 1 滴を採り、その中で病葉小片をガラス棒で磨砕する。③そのスライドガラスを湿室に 15 分間インキュベートする。④その後、スライドガラス上の反応液を 1 滴採り、⑤数秒後、PB (20 滴)、次いで水 (30 滴) で洗浄、⑥UA (5 滴) で洗浄、染色を行い、⑦ろ紙小片で吸い取り風乾させる。薄い抗血清を使用しているため、抗原過剰であるはずなので、各ウイルス粒子は抗体分子の架橋現象により凝集塊 (クランプ) を形成する。大小様々なクランプが UA により濃く染色されるので、ウイルス抗原の検出は容易となる。図 2 は ジャガイモ葉巻ウイルス (PLRV) でのクランプの一例である。

### V Decoration (デコレーション法)

MILNE and LUISONI によるデコレーション法を説明する。①スライドガラス上に 0.1M PB を 1 滴採り、その中で病葉小片を磨砕する。②数秒後、そのドロップにグリッドを接触させ試料を採り、③数秒後、そのグリッドを 0.1M PB ですすぎ、④ろ紙小片で吸い取った後直ちに、希釈抗血清をかけ、⑤そのまま湿室で 15 分間インキュベートする。その後、前法同様、PB、水、UA の順で洗浄、染色し、風乾させる。支持膜上に分散付着した個々のウイルス粒子の表面に抗体分子が付着し、ウイルス粒子の表面が粗面となり、幅 (直径) が增大するため、血清反応陽性のものは容易に検出される。

### VI トラップーデコレーション法

本法は MILNE and LUISONI により "Derrick method combined with decoration" として提唱されたものである。本稿では "トラップーデコレーション法" と仮称しておく。この方法は上述の改良 SSEM 法とデコレーション法を組み合わせた方法で、現在最も効率のよい IEM 法の一つと考える。手順を示すと、①グリッドに抗血清 (10~100 倍) を 1 滴採り、5 分間湿室でインキュベートし (抗体カーベットを作る)、②PB (20 滴) で洗浄し、③その後、ウイルス試料をかけ、15 分間インキュベートする。④その後、PB (20 滴) で洗浄し、⑤風乾せず直ちに再び希釈抗血清をかけ、15 分間インキュベートする。その後、⑥PB (20 滴)、⑦水 (30 滴)、



第 1 図 トラップーデコレーション法の操作手順 (A) と支持膜上の抗体カーベット、トラップされたウイルス抗原、装飾された抗原の模式図 (B)

⑧UA (5滴) で洗浄, 染色し, ⑨ろ紙小片で吸い取り, 風乾させる。これにより, 多くのウイルス粒子が支持膜上の抗体カーベットに効率よくトラップされ, かつ抗体分子により裝飾されるので, 小球形粒子でも低倍で検出が容易となる。第1図は本法の手順と, 支持膜上の抗原抗体の関係を模式的に示したものであり, 口絵写真③はそれぞれ第1図Bに準ずる電顕像を筆者らが行ったPLRVの例で示したものである。

本法がいかに効率のよいものかは, MILNE and LUISONI の結果からもうなずける。すなわち, carnation mottle virus (小球形) でのモデル実験では,  $0.02 \mu\text{g}/\text{ml}$  濃度の試料をグリッドにのせた場合, 400メッシュのグリッドの1目に約10個の粒子が観察されている。

筆者らは, 本法により PLRV の検出を試みたが, 非常に効率よくウイルスが検出された (KOJIMA et al, 1978)。トラップされるウイルス粒子であるが, 直接倍率25,000倍で  $75 \times 51 \text{ mm}$  の視野に約40個の粒子が観察された。

なお, 当然ではあるが, 本法の前半のみ (すなわち改良SSEM法) でもトラップされるウイルス粒子数はほぼ同様であったが, 後半のデコレーションの過程が加わると粒子が大きく, 黒々と見え, より検出しやすかった (口絵写真③参照)。

## VII 注意事項

### 1 溶媒

一般に血清反応には生理食塩水 (または PBS) が使用されているが, IEM 法では, 観察上 NaCl の結晶が障害となる。BALL and BRAKKE は酢安を使用した, 前述のように抗体の力価を低下させる難点がある。しかし, 十分に力価の高い抗血清を使用すれば, 酢安で十分試験しうる。筆者らが行ったマメ類ウイルスの検定においては酢安で2,000倍まで希釈しても十分にLDS法で検出できた (中曾根ら, 1978)。MILNE and LUISONI (1975) は, 0.1M PB, 0.1M Tris-HCl, 0.1M cacodylate, 0.04M veronal (各 pH 7.0) 各々の溶媒につき, NaCl を添加した区と添加しない区と比較し, むしろ NaCl を添加しない区のほうがよい結果を得た。なかんずく, 0.1M PB が抗原, 抗血清いずれの希釈にも適していると述べている。筆者らも, これに従い, 多くは 0.1M PB を使用している。

### 2 染色

dip 法などには一般に 1~2%PTA が使用されているが, ウィルスによっては PTA により崩壊するものがある。像の鮮明さ, 解像力の高さなどから, 1~3%UA

の使用を薦めたい。ただし, UA の使用の場合, リン酸塩の存在下では沈殿を生じる難点がある。しかし, それは次のように蒸留水ですすぐことにより, 解決することである。

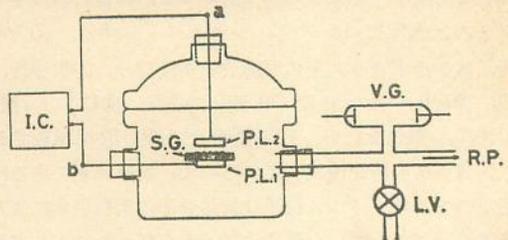
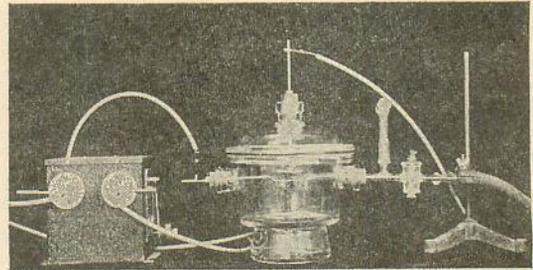
### 3 洗浄

グリッド上の抗原抗体反応物以外は電顕観察に際しては余分なものである。グリッド上の抗体カーベットにトラップされたウイルス抗原は静かに水洗すれば, そう容易に離脱するものではない。グリッドの水洗に当たっては, 筆者らは次のような方法を採用している。先端の鋭利なピンセットでグリッドの端をつまみ, その状態のまま Oリング状のもの (ビニール管を薄く輪切りにしたものなど) をピンセット先端から通して, つまんだ状態のまま締める。こうすることで, 洗浄の途中でグリッドを落とすことはない。そのまま, 湿室に保つこともできる。

洗浄に際しては, グリッドをつまんだままピンセットを片手で垂直に保ち, 他方の手で先端の細いピペット (パストールピペット可) で PB なり水を1滴ずつ横から接触させるようにして, 滴下させ, ピーカーなどで受けとるとよい。最後にろ紙小片にて水滴を吸い取る。

### 4 支持膜の問題

BALL and BRAKKE や DERRICK らはコロジオン膜を使用しているが, 筆者らの経験からカーボン補強ホルムバル膜の使用を薦めたい。支持膜上の試料の分散であ



第2図 グローディスチャージのための簡易装置

I. C. : インダクションコイル; L. V. : リークバルブ; P. L. : 金属板; R. P. : ロータリーポンプ; S. G. : スライドガラス上のグリッド; V. G. : 真空ゲージ。

るが、カーボン蒸着直後のグリッドは表面が親水性であるので問題はないが、そうでない場合は膜面が疎水性であるため試料の分散がよくない。そのため、筆者らは、使用直前に、グリッドを glow discharge 処理し、膜面を親水性化して使用している (中曽根ら, 1978) (第2図参照)。

dip 法も含め、電顕でウイルスを検出、診断しようとするためには、何より試料、染色液の分散、膜面への付着が良好でかつ均一でなければならず、そのためにも親水性のグリッドの使用をぜひとも薦めたい。

### 5 抗血清

IEM 法には生血清か免疫グロブリンが使用されるが、免疫グロブリンを使用したほうが像が鮮明ではあるが、生血清でも十分である。使用する抗血清はその特異性が高く、力価の高いものがよいのは当然である。IEM 法では使用する血清が少量であるので、抗血清は希釈して小分けして保存するほうがよい。筆者らの経験では、抗 BYMV 血清の例で言うと、1,000 倍希釈血清を小分けして、5°C、-25°C で保存したが、6か月後でも対照と同様に反応した (中曽根ら, 1978)。ひんぱんに使用する場合は、希釈抗血清に 0.02~0.1% 程度のアジ化ナトリウムを添加して、5°C 前後で保存するとよい (-20°C 前後のフリーザーを使っての原血清のままの保存

で、出し入れによる凍結融解は厳に慎みたい)。

診断方法は、時代とともに移り変わるものもあるはずである。対象とするウイルスによっては、多少煩雑であっても、一日も早くより新しい、より正確な方法を取り入れる姿勢が今の我が国にもっと定着することを切望し、この稿を終わりたい。

### 主な引用文献

- ALMEIDA, J. D. and A. P. WATERSON (1969) : *Adv. Virus Res.* 15 : 307~338.  
 BALL, E. M. and M. K. BRAKKE (1968) : *Virology* 36 : 152~155.  
 DERRICK, K. S. (1973) : *ibid.* 56 : 652~653.  
 ——— and R. H. BRLANSKY (1976) : *Phytopathology* 66 : 815~820.  
 KOJIMA, M. and E. SHIKATA (1978) : *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 44 : 585~590.  
 LAFFERTY, K. J. and S. J. OERTELIS (1963) : *Virology* 21 : 91~99.  
 李 淳炯ら (1979) : *日植病報* 45 : 255~257.  
 MILNE, R. G. and E. LUISONI (1977) : *Method in Virology* 6 : 265~281.  
 中曽根恒一ら (1978) : *北大農学部邦文紀要* 11 : 149~157.  
 PALIWAL, Y. C. (1977) : *Phytopath. Z.* 89 : 25~36.  
 四方英二郎・小島 誠 (1978) : *日植病報* 44 : 28~34.

## 本会発行図書

# ダイズ病害虫の手引

1,300 円 送料 160 円

B5判 222 ページ タイプオフセット印刷

水田利用再編対策で注目をあびてきたダイズの病害虫について 19 名の専門家により執筆・解説されたダイズ病害虫の手引書

### 内 容 目 次

ダイズ病害虫の特性

害虫, 病害

ダイズ病害虫種類別解説

害虫

タネバエ, ダイズネモグリバエ, ダイズクキモグリバエ, ダイズサヤタマバエ, タマナヤガ, カブラヤガ, ハスモンヨトウ, キタバコガ, ツメクサガ, ヨトウガ, ウコンノメイガ, マメヒメサヤムシガ, マメシクイガ, シロイチモジマダラメイガ, フタスジヒメハムシ, ヒメコガネ, ダイズアブラムシ, ジャガイモヒゲナガアブラムシ, マルカメムシ, 吸実性カメムシ類, ダイズシストセン

チュウ, ネコブセンチュウ類, ネグサレセンチュウ類

病害

モザイク病, 萎縮病, ダイズわい化病, 紫斑病, 黒とう病, ダイズさび病, 菌核病, 立枯性病害, ベと病, 炭そ病, 葉焼病

ダイズ病害虫地域別防除指針

北海道地域, 東北・北陸地域, 関東・東山・東海地域, 近畿・中国・四国地域, 九州地域

付 表

適用農薬一覧, 品種一覧

お申込みは前金 (現金・振替・小為替) で本会へ

# 微量沈降反応法による植物ウイルス病の診断について

北海道大学農学部植物学教室 仙北俊弘

植物ウイルス病学の分野における血清学的手法は、その応用範囲も広く多岐にわたっている。特に植物ウイルス病の診断に関しては古くから利用され、近年になって更に改良が加えられ、研究に、あるいは実用上のウイルスの同定・診断に大きな成果をあげていることは周知のとおりである。

本文では、微量沈降反応法 (microprecipitin test) とその改良法として multi-dish tray 法 (仙北ら, 1979)<sup>25)</sup> を中心とした手技と、それを用いた実際のウイルス診断の応用例を示し、これらの方法がどのように利用されてきたか、また、現在利用されているか、更にこれらの問題点などについて筆者の日ごろ考えている点を述べてみたい。

## I 沈降反応法 (precipitin test)

沈降反応法には、反応媒体が液体のものやゲル状のものがあるが、ここでは液体を媒体としたものについての手技と応用の記述にとどめる。この反応法には、小試験管を用いた混合法及びこれを更に簡便化したスライド法、少量の抗血清と抗体で判定する微量沈降反応法 (microprecipitin test)、あるいはリング重層法 (ring inter face precipitin test, Piling test などと呼ぶ) などの手法があり、本来、凝集反応 (葉緑体凝集反応、赤血球凝集反応、ラテックス凝集反応など) とは区別される。つまり、沈降反応は抗原としての純化ウイルス液、あるいは清澄化した罹病植物汁液を用い、ウイルスとその抗血清による抗原抗体結合反応によって生じる沈降物を観察する手法である。一方、凝集反応は、抗原抗体反応を仲立ちとして葉緑体あるいは抗体に結合された赤血球やラテックス粒子などの凝集物を観察する手法といってよい。その意味では、ジャガイモのウイルス検定などに用いる、いわゆるスライドテストは葉緑体凝集反応とでも言うべきものであろうし、罹病植物粗汁液を検体としたときの微凝集反応と、純化ウイルスを検体としたときの微量沈降反応とは厳密には区別すべきものかもしれない。しかし、植物ウイルスの診断においては、多くの場合、植物の粗汁液を検定試料とし抗血清との反応を調べることから、結果的に葉緑体の凝集物を観察することになり、植物ウイルス病の診断法として特に沈降反応法 (precipitin test) と凝集反応法 (agglutination test) を

明確に区別して論ずることは困難な面がある。

### 1 混合法

小試験管を用いた混合法 (flocculation test) は抗血清を通常生理食塩水 (0.85% 食塩水) で段階希釈 (2<sup>n</sup> など) したものを各試験管に 0.25~0.5 ml ずつ入れ、これに検定すべきウイルス試料を等量加え、よく混合する。普通 37°C 恒温槽に 2 時間加温後、凝集鏡 (agglutino-scope) によって反応を判読する方法である。この場合対照区として生理食塩水にウイルス試料を混ぜる方法が普通用いられており、また、正常血清を使用することもある。反応は、更に冷室に一晩静置し再度確認する。実際に使用する抗血清の濃度とウイルス液あるいは罹病植物粗汁液の濃度 (希釈倍数) をあらかじめ予備試験をし決めておいたほうがよい。これは抗血清と抗原の反応最適比が存在することから、誤診を防ぐうえでも、また、抗血清の節約という面からも必要である。本法の応用は古く、CHESTER (1935, 1936)<sup>8,9)</sup> が TMV 及びジャガイモのウイルス病その他の植物ウイルスの分類を補体結合反応 (complement-fixation test) を併用して試みた報告がある。混合法の問題点は、使用する抗血清の量が試験管当たり 0.25~0.5 ml と多いこと、凝集鏡による反応測定は、十分な沈殿が生じなければ判定しにくいことなどにある。

### 2 スライド法 (slide flocculation method)

スライドガラス上に抗血清、正常血清 (生理食塩水でも可) をそれぞれ滴下し、検定試料の磨碎搾汁液 (ときには 3,000 rpm, 10 分ほど遠心し、その上清) を滴下混合して生じた白色絮状沈殿物を肉眼で判読する方法である。混合後 2~3 分で沈降物が確認できるが、ウイルスによっては抗血清があまり冷えていると反応の現れるのに時間がかかることがある。この場合加温したほうが反応は早く観察できる。絮状沈降物の大きさと量によっては肉眼でも観察できるが、暗視野顕微鏡を使用して判読することをお薦めしたい。また、約 5,000 倍のメチレンブルーを 1 滴混ぜ、反応を明瞭に観察する方法もある。本法は非常に簡便であるが、使用する抗血清は力価の高いものが要求される。ジャガイモ X ウイルス (PVX) のほ場での検定には早くからこの方法が用いられている (BRADLEY, 1953; MUNRO, 1954; 佐藤ら, 1955)<sup>7,19,23)</sup>。

