抗血清による植物ウイルスの診断 — Multi-dish tray 法について —

仙北俊弘*・李 淳炯**・小島 誠***・四方英四郎*

Toshihiro SENBOKU*, Soon Hyung LEE**, Makoto KOJIMA*** and Eishiro SHIKATA* :
Serological Identification of Plant Viruses — Multi-Dish Tray Method —

Abstract

Microprecipitin method for serological reaction was modified by using multidish trays instead of petri-dishes. Multi-dish disposable trays (Linbro Chemical Co., Inc.) for tissue culture vessel with 96 holes (ϕ 6 mm) made by plastic, were used. Each 0.025 ml of antigen and antiserum was mixed by semiautomatic pipettes (Micro selectapette; Clay Adams Co., Inc.). After mixing the mixtures by shaking the trays, paraffin oil (about 0.03 ml) was added to prevent drying.

A dark field microscope was used to observe the reaction at magnification 16 or 25. Crude sap or purified preparations of five plant viruses, potato virus X, potato virus Y, potato virus S, cucumber green mottle mosaic virus and rice dwarf virus, were examined. The results indicated that this method was as sensitive as interface ring test. Advantage of this method is that very small amounts of antigen and antiserum are enough to detect the reaction, and one can handle easily many specimens in one tray. It was shown that serological reactions of PVX, PVY, PVS, CGMMV and RDV could be clearly observed and dilution end point of antiserum could be easily determined by this method under a dark field microscope.

(Received August 28, 1978)

緒 言

植物ウイルスの血清反応は応用範囲が広く、その方法も多く改良が加えられて今日に至っている。筆者らは最近植物ウイルスの血清反応について再検討を行ってきたが、そのひとつとして microprecipitin test の改良法を試みたので報告する。Microprecipitin test は van Slogteren により初めて報告されて以来、欧米において多くの植物ウイルスの検定に用いられてきた^{2,3,8,11,12})。我が国でも一部の研究者によって微凝集反応として用いられてきたが^{1,4,5})、まだ広く実用に供されているとはいえない。本法は沈降反応混合法、重層法、スライド法などに比較して、多数の反応を容易に観察できること、使用する抗原と抗

血清が少量ですみ、流動パラフィンによる乾燥防止ができること、また暗視野で観察するため反応が明瞭に判定できるなどの利点がある。筆者らは van Slogteren¹⁰⁾ の原法に一部改良を加え、さらに少量の抗原と抗血清でも容易に反応を読むことができることを確かめた。本改良法を、使用した容器の名称から multi-dish tray 法と呼ぶことにする。

実験材料および方法

1) 反応の手順 原法ではフォルムバルで被膜したペトリ皿を用いているが、筆者らは組織培養用の Multi-dish disposable tray (Linbro Chemical 社製) を用いた。予備実験の結果、平底の穴をもつ tray (径 6 mm の穴が 96 個) が最も本法に適していることが

* 北海道大学農学部 Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060, Japan.

** 韓国農業技術研究所 Department of Plant Pathology, Institute of Agricultural Sciences, Suwon, Korea.

*** 新潟大学農学部 Faculty of Agriculture, Niigata University, Niigata 950, Japan.

わかったので、以下の実験にはすべてこの tray を用いた (図1)。また抗原と抗血清の少量をいれるには Micro selectapette (Clay Adams 社製) を用いた (図1)。抗原と抗血清をそれぞれ 0.025ml ずつ各穴に滴下し、tray を軽く振盪して液を攪拌した後、反応液の乾燥を防ぐため流動パラフィンを約 0.03ml ずつ各穴に加えた。37°C に 2 時間静置した後反応を観察し、その後 4°C に一晩置いて再び反応を観察した。反応の観察は暗視野双眼顕微鏡 (オリンパス JMTr) を改良したものを用い (図2)、ふつう 16 倍か 25 倍で検鏡した。

2) 抗原 抗原としてジャガイモ X ウイルス (PVX), ジャガイモ Y ウイルス (PVY), ジャガイモ S ウイルス (PVS), キュウリ緑斑モザイクウイルス (GMMV), イネ萎縮ウイルス (RDV) の 5 種類のウイルスを用いた。粗汁液抗原は、PVX 感染トマトの凍結葉, PVS 感染ジャガイモ (男爵) の生葉, CGMMV 感染ユウガオの生葉, および RDV 感染イネの凍結葉を用い、それぞれ 1 g に対し 10ml の生理食塩水を加えて磨砕し、その搾汁液を 3,000rpm, 10 分間遠沈した上清を原液とした。また純化試料は、PVX, PVY は李ら⁷⁾, CGMMV は四方ら⁹⁾, RDV は木村ら⁶⁾の方法により作製した。各抗原の 2 倍段階希釈は

