

## 稲縞葉枯病ウイルス保毒検定法としての 抗体感作赤血球凝集反応の実用性について<sup>1)</sup>

小山 光 男  
(農林省四国農業試験場)

### はじめに

ヒメトビウンカが稲縞葉枯病ウイルスを持っているかどうかを知る手段としては、従来イネ、コムギなどの無毒幼苗に供試虫を寄生させて発病の有無によって判定する方法(吸汁テスト, test feeding)が唯一のものであった。このような生物検定法はいろいろな生物的要因や検定条件が検定結果に影響するために再現性が低く不安定なものである。また発病までに少なくとも6~7日の潜伏期間があるため、労力的にも不利な方法である(新海, 1962)。このような点を克服するために、安尾, 柳田(1963)がはじめた抗体感作赤血球凝集反応を判定に用いる方法(以下血清反応法という)は、簡便かつ迅速に検定できる画期的な方法とされている。

生物検定法である吸汁テストは保毒の有無をしらべるというよりは媒介能力の有無, 強弱を知る方法であるから, 理論的に言って血清反応の結果とは異なると考えられる。これがどれほどのくいちがいをもつかを知ることは保毒検定結果を理解する上で大切であると考えられるので, 著者は, この点について検討を試みた。また血清反応法といえども供試虫の条件, とくに発育ステージによって検定結果が変動することが考えられるのでこの点についても検討を加えた。

また, 血清反応法の精度を保証する条件として, 死亡後時間が経っていないことが必要であるが, 実際の調査にあたってはこの条件がむしろきびしすぎる条件となる場合がある。著者らは圃場におけるヒメトビウンカの消長をしらべるために黄色水盤を用いているが, これに飛来したヒメトビウンカは盤内に満たした展着剤を含んだ水におぼれて間もなく死亡する。このような死亡虫には血清反応法が全く利用できないかどうかを知るために, 類似の条件下で想定実験を試みたので, あわせて報告する。

この研究については, 血清反応法を行なうに必要ないろいろな手法などを当該病害研究室木曾皓技官から教示していただいた。記して深く謝意を表わす次第である。

### 血清反応法と吸汁テストの比較

血清反応の精度が保証されているかぎり, その結果得られる反応陽性率の値が同じ供試虫で行なった吸汁テストのそれよりも低く現われることはあり得ない。いわんや吸汁テストでは判定を検定植物の発病をとおして行なうために, 吸汁をさせる時間が充分でなかったり, 検定植物が少しでもウイルスに感染, 発病しにくい条件にあると, 検定される個体が実際に保毒していても, ときに無毒(媒介力をもたない)と判定されることが起りがちで, それだけ吸汁テストの検定値は低く出ることになる。このような差がどの程度のものか, またこの2方法に起るくいちがいが当然の結果とみなされるものかどうかを確かめるために, 稲縞葉枯病ウイルスを保毒媒介するヒメトビウンカを用いて検定実験を行なった。

1) Problems on the application of hemagglutination test for the detection of the rice stripe virus in the insect *Laodelphax striatellus* Fallen. By Mitsuo Oyama. Proc. Assoc. Pl. Prot. Sikoku., No. 2 : 39-44 (1967)

## (1) 試験方法

供試虫 — 個体群の保毒虫率がいろいろなレベルの場合を試みるために、ウイルスが経卵感染のみによって次代に伝えられる実験個体群 — 世代とともに保毒虫率は低下する — を用いて世代を追って供試した。系統的には普通寺系と京都系のものである。また別に無毒幼虫に発病コムギから獲得吸汁させた個体群も用いた。

血清反応法 — 安尾・柳田 (1963) の方法に改良を加えた木谷・木曾 (1966) の方法によって、抗体および抗体感作赤血球を作製、その力価は高く 62500 倍に稀釈しても反応を判定できるほどであった。この検定は吸汁テストを終り、雌成虫に 4 日間産卵させたのちに実施した。検定の結果の精度をたしかめるために次世代仔虫 (3~4 令) についても血清反応を用いて検定した。

吸汁テスト — 試験管 (18×18 cm) に 3cm 程度に育った無毒のコムギ幼苗をいれ、これに検定虫を 1 頭ずつ放って 25°C ~ 28°C, 18 時間照明下で 4 日間吸汁させたのち、コムギ苗は木箱に植付けガラス室 (冬期は加温) に保護して 30~40 日後に発病の有無をしらべた。経卵感染個体群については 1 令後期から 4 日間ずつ 5 回吸汁テストを行ない、獲得吸汁個体群の場合には獲得吸汁を終わってから 4 日ずつ 2 回吸汁テストを実施した。数回のテストの結果一度でもコムギを発病させた場合を陽性と判定した。