### 3 重層法 (Ring interface precipitin test)

抗血清を 10% グリセリンに溶かし、微小試験管 (内径 2~3 mm, 高さ 3~5 cm) に入れる。このとき、キャピラリーを用い、高さ 1~1.5 cm 程度まで管壁を伝わらせながら注入する。検定試料を抗血清の上に静かに重層する。重層後、普通 2 時間静置し、重層面での反応沈降物 (沈降帯) を観察する方法である。背景を暗くし、斜入光線を当て沈降帯を観察するのであるが、このとき重層境界面を目の高さにし観察する。この方法で留意する点は抗血清及び検定試料が不透明であると、沈降帯がはっきりしないことである。本法はウイルス抗原の存在を確認する方法としてひんばんに用いられている。こうした抗原の質的な検定のみならず、量的な解明にも用いられている。沈降帯が現れるまでの時間を測定する precipitin ring time test がそれであり、応用例として WHITCOMB and BLACK (1961)<sup>31,32</sup>, WHITCOMB (1964)<sup>30</sup> 及び REDDY and BLACK (1966)<sup>21</sup> らが wound tumor ウイルスの保毒ヨコバイ虫体内ウイルス抗原の検出とその濃度の測定に本法を用いている。

### 4 微量沈降反応法 (micro precipitin test)

種々の改良が試みられ広く植物ウイルスの診断に、また、抗血清の力価検定に用いられるようになった。本法の特徴は使用する検定試料 (抗原) と抗血清が極めて少量で済むことにある。この方法は VAN SLOGTEREN (1955)<sup>28</sup> により最初に報告されて以来、欧米においては多くの植物ウイルスの検定に用いられてきた。CORBETT (1967)<sup>10</sup> はタバコ rattle ウイルスの系統である aster ring spot ウイルスの同定に、FRIEBOURG and ZOETEN (1970)<sup>11</sup> はジャガイモ A ウイルスの検定に、また、SAMPSON and TAYLOR (1968)<sup>22</sup> はジャガイモ S, X, Y (PVS, PVX, PVY) 各ウイルスの検出及びジャスミンの latent ウイルスに関して WATERWORTH (1971)<sup>29</sup> が、また、JONES and TOLIN (1972)<sup>15</sup> が maize dwarf mosaic ウイルスの抗血清力価検定に本法を用いた報告などがある。我が国においては、微凝集反応法として井上ら (1967)<sup>14</sup> がキュウリ緑斑モザイクウイルス (CGMMV) の同定に、麻谷ら (1967)<sup>2</sup> は cactus ウイルス X の同定分離に、また、井上 (1977)<sup>13</sup> はランのウイルス病の診断に用いている例があるが、いまだ広く実用に供されているとはいえない。本法は従来の沈降反応 (混合法, スライド法, 重層法など) に比較して、多数の反応を同時に観察できること、操作も簡便であること、使用する抗原、抗血清が極めて少量で済むこと、流動パラフィンで被覆することにより乾燥を防ぎ長時間反応させうること、更に反応の判読に暗視野顕微鏡を用い

ることにより、明瞭に沈降物が観察できるなどの利点がある。BARTELS (1957)<sup>9</sup> は PVY の検出にスライドグラス上に抗血清とジャガイモ葉汁液を微量滴下し、これを混合して 25°C 40 分間湿室に保ち、暗視野顕微鏡下 60~80 倍で反応を観察した。VAN SLOGTEREN の方法及び筆者らの改良法 multi-dish tray 法については後で詳細に述べたい。

### 5 結合抗体凝集反応

赤血球凝集反応は、MOORHEAD and PRICE (1953)<sup>18</sup> により、TMV 各系統間の関係を調べるために用いられ、ペントナイト凝集反応、ラテックス凝集反応、硫酸バリウム反応は BERCKS (1967)<sup>19</sup> により PVX, PVY, PVS, potato aucuba mosaic ウイルス, cactus ウイルス X, Hydrangea ring spot ウイルス, grapevine fanleaf ウイルス, トマト bushy stunt ウイルスに関して、また、BERCKS and QUERFURTH (1971)<sup>9</sup> はラテックス凝集反応を用いて PVX グループ, turnip yellow mosaic ウイルスグループの近縁関係の検定及び抗血清の力価検定を行っている。また、ABU SALIH ら (1968)<sup>17</sup> もラテックス凝集反応を、arabis mosaic ウイルス, narcissus mosaic ウイルス, parsnip yellow fleck ウイルス, raspberry ring spot ウイルス, TMV, turnip yellow mosaic ウイルスなどの検出に應用している。我が国では横山 (1975)<sup>33</sup> が TMV, PVX, PVY の 3 種のウイルスについてラテックス凝集反応を試み、その方法と条件について詳しく報告している。このように、抗原の存在が微量であっても反応が鋭敏で明瞭に観察できる方法が工夫されている。これらの方法の詳細については、前述の引用文献を参照されたい。

沈降反応についての方法とその応用について、特に媒体が液体であるものに関して概略を述べてきたが、沈降反応に影響を与える種々の要因には下記のような事柄が挙げられる。まず、媒体中の塩の存在とその pH の問題であるが、一般的に低濃度塩を用いるのが普通であり、抗血清と抗原の混合の際に塩の沈殿が生じるものは、当然使用を避けねばならない。0.85% 食塩水 (生理食塩水) が最も普通に用いられる。CMV-Y 系統に関して SCOTT (1968)<sup>24</sup> は、中性塩よりむしろ弱アルカリのほうが反応の結果が良かったと報告している。次に反応温度と時間の問題であるが、通常 30~37°C で 1~2 時間おき反応を読み、更に冷室に一晩静置し確認するのが普通である。また、混合の方法及び抗原と抗血清の濃度 (最適比) の問題などを考慮し、実験を行うことが要求される。これら血清反応に関する一般的な問題については、村山 (1960)<sup>20</sup>, MATTHEWS (1967)<sup>17</sup>, VAN DER

VEKEN ら (1962)<sup>27)</sup>, BERCKS ら (1972)<sup>6)</sup> 及び GIBBS and HARRISON (1976)<sup>12)</sup> らの解説を参照されたい。

## II VAN SLOGTEREN の方法と multi-dish tray 法

### 1 VAN SLOGTEREN の方法

VAN SLOGTEREN (1955)<sup>28)</sup> は、ジャガイモのウイルス病診断に際して、特に大量の検定試料を取り扱う必要があること、それに関連して使用抗血清の少量化を図る方法として、また、反応をより明瞭に観察するため、植物汁液を清澄化し、抗原抗体反応による沈降物を観察すべく暗視野顕微鏡を用いる判読を試みた。この方法はペトリ皿内表面を疎水性にするため、フォルムパールで被膜を作り、このペトリ皿の下に 8×8mm 角の線を描いた紙を置く。それぞれの画分にパスツールピペットを用いて抗血清の小滴を滴下し、これに清澄化した植物汁液を等量滴下混合する。後、乾燥を防ぐため流動パラフィンで被覆し、暗視野顕微鏡で反応を判読する方法である。この方法により、多数の試料の反応 (一枚のペトリ皿で 40~60 の反応) を同時に観察でき、使用する抗血清及び抗原の量も各 0.1 ml 程度といった少量で十分であり、特にジャガイモのウイルス病の診断に広く用いられた。

### 2 multi-dish tray 法

VAN SLOGTEREN による原法は、反応容器としてフォルムパール被膜したペトリ皿を用いているが、これでは抗血清と抗原を混合するとき、また、検鏡などの操作の過程で、更に反応液が多いときなど、隣接する反応が混じり合う恐れがある。また、流動パラフィンが多量に必要であることなどから、数 10 個体の検定となると仲々容易でない。筆者らは、この原法に改良を加え、更に少量の抗原・抗血清でも容易に反応を読むことのできる一層の簡便化を試みた。

この方法を、使用した反応容器の名称から multi-dish tray 法と呼ぶことにした。本法の手順と実験例を中心に以下紹介する。反応の混じり合う恐れがあることから、小さな穴の開いた数種の micro titre plate 及び組織培養用の tray (multi-dish tray) の利用を考えた。抗原、抗血清の混合は、この場合回数傾けるだけで十分であり、その際お互いに混じる心配はない。plate, tray の大きさ、穴の個数と大きさにも多種多様なものがあり、目的に応じて使い分けることも可能である。また、穴の底面は microtitre 用のものでは U字型、V字型のものがあり、組織培養用の tray は平底である。暗視野顕微鏡で反応沈降物を観察する場合、平底のものの方が観察が容易であった。数種類の容器を試験した結果、プラスチ

ック製で 8.5×12.5 cm の大きさに、直径 6mm の穴が 96 個 (縦 8 列、横 12 列) 開いている multi-dish dispos tray (Linbro Chemical 社製) (口絵写真①) が最も適していた。各穴に入れる抗原ならびに抗血清の量は、穴の容積と反応観察の容易さなどから判断し、それぞれ 0.025 ml で十分であった。原法では 0.1 ml であることに比べても極めて少量で済む。また、反応を被覆する流動パラフィンの量も容器の各穴に対し、約 0.3 ml 程度で十分である。なお、一定量の液を各穴に入れるために、auto pipette が便利である。参考までに筆者らが用いたものは、Micro selectapette (Clay Adams 社製) である (口絵写真①)。反応は 37°C に 2 時間静置した後、暗視野顕微鏡で観察し、更に 4°C に一晩置いて再び反応を観察し確認した。観察の際は tray を軽く動かしてから検鏡し、通常 16 倍あるいは 25 倍で観察した。暗視野顕微鏡を用いて観察することにより、白色の絮状沈殿がはっきり観察できる。筆者らが用いた暗視野顕微鏡はオリンパス JMT<sub>r</sub> の試料台を平滑にし、絞りレバーを側面に付け改良したものであるが (口絵写真②)、現在市販のニコン双眼の暗視野でも光源の明るさをコントロールすることで十分判読できる。

### 3 multi-dish tray 法の応用と問題点

本法を用い、北海道各地のジャガイモを調査し、PVS の診断を試みた結果を第 1 表に示す。PVS 罹病株は、その病徴が環境条件によって不明瞭になることが多く、肉眼観察では判別が難しいのが実際である。この診断結果から、白色絮状沈殿が明瞭に観察でき、本法の有効性が確認された (口絵写真③、④)。leaf dip serology と本法を併用することにより、より正確な診断ができることは、李ら (1979)<sup>16)</sup> により報告されているので参照されたい。PVS 以外のウイルス病の診断に、また、従来重層法などの沈降反応により決定されていた抗血清の力価検定 (抗血清終末希釈倍数) においても本法が応用できることを確認するため、PVX、イネ萎縮ウイルス (RDV)、CGMMV、PVY を用いて実験を試みた。それぞれの抗血清終末希釈倍数を調べた結果を第 2 表に示す。純化ウイルス抗原を用いた PVX、PVY に関しては重層法との比較を試みたが、得られた結果は純化 PVX の場合、抗原濃度 OD<sub>260</sub> が 0.3 のとき、抗血清終末希釈倍数が 8,192 倍であり、重層法を用いた場合、OD<sub>260</sub> が 0.05 といった抗原濃度で抗血清終末希釈倍数は 2,048 であった。この値は、本法での 16 倍希釈抗原のものと対応すると考えられ、ほぼ同じ結果が得られた。純化 PVY 抗原を供試した場合も、OD<sub>260</sub> が 0.3 といった抗原濃度のとき、抗血清終末希釈倍数が本法で

第1表 Multi-dish tray (MDT) 法によるジャガイモウイルスの診断

株番号	品 種	病 徴	採集地	電 顕 <sup>a)</sup>		血 清 反 応 <sup>b)</sup>	
				dip 法		スライド法	MDT法 <sup>c)</sup>
				ひも状	桿 状	(PVX)	(PVS)
26	紅 丸	脈 間 退 緑	北 見	+	-	+	-
28	農林1号丸	モザイク	北 見	+	-	+	+
40	紅 丸	モザイク	北 見	-	+	+	+
44	農林1号丸	モザイク	中 標 津	+	-	+	-
50	紅 丸	モザイク	中 標 津	+	-	+	-
59	農林1号丸	脈 間 退 緑	中 標 津	+	-	+	+
96	エニワ丸	モザイク	大 正 津	-	+	-	+
105	紅丸	モザイク	大 中 標 津	-	+	-	-
110	農林1号丸	モザイク	大 中 標 津	+	+	+	-
114	農林1号丸	微斑モザイク	大 中 標 津	+	+	+	-
116	農林1号丸	脈 間 退 緑	大 中 標 津	+	+	+	+
118	農林1号丸	脈 間 退 緑	大 中 標 津	+	+	+	+

(dip 法による粒子の検出及び PVX に対するスライド法を併用した) 1975 年, 北海道各地の調査抜粋.

a) dip 法 +, -: ウイルス粒子の有無 (+, 卍 は粒子の多少を示す)

b) +, -: 反応の有無

c) MDT法: Multi-dish tray 法

第2表 Multi-dish tray 法による各種ウイルス抗血清の力価検定

反応方法	供試ウイルス	PVX		PVY		PVS		CGMMV		RDV	
		抗原希釈倍数	抗血清終末希釈倍数	抗原希釈倍数	抗血清終末希釈倍数	抗原希釈倍数	抗血清終末希釈倍数	抗原希釈倍数	抗血清終末希釈倍数	抗原希釈倍数	抗血清終末希釈倍数
Multi-dish tray 法	粗 汁	2	1,024 <sup>a)</sup>			1	4,096	1	128 <sup>a)</sup>	1	128 <sup>a)</sup>
		4	1,024 <sup>a)</sup>			2	4,096	2	256 <sup>a)</sup>	2	128 <sup>a)</sup>
		8	64 <sup>a)</sup>			4	256	4	256 <sup>a)</sup>	4	256 <sup>a)</sup>
		8	64 <sup>a)</sup>			8	4	8	512 <sup>a)</sup>	8	256 <sup>a)</sup>
		16	64 <sup>a)</sup>					16	512	16	512
		128	256					128	1,024	128	128
	液	32	128					32	1,024	32	512
		64	256					64	1,024	64	128
		128	256								
		4	8,192	2	512			2	4,096		
		(OD <sub>260</sub> <sup>a)</sup> =0.3)		(OD <sub>260</sub> <sup>a)</sup> =0.3)				(OD <sub>260</sub> <sup>a)</sup> =0.4)			
		4	8,192	4	256			4	4,096		
純化ウイルス液	8	2,048	8	64			8	2,048			
	16	2,048	16	32			16	1,024	16	1,024	
	32	1,024	32	4			32	512	(OD <sub>260</sub> <sup>a)</sup> =0.32)	512	
	64	512					64	256	32	512	
									64	256	
									128	256	
重層法	純化ウイルス液	OD <sub>260</sub> <sup>a)</sup> =0.05	2,048	OD <sub>260</sub> <sup>a)</sup> =0.1	512						

a) : これ以上の希釈では粗汁液中の他の沈殿のため判定が困難であった.

PVX, PVY, PVS: ジャガイモウイルス X, Y, S CGMMV: キュウリ緑斑モザイクウイルス RDV: イネ萎縮病ウイルス.

