改良 DIBA (Dot Immuno-Binding Assay) 法を用いた キュウリウイルス病の簡便かつ低コスト診断法

櫛間 義幸[†]
(宮崎県総合農業試験場)

Simple and low-cost diagnosis of cucumber viruses causing mosaic diseases with modified DIBA (Dot Immuno-Binding Assay). Yoshiyuki Kushima (Miyazaki Agricultural Research Institute, Sadowara Miyazaki, Miyazaki 880-0212, Japan)

一次抗体と二次抗体を同時に混合処理する改良 DIBA 法のキュウリ黄化えそウイルス (MYSV) の純化ウイルスの検出限界濃度は $0.1 \mu\text{g/ml}$ で、通常の DIBA 法の $1/10$ であったが、検査時間が短縮され有効であった。植物体からの検出感度は DAS-ELISA 法と一致し実用上遜色ない結果であった。同手法はキュウリモザイクウイルス (CMV)、キュウリ緑斑モザイクウイルス (KGMMV) およびズッキーニ黄斑モザイクウイルス (ZYMV) にも適用可能であった。作成した混合抗体液は約 1 ヶ月間反復利用が可能で、陽性対照をスポットしたニトロセルロースメンブレン (NCM) も長期間反応性を有することが確認された。4 種ウイルスの陽性対照と陰性対照をあらかじめスポットした検定用 NCM を、それぞれの混合抗体液と組み合わせて使用することでウイルス種を的確に判定することができ、生産現場での迅速なウイルス病診断が可能である。

Keywords : MYSV, KGMMV, CMV, ZYMV

緒 言

植物ウイルス病の診断は、生物検定や遺伝子診断、血清学的診断法および電子顕微鏡によるウイルス粒子の観察など様々な手法で行われている。血清学的診断法は、最も一般的に使われる手法であり、数種の植物ウイルス病については、日本植物防疫協会等から診断試薬として抗血清類が市販されている。また、近年では RIPA 法によるイムノストリップキットも海外メーカから提供されるものばかりでなく、国内でも独自に作成配布され、現場への適用事例が報告されている (甲把 (安達)・津田, 2015)。

宮崎県は全国一の生産量を誇るキュウリ (*Cucumis sativus* L.) 産地であるが、生産現場ではモザイク病その他のウイルス病が発生して問題となっている。特に、近年では、ミナミキイロアザミウマ (*Thrips palmi*) によって媒介されるメロン黄化えそウイルス (*Melon yellow spot virus* : MYSV) による黄化えそ病が県内全域に拡大しつつあり、また件数は少ないも

のキュウリ緑斑モザイクウイルス (*Kyuri green mild mottle virus* : KGMMV) によるキュウリ緑斑モザイク病も散発的に発生し警戒されている。その他、アブラムシ類によって媒介されるキュウリモザイクウイルス (*Cucumber mosaic virus* : CMV) やズッキーニ黄斑モザイクウイルス (*Zucchini yellow mosaic virus* : ZYMV) などもしばしば発生し生産を脅かしている。

ウイルス病は一旦感染すると治療が困難なことから、防除対策の基本は早期発見・除去であり、生産現場では誰でも簡単に判断できる診断ツールが求められている。

DIBA (Dot Immuno-Binding Assay) 法は、支持体上に固着した病原ウイルスを抗原抗体反応と酵素反応を利用して沈着性色素の発色スポットとして検出する方法で、同様の原理ながら基質溶液の発色程度を定量する ELISA 法と同等の感度を有しながら、マイクロプレートやプレートリーダーなど特別な機材を必要としない汎用性の高い検定法である。