生理食塩水を用いた。

3) 抗血清 各ウイルスの抗血清はそれぞれの純化ウイルス液を Freund's complete adjuvant と等量混合して家兎に筋肉注射し、その後 1 週間ごとに 3～4 回静脈注射を行ない免疫した。得られた抗血清はすべて生理食塩水で 2 倍段階希釈した。

実験結果

PVX, PVY, PVS, CGMMV, RDV の各罹病葉粗汁液と純化ウイルス液を 2 倍段階希釈し、それぞれの抗血清の反応終末点を multi-dish tray 法により検定した (表1)。

1) PVX PVX 罹病トマトの粗汁液 2～16 倍希釈液までの抗原に対して、表1に記した抗血清終末希釈倍数までの混合液には明らかに抗原抗体反応による凝集沈澱を確認できたが、それ以上に希釈された抗血清では緑色沈澱の方が目立って、凝集反応の判定が困難であった。反応は 32～64 倍希釈抗原と 8～16 倍希釈抗血清の範囲内の組合せの場合にほとんど雪状の凝集塊が明瞭に観察でき最も判定し易かった。純化ウイルス試料の 4 倍希釈 ($OD_{260}=0.3$) では抗血清の終末希釈倍数 8192 倍まで反応が認められた。対照として行なった重層法では $OD_{260}=0.05$ の抗原濃度に対して

表1 multi-dish tray 法による各種ウイルス抗血清の力価検定

反 応 方 法	供試ウイルス		PVX	PVY	PVS	CGMMV	RDV
	抗原	抗血清原希釈倍数	抗血清終末希釈倍数	抗血清終末希釈倍数	抗血清終末希釈倍数	抗血清終末希釈倍数	抗血清終末希釈倍数
multi-dish tray 法	粗汁液	1			4096	128 ^{a)}	128 ^{a)}
		2	1024 ^{a)}		4096	256 ^{a)}	128 ^{a)}
		4	1024 ^{a)}		256	256 ^{a)}	256 ^{a)}
		8	64 ^{a)}		4	512 ^{a)}	256 ^{a)}
		16	64 ^{a)}			512	512
		32	123			1024	512
		64	256			1024	128
		128	256				
	純化ウイルス液	2		^{c)} 512		^{d)} 4096	
		4	^{b)} 8192	256		4096	
		8	2048	64		2048	
		16	2048	32		1024	^{e)} 1024
		32	1024	4		512	512
		64	512			256	512
		128					256
		256					128
		512					8
重層法	純化ウイルス液		^{f)} 2048	^{g)} 512			

a) : これ以上の希釈では粗汁液中の他の沈澱のため判定が困難であった。

b) : $OD_{260}=0.3$, c) : $OD_{260}=0.3$, d) $OD_{260}=0.4$, e) : $OD_{260}=0.32$,

f) : $OD_{260}=0.05$, g) : $OD_{260}=0.1$,

2048 倍希釈抗血清まで反応が認められ、本法を用いた 16 倍希釈抗原 ($OD_{260}=0.075$) に対する価と一致した (表1)。純化ウイルス試料の場合、4～8 倍希釈抗原と 16～64 倍希釈抗血清との組合せが最も反応が明瞭な範囲であった (図3)。

2) PVY 純化ウイルス試料 ($OD_{260}=0.3$) を抗原とした場合は抗血清の終末希釈倍数 512 倍まで反応があり、重層法の場合は抗原が $OD_{260}=0.1$ の濃度の時、抗血清の希釈倍数 512 倍まで反応が認められた。2～4 倍希釈抗原と 16～32 倍希釈抗血清の組合せの範囲で凝集沈澱が多く明瞭

な反応を読むことができた(図4)。

3) **PVS** PVS 罹病ジャガイモ(男爵)粗汁液を抗原とした時の抗血清は終末希釈倍数4096倍まで反応が認められた。とくに2~4倍希釈抗原と4~16倍希釈抗血清の範囲内が最も反応が読み易かった(図5, 図6)。

