

特集：ネギアザミウマが媒介するアイリス黄斑ウイルス（IYSV）防除対策

多頭保毒虫検定法（マス検定）による IYSV 検出法の開発

愛媛県農林水産研究所 芝 章二・黒田 つよし・楠元 くすもと ともこ 智子*

徳島県立農林水産総合技術支援センター 美 本 謙 悟

は じ め に

ネギ・ニラえそ条斑病は、アイリス黄斑ウイルス（以下、IYSV）を病原とするウイルス病で、ネギアザミウマにより媒介される。国内では、1996年に千葉県のアルストロメリアで初確認された（奥田、2002）。四国では、2003年に高知県で確認され、ニラやネギで被害が拡大している。本病は、はじめ葉身に小型の退緑斑を生じ、後に黄白色の小型のえそ斑点や大型のえそ条斑を呈する（植草ら、2005；福田ら、2007；福田・森島、2010）。本病の発生地域に隣接する未発生地域では、IYSVの侵入をいち早く知り、その後の感染リスク評価へとつなげるための発生予察技術が求められている。

これまで IYSV の確認は、発生後に圃場から植物体の病徵を採取して検定する方法が中心である。また早期確認には媒介虫の保毒状況を調査する必要があるが、捕獲したネギアザミウマを個体別に血清診断もしくは遺伝子診断していた。この方法で侵入警戒を実施すると多大な労力とコストがかかる。一方、古味ら（2003）は、粘着板に捕獲した媒介虫を 1 頭ずつ剥がして保毒の有無を検定する方法を開発した。筆者らは、この方法を発展させ粘着板に付着した様々な昆虫類をまとめて剥離・分別し、ネギアザミウマを含む微小昆虫類すべてを回収して、その検体に含まれる IYSV を血清診断によって検定する手法を開発した。多頭（マス）検定法（以下、マス検定法）は、生産現場で容易に実施が可能であり、IYSV の有無が不明な地域での早期発見技術である。

I マス 検 定 法

1 概要

現地圃場から回収した粘着板には、アザミウマ類のほかに、ハエ類などの様々な昆虫類が付着している。その

Development of ELISA Assay for Iris Yellow Spot Virus in the Many Numerical Viruliferous Insects. By Shoji SHIBA, Tsuyoshi KURODA, Tomoko KUSUMOTO and Kengo YONEMOTO

（キーワード：マス検定法、IYSV、ネギアザミウマ、粘着板、DAS-ELISA 法）

* 現所属：愛媛県農林水産部農業振興局農産園芸課

粘着板を市販の粘着物質溶解液（商品名：ドフィックスハケ塗りシールはがし）に浸漬し、浸漬時間の違いや付着物の溶解液中の状態（浮遊・沈殿）で、容易に分別することが可能である。本法は、沈殿する微小昆虫とともにまとめて回収したアザミウマ類（最大 500 頭）から、DAS-ELISA 法（日本植物防疫協会、技術情報）により IYSV を一括して検出することで、その中に含まれるネギアザミウマのウイルス保毒の有無を判定する手法である。本法の流れを図-1 に示す。

2 検定方法、資材の選定

（1）IYSV 検出手法（保毒虫検定）の選定

現場で簡易に実施できることを前提に、検出精度が高く、植物ウイルス検出に利用されている血清診断法を検討した。DOT-BLOT 法、DIBA 法および ELISA 法（間接 ELISA 法、DAS-ELISA 法）で保毒虫検定を実施した。これら血清診断法の比較対照として遺伝子診断法（以下、RT-PCR）でも行った。その結果、DOT-BLOT 法、DIBA 法では IYSV の検出は可能であったが、反応の弱い個体（ネギアザミウマ）は判定が困難であった（図-2）。ELISA 法では、DAS-ELISA 法の検出結果が RT-PCR と同等であった（表-1）。保毒虫の判定は基質添加後 1 時間のエライザプレート中の液の発色状況をマイクロプレートリーダーで吸光値を測定して行った。吸光値 0.1 以上であれば目視でも確認（陽性：黄色、陰性：無色透明）が可能であることから吸光値 0.1 以上を陽性と判定した。

