

# RIPA 法による植物ウイルスの簡易迅速診断

山口大学農学部生物資源科学科 <sup>かめ</sup> 亀 <sup>や</sup> 谷 <sup>みつ</sup> 満 <sup>ろう</sup> 朗

植物ウイルスの診断法としては、検定植物への接種、封入体の観察、ウイルス粒子の観察に始まり、抗原抗体反応を利用した赤血球凝集反応法、ラテックス凝集反応法、ゼラチン凝集反応法などの血清学的手法が広く用いられてきた。とくに1977年 CLARK and ADAMS により酵素結合抗体法 (ELISA) が植物ウイルスの診断に適用されて以来、ELISA が一度に多量のサンプルを処理できること、検出感度の高いことなどから広く用いられている。ELISA 法はさらに改良が加えられ、簡易 ELISA (TAKAHASHI, Y. et al., 1987), DIBA 法 (日比忠明, 1984), クロマトグラフ紙上で行う方法 (SHERWOOD, J. L., 1987; HABER, S. and H. KNAPEN, 1989) などが開発された。

植物ウイルスの検出方法の望ましい条件は①検出感度が高いこと、②短時間で完了すること、③簡易であること、などである。さらに検出を圃場で行う場合には検出感度は若干落ちて①どこででもできること、②より一層短時間で完了すること、③複数のウイルスを同時に検出できることなどが加わると考えられる。従来広く利用されている血清学的手法は最短でも2時間程度かかり、さらに若干の器械・設備を必要とするため、サンプルを実験室に持ってきて検定することが通常である。さらに複数のウイルスを同時に検定するためには複数のプレートなどを用意する必要がある。

筆者らは圃場でも利用できる手法を開発する目的で植物ウイルスの抗体を感作させた2種類のラテックス (白色と着色) を用い、ガラス繊維濾紙の上で抗原抗体反応を行うことにより、短時間で結果を得る方法について検討し、迅速免疫濾紙検定法 (Rapid Immunofilter Paper Assay: RIPA) (TSUDA, S. et al., 1992) を開発した。その手法について紹介し、参考に供したい。なお、この検定法の一部は農業研究センターから特許申請中である。

## I RIPA の開発

RIPA の原理は抗体を感作させた白色ラテックスを濾紙の一定位置に固定し、風乾後その濾紙の下端をウイルス液と抗体を感作させた着色ラテックス液の混合液につけて、これらを展開させ、抗体感作白色ラテックス固定

位置にバンドが現れるかどうかにより判定するものである。

RIPA の開発にあたって検討した主要な項目は①濾紙の選定、②2種類のラテックスの選定、③ラテックス及び試料の展開に用いる緩衝液の種類、④展開方法などである。この開発段階ではキュウリモザイクウイルス (CMV) の抗原と抗体を使用した。ラテックスは日本合成ゴム株式会社製を用いた。

濾紙の選定：3種類の着色ラテックスに抗体を感作し、0.01~0.1%に希釈し、7種類の市販濾紙 (GA-100, GA-200, GF/A, GF/B, GF/C, GF/D, 51 B) に展開させた。まず、濾紙を8×0.5 cmに切断し、その下端を0.1%牛血清アルブミン (BSA) 添加リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (pH 7.0) 125  $\mu$ l + 3% ツィーン 20 50  $\mu$ l + 0.025% 抗体感作着色ラテックス 125  $\mu$ l の混合液に3分間つけた。そして液が均一に、しかも十分な量が展開する濾紙3種 (GF/A, GF/B, GF/D) を選定した。また展開状況から着色ラテックスとしては3種類のうち、G 0304 CR が最も良いと判断された。

