

虫体圧搾処理と簡易 ELISA による簡便・迅速な イネ縞葉枯ウイルス保毒虫検定法の開発

茨城県農業総合センター 農業研究所 ^{すぎ}杉 ^{やま}山 ^{あや}恵 ^の乃
農研機構 中央農業総合研究センター ^{おくだ}奥田 ^{みつる}充・^{しば}柴 ^{たくや}卓也・^{ひらえ}平江 ^{まさひろ}雅宏・^{おおとう}大藤 ^{やすお}泰雄

はじめに

我が国におけるイネを加害する主要なウンカ類として、トビイロウンカ、セジロウンカおよびヒメトビウンカが知られている。このうち、ヒメトビウンカは直接の吸汁害は少ないものの、イネ縞葉枯ウイルス (*Rice stripe virus*, RSV) を媒介する重要害虫と位置づけられている。RSV が引き起こすイネ縞葉枯病は、古くから我が国で発生が確認されており、戦後の食糧増産を目的とした米麦作振興に伴うヒメトビウンカ発生の増加が引き金となって、1960～70 年に日本各地で大流行し、大きな減収をもたらした (鳥山, 2010)。その後、縞葉枯病抵抗性品種の開発および作付面積の増加並びに麦類の作付面積の減少に伴って徐々に発生が減少し、2000 年初頭には極めて少発生となっていた。しかし、2000 年代中ごろから、各地でイネ縞葉枯病の発生注意報が出されるなど、本病の発生面積が増大している。また、これまでヒメトビウンカは海外から大量飛来しないと考えられてきたが、2008 年には西日本で中国江蘇省からの大量飛来が確認され、九州地方のイネ縞葉枯病の多発生を引き起こしたと考えられている (OTSUKA et al., 2010)。これらはネオニコチノイド系殺虫剤に対して抵抗性が発達しており、今後、育苗箱処理による防除のみではヒメトビウンカの増殖が抑えきれず、さらなるイネ縞葉枯病の発生拡大も危惧される。

病害虫のまん延は、我が国の農業に重大な損害を与える恐れがあり、かつ、県境を越えて拡大するため、国と都道府県は協力して病害虫の防除とまん延の防止に取り組む必要があるとの考えから、発生予察事業により病害虫の発生状況などを調査し、発生予報などの情報を農業者などに提供している。発生予察事業に必要な病害虫の発生データは全国の病害虫防除所が収集するが、必要かつ十分な調査を的確に行うため発生予察事業の調査実施

基準 (最終改正 平成 26 年 4 月 1 日 25 消安第 6177 号) が定められている。我々は、RSV を保毒するヒメトビウンカの検定について、正確性を維持しつつ、より効率的に行うための迅速検定法を開発したので、ここに紹介する。

I 検定に適した手法の選別

植物ウイルスの検出には、大きく分けて、①生物学的手法、②血清学的手法、③分子生物学的手法が用いられている。このうち、①の生物学的手法は接種試験や電子顕微鏡を用いた形態観察による検出法であるが、手間と時間を要するため、未知のウイルスを検出する場合を除いて、利用される場面は少ない。②の血清学的手法は、抗原抗体反応を利用する方法であり種々の方法が開発されているが、Double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) が最も普及していると思われる。③の分子生物学的手法は、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) や Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) により目的とするウイルスに特異的な塩基配列を増幅する手法であり、試薬の改良や機械の普及に伴い、病害虫防除所などでも普及が進みつつある。これらの方法は、感度、特異性、検定にかかる時間や費用に一長一短があり、目的に応じた使い分けが求められる。発生予察事業の調査実施基準によると、「RSV 保毒ヒメトビウンカの検定には、芽出しイネ接種法 2 日間 (吸汁)、赤血球凝集反応法、ラテックス凝集反応法等により保毒虫率を求める」とされている。既に、我々は DAS-ELISA 法、ラテックス凝集反応法、reverse transcription (RT)-PCR 法、RT-LAMP 法を用いた場合における RSV 保毒ヒメトビウンカから RSV を検出する感度や正確性を比較し、発生予察事業にかかる RSV 保毒ヒメトビウンカの検定には、DAS-ELISA 法が最も適していることを論じている (一木 (植原) ら, 2013)。

