

## DAS - ELISA 法によるトマト黄化えそウイルス (TSWV - O) のキクからの迅速診断

松浦 明\*  
(宮崎県総合農業試験場)

**Rapid detection of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) infected to *Chrysanthemum* using DAS-ELISA.** Akira Matsuura (Miyazaki Agricultural Experiment Station, Sadowara, Miyazaki, 880-0212, Japan)

**Key words :** Chrysanthemum , ELISA, *Tomato spotted wilt virus*, TSWV

### 緒 言

トマト黄化えそウイルス (TSWV) は全国で発生が問題となっているウイルスであり、平成9年には宮崎県のキクでも発生が確認されている (松浦ら, 1998)。その後も突発的ではあるが、他の地域のキクやピーマンに発生が認められ、今後の発生面積の拡大が懸念されている。本県では本ウイルスの蔓延と防止のため、現地から感染が疑われるサンプルについては各種診断を実施し、本ウイルスの同定を行ってきた。特に TSWV によるキクえそ病は、茎にえそが出るなどの特徴的な症状がみられるため (松浦ら, 1998)、症状によって感染の有無を判定することも可能であるが、品種によっては症状が非常にあいまいで生理障害と区別のつきにくいものも多い。これまで同定には DAS-ELISA 法 (二重抗体サンドイッチ法, double antibody sandwich ELISA) を用いてきたが、本県で実施してきた DAS-ELISA 法の手順ではコーティング処理から発色まで約2日間必要であった。そのため、突発的に本ウイルスが発生した場合、迅速に診断ができず、簡易で迅速に診断できる方法が求められていた。

今回 DAS-ELISA 法において、従来実施していたサンプルとコンジュゲートを別々に処理する手法 (以下通常法) と、同時に反応させる手法 (以下同時分注法) を比較し、キク発病葉からのトマト黄化えそウイルスの最適な検出時間の検討と検定時間の短縮化を図った。

### 材料および方法

各試験にはキク感染株 (品種不明) の上位発病黄化葉と、対照として健全キクの上位葉 (品種: 秀芳の力) を供試した。それらを2.0%ポリビニルピロリドン (PVP) と0.1%亜硫酸ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) を添加した0.05%TWEEN20入り0.02Mリン酸緩衝液 (pH7.2) (以下PBST) を用いて磨砕した。キク発病葉は1,600倍で健全葉は50倍量で磨砕後、遠心分離等の処置を行わず、そのままELISA用プレート (ICN社製96ウェル丸底) の1処理当たり3ウェルに分注した。

抗体は TSWV-O モノクローナル抗体を日本植物防疫協会より購入し、コーティング液はカーボネート緩衝液 (pH9.6)、コンジュゲート液は PBST を用いてそれぞれ500倍 (所定量) に希釈して使用した。同時分注法ではコンジュゲート液を処理後、サンプル磨砕液を同量分注した。また、コンジュゲート液の濃度は分注後のウェル中で500倍になるように調整した。

発色は p-ニトロフェニルりん酸 2 ナトリウムを10%ジエタノールアミン溶液 (pH9.8) に1mg/mlの濃度で溶解したものをプレートに分注し、25℃で60分反応後、オートリーダー (OD405nm) を用いて測定し、3ウェルの平均を測定値とした。各処理間には PBST で3分間3回ずつ洗浄を行った。

#### 1. 通常法と同時分注法における非特異反応の発生と検出感度の検討

磨砕緩衝液の PBST に2.0% PVP と0.1%  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  を添加することで通常法と同時分注法におけるキク健全葉の非特異反応とキク発病葉の検出感度がどのように変化するかを検討した。

\*現在 宮崎県病害虫防除所

\*Present address: Miyazaki Plant Protection Office, Sadowara, Miyazaki, 880-0212, Japan

通常法及び同時分注法のプレートへのコーティング処理条件はそれぞれ4℃, 16.0h, 通常法のサンプル処理条件は4℃, 16.0h, コンジュゲート処理条件は37℃, 3.0hで実施した。同時分注法のコンジュゲートとサンプルの同時分注処理条件は4℃, 16.0hで実施した。

