

新潟県におけるダイズウイルス病に関する研究 (第4報) DIBA 法によるダイズモザイクウイルスの検出

立見康明・小島 誠・原沢良栄*・藤巻雄一*

Yasuaki TATSUMI, Makoto KOJIMA, Ryoei HARASAWA* and Yuichi FUJIMAKI*:
Studies on soybean virus diseases in Niigata Prefecture (4) Detection of
soybean mosaic virus by dot-immunobinding assay (DIBA)

Summary

Dot immuno-binding assay (DIBA) was confirmed to be useful for detection of soybean mosaic virus (SMV) from infected soybean plants. A combination of diluted anti-SMV serum (1/2000-1/4000) and 2000-fold diluted conjugate (anti-rabbit goat IgG-alkaline phosphatase) was found to be the optimum condition for DIBA. Under this condition, viral antigens were easily detected by DIBA in leaf materials of plants inoculated or naturally infected with SMV. The 1000-fold diluted crude saps and diluted purified preparations at 10 ng/ml were crucial for DIBA under this condition. The sensitivity and reliability of DIBA for detection of SMV were almost same as those of ELISA. Additionally, the DIBA procedure was able to be completed within 5 hours, that is rather short than that of ELISA.

筆者らはこれまで、新潟県におけるダイズウイルス病の発生実態を明らかにすべく調査研究を進め^{1,7)}、ダイズ褐斑粒との関係で議論されているウイルスの一つであるダイズモザイクウイルス (SMV) の診断に当たっての酵素抗体法 (ELISA) の有用性について報告してきた⁴⁾。この ELISA はその反応特異性、ならびに検出感度がきわめて高いことから、近年多くのウイルスの検出、診断に利用されている。しかしながら、ELISA はその手順がやや煩瑣でかつ長時間を要する難点がある。最近、ELISA の反応原理に従い、その長所を生かし、欠点を補う簡便でより実用的なウイルス検定法として dot-immunobinding assay (DIBA) が開発された^{2,3,8)}。本研究ではこの DIBA 法を用いてダイズのウイルスにつきその検出を試みたところ、良好な結果が得られたので、圃場診断への応用の可否について調べてみた。

材料および方法

1 供試ウイルスと植物

前報^{4,7)}同様、本試験においても SMV (B 系統) を用い、ダイズ品種十勝長葉で増殖維持した。罹病葉は生葉

あるいは -20°C で凍結保存したものを供試した。また、一般圃場から採集したダイズ葉試料は全て -20°C で凍結保存したものを供試した。

2 供試抗血清

本試験では、SMV の検定に際しては前報⁴⁾で報告した抗 SMV 血清 (力価 1/512) を使用した。また、一部の試料についてはダイズ萎縮ウイルス (SSV) の検定のため抗キュウリモザイクウイルス (CMV) 血清⁵⁾も供試した (SSV は CMV と血清学的類縁関係が高いことが知られている)⁶⁾。

3 DIBA 試験に用いた試薬および溶液

DIBA に用いた緩衝液等は以下の通りである。

TBS: 20mM トリス-塩酸-500mM NaCl, pH 7.5

TTBS: 0.05% Tween 20-TBS

TTBSPB: 2%ポリビニールピロリドン (分子量40,000)-0.2%仔牛血清アルブミン-TTBS

ブロック液: 2%ポリビニールピロリドン-2%仔牛血清アルブミン-TTBS (上記の緩衝液には0.02%アジ化ナトリウムを添加した)

一次抗体液: 抗血清を TTBSPB で希釈した。

二次抗体液: アルカリ性フォスファターゼ標識抗ウサギーヤギ IgG (Tago 社) を TTBSPB で希釈した。

基質緩衝液: 0.2M トリス-塩酸, pH 8.2

新潟大学農学部 Faculty of Agriculture, Niigata University, Niigata 950-21

*新潟県農業試験場 Niigata Agricultural Experiment Station, Nagaoka 940

基質発色液^②: 6mg/ml Fast Red TR (Sigma 社)
を基質緩衝液に溶解—①0.1% naphthol AS-MX
phosphate (Sigma 社)を基質緩衝液に溶解—②使
用直前①と②を等量ずつ混合した。

