

# 大量サンプル（検体）に対応したエライザ法による カンキツウイルスの効率的検定法

福岡県農業総合試験場果樹苗木分場 <sup>くさ</sup>草 <sup>の</sup>野 <sup>なり</sup>成 <sup>お</sup>夫

## はじめに

我が国の果樹産地では、輸入果実の増加や需要の減退により国産果実の価格が低迷していることから優良な品種への転換が積極的に進められている。しかしながら、品種転換を急ぐあまり穂木のウイルス汚染の有無を確認しないまま高接ぎや苗木の増殖が図られ、ウイルス病の被害が顕在化している。果樹は永年性作物であり、ウイルスにいったん感染すると果実の収量や品質、樹勢の低下など長期にわたり大きな影響を受ける（清水ら、2004）。

また、果樹苗木の生産は、一般に接ぎ木による栄養繁殖で行われるため、ウイルスに汚染された苗木を植栽することは初期生育の不良と減収をもたらし、場合によっては早期枯死を招くことから、高品質果実生産を阻害する要因となっている。福岡県はカキやカンキツなど、果樹の主要な生産県であるとともに、果樹苗木の一大生産地でもあり、カンキツ苗木については、全国のカンキツ苗木の生産量約600万本のうち、その約7割を生産しており、無毒の苗木生産を行うことは福岡県における重要課題である。今回、団体などの要請により10,000点を超える大量のサンプルのウイルス検査に対応できる簡易かつ効率的な酵素結合抗体法（Enzyme-Linked Immunosorbent Assay：以下エライザ法）による検定手法を開発したので、その概要を紹介する。

## I カンキツウイルス病の発生状況

福岡県では、果樹のウイルス検出に最適な方法であるエライザ法を利用し、主要なカンキツウイルスである温州萎縮ウイルス（SDV）を1983年から、リンゴステムグルーピングウイルス（ASGV：旧カンキツタターリーフウイルス）については92年から年間約2,400点から3,500点の検査を事業として実施している。現在までの単年度のウイルス保毒率はSDVで0.2～14.2%、

ASGVで0.8～22.9%で推移しており、最近10年間ではSDVで0.2～6.4%、平均2.3%、ASGVで0.8～3.9%、平均2.1%と検査事業の継続による効果で、保毒率はやや低下の傾向にある。

## II カンキツウイルスの大量検定法の開発

### 1 従来のエライザ法の簡易化

図-1はエライザ法による検定手順を示している。これまでに、SDV、ASGVの検定法に関しては、抗体固相化（コーティング）済みマイクロプレートの超低温による長期保存法（図-1の①）やサンプルと標識抗体の同時分注法（図-1の②）等の各種の改良を行った（平島ら、1988；平島・野口、1989；草野・下村、1995）。また、96穴のサンプルラックを利用して事前にサンプルの磨砕液を準備し、8連のピペッターでマイクロプレートへ分注するなどの改善も行っており、これらの作業を併用することで作業時間の短縮や簡易化を進めてきた。

### 2 大量検定のための磨砕サンプル調整法

エライザ法では、サンプルの磨砕から磨砕液上清の採取までのステップに相当の労力と時間を要しているた

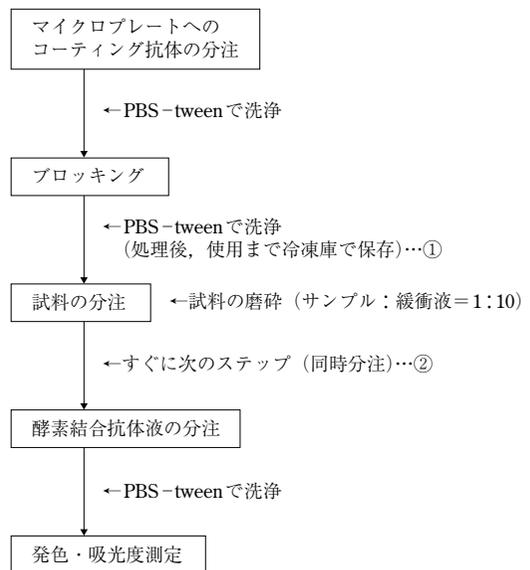


図-1 酵素結合抗体法（ELISA）のステップ

Efficient Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Mass Citrus Test Samples on the Diagnosis of Citrus Viruses. By Nario KUSANO

(キーワード：カンキツウイルス，エライザ法，大量検定，簡易化，コスト低減)