## (2) 検定結果および考察

吸汁テストと血清反応の検定結果を比較することは必ずしも容易ではなかった。吸汁テストは一応できていても血清反応を行なうまでに死亡する個体はかなりあったからである。また、吸汁テストの場合に検定コムギ苗が判定日までに枯れてしまって判定不能となったテストもかなりあった。したがって、この 2 方法を比較するにあたっては、一方のテストが不能となった場合や、吸汁テストが 3 回以下しかできなかった場合を除外して結果をまとめた。

すべての場合に吸汁テストの結果は、血清反応の結果より低い保毒虫率を示したが、吸汁テストで保毒が判定されたもので血清反応は陰性となった場合はなかったし、血清反応で陽性であった雌成虫の次世代仔虫の中には必ず陽性個体 (経卵保毒したもの) が相当数検出され、陰性成虫からは陽性次代仔虫はあらわれなかった。このことは血清反応による保毒の判定がきわめて精度のよいものであることを示している。

血清反応と吸汁テストを比較するために、検定の結果を図示したのが第 1 図である。図が示すように、保毒虫率の大小にかかわらず、吸汁テストの結果より血清反応の結果得られる保毒虫率の方が常に高い値を示す。その差は約 10% と推定されるが、このくいちがいが単に検定精度の差にもとづくものか、あるいは保毒と媒介という現象のレベルのちがいも含まれているのかについては何とも言えない。

## 検定虫の発育ステージと血清反応の精度

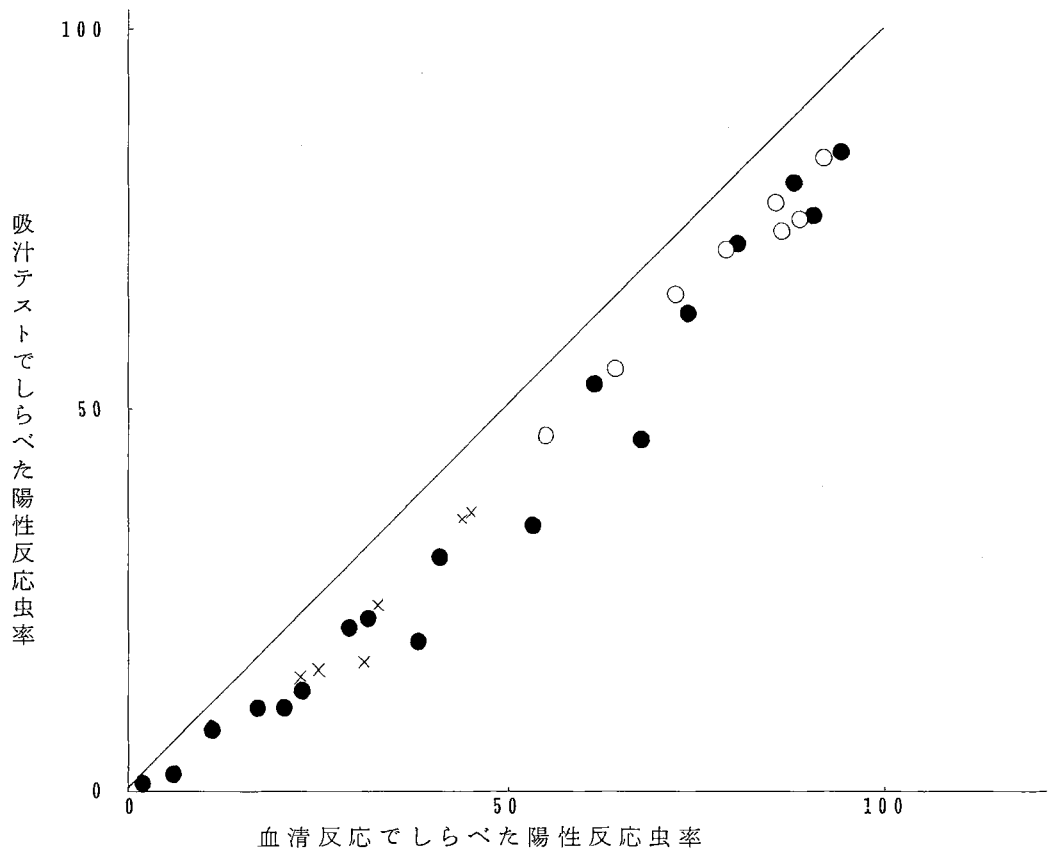
野外で保毒虫率をしらべる場合に、検定に用いるヒメトビウソカバの発育ステージをいつも一定にそろえることは必ずしも容易ではない。一方若令仔虫は体が小さいので血清反応によっても保毒の有毒を正確に検出できるとはかぎらない。こうした懸念をどの程度除きうるかを知るために実験室の系統を用いて検定を行なった。

