

カーネーション類に発生する3種ウイルスのImmunocapture RT-PCRによる診断法の開発

笹谷孝英・小金澤碩城
(近畿中国四国農業研究センター)

An immunocapture reverse transcription-polymerase chain reaction method for specific detection of three viruses infecting *Dianthus* plants.

By Takahide SASAYA and Hiroki KOGANEZAWA (National Agricultural Research Center for Western Region, Zentsuji, Kagawa 765-8508)

We developed an immunocapture reverse transcription-polymerase chain reaction method (IC-RT-PCR) for specific detection of three carnation viruses (*Carnation mottle virus*, *Carnation latent virus* and *Carnation vein mottle virus*) infecting *Dianthus* plants. IC-RT-PCR was compared with other methods such as two types of ELISA (ACP-ELISA and DAS-ELISA) and RT-PCRs using total RNAs extracted by a CTAB/Phenol method or Thomson's method, for sensitivity, necessary time and applicability. As a result, IC-RT-PCR was considered to be better than others in these respects. The field survey for the occurrence of three viruses in Kagawa Prefecture using IC-RT-PCR revealed that *Carnation mottle virus* was prevalent in all the fields surveyed.

緒 言

わが国の花き生産は、その旺盛な需要に支えられここ数年急激に増加している。四国地域においても施設栽培を中心にその生産量は急増しており、地域農業において花き生産はますます重要な地位を占めて行くと考えられる。しかし、これら花き類は多種多様なうえ集約的に栽培されるために、極めて多くの病害が発生し、安定生産を阻害する最大の要因になっている。特に、栄養繁殖性花き類は、ウイルス病が多発生して、生産および品質の著しい低下をもたらしている。四国地域、特に、香川県では栄養繁殖性花き類であるカーネーション (*Dianthus caryophyllus*) の生産が盛んで、カーネーション団地と呼ばれる生産集落を形成し、農業生産上重要な位置を占めている。しかし、ウイルス病発生がその生産性を著しく阻害し、特に苗のウイルス汚染の問題が深刻化している。このような栄養繁殖性花き類においては、健全な種苗

管理が重要であり、そのために複数のウイルスを同時に、かつ高感度で検出できる検出法の開発が望まれている。

近年、バイオテクノロジーの発達により、従来のELISAなどの血清学的診断法より感度の高い遺伝子診断法が開発され、種苗のウイルス検定に用いられている。しかし、遺伝子診断法は操作が煩雑であり、多数の検体を扱うことは困難である。そこで、血清学的診断法と遺伝子診断法を組み合わせたImmunocapture RT-PCR (Nolasco *et al.*, 1993) が注目を集めている。

本研究ではカーネーションで発生が報告されているカーネーション潜在ウイルス (CaLV)、カーネーション斑紋ウイルス (CarMV) およびカーネーションベインモットルウイルス (CVMV) の3種のウイルスについて、Immunocapture RT-PCRによる高感度検出法を確立し、本法の有効性をウイルスの検出感度および操作性の観点

からELISAと従来のRT-PCRと比較検討した。また、本法を用いてこれら3種ウイルスの施設および露地栽培カーネーション類での発生を調査した。

材料および方法

供試ウイルスおよび抗血清

CVMVは香川県詫間町のモザイク症状を示したフジナデシコより分離したものを、CarMVは丸亀市のモザイク症状を示したカーネーションより分離したものを、これらの抗血清は既報のものを用いた(山本ら, 1991; 山本ら, 1993)。CaLVと抗血清は栃原より分離されたものを実験に供試した(栃原ら, 1975)。ウイルスはカーボランダムを用いてカーネーション(*Dianthus caryophyllus*)およびセキチク(*Dianthus chinensis*)に汁液接種し、接種後2週間から1ヶ月の完全展開葉を実験に供試した。なお、実験に供試した完全展開葉にはCVMVおよびCarMVを接種したもので明瞭なモザイク症状が確認された。