4) **CGMMV** 罹病ユウガオ粗汁液を抗原とした場合, 8倍以下の希釈抗原と, 表1に記した終末希釈倍数の抗血清の範囲で明瞭な凝集沈澱を確認できたが, それ以上の希釈倍数の抗血清では粗汁液中の緑色沈澱のため反応を明確に判定できなかった。反応は16~32倍希釈抗原と8~16倍希釈抗血清の範囲内で最も凝集沈澱が多く明瞭に判読できた。一方, 純化ウイルス試料抗原($OD_{260}=0.4$)を用いた時は, 終末希釈倍数4096倍の抗血清と反応し, 粗汁液と比べて高い値を示した。

5) **RDV** 罹病イネ粗汁液を抗原とした場合, 8倍以下の希釈抗原では表1に示す抗血清の終末希釈倍数まで明瞭な凝集沈澱を確認できたが, それ以上に希釈された抗血清では粗汁液中の緑色沈澱のため明確な凝集沈澱が読みとれなかった。16~32倍希釈抗原と8~16倍希釈抗血清の範囲内での組合せの反応が最も観察し易かった。また純化ウイルス試料の16倍希釈抗原($OD_{260}=0.32$)の場合, 抗血清終末希釈倍数1024倍の抗血清まで反応が認められた。この場合の反応は粗汁液の場合と同様の凝集沈澱が観察され, 16~32倍希釈抗原と8~64倍希釈抗血清の範囲内の組合せで最も反応が読み易かった(図7)。

考 察

植物ウイルスの血清学的手技は多くの改良を重ねられて今日に至っており, その反応の鋭敏さと特異性の点から応用範囲も広い。Microprecipitin test について本邦では井上⁴⁾がCGMMVの同定に, また麻谷⁵⁾がcactus virus Xの同定分離に用いた例があり, さらに井上⁶⁾がランのウイルス病の診断に応用した例がある。van Slogterenの方法は小試験管を用いた沈降反応混合法, 重層法, スライド法などに比べると, 一枚のペトリ皿で40~60の反応が同時に観察でき, 使用する抗原と抗血清の量が各0.1ml程度の少量で済む利点がある。また流動パラフィンで被覆することにより乾燥を防ぎ低温で長時間反応させることができる。さらに暗視野で観察するので反応が明瞭に読みとれるなどの利点がある。筆者らはこの方法に改良を加え, より簡単に利用できるように方法を試みた。

まず反応容器としてペトリ皿を用いると抗原と抗血清の攪拌に手数がかかり, 振動により隣接する反応液と混じる恐れがあることから, 小さな穴のあいた数種のmicro titer plateと組織培養用のMulti-dish disposable tray(Linbro Chemical社製)の利用を考えた。この場合の攪拌はplateを数回傾けて振るだけで充分でそれぞれの反応液が混じる心配がない。穴の底面がU字型, V字型のmicro titer plateよりは平底の方が暗視野顕微鏡での観察が容易であったので組織培養用multi-dish trayを利用した。筆者らが用いたものはプラスチック製で径6mmの穴が96あり, 1枚のtrayの大きさは8.5×12.5cmである。一定量の少量の液をtrayの穴に入れるにはsemi-auto micropipetteのMicro selectapette(Clay Adams社製)を用いた。各穴の容積と反応観察の容易さからみて抗原と抗血清の量は各0.025mlで充分である。この量は従来の方法に比して極めて少量である。液の乾燥防止のため筆者らも流動パラフィンを加えたが, この量も各穴に対し0.03ml程度で充分であった。検鏡の際はtrayを軽く動かして観察すると, 白色の絮状沈澱がはっきり確認できる。罹病植物の粗汁液を抗原とした場合, PVXで16倍以下, CGMMV, RDVではそれぞれ8倍以下の濃い粗汁液を用いると, 抗血清が希釈されるにしたがい反応沈澱物が減少し, 反面植物汁液中の緑色沈澱のため僅かの反応を判読するのが困難となった。これに対し純化ウイルス抗原では明瞭な絮状沈澱が常に観察でき判読が容易であった。井上⁶⁾はランのウイルス病の診断に微凝集反応を応用しているが, 罹病植物磨碎搾汁液を低速遠心分離するか, 濾紙で濾過して清澄化した後用いた方が誤診がなかったとしている。筆者らの実験でも罹病植物の粗汁液を低希釈で用いると, 葉緑体や澱粉を含む沈澱が底に沈着して暗視野光をさえぎるため, 抗血清濃度がうすくなって反応が弱くなるにしたがい凝集沈澱の判読が困難になった。したがって本法においても罹病植物の粗汁液を, あらかじめ清澄化の方が結果の判読が容易となる。Multi-dish tray法は従来の小試験管を用いた沈降反応混合法や重層法に比して, 使用する抗原と抗血清の量が極めて少量ですみ操作ならびに反応の判読が容易で, しかも多くの反応が同時にできることから, 抗血清の力価の判定や罹病植物の診断に充分に応用できる。