は 512 倍であり、重層法を用いた場合と、おおよそ同じ結果と考えられる。ほかに純化 CGMMV 抗原、純化 RDV 抗原を供試した場合、それぞれの抗原濃度が OD<sub>260</sub> で 0.4 と 0.32 で、抗血清終末希釈倍数は 4,096 倍と 1,024 倍であった。このように、抗血清の力価検定にも十分本法は応用できることが確認された。それぞれのウイルス罹病植物粗汁液を抗原とした試験で、PVX 罹病トマト、CGMMV 罹病ユウガオ、RDV 罹病イネ (いずれも -30°C 凍結葉) を用いたが、PVX 罹病葉で 16 倍以下、CGMMV 罹病葉、RDV 罹病葉で 8 倍以下の低希釈液では、抗血清が希釈されるにつれ反応沈殿物が減少し、植物汁液中の緑色沈殿がみられ、これが暗視野光をさえぎるため、反応の判読が困難となった。したがって、このような低希釈粗汁液を用いて診断する場合、抗血清はかなり低希釈のものを使用しなければ誤診の危険がある。井上 (1977)<sup>13)</sup> はランのウイルス病の診断に凝集反応を応用しているが、罹病植物磨砕搾汁液を低速遠心分離し、その上清を用いるか、ろ紙でろ過し清澄化した後、用いたほうが誤診がなかったと報告している。筆者らの実験でも、罹病植物の粗汁液を低希釈で用いると葉緑体やデンプン粒を含む沈殿が容器底部に沈着し、暗視野光をさえぎるため、反応沈降物の判読が難しくなることから、本法を用いての植物ウイルス病の診断には、粗汁液をあらかじめ、冷凍や加熱といった前処理と低速遠心の組み合わせなど、簡単な清澄化か、適当に希釈したほうが反応の判読は容易となる。純化ウイルスを抗原として用いた抗血清の力価検定では、このような問題はなく、明瞭な白色絮状沈降物が観察でき、抗血清終末希釈倍数の判読は容易であった。PVX 罹病トマト粗汁液の場合、反応は 32~64 倍希釈抗原と 8~16 倍希釈抗血清の範囲での組み合わせで、ぼたん雪状の明瞭な凝集塊が観察でき最も判定しやすかった。また、純化 PVX を試料としたとき、4~8 倍希釈抗原と 16~64 倍希釈抗血清との組み合わせで最も反応が明瞭であった (口絵写真⑤)。PVS 罹病ジャガイモ (男爵) 葉粗汁液を抗原とした場合、抗血清の終末希釈倍数は 4,096 倍であった。CGMMV 罹病ユウガオ粗汁液を抗原とした場合、反応は 16~32 倍希釈抗原と 8~16 倍希釈抗血清の範囲内での組み合わせで反応が最も明瞭で観察しやすかった。純化 PVY を抗原としたとき、2~4 倍希釈抗原と 16~32 倍希釈抗血清の組み合わせの範囲で凝集沈殿が多く、明瞭な反応を読むことができた (口絵写真⑥)。RDV 罹病イネ粗汁液の試料では、16~32 倍希釈抗原と 8~16 倍希釈抗血清の範囲内での組み合わせの反応が明瞭であり、また、純化 RDV では 16~32 倍希釈抗

原と 8~64 倍希釈抗血清の範囲の組み合わせで最も反応が読みやすかった (口絵写真⑦)。このように、明瞭な反応が観察できる抗原・抗血清の希釈の組み合わせが存在することから、実際の診断においても、この点を考慮することが必要と思われる。このように筆者らは、北海道のジャガイモのウイルス病、特に PVX, PVY, PVS の診断のほか、マメ類のウイルス病の調査においてインゲン黄斑モザイクウイルス (BYMV)、インゲンモザイクウイルス (BCMV) の診断にも本法を応用しており、また、イネ縞葉枯ウイルス (RSV) 抗血清の力価検定にも本法を用いた。

従来、粗汁液を用いてのウイルス病の診断は、小試験管を用いた混合法やこれを簡便化したスライド法が PVX のほ場検定などに実際用いられてきているが、ウイルス濃度が低い場合や抗血清の力価が低い場合は診断が難しい。また、使用する抗血清の量も多い。この点本法は、使用する抗血清の量が極めて微量で済み、しかも、反応が明瞭に観察できること、多くの検定診断が一度にでき操作が簡便であることなど、ウイルス病の診断には極めて有利な点を持っている。暗視野顕微鏡の携帯化を図ることにより、上記の利点を生かしてほ場で採取したものにも十分応用できるものと考えている。

本法で使用した組織培養用の Multi-dish dispo tray (Linbro Chemical 社製) はプラスチック製であり、穴が平底のものであるが、使用後の洗浄にやや面倒なきらいがある。筆者らは使用済み tray をアルカリ洗剤に一晚浸漬し、綿棒で各穴を洗い、十分温水で洗剤を洗い落としその後水洗するという手順で行っている。汚れはもちろんのこと、傷の付いた tray は再使用する場合、特に微小な沈降反応の判読に不都合であることから、傷を付けないよう洗浄には十分留意する必要がある。また、この tray は価格もかなり高いという難点がある。最近筆者らは、検定試料が少ない場合、tray 洗浄の繁雑さを考え、プラスチック製の直方体 (内径 9.5×6×2.5 cm) で蓋のしっかりと合う小箱の底に赤色鉛筆で 1×1 cm のワクを描き、そのワクの中に 0.02ml ずつ抗血清とウイルス液を反応させ、良い結果を得ている。

### III ま と め

植物ウイルス病の診断において、微量沈降反応 (microprecipitin test) は、使用する抗原及び抗血清量が少ないこと、反応が明瞭であり診断が正確であること、更に操作が簡便であることから、今後、更に広く利用されてよいものと考えている。

これまで micro precipitin test という語いに対し、

微量沈降反応法,あるいは multi-dish tray 法 (MDT 法), また, 井上ら (1967)<sup>14)</sup>, 麻谷ら (1967)<sup>2)</sup> 及び井上 (1977)<sup>13)</sup> は微凝集反応という名称を用いてきた。前述のように沈降反応, 凝集反応という反応自体の性質から語句を統一することは, 植物ウイルス学上難しい面はあるが, どの語を使うにしても, 微量沈降反応あるいは微凝集反応, または microprecipitin test のいずれの語もなかなか発音がしにくい。その点, 都丸 (1978)<sup>26)</sup> が使用している“微滴法”という名称は非常に簡明であり, 反応特技の特質を良く表しているように思われる。筆者らも, この名称が microprecipitin test という語いに対して使いやすいのではないかと考えている。

今後, 植物ウイルス病の診断に対する血清反応の応用を考えていくうえで, それぞれのウイルスに対して高い力価の抗血清を得ることが要求されており, また, より微量な抗原に対し, 反応が明確に判読できる方法が要求されている。近年, 各種の結合抗体を用いた凝集反応の導入や酵素結合抗体法 (ELISA 法) の導入などが工夫され, 正確な診断が可能となってきたが, これらの新しい方法は操作がやや複雑な点は否めない。しかし, こうした点も徐々に解消されていくことであろう。

#### 引用文献

- 1) ABU SALIH, H. S. et al. (1968) : J. gen. Virol. 3 : 299~302.
- 2) 麻谷正義・井上忠男 (1969) : 農学研究 53 : 35~48.
- 3) BARTELS, R. (1957) : Phytopath. Z. 30 : 1~16.
- 4) BERCKS, R. (1967) : ibid. 58 : 1~17.
- 5) ——— and G. QUERFURTH (1971) : J. gen. Virol. 12 : 25~32.
- 6) ——— et al. (1972) : in “Principles and Techniques in Plant Virology” (KADO, C. I. and H. O. AGRAWAL, eds.), 466~490. Van Nostrand Reinhold Company.
- 7) BRADLEY, R. H. E. (1952) : Amer. Potato Jour. 29 : 289~291.
- 8) CHESTER, K. S. (1935) : Phytopathology 25 : 686~701.
- 9) ——— (1936) : ibid. 26 : 778~785.
- 10) CORBETT, M. K. (1967) : ibid. 57 : 198~202.
- 11) FRIEBOURG, C. E. and G. A. DE ZOETEN (1970) : ibid. 62 : 812~816.
- 12) GIBBS, A. and B. HARRISON (1976) : “Plant Virology. The Principles”, 95~109. Edward Arnold.
- 13) 井上成信 (1977) : 農学研究 56 : 1~13.
- 14) 井上忠男ら (1967) : 同上 51 : 175~186.
- 15) JONES, R. K. and S. A. TOLIN (1972) : Phytopathology 62 : 812~816.
- 16) 李 淳炯ら (1979) : 日植病報 45 : 255~257.
- 17) MATTHEWS, R. E. F. (1967) : in “Methods in Virology” (K. MARAMOROSCH and H. KOPROWSKI, eds.), Vol. 3. 199~241. Academic Press, New York.
- 18) MOORHEAD, E. L. and W. C. PRICE (1953) : Phytopathology 43 : 73~77.
- 19) MUNRO, J. (1954) : Amer. Potato Jour. 31 : 73~82.
- 20) 村山大記 (1960) : “植物ウイルス病—実験法と種類—” (日高 醇・平井篤造・村山大記・與良清編), 129~152. 朝倉書店.
- 21) REDDY, D. V. R. and L. M. BLACK (1966) : Virology 30 : 551~561.
- 22) SAMPSON, P. J. and R. H. TAYLOR (1968) : Phytopathology 58 : 489~493.
- 23) 佐藤 亮ら (1955) : 植物防疫 9 : 324~328.
- 24) SCOTT, H. A. (1968) : Virology 34 : 79~90.
- 25) 仙北俊弘ら (1979) : 日植病報 45 : 142~146.
- 26) 都丸敬一 (1978) : “新編植物ウイルス学” (平井篤造・高橋 壯・四方英四郎・都丸敬一共著), 304. 養賢堂.
- 27) VAN DER VEKEN, J. A. et al. (1962) : in “Modern Methods of Plant Analysis” (H. F. LINSKENS and M. V. TRACEY, eds.), Vol. 5, 422~463. Springer, Berlin.
- 28) VAN SLOGTEREN, D. H. M. (1955) : Proc. of the 2-nd Conference on Potato Virus Diseases, Lisse-Wageningen : 51~54.
- 29) WATERWORTH, H. E. (1971) : Phytopathology 61 : 228~230.
- 30) WHITCOMB, R. F. (1964) : Virology 24 : 488~492.
- 31) ——— and L. M. BLACK (1961) : ibid. 15 : 136~145.
- 32) ——— . ——— (1961) : ibid. 15 : 508~509.
- 33) YOKOYAMA, T. (1975) : Res. Comm. Inst. Ferment. Osaka 7 : 74~111.

## 螢光抗体法のカンキツトリステザウイルスへの利用の現状

広島県果樹試験場 佐々木 篤

### はじめに

近年、我が国ではトリステザウイルス (CTV) に罹病性のものが多く含まれる、いわゆる中晩柑類の栽培が増加している関係から、これまでになく CTV の検定が必要となってきた。

CTV の検定は、これまでライムテスト (メキシカンライムというカンキツの1種を検定植物に用いて行う方法) でなされてきた。ところが、この方法はすこぶる精度は高いものの、種子の大量入手が困難なこと、育苗と検定にそれぞれ1年前後の長期を要すること、温室あるいは網室などの大型施設が必要なことなどの欠点があり、多数の検体を短期日のうちに処理するには不向きであった。そのため従前よりもっと簡便でかつ高精度の検定法が求められていたが、幸いにして一昨年、土崎ら (1978) の手で螢光抗体法による検定法が開発され、ようやく多年の夢がかなえられることとなった。その手法については詳細が既に本誌 (31: 373~376, 1977) にも紹介されたことがあるのでここでは省き、本稿では、その後この方法がどのような方面で利用され、どのような成果があがっているかを紹介する。

### I 組織内の CTV 分布調査

螢光抗体法の特性の一つは、抗原抗体反応という特異性の極めて高い反応を、直接組織細胞標本上で起こさせることで、組織内でのウイルスの分布状況を知るにはまさにうってつけの方法である。CTV の場合も、本法は一般の検討への利用に先立ち、まずはカンキツ樹体内での分布調査に利用されることとなった。

佐々木ら (1978) は、CTV の弱、強毒系のどちらか一方に感染していることがあらかじめ確認されているハッサクなど、5種類のカンキツ樹を対象にし、葉柄、葉の主脈、支脈、緑枝 (以上、いずれも発芽後8~9か月経過した春梢)、主幹部樹皮、細根 (カラタチ台とナツダイダイ台を供試)、果実維管束、発芽10日後の花の子房、花柱、葯、花弁、花梗の各部位について横断切片を作製、CTV 特異螢光発生細胞 (以下、分かりやすく CTV 感染細胞とする) の分布状況を調べた。

その結果、カラタチ台の細根で分布が認められなかったほかは、いずれの器官部位でも分布が認められた。細

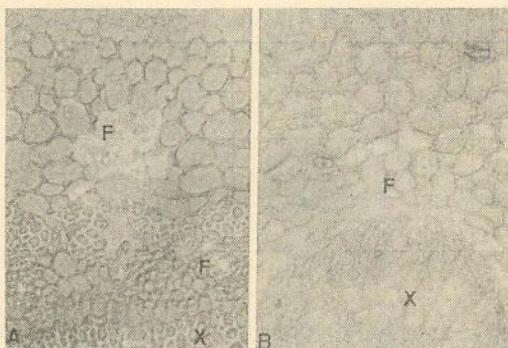
根についても、ナツダイダイ台のものではこれが明瞭に観察された。

ところで、組織内での CTV の分布は既に土崎ら (1978) も述べているように、師部細胞に限られてはいたが、今回の調査でみると同じ師部とはいえ二次師部が形成されている場合は機能の消失した一次師部には全く分布していないか極めて少なく、分布はほぼ二次師部に限られるとよい状態であった。このことは、CTV 粒子が師部細胞の老化あるいは細胞死に伴い、ある時期がくると自然に崩壊していくものであることを示している。

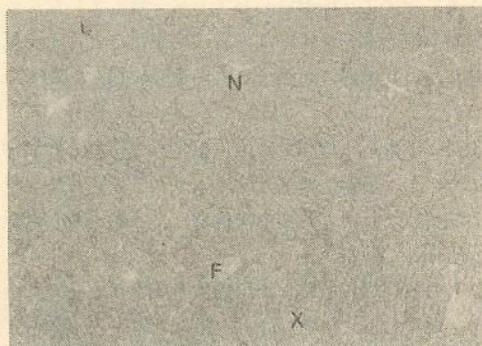
次に CTV 感染細胞の数についてみると、当然のことながら、各組織における師部の占める面積の大小によりかなりの開きがみられた。まず、最も多い分布数を示したのはいずれの品種でも果実の維管束であり、次いで葉柄、緑枝で多かった。これに対して葉脈、細根、花器の各部位では全般に少なく、特に細根、支脈で少ないのが目についた。

一方、弱、強毒系統間あるいは品種間で比較してみると、果実の維管束ではどの比較でも全くといってよいほど差が認められなかった。しかし、葉柄でみると、弱毒系感染苗が強毒系感染のものに比べて多少少ない傾向を示し、ウンシュウミカンが他品種に比較してやや少ない傾向であったが、際立つ差とは言い得ない。

次に、佐々木らは上記の調査と併行して、CTV 弱、強毒系のどちらかに感染していることのあらかじめ分かっているハッサク苗を用い、新梢萌芽時からの葉柄ならびに緑枝内の CTV の消長についても調べている。この結果によると、ウイルスの系統に関係なく萌芽時 (芽が数 mm 伸展した時点) に既に感染細胞の存在が認められ、以後日数の経過につれて分布数が増加し、萌芽21~30日後にピークに達し、その後は逆にこれが減少していくのが観察された。また、これと同時に強毒系に感染しているものでは感染細胞の分布が集団的 (第1図) であり、かつ集団化した感染細胞は時のたつにつれ壊死していくのも観察された (第2図)。一方、弱毒系感染苗ではこのようなことがほとんど認められない。これより佐々木らは螢光抗体法による検定により、組織内における CTV の弱、強毒系統の判別も可能なのではないかと指摘した。しかし、その後の筆者の経験によると、こ



第1図 CTV 強毒系に感染している発芽3週後の枝 (A:ハッサク)と葉柄 (B:ユズ)の位相差・蛍光顕微鏡写真. F:CTV 抗原を示す特異蛍光, X:木質部.



