

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

甲把 (安達) 理恵・津田新哉*

(高知県病害虫防除所, (現在)高知県農業振興部環境農業推進課・

*独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構中央農業総合研究センター)

Search for substitute particles in rapid immunofilter paper assay (RIPA) for detection of Melon yellow spot virus

By Rie GAPP-ADACHI and Sinya TSUDA*

(Kochi Prefecture Crop Pest Control Center, Hataeda 1100, Nankoku, Kochi 783-0023, Japan, (Kochi Prefecture Department of Agricultural Promotion Division, Marunouchi 1-7-52, Kochi, Kochi 780-0850, Japan); *NARO Agricultural Research Center, Kan-nondai 3-1-1, Tsukuba, Ibaraki 305-8666, Japan)

Summary

The original latex particles (Japan Synthetic Rubber Co. Ltd., Tsukuba, Ibaraki, Japan) used for a rapid immunofilter paper assay (RIPA) were no longer commercially offered and substitute particles need to be sought from the available particles. When a combination of 2% (v/v) of a non-dyed polystyrene particle (W050CA; Thermo Fisher Scientific K.K., Waltham, MA, USA) and 1% (v/v) of a dyed polystyrene particle (DR1040CA, DBK1040CA and DB1040CA; Thermo Fisher Scientific K.K.) was used for the RIPA for detecting Melon yellow spot virus, the sensitivity of RIPA was approximately equal to that using the original latex particles. The modified RIPA using these substitute particles can thus be useful for detecting MYSV infections in the field survey.

緒 言

植物ウイルスの診断には、判別植物の利用による生物検定法、電子顕微鏡によるウイルス粒子の観察、遺伝子診断法、血清学的診断法等が用いられている。これらの内、血清学的診断法の1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、検定には数時間以上の時間を要し、さらに検定精度を高めるためにはマイクロプレートリーダー等の測定器機を必要とする。

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。

2013年頃から高知県病害虫防除所では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普及部門に配布し、生産現場での診断に利用してきた。ところが現在のところ、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る。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た。

材料および方法

1. 供試代替粒子の探索と粒子の抗体感作

白色ラテックス粒子 (G24103) の代替として4種類の白色 (無着色) 粒子 (5030A, 5043A, W050CAおよび5060A, Thermo Fisher Scientific K.K.), 赤色ラテックス粒子 (G0301R) の代替として、赤色粒子 (DR1040CA, Thermo Fisher Scientific K.K.) を用いて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 (第1表)。抗体を感作する際の粒子濃度は、5030A, 5043A, W050CAおよび5060Aを1% (v/v) または2% (v/v) とし、これら以外は全て1% (v/v) とした。抗MYSV抗体液には最終濃度250 μ g/l 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) \sim 0.15M NaClを添加] で調製した。混合液は1.5mlマイクロチューブ (ST-0150F, INA・OPTICA Co., Ltd.) に240 μ lずつ分注し、ボルテックスミキサー (VTX-3000L, LMS Co., Ltd.) で攪拌後、小型微量遠心機 (PMC-060, TOMY SEIKO Co., Ltd.) で軽くスピンドウンし、37°Cに設定した乾熱滅菌器 (MOV-1125, SANYO Co., Ltd.) 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。感作後は卓上冷却遠心機 (H-15FR, KOKUSAN Co., Ltd.) を用い14,000rpm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 \sim 0.1% BSAを添加) を600 μ l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8cmに切り、洗浄した白色粒子の感作液を面相筆 (FDM5-2, ペンてる株式会社) でろ紙の表面の下端から1.5cm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) 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、0.5cm幅に切ることで、縦8cm、横0.5cm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。なお、以後の試験において標識粒子液の希釈濃度は全て8% (v/v) とした。

4. 代替白色粒子の選抜

代替となりうる白色粒子を選抜するために、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を調査した。供試白色粒子5030A, 5043A, W050CAおよび5060Aの粒子濃度を2% (v/v) で感作して作製したそれぞれのストリップにおいて、健全キュウリ葉0.1gを1mlの抽出用緩衝液 [0.05M リン酸緩衝液 (pH7.0) \sim 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% スキムミルクおよび0.1% NaN_3 を添加] 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全て冷凍葉である。100 μ lの粗汁液を2.0ml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 \sim 5分間浸した。ストリップが抽出液を全て吸い上げた後、ストリップの下端を5mm程度切除し、代替赤色粒子 (DR1040CA) で作製した100 μ lの標識粒子液に浸し、約5分静置した。