摘 要

植物ウイルスの血清学的方法のひとつであるmicro-

precipitin test の改良を試み、この改良法を multi-dish tray 法とした。反応容器として径 6 mm の平底の穴が横に 12 列、縦 8 列の計 96 並んでいる組織培養用のプラスチック製 Multi-dish disposable tray (Linbro Chemical 社製) を使用し、ピペットは Micro selectapette (Clay Adams 社製) を用いた。抗原と抗血清を各 0.025 ml ずつ混合し、その上に乾燥を防ぐため流動パラフィンを 0.03 ml 滴下し反応させた後、暗視野顕微鏡を用い 16 倍あるいは 25 倍で観察した。PVX, PVY, PVS, CGMMV, RDV の 5 種のウイルス

について各罹病植物粗汁液、または純化ウイルス試料を用いて本法を試みた。その結果、この方法は従来の重層法と同様に、反応を容易に判読できることがわかった。Multi-dish tray 法は操作が簡便で、1 枚の tray で多数の反応を試みることができ、使用する抗原、抗血清の量は極めて少量ですむ利点がある。暗視野顕微鏡を用いることにより、その反応は明瞭かつ正確に判読でき、また抗血清の力価の判定も容易である。

引用文献

1. 麻谷正義・井上忠男 (1969). 農学研究 53 : 35-48.
2. Corbett, M. K. (1967). Phytopathology 57 : 198-202.
3. Fribourg, C. E., and G. A. de Zoeten (1970). Phytopathology 62 : 812-816.
4. 井上忠男・井上成信・麻谷正義・光畑興二 (1967). 農学研究 51 : 175-186.
5. 井上成信 (1977). 農学研究 56 : 1-13.
6. 木村郁夫・児玉忠士・鈴木直治 (1968). 日植病報 34 : 206.
7. 李 淳炯・仙北俊弘・小島 誠・四方英四郎 (1967). 日植病報 42 : 92.
8. Sampson, P. J., and R. H. Taylor (1968). Phytopathology 58 : 489-493.
9. 四方英四郎・桑田博隆・小島 誠・仙北俊弘・青柳明典 (1978). 北大農邦文紀要 11 : 119-128.
10. van Slogteren, D. H. M. (1955). Proc. 2nd Conf. Potato Virus Disease. Lisse-Wageningen. 51-54.
11. van der Veken, J. A., van Slogteren, D. H. M., and van der Wand, J. P. H. (1962). Immunological Methods. In Modern Methods of Plant Analysis. (H. F. Linskens and M. V. Tracey, eds.), 5:422-463, Springer, Berlin.
12. Waterworth, H. E. (1971). Phytopathology 61 : 228-230.

図版説明

- 図 1 : Micro selectapette (Clay Adams 社製) と Multi-dish disposable tray (Linbro Chemical 社製)
 図 2 : 試料台の部分平面にした改良暗視野顕微鏡 (オリンパス JMTr)
 図 3 : 純化 PVX 抗原 ($OD_{260}=0.3$) と抗血清 (32 倍希釈) との反応
 図 4 : 純化 PVY 抗原 ($OD_{260}=0.15$) と抗血清 (16 倍希釈) との反応
 図 5 : 健全ジャガイモ粗汁液 (4 倍希釈) と PVS 抗血清 (8 倍希釈)
 図 6 : PVS 罹病ジャガイモ粗汁液 (4 倍希釈) と PVS 抗血清 (8 倍希釈) との反応
 図 7 : 純化 RDV 抗原 ($OD_{260}=0.16$) と抗血清 (16 倍希釈) との反応