

手もみ式簡易磨砕容器「フィンガーマッシャー」と自動磨砕装置「オートマッシャー」の植物ウイルスの大量診断への利用

佐賀県果樹試験場* 井 手 洋 一

はじめに

植物ウイルスの診断を行ううえで、サンプルの磨砕作業は重要な作業である。大量のサンプルになると、作業に疲れ、根を上げた方も多はずである。これまで、植物サンプルの磨砕作業のために乳鉢が広く用いられてきたが、多くの労力と作業時間を要するため、これにかわる磨砕方法が切望されていた。

今回、実用化開発事業で(独)果樹研究所、佐賀県、福岡県、静岡県、三重県、(株)ミズホメディー、(有)エスメックとともに行った共同プロジェクトにおいて、開発された植物サンプルを簡単に磨砕できる簡易磨砕容器「フィンガーマッシャー」と多検体磨砕装置「オートマッシャー」について紹介する。

サンプルの磨砕作業に苦勞されている皆様のお力になれば幸いである。

これらのツールは、もともとカンキツウイルスの大量診断のために開発されたもので、2011年11月に、カンキツウイルスイムノクロマトキット(井手ら, 2009)とあわせて、「農業試験場と医療品・機械メーカーの連携による果樹ウイルス病診断キットとサンプル磨砕容器・機器の開発」というタイトルで、日刊工業新聞第6回ものづくり連携大賞において「新技術開発賞」を受賞した((独)果樹研究所、佐賀県、福岡県、静岡県、三重県、(株)ミズホメディー、(有)エスメックによる共同受賞)。

I 簡易磨砕容器「フィンガーマッシャー」

植物ウイルスを診断する際の磨砕作業の簡便化のために開発されたのが、(株)ミズホメディーで開発された手もみ式簡易磨砕容器「フィンガーマッシャー」(図-1)である(特許公開番号JP2007218903, EP1975593, US2009084202, WO2007083617)。草野氏(福岡農総試)

が最初に紹介し(KUSANO et al., 2007; 草野, 2008)、筆者もその実用性評価について学会などで発表させていただいた(井手ら, 2008)。使い方としては磨砕を行いたい検体を(必要によって緩衝液と合わせて)容器に入れ、その容器の下部を親指と中指(人差し指でも可)で強く挟み、こすりあわせるだけで簡単に植物の葉を磨砕できる。磨砕作業終了後はフィルター付きのキャップからろ過しながら滴下できるため、遠心分離の作業は不要である。もともとインフルエンザ診断などで使用されていた抽出容器を植物用に改良したもので、磨砕を行う下部容器の内部に凹凸構造をつけ摩擦力を高め、指で押せるように容器自体を柔らかくすることで、植物組織を容易に磨砕できるようにしたのが特徴である。

一般に植物組織の磨砕作業には乳鉢が用いられるが、この「フィンガーマッシャー」を用いることで、作業時間を大幅に短縮できる(48検体: 乳鉢 152分, フィンガーマッシャー 40分)。この「フィンガーマッシャー」は現在、(株)ザルスタットで取り扱われている。

なお、この容器で磨砕できるサンプルは、乳鉢で磨砕できる程度の柔らかい組織に限られる。カンキツ新葉、野菜の葉、果実、肉類、炊いたご飯等柔らかいものには対応できるが、樹皮、骨、玄米等の硬いものについては対応できないので、この点については留意していただきたい。

II 自動磨砕装置「オートマッシャー」の開発

「フィンガーマッシャー」の登場でサンプルの磨砕作業を大幅に短縮することができた。しかし、サンプル数が多くなると指先や手首が疲れ、作業能率が低下する。また、手もみだと個人間による粉碎度のばらつきが生じる。そこで、「フィンガーマッシャー」による磨砕作業を効率的に行うための装置の開発に取り組み、自動磨砕装置「オートマッシャー」を開発した(特開JP2009220065, 佐賀果樹試, (有)エスメック, (株)ミズホメディーの共同出願)。現在、48検体用と8検体用を製作している(図-2A, B)。

装置の上面に配置されたそれぞれの穴(ウエル)は、手もみ式簡易磨砕容器「フィンガーマッシャー」をセッ

‘Finger Masher’ a New Type Vessel for Homogenization with Fingers and ‘Auto-masher’ an Automatic Grinding Machine to Homogenize many Samples for the Diagnosis of Mass Plant Virus Samples. By Youichi Irie

(キーワード: ウイルス診断, ELISA, 磨砕作業, 抽出作業)