停止液: 蒸留水

4 DIBA の手順

DIBA の手順は原法^{2,3)}を少し簡略した方法を用い
た。

a) 抗原液の作成: 通常は試料に10倍量の TTBS を
添加し、磨砕したのち粗汁液を遠心分離 (10,000 rpm,
5分間) した上清を抗原とした。

b) シートの前処理: ニトロセルロースシート (Bio
Rad 社, 孔径 0.45 μ m) を適当な大きさに切断し、プラ
スチック容器内の TBS 中に浸漬し、15分間静置した。
その後、濾紙上に移し、5分間風乾させた。

c) 抗原の添加: a) で調整した抗原液を微量ピペッ
トを用い、予め鉛筆で書いておいた各マス目の中央に
10 μ l 宛スポットし、濾紙上で5分間風乾させた。

d) ブロック液処理: これらのシートをプラスチッ
ク容器内のブロック液中に浸漬し、30分間静置した。

e) 一次抗体処理: ブロック液処理後、シートをプラ
スチック容器内の一次抗体液中に浸漬し、1時間反応さ
せた。

f) シートの洗浄: 反応後、シートを蒸留水中で軽く
濯ぎ、プラスチック容器内の TTBS 中に浸漬し、20
分間軽く振盪しながら洗浄した (その間 TTBS を 2
回交換した)。

g) 二次抗体処理: 洗浄後、シートを二次抗体液中に
浸漬し、1時間反応させた。

h) シートの洗浄: f) と同様に洗浄を行った (但し
洗浄液は TTBS を用いた)。

i) 基質発色液処理: 洗浄後、シートを濾紙上で軽く
風乾し、基質発色液中に浸漬し、1時間静置した。

j) 停止液処理: シートを蒸留水中に移し、30分間静
置し発色反応を止めた。

k) 結果の判定: シートを蒸留水中に浸漬した状態
で肉眼判定した (ピンクのスポットの有無を観察)。

l) シートの保存: シートを濾紙上で風乾し、ポリエ
チレン袋に封入保存した (必要に応じ、蒸留水中に再び
浸漬し、写真撮影などに供した)。

結 果

1 至適条件の検討

SMV 感染葉および健全ダイズ葉からの抗原液を用い
一次抗体、二次抗体、の種々の希釈度の組み合わせで
DIBA の至適条件を検討した。条件の決定には非特異

反応の防止、得られたスポットの発色強度、経済性を
考慮に入れた一次抗体、二次抗体の希釈度の組み合せ
を一応の目安とした。各組み合わせの結果を第 1 表に示
した。上記の条件を満たすものとして一次抗体希釈度
2,000~4,000倍、二次抗体希釈度 2,000倍を至適条件と
した。

第 1 表 ダイズモザイクウイルスの検定のため
の DIBA 法の至適条件

抗体希釈度		抗原希釈度			
1次抗体	2次抗体	10 倍		100 倍	
		罹病葉	健全葉	罹病葉	健全葉
1,000倍	2,000倍	卍*)	±(p)*)	卍	—
2,000倍	"	卍	(G)	卍	—
"	3,000倍	+	(G)	卍	—
4,000倍	2,000倍	卍	(G)	卍	—
"	3,000倍	+	(G)	卍	—
5,000倍	2,000倍	+	(G)	卍	—

a) 卍: 強い発色, 卍: 弱い発色, +: 汁液の緑色が少し残る。

b) P: 弱いピンクに緑色が混じったもの, G: 緑色

また、この至適条件下では感染葉粗汁液を1,000倍ま
で希釈して陽性の反応が認められた。しかし、実際の診
断に当っては10倍希釈液を使用するが妥当と考えた。一
方、精製 SMV 標品を用いて希釈限界を調べたところ、
10ng/ml まで検出が可能であった。当然ながら、ウイル
ス抗原濃度が高いほど、発色スポットの面積が大きくな
り、スポットの発色強度も高く現われた。

