

## ビオチン・アビジンシステムを用いた酵素結合抗体法 (ELISA) によるトマトかいよう病菌の高感度検出

草野 成夫\*・吉永 文浩・國武 孝浩・中堀 裕二  
(福岡県病害虫防除所)

**Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using the biotin-avidin system.** Nario Kusano\*,  
Fumihiko Yoshinaga, Takahiro Kunitake and Yuji Nakahori

A sensitive detection method was used to assay for *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, a causal pathogen of tomato bacterial canker, in tomato fields. Antibodies against the pathogen were biotinylated to use as a conjugate for DAS-ELISA. The dilution end-point of bacterial suspension was about  $10^3$  CFU per ml. The bacteria were not detected in leaves within 1 week after the inoculation of the bacterial suspension, but were detected more than 2 weeks after the inoculation, from symptomatic plants. Dilution tests for the detection of *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* using this conjugate from infected plant proved that the dilution end-point was 240 times more. The antigens were also detected in supernatant from infected tomato seeds and from infested soil suspended in citrate buffer.

**key words:** *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, DAS-ELISA, biotinylated conjugate

### 緒 言

トマトかいよう病 (tomato bacterial canker) は、日本においては1958年に北海道で最初に発見されて以来、東北地方を中心に全国的にその発生が認められ、生産上問題となっている。福岡県では、2000年産施設トマトにおいて大発生して経済的な損失を被り大きな問題となった。トマトかいよう病菌 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*C. michiganensis* subsp. *michiganensis*) は、種子伝染及び土壌伝染を行うことが示唆されており、一旦ほ場内で発生するとその被害は急速に拡大する傾向にある。そのため、病原細菌の迅速な同定や、トマト罹病苗またはほ場で栽培している罹病植物体からの細菌の検出が重要である。

現在まで、植物病原細菌の検出・定量には選択培地を

用いた希釈平板法や特異性の高い血清学的手法として蛍光抗体法などが行われてきた。しかし、SMCMM 培地などの選択培地 (植松ら, 1977; 白川ら, 1988) は作製が煩雑な上、培養に時間を要することから、多量の検定を迅速に処理できない等の問題がある。また、蛍光抗体法は特異性が高く、植物組織での細菌の動態を把握するには好都合であるが、細菌の定量や多検体の処理には向いていない。

このため、1980年代よりウイルス等微細な病原体の検出のため酵素結合抗体法 (ELISA) の開発・利用が進んでいる (Vruggink, 1978; 高橋義行, 1988; 土屋ら, 1989)。トマトかいよう病細菌では、白川ら (1990) が抗血清を作成し ELISA での適用を報告している。しかし、従来の方法では植物体からの検出感度が不足すると考えられた。そこで、ビオチン標識抗体を用いてその改良を行い、若干の知見を得たので報告する。

### 材料および方法

#### 1. 供試菌株および罹病植物体

平成11年から12年に農家ほ場で発生したトマトかいよ

\*現在 福岡県農業総合試験場果樹苗木分場

\* Present address: The Branch of Fruit Tree Sapling, Fukuoka Agricultural Research Center, Tanushimaru, Fukuoka 839-0012, Japan

う病罹病植物から PSA 培地 (ジャガイモ200g, ショ糖20g, 寒天20g, 蒸留水1l) を用いて分離した *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* を実験に供試した。なお、供試株はあらかじめ単コロニー分離を3反復した後、トマトでの病原性を確認した。また、罹病植物体は、細菌懸濁液  $10^6$ CFU/ml を本葉5~6枚の幼苗基部に約0.01ml 接種した後、1週間毎に第一展開葉を採取し、その葉柄を下記試験に用いた。なお、罹病植物体の部位別試料は、接種後3週間目のものを用い、果汁、保菌種子は、現地の農家ほ場から採取したものを使用した。

## 2. 抗体の精製およびピオチン標識

白川氏より分譲された抗血清 (白川ら, 1990) を、常法 (草野ら, 1993) により抗体の IgG を分取した。

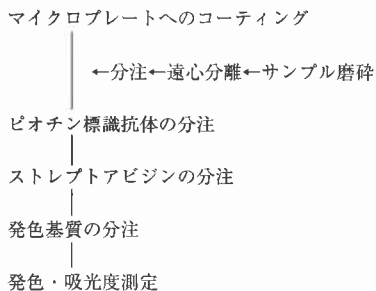
ピオチンを標識する方法は、上記の抗体をグレース社のマイクロコン30による限外ろ過法により濃縮し、N-hydroxysuccinimidobiochin (BNHS) を加えて1時間室温で静置して、標識後 PBS (リン酸一カリウム0.2g, リン酸二水素ナトリウム1.15g, 塩化カリウム0.2g, 塩化ナトリウム8g, 蒸留水1l) 中で3回透析し、腐敗防止としてアジ化ナトリウムを添加して標品とした (草野ら, 1995)。なお、段階希釈によりコーティング抗体は2,500倍、ピオチン標識抗体は4,500倍を最適希釈倍数と決定し使用した。

