

メロン黄化えそウイルス (*Melon yellow spot virus*) の 迅速免疫ろ紙検定法 (RIPA 法) での診断に 利用可能な代替粒子の探索

高知県病害虫防除所 甲^が把^ぼ(安達)理^あ恵^だ*
農研機構 中央農業総合研究センター 津^つ田^だ新^{しん}哉^や

はじめに

植物ウイルスの診断には生物検定法、電子顕微鏡によるウイルス粒子の観察、遺伝子診断法および血清学的診断法等が用いられている。これらのうち、血清学的診断法の一つには Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法 (CLARK and ADAMS, 1977; KOENIG, 1981) があり、比較的検出感度が高い方法として広く用いられている。しかし、検定には最短でも2時間程度かかり、さらに若干の器機・設備を必要とするため、サンプルを実験室まで持ち帰り、検定しなくてはならない。

これに対し、Rapid immunofilter paper assay (RIPA, 迅速免疫ろ紙検定法, TSUDA et al., 1992) は、ウイルス抗体を感作した白色(無着色)ラテックス粒子をガラス繊維ろ紙に固相し、ろ紙の下端から検体磨砕液を吸い上げた後に抗体を感作した有色ラテックス粒子液を展開するという簡便な操作で、特別な器機・設備を必要とせずに5~10分程度でウイルス感染の有無を判定できる方法である。さらに、本法の検出感度を安定させるために改良が加えられた二段階操作のRIPA法 (TSUDA et al., 1993) や、簡易RIPA法 (OHKI and KAMEYA-IWAKI, 1996) が続けて開発された。

高知県病害虫防除所では、2013年頃からキュウリモザイクウイルス (*Cucumber mosaic virus*, CMV)、トウガラシ微斑ウイルス (*Pepper mild mottle virus*, PMMoV) およびメロン黄化えそウイルス (*Melon yellow spot virus*, MYSV) について、独自作製したRIPA法のキットを県内の農業振興センターに配布し、生産現場での診断に利用してきた。ところが、RIPA法に広く用いられているポリスチレン系ラテックス粒子であるG24103, G0301R およびG0304B (日本合成ゴム株式会社) が生産中止と

なり、新たに入手することが不可能となった。これらの市販粒子の代替となり得る粒子は明らかになっておらず、RIPA法キットの作製および生産現場への継続的な配布が困難となっていた。

そこで、現地指導機関から検定キットの継続的配布を強く求められているMYSVの検出を目的として代替可能な粒子を探索し、その有効性を検討した。

本稿では、現在本県で利用されている代替粒子を用いたRIPA法について紹介したい。

I RIPAの手順

1 代替粒子の抗体感作

筆者らが選抜した代替粒子 (甲把 (安達)・津田, 2014) を表1に示した。これらを OSAKI et al. (2011) の方法に準じて抗MYSV抗体 (一般社団法人日本植物防疫協会製) を感作した。抗体を感作する際の粒子濃度は、白色粒子 (W050CA) を2% (v/v)、有色粒子 (DR1040CA (赤)、DBK1040CA (黒) およびDB1040CA (青)) はすべて1% (v/v) とした。抗MYSV抗体液には最終濃度250 µg/mlとなるように0.02% (w/v) Na₂S₂O₃を添加したTBS (0.02 M Tris-HCl (pH7.2), 0.15 M NaCl) で調製した。混合液は1.5 ml マイクロチューブに240 µl ずつ分注し、ボルテックスミキサーで攪拌後、遠心機で軽くスピンドウンし、37°Cで2時間静置した。なお、静置中は30分おきに取り出してボルテックスミキサーで攪拌した。感作後は14,000 rpmの10分間で粒子を遠沈させた。その後、チューブ内の上清を除去し、TBS-BSA (先述のTBSへ0.1% BSAを添加) を600 µl 加え、ボルテックスミキサーで20分以上かけて粒子を十分に攪拌した。この洗浄作業を3回繰り返した。

2 抗体感作白色粒子の固相

ガラス繊維ろ紙 (GF/A, Whatman) を縦8 cmに切り、洗浄した白色粒子の感作液を面相筆 (FDM5-2, ぺんてる株式会社) でろ紙の表面の下端から1.5 cmの位置に線を引くように塗布した。十分乾いた後にろ紙の裏面へスプレーのり (TY-LAS1, コクヨ株式会社) を吹き付け OHP フィルム (PP2500, 住友スリーエム株式会社)

Search for Substitute Particles for Rapid Immunofilter Paper Assay (RIPA) for Detection of *Melon yellow spot virus*. By Rie GAPPÀ-ADACHI and Shinya TSUDA

(キーワード: キュウリ, メロン黄化えそウイルス, RIPA, 代替粒子)

*現所属: 高知県農業振興部環境農業推進課