め、労力削減方法と検出感度の維持について検討した。

3種類の磨砕サンプル調整法としては、採取した新梢を10倍容の磨砕用バッファー（0.1%チオグリコール酸加用0.1Mクエン酸緩衝液）中で乳鉢を用いて磨砕後、そのままサンプルチューブ（1ml）に入れてエライザ法に利用する区（磨砕粗汁液区）、サンプルチューブに入れた後、卓上小型遠心機（日本ミリポア社、チビタン-

R）で30秒遠心分離し上清を利用する区（簡易遠心区）、一度遠心管（12ml）に入れて冷却遠心機で5,000rpm、15分遠心分離後に上清をサンプルチューブに入れて使用する区（慣行区）とした。

3種類の調整法による検定結果は、図-2, 3のようになった（図中のフリー区については、慣行区とほぼ同じなので省略）。磨砕粗汁液区ではASGVおよびSDV共に乳鉢で磨砕後のサンプル液を直ちにエライザ法に利用するため、分注操作時のピペッターに付けるチップ先端に大型の植物破砕物が詰まる原因となった。また、磨砕粗汁液区は、SDVではサンプル希釈倍率10～30倍で、また、ASGVではサンプル希釈倍率10～90倍で簡易遠心区、慣行区と比較して吸光度が低下した。この原因としては、植物組織の磨砕残渣がマイクロプレートに分注されるため、ウイルスのコーティング抗体への吸着反応を阻害していると考えられた。簡易遠心区では、慣行区と比較して吸光度はやや低下する傾向にあるが、実際のエライザ法検定で行うサンプル希釈倍率10倍と比較すると、磨砕粗汁液区よりも優れていた。これは植物組織の磨砕残渣の大部分が遠心分離により除去されたことによると考えられた。磨砕後の作業時間としては、慣行の遠心分離処理（5,000rpm、15分間）に比べチビタン-Rの30秒処理を行う簡易遠心は、慣行区の磨砕液の乳鉢から遠心管へ、また、遠心管からサンプルチューブへのピペッティング操作もなくなることから実働時間は約1/2と少なくなった。

以上のことから、簡易遠心区では、サンプルの磨砕液調整に必要な時間短縮および作業の省略化に極めて有効であった。このため以下の試験では、磨砕液の調整を簡易遠心で行った。

### 3 リンゴシステムグルーピングウイルス（ASGV）および温州萎縮ウイルス（SDV）の同時検定法

ASGV, SDVの単独、および両ウイルスを混合したサンプルを供試し、ASGVおよびSDVのコーティング抗体濃度をそれぞれ200倍、400倍、600倍ずつ混合した時の検出感度を調べた。結果は表-1である。ASGVとSDVの割合を1:1としたサンプルでは、ASGVの抗体濃度が600倍、SDVの抗体濃度が200倍のときに、吸光度倍率が高くなり、検出感度がやや優れていると考えられた。このコーティング抗体濃度区ではASGVとSDVの割合を1:2, 2:1にした場合もすべての処理区で吸光度倍率が4.5倍以上あった。

