

ELISA によるチューリップえそ病病原ウイルス tobacco necrosis virus の検出

宮川 正通・中臣 康範・中井 正樹*・小島 誠*

Masamichi MIYAGAWA, Yasunori NAKATOMI, Masaki NAKAI* and Makoto KOJIMA* :
Detection of tobacco necrosis virus in tulip by ELISA

タバコネクロシスウイルス (tobacco necrosis virus, 以下TNVと略) によるチューリップえそ病の発生は、我国では松澁らにより1971年に新潟県において隔離検疫中のオランダ産チューリップで確認されたのが最初である⁵⁾。また、1974年および1975年には富山県下で輸出用チューリップの栽培地検査の際に松澁らにより本病の発生が確認された⁶⁾。その後、1976年に富山県の一般栽培圃場で発生が認められ⁹⁾、次いで兵庫県でも確認されている¹⁰⁾。

これまで新潟県の一般栽培圃場ではTNVの発生は見られなかったが、1984年に初めて新潟市鳥屋野、同黒崎、北蒲原郡中条町平木田の一般栽培圃場で本病の発生が確認された。

チューリップえそ病は一般に局所的な発生にとどまることが多いが、時には汎滅的な被害を与えるので、栽培農家にとって軽視できない病害の一つであり、確実な診断法の確立が、本病防除にとって必要不可欠と思われる。

チューリップえそ病の診断は、従来から判別植物を用いた接種検定法や抗血清を用いた寒天ゲル内拡散法により行われてきた^{5,6,9)}。しかし、これらの方法では判定に多くの時間を要し、ウイルス濃度が低い場合には検出が困難であった。

一方、血清学的な診断方法として最近しばしば使用されるようになってきた酵素結合抗体法 (ELISA) は、多くの試料を同時に処理することができ、さらにウイルス濃度が低い場合でも確実かつ高い精度で診断することが可能であるとされている²⁾。

本実験では、チューリップえそ病の確実な診断法を確立するために、病原ウイルスの分離同定と精製、抗血清と酵素結合抗体 (conjugate) の作成を行い、ELISA による感染株からのウイルスの検出を試み、若干の知見を得たのでその概要を報告する。

起稿に当り、TNV抗血清を分譲して頂いた横浜植物防疫所西尾健博士、富山県野菜花き試験場名畑信研究

員、有益な御助言を賜った新潟市園芸センター桜井博氏、新潟県園芸試験場幸田達治環境課長、同服部専門技術員に厚くお礼を申し上げる。

材料および方法

被害株におけるTNVの同定は、ササゲ、インゲン、タバコ、ツルナおよび *chenopodium* にカーボランダムによる常法で汁液接種する方法とTNV抗血清による寒天ゲル内拡散法^{5,9)} および免疫電顕法⁴⁾ により行った。

ウイルスの精製材料には、1984年に新潟県北蒲原郡中条町平木田で採取した被害葉のうち、寒天ゲル内拡散法および電子顕微鏡観察で、TNV以外のウイルスが確認されなかったものだけを選んで供試した。実験によっては被害葉の搾汁液をツルナに接種して、単一病斑を分離して、再びツルナで増殖したものを精製材料とした。

TNVの精製は Kassanis³⁾ の変法にしたがった。本法では、硫酸塩析のかわりにポリエチレングリコール (PEG, M. W. 6000) によるウイルスの濃縮を行ったのち、数回の分画遠心を繰り返し、最後に得た沈渣を少量の蒸留水に懸濁し、10~40%の蔗糖密度勾配遠心法によりウイルスを精製した。

精製製品の一部は蒸留水で希釈し、分光光度計 (UV-240, 島津) を用いてウイルス量を算出した。

ウイルス粒子は NaOH で pH7.0 に調整した2%リソタングステン酸液でネガティブ染色後、電子顕微鏡 (HA-300, 日立) 観察に供した。

抗血清は純化ウイルス液 (0.3 mg/ml) 1 ml と Freund's incomplete adjuvant 1 ml を混和して乳化させたのち、家兎の下肢の筋肉に1回注射し、その後1週間おきに1 ml づつ4回耳静脈に注射することにより作成した。

毎回ウイルスを注射する直前に、耳静脈より採血した少量の抗血清を用い、重層法によりその力価を測定した。最後の注射から2週間後に、抗血清の力価が4096倍になった時点で全採血をした。

抗血清は硫酸塩析およびDEAEセルロースクロマトグラフィーにかけ、 γ -グロブリンの分画を分取した。得

新潟県園芸試験場 Niigata Horticultural experiment station, Seirou, Kitakanbara, Niigata 957-01