* 現 佐賀県農業技術防除センター

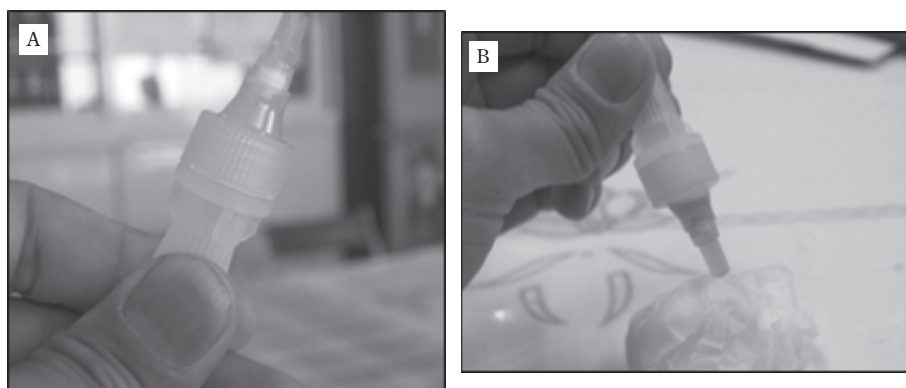


図-1 手もみ式簡易磨砕容器「フィンガーマッシャー」
A：容器の外観 B：フィルターでろ過、摘下。

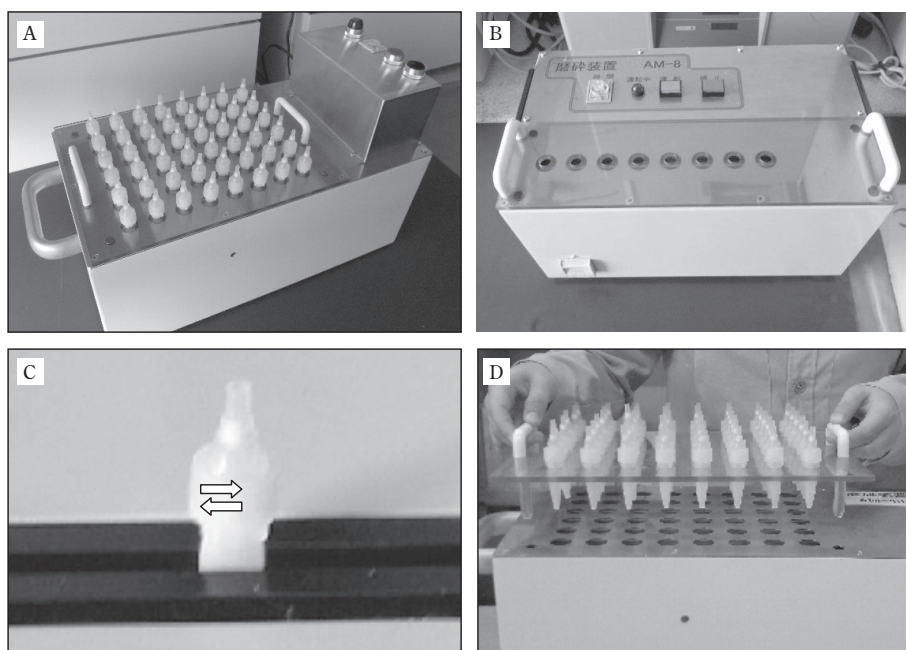


図-2 自動磨砕装置「オートマッシャー」

A：自動磨砕装置「オートマッシャー」48検体用の外観。

B：自動磨砕装置「オートマッシャー」8検体用の外観。

C：各容器を挟み込み磨砕するための鉄製のパネル（装置内部に組み込まれている）。

D：48個の「フィンガーマッシャー」をあらかじめ並べておき同時に装置にセットするためのプラスチック製のトレイ。

トするもので、一度に48検体を並べることができる。スイッチを押すと、各ウェルにセットされた「フィンガーマッシャー」の容器の下部を2枚の鉄板が高い圧力で挟み込み、それぞれの板が互いに逆方向に動くことで（図-2 C、複数の歯車の組合せで制御されている）、指を使った場合と同様の動きを再現しサンプルを磨砕する。

ただし、2枚の板で容器とサンプルを挟みこんだままだと中身のサンプルと緩衝液が容器上部にせり上がったままになるので、鉄板が3回に1度開き、サンプルと緩衝液を容器の下部に沈降させるような仕組みになっている。2枚の板が3回に1度開くことで磨砕効率が高まる（図-3）。タイマーがセットされており、必要に応じて磨

