キュウリモザイクウイルス検出診断のための 簡易寒天ゲル内拡散法*

匠 原 監一郎**・井 上 忠 男**

Kenichiro SHOHARA and Tadao INOUE : Simplified immunodiffusion
techniques in agar gel for detection and serodiagnosis
of cucumber mosaic virus

Abstract

Simplified radial and double diffusion (SRD and SDD, respectively) techniques were developed for rapid detection and serodiagnosis of cucumber mosaic virus (CMV). Both techniques were based on immunodiffusion test in agar gel on microscopic glass slide with some modification. Filter paper disks were arranged on agar bed (containing antiserum for SRD test) as antigen reservoirs, on which NaCl treated leaf tissues were mounted. For SDD test, filter paper saturated with antiserum was placed on agar gel, and filter paper disks for sample antigens were arranged around it. Solution of 24 % NaCl was used successfully for dissociating CMV (including 5 isolates) into fast diffusible and immunoreactive antigen. Immunoreactions were finally read after overnight period at room temperature. The serological detection of CMV was found to be as sensitive as, or in some cases, more reliable than bioassay on cowpea. Nonspecific precipitates sometimes occurred in agar gel with plant species excepting main vegetables. The precipitates, however, did not seriously interfere with interpretation of SDD test.

(Received September 8, 1978)

緒 言

植物ウイルスの検出、定量および類縁関係解明などのために各種の血清学的手法があるが、ウイルス病診断への利用を目的とした手法の簡便化も種々試みられている^{1,9,10,17}。しかし、血清学的手法の多くは特殊な設備や技術を必要とすることもあり、また診断用抗血清の供給配布体制の問題もあって、我が国では血清学的手法がウイルス病の診断に必ずしも広く利用されているとはいえない。

筆者らは寒天ゲルを用いた放射拡散法¹²⁾および二重拡散法⁹⁾を修正することにより、キュウリモザイクウイルス (CMV) を簡便に検出し、実際の診断にも広く利用できる2つの方法 (抗血清寒天スライド法; S RD法, および簡易二重拡散法; SDD法) を案出した。

本報告はこれら2方法とそれに関する基礎実験について述べたものである。

本研究を行なうにあたり、終始懇篤な御指導を賜った前大阪府立大学教授田上義也博士に衷心より謝意を表する。また、岡山県、兵庫県、奈良県、大阪府、和歌山県の各農業試験場、植物病害担当の各位には本診断法を実際に御検討いただき、種々有益な御助言を賜った。ここに記して深謝の意を表する。

実験材料および方法

CMV 抗血清 免疫抗原には CMV のペポカボチャ分離株 (CMV-pepo) を用い、タバコ (*Nicotiana tabacum* L. var. Xanthi) に接種して増殖させ、ポリエチレングリコール 6,000 (PEG) による沈澱、濃

* 昭和52年度日本植物病理学会関西支部会において概要を発表した。

** 大阪府立大学農学部 College of Agriculture, University of Osaka Prefecture, Sakai, Osaka 591, Japan

縮と PEG 逆濃度勾配遠心¹⁶⁾ および蔗糖密度勾配遠心によってウイルスを純化した。純化ウイルスを等量の Freund's complete adjuvant と混合し、家兎に筋肉注射 (20 mg ずつ 4 回) して抗血清を作成した。本抗血清は寄主蛋白抗体をほとんど含まず、CMV 罹病タバコ粗汁液および純化ウイルス (0.5 mg/ml) とミクロプレシピンテストで 2,048 倍希釈まで反応し、また寒天ゲル内二重拡散法による純化ウイルスとの反応限界希釈は 512 倍のものである。

寒天スライドの作成 0.5%の粉末寒天 (Difco) を 0.85 % NaCl, 0.2 % NaN₃ とともに蒸留水 (または 0.02M トリス緩衝液, pH 7.0) に加えて加熱溶解し、湯煎上で 55°C に保ち、攪拌しながら抗血清を加えて混合した。抗血清寒天 (1.5 ml) をピペット (または注射筒) にとり、スライドガラス (7.6×2.6 cm) 上に均一にひろげ、水平に置いて固化させた (抗血清寒天スライド)。SDD 法のためには、抗血清を加えない寒天を高温のまま前述と同様にしてスライドにはりつけた (寒天スライド)。抗血清寒天および寒天スライドは湿室容器内に使用時まで室温で保存した。