そこで、宮崎県総合農業試験場では、DIBA 法を改良して、現場で簡便かつ比較的短時間に同定・診断が

[†] kushima-yoshiyuki@pref.miyazaki.lg.jp

できる手法を開発した（櫛間ら，2013，以下改良 DIBA 法と略す）ので，その概要を報告する。

なお，本文に先立ち，MYSV の純化ウイルスを分譲していただいた南九州大学 菅野善明教授にお礼を申し上げる。

材料および方法

1. 改良 DIBA 法の検出限界と検定時間の短縮

検定時間の短縮を図るため，一次抗体と二次抗体を混合して同時に処理する改良 DIBA 法を考案した。手順は次の通りである。TBS (0.02M トリスヒドロキシアミノメタン 2.4g, 塩化ナトリウム 29.2g, 蒸留水 1,000ml, pH7.5) に 5 分間浸漬後，風乾したニトロセルロースメンブレン (Bio Rad 社製 孔径 0.45 μm , 8 × 25mm に細断。以下 NCM シートという) に，TBS で 0.01~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調整した MYSV の純化ウイルスを 1 μl ずつスポットして，5 分間風乾した。その後，3 つの小型シャーレに注いだ TTBS (TBS にツイーン 20 0.5ml を添加) に 5 分間ずつ順に浸漬した（以下，洗浄という）。洗浄後の NCM シートをパラフィルム上に置きブロック液 (TTBS 50ml, ポリビニルピロリドン 1 g, 牛血清アルブミン Fr 5 1 g) を覆うように添加して 15 分間静置した（以下，ブロック処理という）。再び NCM シートを TTBS で洗浄し，2 ml のマイクロチューブに分注した MYSV の混合抗体液 (TTBSPB (TTBS 50ml, ポリビニルピロリドン 1 g, 牛血清アルブミン Fr 5 0.1g) 2 ml に一次抗体 4 μl (500 倍)，二次抗体 0.67 μl (3,000 倍) を添加) に浸漬し，室温で 30 分間静置した。なお，一次抗体 (抗ウイルス抗体) として，MYSV の DAS-ELISA 用検出セットのコーティング抗体 (日本植物防疫協会製)，二次抗体 (コンジュゲート) として，アルカリフォスファターゼ標識抗ウサギ・ヤギ抗体 (ナカライテスク製) を使用した。抗体処理後の NCM シートは TTBS で洗浄し，小型シャーレに分注した AP9.5 緩衝液 (トリスヒドロキシアミノメタン 12.1g, 塩化ナトリウム 5.8g, 塩化マグネシウム・6 水合物 0.2g, 蒸留水 1,000ml, pH 9.5) で 5 分間ずつ 3 回処理（以下，AP 処理という）し，余分な水分を除去したのち，パラフィルム上に置いて，基質・発色液 (SigmaFast NBT/BCIP タブレット (シグマ社) 1 錠を蒸留水 10ml に溶解) 200 μl をシート全面を覆うように添加した。その後，トレイを被せて遮光し室温で 15 分間静置したのち，濃紫色の有無を判定した。対照の DIBA 法は，日比 (1984) の方法を参考に，

ブロック処理後に一次抗体液 (500 倍) で 30 分処理し，洗浄後，二次抗体液 (3,000 倍) で 30 分処理してから，AP 処理，基質・発色液の添加を行った。

また，植物サンプルとして，MYSV 罹病キュウリ葉 (陽性対照) および健全キュウリ葉 (陰性対照) を供試し，各 0.2g を 5 ml の TTBS で摩砕して，原液 (25 倍液) としたのち，それぞれ TTBS で段階希釈して NCM シートに 1 μl ずつスポットして両手法の比較を行った。

2. 改良 DIBA 法と DAS-ELISA 法との比較

新たに開発した改良 DIBA 法の実用性を植物のウイルス病診断に広く使われている DAS-ELISA 法と比較するため，MYSV に罹病したキュウリ個体から症状の異なる各部位を採取してそれぞれ改良 DIBA 法と DAS-ELISA 法による検出を行った。改良 DIBA 法の NCM シートにはサンプルのほかに陽性および陰性対照を配置して陽性対照と同程度の発色の見られたものを陽性と判定した。また，DAS-ELISA 法は，高橋 (1988) の方法に準じて以下のとおり行った。コーティング液 500 倍で 4℃ 一晩処理したマイクロプレートに，サンプル汁液を添加後 4℃ 16 時間インキュベートしたのち，コンジュゲート液 500 倍を 37℃，2 時間反応させ，基質を添加して 1 時間後にマイクロプレートリーダーを用いて 405nm における吸光度を測定した。DAS-ELISA 法では陰性対照の 2 倍以上の値を陽性と判定した。