5. 選抜した白色粒子と有色粒子の組み合わせの有効性の検討

先述の試験で選抜した代替白色粒子 (W050CA) と、代替赤色粒子 (DR1040CA) の組み合わせに

第1表 RIPA法の抗体感作に用いた粒子の特性

品番	色	粒子径(μm)	販売元
5030A	白	0.30	Thermo Fisher Scientific K.K.
5043A	白	0.43	Thermo Fisher Scientific K.K.
W050CA	白	0.51	Thermo Fisher Scientific K.K.
5060A	白	0.60	Thermo Fisher Scientific K.K.
DB1040CA	青	0.39	Thermo Fisher Scientific K.K.
DR1040CA	赤	0.41	Thermo Fisher Scientific K.K.
DBK1040CA	黒	0.39	Thermo Fisher Scientific K.K.
G24103 ¹⁾	白	0.45	日本合成ゴム株式会社
G0301R ²⁾	赤	0.31	日本合成ゴム株式会社

1,2) G24103, G0301Rは製造中止により入手不可能となっている(2015年3月現在)。
供試粒子はいずれもポリスチレン系ラテックスである。

おける有効性を確認するために、MYSV抗体を感作させたW050CAとG24103をそれぞれ1%(v/v)濃度で塗布したストリップに、DR1040CAおよびG0301Rの標識粒子液を展開し、それら相互の組み合わせにおいて、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)0.1gを1ml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。

6. 代替粒子を用いたストリップの感度の調査

代替粒子を用いたストリップ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、W050CAとDR1040CAの組み合わせで作製したストリップでMYSVの検出を行った。なお、先述の結果から、W050CAは2%(v/v)、DR1040CAは1%(v/v)にてMYSV抗体を感作させた。粗汁抽出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。

7. 有色粒子の色と識別の明瞭さとの関係

標識粒子として選抜した赤色粒子のDR1040CAは、材料と粒径が同じで色が異なるDBK1040CA(黒色)およびDB1040CA(青色)がある。そこで、粒子の色と識別の明瞭さとの関係を検討した。供試した3種類の有色粒子を、先と同様にMYSV抗体(250 $\mu\text{g}/\text{ml}$)でそれぞれ1%(w/v)濃度となるように感作して標識粒子液を作製した。標識粒

子液は単色、または黒：青、黒：赤、赤：青を1：1で混ぜたものをTBS-BSAで8%(v/v)に希釈した。これらを用いてMYSV感染キュウリ葉(発病程度：ごくわずかなモザイク症状)の1%(w/v)濃度の粗汁液から検出されたバンドの明瞭さを比較した。

8. 代替粒子を用いたRIPA法の検出精度の検討

MYSV抗体を感作させたW050CA[感作時の粒子濃度2%(v/v)]と、DR1040CA[感作時の粒子濃度1%(v/v)]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、粗汁抽出液は2%(w/v)濃度とした。

結果と考察

1. 代替白色粒子の選抜

白色ラテックス粒子(G24103)および赤色ラテックス粒子(G0301R)の成分はポリスチレン系ラテックスであることから、ポリスチレン系ラテックス粒子の中から粒径がオリジナルの粒子と近いものを探索したところ、Thermo Fisher Scientific K.K.製の製品に近いものがあつたことから、これらを代替粒子として供試した。

5030A, 5043Aおよび5060Aで作製したストリップは標識粒子液を展開させたときに非特異反応が

現れた。一方、W050CAで作製したストリップは、非特異反応が生じなかった(データ省略)。この結果から、RIPA法に用いる代替白色粒子はW050CAを候補とした。

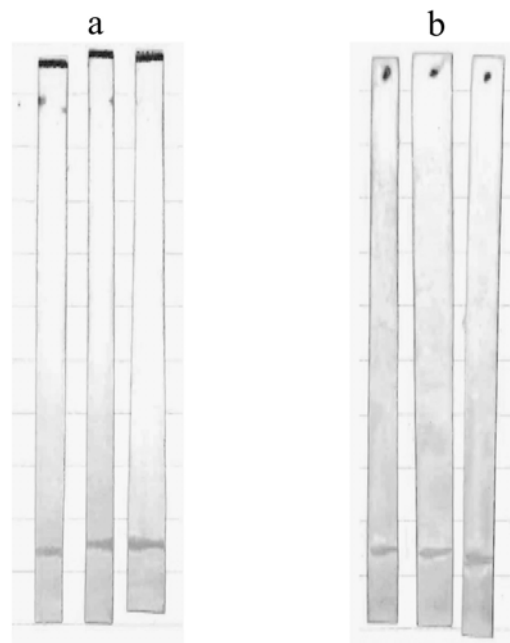
2. 選抜した白色粒子と有色粒子の組み合わせの有効性の検討

W050CA [1% (v/v) : 感作時の粒子濃度] と G0301R (1%) の組み合わせおよび W050CA (1%) と DR1040CA (1%) の組み合わせでは陽性バンドが出現したが、現法の組み合わせ [G24103 (1%) と G0301R (1%)] よりもバンドが薄かった。G24103 (1%) と DR1040CA (1%) の組み合わせは、現法の組み合わせよりもストリップの背景が鮮明でバンドも明瞭に確認された。しかし、ストリップ上の白色ラテックスを塗布した箇所到时折非特異バンドが出現した (第2表)。