II 簡易 ELISA 法

1 簡易 ELISA 法による RSV の検出

簡易 ELISA 法は、DAS-ELISA 法の変法であり、コーティング抗体を固定したプレートに検体と酵素結合 (コ

Simple and Rapid Assay to Detect Viruliferous Insects by Using Squeezing Insect Body and Simplified ELISA for Rice Stripe Virus.
By Ayano SUGIYAMA, Mitsuru OKUDA, Takuya SHIBA, Masahiro HIRAE and Yasuo OHTO

(キーワード: 発生予察, ヒメトビウンカ, イネ縞葉枯病)

ンジュゲート) 抗体を同時に加えることで処理時間を短縮する方法である。ただし、抗原濃度が高い場合、反応液中の抗原とコンジュゲートのみが反応し、吸光度が低くなることもあるため、利用場面に応じた実用性の確認が必要となる。簡易 ELISA 法によるヒメトビウンカからの RSV の検出は、TAKAHASHI et al. (1987) により既に報告されている。本法により通常 5 時間程度要する処理時間が 3 時間程度に短縮される。一方、発生予察事業における保毒虫検定においては、多量のヒメトビウンカを一頭ずつ検定する必要があるため、検体をすり潰すための処理時間がボトルネックとなっていた。そこで、我々はさらなる時間短縮のため、検体処理の簡易化を試みた。

2 虫検体処理を省力化した簡易 ELISA 法の手順

我々が開発した虫検体処理を省力化した簡易 ELISA 法の手順について、下記に整理する。虫検体の処理方法以外の試薬や操作は、簡易 ELISA 法と同様であるが、使用する試薬の液量などをヒメトビウンカ 1 個体からの RSV 検出に最適化している。

(1) 準備するもの

- ・抗 RSV コーティング抗体およびコンジュゲート抗体 (アルカリフォスファターゼ標識抗体) (日本植物防疫協会)
- ・炭酸バッファー (15 mM Na_2CO_3 , 35 mM NaHCO_3 , pH9.6)
- ・PBS-T (3.2 mM Na_2HPO_4 , 0.5 mM KH_2PO_4 , 1.3 mM KCl, 135 mM NaCl, 0.05% Tween20, pH7.4)
- ・10% ジエタノールアミン溶液 (pH9.8)
- ・p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム

96 ウェルマイクロプレート (Greiner 社 No.655061, 住友ベークライト社 MS-8596F 等の ELISA 用高結合能タイプを推奨)

(2) 操作手順

- 1) コーティング抗体を炭酸バッファーによって所定濃度 (500 倍) に希釈し、マイクロプレートの各ウェルに $100\mu\text{l}$ ずつ分注する。乾燥を防止するためプレートにプレートシールやラップフィルムなどでカバーをして、 4°C で一晚以上 (または 37°C で 2 時間) 静置して、抗体を固相に結合させる。コーティング処理したプレートは、 4°C で保存すれば半年後でも使用できると報告されており (TAKAHASHI et al., 1987), 経験上は一年後でも問題なく使用できた。このため、事前にコーティング処理したプレートをまとめて作成し、 4°C で保存しておくといよい。
- 2) 各ウェルを PBS-T で洗い流す。洗浄には、プラスチックの洗浄ピンなどを用い、各ウェルに PBS-T



