

植物ウイルス病ワクチンの製品化と普及展開

株式会社微生物化学研究所 梁^{りょう} 宝成^{ほうせい}・片桐^{かたぎり} 伸行^{のぶゆき}・安原^{やすはら} 壽雄^{ひさお}

京都府農林水産技術センター生物資源研究センター 小^こ 坂^{さか} 能^{よし} 尚^{たか}

はじめに

全国のキュウリ産地では多くのウイルス病被害が発生している。なかでも、ズッキーニ黄斑モザイクウイルス (ZYMV) によるモザイク病は、急性萎凋症 (IWASAKI and INABA, 1988) や奇形果実を引き起こして大きな経済的損失を招いている。こうしたウイルス病に対し、有効な抗ウイルス剤がない現状では、媒介虫に対する薬剤や忌避資材の使用、罹病株の抜取り等の防除対策を講じているのが実情である。その一方で、ウイルス病の効果的な防除対策の一つとして、病原性が弱いかほとんどない弱毒株 (以下ワクチン株と称する) の実用化も進んでいる (小坂, 2005)。

筆者らは、ZYMV に対して高い防除効果を示すワクチン株 ZYMV-2002 (KOSAKA et al., 2006) を有効成分とする凍結乾燥製剤「キュービオ ZY-02」の開発に取り組み、新規農薬として登録された。

本稿では、「キュービオ ZY-02」の製品化に至るまでの研究概要と農薬登録後の利用状況を紹介する。

I 高力価ワクチン製剤の作製

全国のキュウリ生産者に防除効果の高いワクチン株 ZYMV-2002 の接種苗または製剤を供給するためには、高い感染率を付与する高力価の製剤を作製する必要がある。そこで、好適な増殖植物と増殖条件の検討を行うとともに、植物ウイルスでは初めてとなる中空糸膜フィルターを用いた限外ろ過法による簡易迅速濃縮法の確立を目指した。

まず、製剤作製用のカボチャ品種を選定するため、接種したカボチャにおける ZYMV-2002 の増殖性を比較したところ、西洋カボチャ品種の「えびす」が適していると判断された。また、ZYMV-2002 を 10 代まで「えびす」で継代増殖したところ、弱病原性を決定している HC-Pro 領域の四つの遺伝子配列 (WANG et al., 2006) に変異はなく、キュウリに接種しても原株と同様のごく

軽微な症状を現すにとどまったことから、ZYMV-2002 は製造用株として、「えびす」は増殖植物として優れていることが明らかとなった。さらに、ZYMV-2002 を接種したカボチャから、試作製剤を作製した (図-1)。各葉位の展開状況に合わせて感染葉を適時採取し、磨碎汁液を限外ろ過法により濃縮した。その後、濃縮液に等量の安定剤を加え、凍結乾燥して製剤化した。得られた製剤は、ほぼ理論値どおりに濃縮されており、本法の有用性が確認された。

次に、製剤に最適なウイルス含有濃度と容量を検討し、保存安定性を検証した。ウイルスの感染性の指標は生物検定による 50% 感染価 ($\log ID_{50}/0.3 \text{ ml}$) で算出した。製剤の希釈溶媒として水道水を供しても、リン酸緩衝液または蒸留水とは明瞭な差がなかった。また、キュウリ苗が 100% 感染する接種濃度は、ほぼ $10^{2.0} ID_{50}/0.3 \text{ ml}$ 以上であることが明らかとなった。さらに、製剤を 4℃ で保存しウイルス含有濃度を検定したところ、保存 24 か月後まで安定して活性が保たれることが確認された (表-1)。

以上のように、ZYMV-2002 製剤のキュウリへの感染率を高めるための製造方法および接種条件を確立し、長期保存による製剤感染価の安定性などが確認されたことによって、製剤の実用化に目途がついた。

II ZYMV-2002 の生物農薬としての登録

ZYMV-2002 製剤を全国のキュウリ産地で利用するためには、その農薬登録が必要である。生物農薬の登録申請で要求される資料は「微生物農薬の安全性評価に関する基準 (9 農産第 5090 号)」に規定されている。ここでは、「環境生物に対する影響試験」および「ヒトに対する安全性試験」に関する成績を紹介する。

