

特集：菌類伝搬性ウイルス病

ELISA法によるミラフィオリレタスウイルスの検出

近畿中国四国農業研究センター特産作物部 石川浩一

はじめに

日本でのレタスピッグベイン病は1973年に和歌山県で発生したのが初報告であり、90年代後半には兵庫県、香川県で発生して急速にまん延してきた。現在、千葉県、静岡県、岡山県、徳島県、沖縄県でも発生が確認されており、国内の冬春レタス主産地のほとんどで発生が認められている状況にある。

レタスピッグベイン病の病原はレタスピッグベインウイルス (*Lettuce big-vein virus*; LBVV) とされていたが、ROGGERO et al. (2000) によりビッグベイン症状のレタスから検出される新たなウイルスが報告され、ミラフィオリレタスウイルス (*Mirafiori lettuce virus*; MiLV) と命名された。MiLVは国内のレタスピッグベイン病罹病レタスからも確認されており、現在はMiLVがレタスピッグベイン病の病原ウイルスとされている。そのため、ウイルス名については *Mirafiori lettuce virus*, *Lettuce big-vein virus* はそれぞれ、*Mirafiori Lettuce big-vein virus* (MLBVV), *Lettuce big-vein-associated virus* (LBVaV) と改名されることが国際ウイルス分類委員会第8次報告で決定しているところであるが、ここではミラフィオリレタスウイルス (MiLV), レタスピッグベインウイルス (LBVV) と記述していくこととする。

レタスピッグベイン病に限らず、発病前に病原体の存在、感染を確認することは、その後の病気の進展、拡大を阻止するための最初の段階であり、そのための検定技術の必要性は極めて高い。また、ウイルス病の場合、有効な防除法がないことから抵抗性品種導入に依存するところが大きく、その選抜、育成過程での抵抗性評価においても検定技術は不可欠なものである。現在、ウイルス検出、ウイルス病検定は血清診断法または遺伝子診断法が一般的に使用されている。検出感度の面から見ると

遺伝子診断法は極めて高く、MiLV検出に関してもその手法は既に確立されている。しかし検定にかかる費用が安価であること、一度に多数検体が処理できるという点においては血清学的診断法が優れており、筆者ら (2003) は日本植物防疫協会との共同研究で MiLVの抗血清を作製し、本抗血清を使用したELISA法を確立したのでそれについて紹介する。

I 作製抗血清の特異性

抗血清作製に当たって、抗原の調製は温室で栽培した罹病レタスから MiLVを純化して行った。前述のように、罹病レタスには MiLVと LBVVが重複感染していることから、平衡密度勾配遠心を繰り返すことで MiLVの精製を行った。しかし、純化 MiLV分画中に微量の LBVVが含まれていた場合には、作製した抗血清が LBVVとも反応してしまうことが考えられる。そこで作製した抗血清はウエスタンプロット法によりその特異性を確認した。抗血清は MiLV単独感染レタスおよび MiLVと LBVVの重複感染レタスのみと反応し、LBVV 単独感染

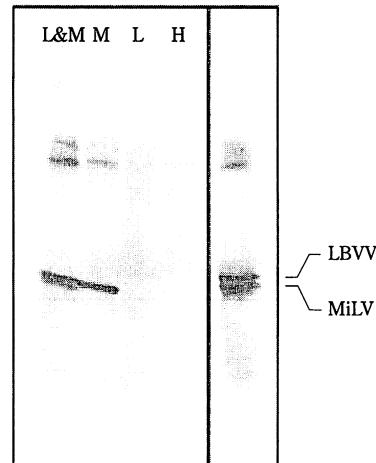


図-1 ウエスタンプロット法による抗 MiLV 血清の特異性の確認

L & M : LBVV と MiLV の重複感染レタス, M : MiLV 単独感染レタス, L : LBVV 単独感染レタス, H : 健全レタス。右端のレーンは MiLV および LBVV のバンドの位置を示す。

Detection of Mirafiori Lettuce Virus by ELISA. By Koichi ISHIKAWA

(キーワード：レタスピッグベイン病、ミラフィオリレタスピッグベインウイルス、ELISA法)

レタスおよび健全レタスとは全く反応しなかった(図1)。このことから作製した抗血清の特異性は極めて高く、血清診断に適用できると判断した。なお、本抗血清はMiLV検定試薬としてIgGと酵素標識抗体をセットで日本植物防疫協会から販売されている。詳しくは<http://www.jppn.ne.jp/kenkyusho/index.htm>を参照していただきたい。