3. 改良 DIBA 法の CMV, KGMMV および ZYMV での適用性確認

CMV, KGMMV および ZYMV の各罹病葉，健全キュウリ葉を用い，改良 DIBA 法を通常の DIBA 法と比較した。

各葉汁液の調整及び検出手法は 1 に準じて行い (第 2 図 B 中央模式図)。一次抗体 (いずれも日本植物防疫協会製) は 1,000 倍に，二次抗体は 4,000 倍にそれぞれ調整した。なお，比較のために MYSV の陽性対照もスポットし同一条件で試験を行った。

4. 混合抗体液・NCM シートの保存性

MYSV の陽性対照および陰性対照をあらかじめスポットした NCM シートを 90 枚作成し，風乾後 4℃ で保存した。MYSV の混合抗体液 (一次抗体 500 倍，二次抗体 3,000 倍) の作成当日，1，7，14，22 および 43 日後に，1 回あたり NCM シート 2 枚，1 日 6 回，計

12枚ずつを同一抗体液を用いて改良 DIBA 法による検出を行った。

5. 検定用 NCM シートの作成と実用性の検証

NCM シートに鉛筆を用いて 8 mm × 25 mm のマス目を引き、検定サンプル用に中央部を避けて、線上に各種ウイルスの陽性対照および陰性対照をスポットして、検定用 NCM シートを作成した。対照汁液は、各キュウリ葉を重量比25倍量の TTBS で摩砕したのち、6,000rpm、10分間遠心後、上清を各 2 μl ずつスポットした（第 1 図）。検定事例では、マス目に沿って切り離した4つの小片に、中央に調べたいサンプル①～⑤の被検液をスポットして、それぞれウイルスの混合抗体液を用いて改良 DIBA 法に供試した。各ウイルスの混合抗体液の濃度は、CMV、KGMMV および ZYMV については一次抗体を1,000倍、二次抗体を4,000倍で、MYSV については一次抗体を500倍、二次抗体を3,000倍にそれぞれ調整した。

結 果

1. 改良 DIBA 法の検出限界と検定時間の短縮

MYSV 純化ウイルスを用いた試験では、DIBA 法では 0.01 μg/ml まで検出されたのに対して、改良 DIBA 法では 0.1 μg/ml までしか検出されずやや劣る結果であった（第 2 図 A）。また、植物汁液を用いた比較試験では、DIBA 法では 2,500～25,000 倍まで検出されたのに対して、改良 DIBA 法では 250～2,500 倍までであった。（データ省略）しかし、DIBA 法では一次抗体液と二次抗体液を個別に処理するため中間の洗浄過程を含め 1 時間10分を要するのに比べ、改良 DIBA

法の処理時間は30分で良いことから40分間の時間短縮が可能であった。

2. 改良 DIBA 法と DAS-ELISA 法との比較

キュウリ黄化えそ病罹病株の各部位から組織サンプルを採取し、DAS-ELISA 法と改良 DIBA 法によるウイルスの検出を行った結果を第 1 表に示した。改良 DIBA 法および DAS-ELISA 法のどちらも、症状の見られる中位葉や萌芽後間もない腋芽では検出されたが、未発症の中位葉や症状は見られるものの下位の老化葉からは検出されず、二つの検出法の結果は一致した。

3. 改良 DIBA 法の CMV, KGMMV および ZYMV での適用性確認

3 種のウイルスについて、それぞれ改良 DIBA 法と DIBA 法の比較を行った結果、いずれのウイルスにおいても両手法の検出結果は一致したことから CMV, KGMMV および ZYMV でも改良 DIBA 法が利用可能であることが確認された。（第 2 図 B）