（2）粘着物質溶解液の選定

粘着板からネギアザミウマを確認し、1 頭ずつ爪楊枝で 1.5 ml マイクロチューブに回収する作業は現地では不可能であるため、粘着板に付着した多数のネギアザミウマを短時間にまとめて剥離できる資材を検討した。検討した資材は D-リモネン、アセトン、クロロホルム、ハケ塗りシールはがし、粘着剤はがしの 5 種類を行った。その結果、剥離・回収に優れていたのは D-リモネン、クロロホルム、ハケ塗りシールはがしであった（表-2）。また、DAS-ELISA 法を利用した IYSV 検出に影響しなかった資材は、D-リモネン、ハケ塗りシールはがしであった（表-3）。このうち価格が安く、広く一般に市販

粘着トラップの設置

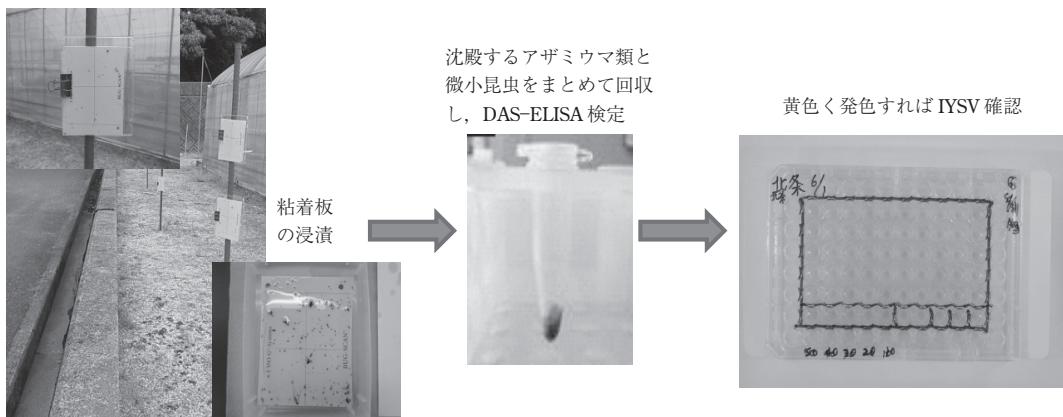


図-1 マス検定法の流れ

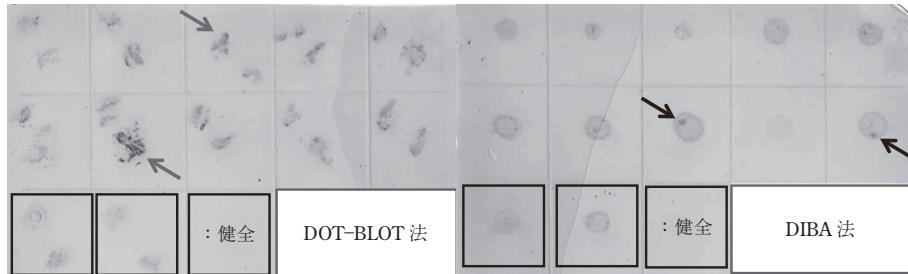


図-2 DOT-BLOT 法および DIBA 法による保毒虫検定

注) 1次抗体: JPP, 2次抗体: 抗ウサギ抗体 (シグマ).

表-1 DAS-ELISA 法と RT-PCR によるネギアザミウマからの IYSV 検出

検定法	ELISA 検定 ¹⁾ の吸光値 (上段) と RT-PCR ²⁾ での検出の有無 (下段)									
	0.165	0.022	0.032	0.030	0.042	0.333	0.017	0.031	0.093	0.154
DAS-ELISA	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+
RT-PCR	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
間接 ELISA	0.017	0.013	0.018	0.147	0.049	0.026	0.018	0.015	0.022	0.029
RT-PCR	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-

¹⁾ 無毒虫をブランクとして吸光値 (A₄₀₅) 0.1 以上を陽性と判定.²⁾ + : 陽性反応, - : 陰性反応.