抗原試料作成と血清反応の判定 両方法のための基礎実験の抗原試料には CMV 罹病タバコ葉を用いた。その他の抗原試料については各実験結果の項に記す。

タバコ葉の病徴明瞭な部分の小片 (約 1×1 cm) を数滴の処理剤 (多くの場合 24% NaCl 液) とともにパラフィルム上でガラス棒によって磨砕し、そのまま抗原試料とした。

SRD 法では抗血清寒天スライド上に 汚紙円盤 (東洋汚紙 No. 1, 直径 6.5mm, 書類パンチで打ち抜いた

もの) を 5 mm 程度の間隔をあけて並べ、その上に汁液を十分に含ませた磨砕組織をのせた。SDD 法の場合は、寒天スライドに抗血清を含ませた汚紙円盤 (または汚紙テープ) を置き、その周りに 5 mm 程度離して抗原用の汚紙円盤を並べて抗原試料をのせた。

抗血清および抗原試料を配置したスライドは湿室容器に入れて室温に置き、1 夜後に血清反応の最終判定を行なった。血清反応は第 1 図に示すように、SRD 法では汚紙周辺に輪状の沈降帯として、また SDD 法では抗原と抗血清との間に弧状の沈降帯として現われ、黒布を背景に置いた逆光線下で観察した。

実験結果

1. 抗原試料処理剤の効果 抗原の拡散速度を高めて血清反応を早く判定できるようにするために、種々の濃度のアルカリ剤¹²⁾、塩類^{2, 5)}、およびドデシル硫酸ナトリウム (SDS)¹⁰⁾ などの溶液とともに試料を磨砕して抗原とし、各処理剤の血清反応におよぼす影響を調べた。

供試処理剤の中では第 1 表に示すように、アルカリ剤のピロリジンおよび NaCl, KCl などの塩類が SRD, SDD 両法に対して有効であった。とくに NaCl 処理は抗原の拡散速度、沈降帯の明瞭さなどの点で他の処理剤に比べて優れており、またタバコ以外の CMV 罹病植物 (後述) に対しても同様に有効であった。

第 1 表 抗原試料処理剤の血清反応におよぼす効果

処 理 剤	最適濃度	血 清 反 応 ^{a)}	
		SRD 法	SDD 法
NaOH	1N	+ ~ + + b)	± ~ +
Na ₃ PO ₄	2%	+ ~ + +	+
ピロリジン	4%	+ + ~ + + +	+ +
LiCl	10%	+ + +	+ + +
NaCl	24%	+ + +	+ + +
KCl	24%	+ + ~ + + +	+ + +
CaCl ₂	11%	c)	+ +
SDS	2%	± b)	+ b)
蒸 留 水		±	+ +

a) 沈降帯の中と反応の強さを相対的に比較し、もっとも明瞭なものを 卅 とした。

b) 淡い非特異沈澱を生じる場合があった。

c) 濃い非特異沈澱のために判定できなかった。

NaCl 濃度を変えて作成した磨砕試料につき、血清反応の強さを調べた結果を第 2 図に示したが、試料作成に用いる NaCl 濃度は 24% が最適と認められ、以下