II DAS-ELISA法

MiLV検出をELISA法で行うに当たってはMiLVの粒子形態が不安定で壊れやすいこと、そしてレタス組織内濃度が低いことから、検定操作中に粒子の安定性が保たれ、かつ検出感度および特異性が高いDAS-ELISA法を前提として検討することとした。

DAS-ELISA法によるウイルス検定は通常、 γ -グロブリンのコーティング(37°C, 2時間静置)→検定試料の添加(4°C, 1夜静置)→酵素標識抗体の添加(37°C, 3~4時間静置)→基質の添加、の手順(CLARK and ADAMS, 1977)で行われ、2日間を要する。しかし、筆者はELISA検定を行う際、事前に γ -グロブリンをコーティングしたプレートを4°Cで保存しておき、検定を1日で終了するようにしている。なお、コーティングしたプレートの保存期間について厳密な検討は行っていないが最低3か月は問題なく使用できている。そこで、MiLVの検出についてもその手順に準じた方法を検討した。

1 試料磨碎用緩衝液

レタス葉は磨碎すると酸化反応が急速に進み、磨碎溶液が褐変する。そして、そのことが時として健全葉でも反応が認められる非特異反応の原因となる。そこで、磨碎用緩衝液として使用したPBSTに各種酸化防止剤・還元剤を添加して、非特異反応の抑制効果を検討した。表-

表-1 酸化防止剤・還元剤による非特異反応の抑制効果

添加試薬	吸光値(A ₄₀₅)	
	健全葉 磨碎液	感染葉 磨碎液
10 mM アスコルビン酸ナトリウム	0.030	0.305
50 mM アスコルビン酸ナトリウム	0.017	0.265
10 mM DIECA	0.025	0.235
10 mM DTT	0.028	0.288
10 mM メルカプト酢酸	0.033	0.288
PBST(無添加)	0.055	0.334

磨碎液添加後の静置条件は37°C、2時間。

1に示すようにアスコルビン酸ナトリウムのほか、DIECA、DTT、メルカプト酢酸の添加で非特異反応の抑制が認められたが、経済性の観点からアスコルビン酸ナトリウムを、そして濃度は50 mMで使用することとした。なお、アスコルビン酸も非特異反応の高い抑制効果を示したが、添加により磨碎用緩衝液のpHが著しく低下し、その結果として特異反応も弱くなつたことから適していない。

2 試料添加後の静置温度

通常、検定試料添加後の静置は37°Cで行っているが、MiLV検出の場合、基質添加後の吸光値が予測される値よりも低くなる傾向にあった。そこで適正静置温度について37°C、30°Cおよび25°Cの3段階で検討した。磨碎試料の添加後2時間静置した場合の吸光値は30°Cのと

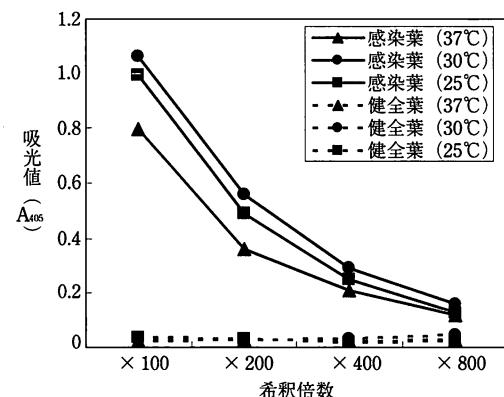


図-2 検定磨碎液添加後の静置温度が吸光値に及ぼす影響
静置時間は2時間とし、吸光値は基質添加1時間後に測定。

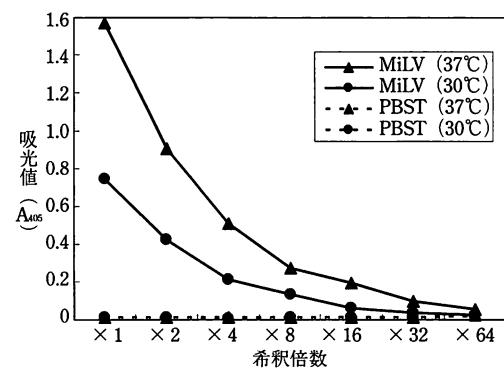


図-3 純化MiLV添加後の静置温度が吸光値に及ぼす影響
MiLV原液はOD = 0.005。静置時間は2時間とし、吸光値は基質添加1時間後に測定。

きが最も高く、次いで25℃であり、37℃の静置が最も低かった。健全レタスでの反応はどれもほぼ同じであり、非特異反応は認められなかった(図-2)。一方、検定試料として純化MiLVを用いた場合にはレタス磨碎液を用いた場合と異なり、37℃と30℃とを比較すると37℃静置の方が吸光値は高かった(図-3)。このことから、レタス磨碎液の30℃静置処理は抗原抗体反応を高めているのではなく、MiLVの分解にかかる酵素がレタス葉には含まれており、それが37℃で作用したものと推測している。