表-2 粘着板に付着した媒介虫の剥離・回収性

D-リモネン	アセトン	クロロホルム	シールはがし液体 ¹⁾	粘着剤はがしスプレー ²⁾
+	-	+	+	-

¹⁾ ドフィックス ハケ塗りシールはがし (ヘンケルジャパン(株)).²⁾ ドフィックス 強力粘着剤はがし (ヘンケルジャパン(株)).

表-3 DAS-ELISA 法による粘着物質溶解液から回収した個体群の IYSV 検出

回収液	シールはがし ¹⁾			D-リモネン	
	検定頭数	30頭 ²⁾	26頭	14頭	
吸光値 (A ₄₀₅)	1.584	0.355	0.209	0.257	

¹⁾ ドフィックス ハケ塗りシールはがし (ヘンケルジャパン(株)).²⁾ ネギアザミウマは保毒虫率 10 ~ 18% の個体群を供試した.

されているハケ塗りシールはがしを選定した。規格は、200 mL と詰替え用の 500 mL がある。

（3）DAS-ELISA 法に使用する抗体の選定

IYSV を検出するために使用する抗体（1 次抗体、2 次抗体）を検討した。IYSV に感染したベンザミアーナ（葉）の 100 倍希釈液を使用し、Agdia 社と日本植物防護協会（以下、JPP）で比較した結果（基質添加後 1 時間のプレート中の液の発色状況）、JPP は陽性反応と陰性反応の確認はできたが、バックグラウンドが高くなる傾向であった。一方、Agdia 社は明瞭に陽性・陰性が確認できた。本法は、現場で利用することを目的としていることから、だれが見ても確認（判定）できる Agdia 社を選定した。Agdia 社の IYSV エライザキットは 96 検体、500 検体、1,000 検体、5,000 検体で販売されている。一方、JPP 作製の抗体についても使用濃度の変更によって利用可能である知見が得られつつあることから、今後は価格面などのコストを考慮して JPP 作成の抗体が利用できるように技術開発する必要がある。

3 特徴

（1）簡便・短時間

粘着板に捕獲されたアザミウマ類を、1 頭ずつ処理するのではなく、沈殿しているアザミウマ類と微小昆虫をまとめて 1.5 mL マイクロチューブに回収し、DAS-ELISA 法により個体群での IYSV 保毒の有無を判定する。病徵を確認するよりも、より早い段階で IYSV の侵入を把握することが可能である。

（2）個体別検定と同等以上の検出精度

1 頭当たりの体内ウイルス濃度が低いネギアザミウマが複数頭存在した場合、個体別検定ではウイルスが検出されない場合でも検出が可能である。また、微小昆虫類などの夾雑物は、目視での判定に影響しなかった。本法では、保毒虫率を把握することはできない。

（3）現場レベルで実施可能

特別な機器は不要であるため、普及組織や農協等の指導機関で実施が可能であり、従来の個体別検定と比較して労力、コストの削減が図れる。

II マス検定法の具体的な手順

1 抽出方法

（1）準備物

現地圃場から回収した粘着板（商品名：BUG-SCAN 青色、分割タイプ）を準備する。速やかに検定しない場合は、粘着板をビニール袋などに入れて冷凍保管する。粘着板からアザミウマ類を回収する際に必要なものを図-3 に示す。

（2）粘着板からのアザミウマ類の剥離・分別・回収

粘着板に捕獲されたアザミウマ類が少ない場合（30 頭以下/粘着板）は、複数枚の粘着板を 1 試料とすることも可能である。その際、粘着物質溶解液を入れた同一の浸漬容器内で粘着板を順番に浸漬し、剥離・分別することができる（通常はサンプルごとに溶解液を交換する）。また、アザミウマ類が多い場合（500 頭以上/粘着板）は、浸漬前に粘着板を分割するか、剥離・分別後に