1 環境生物に対する影響試験

農薬登録に必要な要求項目である環境生物に対する影響試験は、悪影響が懸念されない根拠理由が明確に示される場合にはその成績を除外できる。

そこで、ZYMV-2002 のキュウリやカボチャの根からの分泌あるいは遊離、水中や土壌中での生残性等を簡易かつ的確に調査できる手法を確立し、淡水魚、淡水無脊椎動物および土壌微生物に影響を及ぼす可能性があるか

Diffusion of a Registered Plant Virus Vaccine. By Bo-Song RYANG, Nobuyuki KATAGIRI, Hisao YASUHARA and Yoshitaka KOSAKA

(キーワード: キュウリ, ズッキーニ黄斑モザイクウイルス, 防除, ワクチン, 生物農薬)

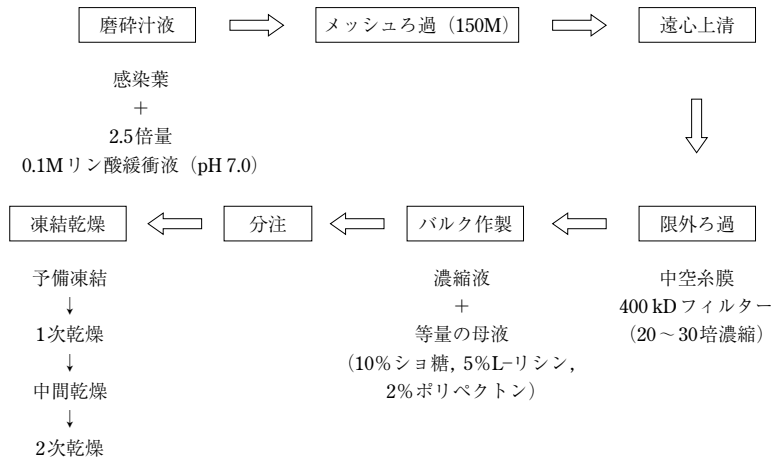


図-1 ZYMV-2002 製剤の製造工程

表-1 ZYMV-2002 製剤の感染価の推移^{a)}

試作製剤	感染価	
	製造直後	保存 24 か月後
Lot9	3.8	4.0
Lot10	4.2	4.0

^{a)} 製剤の保存は 4℃で、感染価 (logID₅₀/0.3 ml) はカボチャ品種えびすで検定した。

表-2 ZYMV-2002 の環境生物に対する影響試験

試験の種類	ZYMV-2002 の性状
根からの遊離	感染性ウイルスは検出されず
栽培収量後の残根	速やかに失活
土壌、農業用水	速やかに失活
水を介した伝染性	なし
アブラムシを介した伝搬性	なしまたは極めて低い
強毒株への復帰変異	10 代継代接種してもなし
他のウリ科作物での病徴	なしまたは軽微

表-3 ZYMV-2002 の実験動物を供試した安全性試験

試験の種類	被験動物・細胞	被験動物への影響
単回経口	マウス	感染性および全身的影響なし
単回経皮	ウサギ	局所刺激性および全身的影響なし
単回経気道	マウス	感染性および全身的影響なし
単回静脈内	マウス	感染性および全身的影響なし
眼一次刺激性	ウサギ	刺激性なし
皮膚感作性	モルモット	皮膚感作性あり
培養細胞	霊長類由来	感染性・毒性なし

否かを検証した。また、アブラムシによる伝搬性試験と各種ウリ科作物への接種試験を行い、植物への影響を評価した。

ZYMV-2002 は感染キュウリまたはカボチャの根から感染性ウイルスの遊離がないこと、収穫後のキュウリ残根から全く感染性が確認されないこと、自然条件下の土壌中や農業排水中では速やかに失活すること、水を介して根から根に伝染しないこと、アブラムシにより伝搬される可能性はないか、または極めて低いこと等が明らかになった。これらの成績から、ZYMV-2002 は生態系に拡散・残留する可能性は極めて低く、淡水魚などの環境生物への影響は問題にならないと評価された (表-2)。

さらに、製剤の使用法や生物学的性質から、鳥類、標的外昆虫、蜜蜂および蚕に対して影響を与える可能性はほとんどないと判断された (文献検索による)。

2 ヒトに対する安全性試験

ZYMV-2002 の経口、静脈内、経気道による各単回投与試験では、高濃度の ZYMV-2002 を投与したマウスに臨床的、病理学的影響はなく、ZYMV-2002 の感染性、病原性、体内残存性および毒性はいずれも認められなかった。また、霊長類由来培養細胞を供試した細胞培養試

