

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^ば (安達) 理^り 恵^え*
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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように 0.02% (w/v) NaN_3 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

表-1 RIPA法の抗体感作に用いた代替粒子の特性

品番	色	粒子径 (μm)
W050CA	白	0.51
DB1040CA	青	0.39
DR1040CA	赤	0.41
DBK1040CA	黒	0.39

供試粒子はいずれもポリスチレン系ラテックスである。
販売元はいずれも Thermo Fisher Scientific K.K. である。

へ貼り付けた。接着後、上下が確認できるように上端部に印をつけ、0.5 cm 幅に切ることにより、縦 8 cm、横 0.5 cm のストリップを作製した。

3 抗体感作有色粒子の希釈

有色粒子の感作液は TBS-BSA で 8.0% (v/v) 濃度に希釈することにより、標識粒子液とした。

4 検定

(1) 代替粒子を用いた RIPA 法の有効性の調査

代替粒子を感作して作製した RIPA 法のキットにおいて、健全キュウリ葉の粗汁液が本検出系の反応に及ぼす影響について調査した。

健全キュウリ葉 0.1 g を 1 ml の抽出用緩衝液 (0.05 M リン酸緩衝液 (pH7.0), 10 mM EDTA, 0.1% 2-メルカプトエタノール, 0.2% BSA, 0.15% PVP-40, 0.1% スキムミルク, 0.1% NaN_3) で磨砕し、10% (w/v) 濃度の粗汁液を作製した。なお、以後の試験において検定に供したキュウリ葉はすべて冷凍葉である。100 μl の粗汁液を 2.0 ml 平底チューブ (SC-0200, INA・OPTICA Co., Ltd.) へ分注し、ストリップの下端を 1~5 分間浸した。ストリップが抽出液をすべて吸い上げた後、ストリップの下端を 5 mm 程度切除し、代替有色粒子 (DR1040CA (赤), DBK1040CA (黒) および DB1040CA (青)) で作製した 100 μl の標識粒子液にそれぞれ浸し、約 5 分静置した。

その結果、いずれの標識粒子液を用いてもキュウリ健全葉からの検出で非特異反応は見られなかった (データ省略)。

次に、先述の代替白色粒子 (W050CA) と代替赤色粒子 (DR1040CA) の組合せで作製した RIPA 法のキットと、現法のキットを用いて MYSV 検出時の反応性を比較した。検定試料として、MYSV 感染キュウリ葉 (発病程度: 黄化を伴うモザイク症状) 0.1 g を 1 ml の抽出用緩衝液で磨砕した 10% (w/v) 濃度の粗汁液を用いた。

その結果、代替粒子の組合せは、現法と比較して同等の反応を示した (図-1)。

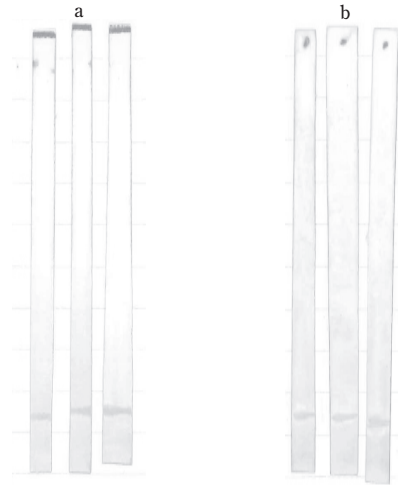


図-1 代替粒子を用いた RIPA 法による MYSV の検出感度 (ストリップはそれぞれ 3 反復)
a: 代替粒子による RIPA, b: 現法 (対照)。

II 代替粒子を用いた RIPA 法の感度

1 検出に適した粗汁液の濃度の調査

代替粒子を用いた RIPA 法の感度を詳細に調査するため、発病程度が異なる MYSV 感染キュウリ葉をそれぞれ用いて、MYSV の検出を行った。粗汁液は抽出用緩衝液で段階希釈し、0.1~10% (w/v) 濃度に調整した。

その結果、発病程度が強から中の感染葉では粗汁液濃度が 10% (w/v) の場合のバンドはやや薄くなる傾向が認められたが、1% (w/v) および 5% (w/v) の粗汁液を検定に用いた場合の陽性バンドは明瞭であった (表-2)。粗汁液濃度が 0.5% (w/v) の場合は、陽性バンドは 1% (w/v) および 5% (w/v) の粗汁液のバンドよりもやや薄かった。一方、発病程度が弱い感染葉を検定に用いた場合は、粗汁液濃度が 1% (w/v) および 5% (w/v) と同様に 10% (w/v) 粗汁液でも陽性バンドが明瞭に確認された。粗汁液濃度が 0.1% (w/v) の場合は、陽性バンドはやや不明瞭となる傾向があった。以上から代替粒子をもちいた RIPA 法で MYSV の検出を行う際、最適な粗汁液の希釈濃度は 1~5% と推察された。

