酵素結合抗体法 (ELISA) によるカンキツ タターリーフウイルスの検出*

川 合 昭**・西 尾 健***

Akira KAWAI** and Takeshi NISHIO***: Detection of Citrus Tatter Leaf Virus
by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Abstract

Antigen of CTLV could be detected from diseased citrus leaves by ELISA using horseradish peroxidase-conjugated IgG (HRP-ELISA). In the HRP-ELISA procedure, sample and conjugate were mixed and incubated in the plate for 16 hr at 4 C. The relative sensitivity of antigen detection was 1:16, when the sample of the infected citrus leaf extract was diluted with healthy leaf extract. Citrus scions from post-entry quarantine and scions taken from citrus groves in Japan were tested by modified HRP-ELISA and by an inoculation test to *Chenopodium quinoa*. The results showed that ELISA was reliable method for detecting CTLV in citrus trees.

Key words: citrus tatter leaf virus, modified ELISA, peroxidase ELISA.

カンキツタターリーフウイルス (citrus tatter leaf virus, CTLV) はわが国でカンキツ接木部異常症の病原であることが知られており¹⁾, カンキツ栽培上重要なウイルスである。また、最近本ウイルスは capillovirus group に所属することが明らかにされた²⁾。一方、本ウイルスは中国、台湾からわが国に導入されるカンキツ品種から高頻度で検出されることも明らかにされており³⁾, 隔離検疫、母樹検疫、苗木生産時には厳重な検査を実施すべきウイルスの一つである。

CTLV は、接ぎ木接種⁴⁾や汁液接種⁵⁾によって検定することができるが、いずれの方法も温室において厳密な環境条件のもとで行う必要があり⁶⁾, 多量の検体を迅速、経済的に検定するのに適した方法ではない。

このため、CTLV を迅速、確実に検定する技術の開発が求められている。そこでカンキツの CTLV を酵素結合抗体法 (ELISA) により検定する方法を検討した。

酵素結合抗体の調製 中国産カンキツ ‘大紅甜橙’ から分離した CTLV (K-1 株)⁷⁾を *Chenopodium quinoa* (キノア) で増殖し純化した後、家兎に免疫して得た抗血清⁸⁾ (ring test による力価 512 倍) を健全キノア葉粗汁液の可溶性分画で吸収し、常法により IgG を純化して本試験に供した。酵素結合抗体 (コンジュゲート) 用の酵素としては、セイヨウワサビペルオキシダーゼ (HRP) を用いた。コンジュゲートは Nakane の過ヨード酸改良法⁹⁾により、IgG と HRP (東洋紡, I-C,

* 本論文の一部は日本植物病理学会昭和 62 年度夏季関東部会で発表した。

** 横浜植物防疫所 Yokohama Plant Protection Station, Shinyamashita, Naka-ku, Yokohama 231, Japan

*** 現在: 農林水産省植物防疫課 Present address: Plant Protection Division, MAFF, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100, Japan

1) Miyakawa, T. and Matsui, C. (1979). In Proc. 7th Conf. IOCV, Univ. Calif. Dept. Pl. Path., Riverside, pp. 125-131. 2) 西尾 健・川合 昭・高橋 勤・難波成任・山下修一 (1989). 日植病報 55: 254-258. 3) 西尾 健・川合 昭・加藤幹雄 (1984). 植防研報 20: 69-71. 4) Wallace, J.M. and Drake, R.J. (1962). Plant Dis. Reprtr. 46: 211-212. 5) Semancik, J.S. and Weathers, L.G. (1965). Phytopathology 55: 1354-1358. 6) Garnsey, S.M. and Weathers, L.G. (1968). USDA Agric. Handbook. No. 333. U.S.D.A., Washington. pp. 80-82. 7) 西尾 健・川合 昭・加藤幹雄・小林敏郎 (1982). 植防研報 18: 11-18. 8) 石川栄治 (1978). 酵素免疫測定法 (石川栄治ほか編). 医学書院, 東京. pp. 82-127.