## (1) 試験方法

経卵的に保毒している飼育室系統のふ化幼虫を集めて集団飼育しながら、毎日 100 頭ずつとりだして令期を判別するとともに、これらについて血清反応法によって保毒検定を行なった。反応の結果は 4 段階の判定基準にしたがって記録した。

## (2) 検定結果および考察

供試した個体群の保毒虫率は約 85~90% と推定されたが、これを 1~2 令のような若令仔虫で検定するときわめて低い保毒虫率しか得られない。しかし、4~5 令虫になると成虫における検定結果とほとんど差のない程度の値が得られた。(第 1 表)。このような若令虫における低い保毒虫率は当然陽性の反応を示すべき個体が疑陽性 (±), あるいは完全陰性を示すことによってもたらされたものであり、恐らくは体が小さいことから検出精度の低下と考えられる。したがって野外でも 1~2 令のような若令虫は検定の対象にすることから除外するのが妥当というべきである。



第1図 血清反応と吸汁テストの検定結果の比較

- ：経卵感染によってのみ保毒した個体群（普通寺系）。
  - ：同 上（京都系）。
  - ×：新しく獲得吸汁によって保毒した個体群。
- 実線は等反応虫率線を示す。

第1表 いろいろな発育ステージのヒメトビウカについて行なった血清反応の判定結果  
(保毒雌成虫から得られた次世代虫を供試)

区 分	令期又は性別	検定虫数	反 応 程 度 別 虫 数				保毒虫率 <sup>1)</sup>
			++	+	±	-	
幼 虫	1 令	292	0	76	99	127	26.0 %
	2	311	21	166	67	57	60.1
	3	298	188	59	7	44	82.9
	4	271	224	5	1	41	84.5
	5	377	321	0	1	55	85.1
成 虫	♀	358	307	0	1	50	85.8
	♂	647	577	0	2	68	89.2
	♀+♂	1005	884	0	3	118	88.0

註 1) ++ と + の反応を示した個体を陽性虫とした。

### 致死後時間を経過した検定虫に対する血清反応法の利用限界

試験場から遠くはなれた圃場でヒメトビウンカを採集して持ち帰るまでには死亡する個体も少なくない。また水盤などで誘殺したものは時間がたつと体が水を吸って膨軟となり、やがては腐敗状態になる。このような致死個体は全く血清反応に用いられないのかどうかについて、2, 3の異なる致死条件を与えて検定を試みた。

#### (1) 試験方法

次の3方法によってヒメトビウンカ成虫(集団飼育した京都系経卵保毒個体群)を致死させ、それぞれ致死後2, 4, 8, 16, 24時間を経過した個体について血清反応を試みた。

- i 水浸漬(展着剤リノール0.0025%加用)
- ii 1%食塩水浸漬(展着剤リノール0.0025%加用)
- iii 乾燥処理(エーテルで処理したのちデンケーターに入れ乾燥状態においた)。いずれの区も30°C保護。

#### (2) 試験結果および考察

検定の結果をまとめると第2表のとおりである。

第2表 異なる方法で致死させたヒメトビウンカ成虫の致死(処理)後の経過時間と血清反応の検定結果(保毒雌成虫から得た次代成虫を供試)