第 1 図. 簡易寒天ゲル内拡散法

CMV 罹病葉試料にみられる輪状 (A ; SRD 法) および弧状 (B ; SDD 法) 沈降帯。

の実験ではすべてこの濃度の NaCl 液によって抗原試料を作成した。

第2図 NaCl 濃度と血清反応 (SRD 法)
抗血清希釈50倍の寒天スライドで6時間後に判定。グラフの太さは反応の強さを表わす (第3, 4図も同様)。

2. 抗血清および抗原希釈度と血清反応 沈降帯を十分に明瞭にし、結果の判定を容易にするために、両方法での最適抗血清希釈度ならびに検出可能な抗原の希釈限度を調べた。抗原の希釈は、CMV 罹病タバコ葉片を健全タバコ葉片とともに NaCl 液中で磨砕して行なった。

a. SRD 法 抗血清濃度を25倍から1,600倍までの範囲で倍数段階希釈となるように抗血清寒天スライドを作り、沈降帯の直径および血清反応の強さを経時的に調べた。結果は第3図に示した。抗血清希釈100倍以下の場合、血清反応は1時間以内に認められ、数時間後には十分に拡大した明瞭な沈降帯となった。1夜後には抗血清希釈400倍でも血清反応が認められたが、抗血清濃度が低くなれば沈降帯は拡大する反面、反応は微弱となるために、CMV 検出に最適の抗血清希釈度は50倍と認められた。抗血清希釈度を一定にして抗原希釈を行なった結果を第4図に示した。実験の範囲では、抗血清希釈度が高まればより低濃度の抗原を検出できたが、反応は逆に弱まった。また、抗血清濃度が高く、抗原濃度が低い場合には濾紙円盤の下に輪状の沈降帯が形成された。

b. SDD 法 生理食塩水で倍数に段階希釈した抗血清をそれぞれ濾紙に含ませて血清試験を行なっ

第3図 抗血清希釈と血清反応 (SRD 法)
A, B, C, D, Eはそれぞれ1, 3, 6, 12, 18時間後の結果。破線部は微弱な反応を表わす。

第4図 抗原希釈と血清反応 (SRD 法)
18時間後に判定し破線は濾紙下での反応を表わす。A, B, Cは抗血清希釈がそれぞれ25, 50, 100倍。

た。第2表に結果を示すように、抗原濃度が十分に高い場合には抗血清希釈が0～8倍でも反応の強さに著しい差異は認められなかった。しかし、抗原濃度が低い場合に高濃度の抗血清を使うと反応は逆に弱まった。したがって、より低濃度の抗原を検出するために

は4倍希釈(力価 512) 抗血清を用いるのがよいと認められた。

第2表 SDD 法での抗血清および抗原希釈と血清反応^{a)}

抗原希釈 (倍)	抗血清希釈(倍)					
	1	2	4	8	16	32
	力 価					
	2048	1024	512	256	128	64
1	+++	+++	+++	+++	++	+
2	+++	+++	+++	++	++	+
4	+++	+++	+++	++	++	+
8	+++	++	++	++	+	+
16	++	++	++	+	+	+
32	+	++	++	+	+	±
64	±	+	+	+	±	-

a) 18時間後に最終判定を行ない, 沈降帯巾と反応の強さを比較してもっとも明瞭なものを $\oplus$ とした。

4倍希釈抗血清によって CMV が検出できる抗原希釈限度は128倍であった。なお, SDD 法では血清反応が現われはじめるまでに少なくとも3, 4時間を要した。

3. CMV 分離株および他の cucumovirus との血清試験 血清反応によって CMV を診断する場合, 系統または分離株によって反応しなかったり, 他の cucumovirus との間に反応が現われるようでは判定に混乱が生じる。そこで5種の CMV 系統や分離株, および cucumovirus の chrysanthemum mild mottle virus (2株) ならびに peanut stunt virus (PSV: 当時東北農業試験場の飯塚典男氏より分譲された) を SRD, SDD 法に供して血清試験を行なった。

第5図 CMV の5分離株の血清反応
A (SRD 法), B (SDD 法) とともに
左から CMV-pepo, CMV-stokesia,
CMV-Y, CMV-p16, CMV-p147

なお, CMV 分離株の CMV-p 16, CMV-p 147 はエンドウ *Pisum sativum* L. var. Wisconsin Perfection で, PSV は黒種三尺ササゲ *Vigna sesquipedalis* Endl. で増殖させ, それぞれの罹病葉を抗原試料とした。