2 代替粒子を用いた RIPA 法の検出精度の検討

代替粒子を用いた RIPA 法と ELISA 法 (CLARK and ADAMS, 1977) との検出精度を MYSV の発病程度の異なる多数のキュウリ葉を用いて比較した。なお、キュウリ葉は抽出用緩衝液で磨砕し、粗汁液は 2% (w/v) 濃度とした。

その結果、供試したすべての検体は本法と ELISA 法

表-2 代替粒子を用いた RIPA 法^{a)} による MYSV 感染キュウリ葉からの検出

MYSV の 発病程度 ^{b)}	粗汁抽出液の希釈濃度 (%)				
	10	5	1	0.5	0.1
強	+ ^{c)}	++	++	+	±
中	+	++	++	+	+
弱	++	++	++	+	±

^{a)} W050CA (2%) -DR1040CA (1%) (感作時の粒子濃度)。

^{b)} 強: 激しい黄化およびモザイク, 中: 黄化を伴わないモザイク~黄化を伴うモザイク, 弱: 無病徴~ごくわずかなモザイク。

^{c)} ++: 明瞭なバンドが確認される, +: 肉眼でバンドが確認可能, ±: 肉眼でバンドが確認可能であるがやや不明瞭。

表-3 代替粒子を用いた RIPA 法と ELISA 法による キュウリ葉からの MYSV 陽性反応数

供試葉	発病程度 ^{a)}	供試葉数	代替粒子を用い	ELISA
			た RIPA	
MYSV 感染葉	強	32	32 ^{b)}	32 ^{c)}
	中	9	9	9
	弱	31	31	31
健全葉	無	30	0	0

^{a)} 強: 激しい黄化およびモザイク, 中: 黄化を伴わないモザイク~黄化を伴うモザイク, 弱: 無病徴~ごくわずかなモザイク。

^{b)} 肉眼で判定できるバンドが出現した数。

^{c)} 基質添加 1 時間後に肉眼で変色が確認できた数。

のいずれでも同様の結果が得られた (表-3)。

以上より, 代替粒子を用いた RIPA 法は現法と同様に MYSV の検出に有効であることが明らかとなった。

III 代替粒子を用いた RIPA 法の普及状況

代替粒子を使用した RIPA 法のキットは, 現在病害虫防除所で作製し, 高知県内の各農業振興センター普及部門へ配布している。また, CMV と PMMoV についても検討したところ, 代替粒子の有効性が確認されたため, これらについてもキットを作製し, 配布している (データ未発表)。これまでに複数県の関連機関から本技術についての問い合わせがあり, キットの作製や検出方法について技術提供を行っているところである。

おわりに

植物ウイルスの検定法には RIPA 法のほかにも PCR 法や ELISA 法, DIBA 法および市販のイムノクロマトキットによる検定など様々な手段がある。

このうち PCR 法は検出感度が最も高い技術であるが, ある程度の技術と特別な器機を必要とし, 生産現場での検定には不向きである。ELISA 法と DIBA 法は PCR 法よりも簡易に行えるが, それでも検定には数時間を要し, さらに若干の器機を必要とするため, これらも生産現場での検定には不向きと考えられる。市販のイムノクロマトキットは RIPA 法と同様に器機, 設備を必要とせず, 検定方法も簡易かつ数分程度で検出が可能であることから, 生産現場での検定方法に適していると考えられる。しかし, イムノクロマトキットは比較的高価であるため, 検定に要する費用の負担が大きい。また, イムノクロマト法による MYSV の検定キットは現在市販されていないため, 生産現場では利用できない。

一方, 本代替粒子を用いた RIPA 法は, イムノクロマト法と比べて検出感度は劣るものの, MYSV の症状がごくわずかな罹病サンプルからも検出が可能であること, 検定方法が簡易かつ 5 ~ 10 分程度で検定できること, 1 サンプル当たりの検定費用が数十円と安価であることから, 労力的にもコスト的にも利用者への負担が少なく, 生産現場での検定に適していると考えられる。

本代替粒子を用いた RIPA 法が生産現場で利用されることにより, キュウリ黄化えそ病の被害抑制の対策の一助となればと考えている。

引用文献

- 1) CLARK, M. F. and A. N. ADAMS (1977): J. Gen. Virol. 34: 475 ~ 483.
- 2) 甲把 (安達) 理恵・津田新哉 (2014): 四国植防 48: (印刷中).
- 3) KOENIG, R. (1981): J. Gen. Virol. 55: 53 ~ 62.
- 4) OHKI, S. and KAMEYA-IWAKI, M. (1996): Ann. Phytopathol. Soc. Japan. 62: 240 ~ 242.
- 5) OSAKI, H. et al. (2011): J. Gen. Plant Pathol. 77: 307 ~ 311.
- 6) TSUDA, S. et al. (1992): Plant Dis. 76: 466 ~ 469.
- 7) ——— et al. (1993): Ann. Phytopathol. Soc. Japan. 59: 200 ~ 203.