験では、ZYMV-2002 の感染性および毒性は確認されなかった。さらに、ZYMV-2002 製剤の単回経皮投与、眼一次刺激性試験では、皮膚と眼への刺激性はなかった。皮膚感作性試験では、製剤に皮膚感作性が認められた (表-3)。

以上のように、製剤としては皮膚感作性が確認されたものの、ZYMV-2002 がヒトに対して感染や悪影響を及ぼす懸念はないと評価された。

「環境生物に対する影響試験」と「ヒトに対する安全性試験」をとりまとめ、ZYMV-2002 製剤（「京都微研」キュービオ ZY-02）の新規農薬登録申請願を（独）農林

水産消費安全技術センター農業検査部に提出し、資料整備を重ねながら、2007 年 10 月 10 日付けで農林水産大臣宛申請書が受理された。その後、微生物農薬検討会および使用時安全性検討会を経て、2008 年 4 月に生物農薬として新規に登録された（図-2）。

Ⅲ ワクチンの特徴・使用方法

本剤の特徴として、① ZYMV によるモザイク病と萎凋症を予防できる、初めての生物農薬であること、② キュウリモザイクウイルスまたはカボチャモザイクウイルスと重複感染しても、病徴を強めず、干渉効果も低下しないこと、③ 定植前に本剤を 1 回接種するだけで防除効果を発揮すること、④ ワクチン接種によって果実の品質や収量が低下しないこと、⑤ 他の作物や環境への影響が小さい農薬であること、⑥ 農薬散布回数にカウントされず、有機栽培・減農薬栽培等に適合することが挙げられる。

ワクチンの接種は、凍結乾燥された製剤を水で 25 倍になるように溶解、希釈し、添付のカーボランダムを加えた後、接種液に十分浸した綿棒またはコットンパフ等で葉の表面をこする（図-3 および表-4）。2 ml 製剤で 166 株分、6 ml 製剤で 500 株分となる。



図-2 「京都微研」キュービオ ZY-02

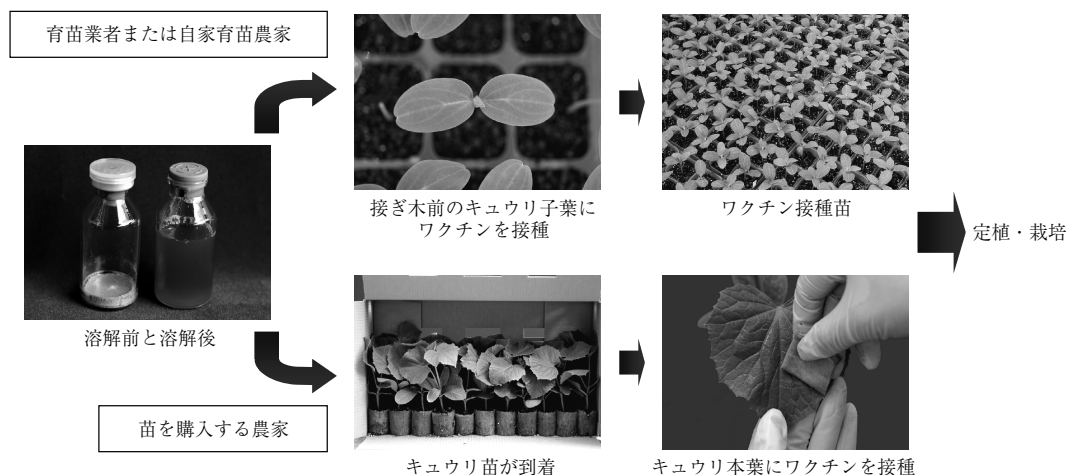


図-3 ワクチンの利用手順

表-4 ワクチンの適用病害虫と使用方法

対象作物名	適用病害虫	希釈倍数	使用量/株	使用時期 ^{a)}	使用回数	使用方法	農薬の使用回数
きゅうり	ZYMV の感染によるモザイク病および萎凋症	25 倍	0.3 ml	子葉または第 1 本葉	1 回	有傷接種	—

