

酵素抗体法 (ELISA) および迅速免疫ろ紙検定法 (RIPA) によるカーネーション斑紋ウイルスおよびカーネーションベインモットルウイルスの検出

山本孝彦・岩崎真人・笹谷孝英
(四国農業試験場)

Detection of carnation mottle virus and carnation vein mottle virus by enzyme-linked immunosorbent assay and rapid immunofilter paper assay.

by Takashi YAMAMOTO, Mabito IWASAKI and Takahide SASAYA (Shikoku National Agricultural Experiment Station, Zentsuji, Kagawa 765)

Carnation mottle virus (CaMV) and carnation vein mottle virus (CVMV) were readily detected in the extracts of leaves of *Dianthus chinensis* by double antibody sandwich-ELISA (DAS-ELISA), simplified DAS-ELISA and rapid immunofilter paper assay (RIPA). Therefore, these results indicate a possibility to develop a routine indexing system for the detection of CaMV and CVMV in *Dianthus* species.

はじめに

カーネーション斑紋ウイルス (Carnation mottle virus, CaMV) およびカーネーションベインモットルウイルス (Carnation vein mottle virus, CVMV) はカーネーションをはじめ *Dianthus* 属花き類に多く発生し, 生育不良, モザイク, 花弁の斑入りなどを生じさせ, 切り花の安定生産を著しく阻害する (HOLLINGS & STONE, 1970, 1971; 栃原, 1983a, 1983b; 栃原ら, 1975; 土崎ら, 1993)。CaMVは汁液, CVMVは汁液およびアブラムシで容易に伝染する。生産地における両ウイルスの防除法としては, 病徴を指標とした病株の抜取りが中心であるが, 無病徴感染株が多いことや, 生育期間が長期間にわたるため管理作業, アブラムシ等による感染機会も多く, 病株の抜取りだけで両ウイルスを防除することはきわめて困難である。そのため, 成長点培養によるウイルスフリー苗の利用により良質な種苗の維持増殖, 育種素材の確保が一般的に行われている。し

かしながら, ウイルスフリー苗の利用に当たっては, 育成した株が確実にウイルスフリーであることが条件であり, そのためには精度が高く, しかも簡便なウイルス診断方法の確立が重要な課題となっている。そこで, このような目的に合った診断方法として酵素抗体法 (ELISA) および迅速免疫ろ紙検定法 (RIPA) による血清学的診断方法を検討したので報告する。

本実験を行うにあたり, RIPAの手法について御教示いただいた山口大学農学部生物生産科学講座 亀谷満朗教授に感謝の意を表す。

試験方法

1. 供試ウイルスおよび抗血清

CVMVおよびCVMV抗血清は既報 (山本ら, 1991) のものを用いた。CaMVはカーネーション (品種: Cerise Royale) のモザイク株から分離したウイルスを用い, セキチク (品種: スノーファイヤ) 実生苗に汁液接種して維持増殖した。CaMVの純化は, モザイク症状の出現したセキ

チク上位葉を採取し、山本ら（1990）の方法に準じて行った。抗血清は純化ウイルス（第1図）約20 μg を3回に分けて、家兎に静脈注射1回、次いでFreund's complete adjuvantを用いた筋肉注射を2回行って作製した。得られた抗血清の力価は重層法で512倍であった。

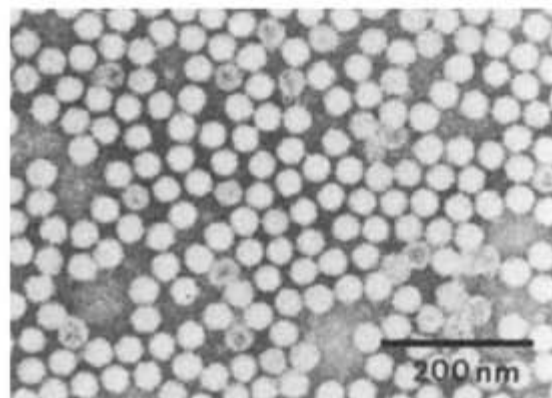
2. ELISAおよびRIPA

ELISAはCLARK & ADAMS（1977）の二重抗体ELISA（double antibody sandwich ELISA）の方法に従った。簡易化したELISAの手法は岩崎ら（1987）の方法に準じ、検定試料と酵素結合抗体を0.1 mlずつ同時にマイクロプレート（96穴、ダイナテック社製）の穴に注入して、5℃に1夜静置後、基質を加えて25℃で反応させた。吸着 γ -グロブリンの希釈倍数（濃度）および酵素結合抗体液の希釈倍数は500倍（2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）-500倍、1,000倍（1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）-1,000倍および2,000倍（0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）-2,000倍の3段階とし、それぞれ抗体液500倍、1,000倍、2,000倍と呼称した。

