ジャガイモ Y ウイルス普通系統およびえそ系統に 特異的なモノクローナル抗体の作製とその 診断への利用*

大島 一里**・Alice Kazuko INOUE**・石川 陽**
四方英四郎**・萩田 孝志***

Kazusato OHSHIMA**, Alice Kazuko INOUE**, Yo ISHIKAWA**, Eishiro SHIKATA**
and Takashi HAGITA***: Production and Application of Monoclonal Antibodies
Specific to Ordinary Strain and Necrotic Strain of Potato Virus Y

Abstract

Monoclonal antibodies (MoAbs) to ordinary strain (PVY-O) and necrotic strain (PVY-T) of potato virus Y were produced. MoAbs PVYO-11G03, 12F05, 12H01, 21H05, 22-D01, 41G07 and 42A08 were specific to PVY-O, MoAbs PVYT-4E7 and 6C11 were specific to PVY-T, and PVYO-11C01, 12H03 and 22A02 were common to both strains in indirect double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (IDAS-ELISA) using polyclonal antibodies (PoAbs) for trapping antibodies. On the other hand, in direct double antibody sandwich ELISA (DAS-ELISA) using MoAbs for both trapping antibodies and enzyme conjugates, MoAbs PVYO-12H01, 21H05, 22D01, 42A08 and 51E04, and MoAbs PVYT-4E7 and 6C11 were specific to PVY-O and PVY-T, respectively. Potato plants collected from fields were examined by DAS-ELISA using the specific and high sensitive MoAbs PVYO-42A08 and PVYT-4E7, and PoAbs against PVY-O or PVY-T. Specific MoAbs could apparently differentiate the two strains of PVY in the plants infected with each of the two strains or both strains.

(Received January 10, 1990)

Key words: monoclonal antibody, potato virus Y, DAS-ELISA.

緒 言

ジャガイモ Y ウイルス (PVY) は, potyvirus グループのタイプメンバーで, 世界中のジャガイモ, タバコ, トマト類に大きな被害を与えている¹⁰⁾. PVY には多くの系統が世界各国から報告されているが^{10, 12)}, ジャガイモの品種に対する局部あるいは全身の病徴に基づいておもに PVY^O グループ (common strain), PVY^N グループ (tobacco vein necrosis strain) さらに PVY^C グループ (stipple streak strain) の 3 系統に分けられ

るが, さらにこのいずれにも属さない PVY の系統も存在する²⁾.

本邦においてタバコに発生している PVY には, 葉脈緑帯を示す普通系統 (PVY-O), 品種によって黄色斑紋とえそ斑点を示すタバコ黄斑えそ系統, およびタバコ (品種: Hicks 2 号) に黄斑, 葉脈えそ, 茎のすじえそなどを伴うえそ系統 (PVY-T) 等が知られている¹²⁾.

最近, ハイブリドーマの作製技術が Köhler and Milstein により開発されて以来⁵⁾, PVY^N に対してモノクローナル抗体 (MoAb) が作製された^{3, 6)}. その後,

* 本研究は文部省科学研究費奨励研究 (A) 課題番号 No. 01760039 により行った。

** 北海道大学農学部植物学教室 Department of Botany, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Kita 9, Nishi 9, Kita-ku, Sapporo 060, Japan

*** 北海道立中央農業試験場 Hokkaido Central Agriculture Experimental Station, Naganuma-cho, Yubari-gun 069-13, Japan

今日まで報告された PVY に対する MoAb はすべて PVY^N に対してである^{3,6)}。本研究では、まず PVY-O および PVY-T に対してポリクローナル抗体 (PoAb) を作製した。しかし、PoAb では両系統の明らかな区別が不可能なことから³⁾、それぞれのウイルスに対して特異的な MoAb を作製することを試みた。さらに半永久的に利用できる MoAb 産生ハイブリドーマの利点⁴⁾を考へて、PoAb を併用しない直接二重抗体サンドイッチ酵素結合抗体法 (DAS-ELISA) に利用できる特異的な MoAb を選抜し、検出感度の高い MoAb を用いて、圃場から採集したジャガイモから PVY-O および PVY-T が特異的に検出できるか否かの検討もあわせて行った。

材料および方法

供試ウイルス ジャガイモ Y ウイルスの普通系統 (PVY-O) およびえそ系統北海道大学分離株 (PVY-T_H) は北海道大学農学部温室内で *Nicotiana sylvestris* 内で継代保存している株を用いた。またえそ系統 (PVY-T)¹²⁾ は高浪洋一博士より分譲いただいた株を用いた。