血清学的診断法

血清学的診断法では、ACP(indirect antigen coated plate)-ELISA(Sasaya and Yamamoto, 1995)あるいはDAS-(double antibody sandwich)-ELISA(Clark and Adams, 1977)の2種のELISAを試み、両ELISAでのウイルスの検出感度、操作性および検出時間を検討した。抗血清は非特異反応を抑えるため、健全セキチク葉で吸収後、MAbTrap[®] G II(アマシャムファルマシア社)でIgGを精製して実験に用いた。ACP-ELISAにおいて、プレートへのコーティングは、ウイルス感染あるいは健全葉を100倍量のCB(50mM炭酸緩衝液 pH 9.6)で磨砕したものを100倍希釈液とし、10倍段階で10⁶倍希釈し、25℃で1時間とした。1次抗体は、IgG濃度がCarMVで0.2 μg/ml, CaLVで0.01 μg/ml, CVMVで0.1 μg/mlとなるようにPBST(10mMリン酸緩衝液 pH 7.2, 150mM NaCl, 0.05% Tween-20)で希釈し、処理は25℃で1時間とした。アルカリフォスファターゼ標識抗ウサギ血清(シグマ社)はPBSTで1,000倍希釈し、25℃で1時間処理した。DAS-ELISAでは、IgG濃度およびアルカリフォスファターゼ標識抗ウイルス血清の希

釈倍率は、それぞれ、CarMVで1.0 μg/mlと800倍希釈、CaLVで2.5 μg/mlと100倍希釈、CVMVで0.5 μg/mlと400倍希釈とした。ウイルス感染葉あるいは健全葉は、100倍量のPBSTを加え磨砕したものを100倍希釈液とし、10倍段階で10⁶倍まで希釈して調整した。なお、IgGのコーティングは37℃で4時間、試料の添加は4℃で一晩、標識抗体処理は37℃で4時間とした。両ELISAとも基質を加えてから25℃で1時間後に405nmの吸光度を測定し、吸光度が0.1以上のものを陽性と判断した。

RT-PCR

ウイルス核酸の抽出は、CTAB(Cetyl trimethyl ammonium bromide)とフェノール法およびThomson and Dietzgen(1995)の非磨砕法の2種を試みた。CTABとフェノール法は、ウイルス感染あるいは健全葉を100倍量の磨砕液(1% CTAB, 50mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA, 1% 2-mercaptoethanol)で磨砕後、フェノール抽出を2回、フェノール・クロロホルムおよびクロロホルム/イソアミルアルコール抽出を各1回ずつ行い、この上清液を100倍希釈液とし、10倍段階で10⁹倍までの希釈倍率液を作製した。なお、逆転写反応には10 μlを用いた。非磨砕法は、ウイルス感染あるいは健全葉を1 mm × 1 mm(約10 μg)に刻み、500 μlのTPS1(100mM Tris-HCl pH 8.0, 1.0M KCl, 10mM EDTA)に5個入れ、95℃で10分間熱処理後、その上清を10倍希釈として、10倍段階で10⁹倍までの希釈倍率液を作製した。なお、逆転写反応には10 μlを用いた。逆転写反応は、反応液(50mM Tris-HCl pH 8.3, 75mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10mM DTT, 0.5mM dNTP Mix, 1 μM ウイルス特異的な一鎖プライマー, 10 ユニット SUPER SCRIPT[™] II RNase H⁻ Reverse Transcriptase (GIBCOBRL[®]))の全量が20 μlで、42℃で50分間行った。ウイルス特異的な一鎖プライマーは第1表に示した。PCR反応には2 μlの逆転写液を用い、反応液(10mM Tris-HCl pH 8.3, 50mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 2.5mM dNTP Mix, 0.4 μM ウイルス特異的プライマー, 5ユニット Takara Taq(タカラ))の全量は50 μlで、94℃で3分間の変性後、94℃で30秒間、60℃で1分間、72℃で2分間を1サイクル