ASGVを単独に保毒したサンプルでは、両ウイルス抗体（ASGV抗体400倍、SDV抗体400倍）を利用した検定法は、ASGV単独のウイルス抗体（400倍）を利用

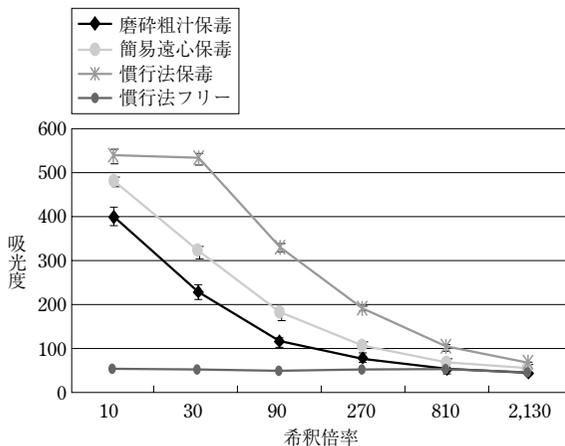


図-2 磨砕サンプル調整法とリンゴシステムグルーピングウイルス（ASGV）の検出程度

吸光度：測定値×1,000，基質投入2時間後に測定。ASGV抗体はコーティング抗体，ALP標識抗体共に500倍。

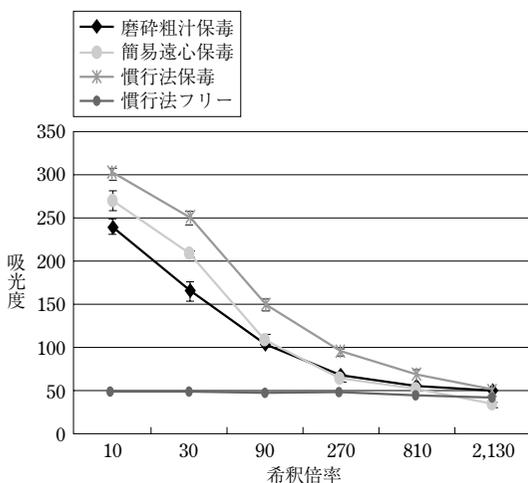


図-3 磨砕サンプル調整法と温州萎縮ウイルス（SDV）の検出程度

吸光度：測定値×1,000，基質投入2時間後に測定。SDV抗体はコーティング抗体，ALP標識抗体共に500倍。

表-1 ASGV および SDV の同時検定とその検出感度

サンプル割合	コーティング抗体濃度											
	ASGV 抗体	200			400			600			400	0
	SDV 抗体	200	400	600	200	400	600	200	400	600	0	400
ASGV1 : SDV1	保毒	636	551	598	596	570	510	680	665	631	386	513
	フリー	112	114	91	87	94	89	87	91	92	86	95
	吸光度倍率	5.7	4.8	6.6	6.9	6.1	5.7	7.8	7.3	6.9	4.5	5.4
ASGV1 : SDV2	保毒	579	579	558	536	453	454	575	586	618	174	577
	フリー	112	114	91	87	94	89	87	91	92	86	95
	吸光度倍率	5.2	5.1	6.1	6.2	4.8	5.1	6.6	6.4	6.7	2.0	6.1
ASGV2 : SDV1	保毒	640	577	573	553	504	489	542	482	504	400	321
	フリー	112	114	91	87	94	89	87	91	92	95	86
	吸光度倍率	5.7	5.1	6.3	6.4	5.4	5.5	6.2	5.3	5.5	4.2	3.7
単独 ASGV	保毒	407	397	415	331	326	297	306	293	318	431	83
	フリー	112	114	91	87	94	89	87	91	92	86	95
	吸光度倍率	3.6	3.5	4.6	3.8	3.5	3.3	3.5	3.2	3.5	5.0	0.9
単独 SDV	保毒	376	365	356	409	378	335	474	389	369	86	409
	フリー	112	114	91	87	94	89	87	91	92	86	95
	吸光度倍率	3.4	3.2	3.9	4.7	4.0	3.8	5.4	4.3	4.0	1.0	4.3

酵素標識抗体：ASGV, SDV 濃度とも 400 倍。吸光度倍率：保毒/フリー。サンプル濃度：SDV (50 倍), ASGV (50 倍), フリー (50 倍)。吸光度：測定値×1,000, 基質投入 2 時間後に測定。

したときに比べ吸光度倍率が 5 倍から 3.5 倍に低下した。SDV を単独に保毒したサンプルでは、両方の抗体を混合した時の吸光度倍率の低下は小さかった (表-1, □囲み数値)。通常、陽性とする基準は吸光度倍率で 2 倍以上であることを前提にすると、両抗体の濃度は日植防の指定濃度の 500 倍で十分であると推察された。なお、ASGV と SDV を、それぞれ単独、または両ウイルスを混合した磨砕サンプルを希釈してエライザ法を行った結果、2 ウイルスの混合サンプルでは希釈倍率 320 倍以上、単独ウイルスでは 320 倍まで検出が可能であり、2 ウイルスの同時検定が十分可能であると考えられた (データ省略)。この方法では、保毒率が低ければ低いほど効果が高く、例えば、検定サンプル中に 1 ~ 10% の保毒率があると仮定すると、慣行法の 49 ~ 40% の検定回数の減少となった (データ省略)。

4 多検体の同時検定法

表-2, 3 は、6 サンプルを一度に検定することを前提に、検出感度について検討した結果である。

6 サンプル (各 20 μl/1 サンプル) のうち、ASGV または SDV 単独磨砕液とウイルスフリー磨砕液の割合を 6 : 0 から 1 : 5 とした場合、エライザ法での吸光度は検

表-2 6 サンプル中のウイルス保毒割合と吸光度

ウイルス：フリー のサンプル割合	SDV			ASGV		
	サンプル希釈倍率			サンプル希釈倍率		
	10	30	90	10	30	90
6 : 0	791	522	393	388	305	209
5 : 1	796	492	386	440	268	199
4 : 2	965	408	415	339	254	184
3 : 3	654	364	287	256	218	151
2 : 4	592	347	224	214	173	136
1 : 5	426	216	174	142	115	103
0 : 6 (フリー)	57	58	57	57	58	57