## 2. 同時分注法における各処理条件の検討

同時分注法を用いてコーティングと同時分注の処理条件を検討した。抗体のコーティング処理条件の検討では、処理温度・時間をそれぞれ①4℃, 16.0h ②37℃, 0.5h, ③37℃, 1.0h, ④37℃, 2.0h, ⑤37℃, 4.0h, に設定し、各区の検出感度を比較した。コンジュゲートとサンプルの同時分注処理条件は4℃, 16.0hに統一した。

コンジュゲートとサンプルの同時分注処理条件の検討では、抗体のコーティング処理条件を4℃, 16.0hに統一し、同時分注処理条件をそれぞれ①4℃, 16.0h ②37℃, 0.5h, ③37℃, 1.0h, ④37℃, 2.0h, ⑤37℃, 4.0h, に設定し、各区の検出感度を比較した。

サンプルはPVP, Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>を添加したPBSTで磨砕した。

## 3. 同時分注法における最短検出時間の検討

TSWVを迅速に検出する条件を検討するため、抗体のコーティング処理条件を①37℃, 0.5h, ②37℃, 0.5h ③4℃, 16.0h, ④4℃, 16.0h, コンジュゲート液とサンプル液の同時分注処理条件を①37℃, 0.5h, ②4℃, 16.0h, ③37℃, 0.5h, ④4℃, 16.0hに設定し、最短検出時間の検討を行った。

サンプルはPVP, Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>を添加したPBSTで磨砕した。

## 結 果

### 1. 通常法と同時分注法における非特異反応の発生と検出感度の検討

磨砕緩衝液のPBSTにPVP, Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>を添加した結果、通常法ではキク健全葉の非特異反応を半分以下にまで抑えることができた。また、同時分注法では添加の効果はあまり認められなかったが、同時分注するだけで非特異反応を低く抑えることが可能であった。(第1図, A)

発病葉の1,600倍希釈における検出感度を比較した結果、同時分注法で磨砕緩衝液であるPBSTにPVP, Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>を添加した区で最も高い検出感度が得られ、次に同時分注法で磨砕緩衝液にPBSTのみを使用した区の検出感度が高かった。通常法のそれぞれの区では発病葉からTSWVを検出することは可能であったが、同時分注法に比較するとその検出感度は低かった。(第1図, B)

### 2. 同時分注法における各処理条件の検討

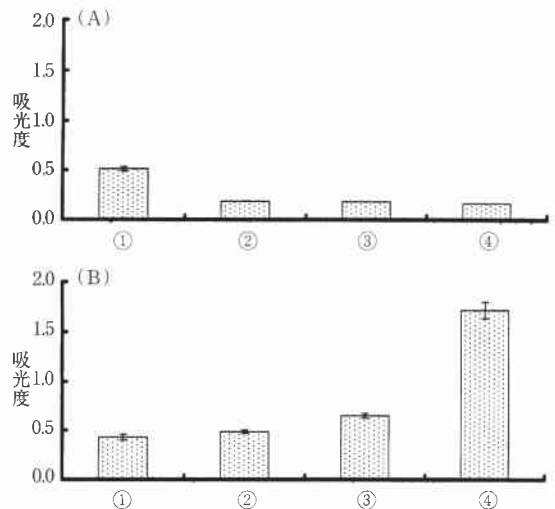
コーティング処理条件の検討ではすべての処理区で

高い検出感度が得られ、区間の差は認められなかった。(第2図, A)

コンジュゲートとサンプルの同時分注処理条件の検討では、各処理条件で検出感度に大きな差が認められた。37℃, 0.5hの処理で最も検出感度が低く、37℃, 1.0h, 2.0h, 4.0hと反応時間が長くなるにつれて検出感度が高くなっていったが、最も検出感度が高かったのは4℃, 16.0hの処理であった。(第2図, B)

### 3. 同時分注法における最短検出時間の検討

最も短時間で検出できる組み合わせを検討した結果、コーティング処理条件を①37℃, 0.5h, コンジュゲート液とサンプル液の同時分注処理条件を①37℃, 0.5hにした区では検出感度が低かったものの、実用上十分な検出感度を得ることが可能であり、他の区に比べ最も短時間で検出が可能であった。(第3図)