第5図にみられるように, 試供 CMV の全分離株は両法によって同様に検出された。SRD 法では互いに沈降帯が接する場所に反応阻止帯を生じ, SDD 法では沈降帯がすべて融合した。一方, CMV 以外の cucumovirus ではまったく血清反応が認められなかった。

4. 非特異沈澱を生じる植物 植物の種類や寒天上に隣接して置く植物の組合わせによっては, 沍紙周辺や試料間の寒天内に非特異沈澱を生じ, 血清反応試験の障害となる。とくに SRD 法では沈降帯が非特異沈澱と重なり, 血清反応の判定ができない植物もあった。主として野外から採集した各種植物について, SRD 法による非特異沈澱生成の有無を調べた結果を第3表に示した。

第3表 寒天内に非特異沈澱を生じた植物 (SRD 法)

濃厚な沈澱を生じた植物	フキ, ショウガ, ミョウガ, テンジクア オイ, ハイビスカス, シャクヤク, ボタン ^{a)} , ニオイイリス, ハナトラノオ, アメリカフウロソウ, アメリカアリタソウ, セイタカアワダチソウ, チドメグサ ^{b)} , ネズミモチ, サルスベリ, ジンチョウゲ, クス, アベリア, ブドウ, ナンキンハゼ ^{b)} , ウメ, サクラ, ノイバラ
淡色の沈澱を生じた植物	トウガラシ, シソ, ハッカ, ソラマメ, ニンニク, パイモ, キク, コスモス, ハマナシ ^{c)} , カトレア, イノコズチ, イヌタデ ^{d)} , ギシギシ, ナンテン, イチジク

- a) SDD 法でも非特異沈澱を生じた。
b) 多くの隣接植物との間に非特異沈澱を生じた。
c) ヒマワリとの間に非特異沈澱を生じた。
d) タバコとの間に非特異沈澱を生じた。

野菜類ではショウガ, ミョウガで白色の, フキでは褐色の非特異沈澱が生じたが, その他のものではとくに血清反応の判定に支障は認められなかった。観賞植物や樹木, 雑草の中には濃厚な沈澱を生じるものもあった。また, ヒマワリとハマナシの間, およびチドメグサと多くの隣接植物との間には顕著な非特異沈澱が生じた。さらに, ギボウシやサボテンなどでは磨砕粗汁液の粘度が高く, 試料を沍紙にのせにくい植物もあった。

非特異沈澱を生じる植物を SDD 法で試験すれば、特殊な場合を除き、ウイルス沈降帯は沈澱から離れて抗血清寄りの位置に認められ、SRD 法の場合に比べると支障は少なかった。

5. 各種植物についての CMV 診断例 外部病徴の有無にかかわらず採集した各種植物から CMV の検出を試みた (1977年4~10月)。SRD, および SDD 法による血清試験の条件は前述と同様にし、1夜後に最終判定を行なった。

53科146種の植物について調べたところ、第4表に示す13科21種の植物に血清反応が認められ、ササゲなどによる生物検定の結果とともに CMV と判定された。また、両血清診断法とササゲによる生物検定の結果を比較するために、露地栽培野菜について行なった CMV の発生調査 (1977年6, 7, 8月) の1例を第5表に示した。この調査ではトマト、トウガラシでは血清試験と生物検定の結果が一致したが、ナス、キュウリ、フキでは両血清試験法による CMV 検出が生物検定によるよりも精度が高い結果が得られた。

第4表 SRD, SDD 法により、CMV が検出された植物^{a)}

キュウリ、カボチャ、メロン、トマト、ナス、トウガラシ、タバコ、ホウレンソウ、フキ ^{b)} 、ショウガ ^{b)} 、ミョウガ ^{b)} 、サトイモ、ササゲ、トウモロコシ、ペニバナ、ハクニチソウ、ホタルブクロ、センニチコウ、セイヨウオダマキ、ツユクサ、キョウチクトウ