第2図 CTV 強毒系に感染しているハッサクの発芽およそ90日後の葉柄の位相差・蛍光顕微鏡写真. F:CTV 抗原を示す特異蛍光, X:木質部, N:ネクロシス.

れを実用に供するにはまだ問題が多く、更に詳細な検討が必要のようである。

次に、山田ら(1979)は蛍光抗体法を用いて検定を行う際、枝あるいは主脈のどの部分をサンプルに用いるのが適当かを知るための分布調査を行っている。すなわち、森田ネーブル、宮内イヨ、セミノールのCTV感染苗から1本ずつ新梢を採り、これを頂部、中間部、基部に分けそれぞれの部位から葉柄を採ってCTV特異蛍光発生細胞数を比較調査したところ、いずれの品種でも部位による差はなかったが、全般的にみてセミノールが他の品種に比べて少ない傾向にあったとしている。また、葉脈については、葉の先端部に近づくほど特異蛍光発生細胞数は少なく、新、旧葉での比較では旧葉において多いとした。

筆者もまた、これと同じようなねらいで同一樹内あるいは同一枝内の着葉部位の相違と、葉柄におけるCTVの分布との関係を調べてみた。結果は第1表に示すように、CTV感染細胞数にはかなりバラツキが認められた。しかし、いずれのサンプルでもCTVの検出は十分にでき、単にCTVに感染しているか否かを知るだけならば、1樹1枚の葉でも目的は達しうるように思われる。

## II 無毒処理個体におけるCTVの検定

現在カンキツでは、ウイルス病防除対策として種々のカンキツの無毒あるいは無病母樹の育成が急務の課題となっており、茎頂接木法、あるいは高温処理法による無毒個体の作出が各所で実施されているが、その能率が検

第1表 同一樹の枝の相違、着葉部位の相違と葉柄におけるCTV感染細胞数の関係

供試樹	供試枝 No.	CTV 感染細胞数			同左の集団分布			師部ネクロシス		
		先端部	中間部	基部	先端部	中間部	基部	先端部	中間部	基部
CTV 弱毒系 感染ハッサク 成木	1	5	60	50	-	-	-	-	-	-
	2	13	19	32	-	-	-	-	-	-
	3	39	52	42	-	-	-	-	-	-
	4	26	13	23	-	-	-	-	-	-
	5	25	19	31	-	-	±	-	-	±
	平均		18	33	36					
CTV 強毒系 感染ハッサク 成木	1	79	75	61	+	+	+	+	+	+
	2	60	70	>90	+	+	+	+	+	+
	3	14	31	48	-	+	-	-	+	+
	4	38	53	50	+	+	+	-	-	-
	5	25	21	31	-	-	-	-	-	-
	平均		43	50	57					

注 供試樹はおよそ15年生樹。供試枝は発芽10~20日後の春梢。検定はすべて葉柄を用いて行い、1検体当たり5切片供試した。表中の数値はその平均値である。また、CTV感染細胞の集団分布、ネクロシスについては5切片中1切片でもこれが認められた場合は+とした。

第2表 蛍光抗体法による熱処理期間中におけるCTVの経時的变化と無毒化状況 (山田ら, 1979)

穂木品種	処理開始前平均 特異蛍光数	5 週 間		7 週 間		9 週 間	
		A <sup>1)</sup>	B <sup>2)</sup>	A	B	A	B
森田ネーブル	31.2	23.6	3/3 (15)	6.8	11/18 (42)	1.0	10/14 (72)
宮内イヨ	21.4	6.5	4/4 (14)	0.5	4/4 (42)		
セミノール	46.2	1.0	0/0 (14)	0.6	1/1 (47)		
興津14号	約 20	0.8	3/3 (19)				

注 1) 平均特異蛍光数, 2) 無毒苗/活着苗 (接木数)

定という工程の早晚によって大きく左右されることは今更言うまでもない。そこで、蛍光抗体法による検定を利用してその能率を大幅に高め得ないものかどうか、1, 2 検討した結果があるので紹介する。

山田ら (1979) は、森田ネーブル、宮内イヨ、セミノール、興津14号を用いて高温処理期間中のCTVの分布の様子を経時的に調べた。その結果第2表に示すように、高温処理によりCTVは急激に減少し、耐熱性の低い品種ほど早く減少するものであることを認めた。

また、山田ら (1979) は高温処理によって無毒化した

個体について、蛍光抗体法とライムテストの結果の比較も行っているが、これによると両者の結果には微妙な差があって、蛍光抗体法の感度がいまま一つライムテストに及ばぬことをうかがわせる。

これと同様な比較を筆者も最近行ってみたが、結果は第3表に示すように両者必らずしも一致していない。特にワシントンネーブルでは両者の結果がほとんど逆転しており、これが何に起因するのか今後の検討課題といえよう。

また、小泉ら (1979) は茎頂接木法で作出した無毒個体について、蛍光抗体法とライムテストの結果を比較しているが、それでも8例中1例ではあるが一致しない例が認められている。

以上の各例からみて、無毒個体の作出など特に正確な検定を要するような場合は、ライムテストの実施もまだ欠くことのできないことのものであり、蛍光抗体法は目安程度に利用するのが無難のようである。

以上が、これまでに報告された蛍光抗体法のCTVへの利用状況であるが、本法を今すぐにライムテストと置き替えることは無理である。しかし、特別厳正さを要しない検定や研究手段としてならば実用性はすこぶる高い。

特に無病母樹の探索の際の一次選抜や、ウンシュウミカンのようなCTVに感染しても病徴を生じない品種におけるCTVの感染実態調査には、大いに威力を発揮するであろう。また、CTV関係の実験を進めていくうえで、供試植物におけるCTVの感染是非、全身への分布状況、人為的に接種した場合の定着状況のチェックは、実験結果の精度を高めるうえで重要なことであるが、このような場面でも本法は手軽に利用できる。

必要器械の整備や蛍光抗体の供給体制が一日も早く整えられ、各所において幅広く本法が活用されることを期待してやまない。

第3表 高温処理したカンキツ苗における蛍光抗体法とライムテストによるCTVの検定結果の比較

供試品種	供試枝 <sup>a)</sup>	蛍光抗体法 <sup>b)</sup>	ライムテスト <sup>c)</sup>
紅甘ナツ	旧	0.3	+
	〃	0.3	-
	〃	0	-
	〃	0	-
同上無処理苗	〃	13	
早生甘ナツ	〃	7	
	〃	7	
イヨカン	〃	0	-
	〃	0	-
	〃	0	-
	〃	0	-
	〃	0	-
同上無処理苗	〃	35	
ワシントン ネーブル	〃	21	-
	〃	40	-
	新	0	卅
	〃	1	卅
	〃	0	卅

注 a) 旧とは高温処理開始前に生じていた枝。新とは高温処理期間中に生じた枝の意。b) 葉柄における平均特異蛍光数。c) 蛍光抗体法の検定に用いた葉柄と同一部位の芽をテスト。

# ラテックス凝集反応による温州萎縮病の診断

農林水産省植物ウイルス研究所 **宇 杉 富 雄**

## はじめに

温州萎縮病は 1930 年ごろから静岡県において、その発生が認められていたが、本病がウイルス病であることは 1950 年に山田・沢村によって明らかにされた<sup>9,10</sup>。現在では本病は我が国のウンシュウミカンの産地にはほぼ全国的に分布しており、接木以外の自然条件下での伝搬様式がいまだに明らかでないため有効な防除法がなく、発病地においてウンシュウミカン栽培上の重要な障害となっている。温州萎縮ウイルス (SDV) に感染したウンシュウミカンは舟型葉、さじ型葉を生じ、樹全体は萎縮する。特に春芽における病徴が最も顕著に現れ、葉が舟型やさじ型を呈して小葉化する。しかしながら、発病園においては病徴には各段階のものがあり、SDV に感染していても外観健全の樹がある。また、しばしば SDV 感染の認められないウンシュウミカンに萎縮病類似の舟型葉が観察され、SDV 罹病株と混同する場合がある。したがって、ウンシュウミカンの病徴のみによって SDV 感染株を診断することは困難で、シロゴマに新芽の磨砕液を汁液接種し、シロゴマに生ずる局部病斑や全身病徴の有無によって検定を行う必要がある。この汁液接種による生物検定は特別の器具を必要とせず、比較的容易に高感度の結果を得ることができる。しかし、検定植物のウイルスに対する感受性は植物の生育状態や接種後の温度条件などによって大きく影響されること、一度に多数の試料を調査する場合、植物の育成と接種後の管理にはかなりの労力と広いスペースの施設が必要となることなど、生物検定の欠点もある。特にシロゴマは育て方が難しく、生育途中で枯死し、試験の予定が狂うことがある。

そこで、筆者は SDV の検定が血清学的手法によってできないだろうかと考え、各種の手法について検討した。その結果、ラテックス凝集反応、抗体感作赤血球凝集反応及び ELISA (酵素結合抗体法) の 3 手法によって少量の罹病 ウンシュウミカン新芽から SDV の検出が可能であり、温州萎縮病の診断に使えることが分かった。抗体感作赤血球凝集反応と ELISA は極めて鋭敏な手法であるが、手法が複雑であったり、試験ごとに抗体感作血球を作る必要があるなどの難点がある。そこで、感度はこれらの手法に比べて劣るが SDV のほ場検

診を目指した簡易診断法としてラテックス凝集反応が適しているのではないかと考え、これについて種々検討を行った。

本稿においては、参考としてはじめに各種の凝集反応を紹介し、次いでラテックス凝集反応を用いた SDV の診断に関して行った試験結果について述べる。

## I 凝集反応の種類

植物ウイルスでよく使われている血清学的診断法に凝集反応がある。ウイルスと抗体の凝集物を直接観察するにはウイルスは極端に小さいため相当多量のウイルスが必要である。そこで、赤血球やラテックスのような均一な物体に抗体やウイルスを附着させ、これを用いて血清反応を行わせる方法が考えられた。この場合、抗原抗体反応はウイルスと比べると巨大な物質である赤血球やラテックスの凝集物として認められる。このため、これらの凝集反応では粗汁液の特別な清澄化を必要とせず極めて微量のウイルスが検出される。凝集反応には抗体やウイルスの担体を異にする各種の手法がある。

### 1 スライド法

凝集反応では最も簡単な手法で、タバコモザイクウイルス (TMV)、ジャガイモ X ウイルス (PVX)、キュウリ緑斑モザイクウイルス (CGMMV) のような桿状またはひも状粒子で、植物体内において高濃度に増殖するものが適している。顕微鏡用のスライド上に病植物汁液を滴下し、これに 10 倍くらいに希釈した抗血清を加えて混合すると、汁液中のクロロプラストが凝集し反応が起こる。反応が極めて速く数分で結果が分かるので、感度は高くないが一時に多くの個体を扱うジャガイモほ場での PVX の検定に用いられ成果をあげている。

### 2 ベントナイト凝集反応

本法は、抗体の担体として精製されたベントナイトを用いる方法で、反応を見やすくするためにベントナイトをメチレンブルーで染色する<sup>3,7)</sup>。得られる標品は 4°C で 6 か月は保存できる。病植物の汁液 0.1 ml と抗体感作ベントナイトを 0.05 ml 混合し、1 分間に 110 回、20 分間振とうする。これを 60 倍程度の顕微鏡下で観察し、ベントナイトの凝集物が認められれば反応陽性である。純化ウイルスを用いた実験では TMV 0.15 μg/ml, southern bean mosaic virus 0.3 μg/ml, tobacco ri-

ngspot virus 0.5  $\mu\text{g/ml}$  を本法によって検出することができ、かなり鋭敏である<sup>2)</sup>。このため、休眠中のジャガイモの芽から PVX (ジャガイモウイルス X), PVM (ジャガイモウイルス M) 及び PVS (ジャガイモウイルス S) が検出できるようになった。本法の欠点としては感作ベントナイトを作製するのに時間がかかること、使用する血清量が多いことが挙げられる。

### 3 ラテックス凝集反応

ラテックス凝集反応は、抗体の担体としてポリステレンラテックスを用いる。反応は鋭敏で信頼性が高く、その感度はベントナイト凝集反応とほぼ同じであり、PVX 0.1  $\mu\text{g/ml}$ , PVS 0.5  $\mu\text{g/ml}$  を検出することができる<sup>4)</sup>。ラテックス粒子は血清反応用のものが市販されているので、ベントナイトのように精製する必要がなく、直接抗体を感作できるため感作に要する時間が少なく済む、また、ベントナイト法や後に述べる抗体感作赤血球凝集反応に比べて、より少量の抗体で感作できる利点がある。感作ラテックス粒子は 4°C に置くと一年ぐらいは保存できる。

### 4 赤血球凝集反応

TMV を用いて見いだされた手法で、ウイルスと抗体が反応するときヒツジの赤血球が存在すると、赤血球が凝集して試験管の管底に広く分散するか凝塊を作る。反応陰性の場合、管底の中央に赤血球が集まり小円を形成する。この方法は検定に要する試料が少量で済み、また、沈降反応よりは鋭敏である<sup>5)</sup>。

### 5 タンニン酸処理感作赤血球凝集反応

数多い血清学的手法のうちで最も鋭敏な手法の一つである。ヒツジ赤血球をタンニン酸で処理すると、赤血球の表面はタンパク質を吸着するようになる。この現象を応用し、赤血球を抗体やウイルスの担体として用いる方法がタンニン酸処理感作赤血球凝集反応である<sup>6, 8)</sup>。

血球にウイルスを吸着させた場合はウイルス感作赤血球凝集反応と呼ばれる。抗血清を段階希釈して、これにウイルス感作赤血球を加え、室温に3時間または 4°C に一夜静置すると凝集反応が起こり、抗血清の力価を知ることができる。この方法によると沈降反応 1,280 倍の抗ムギ斑葉モザイクウイルス血清は、13, 107, 200 倍の力価を示し極めて鋭敏である。本法は抗体の微量定量法であるので、ウイルスを検出するためには抑制試験である間接的方法によらなければならない。抑制試験には4単位抑制法と抗体希釈抑制法の2方法が考案されている。4単位法は定量関係が明瞭であり、抗体希釈法はウイルスの微量検出に適している<sup>6)</sup>。

赤血球に抗体を吸着させた場合は、抗体感作赤血球凝

集反応と呼ばれる。本法はウイルスを直接定量することができ、しかも、ラテックス凝集反応に比べて数 10 倍も高感度で、かつ反応結果の判定が容易であるため、ウイルス病の診断には有効である。本病は特にイネ縞葉枯病においてヒメトビウカのウイルス保毒虫の検定には欠かすことのできない手法となっている<sup>8)</sup>。ウイルス感作赤血球凝集反応は、純化の困難なウイルスを扱う場合やウイルス純化に必要な機器のない所では適用できないが、抗体感作赤血球凝集反応は精製された抗体が得られるならば特別の機器を必要とせず、どこの実験室でも用いることができる。欠点としては感作血球が保存できないため試験ごとにこれを作成しなければならないこと、ラテックス凝集反応に比べても使用する血清量が多いことが挙げられる。

## II ラテックス凝集反応のあらまし

### 1 抗体

ラテックス粒子の感作には、非動化 (60°C, 10 分間) した抗血清そのままか、硫酸塩析などによってアルブミンを除いた抗体グロブリンを用いる。抗血清は球形ウイルスの場合寒天ゲル拡散法による反応終末点まで希釈して用いる。筆者は SDV 抗血清を 1/2 飽和硫酸塩析法によって分離したグロブリンを用いた。得られた抗体はリングテストで SDV と 3,200 倍まで反応し、タンパク含量は約 3.1% であった。

