

RIPA 法による植物ウイルスの圃場診断

青森県グリーンバイオセンター ^{やま}山 ^{した}下 ^{かず}一 ^お夫

はじめに

近年、侵入病害虫が短期間に全国的に発生拡大するなどの事例が見られ、早期発見・早期防除等の対策がより重要と認識されるようになった。そのためには遺伝子診断法ほどの超高感度検出でなくても、圃場で迅速な診断が可能になれば生産指導に役立つ、そのような診断技術の開発・普及が求められている。

TSUDA et al. (1992) は圃場診断に対応できるイムノクロマト法を活用した迅速免疫ろ紙検定法 (Rapid Immunofilter Paper Assay: RIPA) を開発し、その後、数種の改良法 (TSUDA et al., 1992; 河野, 1994; OHKI and KAMEYA-IWAKI, 1996) も考案されるなど実用化に期待が高まった。

RIPA 法による植物ウイルスの検出例はキュウリモザイクウイルス (CMV) やトマトモザイクウイルス (ToMV), トマト黄化えそウイルス (TSWV), ジャガイモ Y ウイルスなどが報告されているが、一般栽培条件下での検定材料を用いた例は少ない。

本稿では多くの植物ウイルスの検出に対応し、圃場診断にも適した診断試薬キットの開発を行い、これら診断キットを用いた 9 属 23 種の植物ウイルスの検出について検討した。また、数種ウイルスについて、高温期のビニルハウス栽培株からの検出についても検討したので紹介する。

また、筆者は科学技術振興事業団の委託事業により、民間企業と共同研究を実施し、商品化に向けた試験を行ってきた。その取り組みについても、簡単に紹介する。

I 抗血清の作製

1 ウイルスの分離・同定

はじめに必要なことは、ウイルス分離株と抗血清である。そこで、国内各地の研究者の協力も得ながら、主として青森県内各地の植物ウイルスを分離、同定し、抗血清の作製を行った。平成 7 年からの 8 年間で、新種など国内初報告 9 種を含む 52 種のウイルスを分離、同定し

(5 種は分譲していただいた)、そのうち 45 種の抗血清を作製した (表-1)。

2 純化と抗血清の作製

純化方法の未確立のウイルス種も多いが、下記の手法によりウイルスを純化した。球形ウイルスには 10% ショ糖, 2 mM EDTA 加用 リン酸緩衝液 (pH 7.0~7.4) を、ひも状ウイルスには 0.1% 2-メルカプトエタノール加用 0.5 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) をそれぞれ基本磨砕用緩衝液として 2~5 倍容で磨砕した。純化材料は、あらかじめ -80°C で凍結保存し、通常は有機溶剤による清澄化处理は行わず、1~5% Triton X-100 処理を行い、1~2 回分画遠心分離し (7,000~10,000 xg, 10 分と、104,000 xg, 120 分または 72,400 xg, 90 分)、ショ糖・塩化セシウム準平衡密度勾配遠心 (256,400 xg, 2.5 時間) によって純化ウイルスを得た。ただし、*Carlavirus* 等の場合、上記の手法ではウイルス外被タンパク質の切断が容易に起こるため、有機溶剤処理を行った。

抗血清の作製は、アジュバント (TiterMax Gold, フナコシ) と純化ウイルス液を等量混合したものを家兎の背中 of 皮中に 1~2 回注射し、さらに 10~14 日後に外耳静脈に注射した。1 回の免疫に用いる純化ウイルス量はウイルス種により多少異なるが 50 µg~3 mg であり、この条件で十分な力価の抗血清が得られた。

