調査報告

我が国の植物防疫における血清学的診断法の需要に関する調査

沖縄県病害虫防除技術センター　眞境名　元　次*

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構
九州沖縄農業研究センター　冨　高　保　弘

電子版

はじめに

植物の病害の診断同定は病原体の種を明らかにすることによって，その伝染環や病原性に基づいた防除対策が実施できるために重要である。これまでに開発されてきた病害の診断手法は，生物学的診断法，血清学的診断法および分子生物学的診断法に大別され，利用場面に応じて使い分けられている（久能ら，1998；難波，2008）。生物学的診断法は病害と疑われた植物を同種の健全植物や判別宿主と呼ばれる植物種に接種し，それら植物の症状を観察して種を推定する方法である。血清学的診断は病原体の表面などのタンパク質等を抗原として家兎やマウス等に免疫して得られた抗血清あるいは抗体を用いて，抗原抗体反応で病原体を検出する手法である。分子生物学的診断法は病原体由来の RNA や DNA を逆転写―ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）やポリメラーゼ連鎖反応（PCR）で検出する手法である。

それらの診断法のうち血清学的診断法は 1970 年代に確立され，今日に至るまで広く利用されている。その理由としては，本法は簡便かつ迅速な診断が可能であるためであり，都道府県の公設試験場などにおいて，生産現場で発生した病原体の診断に今でも広く利用されている。抗原・抗体反応を利用した診断法のうち，一般的に利用されている方法としては enzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）法，Rapid immunofilter paper assay（RIPA）法および Dot immuno-binding assay（DIBA）法がある。Double antibody sandwich ELISA（DAS-ELISA）法は，ウイルス抗原に対して特異的な抗体をプレートに吸着させ，ウイルス抗原（感染葉の摩砕汁液），酵素標識抗体を順に反応させ，最後に発色させる方法である（Clark and Adams, 1977）。一方，RIPA 法はサンプルをバッファーで摩砕し，その液に検査紙の先端を浸漬して液を展開させて特定の位置にバンドが確認されれば陽性反応として判断され，診断に要する時間はおよそ 15 分以内である（Tsuda et al., 1992；大崎，2012）。このように本法は，簡便かつ迅速に診断できることから生産現場において最も適している診断手法の一つとなっている。DIBA 法はウイルス抗原（感染植物の摩砕汁液）をニトロセルロース膜やろ紙に吸着させ，ウイルス抗原に対して特異的な抗体，酵素標識抗体を順に反応させたのち，基質を加えて発色の有無で検定する方法である（櫛間義幸，2017；Kubota and Tomitaka, 2019）。

近年，RT-PCR 法や PCR 法等の遺伝子診断技術の開発も飛躍的に進み，一度の操作で複数の病原体を検出する手法が開発されているが（Uga and Tsuda, 2005；Kuwabara et al., 2010），上述のような血清診断法は農業生産現場で実施できることから，現在でも需要が大きい。一方，それら血清学的診断法に使用するための試薬やキットは，国内外の企業などから上市されているが，検定できる病原体の種類が限られている。また，現在国内において流行している病害に対する血清学的診断法がない場合も認められる。実際に，筆者らは RIPA 法などの血清学的診断法をよく利用しているが，必要な抗体（抗血清）の入手に苦労している。例えば 1982 年に沖縄県のスイカで初めて報告され，最近では本州地域でも発生が報告されてきているスイカ灰白色斑紋ウイルス（watermelon silver mottle otrhotospovirus, WSMoV）については，血清学的診断法の確立の要望が大きいもののいまだ開発に至っていない。このような場合，沖縄県病害虫防除所などが独自に WSMoV に対する抗体（抗血清）の作製することも想定されるが，コストなどの観点から県単独では困難である。このような背景のもと，我が国における血清学的診断法の確立が求められている病原体や手法に関する情報を得ることを目的として，都道府県の公設試験場における血清学的診断法のニーズに関するアンケート調査を実施したので，その結果を報告する。

Survey on the Usage of Serological Diagnoses for Plant Protection in Japan.　By Motoji Majikina and Yasuhiro Tomitaka

（キーワード：ウイルス，血清学的診断）

*現所属：沖縄県糖業農産課