RIPAはTsudaら（1992）の方法に従った。ラテックスに感作する抗体濃度は白色ラテックスで γ -グロブリン50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、同様に着色ラテックスで100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とした。赤色ラテックスにはCVMV抗体、青色ラテックスにはCaMV抗体を感作させた。ウイルス検出に当たっては、ガラス繊維ろ紙GF/A（ワットマン）を幅5mm、長さ8cmに切り固相とした。下端から1.5cmにCVMV抗体、2cmにCaMV抗体をそれぞれ感作した白色ラテックス約10 μl を幅一杯に置いた。感作着色ラテックスは50倍に希釈して供試した。

3. 検定材料

検定にはCaMV、CVMVの純化標品およびセキチク（品種：スノーファイヤ）病葉を用いた。凍結病葉は-80℃に6か月保存したものをを用いた。



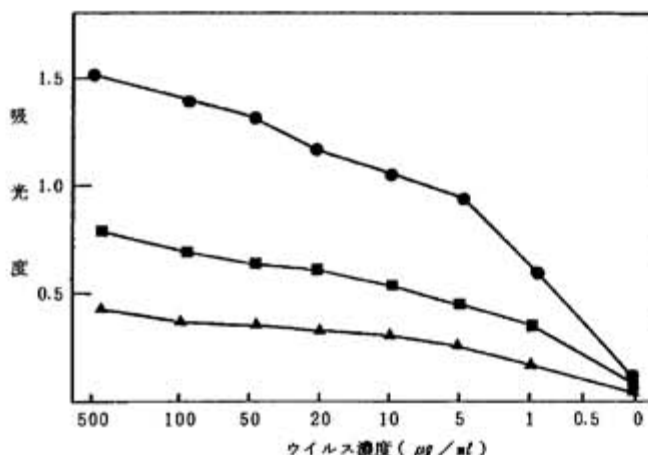
第1図 純化したCaMVの電顕像

結 果

1. ELISAおよび簡易化したELISAによるCVMVおよびCaMVの検出

純化ウイルスを用いた場合には、抗体液の500、1,000、2,000倍希釈いずれの場合もCVMVは1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、CaMVでは0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ まで検出できた。（第2、3図）。