4. 混合抗体液・NCM シートの保存性

あらかじめ MYSV の陽性対照および陰性対照をスポットした NCM シートを用い、同一混合抗体液を用いて改良 DIBA 法を複数回反復した連用試験では、43日後、延べ90回（枚）使用しても、検出可能であった（第 2 表）。使用回数、経過時間によって、基質の発色程度がやや減少する傾向が認められたが、陽性対照と陰性対照の発色程度の差は明瞭で判定に支障はなかった（第 2 図 C）。

第 1 図 各ウイルスの陽性対照を配置した検定シートの作成。
C: CMV, K: KGMMV, M: MYSV, Z: ZYMV, -: 健全。

5. 検定用 NCM シートの作成と実用性の検証

試作した検定用 NCM シートを用いたウイルス病診断実施例を第3図に示した。各種ウイルスの混合抗体液と反応させた結果、それぞれの組み合わせと対応した陽性対照部位は陰性対照部位と比較して濃い紫色を呈した。混合抗体液の一次抗体と異なるウイルス種の陽性対照部位は陰性対照と同程度の発色であった。検定事例では、上下辺にある陽性・陰性対照の発色程度の比較から、被検サンプルのうち②は MYSV に、③は ZYMV に、⑤は KGMMV にそれぞれ感染しており、①と④は健全と判断された（第3図）。

考 察

DIBA 法は支持体に固着した抗原に一次抗体を反応させ、その後アルカリフォスファターゼ標識抗体を用いて検出する間接 ELISA 法の一種で、2段階の反応からなるため操作時間を2時間～半日程度要する。そこで、時間を短縮するために一次抗体と二次抗体の混合処理を行った。改良 DIBA 法による MYSV 純化ウ

イルスの検出限界は $0.1 \mu\text{g/ml}$ で、通常の DIBA 法の $1/10$ 濃度でやや劣る結果となったが、植物サンプルを供試した実際の検定では DAS-ELISA 法と同等の検出結果が得られたことから、実用上問題は無いものと考えられる。

小宮ら（2002）はスイカ果実汚斑細菌病菌（*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*）の迅速な検定を行うため、DIBA 法の変法として、サンプルをスポットした NCM シートに、スイカ果実汚斑細菌病菌に特異的な IgG にアルカリフォスファターゼを結合させたコンジュゲートを直接作用させ、約30分で検出可能であることを報告している。また、石井ら（2003）はトマト黄化えそウイルス（*Tomato spotted wilt virus*）に対して、同様にコンジュゲートを直接作用させることで、通常の DIBA 法と比較してやや感度は劣るものの十分に検出が可能であり、操作時間の短縮が図れるとしている。今回の改良 DIBA 法でも同様の結果が得られているが、両報告がいずれも DAS-ELISA 法のコンジュゲートを直接使用しているのに

第2図 基質・発色液を添加処理後の NCM シート。A：改良 DIBA 法の検出限界濃度（MYSV 純化ウイルス）。B：4 種ウイルスにおける両 DIBA 法の比較。各シートの中央にはレイアウトのとおり CMV、KGMMV、MYSV、および ZYMV の感染汁液及び健全汁液をそれぞれスポット。C1 および C、K1 および K、M1 および M、Z1 および Z は、それぞれ CMV、KGMMV、MYSV および ZYMV の抗体を用いて通常の DIBA 法と改良 DIBA 法により処理した。C：保存43日後の NCM シートに88回反復利用した MYSV 混合抗体液を89回目（上）および90回目（下）に反応させた場合の検出事例。P は MYSV 感染汁液、健は健全汁液。

対して、本報では一次抗体（通常ウサギ抗体）とアルカリフォスファターゼ標識抗ウサギ・ヤギ抗体を混合して用いた点が異なっている。理論的には、前記の DAS-ELISA 法のコンジュゲートを用いても検出可能と考えられるので、筆者も試行してみたが、MYSV 他 3 種のウイルスの場合、今回の改良 DIBA 法よりも検出感度が劣る結果であった（データ省略）。