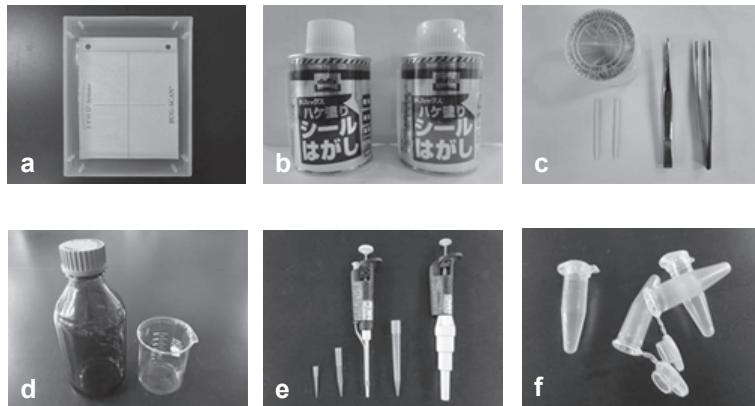


図-3 アザミウマ類を回収する際の準備物

- a 粘着板を浸漬する容器。
- b 粘着物質溶解液（商品名：ドフィックスハケ塗りシールはがし）。
- c 爪楊枝とピンセット（大型昆虫類が剥離した場合に使用）。
- d 回収ピンとピーカー。
- e マイクロピベット（P5000, P100～200）。
- f 1.5 mL マイクロチューブ。

1.5 ml マイクロチューブに回収する際に小分けする。

アザミウマ類の剥離・分別・回収方法について図-4に示す。回収した粘着板（寸法縦 12.5 × 横 9.9 cm）を浸漬容器に入れる（図-4 a）。粘着板が浸るまで、粘着物質溶解液を約 15 ml 入れる（容器寸法が縦約 14.5 × 横 11.7 × 高さ 2.5 cm の場合）。アザミウマ類と大型昆虫は剥離時間（アザミウマ類は約 2 分程度、大型昆虫は約 5 分程度）により分別し、微小昆虫は、浮遊する昆虫と沈殿するアザミウマ類などで分別する。アザミウマ類が剥離した時点で、大型昆虫が付着した状態の粘着板の片方を持ち上げて、粘着板の上に残ったアザミウマ類を、新しい粘着物質溶解液で洗い流すようにして粘着板を取り除く。浸漬容器の中で浮遊する微小昆虫と余分な粘着物質溶解液を、準備したピーカーに除去する（図-4 b）。浸漬容器の隅に沈殿しているアザミウマ類と微小昆虫を、マイクロピペットで一緒に吸い取り、1.5 ml マ

イクロチューブに回収する（図-4 c）。1.5 ml マイクロチューブの中には、粘着物質溶解液も一緒に入るので、約 1 分間静置し、粘着物質溶解液とアザミウマ類を分離させる（図-4 d）。上澄みの粘着物質溶解液を、マイクロピペットで吸い取り除去する（図-4 e）。アザミウマ類の頭数が多い場合は、一度に回収できない場合があるので、図-4 の c から e を繰り返し、すべてのアザミウマ類を 1.5 ml マイクロチューブに回収し、検定試料とする（図-4 f）。速やかに DAS-ELISA 法によりウイルス検定を実施する。速やかに検定できない場合は、検定試料をマイクロチューブケースに入れて冷凍保管する。