病葉汁液ではCVMVは抗体液500倍、1,000倍希釈いずれの場合も 2^{10} 倍希釈まで検出できた。簡易化したELISAでは抗体液500倍希釈で検体の



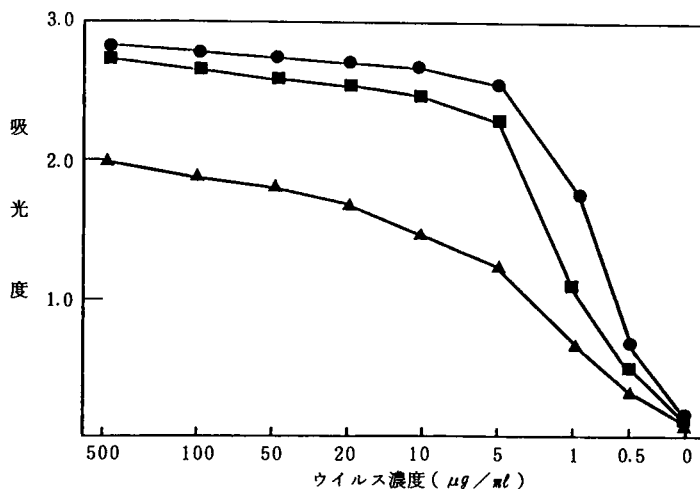
第2図 ELISAによるCVMVの検出

- ：吸着 γ -グロブリン/酵素結合抗体液 500倍希釈
- ：同 1,000倍希釈
- ▲：同 2,000倍希釈

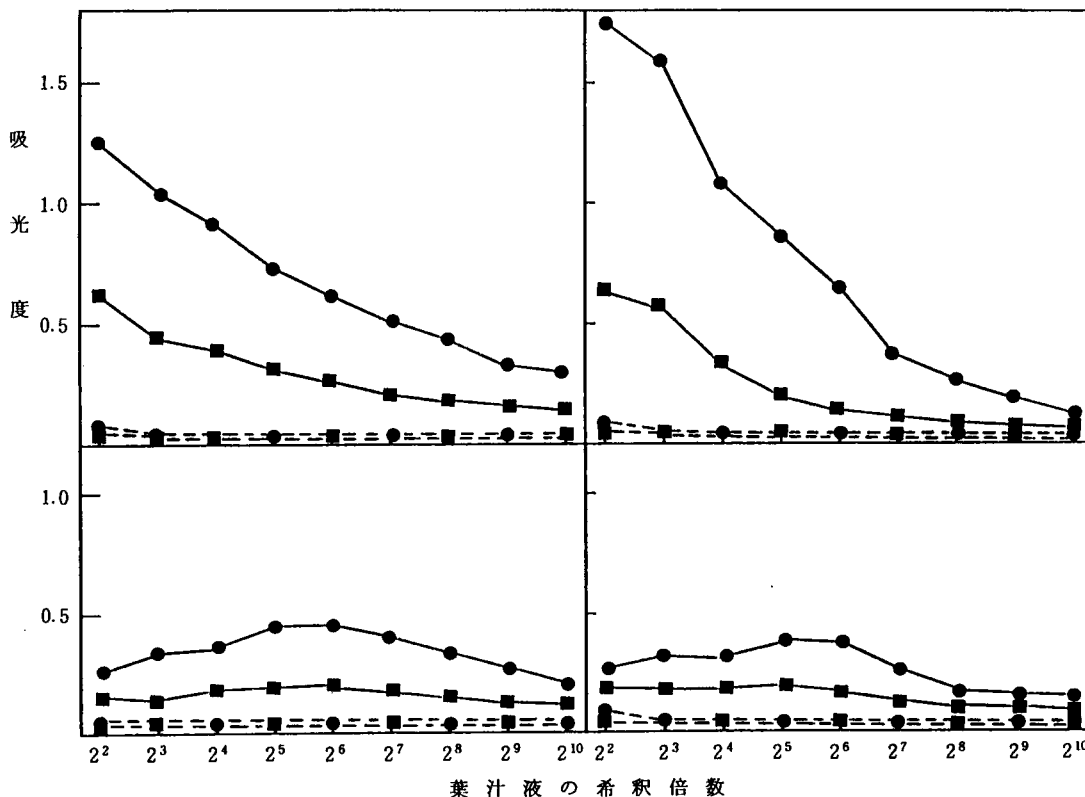
陽性反応は吸光度0.1以上
以下の図も同じ

2⁹倍希釈, 1,000倍希釈では2⁸倍希釈まで検出できた。同様に凍結保存病葉を用いた場合には通常のELISAでは, それぞれ2⁹, 2⁵倍希釈, 簡易ELISAでは2⁷および2⁶まで検出可能であった。検出感度は通常のELISAに比べて簡易化したELISAでは著しく劣った(第4図)。吸光度は, 通常のELISAでは検体の希釈倍数が高くなるほど低下したが, 簡易法では2⁵~2⁶倍希釈が最も高かった。