図-1 簡易 ELISA に供するヒメトビウンカ圧搾処理の様子

を適量注入した後、プレートを逆さにして振り落として除去する。洗浄は 3 回行う。最後にペーパータオルに軽くたたきつけて、水分をのぞく。以後の洗浄も同様に行う。

- 3) コンジュゲート抗体を PBS-T で所定濃度 (500 倍) に希釈し、各ウェルに $50\mu\text{l}$ ずつ添加する。虫検体の胸部を中心にピンセットで挟み (圧搾処理、図-1), ウェル内のコンジュゲート液に浸漬する。圧搾処理は 1 個体ずつ行い、処理ごとにキムワイプなどでピンセットの先端を拭きとる。陰性コントロールとして無保毒ヒメトビウンカを、陽性コントロールとして RSV 感染葉を用いるといよい。その後、プレートをラップフィルムなどで覆い、 37°C で 2 時間静置する。
- 4) 各ウェルを PBS-T で 5 回洗浄する。
- 5) p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウムを 10% ジエタノールアミン溶液に 1 mg/ml となるように溶解し、各ウェルに $100\mu\text{l}$ ずつ分注する。
- 6) 15 ~ 30 分後、マイクロプレートリーダーを用いて波長 405 nm の吸光度を測定し、陰性コントロールの 2 倍以上の吸光度を示す検体を陽性と判定する。陰性コントロールを省略した場合は、吸光度 0.1 以上を目安として陽性と判定する。肉眼で判定する場合は、白紙を背景にしてプレートを目視し、ウェルがわずかでも黄色に発色しているものを陽性とする。確認のため、2 時間後に再度判定を行ってもよい。

III 虫検体処理条件について

上記の通り、虫検体圧搾処理を用いた簡易 ELISA 法により大幅に検定時間を短縮できるようになった。参考までに、検討の過程において得られたデータを紹介する。

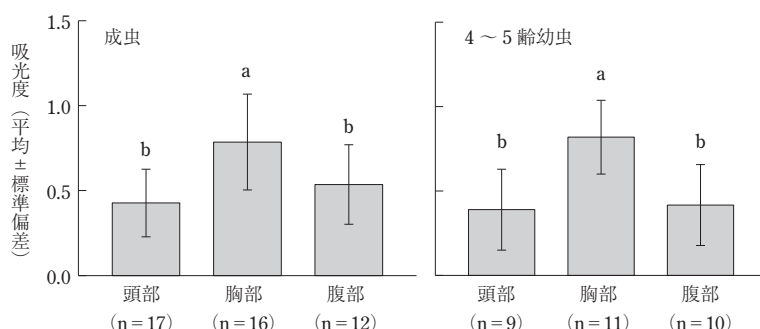


図-2 圧搾部位による陽性判定検体の吸光度の比較

圧搾部位の検討は成育ステージごとに同じプレート内で行い、プレート間のバックグラウンド値の違いが解析結果に影響しないようにした。

基質溶液添加から 15 分後の吸光度を示す。

同じ英文字でつながっていない水準は有意に異なる (Tukey-Kramer HSD 検定, $\alpha = 0.05$)。

1 虫検体の圧搾部位

簡易 ELISA 法において、RSV を最も効率よく検出できる虫検体の圧搾部位を明らかにするため、RSV 保毒ヒメトビウンカ個体群の頭部、胸部、腹部をピンセットで圧搾した後、簡易 ELISA 法を行い、陽性検体の吸光度を比較した。供試ヒメトビウンカは、成虫と 4～5 齢幼虫を用い、2～3 齢については、ピンセットによる圧搾ではほぼ全身が潰れるため省略した。

その結果、成虫、4～5 齢幼虫ともに胸部をピンセットで圧搾した場合に有意に高い吸光度が得られ (図-2)、胸部を中心に圧搾することで効率よくウイルスを反応液中に溶出させることができることが示された。虫検体胸部の圧搾では、サイズの小さい頭部や比較的柔軟な腹部を圧搾する場合と比べて容易に虫検体を破壊できることが、他の部位を圧搾した場合と比較して高い吸光度が得られた要因ではないかと考えられる。ただし、頭部、腹部を圧搾した場合でも十分高い吸光度が得られ、実用上は圧搾部位を気にする必要はないと思われる。