3 操作手順およびその特性

前述のように決定した試料磨碎用緩衝液、試料添加後の温度条件を基にしたDAS-ELISA法によるMiLV検出の手順は図-4に示したとおりであり、おおむね7時

- ・ IgG (1 μg/ml) をプレートにコーティング
(使用直前まで4℃で保存)
- ↓
- ・ PBSTで洗浄 (3回)
- ↓
- ・ 磨碎した検定試料をウェルに添加
- ↓
- ・ 30℃, 2時間静置
- ↓
- ・ PBSTで洗浄 (3回)
- ↓
- ・ 酵素標識抗体 (1,000倍希釈液) を添加
- ↓
- ・ 30℃, 2時間静置
- ↓
- ・ PBSTで洗浄 (5回以上)
- ↓
- ・ 基質添加
- ↓
- ・ 1時間後に判定

図-4 DAS-ELISA法による検定手順

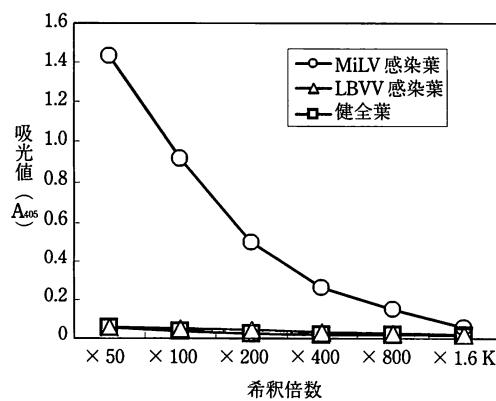


図-5 DAS-ELISAによるレタス磨碎汁液からの検出限界
MiLV原液はOD = 0.005. 静置時間は2時間とし、
吸光値は基質添加1時間後に測定。

間で約100検体の検定が可能である。IgG濃度1 μg/ml、酵素標識抗体1,000倍希釈で検定を行った場合、病徵発現レタス葉からの検出限界は800倍希釈である(図-5)。また、健全レタス苗を汚染土壤に定植して20℃で栽培した場合、病徵が出現するまでに約50日を要するが、100倍希釈磨碎液を用いた検定では約25日後にウイルス感染の判定が可能である。なお、純化MiLVでの検出限界は50 ng/mlである。

III 迅速・簡易ELISA法への適用

迅速・簡易ELISA法は高橋ら(1987)によりイネ枯葉枯ウイルスの保毒虫検定を目的として報告されている。本法はDAS-ELISA法を簡略化した方法であり、試料と酵素標識抗体を同時に処理することから感度は劣るが検定所要時間を大幅に短縮することができる。MiLVにおいても迅速・簡易ELISA法による検定が可能であり、その検定結果の信頼性は高いものである。

1 操作手順

検定手順の概略は、図-6に示すとおりである。検定試料は磨碎用緩衝液を加えて磨碎するのではなく、PBST洗浄後、プレートの各穴に検定試料(約1 cm × 1 cm)を直接入れ、穴の表面が傷つかないように塩化ビニルなどの棒で上から加圧磨碎する。次に磨碎した試料を除去せずに50 mMアスコルビン酸ナトリウムを含むPBSTで1,000倍希釈した酵素標識抗体を100 μl添加し、30℃で2時間静置する。プレートの各穴中の試料残渣を除去して十分に洗浄した後に基質溶液を加え、1時間後に判定する。このように本法は検定試料を乳鉢などを用いて磨碎する必要がないため、多試料を短時間に処理することが可能であり、約100検体の検定がおおむね

- ・ IgG (1 μg/ml) をコーティング
(使用直前まで4℃で保存)
- ↓
- ・ PBSTで洗浄 (3回)
- ↓
- ・ 検定試料をウェルに入れて加圧磨碎
- ↓
- ・ 酵素標識抗体 (1,000倍希釈液) を添加
(試料除去の必要なし)
- ↓
- ・ 30℃, 2時間静置
- ↓
- ・ PBSTで十分に洗浄 (5回)
- ↓
- ・ 基質添加
- ↓
- ・ 1時間後に判定