2 識別方法

(1) 血清診断法による IYSV の検出

アザミウマ類を回収した 1.5 ml マイクロチューブ（図-5 a）と検定方法の適否を確認するため、可能な範囲でエライザプレートごとにポジティブコントロール

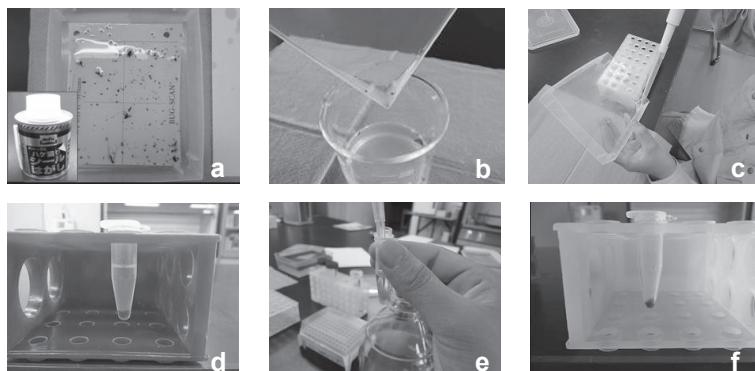


図-4 アザミウマ類の剥離・分別・回収方法

- a 粘着板を容器に入れ、粘着物質溶解液に浸す。
- b 余分な粘着物質溶解液および浮遊する昆虫をあらかじめ除去。
- c 沈殿しているアザミウマ類と微小昆虫をマイクロピペットで回収。
- d アザミウマ類を回収した 1.5 ml マイクロチューブを静置。
- e 上澄みの粘着物質溶解液を除去。
- f 検定試料（1.5 ml マイクロチューブ）。

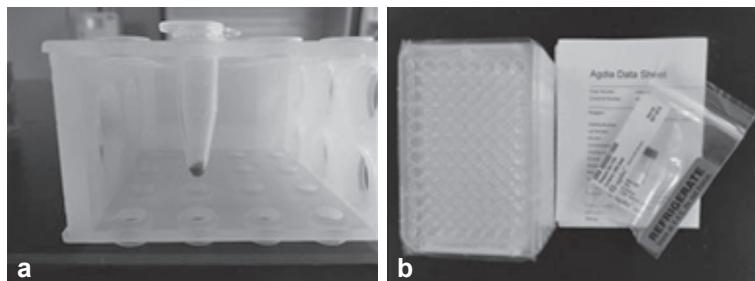


図-5 マス検定の準備物

- a 1.5 ml マイクロチューブ（検定試料）。
- b IYSV エライザキット（1,000 検体用）。

(以下、ポジコン), ネガティブコントロール (以下、ネガコン) を準備する。ポジコンは IYSV 保毒虫または感染植物とし, ネガコンは無毒虫, 非感染植物または 5% ブロッキングワンを含む PBST (Tween 20 を加えた 0.02 M リン酸緩衝生理食塩水液 (pH 7.4); 以下, PBSTB) とする。現場ではなかなかポジコンを用意するのは難しいが, ネガコンは比較対象として必要である。IYSV の検出は, DAS-ELISA 法により実施し, 抗体は Agdia 社製の IYSV エライザキットを使用する (図-5 b)。

アザミウマ類を回収した 1.5 ml マイクロチューブ内で, ペレットミキサーを使って磨碎した後, PBSTB 120 μ l を加えて検定試料とする。ポジコンおよびネガコンをネギアザミウマ (保毒虫, 無毒虫) で実施する場合は, 各 1 頭を 1.5 ml マイクロチューブ内で磨碎した後, PBSTB 120 μ l を加えてコントロールとする。また, 植物体で実施する場合は, 葉の重さに対して 10 倍量の PBSTB を加えた後に磨碎し, コントロールとする。本検定法の手順について図-6 に示す。