2 圧搾処理による結果の明瞭性

虫検体の胸部圧搾処理では、摩砕処理に比べて反応液中へのウイルスの溶出が少なくなり、発色が不明瞭となる可能性が考えられた。そこで、虫検体の胸部圧搾処理においても摩砕処理と同様に明瞭な発色を得ることができるか検討するため、RSV 保毒ヒメトビウンカ個体群の雄成虫、雌成虫、2～3 齢幼虫および 4～5 齢幼虫を用いて、虫検体の胸部圧搾処理と摩砕処理を行い、吸光度を比較した。

その結果、胸部圧搾処理と摩砕処理ともに陽性判定検体は健全検体の 10 倍以上の吸光度を示し、処理間では

4～5 齢幼虫を供試した場合を除いて吸光度に有意差は認められなかった (図-3)。4～5 齢幼虫でも陽性検体の吸光度は健全検体の 10 倍以上であり判定には支障はないと思われる。なお、すべての陽性検体は肉眼での判定に支障のない明瞭な発色が認められた。

3 野外採集個体群からの RSV 検出

発生予察調査においてヒメトビウンカの採集時期や成育ステージにかかわらず胸部圧搾処理により保毒個体を検出できることを確認するため、野外から採集した様々な成育ステージのヒメトビウンカを用いて胸部圧搾処理と摩砕処理による検出結果の比較を行った。胸部圧搾処理した虫検体を、コンジュゲート液を添加したプレートのウェル内に浸漬して 2 時間静置した後、コンジュゲート液を添加した別のプレートに移し替え摩砕処理し、検定結果を比較した。

その結果、虫検体の採集時期や成育ステージにかかわらず供試した 99.8% の検体で陽性・陰性の結果が一致した (表-1)。圧搾処理で陰性だったものが摩砕処理で陽性になる事例は 1 例も認められず、胸部圧搾は確実に RSV を検出できることが示された。一方で、圧搾処理が陽性、摩砕処理が陰性となる検体が 2 例認められた。この 2 検体については、捕虫網によるすくい取りなどの過程で潰れた他の保毒個体の体液が付着したことが原因であると推察され、事例はわずかであるが採集後の検体の取り扱いに注意が必要であることが示された。