吸光度：測定値×1,000, 基質投入 1 時間後に測定。SDV, ASGV 抗体はコーティング抗体, ALP 標識抗体共に 500 倍。

出に十分な吸光度が得られた。実際の検定場面では 10 倍希釈磨砕液を用いるので問題はないと考えられるが、それをさらに 9 倍 (表-2 の 90 倍に該当) にまで希釈した場合は、ASGV で 6 サンプル中に 1 サンプル保毒のケースで検出が困難となった。ASGV, SDV およびウイルスフリーのサンプルを混合した場合の検出感度を調べた。その結果、ASGV, SDV のいずれも 1/6 以上の混合

割合であればすべて検出された（表-3、一部省略）。6サンプル同時検定法では保毒サンプルが一つの際には、吸光度が低下するが、検定手法としては実用化が可能と考えられた。

図-4は、サンプル磨砕液のサンプルチューブラック（96穴サンプルラック）での保存方法と8連ピペッターでのマイクロプレートへの分注方法を図示したものである。従来法では、8連ピペッターを用いてサンプルラック1列分をマイクロプレートの2列（2反復）に各100 $\mu$ lずつ分注後、100 $\mu$ lの酵素結合抗体液を分注して

いた（同時分注法）。改良法では、サンプルラックの6列までの各サンプルを20 $\mu$ lずつ採取してマイクロプレートの同一ウェルに分注することで計120 $\mu$ l/ウェルが分注される（2反復）。その後、酵素結合抗体液を120 $\mu$ l/ウェル重ねることで一連の抗原抗体反応が終了する。この方法では、1枚のマイクロプレートで2.5箱分、240サンプル（マイクロプレートの2列分は陽性、陰性コントロール用として使用）を同時に検定することが可能となる。なお、この改良法では、マイクロプレート上で陽性と判定された場合、6サンプルすべてについて

表-3 保毒サンプルの割合と吸光度

F : S : A	SDV と ASGV およびフリーの サンプル希釈率		
	10	30	90
4 : 1 : 1	426	278	212
3 : 2 : 1	465	345	268
2 : 3 : 1	523	362	312
1 : 4 : 1	557	366	278
1 : 3 : 2	572	510	351
0 : 5 : 1	714	425	278
0 : 4 : 2	568	581	388
6 : 0 : 0 (フリー)	57	58	57

吸光度：測定値×1,000、基質投入1時間後に測定。SDV、ASGV抗体はコーティング抗体、ALP標識抗体共に500倍。Fはフリー、SはSDV、AはASGV。

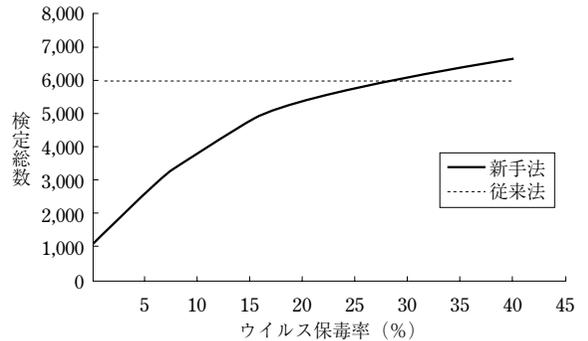
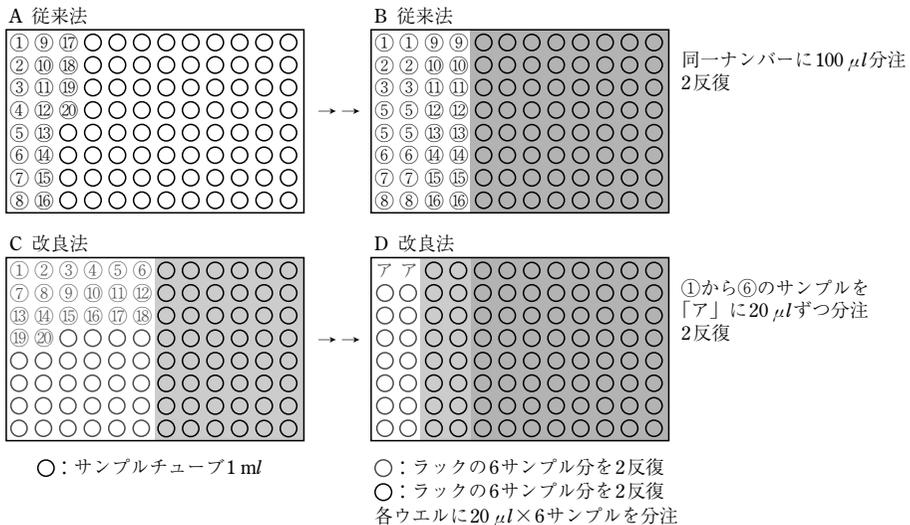