II RIPA キット製造技術の改良

RIPA 試薬の調整、製造をできる限り簡便にするため、ラテックスへの抗体感作は河野 (1994) のプロテイン A (ProA) を用いた改良型を採用した。

使用する抗血清の希釈倍数 (力価との関係)、ProA のラテックス粒子への吸着や抗血清処理時の諸条件、ラテックス粒子の洗浄方法などの細部で改良した点もあるが、基本的には TSUDA et al. (1992) や亀谷 (1993) の手法に準じた。TSUDA et al. (1993) は、ひも状ウイルスの検出を容易にするために 2 段階法を開発したが、その方法は検定植物の磨砕汁液に浸漬した後、ろ紙先端部 2 mm ほどをハサミなどで切断する必要がある、その操作が煩雑であった。ここでは反応ろ紙の改良について紹介する。

反応ろ紙にはガラス繊維ろ紙 GF/A (Whatman Co.

表-1 これまでに分離、収集した植物ウイルスと免疫抗原

属名	ウイルス英名	略名と分離植物	免疫抗原 ¹⁾	属名	ウイルス英名	略名と分離植物	免疫抗原 ¹⁾
poty	leek yellow stripe	LYSV-ニンニク	virion*	cucumo	cucumber mosaic	CMV-メロン	virion*
	onion yellow dwarf	OYDV-ニンニク	virion*		peanut stunt	PSV-ニラ	virion*
	shallot yellow stripe	SYSV-ネギ	virion*		tomato aspermy	TAV-トマト	virion*
	potato Y	PVY-ピーマン	virion*		tomato spotted wilt	TSWV-トルコギキョウ	nucleocap*
	turnip mosaic	TuMV-トルコギキョウ	virion*	tospo	impatiens necrotic spot	INSV-スターチス	nucleocap*
	bean yellow mosaic	BYMV-グラジオラス	virion*		iris yellow spot	IYSV-トルコギキョウ	nucleocap*
	clover yellow vein	CYVV-ソラマメ	virion*		shallot latent	SLV-ニラ	virion*
	bean common mosaic	BCMV-アズキ	virion*		chrysanthemum B	CVB-食用ギク	virion*
	delphinium mosaic (仮称)	DelMV-デルフィニウム	virion*	carla	lily symptomless	LSV-ユリ	virion*
	watermelon mosaic 2	WMV 2-カボチャ	virion*		potato S	PVS-ジャガイモ	virion*
	zucchini yellow mosaic ²⁾	ZYMV	virion*		aconitum latent	AcLV-デルフィニウム	virion
	papaya ringspot ²⁾	PRSV	virion*		butterbur mosaic	ButMV	virion
	alstroemeria mosaic	AlMV-アルストロメリア	virion	carmo	melon necrotic spot	MNSV-メロン	virion*
	lily mottle	LiMV-ユリ	virion*		carnation mottle	CaMV-カーネーション	virion*
maclura	chineseyam necrotic mosaic	ChYNMV-ナガイモ	f-protein*	nepo	cherry leafroll	CLRV-ニラ	virion*
potex	potato X	PVX-トマト	virion*	allexi	garlic A	GarV A ニンニク	virion*
	plantago asiatica mosaic	PIAMV-ユリ	virion*		garlic B	GarV B ニンニク	virion*
tobamo	tobacco mosaic	TMV-トマト	virion*		garlic C	GarV C ニンニク	virion*
	tomato mosaic	ToMV-トマト	virion*		garlic D	GarV D ニンニク	virion*
	youcai mosaic	YoMV-トルコギキョウ	virion*		shallot X	SVX-ワケギ	virion*
	pepper mild mottle	PMMoV-ピーマン	virion*	capillo	apple stem grooving	ASGV-リンゴ	f-protein
	cucumber green mild mottle ²⁾	CGMMV-w	virion*		cherry A	CVA-オウトウ	f-protein
	kyuri green mild mottle ²⁾	KGMMV-k	virion*	tricho	apple chlorotic leaf spot	ACLSV-リンゴ	f-protein
alfalfa	alfalfa mosaic	AMV-トマト	virion*	clostero	little cherry-2	LChV-2 オウトウ	f-protein
	broad bean wilt 1	BBWV1-デルフィニウム	virion*				
faba	broad bean wilt 2	BBWV 2 リンドウ	virion*				
	broad bean wilt 3	BBWV-3 リンドウ	virion*				