白色ラテックスの選定：5種類の白色ラテックスに抗体を感作させ、前記3種類の濾紙の下から1.5 cmの位置に10  $\mu$ l ずつ固定し、風乾した後、抗体感作着色ラテックスを前記同様に展開した。その結果、抗原を入れないにもかかわらず、抗体感作白色ラテックスを固定した位置にバンド (非特異反応) が現れた。そこでこの非特異反応を軽減するために展開させる液の添加剤を検討した。添加剤としてはツィーン 20, トリトン X-100, ポリビニルピロリドン 40 (PVP), ポリエチレングリコール (#6,000), アラビアゴム, Ficoll, デキストランサルフェイト, ドデシル硫酸ナトリウム (SDS), ショ糖を用い、それぞれ1%液を3% ツィーン 20 の代わりに加えて、展開した。その結果、PVP を添加した時にだけ非特異反応が見られなかった。そして、白色ラテックスとしては S 080-20-120 が最適と判断された。さらに濾紙としては GF/A が選定された。

抗体感作用緩衝液の検討：濾紙 GF/A, 白色ラテックス S 080-02-120, 着色ラテックス G 0304 CR, PVP 添加検定用緩衝液を用いて、CMV の検出感度を調べたところ、抗体感作着色ラテックスの濃度を0.025%とした場

合  $0.1 \mu\text{g/ml}$  まで、 $0.01\%$ とした場合  $0.05 \mu\text{g/ml}$  まで検出された。さらに検出感度を高める目的で、ラテックスに抗体を感作させる際に用いる緩衝液の pH について、pH 6.2, 7.2, 8.2 で試験したところ、いずれにおいてもほぼ同じ検出感度であったが、最も良かったものは pH 7.2 であった。

試料の展開方法：タバコモザイクウイルス (TMV) について CMV 同様に試験したところ、CMV より低濃度まで検出できることが明らかとなった。ついでジャガイモ Y ウイルス (PVY) について試験したところ、このような方法では全くバンドが見られなかった。そこで PVY 液に SDS または 3,5-ジヨードサルチル酸リチウムを加えたり、沓紙にしまして試みたが検出できなかった。PVY の場合ウイルスと抗体感作着色ラテックスを混合すると凝集反応が起き、大きな凝集塊ができ、沓紙を展開しないとされる。そこで、初めにウイルス液を展開した後に着色ラテックスを展開する方法を試みたところ、バンドが現れた。この方法を二段階法 (Two step method) と呼んでいる (TSUDA, S. et al., 1993)。ただし、PVY 純化液を用いた場合はこの方法でも検出できなかった。

## II RIPA の手順

### 1 ラテックスの抗体感作

着色ラテックス (G 0304 CR) と白色ラテックス (S 080-02-120) を感作用緩衝液 ( $0.45\% \text{NaCl}$  と  $0.02\% \text{NaN}_3$  を含む  $0.05 \text{M}$  トリス緩衝液, pH 7.0) でそれぞれ  $1\%$  と  $0.5\%$  になるように希釈する。植物ウイルスの抗体 (精製  $\gamma$ -グロブリン) も同じく感作用緩衝液を用いて  $50\sim 100 \mu\text{g/ml}$  に希釈する。希釈したラテックスと抗体を等量 (各  $1 \text{ml}$ )  $2 \text{ml}$  エッペンドルフチューブに入れ、混合し、室温で 2 時間強く振とうする。振とう後遠心機を用いて洗浄する。抗体感作着色ラテックスは  $10,000 \text{rpm}$  15 分間、抗体感作白色ラテックスは  $10,000 \text{rpm}$  10 分間遠心し、ラテックスが完全に沈殿したことを確認する。上澄を捨て、 $1 \text{ml}$  の洗浄用緩衝液 ( $0.45\% \text{NaCl}$ ,  $0.02\% \text{NaN}_3$ ,  $0.1\% \text{BSA}$  を含む  $0.05 \text{M}$  トリス緩衝液, pH 7.0) を加え、ミキサーを用いて強く振とうし、完全に懸濁させる。この洗浄操作を 4 回繰り返す、最後は  $1 \text{ml}$  の洗浄用緩衝液に懸濁し、冷蔵庫に保存する。

### 2 抗体感作白色ラテックスの固定

ガラス繊維沓紙 (Whatman 製 GF/A) を  $8 \times 0.5 \text{cm}$  に切断し、その下端から  $1.5 \text{cm}$  のところに抗体感作白色ラテックス (原液) を固定する。固定方法としては沓紙をフィルターの上に置き、下から吸引しながらマイク