* 新潟大学農学部 Faculty of Agriculture, Niigata University, Niigata 950-01

られた γ -グロブリンは0.02M生理食塩リン酸緩衝液(PBS, pH7.2)で希釈し、 γ -グロブリンの量が1mg/ml ($OD_{280} \approx 1.4$)になるように調整した。

その後 Clark & Adams²⁾の方法にしたがって酵素結合抗体(conjugate)を作製した。作製した γ -グロブリンおよび conjugate は、精製ウイルス液(160ng/ml)を抗原として用い、その最適濃度を決定した。

ELISA法による診断には、材料として、現地圃場の感染株(品種:オックスフォード)より採取した球根を温室で促成栽培し、植付後11週間経過したものを供試した。これらの感染株より各部位ごとに1gずつ取り、20倍量のPBS(pH7.2, 0.05% Tween-20+2%ポリビニールピロリドン+0.1%チオグリコール酸を含む)とと

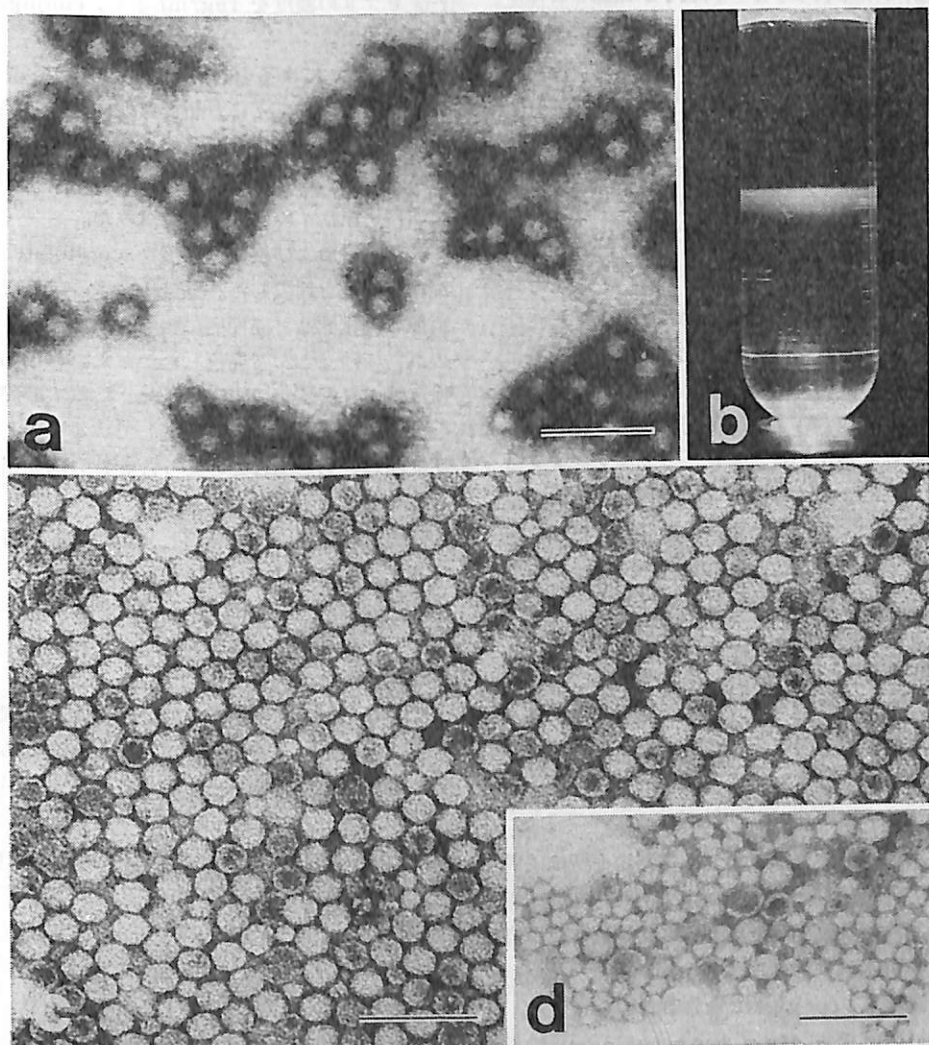
もに磨砕し、その遠心(5000rpm, 10分間)上清を抗原として供試した。

診断結果の判定は発色の程度をマイクロプレート分光光度計(MTP-12, 日立)を使い、波長405nmの吸光度を測定し、対照区(PBS区, 健全株区)あるいは精製ウイルス区と比較し判定した。