### 2 抗体感作法

ラテックスは、血清試験用に市販されている Difco, Bacto Latex 0.81 を用いた。ラテックス原液を一定量採り、0.85% 塩化ナトリウム水溶液で 15 倍に希釈する。次に抗血清を 0.05M, pH 7.2 トリス緩衝液で所定の濃度に希釈する。SDV 抗血清の場合は 800 倍希釈で用いた。濃すぎる抗体を使用すると明らかに結果が悪くなるので、抗体の濃度はよく検討して決める必要がある。それぞれ調整した両希釈液を等量混合し、30°C または室温で 30 分間静置する。この間に抗体がラテックス粒子の表面に吸着するが、未吸着の抗体を除くために混合液を 5,000 g, 30 分間の遠心かけラテックスを沈殿させる。沈殿したラテックスを 0.05M, pH 7.2 トリス緩衝液 (0.02% ポリビニルピロリドンを含む) で再溶解し、更にもう一度同じ操作を繰り返し、3 回目のラテックス沈殿を出発時の希釈ラテックスと同量の前述のポリビニルピロリドンを含むトリス緩衝液に溶解する。最後に 0.05% アジ化ナトリウムを加えて 4°C で保存する。

### 3 試験の仕方

ウンシュウミカン新芽を 2g 採り、これに 4ml の 0.1M クエン酸ナトリウム溶液 (0.1% チオグリコール酸を含む) を加えて乳鉢内で磨砕する。磨砕液に 2ml の Mg-ベントナイト溶液を加えて混和し、10,000 rpm、15 分間の遠心にかける。得られる上清 (抗原液 I) 0.1 ml を血清試験に用いるが、ウイルスを濃縮するためにこの上清に等量の 33% 硫酸溶液を加えてよく攪拌し、10,000 rpm、15 分間の遠心にかける。沈殿を 0.1 ml のポリビニルピロリドンを含むトリス緩衝液に溶解する (抗原液 II)。抗原液 II には凝集物が認められる場合があるので、その場合は軽く遠心を行って沈殿物を除く必要がある。この方法で SDV 罹病のウンシュウミカン、*Physalis floridana*、ブラックアイカウピーから抗原液を作成することができる。

このようにして作成した抗原液 0.1 ml と抗体感作ラテックス 0.1 ml を試験管に採り、30°C または室温下で 1 分間 120 回の振とうを行い血清反応を行う。反応開始後 20 分でほぼ結果が分かるが、最終結果は 1 時間後に管底所見によって行う。反応陽性であれば液中に凝集物が観察され、陰性であれば液はミルク状である。また、反応が見づらい場合は顕微鏡観察によるのがよい。

### III ラテックス凝集反応による SDV の診断

#### 1 他の血清学的手法との比較

純化 SDV を用いて、各種の血清学的手法によって SDV の検出限界濃度を調べた結果が第 1 表である。この結果から抗体感作赤血球凝集反応と ELISA は極めて鋭敏なことが分かる。また、ラテックス凝集反応でもかなり高感度である。*Chenopodium quinoa* による生物検定ではおよそ 0.05~0.025  $\mu\text{g}/\text{ml}$  であった。しかし、生物検定では検定植物の生育状態などによっては結果がかなりの変動があった。

第 1 表 各種の血清学的手法による純化 SDV の検出限界濃度

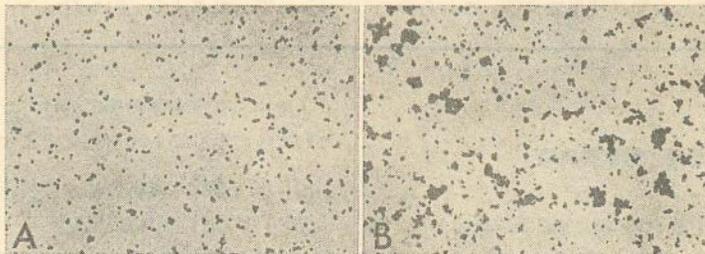
血清学的手法の種類	検出限界濃度*
寒天ゲル拡散法	20 $\mu\text{g}/\text{ml}$
リングテスト	4
補体結合反応	2
ラテックス凝集反応	0.32
抗体感作赤血球凝集反応	0.008
ELISA (酵素結合抗体)	0.006

\* 純化 SDV OD<sub>260</sub> 5.0 を 1mg/ml として計算した。

#### 2 SDV 罹病ミカンからの SDV の検出

神奈川県小田原市のミカン園における 1 罹病ウンシュウミカン樹から、秋芽、春葉、春枝、2 年生春葉及び果実を採取し、各部位ごとにラテックス凝集反応による検定を行い、どの部位から SDV が検出されるかを検討した。その結果、抗原液 I を用いた場合、秋芽のみにおいてウイルスが検出されたが、ほかからは検出できなかった (図)。抗原液 II の場合、秋芽のほか春葉が若干陽性の反応を示した。また、抗原液 I をシロゴマに汁液接種し生物検定を行ったところ、秋芽のみが陽性反応を示した。秋芽はラテックス凝集反応で 6 倍まで、20~23°C 設定のグロースキャビネット内で萌芽させた別のウンシュウミカンの新芽では 24 倍まで反応した。更に夏芽においても反応が認められたが、春芽の反応が最も強く、結果の判定が容易であった。これらの結果から温州萎縮病の診断には春芽を使用し、更に抗原液 II も用いると結果は確実であろう。

神奈川県小田原市及び愛知県蒲郡市における温州萎縮病発病園のウンシュウミカン樹から病徴の認められるもの及び外観健全のものからそれぞれ春芽を採取し、これを用いてラテックス凝集反応及びシロゴマ検定によって診断を行った。その結果は第 2 表に示すとおりである。



SDV のラテックス凝集反応の顕微鏡像 (400 倍)

A : 健全ウンシュウミカン新芽

B : 罹病ウンシュウミカン新芽

第2表 ラテックス凝集反応及びシロゴマ検定による温州萎縮病の診断結果

採取地	検定株数	病徴の認められた株数	陽性反応の認められた株数	
			ラテックス凝集反応	シロゴマ
小田原市	11	3	4(病3, 無1)*	4(病3, 無1)
蒲 郡 市	10	5	5(病5)	3(病3)

\* 病：病徴の認められた株数  
無：無病徴の株数

この結果はラテックス凝集反応による診断がシロゴマ検定や病徴による診断よりも優れていることを示している。

### 3 カンキツモザイク病の診断への適用

和歌山県果樹園芸試験場山本氏よりカンキツモザイク罹病ウンシュウミカン樹の分譲をうけ、これを網室内に保存して、これから得られる春芽、夏芽及び秋芽を用いてSDV抗体感作ラテックスで血清試験を行った。新芽のうち抗原液Iで反応が認められたものは春芽だけであった。夏芽及び秋芽では抗原液IIを用いても反応は起こらなかった。春芽では6~12倍希釈液まで反応が認められたが、SDVと比較すると反応が弱く凝集物が小さかった。しかし、抗原液IIを用いると反応はより明瞭になった。したがって、ラテックス凝集反応によってカンキツモザイク病を診断するためには、春芽を用いても抗原液Iでは若干無理であり、少なくとも抗原液IIを使用する必要がある。

### おわりに

以上のように、ウンシュウミカンの新芽を使えば、ラテックス凝集反応によって温州萎縮病を診断できることが明らかになった。ラテックス凝集反応は、反応が安定していること、短時間で結果が得られることなどシロゴマ検定よりも優れた点を持っている。また、ラテックス凝集反応は手法が簡単であり、感作ラテックスが長期間保存できるのでどこでも手軽に使用できる。これらのこ

とから温州萎縮病の簡易診断法として、ラテックス凝集反応が適しているものとする。

しかし、カンキツモザイクウイルスの場合は問題がある。SDV及びカンキツモザイクウイルスの粒子形態、草本植物における寄主範囲、粗汁液中における物理的性質及び血清学的性質はほぼ同一であるとされているが、ラテックス凝集反応ではカンキツモザイクウイルスの反応はSDVよりも弱かった。その原因の一つとしてカンキツモザイクウイルスの場合、ウンシュウミカン樹体内におけるウイルス濃度がSDVよりも低いためということが考えられるが、この点は明らかでない。また、カンキツモザイクウイルスとSDVの抗原性に若干の差があると、SDV抗血清を使った場合、反応が弱く現れる可能性があることもその原因であるかもしれない。筆者は、本実験に供試したカンキツモザイク罹病ウンシュウミカンから、SDVとは一部分抗原性が異なるウイルスを分離した。このウイルスがカンキツモザイク病の病原ウイルスかどうかは明らかでないが、本ウイルスについて、更にその諸性質を調べる必要がある。

### 引用文献

- 1) BERCKS, R. (1967): *Phytopathol. Z.* 58: 1~17.
- 2) BOZICEVICH, J. et al. (1963): *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 114: 794~798.
- 3) KAHN, R. P. et al. (1967): *Phytopathology* 57: 61~65.
- 4) KHAN, M. A. and S. A. SLACK (1978): *Am. Potato J.* 55: 627~637.
- 5) MOORHEAD, E. L. and W. C. PRICE (1953): *Phytopathology* 47: 73~77.
- 6) 斎藤康夫ら (1964): 農技研報 C17: 23~39.
- 7) SCOTT, H. A. and R. P. KAHN (1964): *Phytopathology* 54: 1292~1293.
- 8) 安尾 俊・柳田 駿策 (1963): 植物防疫 17: 215~218.
- 9) 山田 駿一・沢村 健三 (1950): 園芸学会 (昭25秋) 講要: 36~37.
- 10) \_\_\_\_\_ (1952): 東海近畿農試研報 園芸部第1号: 61~71.

### 〇お知らせ

「農林水産研究文献解題 野菜害虫編」

発刊のお知らせ

このたび、先に刊行された野菜病害編の姉妹編として、本書が発行されました。近年の野菜害虫に関する試験研究文献が網羅的に集録、解説されています。執筆にはそれぞれの専門家があたり、昆虫一般・アブラムシ・ハダ

ニ・線虫・有害小動物等に分けて、A5判、545ページにわたって取りまとめられています。

編集 農林水産省農林水産技術会議

発行 (財)農林統計協会

〒153 東京都目黒区目黒 2-11-14

大鳥ビル TEL (03) 492-2987

定 価 5,000 円

## 酵素結合抗体法 (ELISA) による植物ウイルス病の診断

農林水産省果樹試験場口之津支場 久 原 重 松

### I 酵素結合抗体法の概要

抗体に標識となる物質を結合させ、その結合抗体を用いて血清反応による診断を行う方法としては、既に蛍光物質を結合させる蛍光抗体法と放射性物質を結合させる放射標識抗体法がある。前者は、極めて優れた診断法として今日広く用いられているが、なお、多数のサンプルの処理が容易でないこと、検査に蛍光顕微鏡、暗室を要すること、また、一般的に抗原の検出は定性的であって定量的検査が困難であるなどの難点がある。他方、後者では極めて高感度の検出ができるほか高精度の定量が可能であり、また、多数のサンプルの検査もできるが、人体や環境への影響を考慮することが必要で、取り扱いが容易でなく、検定には熟練と施設を要する。

抗体に酵素を結合させたものを用いて診断を行う酵素結合抗体法は、上記両方法それぞれの長所を持ち、欠点を補う手法であって、高感度で検出と定量の両方ができ、かつ特別な設備機械を要せず多数のサンプルの処理ができる。そのうえ、安全で操作の容易な方法であることからここ数年間に急速な発展を遂げ、血清による診断法の中で重要な役割を果たしつつある。ここではその一般的な手法と、植物ウイルス病の診断への応用について述べることにする。

抗体と酵素を結合させたものを用いて抗原を検出する試みは、当初組織内抗原の存在部位を明らかにする目的で、AVRAMEAS (1969<sup>1)</sup>、1971<sup>2)</sup> によって行われ、各種酵素と抗体の結合や抗原検出についての基礎実験が進められた。

酵素結合抗体を用いた液状抗原の検出、すなわち酵素結合抗体法 (Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)) による検出、定量実験は ENGVALL (1971)<sup>11)</sup> によって行われ、競合法の放射標識抗体法と同様に高感度の検出と定量のできる事が示された。更に 1972 年になると、ENGVALL<sup>12)</sup> らはポリスチレン試験管を用いて間接法により数 ng/ml の各種抗原が検出できることを示した。

1974 年、VOLLER<sup>23)</sup> らはマラリア抗原の検出に、ポリスチレン製のマイクロプレートを用い、多数のサンプルを取り扱う検定を試みた。こうして、1975 年には WOLTERS ら<sup>26)</sup> により、1976 年には BARTLETT ら<sup>2)</sup> により

マイクロプレートを用いる二重抗体法 (double antibody sandwich method) が開発され、卓越した精度で検出のできる事が示された。酵素結合抗体法による抗原の検出定量が始められた 1971 年から、二重抗体法が開発されるまでの 5 年間に、酵素結合抗体法による検出について多くの検討が進められ各種のホルモンや、アレルゲンの検出をはじめウイルス、細菌、菌類、織毛虫などに及ぶ広範な動物の感染性病原の検出や、各種植物ウイルス病の診断に利用されるに至った<sup>25)</sup>。

### II 酵素結合抗体法の実際

#### 1 主要な検出手法

酵素結合抗体法による検出は、方法開発の経過と対象抗原ごとに加えられた工夫とによって、多少ずつ異なっているが検出の方式には、およそ次のようなものがある<sup>24, 25, 27)</sup>。すなわち、(1) 間接法 (indirect method)、(2) 競合法 (competitive method)、(3) 二重抗体法 (double antibody sandwich method)、(4) 抗異種グロブリン抗体法 (anti-globulin antibody method)、(5) 抗酵素抗体法 (anti-enzyme antibody method) の五つである。このいずれの方式も、用いる容器の大きさ、試料の多少によって、マイクロ法またはマクロ法と区別して取り扱われる (図参照)。

(1) 間接法: ①サンプルを試験管、またはマイクロプレートに入れ容器壁に抗原を吸着させる。次いで洗浄により容器壁に吸着された抗原のみを残す。②酵素結合抗体液を入れ、抗原と抗体を反応させる。次いで洗浄し、抗原と結合した酵素結合抗体のみを残す。③酵素基質を加える。時間の経過とともに酵素結合抗体の酵素的作用により基質が発色する。十分な発色に達した時期に酵素作用を停止させ、肉眼による発色の判定を行う。定量的測定の場合は光電比色計で測定する。

(2) 競合法: ①純化抗体溶液を入れ、容器壁に抗体を吸着させる。次いで洗浄し、壁面に吸着していない抗体を除去する。②一方の容器 (test) には酵素結合抗原液と抗原サンプルの混合液を入れ、他方の容器 (check) には酵素結合抗原液を入れる。次いで洗浄により前処理の抗体と反応して壁面に捕捉されている抗原のみを残す。③基質を添加し発色させて間接法と同様に測定するが、test と check の発色の差によってサンプルの中の抗原



(4) 抗異種グロブリン抗体法：抗家兎グロブリン山羊抗体を作り、これと酵素を結合させた酵素結合抗体を用いる。図は間接法の場合である。①抗原吸着処理、②家兎抗体処理、③酵素結合抗家兎山羊抗体での処理、④基質処理である。この方法では家兎の特異抗血清が用意されておれば、各種の抗原の検出に共通してこの酵素結合抗体を用いることができる。

家兎また山羊の抗ヒトグロブリン抗体を酵素と結合させて用いるときは、抗原の用意さえあればヒト体液中の各種の抗体の検出ができるので、医学の分野での利用が多い。

(5) 抗酵素抗体法：この方法では抗酵素抗体を用いることで、酵素と抗体を化学的に結合させた酵素結合抗体を作る必要がない。図には間接法で行う場合を示した。①抗原の吸着、②家兎抗体処理、③抗家兎グロブリン山羊抗体処理、④抗酵素家兎抗体処理、⑤酵素処理、⑥基質処理である。この方法によると処理操作が多くなるほか、幾らか精度低下の傾向があるとされているが、抗酵素抗体と抗家兎グロブリン山羊抗体とを用意しておけば、個々に酵素結合抗体を作ることなく、特異抗血清の準備だけでいろいろの抗原の検出に共通に利用できる。

以上のほか、抗原を含むサンプル液を基準抗体液と混合し、抗原と抗体を結合させた後、残余の抗体量を検出定量する阻止法 (inhibition method)<sup>27)</sup> がある。また、(1)の間接法では酵素結合抗原を、(2)の競合法では酵素結合抗体を用い、抗原と抗体を置き換えて操作すれば抗体の検出、定量が可能である。