第1図 通常法と同時分注法における非特異反応の発生と検出感度の検討

(A) 健全葉の非特異反応の検討結果

(B) 発病葉の検出感度の検討結果

試験区の構成

①通常法(-): 通常法でサンプル磨砕緩衝液にPBSTのみ使用。

②通常法(+): 通常法でサンプル磨砕緩衝液にPBSTにPVPとNa<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>を添加したものを使用。

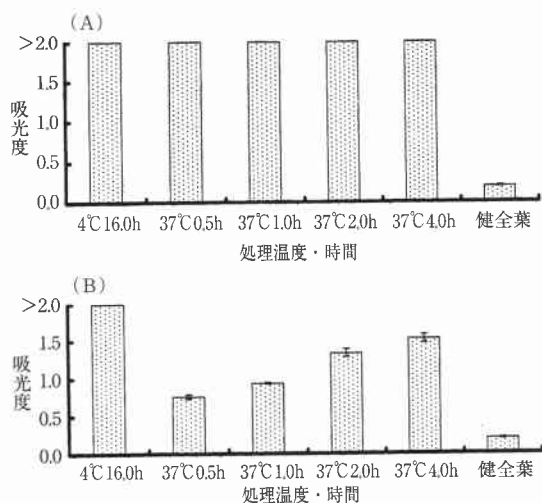
③同時分注法(-): 通常法でサンプル磨砕緩衝液にPBSTのみ使用。

④同時分注法(+): 通常法でサンプル磨砕緩衝液にPBSTにPVPとNa<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>を添加したものを使用。

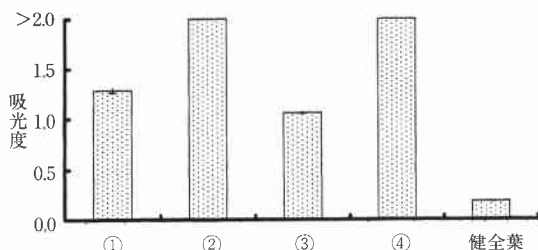
通常法ではサンプル磨砕液とコンジュゲート液を別々に反応させ、同時分注法ではサンプル磨砕液とコンジュゲート液を同時に分注し反応させた。

健全葉の希釈倍率は50倍, 発病葉の希釈倍率は1,600倍で実施した。

縦線は標準誤差を表す。



第2図 同時分注法における各処理条件の検討  
(A) コーティング処理条件の検討  
(B) コンジュゲートとサンプルの同時分注処理条件  
縦線は標準誤差を表す。



第3図 同時分注法における最短検出時間の検討  
コーティング処理条件+コンジュゲートとサンプルの  
同時分注処理条件  
①37°C 0.5h + 37°C 0.5h ②37°C 0.5h + 4°C 16.0h  
③4°C 16.0h + 37°C 0.5h ④4°C 16.0h + 4°C 16.0h  
縦線は標準誤差を表す。

## 考 察

TSWVに感染し発病したキクの発病葉から本ウイルスを検出する方法として、DAS-ELISA法は一般的に行われているが、詳しく検出条件を検討した報告はほとんど無く、処理条件は各検定者が経験的に決定していることも多い。今回、効率的にTSWVを検出する条件がいくつか判明した。

ELISA法における健全植物の非特異反応は植物によっては強く発生することが知られており(千田ら, 1994)、今回、供試したキク品種「秀芳の力」において、通常法でPBSTのみで磨砕した場合、検定に問題が生じるレベルの非特異反応を生じた。(第1図)非特異反応を抑える方法として、磨砕緩衝液を変えたり、磨砕緩衝

液にPVP、仔牛血清アルブミンなどの添加が有効であることが報告されている(大木, 1997)。今回、添加物としてPVPと $\text{Na}_2\text{SO}_3$ を用いたところ、通常法では非特異反応を十分抑制することができた。同時分注法を用いた場合、PVPと $\text{Na}_2\text{SO}_3$ の添加の有無にかかわらず非特異反応は低く抑えられた。