IV 今後の課題と展望

今回紹介した虫検体圧搾処理と簡易 ELISA 法による RSV 保毒虫検定は、病害虫防除所や試験場等の病害虫

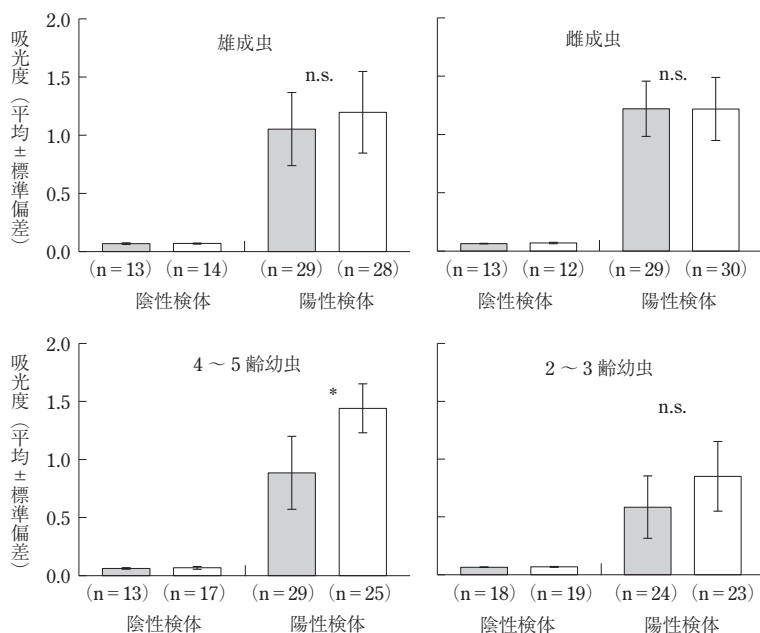


図-3 圧搾処理 (■) と摩砕処理 (□) の陰性判定および陽性判定検体の吸光度の比較

圧搾処理と摩砕処理は、虫検体の雌雄および成育ステージ別に同一プレート内で行い、プレート間のバックグラウンド値の違いが解析結果に影響しないようにした。

基質溶液添加から 15 分後の吸光度を示す。n.s.: 有意差なし, *: $P < 0.05$, ANOVA.

表-1 ヒメトビウンカの野外採集個体を用いた簡易 ELISA における処理方法の違いによる RSV 検出結果の比較

		摩砕処理		計
		陽性	陰性	
圧搾処理	陽性	182	2	184
	陰性	0	1,059	1,059
	計	182	1,061	1,243

発生予察の現場で使用されることを想定して作業効率の向上やコスト低減を目標とした。その結果、十分な検出感度を得られることはもちろんのこと、多検体（一度に 500 検体以上）の検定が容易になること、検定費用が安価であること（1 検体当たり約 20 円）、比較的速やかに結果が得られる等の優位性が実現できた。実際に計測した事例では、一人の検定者が 500 検体の保毒虫検定に要した時間は約 3 時間とラテックス凝集反応法と同程度であり、DAS-ELISA 法と比較して約半分の時間で結果が得られた。

本手法は発生予察事業の調査実施基準の改訂時に取り入れられる予定であり、多くの病害虫防除所で本手法が

採用されることを期待している。簡易 ELISA 法以外の手法から簡易 ELISA 法に検定手法を切り替えた場合には、切り替え前後でのデータの継続性が議論となる可能性がある。現在、農林水産省の委託事業である「発生予察調査実施基準改良事業」の中で、中央農業総合研究センター、茨城県、埼玉県、兵庫県の共同で、RSV 保毒虫検定に用いられているラテックス凝集反応法、DAS-ELISA 法と簡易 ELISA 法との検出結果の比較を行っている。また、平成 26 年には本手法の普及に向けて中央農業総合研究センターでは、「イネ縞葉枯ウイルスを保有するヒメトビウンカの簡易検定法およびイネ縞葉枯病の防除対策に関する研修会」を実施している。

イネ縞葉枯病の発生拡大にともない、今後も広い地域で本病による被害が生じることが危惧される。病害虫発生予察の現場では、イネ縞葉枯病の発生を的確に把握し、早期の対策を促すため、ヒメトビウンカの発生時期や発生量とともに RSV 保毒虫率を把握し、適期に情報を発信していく必要がある。圧搾処理と簡易 ELISA 法の採用による作業の簡便化、迅速化、省力化により、サンプル採集から検出結果を得るまでの時間を大幅に短縮

できることで、より速やかな発生予察の実施と情報提供の助けとなることを期待する。

引用文献

- 1) 一木（植原）珠樹ら（2013）：応動昆 **57**：113～116.
- 2) OTSUKA, A. et al. (2010) : Appl. Entomol. Zool. **45** : 259～266.
- 3) TAKAHASHI, Y. et al. (1987) : Ann. Phytopath. Soc. Japan **53** : 254～257.
- 4) 鳥山重光（2010）：水稻を襲ったウイルス病—縞葉枯病の媒介昆虫と病原ウイルスの実像を探る—補遺：高田鑑三の論文「萎縮病稲試験成績」（1895）の再評価，創風社，東京，306 pp.

発生予察情報・特殊報（26.11.1～11.30）

各都道府県から発表された病虫害発生予察情報のうち，特殊報のみ紹介。**発生作物：発生病虫害**（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虫害。

※詳しくは各県病虫害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。

■プラタナス：プラタナスグンバイ（岩手県：初）11/26