## 2 検出のための手順

酵素結合抗体法による診断では、まず特異抗血清を作成することが必要で、そのためには、ウイルス抗原の純化、実験動物への注射、採血など高力価の抗血清を得る手段を必要とするが、ここでは、蛍光抗体法などの場合と同様であるので省略する。以下、酵素結合抗体法の実験手順に沿いながら実際の手法を述べてみる。

(1) 実験容器：セルロース、ポリアクリルアミン、ポリスチレン、ポリプロピレン、塩化ビニル、ポリエチレンなどを材質とする試験管（マクロ間接法の場合）またはマイクロプレートが使用される。特に多数のサンプルを取り扱う場合には後者を用いるほうが便利である。また、植物ウイルスの診断では後者が用いられる。

(2) 実験容器壁への抗原または抗体の吸着：容器壁に抗原または抗体を吸着させる操作は、液体中に存在する抗原または抗体を固体面に存在するものとして取り扱うようにする重要な手順である。壁面への吸着にはサ

ンプルの抗原を吸着させる場合（間接法）と、抗体グロブリンを吸着させる場合（二重抗体法、競合法）とがある。

いずれの場合も、抗体またはサンプル溶液を容器に入れ（マクロ法の場合は1 ml あて、マイクロ法では0.2 ml あて）、一定時間置くことでよい。このときの抗体またはサンプルの濃度、温度、pH、時間などの条件は検出対象により種々で、それぞれの場合ごとに最適な方法を探さねばならない。普通吸着させる材料がタンパク質の場合では1~10 µg/ml の濃度で、炭酸緩衝液 (pH 9.6) の溶液として使用する。また、吸着は比較的低温 (4°C) で行う場合と高温 (37°C) で行う場合とがあり、前者では12~18 時間、後者では3~6 時間のことが多い。

(3) 洗浄：酵素結合抗体法では前処理、資料処理及び酵素結合抗体処理それぞれの直後に洗浄を行う必要がある。洗浄は検出や定量結果に大きな影響を及ぼすので、丁寧に行わねばならない。洗浄ではまず内容を空にし、次いで、0.015M または0.02M のツィーン加用リン酸緩衝液 (PBS-Tween) を入れ、普通5分間置いてから空にする操作を3回繰り返す。場合によっては振とう洗浄を行うことがある。また、洗浄のやり方は一定の方式にそろえておくことが好ましい。

サンプルの調製：血清または体液の抗原や抗体量を測定する場合では、PBS-Tween で希釈して用いる。試料がグロブリンの場合では、0.05M 炭酸緩衝液で5~100 µg/ml 程度に希釈して用いる。しかし、植物ウイルスの診断では、植物試料の磨砕、固形物の除去などの操作が必要で、多数のサンプルを検定する場合の最も大きな障害となる。木本の場合では、磨砕汁液にポリビニルピロリドン (分子量 25,000~44,000) を加え、低速で遠沈して、その上清を更に希釈して検定に用いる場合が多い<sup>9)</sup>。また、検出限界を求める場合や基準試料との比較では幾つかの段階希釈液を用意するが、検定のみを目的とする場合は1濃度の希釈液を用いるだけでよい。

二重抗体法でのサンプル処理：植物ウイルスの検定で重要な二重抗体法でのサンプル処理<sup>9,22)</sup> は、既に述べた間接法でのサンプル処理と異なり、前処理の終わった後に行われるが、その方法は前処理の済んだマイクロプレートにサンプル溶液を1ウェル当たり0.2 ml ずつ、2反復で入れ、4~6°C で16~18 時間、または37°C で4~5 時間置く。

酵素結合抗体：抗体と結合させる酵素は安定で高い反応性を持ち、安値で入手の容易なことが必要で、パーオキシターゼ、アルカリフォスファターゼのほか、グルコースオキシダーゼ、ペーターガラクトキナーゼも試み

られているが、実際的な検出実験では前二者が用いられ、特に植物ウイルスの診断では、今のところ、アルカリフォスファターゼが用いられている。酵素と抗体との結合には、化学的に結合させる方法と抗酵素抗体を用いる方法がある。化学的結合には普通グルタルアルデヒドによる方法が用いられ、1段階法と2段階法の二つがある。前者は酵素と抗体を混合し、これにグルタルアルデヒドを加えて一定時間置き、その後透析して得られる<sup>1,9,25)</sup>。この方法で得られた結合抗体には多重結合のものを含んでいるが十分な結果の得られることが多い。2段階法<sup>2)</sup>は酵素とグルタルアルデヒドとをまず結合させて多重結合のものを除き、これを抗体グロブリンと混合することで酵素と抗体との結合物を作るもので、両者の分子比の均一なものが得られる。1段階法での抗体と酵素の混合比には種々の場合があるが、アルカリフォスファターゼの場合<sup>1,6,9,11,14)</sup>では、1:3 または 1:2 で、パーオキシダーゼの場合<sup>11,19)</sup>では、4:1 付近で良い結果が得られている。また、グルタルアルデヒド処理の濃度と時間は 1/500 で2時間、または 1/2,000, 4時間以前者の場合が多い。

酵素と結合させる抗体グロブリンは多くの場合、硫酸または硫酸ソーダ法による精製で十分であり、クロマトグラフィーによる精製ではこれに比べて非特異発色が多少とも少なくなり、使用する場合の希釈倍率を大きくしうるとされている<sup>25)</sup>。植物ウイルスの診断では後者による場合が多い。

酵素結合抗体の使用濃度及び処理時間は最適濃度試験によって決定されるが、普通抗体タンパクで 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ~ 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  付近で用いられる。処理時間をみると、短い例では 37°C で 10 分前後の場合もあるが、37°C, 2~3時間の処理とされる場合が多く、特に植物ウイルスの検出では 37°C, 3~4時間の場合がほとんどである。また、酵素結合抗体は 4°C で1年近く活性を維持している。

酵素基質: 酵素の基質には、はじめ無色で、酵素の作用により分解されると発色するものが用いられる。アルカリフォスファターゼとの結合抗体を用いる場合では、パラニトロフェノールフォスフェートが使用される。この基質は高い反応性を持っており、黄色に発色する。普通 10% ジエタノールアミン緩衝液 (pH 9.8) の 1 mg/ml の濃度として使用される。酵素の活性は 2 または 3M カセイソーダ液の添加で中止することができ、得られた発色の強さはかなりの間安定である。パーオキシダーゼとの結合抗体を用いる場合では、過酸化水素と混合したアミノサリシン酸<sup>18,19)</sup>、またはオルソフェニルジア

ミン<sup>25)</sup>が使用される。前者では基質 2.25 mg/ml の溶液 9 ml に 1 ml の 0.05% 過酸化水素液を加えて使用し、褐色に発色した後では 1%  $\text{NaN}_3$  液を添加して反応を停止させ、更に 0.05M 硫酸液で安定化させる。また後者の場合は、オレンジ色の発色となる<sup>25)</sup>。

マクロ法の場合では 1 ml 前後の基質溶液が用いられるが、マイクロプレートによる検出では 1 ウェル当たり 0.3 ml とする。

酵素基質の反応は時間と発色強度とが直線関係を示す範囲にあって、対照サンプルとの発色の差が最も明らかとなった時期に停止させる。基質添加の時間的差異が発色の誤差となることを避けるために、発色に要する時間を 30 分以上とすることが好ましい。また、発色に時間がかかり過ぎる場合も含めて、反応時間の調節は前処理での抗体濃度、サンプル溶液の希釈倍数または結合抗体の濃度を変えることで得られる<sup>25,27)</sup>。

結果の判定: 各サンプルでの発色と対照サンプルのそれとを比較しながら、肉眼により陽性か陰性かを判定する。場合によってはサンプルの希釈系列の発色を対照のそれと比較し、陽性を示す最大の希釈値を判定の基準に用いることもある。発色の強さが一定の判別水準を超えているかどうか、あるいは対照区の発色強度とサンプルのそれとの比率から陽性か否かを判断する場合、更に発色強度からサンプル中のウイルス濃度を知らうとする場合では、光電比色計による測定が必要である。パラニトロフェノールフォスフェートを基質とした場合は 405 nm, アミノサリシン酸の場合は 560 nm で測定する。

### III 植物ウイルス病の診断

酵素結合抗体法の植物ウイルス病診断への応用は、1976 年から VOLLER<sup>22)</sup> ら、CLARK ら<sup>7,8)</sup> により始められ、アラビシモザイクウイルス (AMV)、プラムポックスウイルス (PPV)、リンゴモザイクウイルス (ApMV) の検出に極めて優れた手法であることが示された。その後 CLARK ら (1977)<sup>9)</sup>、THRESH ら (1977)<sup>21)</sup> により、ホップモザイクウイルス (HMV)、ラズベリーリングスポットウイルス (RRV) などについて研究が進められ、植物ウイルスの診断における有用性とその基本的な手法が打ち立てられた。また、1977 年のイギリスでの関係者の会議では、パレイショウイルス Y、ソラマメモザイクウイルス、タバコリングスポットウイルス、トマトブラックリングウイルス、タバコラットルウイルス、スイセンモザイクウイルスなど多くの植物ウイルスについて、本法による検出が報じられたとされている<sup>25)</sup>。その後、1978 年にはキュウリモザイクウイルス (CMV)<sup>13)</sup>、パレ

イシヨ葉巻病<sup>17)</sup>及びカンキツのスパイロプラズマの検出、プルナスリングスポットウイルスの血清学的系統の診断について<sup>3)</sup>、1979年にはキクBウイルス<sup>18)</sup>、グラジオラスのピーンイエローモザイクウイルスとCMV<sup>20)</sup>、カンキツのトリステザウイルス(CTV)の検出<sup>4)</sup>について報告されており、また、国内でも、後述するように、カンキツの温州萎縮病(SDV)とカンキツモザイク病(CiMV)についての検定が試みられるに至った。このように、酵素結合抗体法の植物ウイルス病診断への利用は、ここ数年のうちに急速に進められている。

植物ウイルス病の診断は、マイクロプレートを用いる二重抗体法で行われる。

酵素結合抗体法による植物ウイルスの検出感度は極めて高く、純化ウイルスを用いた場合で最高1~数ng/ml<sup>9,22)</sup>、動物抗原の検出における感度と同じである。また、草本植物組織からのウイルスの検出について、タバコ材料中のPPVとHMVの検出実験をみると、前者の場合で $10^6$ 倍、後者で $5 \times 10^4$ 倍の希釈汁液<sup>9)</sup>まで検出が行われている。また、このように著しい場合でなくても、 $10^3 \sim 10^4$ 倍程度の希釈汁液まで検出される場合が少なくない<sup>9,22)</sup>。検出精度に及ぼす植物汁液の影響については、純化したAMV及びPPV溶液にキュウリ及びタバコの汁液を加えた場合について検討されているが、発色強度、検出精度ともほとんど変わっていない。

しかし、木本植物の汁液ではウイルスによる反応が弱まり、非特異反応が高くなる場合がある。CLARKら(1977)<sup>9)</sup>は、AMVにかかったスグリの芽の磨砕汁液で、10倍希釈のときでは反応が阻害され、100倍希釈では阻害されないこと、盛夏期に採集したモモの葉の磨砕汁液や、幾つかの木本植物の葉の磨砕汁液がしばしば強い非特異反応を示したと述べている。また、このような非特異反応は、磨砕汁液にポリビニルピロリドンを添加することで改善され、モモの葉の磨砕汁液の場合、多少の検出感度の低下はあるが全生育期を通じて検定可能となると報じている。また、非特異反応による発色を少なくするために使われる牛血清アルブミンの汁液への添加も<sup>27)</sup>、植物ウイルスの検出では効果をあげていない<sup>9)</sup>。

酵素結合抗体法と他の検出法との検出感度をPPVの検出限界濃度と比較すると、酵素結合抗体法は、拡散法の1,000倍、沈降法の500倍、電顕法の100倍、平均1病斑を判定基準とする接種検定法の100倍となっている<sup>9)</sup>。このほか酵素結合抗体法が高い検出能力を示すことは、ポップ葉の磨砕汁液を用いたネクロティックリングスポットウイルス(NRSV)の検出実験で、キュウ

リ葉への接種検定では汁液の125倍の希釈まで、酵素結合抗体法では汁液の2,000倍の希釈まで検出できたことにもみることができる。このほか、CMVでは植物汁液のみならず媒介アブラムシでも検出される<sup>13)</sup>など、酵素結合抗体法による検定では多くのウイルスが高い精度で検出されている。

他方、酵素結合抗体法に備わる定量性は、植物体内におけるウイルス濃度の季節的推移や植物の部位別濃度の測定を可能にする<sup>4,8,16,20)</sup>。PPVについてはモモの花におけるウイルスが調べられ、萼と雄しべに多いことが示されている<sup>9)</sup>。また、ポップのAMVでは5月に採集すると生長している部分に最も多く、次いで葉、茎の順であるが7月になると病徴のある旧葉に最も多く、次いで病徴のない葉であり、若い葉や先端部分では少ないことが述べられている。

酵素結合抗体法による診断で、血清反応の点で無関係な他のウイルスをサンプル汁液に添加しても全く検出に影響しないこと<sup>22)</sup>や、重複感染している植物での検定では、抗体グロブリンと酵素結合抗体を替えるだけで、含まれているそれぞれのウイルス検定の可能なことが示されている<sup>20,21)</sup>。このことは、重複感染した多数のサンプルを取り扱うことの多いほ場での、ウイルス病の発生実態調査や無毒母樹、無毒種苗の監視検定において最も労力を要する磨砕汁液を一度作りさえすれば、容易に幾つものウイルス病について診断を行いうることになるので極めて有用である。

更に、ウイルスの系統や近縁ウイルスの診断については、それらの間に血清反応がないか弱い場合は区別して診断できる<sup>3,15)</sup>。他方、血清反応で相互に区別できない系統や近縁関係にあるウイルスでは、酵素結合抗体法でも区別できない場合が多いと思われる。しかし、中には区別のできる場合や発色強度の差異として現れる場合もある<sup>3,24)</sup>。したがって、系統や近縁ウイルスの診断に本法を用いる場合は今後増加していくと考えられるが、その成否は特異抗原と特異抗体をどのように準備できるかにかかっているように思われる。

また、ほ場調査では、酵素結合抗体法の検出感度の高いことを利用して、個々の植物について検定するかわりに幾つかのサンプルを一括して検定することが可能<sup>9)</sup>で、特に種苗の検査では検査効率の向上が期待されている。

#### IV カンキツモザイク病(CiMV)対策における応用

以上、酵素結合抗体法による植物ウイルスの診断法

と診断上の特性について述べたが、今日既に国内では CiMV (トラミカン) の防除対策の重要な柱として酵素結合抗体法による母樹、苗木及び穂木の保毒検定が緊急に進められようとしている。