ウイルスの純化 PVY の純化は Uyeda *et al.*¹³⁾ の方法に多少の改変を加えて行った。PVY 感染生材料 (*Nicotiana sylvestris*) に 3 倍量 (v/w) の 0.5 M リン酸カリウム緩衝液 (PPB) (pH 7.0, 1%メルカプトエタノールを含む) を加えミキサーで破砕後、四塩化炭素処理し、低速遠心分離により植物成分を除去した。上層に 4% (w/v) ポリエチレングリコール #6,000 を添加し溶解後、6°C で 1 時間静置した。低速遠心分離により沈殿を回収し、1% (v/v) Triton X-100 を含んだ 0.01 M PPB で懸濁し、再度の四塩化炭素処理を行い、2 度の高速遠心分離を繰り返した後 10~40% 蔗糖密度勾配遠心分離を行った。ウイルス分画を ISCO fractionator (UA-2 monitor) で採集し、高速遠心分離により蔗糖を除いた後 0.01 M PPB に溶かし純化ウイルスとした。なお、純化ウイルス濃度は A_{260} が 2.3 のとき 1 mg/ml として算出した。

ポリクローナル抗体の作製 抗血清の作製は、200 μ g/ml 純化 PVY-O あるいは PVY-T と Freund's complete adjuvant をそれぞれ 1 ml ずつ混合後、家兎に 2 週間おきに 2 度筋肉注射を行った。さらに 2 週間後 200 μ g/ml の純化ウイルスのみを静脈注射し、その 1~2 週間後に耳の静脈から採血し、抗血清を得た。抗血清の精製は、Clark and Adams の方法¹⁴⁾に基づき、精製した免疫グロブリンをポリクローナル抗体 (PoAb) とした。

重層法による力価の測定 抗体としては、PVY-O および PVY-T の抗血清を用い、抗原としては純化ウイルス 10 μ g/ml を用いて重層法により力価を測定した。

モノクローナル抗体の作製 モノクローナル抗体 (MoAb) の作製は、BALB/c マウスへの免疫方法および抗体産生ハイブリドーマのスクリーニング方法を除いて Ohshima *et al.*¹⁵⁾ の方法に準じて行った。免疫方法は Spitz *et al.*¹⁶⁾ の方法に準じ、20~40 μ g/100 μ l の純化した PVY-O あるいは PVY-T_H を直接脾臓へ 1 回注射し、その 3~4 日後に細胞融合を行った。スクリーニング方法は Ohshima and Shikata¹⁵⁾ の方法に準じ、4 種類の異なる酵素結合抗体法 (ELISA) を用い、MoAb はクロニングした抗体産生ハイブリドーマをマウスの腹腔内へ注射後、腹水を精製して用いた。なお、MoAb の免疫グロブリン (Ig) 型はパーオキシダーゼ標識抗マウス IgG γ 鎖、IgA α 鎖、IgM μ 鎖特異抗体 (Zymed 社) を用いて識別し、力価は抗原吸着間接 ELISA (AAI-ELISA)¹⁷⁾ を用いて検討した。

罹病植物からのウイルスの検出

(1) 間接二重抗体サンドイッチ ELISA

間接二重抗体サンドイッチ ELISA (IDAS-ELISA) は trapping 抗体 (一次抗体) に PoAb、二次抗体に MoAb、三次抗体に抗マウス免疫グロブリン (Ig) enzyme conjugate を用いて行った。なお、trapping 抗体に用いた PoAb と抗原は同種を用いた。

(2) 直接間接二重抗体サンドイッチ ELISA

直接間接二重抗体サンドイッチ ELISA (DAS-ELISA) は trapping 抗体 (一次抗体) および enzyme conjugate (二次抗体) の両方に PoAb あるいは MoAb を用いて行った。

ジャガイモ試料の調製 ジャガイモ葉は北海道の各地より採集し、ELISA に用いるまで -30°C で凍結保存した。試料の調製は、1 g の葉を 10 ml のリン酸緩衝液、pH 7.4 (0.05% Tween 20 を含む)¹⁷⁾ で磨碎し、ELISA に用いた。