## 3. DAS-ELISA

ELISAの手順は、第1のとおりである。ELISAには、ヌンク社の96穴のマイクロプレートおよびグライナー社のイミュロン600のマイクロプレートを使用した。マイクロプレートリーダー (SLT社, EAR400FW) により、発色操作20分後に吸光度 (O.D.405nm) を測定した。なお、各ステップの間には、発色基質分注まで PBS-Tween による3回の洗浄を行なった。

## 4. 抗原液の調整

植物試料を磨砕する際の緩衝液の種類は、0.1%チオグリコール酸加用0.1Mクエン酸緩衝液 (CB-T: クエン酸三ナトリウム3.4g, 蒸留水1l, pH7.2) とした。植物



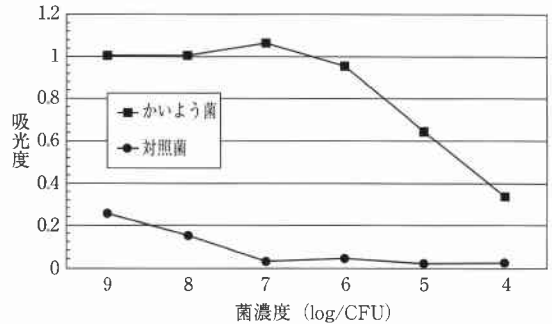
第1図 DAS-ELISAの手順

体0.2gに対し2mlのCB-Tを使用し、磨砕後1,000rpmで3分間遠心し上清を試験に使用した。また、種子および土壌からの抽出液として、滅菌水およびCB-Tを利用した。種子からの抽出方法としては、罹病、健全種子ともに10粒を上記抽出液が500 $\mu$ l入ったエッペンチューブに入れ、5分間攪拌後サンプルとして使用した。土壌からの抽出は、罹病植物体の植えられている土壌から、肉眼で識別できる根部を除去した土壌の20倍量の抽出液とともにエッペンチューブ内で攪拌して遠心後に使用した。なお、果汁については、トマト果実を潰す際に出る汁液を遠心分離し上清を使用した。

## 結果および考察

### 1. 菌濃度と検出感度

かいよう病菌懸濁液を使用して検出感度を検討したところ、検出限界は $10^3$ CFU/ml程度であり、既報 (白川ら, 1990) では $10^4$ ~ $10^5$ CFU/mlであることから約10倍から100倍向上したと考えられた。また、アルカリフォスファターゼ標識ストレプトアビジンは、ピオチン化抗体との結合係数が高く、速やかに発色基質を消化するため、短時間での吸光度測定が可能であった。



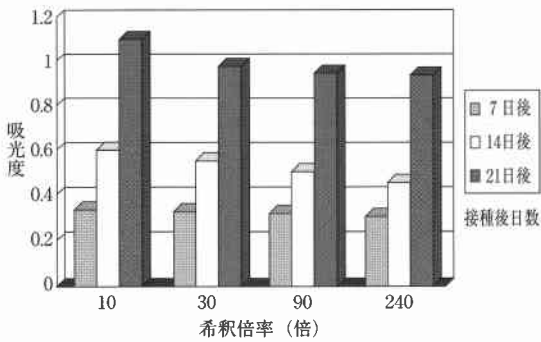
第2図 かいよう病菌濃度と検出感度

注) 対照菌: *Agrobacterium tumefaciens*

### 2. 菌接種後の検出感度

トマト幼苗にかいよう病菌懸濁液を接種すると、概ね2週間目から葉の一部に萎れが発生し始め、3週間目には葉全体に拡大した。そこで、時期別について検出可能かについて検討した。

結果は、第3図に示しているように、2週間から3週間で急激に吸光度が高くなり検出が容易となった。また、検出は植物試料濃度が240倍でも可能であった。白川ら (1990) は、グルタルアルデヒド一段法によってアルカリフォスファターゼを標識して利用した際、罹病トマト小葉での検出限界は16倍希釈程度であったと報告して