極早生ウンシュウの宮本早生は、品種更新におけるきわめて重要な系統の一つとして各産地に急速に取り入れられつつある。しかし、この宮本早生はその発見地が CiMV の既発生地近くであったことから、その一部が CiMV に汚染し、保毒苗を混ぜたまま国内の全産地に分散してしまうことになった。このウイルスは商品となる果実にモザイク症状を現すほか、土壤伝染性で徐々に拡がり、跡地がカンキツ園として使えず、そのうえ、土壤処理による防除法が明らかになっていないことなどから、このウイルスの産地への侵入、分散は国内カンキツ産地の荒廃につながる危機をはらんでいる。ここ1~2年の間に、各産地に苗木、穂木として導入されたものの数は10数万本に及んでいると言われ、それらは既に個々の農家で植栽または高接ぎされているものもあるが、かなりのものは生産者団体などで一括して隔離され、検定後植え付けられることになっている。それらの苗について、1979年から、各県では関係者によるゴマ検定が精力的に実施された。その結果、CiMVのゴマによる検定精度は検定条件に細心の注意を持ってしても決して高いものとは言えず、また、多数(1,000本以上)の苗を検定することは労力、設備、所要日数の面で容易でないことが判明した。しかし、他方では、各産地に導入され、隔離されている苗木はもとより農家に分散している苗木や高接ぎ樹もできるだけ早急に検定し、保毒のものを除去し、以降の伝染を防止しなければならない。1年遅れれば、その間に増えた苗木や高接ぎ樹の検定負担が増大し、その中に含まれる保毒苗での産地の土壤汚染も更に拡大する。このような事情の下で、果樹試験場口之津支場では、SDV 抗血清が CiMV にも共通に反応することから、ウイルス研究所より SDV 抗血清の分譲を受け、アルカリフォスファターゼを用いて、酵素結合抗体を作り、SDV 及び CiMV の二重抗体法による検出実験を行った。ここではその手順や実験ごとの結果は省略するが、およそ次のような結果が得られた。①各産地に導入されている苗木、母樹や高接ぎ樹の約400点について検定したが、各地苗木での保毒率は一般に高く70~80%に及ぶ場合があった。しかし、検定した限りでは、母樹の保毒はみられなかった。高接ぎ樹の場合は1か所のは場を除いて、無検出のは場はなかった。②SDV、CiMVともに新芽での検出が最も容易であった。SDV 罹病樹の芽の磨砕汁ではサンプル重の1,000

倍希釈まで、CiMV 保毒苗の芽では100倍希釈まで検出が可能であった。CiMV の検出はSDVのそれに比べて劣り、発色の程度も弱かった。③また、SDV、CiMV いずれの場合も硬化葉では検出されない場合が多かった。しかし、SDV 罹病樹の半硬化葉では検出が可能であった。④SDV、CiMV いずれの場合も盛夏期に発生した芽からの検出も可能であった。⑤SDV 罹病樹の果実では果皮から検出されたが、CiMV 発病果実では病斑部分のみで検出された。⑥ゴマ検定で保毒と判定された苗木はすべて本法でも陽性であった。更に、3回のゴマ検定で検出されなかった苗からも本法で検出されるものがあった。⑦ゴマ検定で病徴を示したゴマ苗の磨砕汁液では10<sup>4</sup>倍の希釈まで検出できた。

以上のように、酵素結合抗体法によって、SDV については極めて高い感度で、CiMV についてもゴマ検定よりも正確に、そしてはるかに容易に保毒検定を行うことが分かった。しかし、酵素結合抗体法による CiMV 検定については、現在の SDV 抗血清を用いる代わりに CiMV の抗血清を使った場合の検出の感度や安定性についての検討をはじめ、検定操作の細部について幾多の改善すべき点が残されている。それにもかかわらず、前述したような、一日も早い苗木の植え付けや高接ぎが必要であるという生産場面からの強い要請にこたえて、可能な限り早期に無毒苗、無毒穂木を供給するという実際上の課題を解決するために、宮本早生の CiMV の検定に酵素結合抗体法が適用されることになった。カンキツ生産各県では早急に、検定のための機械、器具の準備と検定に必要な血清の確保と検定手法の習得についての準備が進められている。宮本早生の検定を必要とする20県のうち5県では、既に1979年の秋芽が低温(-50°C以下)で貯蔵されており、1980年4月の萌芽を待たず、3月までの冬期間に第1回の検定を行う計画である。

差し当たって、1980年4月の段階までに必要な血清については、調査研究用として果樹試験場で準備中であるが、今後の現地における検定と調査のためには、早急に血清の供給体制が確立されなければならない。

## む す び

以上、酵素結合抗体法の概略と、それによる植物ウイルスの診断方法、精度及び実際上での応用について述べたが、診断を実施する立場からみると、この方法は多数のサンプルを取り扱うのに適しており、操作が簡単で信頼性が高い。また、サンプル量は0.2g前後と比較的少なくよく、植物の粗汁液を使うことで高い感度で

の診断が迅速に行える。また、形態や性質の異なる種々のウイルス病の診断が可能である。更に、検定植物による検定では、検出できない季節や部位での検定がしばしば可能であるばかりでなく、検定植物を育成するためのガラス室や検定期間での温度制御を必要としないなど、設備、経費、労力の面でも極めて優れた診断法と思われる。

更に、酵素結合抗体法による診断は、野外でのウイルス感染の実態の調査、土壌伝染、虫媒伝染などを含めた伝染機構の解明、潜伏感染を含めた寄主植物の調査、ウイルスの植物体内濃度と品種間差異や環境条件との関係の解明など、ウイルス病の生態研究面で大きな役割が期待される。また、母樹や種苗の無毒化、無毒母樹、無毒種苗の探索と維持供給における保毒検定、特にウイルス濃度が低く、草本の検定植物がないため接木検定によらねばならず、更に病徴の発現に数年を要するという場合が少なくない永年作物のウイルス検定に役立つものと思われる。

また、新しいウイルスの国内への侵入阻止のための検査、撲滅計画を実施する場合の検査、弱毒ウイルスの探索と利用場面でのウイルス濃度の監視などにも重要な役割を果たすと思われる。これらのほか、薬剤処理による伝染防止法、耕種的防除法、抗ウイルス剤の開発場面でも利用価値は高いであろう。このように酵素結合抗体法は、これからの植物ウイルスの生態と防除の研究場面と実際の防除推進の両面で極めて重要な診断法になるとされる。

引用文献

1) AVRAMEAS, S. (1969) : *Immunochemistry* 6 : 43~52.  
 2) ——— (1971) : *ibid.* 8 : 1175~1179.  
 3) BARBARA, D. J. (1978) : *Ann. Appl. Biol.* 90 (3) : 395~399.  
 4) BAR-JOSEPH, M. et al. (1979) : *Phytopathology* 69 : 190~194.  
 5) BARTLETT, A. et al. (1976) : *Brit. Med. J.* 1 : 994~996.

6) CARLSSON, H. E. et al. (1972) : *Infection and Immunity* 6 (5) : 703~708.  
 7) CLARK, M. F. et al. (1976) : *Acta. Horticulturae* No. 67 : 43~49.  
 8) ——— et al. (1976) : *ibid.* No. 67 : 51~57.  
 9) ——— et al. (1977) : *Jour. General virology* 34 : 475~483.  
 10) ——— et al. (1978) : *Phytopath. Zeitschrift* 92 (4) : 332~337.  
 11) ENGVALL, E. et al. (1971) : *Immunochemistry* 8 : 871~874.  
 12) ——— et al. (1972) : *Jour. Immunology* 109 : 129~135.  
 13) GERA, A. et al. (1978) : *Virology* 86 (2) : 542~545.  
 14) HOLMGREN, J. et al. (1973) : *Infection and Immunity* 7 (5) : 759~763.  
 15) KOENIG, R. (1978) : *Jour. General Virology* 40 (2) : 309~318.  
 16) ——— (1979) : *Plant Disease Reporter* 63 : 301~303.  
 17) MAAT, D. Z. et al. (1978) : *Netherland Jour. Plant. Pathology* 84 (4) : 149~156.  
 18) SAUNDERS, G. C. et al. (1976) : *Jour. Clin. Microbiol.* 3 : 604~608.  
 19) ——— (1977) : *Amer. J. Vet. Res.* 38(1) : 21~25.  
 20) STAIN, A. et al. (1979) : *Plant Disease reporter* 63 (3) : 185~188.  
 21) THRESH, J. M. et al. (1977) : *Ann. Appl. Biol.* 87 (1) : 57~65.  
 22) VOLLER, A. et al. (1976) : *Jour. General Virology* 33 : 165~167.  
 23) ——— et al. (1974) : *Bull. Wld. Hlth. Org.* 51 : 209~211.  
 24) ——— et al. (1976) : *ibid.* 53 : 55~65.  
 25) ——— et al. (1977) : *Nuffield Institute of Comparative Medicine, The Zoological Society of London.* 48 pp.  
 26) WOLTERS, F. et al. (1975) : *Hepatitis Scientific Memoranda* H 908 : 1.  
 27) World Health Organization (1976) : *Bull. Wld. Hlth. Org.* 54 : 129~139.

次号予告

次4月号は下記原稿を掲載する予定です。

昭和55年度植物防疫予算の概要	栗田 年代
植物防疫研究課題の概要	松本 省平
農業が環境に与える影響の評価	石倉 秀次
ピーマン黄化えそ病の発生	米山 伸吾
新害虫チビクロバネキノコバエの生態と防除	中込 暉雄

静岡県におけるジャガイモそうか病、粉状そうか病	
対策の現状	牧野 孝宏
さび病菌の人工培養	安藤 勝彦
植物防疫基礎講座	
土壌伝染性病原糸状菌の分離	渡辺 恒雄
ヒメエグリバの人工飼育法	岩淵喜久男

定期購読者以外の申込みは至急前金で本会へ  
 1部 400円 送料 29円



## 新刊紹介

### 「節足動物の生物学」

K. U. クラーク著 北村実彬・高藤晃雄 共訳

定価 2500 円

A 5 版 246 ページ

培風館 発行

本書は 1973 年に出版された“The Biology of Arthropoda” (第3版) の完訳である。形態学の本は、とかく各器官の難解な名称を記憶することに追いまわされ、途中で読むのに嫌気がさして遂には投げ出した経験を持っている人が多いのではなかろうか。本書は各器官の持っている構造と機能を基本的にしっかり把握、これがどのように進化し、生活型の中にとけこませて行ったかを明快に述べており、終わりまで読み続けさせる。動物界の中で現在最も繁栄している節足動物を例にとって、これらのことを理解させるために「多くの教科書に書かれたものとはかなり異ったアプローチの仕方」(本文) をとっているからであり、このことが生理・生化学(北村)、生態学(高藤)を専攻する2人が訳出を行った所以であろう。

1章 はじめに、2章 節足動物の(以下略)細胞、3章 組織、4章 器官、5章 系、6章 体制と総合化、7章 生活型、8章 制御機構、9章 進化、10章 生活様式への適応、11章 節足動物の体制の性質、特徴および表現法となっている。

各章の表題にも見られるとおり、機能とそれの基幹となっている形態とを一体として把握、進化的に生物としての可能性や限界や、多様性を理解させるように記述されている。したがって生理学書を読んでいるようでもあり、生態学書を読んでいるような気がしているうちに、いつの間にか形態学へと引きずり込まれている自分に気が付く。もう一つの特徴は、生活史や体制の性質・特徴などを基本的に幾つかに区分けして、記号論理的な思考を読者にすすめていることである。この本に述べていることに反対であれば、またもっと良い考えがあれば、いくらでも読者自身の体系をお考え下さいという点が、本書の初版からかなりの年数を経ているのに、一向古さを感じさせない所以でもあろう。

生理学・生態学を学ぶ人達が形態学を理解するには得難い本であるし、逆に分類学を志している人達にも是非一読をおすすめしたい。

なお、訳出はかなり気をつけて読み易く書かれ、また、巻末の索引は非常に凝っていて、至極便利である。

(湯嶋 健)

### 本会発行図書

## 野そ防除必携

野鼠防除対策委員会 編

A 5 判 104 ページ 900 円 送料 120 円

野そ防除に関する事項を1冊にとりまとめた講習会のテキストなどに好適な書。

### 内容目次

- 第1章防除 野そとは、防除の目的と手順、防除計画
- 第2章そ害発生調査 そ害の実態調査、そ害発生環境調査、生息調査
- 第3章駆除 殺そ駆除法、環境駆除法、忌避駆除法、駆除時期、効果判定、駆除が失敗する原因
- 第4章そ害の発生防止 そ害発生防止の手段、ネズミの減少率と復元期間
- 参考資料 野その種類と習性、ネズミの一生、ネズミの感覚、ネズミの鑑定標本とその用語、ネズミの生息数推定法、発生予察、省力試験の実例、最近の被害例、殺そ剤小史、殺そ剤のイタチに対する二次毒性試験成績、野鼠防除対策委員会、主要参考文献

お申込みは前金(現金・振替・小為替)で本会へ

新しく登録された農薬 (54.12.1~12.31)

掲載は、種類名、有効成分及び含有量、商品名、登録番号(登録業者(社)名)、対象作物：病害虫：使用時期及び回数などの順。ただし、除草剤は、適用雑草：適用地帯も記載。(…日…回は、収穫何日前まで何回以内散布の略)(登録番号 14212~14250 まで、39 件)

なお、アンダーラインのついた種類名は新規のもの。

『殺虫剤』

イソキサチオン・メソミル水和剤

イソキサチオン 30%, メソミル 15%

ホスクリン

14223 (三共)

キャベツ：アブラムシ類・アオムシ・コナガ・ヨトウムシ：21 日 2 回、はくさい、だいこん：アブラムシ類・アオムシ・コナガ・ヨトウムシ：30 日 2 回、茶(覆下栽培を除く)：チャノコカクモンハマキ・チャノホソガ・チャハマキ・チャノミドリヒメヨコバイ・ヨモギエダシヤク(若令幼虫)：14 日 1 回

クロルプロピレート・テトラジホン乳剤

クロルプロピレート 15%, テトラジホン 6%

ブデン乳剤

14224 (兼商化学工業)

りんご：リンゴハダニ・ナミハダニ：30 日 2 回

DDVP・BCPE くん煙剤

DDVP 15%, BCPE 20%

クイックロン VP ジェット

14243 (新富士化成業), 14244 (日本曹達)

温室・ビニールハウスなど密閉できる場所

ぶどう、いちご：ハダニ類：7 日 2 回、カーネーション：ハダニ類

『殺菌剤』

イプロジオン水和剤

イプロジオン 50%

ロブラール水和剤

14212 (ローヌ・プーラン ジャパン), 14213 (日産化学工業), 14214 (八洲化学工業), 14215 (武田薬品工業)

ぶどう：灰色かび病・黒とう病：60 日 3 回、おうとう：灰星病：7 日 3 回、りんご：斑点落葉病：14 日 5 回、なし：黒斑病：14 日 5 回、もも：灰星病：7 日 3 回、レタス：灰色かび病・菌核病：14 日 3 回、トマト：灰色かび病・斑点病・輪紋病：前日 4 回、ピーマン：灰色かび病・菌核病：前日 4 回、かぼちゃ：灰色かび病：前日 4 回、きゅうり、なす：灰色かび病・菌核病：前日 4 回、たまねぎ：灰色かび病・灰色腐敗病：7 日 3 回、稲：ごま葉枯病：30 日 3 回、だいず、あずき：菌核病：21 日 3 回、いんげんまめ：灰色かび病・菌核病：21 日 3 回、芝：ブラウンパッチ

イソプロチオラン粒剤

イソプロチオラン 12%

フジワン粒剤

14218 (八洲化学工業), 14219 (三笠化学工業)

稲：いもち病：葉いもちに対しては初発 7~10 日前、穂いもちに対しては出穂 10~30 日前 3 回；育苗箱使用の場合：苗の緑化期から移植直前まで 3 回、小粒菌核

病：出穂 10~30 日 3 回

イソプロチオラン乳剤

イソプロチオラン 40%

フジワン乳剤

14220 (八洲化学工業), 14221 (三笠化学工業)

稲：いもち病：14 日 3 回

フサライド・カスガマイシン・バリダマイシン水和剤

フサライド 15%, カスガマイシン-塩酸塩 1.4% (カスガマイシンとして 1.2%), バリダマイシン A 4.0%  
カスラブバリダゾル

14225 (北興化学工業), 14226 (武田薬品工業)

稲：いもち病・紋枯病：21 日 5 回・ただし穂ばらみ期以降は 4 回以内

銅水和剤

無水硫酸銅 47.5% (銅として 19%), 無水炭酸ナトリウム 38%

ガンデー

14227 (兼商化学)

茶：炭そ病：25 日

チオファネートメチル水和剤

チオファネートメチル 40%

トップジン M ゾル

14228 (日本曹達), 14229 (クミアイ化学工業), 14230

(北興化学工業), 14231 (八洲化学工業), 14232 (三笠化学工業)

稲：いもち病：14 日 3 回、みかん：そうか病：前日 7 回、もも：灰星病：前日、ぶどう：黒とう病：14 日 3 回

キノキサリン系粉剤

キノキサリン系 10%

モレスタン FD 10

14233 (三笠化学工業), 14234 (クミアイ化学工業),

14235 (八洲化学工業), 14236 (日本特殊農薬製造)