実験結果

1. ポリクローナル抗体によるウイルスの検出

PVY-O および PVY-T 抗血清を用いて、重層法により同種抗原ウイルスおよび異種抗原ウイルスに対して力価を測定した。Table 1 に示したように、PVY-O 抗血清を用いた場合の力価は、同種抗原ウイルスの 1/2,048 に対して、異種抗原ウイルスは 1/1,024 であった。一方、PVY-T 抗血清を用いた場合の力価は、同種抗原ウイルスの 1/2,048 に対して異種抗原ウイル

スは 1/128 であった。

PVY-O PoAb および PVY-T PoAb を用いてウイルスの感染した *N. sylvestris* の葉汁液について DAS-ELISA で検討した。Fig. 1 に示したように、PVY-O PoAb を用いた場合、同種抗原ウイルスに対して異種抗原ウイルスは 1/2 程度の吸光度を示し、一方、PVY-T PoAb を用いた場合、同種抗原ウイルスに対して異種抗原ウイルスは 1/6 程度の吸光度を示した。なお、PVY-O PoAb および PVY-T PoAb を用いてそれぞれの純化ウイルスに対して DAS-ELISA で検討したが、ウイルス感染 *N. sylvestris* の葉汁液と同様の結果を示した（データ省略）。

2. モノクローナル抗体

モノクローナル抗体の免疫グロブリン型および力価

Table 2 に示したように、MoAb は 11 種が IgG 型、

Table 1. Titers of antisera prepared against PVY-O and PVY-T by ring interface precipitin test

Antiserum against	Antigen ^{a)}	
	PVY-O	PVY-T
PVY-O	2, 048 ^{b)}	1, 024
PVY-T	128	2, 048

a) Antigens were used at the concentration of 10 μ g/ml.

b) Figures are the reciprocals of the dilution endpoint of antiserum.

5 種が IgM 型であった。また力価を検討した結果、1/625 以上の高い力価を示した MoAb は、PVYO-12H01, 21H05, 21H09, PVYT-4E7 および 3E4 の

Table 2. Immunoglobulin (Ig) types and titers of PVY-O and PVY-T monoclonal antibodies

Monoclonal antibody	Ig type	Titer ^{a)}
PVYO- 11A12	IgG	5
11C01	IgG	5
11G03	IgG	1
12F05	IgM	125
12H01	IgM	625
12H03	IgG	25
21H05	IgM	625
21H09	IgM	625
22A02	IgG	5
22D01	IgM	125
41G07	IgG	25
42A08	IgG	125
51E04	IgG	25
PVYT- 4E7	IgG	625
3E4	IgG	3, 125
6C11	IgG	125

a) Titers were determined by antigen adsorption indirect ELISA⁸⁾. Titer 1 indicates that monoclonal antibodies were reacted with virus at the concentration of 5 μ g/ml. Figures are the reciprocals of the dilution endpoint of monoclonal antibodies.

Fig. 1. Detection of virus in crude saps^{a)} by DAS-ELISA^{b)} using PVY-O and PVY-T polyclonal antibodies.

^{a)} 5⁰ indicates that 1 g virus infected tissue was homogenized with 10 ml of phosphate buffered saline, pH 7.4, containing 0.05 % Tween-20. ^{b)} Trapping polyclonal antibodies were used at the concentration of 5 μ g/ml and enzyme conjugates were used at 400-fold dilution.

H: Healthy *N. sylvestris* plants.

Table 3. Reactions of PVY-O and PVY-T monoclonal antibodies in IDAS-ELISA

Monoclonal ^{a)} antibody	Antigen			
	PVY-O ^{b)}	PVY-T ^{b)}	H ^{c)}	PBS ^{d)}
PVYO- 11A11	high background			
11C01	0.63 ^{e)}	2<	0.00	0.00
11G03	0.69	0.00	0.00	0.00
12F05	2<	0.00	0.13	0.00
12H01	2<	0.00	0.10	0.00
12H03	2<	2<	0.00	0.00
21H05	2<	0.00	0.09	0.00
21H09	high background			
22A02	0.75	0.41	0.00	0.00
22D01	2<	0.13	0.08	0.00
41G07	2<	0.00	0.00	0.00
42A08	2<	0.00	0.00	0.00
51E04	high background			
PVYT- 4E7	0.00	2<	0.00	0.00
3E4	high background			
6C11	0.00	2<	0.00	0.00

a) Trapping polyclonal antibody was used at the concentration of 2 µg/ml, 2 nd monoclonal antibodies were used at the concentration of 1–10 µg/ml and anti-mouse Ig enzyme conjugate was used at 1,000-fold dilution.

b) Homologous polyclonal antibody were used for trapping antibody.

c) Healthy *N. sylvestris* plants.

d) PBS: phosphate buffered saline.

e) Absorbance values were measured at 415 nm and hydrolysis times were 30–90 min at 20 C.