a) ササゲによる生物検定も同時に行なった。

b) SDD 法によって検定した。

第5表 露地栽培野菜における CMV 発生調査例

野菜 (調査地)	血清試験		生物検定 ^{a)}
	SRD 法	SDD 法	
ト マ ト (大 阪)	14/21 ^{b)}	—	14/21 ^{b)}
ナ ス (大 阪)	—	11/18	9/18
キ ュ ウ リ (大 阪)	12/37	—	12/37
トウガラシ (和歌山)	52/58	52/58	49/58
フ キ (大 阪)	8/243	8/32 ^{c)}	4/32 ^{c)}

a) 血清試験検体葉を1% K₂HPO₄ 液で磨砕し、ササゲ初生葉6枚で検定、病斑数が1個でも CMV 罹病とした。

b) CMV 検出株数/検定株数

c) SRD 法で明瞭な血清反応が認められた検体を含め、非特異沈澱のために判定不確実な試料について再試験した。

考 察

野菜などに広く発生する CMV の診断は、一般には主として検定植物に対する接種試験によって行なわれることが多いが、育苗や接種に時間と労力を要する。比較的短時間内に結果が得られるササゲなどでの局部病斑法でも病斑数が少ない場合の判定に疑問が残ることもある。

血清学的手法がウイルス病の的確で迅速な診断に有効であることは広く理解されており、我が国でも potato virus X (PVX) や cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV) などでは、診断を目的として抗血清が作成され、血清診断法の検討も行なわれた^{1,4,8,9)}。

血清試験法がウイルス病診断に広く用いられるためには、1) 手法が簡便で多数の検体の処理も困難でないこと、2) 血清反応の判定が迅速、確実にできること、3) ウイルス検出精度が十分に高いこと、などが要求されるであろう。筆者らは、1) の条件として、特殊な器具や装置を必要とせず、検体試料の作成が容易であり、できれば多くの血清学的手法で必要とされる遠心操作が省けること、2) の条件として、遅くとも翌朝には最終判定ができること、3) の条件として、少なくとも病徴の明瞭な標本検体ではほぼ確実にウイルスが検出されるだけの精度を有すること、などを当面解決すべき条件と考えた。本報の SRD, SDD 法は、遠心操作不要のために試料の作成が容易である。また、抗原処理剤によって抗原の拡散が促進されるために、血清反応の結果判定までの時間が短縮され、ウイルス検出精度についても前述の条件を満たすものと考えられた。

両法は基本的に寒天ゲル内拡散法であり、CMV は各種の長形ウイルスで必要とされる薬品^{3,10,12)}や超音波¹⁸⁾による粒子の崩壊処理を行なわなくても寒天ゲル内に拡散する。しかし、本報の実験結果から明らかのように、NaCl 処理した CMV 抗原は寒天中での拡散が早く、血清反応による沈降帯はより明瞭となり、ウイルス検出精度も無処理試料の場合より高く、ササゲによる生物検定と同程度かそれ以上であった。一方、tobacco mosaic virus (TMV), PVX および tobacco etch virus などでは、ウイルス粒子と崩壊外被蛋白間の抗原性差異が報告されているが^{11,13,14)}、CMV 抗血清は外被蛋白抗原と強く反応する¹⁵⁾。したがって、CMV 検出精度を高めるために、とくに CMV の 'D-protein' 抗血清を用いる必要はないと考え

られる。

SRD, SDD 法ともに、主要野菜での CMV 検定に使用して問題はないと考えられるが、それぞれの方法による若干の得失があるので実際には目的に応じて選ぶのがよいと考えられる。SRD 法は判定を急ぐ場合や単一の植物を多数検定する場合（スライド 1 枚に少なくとも 20 検体を置く）、さらに抗原量の比較定量を行なう場合などに有利と考えられるが、非特異沈澱を生じる植物では不適当である。また、夏期の高湿時には SRD 法での血清反応が弱まることもあるが、汚紙円盤のかわりに槽を作る放射拡散法によって好結果が得られた。SDD 法では 1 枚のスライドで検定できるのは 18 検体以下であり、また定量的な比較には必ずしも適当とはいえないがウイルス濃度の比較的低い試料からも抗原が検出でき、非特異沈澱を生じ易い植物にも特殊な場合を除き適用できる点で有利と考えられる。