区 分	処理後の時間	性別	検定虫数	反 応 程 度 別 虫 数				保毒虫率
				++	+	±	-	
無 処 理	0	♀ ♂	155	130	0	0	25	83.9%
			146	134	2	1	9	93.2
水 浸 漬 展着剤 0.0025% 加用	2	♀ ♂	46	42	0	0	4	91.3
			41	32	0	0	9	78.0
	4	♀ ♂	64	58	0	0	6	90.6
			46	40	0	0	6	87.0
	8	♀ ♂	59	44	5	1	9	83.1
			50	42	2	0	6	88.0
16	♀ ♂	52	48	0	1	3	92.3	
		60	55	0	1	4	91.7	
24	♀ ♂	51	36	5	3	7	80.4	
		44	24	14	1	5	86.4	
1%食塩水浸漬 展着剤 0.0025% 加用	2	♀ ♂	46	41	0	0	5	89.1
			46	39	0	1	6	84.8
	4	♀ ♂	43	36	1	0	6	86.0
			53	45	0	0	8	84.9
	8	♀ ♂	61	49	1	0	11	82.0
			55	48	0	0	7	87.3
16	♀ ♂	47	42	0	1	4	89.4	
		43	35	4	0	4	90.7	
24	♀ ♂	53	43	4	1	5	88.7	
		41	24	11	1	5	85.4	
乾 燥 処 理	2	♀ ♂	56	48	0	0	8	85.7
			54	49	0	1	4	90.7
	4	♀ ♂	55	50	0	0	5	90.9
			48	40	0	1	7	83.3
	8	♀ ♂	51	25	14	1	11	76.5
			66	20	33	1	12	80.3
16	♀ ♂	45	27	6	2	10	73.3	
		47	16	18	6	7	72.3	
24	♀ ♂	51	19	15	4	13	66.7	
		49	12	21	5	11	67.3	

水浸区と1%食塩水浸漬区はいずれも水盤飛込虫を想定したものであるが、後者は生体保存に有利な生理的食塩水に浸漬しておく場合を考えたものである。第2表の結果が示すように両浸漬区では致死後かなりの時間が経過しても反応率は低下しない。これに対して乾燥区は8時間以上経過すると明らかに反応陽性個体は減少し、反応のあいまいな疑陽性個体が増加する。これは検体中の体液が乾いてしまったことに原因があると考えられる。浸漬区でも1昼夜経過したものは明らかに低い反応率を与えるので、このような条件におかれた個体は検定に用いるべきでない。水浸漬よりも食塩水浸漬の方がやや安定した検定結果を示す傾向がうかがわれる事実は興味もたれる。このように致死後30°Cのような高温におかれても、4時間以内に検定すれば、生体で検定したときとほぼ同精度の結果がえられることは今後、血清反応法の利用範囲をさらに広めうる可能性を示している点で注目してよいだろう。

第3表 致死させたヒメトビウンカ成虫を種々の温度に24時間おいた後の血清反応による検定結果  
(保毒雌成虫から得られた次世代成虫を供試、♀+♂)

区 分	処理後の温度	検定虫数	反 応 程 度 別 虫 数				保毒虫率
			++	+	±	-	
無 処 理 (対照)	-	215	167	0	0	48	77.7%
水 浸 漬 (展着剤 0.0025% 加用)	20°C	97	73	4	1	19	79.4
	25	101	69	5	10	17	73.3
	30	99	79	0	7	13	79.8
	35	102	64	4	19	15	66.7
	40	96	62	2	1	31	66.7
1%食塩水浸漬 (展着剤 0.0025% 加用)	20	99	66	2	1	30	68.7
	25	97	68	1	0	28	71.1
	30	105	76	3	1	25	75.2
	35	99	80	4	2	13	84.8
	40	99	79	4	1	15	83.8

水浸漬よりも1%食塩水浸漬の方があいまいな反応個体が少なく、安定した検定結果が得られることは第3表の結果からも推察される。この場合、致死後の温度条件がそれほど大きい影響をもたらすものでないことも注目してよい。これらの検定成績において保毒虫率にかなりの変動がみられるのはサンプリング誤差によることはいうまでもない。

### 要 約

- 1 血清反応法は吸汁テストよりも保毒虫を検出することが容易で、精度も高く、保毒虫率は少なくとも吸汁テストの10%ほど高く出る。
- 2 検定時のヒメトビウンカの発育ステージによっても血清反応の検出精度は同じでない。すなわち、1~2令のような若令虫は体が小さいために保毒検定の精度は低くなるから、検定の対象とすべきではない。

3 致死後時間を経過したヒメトビウンカについても血清反応による保毒検定は可能であるが、その限界は致死後4時間までであると思われる。水浸漬とくに1%食塩水に浸漬された致死個体はさらに長時度被検体として利用できることが立証された。

#### 引 用 文 献

木谷清美・木曾皓(1966)：四国植物防疫研究，No. 1：9-11.

新海昭(1962)：農技研報告 C, No. 14：1-12.

安尾俊・柳田騏策(1963)：植物防疫，17：215-218.

(1967年4月26日 受領)