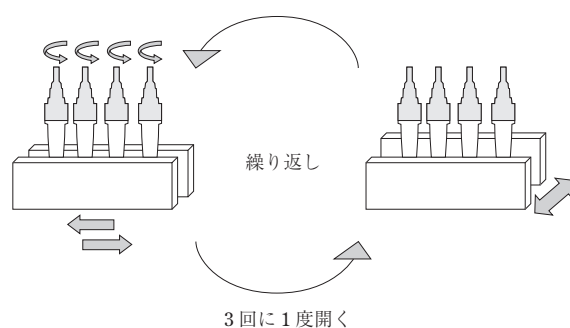


図-3 オートマッシャーの基本原理

碎の回数を変えることができる。

また、ユーザーは付属のプラスチックトレイを 2 枚以上所有しておくことで、あらかじめ「フィンガーマッシャー」を並べることができ、効率作業を行うことができる (図-2 D)。

III ELISA 診断におよぼす影響

手もみ式簡易磨砕容器「フィンガーマッシャー」と、自動磨砕装置「オートマッシャー」を用いて調整した試料が DAS-ELISA によるウイルス診断の結果におよぼす影響を確かめるために、果樹類および草本植物の代表的なウイルスに感染した植物 (ASGV 感染カンキツ葉、

表-1 自動磨砕装置 (オートマッシャー) で磨砕した場合の各ウイルスの ELISA 検出感度

ウイルス	植物	磨砕方法	ELISA 吸光度				
			感染葉				未感染葉
ASGV	カンキツ	オートマッシャー (フィンガーマッシャー使用)	2 時間後	4 時間後	6 時間後	12 時間後	12 時間後
			0.95 a¹⁾ (0.18) ²⁾	1.78 a (0.30)	2.52 a (0.28)	3.43 a (0.14)	0.13 a (0.00)
			0.57 a (0.09)	1.13 a (0.18)	1.72 a (0.27)	2.55 a (0.34)	0.13 a (0.00)
		手もみ (フィンガーマッシャー使用)	0.64 a (0.06)	1.28 a (0.13)	1.93 a (0.18)	2.67 a (0.18)	0.12 a (0.00)
SDV	カンキツ	オートマッシャー (フィンガーマッシャー使用)	2 時間後	4 時間後	6 時間後	12 時間後	12 時間後
			0.21 b (0.01)	0.38 b (0.03)	0.55 b (0.04)	0.84 b (0.06)	0.18 a (0.01)
			0.22 b (0.03)	0.30 b (0.02)	0.42 b (0.04)	0.63 b (0.06)	0.17 a (0.01)
		手もみ (フィンガーマッシャー使用)	0.68 a (0.10)	1.16 a (0.21)	1.96 a (0.32)	2.61 a (0.35)	0.15 a (0.01)
CMV	キュウリ	オートマッシャー (フィンガーマッシャー使用)	15 分後	30 分後	45 分後	1 時間後	1 時間後
			0.38 a (0.05)	0.71 a (0.18)	1.04 a (0.24)	1.38 a (0.32)	0.10 (0.00)
			0.43 a (0.07)	0.79 a (0.10)	1.19 a (0.16)	1.56 a (0.21)	0.10 (0.01)
		手もみ (フィンガーマッシャー使用)	0.33 a (0.03)	0.61 a (0.09)	0.88 a (0.12)	1.14 a (0.16)	0.09 (0.02)
IYSV	トルコギキョウ	オートマッシャー (フィンガーマッシャー使用)	0.5 時間後	1 時間後	1.5 時間後	2 時間後	2 時間後
			1.95 b (0.18)	2.76 b (0.15)	2.97 b (0.07)	3.06 b (0.03)	0.16 (0.00)
			2.67 a (0.12)	3.01 a (0.02)	3.05 a (0.01)	3.09 a (0.01)	0.20 (0.01)
		手もみ (フィンガーマッシャー使用)	0.14 c (0.00)	0.40 c (0.06)	0.56 c (0.09)	0.70 c (0.12)	0.22 (0.02)

¹⁾ 異なる英字間には Turkey-test で有意差があることを示す。

また、感染葉の太文字 (下線付き) は未感染葉の吸光度との間に目視で有意な差があることを示す。

²⁾ () 内の数値は標準誤差を示す ($p < 0.05$)。

表-2 カンキツの新葉 48 検体を磨砕するために要する作業時間の比較 (単位・分)