宮島ら⁷⁾は汚紙吸着乾燥抗血清 (TMV, CGMMV) の力価が室温で 30 日間低下しないことを報告した。CMV 抗血清を同様にして汚紙に含ませ、室温で乾燥保存したものについて予備的に調べたところ、1 年後にはやや力価が低下したが、少なくとも 3 ケ月間は力

価の低下が認められなかった（第 6 図）。このことから診断用抗血清の保存、輸送方法の簡略化も可能ではないかと考えられるので、この点についてはさらに検討を加えたい。

摘 要

キュウリモザイクウイルス (CMV) の検出、診断のための簡便な血清学的手法として、抗血清寒天スライド法 (SRD 法) と簡易二重拡散法 (SDD 法) を案出した。

両方法はともにスライドガラス上での寒天ゲル内拡散法を修正したものであり、抗原用の槽を作るかわりに寒天 (SRD 法では抗血清を混合した) 上に汚紙片を置き、その上に 24% NaCl 液で磨砕した植物組織をのせて抗原を拡散させた。また、SDD 法は抗血清を汚紙片に含ませて寒天上の抗原用汚紙に並置する方法である。

試料を NaCl 処理することにより、CMV 抗原の拡散速度と血清反応は、無処理試料に比べて早く、かつ明瞭となり、1 夜後にはササゲによる生物検定と同程度以上の精度でウイルス検出結果の最終判定が可能であった。また、供試した CMV の 5 分離株はいずれも同様に検出された。

各種植物からの CMV 検出に両方法を適用することができたが、SRD 法では数種の主要野菜を除き、植物の種類によっては非特異沈澱を生じ、血清反応の判定に支障のあるものもあった。一方、SDD 法では非特異沈澱がウイルス検出の障害となることは SRD 法に比べて少なかった。

第 6 図 汚紙吸着乾燥保存抗血清による血清反応上；汚紙乾燥保存（1 年間）抗血清，下；凍結保存抗血清 右；CMV 罹病タバコ葉 (NaCl 処理)，左；健全タバコ葉。

引用文献

1. 江口俊一・戸倉幸三・江住和雄 (1955). 日植病報 19: 175. (講要)
2. Francki, R. I. B., Randles, J. W., Chambers, T. C. and Wilson, S. B. (1966). Virology 28: 729-741.
3. Hamilton, R. I. (1964). Phytopathology 54: 1290-1291.
4. 井上忠男・井上成信・麻谷正義・光畑興二 (1967). 農学研究 51: 175-207.
5. Kaper, J. M., Diener, T. O. and Scott, H. A. (1965). Virology 27: 54-72.
6. McCrum, R. C., Studenroth, J. C. and Olszewska, D. (1971). Phytopathology 61: 290-292.
7. 宮島成寿・田辺仁志 (1976). 日植病報 42: 81. (講要)
8. 松山大記・山田守英・松宮英視 (1951). 農及園 26: 775-778.
9. 西 泰道・西沢正洋 (1967). 九州農試集報 13: 89-111.
10. Purcifull, D. E. and Batchelor, D. L. (1977). Florida Agr. Expt. Sta. Tech. Bull. 788. pp.39.
11. Rappaport, I. and Zaitlin, M. (1970). Virology 41: 208-217.
12. Shepard, J. F. and Secor, G. A. (1969). Phytopathology 59: 1838-1844.
13. Shepard, J. F., Secor, G. A. and Purcifull, D. E. (1974). Virology 58: 464-475.
14. Shepard, J. F. and Shalla, T. A. (1970). Ibid. 42: 825-834.
15. 匠原監一郎・井上忠男 (1978). 日植病報 44: 97. (講要)

-
16. 匠原監一郎・尾崎武司 (1974) 日植病報 40 : 265-267.
 17. Slack, S. A. and Shepherd, R. J. (1975). Phytopathology 65 : 948-955.
 18. Tomlinson, J. A. and Walkey, D. G. A. (1967). Virology 32 : 267-268.