第1表 カーネーションに発生する3種のウイルスに対するプライマーの設計

ウイルス	±鎖	プライマーの位置	プライマーの配列	増幅断片塩基数	引用文献
CarMV	+鎖	2814-2833	5'-GATACACTCCAGCGATCCTA-3'	656bp	Guilley <i>et al.</i> (1985)
	-鎖	3451-3470	5'-TAACCGAAGGGACCACATAC-3'		
CaLV	+鎖	340-359	5'-CCTTCTCTAGATGCGCTACA-3'	854bp	Meedhan and Mills (1991)
	-鎖	1174-1193	5'-AACCAGGCTGCATGTCTTAC-3'		
CVMV	+鎖	454-473	5'-ACATCACCGAACATAAGCGG-3'	265bp	Sasaya <i>et al.</i> (2000)
	-鎖	701-720	5'-CCTATTGGGCATTTTTGGGG-3'		

とし、25回、30回および35回行った。なお、今回用いた各ウイルス特異的なプライマーは第1図に示し、PCR産物は反応液の1/10量(5 μ l)を電気泳動して確認した。

Immunocapture RT-PCR

Immunocapture RT-PCRはNolasscoet *al.*の方法(1993)にしたがって行った。ウイルス特異的なIgGを1 μ g/mlとなるようにCBで希釈し、ELISAプレートに1ウェル当たり50 μ l入れ、37 $^{\circ}$ Cで4時間静置しコーティングした。ELISAプレートをPBSTで洗浄後、ウイルス感染葉あるいは健全葉を100倍量のPBSTで磨砕しこれを100倍希釈液とし、10段階で10⁹倍まで希釈し、ELISAプレートに1ウェル当たり50 μ l入れ、4 $^{\circ}$ Cで一晩処理した。ELISAプレートをPBSTで2回、次に蒸留水で2回洗浄後、逆転写反応液を20 μ lに加え、42 $^{\circ}$ Cで50分間逆転写反応をおこなった。逆転写反応後、逆転写反応液の2 μ lをPCR反応に用いた。なお、PCRの反応液は上記と同様で、PCR反応後5 μ lとり電気泳動でPCR産物を確認した。カーネーションおよびナデシコにおける3種ウイルスの発生調査

高松市、丸亀市、普通寺市および詫間町でウイルス症状を示したカーネーションあるいはナデシコ栽培圃場で、50株当たりのウイルス病発生株率を調査し、その中でウイルス症状を示した株を無作為に採集し、Immunocapture RT-PCRでウイルスの検出を行った。

結果及び考察

カーネーションに発生する3種ウイルスの検出感度を、2種のELISA、2種の核酸抽出法で

行ったRT-PCRおよびImmunocapture RT-PCRで比較した(第2表)。なお、検出感度は検出限界希釈倍率で示した。ELISAにおける検出感度はウイルス種で異なり10³~10⁵倍希釈で、DAS-ELISAの方がACP-ELISAより若干検出感度が高かった。1回の処理検体数は96検体で、多数の検体を一度に処理できると言った利点を有していた。CTAB/フェノール法で抽出した核酸を用いたRT-PCRでは、PCRのサイクルが25サイクルで検出感度はELISAと同程度の10⁴~10⁵倍希釈であったが、サイクル数を35にあげると検出感度は25サイクルの時より100倍高まり10⁶~10⁷倍希釈であった。また、検出までの所要時間は6時間であった。しかし、フェノールやクロロホルムと言った劇物を使う点や、核酸抽出が煩雑である点で操作性には問題があり、多数の検体処理には不適切であると考えられ、1回に処理可能な検体は10~20検体程度と考えられた。一方、核酸の抽出法を簡略化した非磨砕法では、CTAB/フェノール法より一度に処理可能な検体数が多く、50検体程度まで処理可能であると考えられたが、検出感度が低く35サイクルでもELISAと同程度の10³~10⁵倍希釈であった。

Immunocapture RT-PCRでは、検出感度はPCRのサイクルが25サイクルで10³~10⁵倍希釈、35サイクルでは10⁷~10⁹倍希釈以上とかなりの高感度であった(第1図)。また、検出時間は6時間(事前にELISAプレートへの抗体のコーティングを行い冷蔵保存した場合)で、1回の処理可能な検体数は50検体で、フェノールなどの劇物を使用しない点で操作性も簡便であった。また、抗体をコーティングしたプレートを冷蔵条件下では数ヶ