磨砕方法	サンプルの 計測	磨砕 ¹⁾	磨砕液を チューブに移す	合計 ¹⁾
オートマッシャー (48 検体用)	15	3 (5)	6	24 (28)
オートマッシャー (8 検体用)	15	6 (10)	6	27 (32)
手もみ (フィンガーマッシャー)	15	19 (32)	6	40 (47)
乳鉢	18	60	7	85

¹⁾ () 内の数値は乳鉢磨砕で要した時間に対する比率 (%) を示す。

SDV 感染カンキツ葉, CMV 感染キュウリ葉, IYSV 感染トルコギキョウ葉) を供試し, 「フィンガーマッシャー」を用いて磨砕した場合と, 乳鉢で磨砕した場合の ELISA 値を比較した (井手ら, 2009; 2011)。

その結果, 各ウイルスとも「フィンガーマッシャー」を用いて磨砕を行った場合でも十分な ELISA 値が得られており, ウイルス診断を行ううえで, 実用的に問題はないと判断した (表-1)。

IV 作 業 時 間

カンキツ新葉 48 検体の磨砕作業行程に要した時間 (磨砕時間のみでなくサンプルのセットなどに要する時間を含む) を比較した結果, 乳鉢による磨砕の場合は 85 分, 「フィンガーマッシャー」による磨砕を手もみで行った場合は 48 分の時間を要したが, 自動磨砕装置「オートマッシャー」を用いた場合は 24 分で作業が終了した。磨砕作業のみに要した時間については, 乳鉢の場合が 60 分, 「フィンガーマッシャー」による磨砕を手もみで行った場合が 19 分であったのに対して, 自動磨砕装置「オートマッシャー」の場合は, わずか 3 分であった (表-2)。

磨砕作業に「フィンガーマッシャー」を使用することで磨砕作業の効率化を図ることができ, 「オートマッ

シャー」を用いることで大幅な時間短縮を図られることがわかっていただけるかと思う。

オートマッシャーは 2009 年 9 月から (有) エスメック (佐賀県小城市) で製造・販売が開始された。2009 年 12 月時点での販売価格は 8 検体用が約 25 万円, 48 検体用が約 45 万円である。本稿では自動磨砕装置「オートマッシャー」が植物ウイルスの ELISA 診断の効率化に寄与する可能性のみを示したが, PCR 診断や植物の栄養診断の際の磨砕作業の短縮にも寄与でき, 実際に植物ウイルスやウイロイドの PCR 診断に利用されている研究者の方もいる。また, 植物サンプルのみならず, 医療, 動物, 食品等様々な分野に応用できることから, 幅広い分野での利用を期待している。

引 用 文 献

- 1) 井手洋一ら (2008): 日植病報 74: 30 ~ 31 (講要)。
- 2) ————ら (2009): 平成 21 年度佐賀県果樹試業務年報: p. 207 ~ 208。
- 3) ————ら (2011): 日植病報 77: 295 ~ 298 (講要)。
- 4) KUSANO, N. et al. (2007): J. Gen. Plant Pathol. 73: 66 ~ 71。
- 5) 草野成夫 (2008): グリーンレポート 463(1): 5 ~ 7。

参考: 企業連絡先

- (株) ザルスタット 03-5825-0107
 (株) ミズホメディー 0942-85-0303
 (有) エスメック 0952-72-6171

発生予察情報・特殊報 (24.3.1 ~ 3.31)

各都道府県から発表された病害虫発生予察情報のうち, 特殊報のみ紹介。発生作物: 発生病害虫 (発表都道府県) 発表月日。都道府県名の後の「初」は当該都道府県で初発生の病害虫。

※詳しくは各県病害虫防除所のホームページまたは JPP-NET (<http://www.jppn.ne.jp/>) でご確認下さい。

- 水稲, 大豆, 野菜類, 果樹類等: ミナミアオカメムシ (岐阜県: 初) 3/5
- クリ: ナラウスズジハマキホソガ (岐阜県: 初) 3/5
- トマト: 黄化病 (鹿児島県: 初) 3/8
- サツマイモ: サツマイモヒサゴトビハムシ (宮崎県: 初) 3/9

- トルコギキョウ: キキョウトリバ (鳥根県: 初) 3/14
- チャ: チャトゲコナジラミ (高知県: 初) 3/16
- マンゴー: シュレイツメハダニ (鹿児島県) 3/27
- 飼料用とうもろこし: トウモロコシ根腐病 (長野県: 初) 3/27
- タマネギ: タマネギ萎黄病 (富山県: 初) 3/29