図-6 迅速・簡易ELISA法による検定手順

表-2 迅速・簡易 ELISA 法による検出感度

検出法	吸光値 (A ₄₀₅)	
	健全葉磨碎液	感染葉磨碎液
迅速・簡易 ELISA	0.036	0.525
DAS-ELISA (50倍希釈)	0.069	1.200
DAS-ELISA (100倍希釈)	0.063	0.574
DAS-ELISA (200倍希釈)	0.048	0.281

磨碎液添加後の静置条件は 37°C, 2 時間。

3.5 時間でできる。

2 検出感度

迅速・簡易 ELISA 法の検出感度は DAS-ELISA 法と比べて劣ること、MiLV はレタス組織内濃度が低いことから検定法として使用可能かどうかを確認する必要がある。発病レタス葉を用いて両検定法で比較したところ、迅速・簡易 ELISA 法による検出感度は DAS-ELISA 法で 100 倍希釈磨碎液を検定した場合とほぼ同程度であった（表-2）。このことから MiLV の検出法として迅速・簡易 ELISA 法は十分に活用できると考えている。しかし、試料と酵素標識抗体を同時に入れる迅速・簡易 ELISA 法では、検定試料中のウイルスと酵素標識抗体の量比によっても基質の反応程度が異なってくる場合がある。したがって、ウイルス濃度と発色程度との間に必ずしも相関があるわけではないので、定量には使用できない。ウイルス存在の有無についての判定だけに使用する。

おわりに

ウイルスの検出法は肉眼では確認できないウイルスの種を同定するうえで、そして発病以前に作物のウイルス感染有無を確認するうえで欠くことのできない技術である。

る。そして、血清学的検出法であるラテックス凝集反応法、DIBA 法、TBIA 法、RIPA 法そして ELISA 法などや遺伝子学的検出法である PCR 法、LAMP 法など、多くの手法が紹介されている。これらの手法は、それぞれ検出感度、簡便さ、検定処理数などにおいて特徴を有しており、検定目的、検定場面にあわせて選択することが重要である。ここで紹介した MiLV の ELISA 法による検定法はレタスピッグベイン病発病地における発生実態の把握もさることながら、レタスピッグベイン病抵抗性品種の選抜、育成過程における抵抗性評価の場面で使用されることを想定して検討してきた。したがって、多検体の検定が容易であること（一度に 500 検体以上の検定可能）、検定が安価でできること（1 検体当たり約 15 円）、そして比較的早期に判定できること（汚染土への定植から約 20 日で判定可能）を優先した。冒頭にも触れたが、現在レタスピッグベイン病は茨城県を除いた冬春レタスの主産地で発病しており、より品質の優れた抵抗性品種の育成が望まれている。現在、近畿中国四国農業研究センター野菜花き研究室（藤野ら、2004）をはじめ、民間種苗会社においても本 ELISA 法を用いての抵抗性品種の選抜、特性解明がなされているところであり、新しい抵抗性品種の早期育成を期待したい。

引用文献

- ROGGERO, P. et al. (2000) : Arch. Virol. 145 : 2629 ~ 2642.
- TAKAHASHI, Y. et al. (1987) : Ann. Phytopath. Soc. Jpn. 53(2) : 254 ~ 257.
- 石川浩一ら (2003) : 日植病報 69 : 328.
- 藤野雅丈ら (2004) : 園芸雑 73(別 1) : 117.
- CLARK, M. F. and A. N. ADAMS (1977) : J. Gen. Virol. 34 : 475 ~ 483.

世界におけるいもち病研究の軌跡

—21世紀の研究発展をめざして—

浅賀宏一・加藤 肇・山田昌雄・吉野嶺一 編 B5判 261頁
定価 9,975 円税込み (本体 9,500 円) 送料 340 円

1971 年以降に世界で発表された稲いもち病の関係論文延べ 6,000 件以上を分類別に収録し、その分野の専門家に研究内容の概論を執筆いただきました。巻末には「日本植物病理学会」のいもち病関係の講演要旨も収録しております。いもち病研究に不可欠な書です。

お申し込みは直接当協会へ、前金（現金書留・郵便振替）で申し込むか、お近くの書店でお取り寄せ下さい。

社団法人 日本植物防疫協会 出版情報グループ 〒170-8484 東京都豊島区駒込 1-43-11
郵便振替口座 00110-7-177867 TEL (03) 3944-1561(代) FAX (03) 3944-2103 メール : order@jppa.or.jp