CaMVでは, 抗体液500, 1,000, 2,000倍希釈において通常のELISAでは, 生葉, 凍結

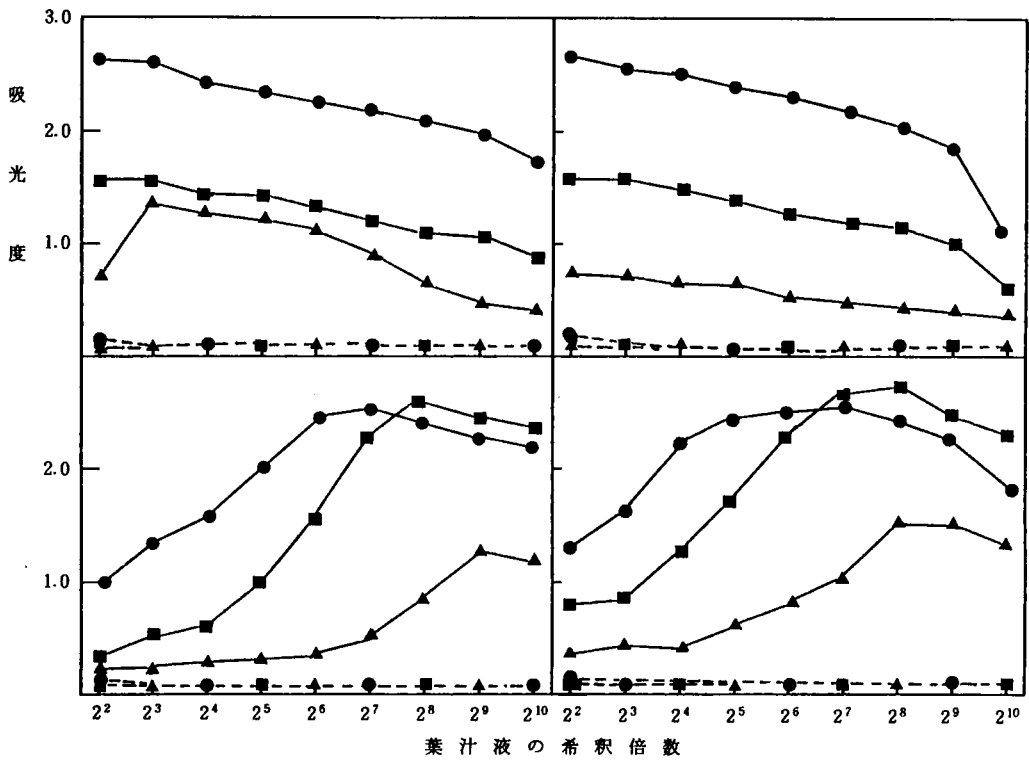


第3図 ELISAによるCaMVの検出



第4図 セキチク病葉からELISAによるCVMVの検出

左: 生葉 右: 凍結保存葉
 上段: 通常のELISA 下段: 簡易化したELISA
 実線は病葉, 破線は健全葉
 以下の図も同じ



第5図 セキチク病葉からELISAによるCaMVの検出

葉いずれの場合でも 10^{10} 倍希釈まで検出できた。簡易ELISAでも同様であったが、抗体液 2,000 倍希釈の場合、生葉 $2^2 \sim 2^3$ 倍希釈の範囲では検出できなかった。通常のELISAでは、CVMVの場合と同様に検体希釈倍数が高くなるにしたがって吸光度が低下する傾向が見られたが、簡易法では、逆に検体 $2^8 \sim 2^9$ 倍希釈までは、希釈倍数が高くなるほど吸光度も高くなった（第5図）。

2. RIPAによるCVMVおよびCaMVの検出

凍結保存したセキチク病葉の 100, 200, 500 倍希釈液では両ウイルスとも明瞭なバンドが現れ、1,000 倍希釈まで陽性反応が認められた。この結果は、それぞれのウイルスを単独で検出した場合も、両ウイルスを同時に検出した場合も同様であった（第1表）。非特異反応は認められなかった。

第1表 セキチク病葉からRIPAによるCaMVおよびCVMVの検出

病葉の 感染ウイルス	検出ウイルス	病汁液の希釈倍数					
		10^2	2×10^2	5×10^2	10^3	5×10^3	10^4
CaMV	CaMV	+++ ¹⁾	+++	+++	+	-	-
	CVMV	-	-	-	-	-	-
CVMV	CaMV	-	-	-	-	-	-
	CVMV	+++	+++	+++	+	-	-
CaMV	CaMV	+++	+++	+++	+	-	-
CVMV	CVMV	+++	+++	+++	+	-	-

1) + ; 陽性反応, - ; 陰性反応, +++ ; 明瞭な反応

考 察

カーネーションに発生するウイルスは多く、これまで10種以上報告されているが、わが国では本報告の2種類に加えて、キュウリモザイクウイルス(Cucumber mosaic virus, CMV), カーネーション潜在ウイルス(Carnation latent virus, CaLV), カーネーションえそ斑ウイルス(Carnation necrotic fleck virus, CNFV) およびカーネーションエッチドリリングウイルス(Carnation etched ring virus, CERV)の6種類が知られている(大木, 1992; 土崎ら, 1993)。これらのうちCVMV, CaMV, CaLV, CNFVなどは発生が多く(井上, 1976), 特に, CVMV, CaMV, CaLVの3種類はカーネーションに高率に感染していることが報告されている(栃原ら, 1975)。

これらのウイルス病防除のため栽培地では茎頂培養によるウイルスフリー苗が利用されているが、それには育成苗や、母本品種のウイルス検定が不可欠である。ウイルス検定には試験的には電子顕微鏡によるウイルス粒子の観察、抗血清の利用などによっているが、多くは*Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor*, ビジョナデシコなどによる生物検定である。この方法はCVMV, CaMV, CaLV, CNFVなどのウイルス感染を知るには便利であるが、検定植物の育苗, 検定期間, ウイルスの特定, 検定精度などの点から考えると難点があるため、ウイルス検出精度が高く、しかも簡便なウイルスの診断方法の確立が要望されている。