Lot 4518) の混合割合を 2 : 1 として作製し、等量のグリセリンを加えてコンジュゲート原液とした。コンジュゲート原液の HRP 濃度は 0.25 mg/ml, IgG 濃度は 0.5 mg/ml となった。

ELISA の方法 試料の磨砕には、リン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.4) に Tween-20 を 0.05% 添加 (PBS・T) し、さらに、PVP-40 (polyvinyl pyrrolidone, M.W. 40,000) を 2%, 牛血清アルブミンを 2% 加えたもの (PBS・T・PVP・A) を用いた。

現在、ELISA の方法は、ダブルサンドイッチ法 (常法)⁹⁾ のほか、操作手順の短縮、検出感度の向上のために各種の改良法が用いられている。本試験では、試料とコンジュゲートを混合して ELISA プレートの穴 (well) に投入する方法 (変法)¹⁰⁾ について検討した。その結果、CTLV の HRP-ELISA では、変法がより非特異発色が少なく、かつ、高感度であることが明らかとなった。また、IgG をコーティングした well 中における試料とコンジュゲートの混合液の静置条件を、37 C、3 時間と 4 C、16 時間 (overnight) で比較したところ、4 C、16 時間の場合、常に非特異反応が低くかつ ELISA 値は高かった。

そこで、最終的に HRP-ELISA の手順は、Fig. 1 のとおりとした。ELISA プレート (DYNATEC 社製 平底型イミュロン 1 プレート 96 well) に、0.05 M 炭酸緩衝液で 2.5 µg/ml に希釈した IgG を 1 well 当り 200 µl 投入し 37 C で 4 時間静置して IgG のコーティングを行った。静置後、PBS・T で洗浄したプレートに、まず、PBS・T・PVP・A で 200 倍に希釈したコンジュゲートを 1 well 当り 100 µl 投入し、続いて、試料液 (試料葉を 10 倍容量の PBS・T・PVP・A で磨砕) を 1 well 当り 100 µl 投入して well 中でコンジュゲートと試料液を混合し、4 C で 16 時間静置した。したがって、well 中でのコンジュゲート希釈倍率は 400 倍、試料葉は 20 倍容量の PBS・T・PVP・A で磨砕した場合と同等となる。静置後、プレートを PBS・T で洗浄し、1 well 当り 300 µl の基質液を投入し、室温で 15 分間静置した。基質としては、0.025 M 酢酸ナトリウム緩衝液 pH 5.5 に *o*-phenylenediamine 0.5 mg/ml、過酸化水素を 0.06% 加えたものを用いた。酵素反応は、15 分間静置の後、3 M 硫酸を 1 well 当り 50 µl 投入して停止させた。ELISA の結果の判定

Add 200 µl purified IgG diluted at 2.5 µg/ml in coating buffer in each well

—Incubate for 4 hr at 37 C

Wash

Add 100 µl test sample in PBS・T・PVP・A (phosphate-buffered saline with 0.05% Tween-20, 2% PVP-40 and 2% bovine serum albumin) and

100 µl conjugate diluted at 1:200 in PBS・T・PVP・A

—Incubate for 16 hr at 4 C

Wash

Add 300 µl 0.5 mg/ml *o*-phenylenediamine in 0.025 M-sodium acetate buffer pH 5.5 containing 0.06% H₂O₂

—Incubate for 15 min at room temperature

Stop reaction by adding 50 µl 3 M-H₂SO₄

Visual assessment

or

Photometric measurement at 495 nm

Fig. 1. Procedure of HRP-ELISA for CTLV detection from citrus leaves.

は、コロナ社製 MTP-32 型 ELISA リーダーで 495 nm の吸光度を測定し、通常 1 試料当たり ELISA プレートの 2 well を使用して、2 well の吸光度の平均値が同一プレートに設置した健全試料の示す吸光度の 2 倍以上の場合を陽性とした。

カンキツ葉からの CTLV の検出 CTLV 罹病カンキツ葉から HRP-ELISA による CTLV の検出限界を調査した。検出限界の調査は、葉重量の 10 倍容量の PBS・T・PVP・A を加えて磨砕した CTLV 罹病葉 (K-1 株ウイルスを接ぎ木接種した 'Cuban shaddock') 汁液を、同様に調製した健全カンキツ葉汁液で段階希釈して行った。罹病葉汁液：健全葉汁液が 1 : 16 (罹病葉重量：試料容量では 1 : 320) までは健全葉汁液の 2 倍以上の吸光度を示した (Fig. 2)。

9) Clark, M.F. and Adams, A.N. (1977). J. gen. Virol. 34: 475-483. 10) Flegg, C.L. and Clark, M.F. (1979). Ann. appl. Biol. 92: 61-65.