1) virion：純化ウイルス，f-protein：大腸菌発現ウイルス外被タンパク質，nucleocap：純化ヌクレオキャプシド，*：抗血清作製済（2002 年 12 月 27 日現在）。

2) ウイルス分離株を分譲していただいたもの。

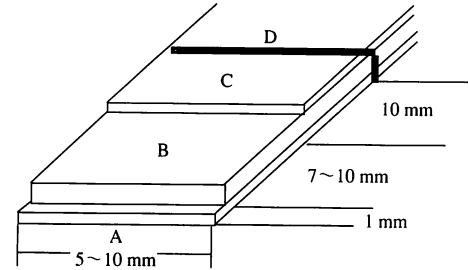


図-1 反応ろ紙先端部の構造
A：白色 PPC ラベルシート，B：ガラス繊維ろ紙，
C：透明 PPC ラベルシート，D：固相化白色ラテックス部位

Ltd.) を，溶液吸収用ろ紙にはガラス繊維ろ紙 GA 100 (Advantec Co. Ltd.) を用いた。反応ろ紙の下側から 17～20 mm の位置にキャプチャー用の抗体感作白色ラテックス溶液を面相筆などを用いて 1 mm 幅で画線するように吸着固定した。抗体感作白色ラテックス溶

液量は反応ろ紙幅 1 cm 当たり 15～20 μ l をのせた。反応ろ紙先端部（溶液滴下部位）の構成は図-1 のとおりである。白色 PPC ラベルシート (KOKUYO Co. Ltd.) 等に張り付け，さらに表側を透明 PPC ラベルシート (KOKUYO Co. Ltd.) などカバーした。反応ろ紙は，球形および棒状ウイルス用は 5～7 mm 幅に，ひも状ウイルス用は 10 mm 幅になるように切断した。

III 使用方法とウイルスの検出限界

溶液は水平展開方式に改良したため，反応ろ紙は蓋やケースなどの上に置き，溶液滴下部位に検定植物の磨砕汁液を 2～3 滴（約 100 μ l 程度）滴下後，液がろ紙に吸水されたら，ただちに検出用ラテックス溶液を 2～3 滴滴下し，そのまま静置する。陽性の場合，滴下した溶液がろ紙内に吸収されるとほぼ同時に，キャプチャー用白色ラテックスを固相化した部位に着色のラインが現れはじめて徐々に濃くなる。結果はそのラインの有無により

判定する。もし、着色が不明瞭で判定が困難な場合には、検出用ラテックス溶液をさらに数滴追加するか、再度新しい反応ろ紙で、それぞれの溶液を増量して反応させてみることもできる。

23 種の植物ウイルスの純化ウイルスや接種植物を用いた検出限界を検討した結果を表-2 に示した。純化ウイルスでの検出限界は、キュウリモザイクウイルス (CMV) やトマトアスパミーウイルス (TAV) が 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と検出感度が高く、次いで他の球形ウイルスやタバコモザイクウイルスなどのトバモウイルスで、ひも状ウイルスは 0.5~1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とやや劣った。

ポット苗に接種して発病させた植物病葉を磨砕した粗汁液でも、純化ウイルスと同様な結果が得られ、クモウイルスやトバモウイルスなどでは 5,000~10,000 倍希釈まで検出できた。ひも状ウイルスの中でも、ジャガイモ X ウイルス (PVX) やカブモザイクウイルス (TuMV) などでは 2,000 倍希釈以上と高感度に検出できたが、インパチェンスやユリ、ニンニクのような多糖類の多い植物では、磨砕用緩衝液に 2% ドリセラーゼを添加することにより 100~200 倍希釈までウイルスの検出が可能になった。