ロピペットを用いて  $10 \mu\text{l}$  を線状に置く方法と抗体感作白色ラテックス液を十分しませた細い面相筆 (例、宝翰堂 No 3 Smaat) を用いて線を引く方法がある。沓紙の取扱いを容易にするためプラスチックフィルムを裏打ちする場合はすべて面相筆を用いる必要がある。プラスチックフィルムの裏うちにはオーバーヘッドプロジェクター用の透明フィルムを用い、接着剤としては写真用などに用いる 3 M スプレーのりを用い、接着後切断すると良い。

### 3 抗体感作着色ラテックスの希釈

抗体感作着色ラテックスを洗浄用緩衝液を用いて、 $0.01\sim 0.025\%$  ( $100\sim 40$  倍) に希釈する。

### 4 検定

#### 1) 一段階法 (One step method)

ウイルス液  $125 \mu\text{l}$ ,  $0.025\%$  抗体感作着色ラテックス  $125 \mu\text{l}$  と  $3\%$  ツィーン 20 または  $1\% \text{PVP}$   $50 \mu\text{l}$  を  $0.75 \text{ml}$  エッペンドルフチューブに入れ、かくはんする。ただちに、抗体感作白色ラテックスを固定した沓紙の下端  $0.3\sim 0.5 \text{cm}$  をつける。2~3 分後に抗体感作白色ラテックスを固定した位置にバンドが現れ、検定を終える (図-1)。

この方法で純化 CMV について検定したところ、肉眼判定で  $50 \text{ng/ml}$  まで検出できた。同様に純化 TMV-T について検定したところ、 $5 \text{ng/ml}$  まで検出できた (図-2)。これらの沓紙を写真にとり、そのプリントを用いて二波長クロマトスキャナーで測定したところ、それぞれ  $10 \text{ng/ml}$ ,  $1 \text{ng/ml}$  まで陽性と判断された。

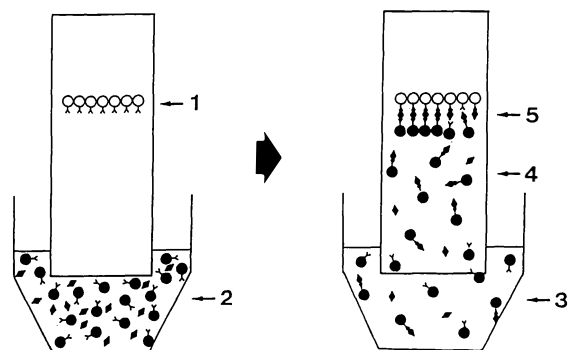


図-1 迅速免疫沓紙検定法の原理 (一段階法)

- 1: 抗体感作白色ラテックスの固相
- 2: ウイルスと抗体感作着色ラテックスの混合液
- 3,4: ウイルスと抗体感作着色ラテックスの反応体の展開
- 5: ウイルスをはさんで抗体感作着色ラテックスが抗体感作白色ラテックスにトラップされる (バンド出現)

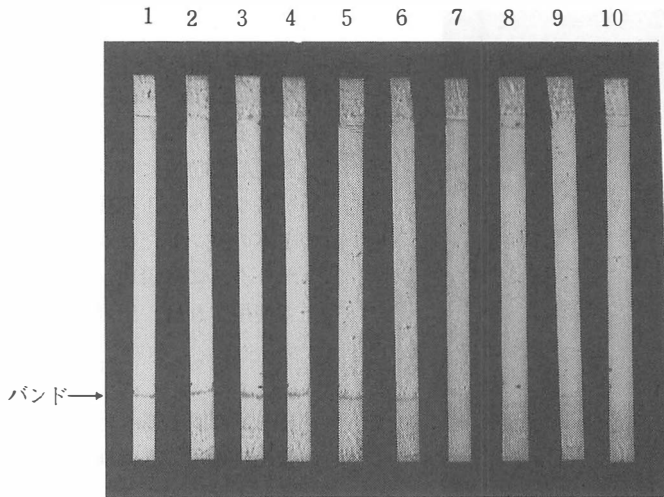


図-2 RIPAによる純化TMV-Tの検定

ウイルス濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )

1 : 10, 2 : 5, 3 : 1, 4 : 0.5, 5 : 0.1

6 : 00.5, 7 : 0.01, 8 : 0.005, 9 : 0.001, 10 : 0.0005

次いで、CMVとTMV-Tを接種した発病タバコ(キサンチ)葉について検定したところ、CMVは10万倍希釈まで、TMV-Tは1,000万倍希釈まで肉眼的に検出できることが明らかとなった。この検定において、病葉の磨砕・希釈には検定用緩衝液(0.1%2-メルカプトエタノール, 0.01 Mエチレンジアミントトラアセティックアシド, 0.1%BSA, 0.15%PVPを含む0.1 Mリン酸緩衝液)を用い、その病葉汁液150  $\mu\text{l}$ と抗体感作着色ラテックス150  $\mu\text{l}$ をチューブに入れ、それに抗体感作白色ラテックス固定濾紙の下端をつけた。

CMVの純化ウイルスと感染タバコ葉を用いて、RIPAの結果(二波長クロマトスキャナーを用いた測定結果)とELISA値を比較したところ、ほぼ同等な検出感度であった。

#### 2)二段階法 (Two step method)

検定用緩衝液で希釈したウイルス液または病葉汁液を0.75 ml エッペンドルフチューブに入れ、抗体感作白色ラテックスを固定した濾紙の下端1 mm程度を1分間つける。直ちにそのまままたは先端2 mmを切り除いて、抗体感作着色ラテックス液に深目に2分間つける。抗体感作白色ラテックスを固定した位置にバンドが現れる(図-3)。

CMVとTMV-Tについては純化ウイルスと病葉粗汁液を用いて、二段階法でも一段階法同様に容易に検出でき、検出感度も高かった。ただし、ここで使用する抗体感作着色ラテックスの濃度は0.01%が適当である。

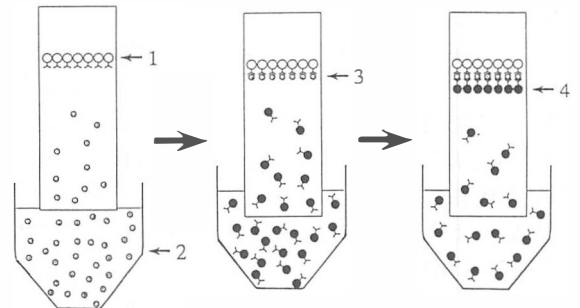


図-3 迅速免疫濾紙検定法の原理(二段階法)

- 1: 抗体感作白色ラテックスの固相
- 2: ウイルス液の展開
- 3: 抗体感作白色ラテックスにウイルスがトラップされる。
- 4: 抗体感作着色ラテックスの展開後、ウイルスをばさんで抗体感作白色ラテックスにトラップされる(バンド出現)。

続いて、PVYの純化液を用いて検定を試みたところ、全く反応が現れなかった。この原因は純化ウイルスが凝集している可能性が考えられた。そこで、病葉汁液を用いて二段階法を試みた。PVY感染トマト葉を検定用緩衝液とともに磨砕し、10, 50, 100倍液を用いて試験したところ、すべてにバンドが見られた。また、PVY感染タバコ葉を用いて検定したところ、1,000倍希釈まで陽性と判断された。PVYの検定条件としては、病葉汁液の希釈は50~100倍、抗体感作着色ラテックスの濃度は0.02%が適当である。