Fig. 2. The sensitivity of HRP-ELISA for detecting CTLV in citrus leaves. The diseased citrus leaf extracts ground with 1:10 (w/v) of PBS·T·PVP·A were diluted with healthy leaf extracts treated in the same manner as diseased leaf extract. The dashed line indicates absorbance level for healthy leaf extract ground with 1:10 (w/v) of PBS·T·PVP·A.

Fig. 3. Comparisons of HRP-ELISA absorbance value between young leaves and mature leaves on the same trees. Young leaves and mature leaves sampled from the same tree were separately ground with 1:10 (w/v) of PBS·T·PVP·A and assayed by HRP-ELISA, respectively. Tree no. 1-5: Healthy citrus trees. Tree no. 6-9: CTLV diseased citrus trees.

Fig. 4. Comparisons between HRP-ELISA and inoculation test on *Chenopodium quinoa*. Each sample extract of citrus leaves from different trees in 1:10 (w/v) of PBS·T·PVP·A was assayed by ELISA and was inoculated to three *C. quinoa* plants, at the same time. The dashed line indicates two times higher level than healthy control sample as threshold. Open circles indicate negative results of the inoculation test. Solid circles indicate positive results of the inoculation test.

次に、接ぎ木検定、汁液接種検定によって CTLV に感染していることが確認されているカンキツおよび健全カンキツから、新葉と成熟葉を採取し、ELISA を行った。結果は、Fig. 3 に示すとおり、新葉は常に同一樹の成熟葉より発色が強く、また、新葉、成熟葉とも CTLV 罹病葉はいずれも健全葉の2倍以上の吸光度を示した。さらに、未検定の隔離検疫中のカンキツ、国内産カンキツ計 68 個体について、HRP-ELISA とキノアへの汁液接種による検定（キノア検定）とを行い、検定結果を比較した。カンキツ葉をその 10 倍容量の PBS·T·PVP·A で磨砕して ELISA に供試し、残りの汁液をキノア検定に供した。キノア検定には 1 試料当り 3 本のキノア苗を供した。ELISA で陽性と判定した試料は 30 試料あり、このうちキノア検定で 27 試料が陽性、3 試料が陰性であった。ELISA で陰性と判定した 38 試料はキノア検定でもすべて陰性であった (Fig. 4)。

CTLV に対するキノア検定は、*Citrus excelsa* 等を用いた接ぎ木接種と同等の検出感度をもつと報告⁷⁾されている。一方、CTLV (K-1 株) 罹病カンキツ葉汁液（罹病葉汁液）を健全カンキツ葉汁液（健全葉汁液）で段階希釈し、同一試料を HRP-ELISA とキノア検定（1 区当り苗 3 本を供試）とで検出感度の比較を行

うと、HRP-ELISA では各希釈段階の示した吸光度は反復による差がほとんど認められず、常に罹病葉汁液：健全葉汁液 1：16 までは健全葉汁液の 2 倍以上の吸光度を示したのに対し、キノア検定では、1：8 以上の希釈段階では感染率に幅 (0/3～3/3) を生じ、1：1,024 でも検出されたり、1：64 で検出されない (0/3) ことがあるなど、1：8 以上の希釈液の感染性が不安定であった。このことから、HRP-ELISA は、キノア苗 3 本程度を供するキノア検定と比べやや検出感度が低いものの、安定した結果が得られる点で、ほぼ同程度の精度を有する検定方法と考えられる。なお、HRP-ELISA で判定が困難な試料があった場合、それを正確に検定するには、多数のキノア苗を用いた接種検定が必要であると思われる。

現在までに、CTLV の血清型についての研究は行われておらず、血清型の異なる系統が存在するかどうかは不明であるが、著者らがいままでに供試して CTLV と同定されたウイルス株（ユリ分離株および USA から導入したカンキツ分離株 4 株を含む）はすべて本試験に供した抗血清と反応し、本抗血清による HRP-ELISA は、十分利用可能と考えられる。

本研究を行うに当たり、ウイルス株を分譲していただいた南九州大学宮川経邦教授、HRP-ELISA について有益な助言をいただいた岡山大学資源生物科学研究所・前田孚憲氏に深謝の意を表する。

(平成元年 10 月 13 日受理)