表-2 RIPA 法による植物ウイルスの検出限界

ウイルス 属名	ウイルス名	供試植物名	粗汁液 希釈限界	純化 ウイルス $\mu\text{g}/\text{ml}$
<i>cucumo</i>	CMV	トマト	10,000	0.05
	TAV	トマト	5,000	0.05
<i>alfamo</i>	AMV	トマト	2,000	0.1
<i>carmo</i>	MNSV	メロン	1,000	0.1
<i>tospo</i>	TSWV	トマト	500	NT
	INSV	インパチェンス	100	NT
<i>tobamo</i>	TMV	トマト	10,000	0.1
	ToMV	トマト	5,000	0.1
	PMMoV	ピーマン	5,000	0.1
<i>potex</i>	PXV	トマト	10,000	0.1
<i>carla</i>	LSV	ユリ	200	1
	SLV	ネギ	500	1
<i>allexi</i>	SVX	ネギ	100	0.1
<i>poty</i>	PVY	トマト	500	0.1
	PVY	ピーマン	2,000	0.1
	TuMV	カブ	2,000	0.5
	BYMV	ソラメ	500	0.5
	BYMV	トルコギキョウ	500	0.1
	CYVV	ソラメ	500	0.5
	BCMV	アズキ	1,000	1
	LYSV	ニンニク	200	0.5
	SYSV	タマネギ	100	0.5
	OYDV	ニンニク	100	0.5

NT：試験例なし。

IV 圃場診断の実用化

当センター圃場のビニルハウス栽培条件下で生育した作物での診断・検出の可能性について検討した。試験の実施時期は、青森県で高温期にあたる 8 月上旬~8 月下旬であった。供試ウイルスは TAV, CMV, トウガラシマイルドモットルウイルス (PMMoV), TSWV を用いた。明瞭な病徴が認められる上位葉粗汁液からの検出は、トマトの TAV とピーマンの CMV では 5,000 倍希釈まで、ピーマンの PMMoV とキュウリの CMV では 2,000 倍希釈まで、キクの TSWV では 1,000 倍希釈まで検出可能であった。一方、感染株で病徴が認められない下位葉の粗汁液では、トマトの TAV で 2,000 倍、ピーマンの PMMoV で 5,000 倍希釈までと高感度な検出結果となったが、CMV が感染したピーマンやキュウリの無病徴の下位葉では、50 倍希釈粗汁液でも検出できなかった。いずれの作物も健全葉での非特異反応は認められなかった。

同一の粗汁液を用いて DIBA 法と比較したところ、供試したいずれのウイルスと植物でも、ほぼ同程度の検出結果を示した (データ省略)。

これまでに示した結果から、RIPA 法による圃場診断の実用性は十分あるものと判断された。ここで注意する点は、多くのウイルスで、同一葉でも病徴の部位から検出されるが濃緑色の無病徴部位からは検出できないことがある。また、検出感度を高めたいと思って濃い粗汁液を用いると、反応ろ紙が色素で汚くなるほかに、砕かれた組織片などによる反応ろ紙の目詰まりが生じてウイルスの展開が阻害され、陽性結果が不明瞭になる場合があることから検定植物から試料を採取する際に、病徴が明瞭に認められる葉などの組織や部位を用いること、粗汁液を濃くしないことが重要である。

V 「植物ウイルス簡易診断キット」の市販に向けて

今回紹介した内容は、青森県グリーンバイオセンター設立後の 1996 年から取り組んできた事業の一つで、1998 年には、東北化学薬品株式会社との共同研究で、平成 10 年度地域研究開発促進拠点支援 (RSP) 事業 (科学技術振興事業団からの委託) の一環として商品化に向けた「可能性試験」を実施したものである。その後も共同研究を継続し、2002 年には 11 種の植物ウイルスの「簡易診断キット」の販売開始に至っている。