第2表 カーネーションに発生する3種のウイルスのELISA, RT-PCRおよび
Immunocapture-RT-PCRによる検出感度^{*)}

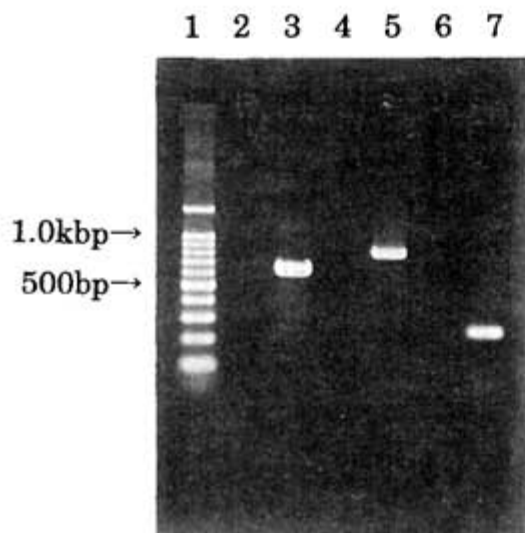
調査日	ELISA ^{*)}		RT-PCR ^{*)}						Immunocapture		
			CTAB/フェノール法			非磨砕法			RT-PCR		
	ACP-	DAS-	25 ^{*)}	30	35	25	30	35	25	30	35
CarMV	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ²	10 ²	10 ²	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷
CaLV	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ²	10 ²	10 ³	10 ³	10 ⁴	10 ⁶
CVMV	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ²	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁹

^{*)} 検出感度は検出限界希釈倍率で示した。

^{*)} ACP(indirect antigen coated plate)-ELISAとDAS-(double antibody sandwich)-ELISAを実施した。

^{*)} 核酸の抽出はCTAB/フェノール法とThomson and Dietzgen(1995)の非磨砕法を実施した。

^{*)} PCRのサイクル数を示した。



第1図 Immunocapture RT-PCR後の電気泳動によるウイルス核酸の検出

レーン2と3はCarMV特異的プライマー、レーン4と5はCaLV特異的プライマー、レーン6と7はCVMV特異的プライマーを用いてImmunocapture-RT-PCRを行った。なお、レーン1はマーカー、レーン2、4および6は健全カーネーション、レーン3、5および7は各ウイルス感染カーネーションを鋳型として用いた。

月、冷凍条件下では1年以上保存が可能である。

以上をまとめると第3表となる。ELISAは操作性が簡便で多数の検体を一度に扱えるが、PCRほど検出感度が優れない。一方、CTAB/フェノール法で核酸を抽出してRT-PCRを行った時は、検出感度は高いが操作が煩雑となり、しかも、多数の検体を一度に扱うことは難しい。また、非磨砕法で核酸を抽出した場合は、操作性はかなり改善されるが検出感度が著しく低下する。Immunocapture RT-PCRは操作性が簡便で、しかも多数の検体を一度に扱える。また、ELISAで見られる健全葉との非特異反応もほとんど無いため、本法はカーネーションのウイルス診断での実用性が高いと考えられた。

香川県内のカーネーションおよびナデシコ圃場でのウイルス症状の発生を調査した(第4表)。カーネーションの親株は茎頂培養の普及によりウイルス発生は以前より低下していると考えられているが、本県内のウイルス病の発生率は10%前後であった。Immunocapture RT-PCRでウイルス種の識別を試みたところ、すべての圃場でCarMVの発生が確認された。CarMVは媒介者の報告が無く、専ら、種苗伝染や摘心・摘芽など農作業により蔓延すると考えられる。このことから親株のウイルス汚染の検定を強化するとともに、病株の除去を徹底し、圃場内でのウイルス蔓延を抑える必要がある。また、詫間町のナデシコ圃場ではCarMV以外にもCVMVの発生が顕著であることが示された。CVMVはアブラムシ伝播す