結果および考察

1 病徴と病原ウイルスの同定

新潟市鳥屋野, 同黒埼および北蒲原郡中条町平木田で発生した被害株では、本葉に褐色~黒褐色のえそ斑点が生じ、葉身のひきつれと茎のねじれが同時に観察された一部の株ではえそ斑点が灰白色となったり、花卉にえそ



a. チューリップから分離したTNV粒子の免疫電顕像(ウラニル染色)
 b. TNVの蔗糖密度勾配遠心 c. 精製したTNV粒子(リンタンングステン酸染色)
 d. TNV粒子と17~18nmの小型粒子(リンタンングステン酸染色)

注) barの長さは100nm

が生じている事例も見出された。

葉、茎および花に認められたこれらの病徴は、いずれもTNVに感染したチューリップの病徴(5,6,7,9)に酷似していた。

判別植物のササゲ、インゲン、タバコ、ツルナおよび *Chenopodium quinoa* に、被害葉の搾汁液をカーボランダムとともに汁液接種したところ、いずれの場合も接種葉にえそ斑点が形成されることが判明した。

他のウイルスとの混合感染の有無を知るため、CMV抗血清およびTNV抗血清を使って寒天ゲル内拡散法を行ったが、CMV抗血清とは反応しなかったが、TNV抗血清との間に弱い反応が見られた。しかし、PEGを使った濃縮試料では明確に沈降帯が確認された。また、電子顕微鏡観察では球状のウイルス粒子が確認されたがひも状や棒状の粒子は確認されなかった。一方、免疫電顕法の手法の一つであるデコレーション法による観察では、ウイルス粒子の周囲に抗体分子が付着し、ハローが観察された(図版a)。

以上の結果から、新潟県下の3圃場で採集した被害株はいずれもチューリップえそ病と診断され、病原ウイルスをTNVと同定した。

2 ウイルスの精製

PEGによって濃縮した搾汁液を10~40%の蔗糖密度勾配で遠心したところ、液面から約3.5cm下の部分に巾約3mmの1本の乳白色のバンドが形成された(図版b)。この部分を分取して、蒸留水に希釈したあと、数回の遠心を繰り返して純化した。また、2%リントングステン酸(pH7.0)によってネガティブ染色した標品の電顕観察では、直径27~30nmの均一な球状粒子が多数認められた(図版c)。同時にこれらの粒子のほかに、少数の直径17~18nmの粒子も認められた(図版d)。

この精製標品の希釈液は260nmの紫外部に極大値を、また242nmに極小値をもつ核蛋白特有の吸収スペクトルを示し、 $A_{max/min}=1.24$ および $A_{260/280}=1.77$ であった。精製標品はツルナに高い感染性を有し、接種4日後に典型的な病斑が形成された。

3 血清試験

精製ウイルス標品を家兎に注射し、得た抗血清は重層法で4096倍の力価を示した。また、寒天ゲル内拡散法では精製ウイルス液を抗原とした場合、8倍希釈まで反応し、明瞭な沈降帯が形成された。この抗血清を使いγグロブリンを調整し、conjugateを作製した。

ついで、coating用γグロブリンとconjugateの最適濃度を検討した。精製ウイルス液(160ng/ml)を抗原とした場合、同一希釈のconjugateではγグロブリンの濃度が1~10μgまでは吸光度 A_{405} にあまり差が

第1表 conjugateとcoating用グロブリンの最適濃度

conjugateの希釈	coating用グロブリンの濃度(μg/mg)		
	10	5	1
200倍	0.52 ¹⁾	0.58	0.67
400倍	0.39	0.44	0.44
800倍	0.26	0.28	0.31
PBS ²⁾	0.02	0.04	0.04

1) 0.02M生理食塩リン酸緩衝液。
2) 表中の数値はE₄₀₅の吸光度を示す。

なく、conjugateの濃度を変えると200倍希釈で吸光度が最も高かった(表1)。しかし、400倍に希釈したconjugateを使用しても、実際の診断に際し支障をきたすことがなかったので、以後の実験ではcoating用γグロブリンの濃度を1μg/mlとし、conjugateは400倍希釈とした。

4 ELISAによるTNVの検出

上述の結果をもとに、新潟県北蒲原郡中条町平木田の圃場で採取した被害株(品種:ゴールドンオックスフォード、オックスフォード)を供試材料として、ELISAによる病原ウイルスの検出を試みた。

葉、球根および根の搾汁液をconjugateと作用させ発色の程度を比較した。感染株由来の試料ではいずれも対照の純化標品と同程度に強く発色したが、健全株由来の試料ではほとんど発色しなかった。Beijersbergenらはユリのりん茎をPBS-Tween溶液で磨砕すると、非特異発色が認められると指摘している¹⁾が、チューリップを試料とした場合このような非特異は見出されず、磨砕液の検討は不用と思われた。

被害株の球根を促成栽培し、開花直前に各部位に分けTNVの検出を試みた。表2に示すように、葉身では感染株と健全株との間に発色程度に差異がなかったが、根部や新たに形成された球根では感染株と健全株との間に明確な差が認められた。