販売開始以前から問い合わせがあり、公設試験研究機関や農業改良普及センター、全農など農協の生産指導、

表-3 雨除けビニルハウス条件下で栽培した病株からの数種植物ウイルスの検出

供試作物名	ウイルス種	検定部位	病徴	50	100	200	500	1,000	2,000	5,000	10,000
トマト	TAV	上位葉	あり	++ ¹⁾	++	++	++	+	+	+	-
		下位葉	なし	++	++	++	++	++	+	-	-
	健全			-	-	NT					
ピーマン	PMMoV	上位葉	あり	++	++	++	++	++	+	-	-
		下位葉	なし	++	++	++	++	++	+	+	-
	健全			-	-	NT					
ピーマン	CMV	上位葉	あり	++	++	++	++	++	+	+	-
		下位葉	なし	-	-	-	-	-	-	-	-
	健全			-	-	NT					
キュウリ	CMV	上位葉	あり	++	++	++	++	++	+	-	NT
		下位葉	なし	-	-	-	-	-	-	-	NT
	健全			-	-	NT					
キク	TSWV	病斑部		++	++	++	++	+	-	-	-
		無病斑部		-	-	-	NT				
	健全			-	-	NT					

¹⁾ ++: 明瞭な反応, +: 反応あり, -: 反応なし, NT: 試験例なし

種苗会社の種苗検定や農業資材関連企業等のサービス、大学や農業高校さらには園芸講座等での教材等、幅広い活用が期待されている。

お わ り に

生産現場では、依然として多くの作物で種々の植物ウイルス病が発生し、それによる品質低下や減収等は後を絶たないのが実状である。その中で診断という技術は、生産上重要であるが、相変わらず専門家の独壇場である。迅速な圃場診断技術である RIPA 法の普及は、(社)日本植物防疫協会より「ランウイルス診断試薬」が販売されているのみで、生産場面への普及は今ひとつといった状況である。

ヒト関連分野で発展し続けるイムノクロマト法に比較し、農業分野で果たして「診断事業」というマーケットが成立するかどうかは不明ではあるが、「遺伝子組換え

体」や「無登録農薬問題」など「食の安全」が社会問題化している今こそ、「診断事業の創成期」とも言える。

技術は「使われて活かされる」ものであり、多くの方々にサンプルテストをお願いし、苦言提言をいただいた。また、種々の改良を検討する上で、山口大学農学部 亀谷満朗博士、独立行政法人農業生物資源研究所花田薫博士はじめ多くの方々にご指導ご助言をいただいた。ここに記して感謝の意を表する。

引 用 文 献

- 1) 福井要子ら (2002): 日植病報 68: 53 (講要).
- 2) 亀谷満朗 (1993): 植物防疫 47: 189~192.
- 2) 河野伸二 (1994): 日植病報 60: 739 (講要).
- 3) 三澤知央 (2000): 北日本病虫研報 51: 83~86.
- 4) OHKI, S. T. and M. KAMEYA-IWAKI, (1996): Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 62: 240~242.
- 5) TSUDA, S. et al. (1992): Plant Dis. 76: 466~469.
- 6) ——— et al. (1993): Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 59: 200~203.
- 7) 山下一夫ら (2001): 日植病報 67: 174 (講要).

人 事 消 息

●農林水産省生産局関係 (2月1日付)

三角 隆氏 (植物防疫課防除班防除指導係長兼農産振興課) は、生産資材課併任へ

岩井朋久氏 (同上課防除班防除技術係長) は、生産資材課併任へ

新居威行氏 (横浜植物防疫所東京支所) は、植物防疫課併任へ

佐々木隆氏 (独立行政法人農業検査所検査部毒性検査課 毒性第一係長兼生産資材課) は、生産資材課併任へ
星野稔彦氏 (同上所同上部化学課製剤第二係長兼生産資材課) は、生産資材課併任へ

●独立行政法人関係 (1月31日付)

桑原雅彦氏 (農業環境技術研究所化学環境部ダイオキシン評価研究官) は、退職し国際協力事業団へ