第3表 香川県における3種のカーネーションウイルスのImmunocapture RT-PCRによる発生調査

調査日	調査場所	調査作物	調査株数	検出ウイルス		
				CarMV	CaLV	CVMV
'95-3-2	善通寺市	カーネーション	7	7	0	0
'95-3-27	善通寺市	カーネーション	10	10	0	0
'95-4-19	丸亀市	カーネーション	12	10	3	2
'95-6-26	高松市	カーネーション	17	8	0	6
'98-7-11	詫間町	ナデシコ	32	25	3	20
'98-7-11	善通寺市	カーネーション	25	20	1	3

第4表 ELISA, RT-PCRおよびImmunocapture RT-PCRによるウイルス検出の特徴の比較

	ELISA		RT-PCR		Immunocapture
	ACP	DAS	CTAB/フェノール	非磨砕法	RT-PCR
検出感度 ^{a)}	△	△	○	×	○
処理検体数 ^{b)}	96	96	10~20	50	50
操作性 ^{a)}	○	○	×	○	○
検出時間 ^{c)}	5時間	2日間	6時間	5時間	5時間

^{a)} 検出感度、操作性は客観的に良いは○、まあまあ良いは△、悪いは×で示した。

^{b)} 通常1回の検定で処理できる可能な検体数を示した。

^{c)} 本実験では10検体を検定するのに要した時間を示した。

るので、カーネーションでのCVMVの発生の危険性が示唆された。

摘 要

カーネーションで発生が報告されているカーネーション斑紋ウイルス (CarMV)、カーネーション潜在ウイルス (CaLV) およびカーネーションベインモットルウイルス (CVMV) の特異的な高感度検出法を開発するため、2種のELISA、CTAB/フェノールあるいは非磨砕法 (Thomson and Dietzgen, 1995) で抽出した核酸を用いたRT-PCRおよびImmunocapture RT-PCRを行い、ウイルスの検出感度、検出時間および操作性を比較した。その結果、Immunocapture RT-PCRが検出感度、検出時間および操作性で他の方法より優れており、実際のウイルス診断に利用可能であると考えられた。また、Immunocapture RT-PCRを用いて、香川県内の施設および露地栽培カーネーションおよびナデシコで発生しているウイルス病の検定をしたところ、いずれの圃場でもCarMVの発生が確認された。

引用文献

- Clark, M. F. and A. N. Adams (1977) : Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. gen. Virol.*, 34 : 475~483.
- Guilley, H., J. C. Carrington, E. Balazs, G. Jonard, K. Richards and T. J. Morris (1985) : Nucleotide sequence and genome organization of carnation mottle virus RNA. *Nucleic Acids Res.*, 13 : 6663~6677.
- Meehan, B. M. and P. R. Mills (1991) : Nucleotide sequence of the 3' -terminal region of carnation latent virus. *Inter-virology*, 32 : 262~267.
- Nolasco, G., C. de Blas, V. Torres, and F. Ponz (1993) : A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtiter plate for the detection of plant viruses and subviral pathogens. *J. Virol. Meth.*, 45 : 201~218.

- Sasaya, T., G. Dujovny and H. Koganezawa (2000) : Nucleotide sequence of the 3' -terminal region of carnation vein mottle virus RNA. *J. Gen. Plant Pathol.*, 66 : 251~253.
- Sasaya, T. and T. Yamamoto (1995) : Improvements in non-precoated indirect enzyme-linked immunosorbent assay for specific detection of three potyviruses infecting cucurbitaceous plants. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, 61 : 130~133.
- Thomson, D and R. G. Dietzgen (1995) : Detection of DNA and RNA plant viruses by PCR and RT-PCR using a rapid virus release protocol without tissue homogenization. *J. Virol. Meth.*, 54 : 85~95.
- 梶原比呂志・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ーCaMoV, CaLV およびCaVMVについてー. *日植病報*, 41 : 390~399.
- 山本孝彜・岩崎真人・笹谷孝英 (1991) : フジナデシコから分離されたカーネーションベ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.
- 山本孝彜・岩崎真人・笹谷孝英 (1993) : 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. *四国植防*, 28 : 43~48.