図-5 ウイルス保毒率と6サンプル同時検定法における再検定を含めた検査総数  
検査点数：6,000サンプル。関係式： $y = n/6 + (1 - (1 - x)^6) \times (n/6) \times 6$ 。y：検査総数，x：圃場におけるウイルス保毒率，n：サンプル点数。

8チャンネルピペッターによるサンプルラックからマイクロプレートへの磨砕液の分注



磨砕液分注後のサンプルラックの状態

マイクロプレート上の分注方法

図-4 サンプル磨砕後のサンプルラックへの保存方法とマイクロプレートへの分注法

て1サンプルずつSDVとASGVそれぞれに個別に再検定を行う必要がある。図-5は6,000検体を前提に1ウイルスを対象に6サンプルまとめて検定し、保毒していた場合の再検定数も含めた検定総数と保毒率の関係を示している。2ウイルスでも同様の結果となり、保毒率が低ければ低いほど省力化の効果は圧倒的に大きいことが明らかとなった。

### おわりに

カンキツのウイルス検定については、近年、地域や県域レベルでの新品種苗木の栽植や高接ぎなどに対応した大量のウイルス検定の要請がある。

本報では、エライザ法の各ステップを見直し、時間とコストを省略するため、主として3点について改良した。1点目は磨砕液の調整を卓上小型遠心機を利用し、かつ30秒の短時間とすることで、従来法の約半分の時間にできた。2点目はASGVとSDVの2ウイルスをマイクロプレート上で同時に検出することとした。この方

法では、保毒率を1～10%と仮定すると、従来法の49～40%に検定回数を減少させることができる。3点目は、6サンプルを同時に検定する方法である。従来法の1サンプルずつ検定する方法を改良し、磨砕液20 $\mu$ l/1サンプルで6サンプルを混合してもウイルス検定が可能であり、また、20 $\mu$ lを正確に分取できる8連のピペッターとそのピペッターに対応した96穴のサンプルラックの利用を行うことで省力・低コスト化ができた。

以上のように、エライザ法の各ステップの改良を行うことで労力的には半分以下となり、抗体、マイクロプレート等の試薬・機材の使用を減らすことで、人件費も含めたトータルコストは大幅に低下すると考えられた。

### 引用文献

- 1) 平島敬太ら (1988): 福岡農総試研報 B-8: 85～88.
- 2) ———・野口保弘 (1989): 同上 B-9: 57～60.
- 3) 草野成夫・下村克己 (1995): 同上 14: 163～166.
- 4) 清水伸一ら (2004): 四国植物防疫研究 39: 27～33.
- 5) 高橋義行 (1988): 植物防疫 42: 22～26.

## 植物防疫特別増刊号 No.10

# 植物ダニ類の見分け方

B5判 120頁 口絵カラー  
価格 2,520円税込 (本体 2,400円)

◆ 農作物に寄生するダニ類および天敵のカブリダニ類の見分け方を詳しく解説。

### 掲載内容



#### I. ハダニ科の見分け方 (江原昭三・後藤哲雄 著)

- 1) ハダニ科の概説と日本産の種のリスト
- 2) ビラハダニ亜科のハダニ
- 3) ナミハダニ亜科のハダニ

#### II. ヒメハダニ科およびケナガハダニ科の見分け方 (江原昭三 著)

#### III. フシダニ科の見分け方 (上遠野 富士夫 著)

- 1) フシダニ科の概説とナガクダフシダニ科およびヨツゲフシダニ科
- 2) フシダニ科群の概説と属への検索
- 3) ハリナガフシダニ科の概説と属への検索

#### IV. コナダニ科の見分け方 (岡部 貴美子 著)

- 1) コナダニによる作物被害とダニの見分け方
- 2) コナダニ類の同定 I 標本の作製から科の同定まで
- 3) コナダニ類の同定 II 成虫と第2若虫から属への同定

#### V. カブリダニ科の見分け方 (江原 昭三 著)

- 1) カブリダニ科の概説と日本産の種のリスト
- 2) ムチカブリダニ亜科
- 3) ホンカブリダニ亜科
- 4) カタカブリダニ亜科