- (1) コーティング抗体 (Agdia 社製, 1 次抗体) を 50 mM 炭酸ナトリウム緩衝液で 200 倍に希釈し, エライザプレートに 100 μ l ずつ分注する。
37°C で 3 時間または 4°C で一晩静置する。
- ↓
- (2) コーティング液を捨て, エライザプレートを PBST で 3 回洗浄する。
- ↓
- (3) 検定試料 (回収したネギアザミウマ) をペレットミキサーで磨碎し, PBSTB を 120 μ l 加え, エライザプレートに 100 μ l ずつ分注する。
4°C で一晩静置する。
- ↓
- (4) 磨碎液を捨て, エライザプレートを PBST で 3 回洗浄する。
- ↓
- (5) コンジュゲート抗体 (Agdia 社製, 2 次抗体) を PBSTB で 200 倍に希釈し, エライザプレートに 100 μ l ずつ分注する。
37°C で 3 時間静置する。
- ↓
- (6) コンジュゲート液を捨て, エライザプレートを PBST で 5 回洗浄する。
- ↓
- (7) 4-ニトロフェニルリン酸溶液をエライザプレートに 100 μ l ずつ分注する。
37°C で 1 時間静置する。
- ↓
- (8) 目視により発色を判定

※PBSTB : 5% ブロッキングワンを含む PBST.

図-6 DAS-ELISA 法の手順

(2) ウイルス保毒の判定

基質添加後 1 時間のエライザプレート中の液の発色状況により, ウイルス保毒の判定を目視で行う。マス検定の結果について, 図-7 に示す。ネガコンの色と比較して, サンプルが黄色くなっている場合は陽性と判断する。粘着物質溶解液が, ウイルス保毒の判定に影響することはない。

一般に保毒の判定は, 過大評価にならないように発色が薄いものについては不明として取り扱うが, ここでは侵入警戒が目的であるので「疑わしきは要警戒」として, 再検定するか感染リスク評価のための精密調査を行う。

III マス検定法の利用について

1 既発生地での実証

既発生地 (愛媛県西条市) のネギ栽培圃場に 1 週間間隔で設置した 2 枚の粘着板から, 上述の剥離・分別方法によって回収した検体について, DAS-ELISA 法によって検定を行ったところ 6 月, 8 月および 10 月に IYSV が検出され, 本法の現地での有効性が確認された (図-8)。しかし, この時期は保毒虫率 (個体別検定により確認) が高い時期であり, 保毒虫が少ないことが予想される侵入警戒地では, より多くのネギアザミウマを捕獲する必要がある。なお, IYSV 検出に夾雑物 (他のアザミウマ, 微小昆虫類) の影響はなかった。

2 侵入警戒地での実証

2012 年に本法を利用した未確認地域での侵入警戒では, 徳島県 (1 市 1 町, ニラ, ネギ) および愛媛県 (3 市 1 町, タマネギ, ネギ) の新たな市町で IYSV の存在を確認し, 本法の有効性を明らかにした (表-4)。