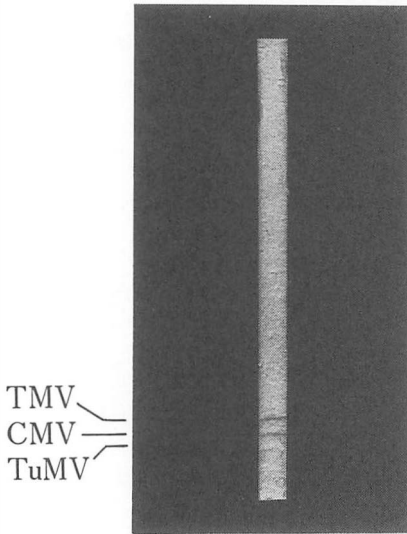


図-4 RIPAによる3種ウイルス  
(TMV, CMV, TuMV)の同時検出。

検定材料として純化ウイルス、タバコとトマト葉を用いて行ったが、その緩衝液や健全葉では非特異反応は見られなかった。他の植物についても確認するため、6科13種の植物の健全葉を用いて検定したところ、いずれも非特異反応は見られず、それらのCMV罹病葉からはCMVが検出できた。

CMV系統間の反応を比較するため、CMV-Yの抗体を用いて、CMV-普通系、ラゲナリア系、Y系、ダイズ萎縮系、SR系との反応を調べたところ、これらの系統間で差異は見られなかった。

### 3) 複数ウイルスの同時検出 (Multi-RIPA)

圃場サンプルのウイルス検定をする場合のもう一つの要件である複数ウイルスの同時検出について、TMV, CMV, PVYまたはTMV, CMV, カブモザイクウイルス (TuMV) の組み合わせで試験した。沱紙の下端から1.5 cmの位置を中心に上下3 mm間隔で3種類のウイルス抗体感作白色ラテックスを固定した。次いで、3種ウイルスに重複感染した病葉汁液、または3種ウイルス感染病葉汁液の混合液に沱紙の下端1~2 mmを1分間つけて、ウイルスを展開した。その後その先端2 mm程

度をハサミで切り除き、直ちに3種類のウイルス抗体感作着色ラテックスの混合液 (最終濃度; TMV-T: 0.01%, CMV: 0.01%, potyvirus: 0.02%) にやや深目につける。すると、約2分後に抗体感作白色ラテックスを固定した位置にバンドが現れた (図-4)。この沱紙を用いて各ウイルス1種類ずつを展開させたところ、おのおの1本のバンドだけが現れ、特異性が確認された。また、ラテックスには着色が可能であり、ウイルス別に色を変えて使用すれば、出現したバンドの判定が容易になる。

### おわりに

RIPAは以上述べたように球状、棒状、ひも状ウイルスの検出に適用でき、検出感度の高いこと、1枚の沱紙で2種以上のウイルスの同時検出も可能であることから、いろいろな場面で利用できると思われる。しかし、病葉からの検出の場合、ウイルス濃度の変化が大きいこと、いろいろな成分を含んでいることなどから、すべての植物のウイルスに適用できるかどうかかわからない。今まで10種以上のウイルスについて行い成功しているが、いろいろな場面で検討する必要がある。特に栄養繁殖性作物の場合、時期によりウイルス濃度が大幅に変動する可能性があり、サンプリングの時期について検討する必要がある。また病葉磨碎時に用いる検定用緩衝液についても検討する必要がある。

この研究は日本合成ゴム株式会社筑波研究所日方幹雄氏のご協力のもとに、東京農業大学総合研究所津田新哉氏・都丸敬一氏、農業研究センター花田薫氏と共同で行ったものである。

### 引用文献

- 1) CLARK, M. F. and A. N. ADAMS (1977) : J. Gen. Virol. 34 : 475~483.
- 2) HABER, S. and H. KNAPEN (1989) : Can. J. Plant Pathol. 11 : 109~113.
- 3) 日比忠明 (1984) : 植物防疫 38 : 380~384.
- 4) SHERWOOD, J. L. (1987) : J. Phytopathol. 118 : 68~75.
- 5) TAKAHASHI, Y. et al. (1987) : Ann. Phytopath. Soc. Japan 53 : 254~257.
- 6) TSUDA, S. et al. (1992) : Plant Disease 76 : 466~469.
- 7) ——— et al. (1993) : Ann. Phytopath. Soc. Japan (in press) .