代替粒子を用いた検出系では、現法より感度が劣っていたことから、感度を向上させるため、W050CAの濃度を2%にしてMYSV抗体を感作してストリップを作製し、DR1040CA (1%) の標識粒子液との組み合わせによるMYSV検出時の反応性を現法と比較したところ、W050CA (2%) と DR1040CA (1%) の組み合わせは、G24103 (1%) と G0301R (1%) の組み合わせと比較して同等の反応を示した (第1図)。

3. 代替粒子を用いたストリップの感度の調査

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



第1図 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 (W050CA: 2%* - DR1040CA: 1%)

b: 現法 (対照) (G24103: 1% - G0301R: 1%)

*感作時の粒子濃度

汁液を検定に用いた場合の陽性バンドは明瞭であった (第3表)。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

第2表 代替粒子のMYSV検出時の反応性の比較

RIPA法に用いた粒子の組み合わせ		陽性バンドの出現	適用性
白色粒子 [感作時の粒子濃度 (v/v)]	赤色粒子 [感作時の粒子濃度 (v/v)]		
W050CA (1%)	G0301R (1%)	陽性バンドが出現したが、現法の組み合わせ (G24103とG0301R) より薄い。	不適
G24103 (1%)	DR1040CA (1%)	現法と同等以上の濃さの陽性バンドが出現したが、時折非特異バンドが出現した。	不適
W050CA (1%)	DR1040CA (1%)	陽性バンドが出現したが、現法の組み合わせ (G24103とG0301R) より薄い。	不適
W050CA (2%)	DR1040CA (1%)	現法と同等の陽性バンドが出現し、非特異バンドも出現しなかった。	適

バンドはやや不明瞭となる傾向があった。以上からW050CAとDR1040CAの組み合わせで作製したストリップを用いてMYSVの検出を行う際、最適な粗汁抽出液の希釈濃度は1～5%と推察された。

4. 有色粒子の色と識別の明瞭さとの関係

全ての標識粒子液でMYSV陽性バンドが現れたが、その明瞭さはほとんど違いが認められなかった。なお、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)。

5. 代替粒子を用いたRIPA法の検出精度の検討

供試した全ての検体は本法とELISA法のいずれでも同様の結果が得られた(第4表)。

以上より、W050CA, DR1040CAは、RIPA法で広く用いられてきたG24103とG0301Rの代替となりうる事が明らかとなった。

この代替粒子を使用したRIPA法を生産現場で利用することでキュウリの生産工程で簡便な

MYSVの感染診断が行え、発生地域の拡大と被害の慢性化が問題となっているキュウリ黄化えそ病の被害抑制の対策に利用できると考えられる。今後は本検出系がCMVおよびPMMoVなど他のウイルスについても汎用可能かどうか検討していきたい。

謝 辞

本研究を行うに当たり、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構中央農業総合研究センター富高保弘博士には、MYSV感染キュウリ株をご提供いただき、研究を進める上で適切なご助言を賜った。一般社団法人日本植物防疫協会研究所高知試験場河野敏郎氏には、研究を進める上で貴重なご助言を賜った。高知県内農業振興センター各位には供試植物の採取にご協力いただいた。高知県農業技術センター森田泰彰氏には研究を進める上で貴重なご助言及びご指導を賜った。ここに記して厚くお礼申し上げる。

第3表 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

第4表 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	代替粒子を用いたRIPA	ELISA
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

引用文献

- Clark, M.F. and A.N. Adams (1977). Characteristics of the micro plate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34 : 475~483.
- Koenig, R. (1981). Indirect ELISA methods for the broad specificity detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 55 : 53-62.
- Ohki, S and M. Kameya-Iwaki (1996). Simplifying of the rapid immunofilter paper assay for faster detection of plant viruses : simplified RIPA. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan.* 62 : 240~242.
- Osaki, H., K. Nomiya and K. Ishikawa (2011). Improved multiple rapid immunofilter paper assay to detect three viruses of cucumber simultaneously. *J. Gen. Plant Pathol.* 77 : 307-311.
- Tsuda, S., M. Kameya-Iwaki, K. Hanada, Y. Kouda, M. Hikata and K. Tomaru (1992). A novel detection and identification technique for plant viruses: rapid immunofilter paper assay (RIPA). *Plant Dis.* 76 : 466~469.
- Tsuda, S., M. Kameya-Iwaki, K. Hanada, I. Fijisawa and K. Tomaru (1993). Simultaneous diagnosis for plants infected with multiple viruses employing rapid immunofilter paper assay (RIPA) with two-step method ; multi-RIPA. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan.* 59 : 200~203.