一方、混合抗体液は、43日後、90回までの反復使用が可能であったことから、作成した抗体液は 1 ヶ月程度は利用可能であることが示唆された。

Susamto ら（1989）は、ZYMV 罹病葉の汁液を塗布した NCM が 6 ヶ月間保存した後でも抗原性が失われず DIBA 法により検出可能であることを報告しているが、今回試験を行った MYSV においてもスポット後約 2 ヶ月を経た NCM シートで陽性対照が安定して反応し同様の傾向が認められたことから、あらかじめ検定用 NCM シートとして作成しておくことが可能と考えられた。

今回開発した改良 DIBA 法の所要時間とコストを、従来の主要な血清学的診断法と比較して第 3 表に示した。標準の DIBA 法と比較して 40 分程度短縮した改良 DIBA 法の所要時間は約 1 時間で、DAS-ELISA 法に比べると 1/8～1/16 程度の時間で判定することが可能であった。DAS-ELISA 法は反応容器としてマイクロプレートを使用するため検定規模にもよるがコストがやや高くなること、検定実施に際してもマイクロピペットやプレートリーダー等の機材を要し、諸操作への習熟も必要であり、簡便性においては改良 DIBA 法が勝っている。

一方、現在イムノストリップキットとして実用化されている RIPA 法は、簡単な作業でかつ約 10 分程度で判定が可能で、簡便性・迅速性が極めて優れる手法であるが、提供されるウイルス種が限られており、1 件あたり約 1,000 円前後のコストがかかることから、小規模農家等では容易に用いられていないのが現状である。また、高知県では CMV や MYSV、トウガラシ

第 1 表 改良 DIBA 法と DAS-ELISA 法による植物体各部位からのウイルス検出

番号	症状	肉眼観察 ^{a)}	改良 DIBA 法 ^{b)}	DAS-ELISA ^{c)}
1	発症葉（下位老化葉）	±	—	—
2	発症葉	+	+	+
3	未発症葉（中位）	—	—	—
4	発症葉（中位）	+	+	+
5	激しい発症葉（上位）	++	+	+
6	発生初期の上位葉	+	+	+
7	症状のある側枝	+	+	+
8	萌芽後間もない腋芽	—	+	+
9	未発症葉（下位葉）	—	—	—
10	未発症の側枝葉	—	—	—

a) ++：顕著なモザイク症状 +：モザイク症状 ±：擬症状 —：症状なし。

b) DIBA 法は抗体同時処理、罹病・健全サンプルの発色程度と比較して判定。

c) DAS-ELISA 法は健全サンプルの吸光度の 2 倍以上を陽性と判定した。

第 2 表 混合抗体液・NCM シートの作成後日数と改良 DIBA 法の反応^{a)}

	作成後経過日数						
	0	1	7	14	22	29	43
NCM シートの 延反復枚数	12	24	36	48	60	72	90
陽性対照	+ ^{b)}	+	+	+	+	+	+
陰性対照	—	—	—	—	—	—	—

a) MYSV 混合抗体液（一次抗体 500 倍、二次抗体 8000 倍）、および陽性対照、陰性対照をスポットして風乾した NCM シートは、作成後に 4℃ で保存し、経時的に取り出し、室温で改良 DIBA 法に供試した。各試験日とも最後に混合抗体液を処理した NCM シートについて基質・発色剤を添加し反応の有無を調査した。

b) +：青紫色に呈色 —：反応なし。

微斑モザイクウイルス (*Pepper mild mottle virus*) について RIPA 法のキットを独自に作成して県内の農業振興センターに配布して生産現場での診断に利用している事例も報告されているが, RIPA 法に用いられてきたポリスチレン系ラテックス粒子が生産中止と