温室・ハウス等 きゅうり：うどんこ病：前日 10 回

チオファネートメチル粉剤

チオファネートメチル 30%

トップジン M・FD

14237 (クミアイ化学工業), 14238 (北興化学工業),

14239 (八洲化学工業), 14240 (三笠化学工業), 14241 (日本曹達)

温室・ハウス等 トマト：灰色かび病：前日

TPN 粉剤

TPN 30%

ダコニール FD

14242 (クミアイ化学工業)

温室・ハウス等 トマト：はかび病：14 日 2 回

銅粉剤

塩基性塩化銅 67.3% (銅として 40%)

ドイツボルドー FD  
14245 (北興化学工業)  
温室・ハウス等 きゅうり, トマト

## 『除草剤』

## DBN 除草剤

DBN 6.7%

カソロン粒剤 6.7

14216 (北興化学工業), 14217 (兼商化学工業)

りんご, みかん, 柿: 一年生雑草・ギシギシ・ヨモギ・  
タンポポ・ヤブガラシ等の多年生広葉雑草, なし, も  
も, ぶどう: ギシギシ・ヨモギ・タンポポ・ヤブガラ  
シ等の多年生広葉雑草, 桑: 一年生雑草, 牧野草地:  
いね科雑草・まめ科雑草・ギシギシ・ヨモギ・ヤブガ  
ラシ, 休耕田: ノビエ・その他水田一年生雑草及びマ  
ツバイ

## アトラジン除草剤

アトラジン 40%

ゲサプリムフロアブル

14222 (日本チバガイギー)

とうもろこし: 畑作一年生雑草

## オキサジアゾン除草剤

オキサジアゾン 12%

ロンスター乳剤

14246 (昭和ローディア化学)

水稲: ノビエその他水田一年生雑草及びマツバイ

オキサジアゾン 50%

ロンスター水和剤 50

14247 (昭和ローディア化学)

水稲(乾田直播): ノビエ・メヒシバ・カヤツリグサ・タ

デなどの一年生雑草及びマツバイ, 陸稲, 落花生: メ

ヒシバ・タデ・シロザなどの畑作一年生雑草, 桑: メヒ

シバ・アカザ・スベリヒユなどの畑作一年生雑草

オキサジアゾン 8%

ロンスター粉剤 8

14248 (昭和ローディア化学)

普通移植水稲: ノビエその他水田一年生雑草及びマツバ

イ

オキサジアゾン 2%

ロンスター粒剤 2

14249 (昭和ローディア化学)

水稲: ノビエ・その他水田一年生雑草及びマツバイ

オキサジアゾン 4%

ロンスター粒剤 4

14250 (昭和ローディア化学)

水稲: ノビエその他の水田一年生雑草及びマツバイ

## 新しく登録された農薬 (55.1.1~1.31)

掲載は, 種類名, 有効成分及び含有量, 商品名, 登録番号(登録業者(社)名), 対象作物: 病害虫: 使用時期及  
び回数などの順。(…日…回は, 収穫何日前まで何回以内散布の略)(登録番号 14251~14255, 計5件)

## 『殺菌剤』

フェナジンオキシド水和剤

フェナジンオキシド 20%

フェナジン水和剤 20

14253 (サンケイ化学), 14254 (日本農薬), 14255 (ク

ミアイ化学工業)

稲: 白葉枯病: 21 日5回

トマトラン液剤

14251 (塩野義製薬)

トマト: 着果増進・果実の肥大促進: 1花房につき1

回, なす: 着果増進・果実の肥大促進: 1花房につき

1回

## 『農薬肥料』

ピリダフェンチオン複合肥料

ピリダフェンチオン 0.5%

オフナック苦土入り複合硫加燐安 S121

14252 (三井東圧化学)

たまねぎ: タマネギバエ: 定植時5回

## 『植物成長調整剤』

## 植物成長調整剤

4-クロル-2-ヒドロキシメチルフェノキシ酢酸ナトリウ

ム 9.8%

## ○編集部より

本年初めての特集号をお届けします。「ウイルス病の抗  
血清診断」と題し, 7題の論文を併録してあります。「植

物ウイルス病の抗血清診断法の普及のために」を巻頭  
に, 寒天ゲル内拡散法, 免疫電子顕微鏡法等, 種々の診  
断法を解説しております。

## 植物防疫

第34巻 昭和55年3月25日印刷

第3号 昭和55年3月29日発行

実費450円 送料29円

1か年5,000円  
(送料共概算)

昭和55年

3月号

(毎月1回30日発行)

編集人 植物防疫編集委員会

発行人 遠藤武雄

印刷所 株式会社 双文社印刷所

東京都板橋区熊野町13-11

—発行所—

東京都豊島区駒込1丁目43番11号 郵便番号 170

社団法人 日本植物防疫協会

電話 東京(03)944-1561~4番

振替 東京 1-177867番

—禁転載—

# 増収を約束する 日曹の農薬

## 殺菌剤

**トップジンM** 水和剤

**トリアジン** 水和剤

**ホーマイ** 水和剤

**アタッキン** 水和剤

**ラビライト** 水和剤

**日曹プラントボックス** 水和剤

## 殺虫剤

**ホスピット75** 乳剤

**ガードサイド** 水和剤

## 殺ダニ剤

**シトラゾン** 乳剤

**クイックロン** 水和剤

**マイトラン** 水和剤

**ダニマイト** 水和剤

**ピロダン** 乳剤

## 植物成長調整剤

**ビーナイン** 水溶剤80

## くん煙剤

**ジェットVP**

**トリアジンジェット**

## 展着剤

**ラビデンSS**



**日本曹達株式会社**

本社：東京都千代田区大手町2-2-1 〒100

支店：大阪市東区北浜2-90 〒541

営業所：札幌・仙台・信越・高岡・名古屋・福岡

本会発行新刊図書

## 茶樹の害虫

南川仁博・刑部 勝 共著

5,000円 送料400円

A5判 口絵カラー写真4ページ、本文322ページ 上製本 箱入り

第1編の総論で茶樹の害虫とその被害・防除上の諸問題を、第2編の各論で茶樹につく108の害虫について形態・経過習性・防除法・天敵を、第3編の農薬概説で分類・使用の歴史・殺虫剤の特性と効果・安全使用基準を解説し、巻末に動物和名・学名・薬剤名・病菌名・事項名より引ける索引を付した解説書

### 内容目次

#### 第1編 総論

- 1 茶樹の害虫とその被害
- 2 茶樹害虫防除上の諸問題

#### 第2編 各論

- 1 クダマキモドキ
- 2 ヤマトシロアリ
- 3 アザミウマ類
- 4 カメムシ類
- 5 ヨコバイ類
- 6 アオバハゴロモ
- 7 ヤマモモコナジラミ
- 8 コミカンアブラムシ
- 9 カイガラムシ類
- 10 コウモリガ
- 11 ハマキガ類

- 12 チャノホソガ
- 13 メイガ類
- 14 アミメマドガ
- 15 イラガ類
- 16 ゴマフボクトウ
- 17 ミノガ類
- 18 シヤクガ類
- 19 ドクガ類
- 20 ヤガ類
- 21 ヒトリガ類
- 22 マダラカサハラハムシ
- 23 キクイムシ類
- 24 コガネムシ類
- 25 バラハキリバチ
- 26 チャノハモグリバエ

- 27 ダニ類
- 28 土壌線虫類
- 29 沖縄の茶樹害虫
- 30 台湾産茶樹害虫目録

#### 第3編 農薬概説

- 1 農薬の分類
- 2 茶樹に対する農薬使用の歴史
- 3 殺虫剤の特性と茶樹害虫に対する効果
- 4 殺虫剤の一般名と商品名ならびに茶用農薬の使用制限事項(安全使用基準)

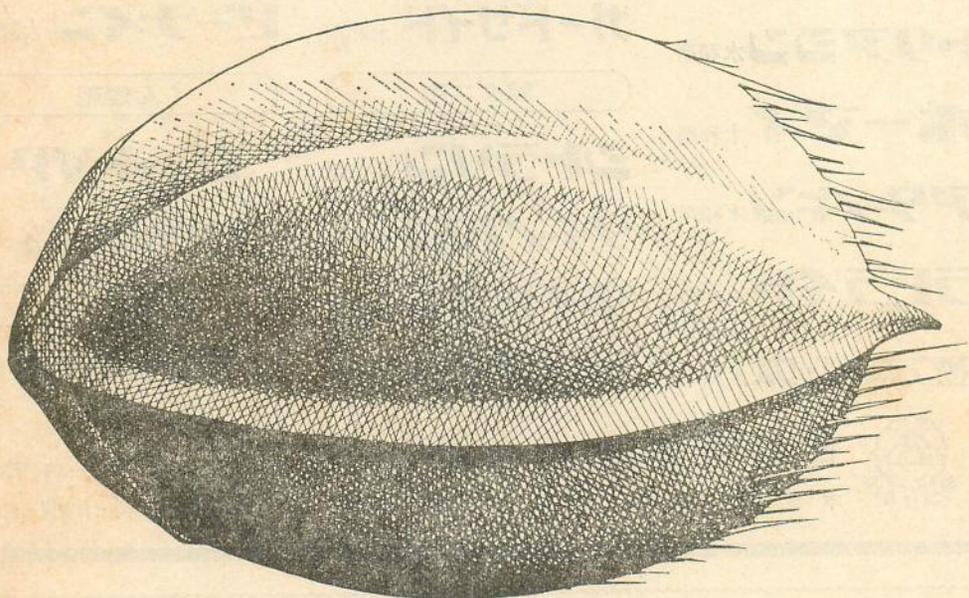
#### 索引

お申込みは前金(現金・振替・小為替)で本会へ



フジワンのシンボルマークです

やらなければならない、いもち防除。  
やるからには、確実に…。



# いもちに勝つ長い効果

- 散布適期巾が広く、散布にゆとりがもてます。
- 効果が長期間(約50日)持続します。
- 粉剤2~3回分に相当する効果を発揮します。
- 育苗箱施薬により葉いもちが防げます。
- イネや他の作物に薬害を起こす心配がありません。
- 人畜、魚介類に高い安全性があります。

## フジワン<sup>®</sup>粒剤

®は日本農薬の登録商標です

予防と治療のダブル効果

## フジワン<sup>®</sup>乳剤・粉剤

●他の作物に薬害を起こす心配がありません。

### フジワンスミチオン粉剤

### フジワンND粉剤

### フジワンダイアジノン粒剤



日本農薬株式会社

〒103 東京都中央区日本橋1-2-5 栄太楼ビル

資料請求券

フジワン

植物防疫

北條良夫・星川清親 共編

# 作物—その形態と機能—

## 上 巻

A 5 判 上製箱入 定価 3,200円 千 200円

—主 内 容—

第1編 作物の種子／第1章 作物の受精と胚発生（星川清親） 第2章 種子の発芽（高橋成人） 第3章 種子の休眠（太田保夫）

第2編 作物の花成／第1章 作物の播性と品種生態（川口敦美） 第2章 春化現象（中條博良） 第3章 作物における花成現象（菅 洋） 第4章 野菜の抽薹現象（鈴木芳夫）

第3編 作物の栄養体とその形成／第1章 作物の葉（長南信雄） 第2章 作物の茎（長南信雄） 第3章 作物の根（田中典幸） 第4章 作物におけるエージング（折谷隆志）

第4編 作物の生産過程—その1—／第1章 光合成と物質生産（梶 和一） 第2章  $C_3$ 、 $C_4$  植物と光呼吸（秋田重誠） 第3章 光合成産物の転流（山本友英） 第4章 光合成産物の供与と受容（北條良夫） 第5章 草姿、草型と光合成産物の配分（小野信一）

## 下 巻

A 5 判 上製箱入 定価 2,700円 千 200円

—主 内 容—

第5編 作物の生産過程—その2—／第1章 サツマイモ塊茎の肥大（国分楨二） 第2章 牧草の物質生産（梶和一） 第3章 葉菜類の結球現象（加藤 徹） 第4章 果樹の接木不親和性（仁藤伸昌）

第6編 作物の登熟／第1章 マメ類の登熟（昆野昭長） 第2章 穀粒の登熟（星川清親） 第3章 穀粒の品質（平 安和） 第4章 登熟と多収性（松崎昭夫）

第7編 作物の生育と障害／第1章 作物の倒伏と強稈性（北條良夫） 第2章 作物の倒伏と根（宮坂 昭） 第3章 イネの冷害（佐竹徹夫） 第4章 作物の大気汚染障害（白鳥孝治）

〈お申込みは最寄りの書店、または直接本会へ〉

東京都北区西ヶ原 1 丁目 26 番 3 号 農 業 技 術 協 会 振替 東京 8 - 176531 千114 TEL (910) 3787



は信頼のマーク



予防に優る防除なし  
果樹・そ菜病害防除の基幹薬剤

**キノドール**<sup>®</sup> 水和剤  
40

殺虫・殺ダニ 1剤で数種の剤  
の効力を併せ持つ

**トーラック** 乳 剤

宿根草の省力防除に  
好評！粒状除草剤

**カソロン** 粒 剤  
6.7

人畜・作物・天敵・魚に安全  
理想のダニ剤

**デデオン** 乳 剤  
水和剤

兼商株式会社

東京都千代田区丸の内 2 - 4 - 1

展着剤はグラミンS・泡のたたないグラミンS・展着剤はグラミンS・泡のたたないグラミンS・展着剤はグラミンS

展着剤はグラミンS・泡のたたないグラミンS・展着剤はグラミンS・泡のたたないグラミンS・展着剤はグラミンS・泡のたたないグラミンS

# 苗半作から七分作へ…育苗には欠かせない!

\* 安定した健苗育成に

## タチガレン<sup>®</sup> 液剤 粉剤

- ◎ いつでも、どこでも安定した効果が得られます。
- ◎ 立枯病や立枯性腐敗を適確に防ぎます。
- ◎ 健苗が得られます。
- ◎ 移植後の生育が良くなります。
- ◎ 安全で使いやすい薬剤です。

稲にも適用拡大(粉剤) イネミズ・メイチュウ・ドロオイ

\* ドリン剤に替る土壌殺虫剤

ネキリ、タネバエ、コオロギ、ケラ、ダンコムシに

### カルホス<sup>®</sup> 粉剤 微粒剤F

\* アオムシ、コナガなどそしゃく害虫に

### カルホス<sup>®</sup> 乳剤

適用拡大(レタス・かんしょ・ばれいしょ・もも)

\* 野菜のコナガ、ヨトウ、ウワバ、アブラムシなど  
広範囲の害虫に効きめが鋭い!!

### ホスパー<sup>®</sup> 乳剤

\* 三共のボルドウ再登場!  
斑点細菌病に薬害の少ない銅剤

### 三共<sup>®</sup> オキシボルドウ



### 三共株式会社

農業営業部 東京都中央区銀座2-7-12  
支店 東京・仙台・名古屋・大阪・広島・高松

北海三共株式会社  
九州三共株式会社

展着剤はグラミンS・泡のたたないグラミンS・展着剤はグラミンS・泡のたたないグラミンS・展着剤はグラミンS・泡のたたないグラミンS・展着剤はグラミンS

昭和五十五年 三月二十五日 印刷  
昭和五十五年 三月三十日 発行  
昭和五十四年 九月九日 第三十四卷第三号  
植物防疫 第三十四卷第三号  
郵便物 認可

# ゆたかな実り = 明治の農薬

サツとひとまき

## いもち病に! オリゼメート粒剤

強い力がなが〜くつづく

野菜・かんきつ・ももの細菌性病害防除に **アグレプト** 水和剤・液剤

イネしらはがれ病防除に **フェナジン** 水和剤・粉剤

デラウェアの種なしと熟期促進に **ジベレリン明治**  
野菜の成長促進・早出しに



明治製薬株式会社

東京都中央区京橋2-4-16

実費 四五〇円 (送料 二九円)