Table 4. Reactions of PVY-O and PVY-T monoclonal antibodies in DAS-ELISA

Monoclonal ^{a)} antibody	Antigen			
	PVY-O	PVY-T	H ^{b)}	PBS ^{c)}
PVYO- 11A11	2< ^{d)}	2<	1.73	0.00
11C01	0.06	0.03	0.00	0.00
11G03	0.03	0.02	0.01	0.00
12A12	0.00	0.00	0.00	0.00
12F05	0.03	0.03	0.00	0.00
12H01	0.68	0.01	0.01	0.00
12H03	0.07	0.03	0.01	0.00
21H05	2.00	0.00	0.00	0.00
21H09	0.00	0.00	0.00	0.00
22A02	0.00	0.00	0.00	0.00
22D01	0.27	0.01	0.00	0.00
41G07	0.19	0.18	0.12	0.00
42A08	2<	0.01	0.02	0.00
51E04	0.55	0.00	0.00	0.00
PVYT- 4E7	0.00	1.61	0.00	0.00
3E4	0.84	0.33	0.01	0.00
6C11	0.00	1.95	0.00	0.00

a) Trapping monoclonal antibodies were used at the concentration of 10 µg/ml and enzyme conjugates (monoclonal antibodies) were used at 200-fold dilution.

b) Healthy *N. sylvestris* plants.

c) PBS: phosphate buffered saline.

d) Absorbance values were measured at 415 nm and hydrolysis times were 30–60 min at 20 C.

5種であった。

間接二重抗体サンドイッチ ELISA によるウイルスの検出 作製した MoAb を用いてウイルスの感染した *N. sylvestris* の葉汁液について IDAS-ELISA で検討した結果を Table 3 に示した。PVYO-11G03, 12F05, 12H01, 21H05, 22D01, 41G07 および 42A08 の7種の MoAb は PVY-O にのみ特異的に反応し, PVYT-4E7 および 6C11 の2種の MoAb は PVY-T にのみ特異的に反応した。さらに, PVYO-11C01, 12H03 および 22A02 の3種の MoAb は PVY-O および PVY-T の両方に反応した。

直接二重抗体サンドイッチ ELISA によるウイルス

の検出 作製した MoAb を用いてウイルスの感染した *N. sylvestris* の葉汁液について DAS-ELISA で検討した結果を Table 4 に示した。DAS-ELISA において PVY-O のみに特異的に反応した MoAb は PVYO-12H01, 21H05, 22D01, 42A08, 51E04 で, PVY-T のみ特異的であったのは PVYT-4E7 および 6C11 であった。これらのなかで, とくに検出感度が高かったのは PVYO-21H05, 42A08, PVYT-4E7 および 6C11 であった。また, PVY-O および PVY-T の両方に反応が認められたのは PVYT-3E4 のみであった。

3. ジャガイモ葉からのウイルスの検出

北海道の各地圃場から採集したジャガイモについ

Table 5. Detection of virus in potato leaves by DAS-ELISA using PVY-O and PVY-T polyclonal and monoclonal antibodies

Sample No.		Cultivar	Polyclonal antibody ^{a)}		Monoclonal antibody ^{a)}		Virus ^{b)}
			PVY-O	PVY-T	PVYO-42A08	PVYT-4E7	
Group 1	28	Danshaku	1.42 ^{c)}	0.79	2<	0.04	O
	40	Danshaku	0.75	0.25	0.87	0.01	O
	46	Danshaku	1.36	0.39	1.29	0.01	O
	54	Danshaku	2<	0.51	2<	0.02	O
	78	Toyoshiro	0.97	0.26	1.69	0.01	O
	200	Norin 1 go	2<	0.55	2<	0.04	O
Group 2	10	Danshaku	0.63	2<	0.03	0.91	T
	60	Toyoshiro	0.73	1.97	0.00	1.27	T
	68	Danshaku	0.89	2<	0.00	2<	T
	81	Danshaku	0.24	2<	0.02	2<	T
	177	Norin 1 go	1.17	2<	0.01	1.67	T
	207	Benimaru	0.57	2<	0.01	1.17	T
Group 3	39	Danshaku	1.86	2.00	1.82	0.76	O, T
	107	Danshaku	2<	2<	2<	2<	O, T
	187	Danshaku	1.21	0.94	2<	0.49	O, T
	203	Benimaru	1.89	2<	2<	1.49	O, T
	205	Benimaru	2<	2<	2<	1.99	O, T
Group 4	27	Danshaku	1.26	0.56	0.04	0.00	?
	36	Danshaku	0.92	0.33	0.02	0.02	?
	72	Danshaku	0.45	0.24	0.04	0.05	?
	PVY-O	<i>N. sylvestris</i>	2<	0.28	2<	0.00	
	PVY-T	<i>N. sylvestris</i>	0.64	2<	0.03	2<	
	H ^{d)}	<i>N. sylvestris</i>	0.07	0.05	0.01	0.01	
	PBS		0.00	0.00	0.00	0.00	