このような目的に合った診断方法として、CVMVおよびCaMVの2種類のウイルスの診断を目的として、ELISAおよびRIPAについて検討した結果、両法ともきわめて検出精度が高く、セキチク病葉から容易にウイルスが検出できた。今後、カーネーション、ナデシコなど*Dianthus*属花きにおけるウイルス診断の手法として利用できるものと考えられる。

実際の診断に当たっては検体数、診断時間などを考慮し、検定方法を選択すれば良いと考える。即ち、RIPAは特別な機械を必要とせず、迅速かつ簡便な検出方法であり、ろ紙、抗体感作ラテックスを準備しておけば数分以内には結果が判定できる。病葉の100~500倍希釈液では、ELISAと同

様の高い精度の診断が期待でき、また、両ウイルスの同時検定ができる点から、極めて優れた方法と言える。一方、ELISAは、手法はやや複雑であるが、定量性に優れており、結果の判定が容易であり、機械化、システム化が可能であるため、一度に多量の検体が処理できる。CaMVでは簡易化したELISAでも良好な結果が得られており、今後、CVMVとの同時診断や、簡易化した間接ELISA(岩崎ら, 1993)などの手法が確立されれば、生産組織などにおけるウイルスの圃場診断技術として利用でき、カーネーション、セキチク、ナデシコなどの品質向上に大きく寄与できるものと考えられる。

摘 要

ELISAおよびRIPAによりセキチク病葉からCaMVおよびCVMVを容易に検出することが出来た。そのうちRIPAでは両ウイルスを同時に検出することが可能であった。

引 用 文 献

- CLARK, M. F. and ADAMS, A. N. (1977): Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol*, 34: 475~483.
- HOLLINGS, M. and STONE, O. M. (1970): Carnation mottle virus. CMI/AAB Description of Plant Viruses, No. 7.
- HOLLINGS, M. and STONE, O. M. (1971): Carnation vein mottle virus. CMI/AAB Description of Plant Viruses, No. 78.
- 井上忠男(1976): わが国で発生しているカーネーションウイルス病の種類と防除上の注意. 今月の農薬, 20: 83~87.
- 岩崎真人・山本孝彦・勝部利弘・稲葉忠興(1987): 簡易化した酵素結合抗体法(ELISA)によるキュウリモザイク病の診断. 四国植防, 22: 57~62.
- 岩崎真人・笹谷孝英・山本孝彦(1993): 簡便化した間接ELISAによるキュウリウイルス病の診断. 平成4年度四国農業研究成果情報(印刷中)
- 大木 理(1992): 日本に発生する植物ウイルス

- 一覧 — 植物ウイルス同定のテクニックとデザイン。植物防疫特別増刊号，日本植物防疫協会，東京。93 pp.
- 栃原比呂志 (1983 a) : カーネーション斑紋ウイルス *Carnation mottle virus*. 植物ウイルス事典，朝倉書店，東京。632 pp.
- 栃原比呂志 (1983 b) : カーネーションペインモットルウイルス *Carnation vein mottle virus*. 植物ウイルス事典，朝倉書店，東京。632 pp.
- 栃原比呂志・出射 立・矢吹駿一・福本文良 (1975) : わが国のカーネーションウイルス—CaMoV, CaLV および CaVMV について—。日植病報，41 : 390 ~ 399.
- TSUDA, S., KAMEYA-IWAKI, M., HANADA, K., KOUDA, Y., HIKATA, M. and TOMARU, K. (1992) : A novel detection and identification technique for plant viruses : Rapid immunofilter paper assay. *Plant Disease*, 76 : 466 ~ 469.
- 土崎常男ほか編 (1993) : 作物ウイルス病事典。全国農村教育協会，東京，738 pp.
- 山本孝彜・中井正樹・守川俊幸・名畑清信・松本美枝子・稲垣佳世子 (1990) : 酵素抗体法 (DIBA および ELISA) によるユリ潜在ウイルス (*Lily symptomless virus*) の検出。北陸病虫研報，38 : 45 ~ 50.
- 山本孝彜・岩崎真人・笹谷孝英 (1991) : フジナデンコから分離されたカーネーションペインモットルウイルス (*Carnation vein mottle virus*) の諸性質，四国植防，26 : 49 ~ 54.