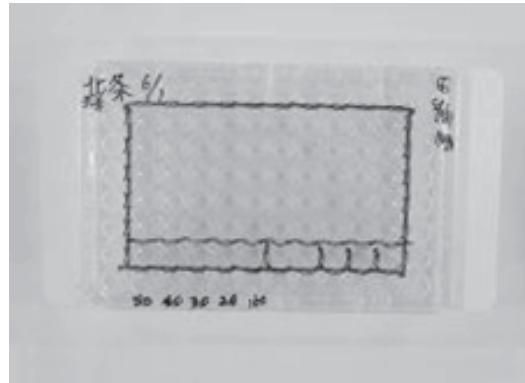


図-7 マス検定結果

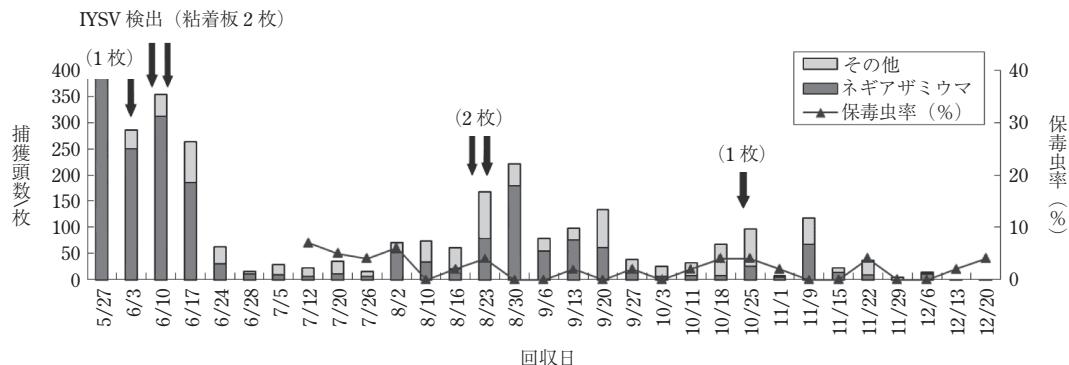


図-8 夾雑物（他のアザミウマ、微小昆虫類）を含むネギアザミウマ個体群からのIYSV検出

注) 粘着板は地上1mの位置でイボ竹にセットし、圃場対角線上の隅2箇所（合計2枚）に設置した。

7～12月までの圃場内の保毒虫率は約2.3%であった。

表-4 侵入警戒地におけるIYSV検出

調査地域 ¹⁾	マス検定 ²⁾
徳島県小松島市	+
愛媛県松山市（伊台）	+
伊予市	+
宇和島市（津島）	+
鬼北町	+

1) 2012年にIYSVを新たに検出した市町。

2) 供試頭数各100頭。

3) +：陽性反応、-：陰性反応。

無毒虫をランクとして吸光値0.1以上（目視で黄色と認識できる）を陽性と判定。

おわりに

本稿で紹介したマス検定法は、粘着板に付着した様々な昆虫類の中から媒介虫を1頭ずつ回収する手法をもとに、侵入警戒地の生産現場で対応可能とするため、より簡便に短時間で実施できるように開発した方法である。筆者ら（投稿中）は、既にマス検定の適用性を検討しており、粘着板の設置期間（回収間隔）は、捕獲されたネギアザミウマからのIYSV検出限界日数よりおおむね1週間と判断している。また、ネギアザミウマ無毒虫500頭（成虫）に対して、媒介能を有した保毒虫（成虫）が1頭の比率でも検出可能であり、個体別検定と同等以上の精度であることを明らかにしている。2012年には徳島県、愛媛県の侵入警戒地で発病前にIYSVの存在を

確認しており、新たな発生予察法の一つとして考えている。また、媒介虫であるネギアザミウマをより多く捕獲するためのトラップについては、現在、徳島県で開発中である。

本法はブロックサンプリングの1手法として利用可能で、媒介虫をより多く捕獲するための誘殺方法や設置基準等を開発すれば、既発生地での感染リスク評価として地域のリスクの濃淡を調査することも可能である。また遺伝子診断技術との組合せを開発できれば、ブラジル系が分布しない高知県でのIYSV系統の侵入警戒、ネギアザミウマ産雄性単為生殖系統の分布しない香川県、愛媛県および未発生の徳島県の地域での同系統の侵入警戒也可能である。さらに、粘着板に捕獲されたネギアザミウマからの検出のほか、現地圃場で払い落としにより、捕獲したネギアザミウマからでも検出は可能である。

今後は、他の昆虫媒介性ウイルス病にも応用できると考えているので、タバココナジラミ（トマト黄化葉巻病）やミナミキイロアザミウマ（キュウリ黄化えそ病）等にも利用するための技術開発を行う予定である。

引用文献

- 1) 福田 充ら (2007): 日植病報 73: 311～313.
- 2) _____・森島正二 (2010): 植物防疫 64: 818～821.
- 3) 古味一洋ら (2003): 平成15年度九州沖縄農業研究センター成果情報、独立行政法人農研機構九州沖縄農業研究センター、熊本。
- 4) 日本植物防疫協会: 技術情報 DAS-ELISA 法.
<http://www.jppa.or.jp/shuppan/shizai.html>
- 5) 奥田 充 (2002): 植物防疫 56: 18～21.
- 6) 植草秀敏ら (2005): 関東東山病虫研報 52: 31～34.