a) Trapping antibodies were used at the concentration of 5 µg/ml and enzyme conjugates were used at 400-fold dilutions.

b) O: PVY-O was only detected.

T: PVY-T was only detected.

O,T: both PVY-O and PVY-T were detected.

?: neither PVY-O nor PVY-T were detected.

c) Absorbance values were measured at 415 nm and hydrolysis times were 1–2 hr at 20 C.

d) Healthy *N. sylvestris* plants.

て、PVY-O および PVY-T の PoAb と PVYO-42A08 および PVYT-4E7 の MoAb を用いて DAS-ELISA で検定した結果を Table 5 に示した。Group 1 あるいは Group 2 のような PVY-O あるいは PVY-T に単独感染していると思われるジャガイモ葉の場合、PoAb による診断では PVY-O あるいは PVY-T のどちらかが感染しているかどうかをそれぞれの反応吸光値の差からおおよその推定はできるが、本実験で得られた MoAb は両系統を明確に判別できた。また、Group 3 のように PoAb を用いて検定すると PVY-O および PVY-T のどちらが感染しているか明確でない場合も、MoAb により混合感染していることが明らかとなった。さらに、Group 4 のように PoAb では反応が認められるが PVY-O および PVY-T MoAb の両方に反応が認められないジャガイモ葉が認められた。

考 察

PVY に対する MoAb は、初め Gugerli and Fries⁸⁾ により、ついで Rose and Hubbard^{6,7)} により tobacco veinal necrosis strain グループである PVYN に対して作製された。しかしながら、今日まではえそ系統に対してのみで、PVY-O および PVY-T の両系統に対してそれぞれ特異的な MoAb が作製された報告はない。Halk and De Boer⁴⁾ は、PoAb より MoAb が勝る点について、(1) 一度 MoAb を作製したならば、半永久的に利用できること、(2) PoAb は抗血清の batch ごとに質的に異なるが、MoAb は均一であると述べている。これらの点を考えれば、PoAb を併用しなければならない IDAS-ELISA より、trapping 抗体および enzyme conjugate の両方に MoAb を用いる DAS-ELISA で反応する MoAb を作製することがはるかに有効である。

Table 4 に示したように DAS-ELISA で反応し、かつ PVY-O に特異的な MoAb は、PVYO-12H01, 21H05, 22D01, 42A08 および 51E04 の 5 種が得られ、なかでも検出感度の高い MoAb は PVYO-21H05 および 42A08 の 2 種であった。さらに、PVY-T に特異的な MoAb は PVYT-4E7 および 6C11 の 2 種であった。一方、DAS-ELISA に利用可能であり PVY-O および PVY-T の両系統に反応する MoAb は、PVYT-3E4 のみであったが、その検出感度は低いものであった。Table 3 に示したように IDAS-ELISA で反応があり、PVY-O および PVY-T の両系統に反応する MoAb は、PVYO-11C01, および 22A02 の 3 種が得

られたが、前述のように、MoAb の利点を考えるならば、DAS-ELISA に利用できる MoAb のほうが有効であり、PVY-O および PVY-T の両系統に強く反応する MoAb の作製は今後の課題であると思われる。