なったことから代替粒子への移行が工夫されている(甲把・津田, 2015)。

改良 DIBA 法は迅速性や作業の簡便性の点では及ばないが, 必要な資材は NCM シート小片と反応容器としてのマイクロチューブのみであり, ストリップを作成する労力も不要であることから, 県農業試験場等, 供給側として取り組みやすい利点がある。また, 2 ml のマイクロチューブに挿入可能な NCM シートの小片サイズであれば 5~10 件はサンプルのスポットが可能で, 一斉に複数サンプルを検定できるメリットがある。このため, 同一圃場内の複数箇所から, あるいは同一個体内でも複数の部位からサンプルを採取して診断が可能である。さらに, 複数のウイルス病についても, 今回作成したような複数種の陽性対照を配置した検定用 NCM シートに同時にスポットして用いれば, 調べたいウイルスの混合抗体液とそれぞれ反応させることで, 一斉に検定することも可能である。

現在, 宮崎県では, 混合抗体液その他の試薬と検定用 NCM シートをセットにして県内の農業改良普及センター等へ配布しており, キュウリのウイルス病診断に活用している。

引用文献

- 甲把 (安達) 理恵・津田新哉 (2015) メロン黄化えそウイルス (*Melon yellow spot virus*) の迅速免疫ろ紙検定法 (RIPA 法) での診断に利用可能な代替粒子の探索. 植物防疫 69: 447-449.
- 日比忠明 (1984) DIBA 法による植物ウイルスの検出法. 植物防疫 38: 380-384.
- 石井貴明・奥田充・花田薫・嶽本弘之 (2003) 福岡県のパプリカ (*Capsicum annuum*) におけるトマト黄化えそウイルス (*Tomato spotted wilt virus*: TSWV) の発生および Dot Immuno-Binding Assay (DIBA) 法による検出. 福岡県農業総合試験場研究報告 22: 56-60.

第3図 検定用シートを利用した検定結果. “A:” サンプルのレイアウトを示す. CP, KP, MP および ZP は, それぞれ CMV, KGMMV, MYSV および ZYMV の陽性対照, N は陰性対照. ①~⑤は被検サンプル. “B:” 検定結果を示す. C 液: CMV 混合抗体液, K 液: KGMMV 混合抗体液, M 液: MYSV 混合抗体液, Z 液: ZYMV 混合抗体液. 図中の矢頭は陽性と判定したサンプルを示す.

第3表 改良 DIBA 法と DIBA 法, DAS-ELISA 法及び RIPA 法の比較

検定方法	検定規模	所要時間	単価 / 件	備考
改良 DIBA 法	1~5 件	約 1 時間	50 円	一次抗体 500 倍, 二次抗体 4000 倍で 50 回反復利用. NCM シート小片あたり基質・発色液を 200 μ l 使用すると仮定して算出.
DIBA 法	1~5 件	約 2 時間	50 円	改良 DIBA 法の場合, マイクロチューブや洗浄用 TTBS が節約可能.
DAS-ELISA 法	1~96 件	1~2 日	100 円~	DAS-ELISA 検査キットのウェルあたり試薬コストは 20 円以下だが, マイクロプレート単価は 100~200 円程度である.
RIPA 法	1 件	約 10 分	1,100 円	A 社イムノストリップキットの場合 25 テスト分で 27,000 円程度である.

- 小宮友紀子・白川隆・我孫子和雄 (2002) Dot Immuno-Binding Assay および Tissue Printing Immunoassay によるスイカ果実汚斑細菌病の血清学的診断法. 日植病報 68: 291-296.
- 櫛間義幸・黒木尚・河野亜希子・黒木修一・今村幸久 (2013) 改良 DIBA 法を用いたキュウリモザイク病・緑斑モザイク病の簡易診断. 九病虫研会報 59: 115. (講要)
- Susanto SOMOWIYARJO・佐古宣道・野中福次 (1989) ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体によるズッキーニ黄斑モザイクウイルス (ZYMV) の dot-immunobinding assay (DIA). 日植病報 55: 56-63.
- 高橋義行 (1988) ELISA 法 - その特徴と実施上の注意点 -. 植物防疫 42: 88-92.
- (2017年4月30日受領, 7月14日受理)