2 診断の試み

62年6月から8月にかけて新潟県各地域のダイズ圃場
からモザイク株 (擬似株も含む) を採集し、DIBA 法に
よりウイルスの検出、診断を試みた。この試験において
は SMV の外に SSV の検定も併せ行った。エンレイに
ついては SMV によるモザイク株と判断された株が30株
中4株で、SSV によると思われる株5株、SMV と SSV
重複感染と思われる株が9株であった。また、モザイク
症状を呈しながら、抗 SMV、抗 CMV 血清何れとも反
応が認められない株が12株もあった。一般エダマメ (品
種不詳) からは46株中37株が SMV 単独感染、9株が S
MV と SSV との重複感染と判断された。一方、タチスズ
ナリでは19株全てが SMV による単独感染と診断された
(第 2 表)。

考 察

ダイズウイルス病の診断に当って DIBA 法が有効で
あることが判明した。ELISA 法と比較すると次の点が
利点として考えられる。①感度は ELISA とほぼ同程度
に高い。②反応に特殊な機器を必要としない。③操作が
簡便で、判定まで約5時間と迅速である。一方では欠点

第2表 DIBA 法によるウイルスの検定

品 種	採集地域	調査株数	各抗血清に対する反応別個体数			
			SMV(+) CMV(-)	SMV(+) CMV(+)	SMV(-) CMV(+)	SMV(-) CMV(-)
エンレイ	5市町6地域	30	4	9	5	12
タチスズナリ	村松町	19	19	0	0	0
エダマメ	5市町6地域	46	37	9	0	0
合 計		95	60	18	5	12

もある。即ち、①定量的でない。②非特異反応が生じ易いなどである。しかし、至適条件を予め決定しておくことにより、かなり精度の高い診断が可能と考える。実験設備のないところでも充分活用される診断法の一つであるとする。

これまでの調査は主として SMV のみを対象として進めてきたが、本試験では SSV についても併せて検討したところ、エンレイにおいては SSV 単独感染と考えられる株や SMV と SSV との重複感染と思われる例のあることが明らかとなり、新潟県においても SMV の外に SSV によるモザイク病、引いては SSV による褐斑粒の発生の可能性もあることが示唆された。また、抗 SMV、抗 CMV 血清とも反応しないモザイク株があったことからこれら以外のウイルスもダイズモザイク病に関与している可能性も充分考えられ、更なる病原ウイルスの探索の必要性を痛感させられた。

摘 要

1 DIBA 法による SMV の検出のための至適条件は、一次抗体希釈倍数は2,000~4,000倍、二次抗体（コンジュゲート）希釈倍数は2,000倍であった。

2 抗原の希釈倍数は10倍が適当と考えた。

3 至適条件下での抗原検出限界は粗汁液で1,000倍

まで、精製標品では10ng/mlであった。

4 反応時間が短縮され、判読まで約5時間で足ること、感度も ELISA のそれに匹敵することから一般への普及が可能と考えた。

5 SMV 以外に SSV の本県での分布が明らかとなつた。

6 SMV、SSV 以外の病原ウイルス存在も示唆された。

引用文献

1) 藤巻雄一・原沢良栄・矢尾板恒雄・小島 誠 (1987) 北陸病虫研報 35:66~68. 2) 日比忠明 (1984) 植物防疫 38:380~384. 3) Hibi, T. and Saito, Y. (1985) J. gen. Virol. 66:1191~1194. 4) 小島 誠・高野直行・原沢良栄・藤巻雄一 (1987) 北陸病虫研報 35:69~71. 5) 佐野義孝・関川正規・小島 誠 (1986) 同 34:45~48. 6) 高橋幸吉・宇田川晃・都丸 敬一・斎藤康夫 (1970) 日植病報 36:374. 7) 高野直行・小島 誠・原沢良栄・藤巻雄一 (1987) 北陸病虫研報 35:72~74. 8) Yoshikawa, N. Poolpol, P. and Inouye, T. (1986) Ann. Phytopath. Soc. Japan 52:728~737.

(1988年6月25日受領)