また検出感度を比較した場合、同時分注法ではPVPと $\text{Na}_2\text{SO}_3$ を添加した区は添加しなかった区に比べ、2倍近い検出感度を得ることができた。サンプルとコンジュゲートを同時に処理する方法はいくつかのウイルスで試験されており、キュウリモザイクウイルス(CMV)とズッキーニ黄斑モザイクウイルス(ZYMV)及びカボチャモザイクウイルス(WMV)を用いて行われた試験では、CMVとZYMVで通常法より感度の向上がみられたが、WMVでは逆に感度が低くなっており、ウイルスの種類によって感度が向上するかどうかは異なることが報告されている(岩崎ら, 1987)。今回検討したTSWVでは、通常法に比べ同時分注法が非特異反応の軽減や検出感度、検定時間の短縮に優れ、また、更にPVPと $\text{Na}_2\text{SO}_3$ の添加は検出感度を上げるのに効果的であった。

同時分注法は通常法に比べ、検定時間の短縮に優れ、更にコーティング処理条件を37°C、0.5h、コンジュゲートとサンプルの処理条件を37°C、0.5hにまで短縮した場合、検出感度が低くなるものの、4時間程度で検定を終わらせることが可能であった。

TSWVは感染株であっても無病徴部のウイルス濃度が非常に低く、そこからの検出はELISA法では困難であることが多い(藤ら, 1997)。今回、コンジュゲートとサンプルの同時分注処理条件を最も高い検出感度が得られた4°C、16.0hに設定した条件でも感染株の無病徴葉からTSWVを検出することは不可能であった(未発表)。そのため、ウイルス濃度が低いと思われる感染未病徴株の検定にはELISA法より高感度なRT-PCRのような手法を用いる必要があると思われる。

本研究によりTSWVに感染し発病した緊急を要するサンプルの場合でも迅速に検定し、現場での防除指導に十分対処することが可能である。また短時間で検定できることから、普及センター等の現地でも使用できると思われる。

## 摘 要

DAS-ELISA法を用いてTSWVをキク発病葉から簡易迅速に検出するため、サンプルとコンジュゲートを別々に処理する通常法と、同時に反応させる同時分注法

を比較した。キク健全葉の非特異反応は磨砕緩衝液の PBST に 2.0%PVP, 0.1%Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> を添加することで、通常法では十分抑えられ、同時分注法では添加の効果は認められなかったが、同時に処理するだけで非特異反応を低く抑えることが可能であった。また、検出感度は同時分注法に PVP, Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> を添加した区が最も高かった。この同時分注法のコーティング処理条件とコンジュゲートとサンプルの同時分注処理条件の検討を行ったところコーティング処理条件は検出感度に影響をあまり及ぼさず、コンジュゲートとサンプルの同時分注処理条件が検出感度に影響を及ぼすことが明らかとなった。また、この結果を元に迅速に検出する条件を検討した結果、コーティング処理条件を 37℃, 0.5 h, コンジュゲート液とサンプル液の同時分注処理条件を 37℃, 0.5 h にする組み合わせは検出感度が低くなるものの、実用上十分な検出感度を得ることが可能で、従来 2 日間必要だった検定を 4 時間程度で終わらせることが可能であった。

## 引用文献

- 松浦 明・田村逸美・三浦猛夫 (1998) 宮崎県で初確認されたトマト黄化えそウイルス (TSWV-O) によるキクえそ病. 九州農業研究 60: 77.
- 千田茂樹・高橋義行・河野敏郎・小島 誠 (1994) 花卉類の ELISA 検定における非特異反応. 関東病虫研報 41: 163-164.
- 大木 理 (1997) 植物ウイルス同定のテクニックとデザイン. 日本植物防疫協会 (東京), pp. 55.
- 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.
- 藤 晋一・平野哲司・中込暉雄・大石一史・中前 均 (1997) キクえそ病 (TSWV) の診断. 関西病虫研報 39. 61-62.

(2001年4月30日 受領)