^{a)} 定植前に接種、苗のステージは完全展開期。

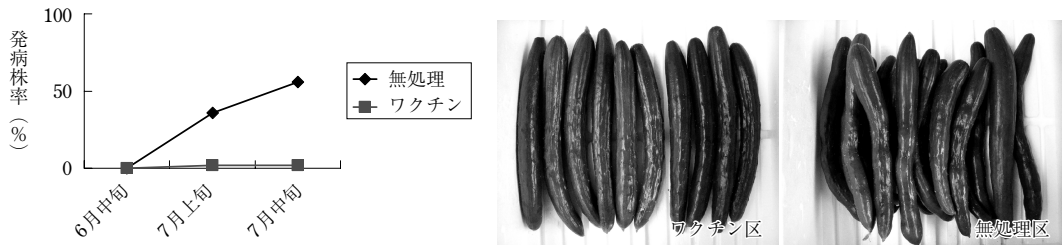


図-4 農家圃場におけるキュウビオ ZY-02 の防除効果の一例 (2009 年度)

IV ワクチンの普及事例と課題

ワクチンを接種したキュウリの苗数は、2008 年度では 7 府県 37,000 株、09 年度では 24 府県 81,000 株と利用の途についたところである（口絵および図-4）。これまでに、ワクチンを利用した農家または現地関係者の意見として、①毎年モザイク病に悩まされていたが、ワクチンを使った今年は全く出なかった（宮城県、神奈川県、長野県および宮崎県）、②ワクチンを導入してから凸凹果実や急性萎凋症状が見られなくなった（滋賀県および愛媛県）、③ワクチンを接種しておくことで安心して栽培できるので今後も保険的に使いたい（京都府および岡山県）、等が挙げられた。

一方では、今後の普及の鍵を握る重要な課題も顕在化している。まず、技術的には、接種作業の機械化などによる簡易・効率化である。過去にプロトタイプの接種装置が開発されているが（小坂，2005）、感染率が安定しなかったことから、再度、機械での噴霧接種試験を実施中であり、早期の実用化を目指している。次に、農家の要望に応じて実証試験に踏み切る事例が多いが、その地域で被害をもたらしている病原ウイルスが ZYMV によるものか明らかにされている場合は極めてまれである。当該地域の主要病原ウイルスの発生情報をあらかじめ把握しておくこと、ウイルス診断では地元の公的機関と連携することが不可欠と考えられる。さらに、ワクチンが上市した例は全くなかったことから、ウイルス感染を防ぐ農業として十分に周知されておらず、化学農業とは異なる特質を生産者に認識してもらうことも重要と考えている。

おわりに

ZYMV による被害は年間数十億円以上と概算されるが、発生が慢性的な産地もあれば、数年ごとというところもある。一度でも ZYMV による甚大な被害を経験した生産者には、ワクチンの「保険」的な利用は高く評価されている。今後の現地試験などの取り組みにより、ワクチン＝「保険」という考え方を広く定着させたいと思っている。また、キュウリでは ZYMV 以外のウイルス病も発生しており、数種混合ワクチンを求める声も少なくない。さらに、最近では、温暖化に伴うエマージングウイルス病の脅威もある。誰でも、いつでも、どこでも利用できるキュウビオ ZY-02 のような安全・安心なワクチンの開発とその生物農薬登録は喫緊の課題と考えている。

現在、生物農薬市場が占める割合は、全農薬市場の約 3,500 億円の 1% にも満たない状況にある（土井，2009）。このキュウビオ ZY-02 が植物ウイルス病ワクチンという新しい分野を創生し、今後の生物農薬市場に活性化をもたらすことを期待したい。

本稿の研究成果の一部は、農林水産省「先端技術を活用した農林水産研究高度化事業「安心感・信頼感の高いワクチン接種キュウリ苗のオンデマンド供給」（2005～07 年度）により得られたものである。

引用文献

- 1) 土井清二 (2009): 日本植物病理学会バイオコントロール研究会レポート 11: 49～54.
- 2) IWASAKI, M. and T. INABA (1988): Ann. Phytopath. Soc. Japan 54: 584～592.
- 3) 小坂能尚 (2005): 植物防疫 59: 337～340.
- 4) KOSAKA, Y. et al. (2006): Plant Dis. 90: 67～72.
- 5) WANG, W.-Q. et al. (2006): J. Gen. Plant Pathol. 72: 52～56.

農林水産省プレスリリース (22.10.16～22.11.15)

農林水産省プレスリリースから、病害虫関連の情報を紹介します。

<http://www.maff.go.jp/j/press/syouan> の後にそれぞれ該当のアドレスを追加してご覧下さい。

◆ 平成 22 年度病害虫発生予報第 9 号の発表について (11/11)

/syokubo/101111.html