このように、本実験に供試した個体は採取時点において葉身にえそ斑点を生じている株の球根であるにもかかわらず、次年度に植付けた葉ではえそ斑点が見出されず

第2表 ELISAによる各部位からのTNVの検出

調査株 ¹⁾	調 定 部 位				
	葉	根	主 球	外仔球	
TNV感染株	A	0.03 ²⁾	0.42	1.30	0.65
	B	0.03	0.66	1.48	0.50
	C	0.04	0.67	0.51	
健全株		0.03	0.07	0.05	
精製ウイルス			0.21		

1) 植付後11週間。
2) 表中の数値はE₄₀₅の吸光度を示す。

ウイルスの検出も困難であった。同様な知見は名畑らによってもすでに認められている⁸⁾。

外部的には感染株としては認められないにもかかわらず、葉身以外の球根や根部ではウイルスが明確に検出された。坂本、松尾¹⁰⁾も被害株由来の球根を使った試験で、根にTNVを保有しているにもかかわらず、地上部は外観上健全に生育する個体が多いことを報告している。

これらの知見から、えそ病発生圃場で採取した球根は生育時における葉身の病徴にもとずいてえそ病感染の有無を判定することは極めて危険と考えられる。

また、感染株由来の球根の病徴発現が翌年ではなく2年目に病徴が発現する可能性を考えると、TNV汚染球の拡散の危険も考えられ、チューリップえそ病根絶の困難さが示唆される。

摘 要

1 1984年、新潟県下のチューリップに新たに発生したウイルス病は、病徴、接種試験および、血清反応の結果からチューリップえそ病と診断され、その病原をタバコネクロシウイルス(TNV)と同定した。

2 被害株の搾汁液をPEGで濃縮したあと、分画遠心および蔗糖密度勾配遠心法によってTNVを精製した。

3 精製標品の紫外線吸収は260nmに極大値、242nmに極小値を示し、 $A_{max/min}=1.24$ 、 $A_{260/280}=1.77$ と測定された。精製標品の電顕観察では、直径27~30nmのウイルス粒子と直径17~18nmの粒子が確認された。

4 精製したTNVを家兎に免疫し、4096倍の力価を有する抗血清をこの抗血清から γ -グロブリンを分画したあと、酵素結合抗体(conjugate)を作成した。ELISAのためのcoating用 γ -グロブリンおよび、conjugateの最適濃度をそれぞれ $1\mu\text{g/ml}$ および、400倍希釈とした。

5 ELISAによりTNV感染株の検定を試みたところ、球根および根部における保有が確認された。しかし

葉身におけるウイルスの検出は困難であった。それゆえ葉に病徴が認められなくとも地下部にウイルスを保有している可能性が高いので、地上部の病徴だけでもとずくえそ病の診断は危険と結論した。

引用文献

- 1) Beijersbergen, J.C.M. and Hulst, Carola Th. C. van der (1980) Application of enzymes during bulb tissue extraction for detection of lily symptomless virus by ELISA in *Lilium* spp. *Neth. J. Pl. Path.* 86: 277~283.
- 2) Clark, M.F. and Adams, A.N. (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosolvent assay for the detection of plant viruses *J. gen. Virol.* 34: 476~483.
- 3) Kassanis, B. (1970) Tobacco necrosis virus. *C.M.I./A.A.B. Description of plant viruses.* No. 14.
- 4) Kojima M. Chou, T. and Shikata, E. (1978) Rapid diagnosis of potato leafroll virus by immune electron microscopy. *Ann. Phytopath. Soc. Japan.* 44: 585~590.
- 5) 松濤美文・末次哲雄・諸橋公穂(1971) 輸入検疫中にチューリップから発見された Tobacco necrosis virus について. *植防研報* 9: 45~49.
- 6) 松濤美文・西尾 健・木村 茂・藤井伸泰(1977) 国内産チューリップより分離された Tobacco necrosis virus. *植防研報* 14: 17~23.
- 7) Mowat W.P. (1970) Augusta disease in tulip—a reassessment. *Ann. Appl. Biol.* 66: 17~28.
- 8) 名畑清信・草葉敏彦(1980) チューリップえそ病発病跡地土壌におけるTNVの消長. *富山農試研報* 11: 21~24.
- 9) 名畑清信・岩木満朗・草葉敏彦(1978) Tobacco necrosis virusによるチューリップえそ病の発生. *富山農試研報* 9: 1~10.
- 10) 坂本 庵・松尾綾男(1980) チューリップにおけるTNVの伝染実態. *日植病報* 46: 88.

(1985年8月31日受領)