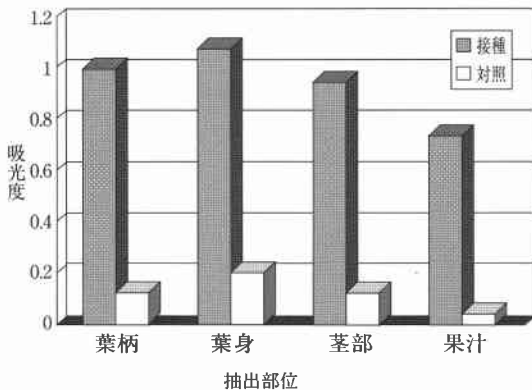
第3図 接種後の検出感度

注) 対照の吸光度: 0.1~0.15

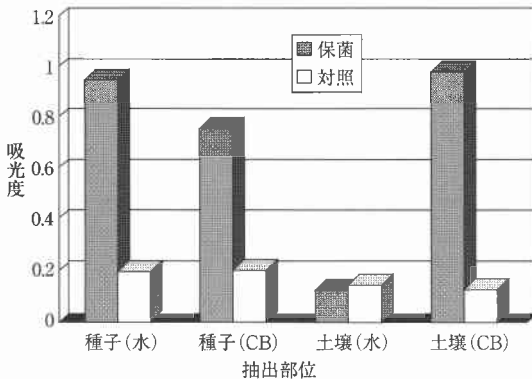
いることから、検出感度が飛躍的に向上した。

### 3. 罹病植物部位別の検出

部位別の検出感度を幼苗および果汁で検討したところ、100倍希釈した全ての試料で吸光度は1.0程度であり、罹病植物のどの部位からも検出が可能であった (第4図)。



第4図 罹病植物の部位による検出感度の違い



第5図 種子および土壌からのトマトかいよう病菌検出と吸光度

注) サンプルは150倍希釈

また、本抗体は非特異反応が少なく感度が高かった。

### 4. 種子および土壌からの検出

保菌種子から検出する場合は、滅菌水を使うとわずかに吸光度が高かったが、CB-Tによる抽出と同程度と考えられた。また、土壌からの検出では、滅菌水では抽出できず、CB-Tでは検出可能であった。この原因ははっきりしないが、抽出液の種類により *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* の土壌粒子等からの解離に難易があると推察された。

以上の結果から、抗血清中より精製したIgGにビオチンを標識することで従来と比べて *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* を高感度で検出できるようになった。従来のグルタルアルデヒド法による抗体へのアルカリフォスファターゼの標識は、作製ロットごとに力価が異なっていたり、利用している過程で活性が低下するトラブルが発生しやすい (草野ら, 1995)。また、抗体にビオチン標識することで作業のステップが1つ増えるものの、感度が向上するとともに発色時間が短縮した。さらに、本研究において、罹病種子や罹病植物が植えられていた土壌からも病原細菌の検出が可能であったことにより、本法の利用範囲がさらに広がると考えられる。

### 摘 要

トマトかいよう病の早期発見のため、トマト植物体から保菌の有無を確認する方法として、抗体にビオチンを標識する方法による DAS-ELISA の検出感度向上法を検討した。その結果、かいよう病菌接種2週間後で容易に陽性反応を示したことから、感染初期から検出できることが明らかとなった。また、発病植物体では茎、葉柄、葉身のみならず、罹病果実の果汁や乾燥種子からも容易に検出が可能であった。このことから、本方法により、ほ場でかいよう病の疑いのあるトマトから高感度に保菌の有無を診断できると考えられる。

### 引用文献

- Clark, M. F. (1981) Immunosorbent assays in plant pathology. *Ann. Rev. Phytopathol.* 19: 83-106.
- 草野成夫・下村克己 (1995) ビオチン・アビジンシステムを用いた ELISA による温州萎縮ウイルス (SDV) およびカンキツタリーフウイルス (CTLV) の検出. *日植病報* 61: 597. (講要).
- 草野成夫・下村克己 (1995) カンキツタリーフウイルス検出のための ELISA の改良. *福岡農総試報* 14: 163-166.
- 草野成夫・平島敬太 (1993) 抗体利用による病原糸状菌

- の簡易検出法の開発第1報. 福岡県農総試報 B-12: 69-72.
- 白川 隆・佐々木次男 (1990) トマトかいよう病菌細菌の検定用選択培地. 日植病報 54: 540-543.
- 白川 隆・佐々木次男 (1990) トマトかいよう病細菌 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* の酵素結合抗体法による検出. 野菜・茶業試験場報告 C. 1: 75-83.
- Shirakawa, T. and T. Sasaki (1991) Ecology and control of tomato bacterial canker and detection method of its pathogen. JARQ 25(1): 27-32.
- 高橋義行 (1988) 植物ウイルス病の血清学的診断法 (2). 植物防疫 42: 22-26.
- 土屋健一・高橋義行・匠原監一郎・本間義久・鈴木孝仁 (1989) ELISA 法による *Pseudomonas cepacia* の土壌からの検出. 日植病報 55: 123. (講要).
- 植松 勉・藤井 博・大畑貫一 (1977) トマト潰瘍病菌 *Corynebacterium michiganensis* の接種方法と種子伝染. 日植病報. 43: 22-26.
- Vruggink, H. (1978) Enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa) in the serodiagnosis of plant pathogenic bacteria. Proc. 4th Int. Conf. Plant Path. Bact. Angers, 307-310.

(2001年4月30日 受領)