DAS-ELISA で反応し検出感度の高い PVYO-42A08 および PVYT-4E7 を用いて、圃場から採集したジャガイモ葉から PVY-O および PVY-T の検出を試みた結果 (Table 5) は MoAb の有効性を明らかに示した (Group 1 および 2)。とくに両系統に混合感染しているジャガイモ (Group 3) は PoAb では単独感染か、あるいは混合感染かは判別できないが、MoAb を用いることにより混合感染であることが明らかとなった。Gugerli and Fries⁸⁾, Rose and Hubbard⁶⁾ は PVYN の一方に対してだけ MoAb を作製したが、混合感染であるか否かは PVY-O および PVY-T の両方に特異的な MoAb がなければ明らかとはならない。さらに、都丸¹²⁾は PVY-T と他の PVY の系統で干渉作用は完全ではないと述べているが、今後、今回作製した PVY-O および PVY-T の特異 MoAb を用いれば、さらに干渉作用の研究が進むものと思われる。今回の調査で、PoAb で反応が認められ、MoAb では反応が認められないジャガイモ (Group 4) が認められた (Table 5)。PVY-O PoAb と強く反応し、PVY-T PoAb と弱く反応していることから PVY-O の一系統と推測されるが、今後さらに、これらのウイルスを分離しその MoAb を作製し、系統の性質を明らかにしてゆきたい。

MoAb による検出では、Group 4 のように、用いた MoAb に対して抗原決定基をもたないウイルス系統が存在する可能性も当然考えられるので、MoAb の利用については、慎重な考慮が必要である。

なお、PVY-T を分譲いただいた日本タバコ産業株式会社 高浪洋一博士に深謝する。

摘 要

ジャガイモ Y ウイルス (PVY) の普通系統 (PVY-O) およびえそ系統 (PVY-T) に対してモノクローナル抗体 (MoAb) を作製した。スクリーニングに用いた間接二重抗体サンドイッチ酵素結合抗体法 (IDAS-ELISA) で作製した MoAb を用いてウイルスの感染した *N. sylvestris* の葉汁液について検討すると、PVYO-11G03, 12F05, 12H01, 21H05, 22D01, 41G07 および 42A08 が PVY-O に対して、また PVYT-4E7

および 6C11 は PVY-T に対して特異的であった。さらに, PVYO-11C01, 12H03 および 22A02 は PVY-O および PVY-T に共通に反応した。一方, 直接二重抗体サンドイッチ ELISA (DAS-ELISA) に利用可能でかつ PVY-O に対して特異的な MoAb は PVYO-12H01, 21H05, 22D01, 42A08 および 51E04 であり, PVY-T に対して特異的な MoAb は PVYT-4E7 および 6C11 であった。このなかで検出感度の高い PVYO-

42A08, PVYT-4E7 MoAb および PVY-O, PVY-T のポリクローナル抗体 (PoAb) を用いて DAS-ELISA により, 圃場で採集したジャガイモ葉からウイルスの検出を試みた。その結果, PVY-O あるいは PVY-T に単独感染している株, PVY-O および PVY-T に混合感染している株, さらに PoAb では反応が認められるが PVY-O および PVY-T MoAb の両方に反応の認められない株が認められた。

引用文献

1. Clark, M.F. and Adams, A.N. (1977). *J. gen. Virol.* 34: 475-483.
2. De Bokx, J.A. and Huttinga, H. (1981). CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses No. 242.
3. Gugerli, P. and Fries, P. (1983). *J. gen. Virol.* 64: 2471-2477.
4. Halk, E. and De Boer, S. (1985). *Ann. Rev. Phytopath.* 23: 321-350.
5. Köhler, G. and Milstein, C. (1975). *Nature* 256: 495-497.
6. Rose, D.G. and Hubbard, A.L. (1986). *Ann. appl. Biol.* 109: 317-321.
7. Rose, D.G., McCarra, S. and Mitchell, D.H. (1987). *Plant Pathol.* 36: 95-99.
8. Ohshima, K. and Shikata, E. (1990). *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 56: 219-228.
9. Ohshima, K., Uyeda, I. and Shikata, E. (1989). *Ibid.* 55: 420-426.
10. Shukla, D.D., Thomas, J.E., McKern, N.M., Tracy, S.L. and Ward, C.W. (1988). *Arch. Virol.* 102: 207-219.
11. Spitz, M., Spitz, L., Thorpe, R. and Egugui, E. (1984). *J. Immunol. Methods* 70: 39-43.
12. 都丸敬一 (1983). 盛岡たばこ試験 17: 87-96.
13. Uyeda, I., Kojima, M., Yonemura, M., Aoki, T., Kawada, T. and Shikata, E. (1984). *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.* 62: 22-35.