平成２８年３月２２日

レギュラトリーサイエンス新技術開発事業 研究実績報告書

課題番号：２５０８

隔離栽培検査体系の見直しのための高度な病害虫検査技術の開発

研　究　期　間：平成２５年度～平成２７年度（３年間）
研究総括者名：中畝　良二
試験研究機関名：国立研究開発法人農業･食品産業技術総合研究機構果樹研究所
国立研究開発法人農業･食品産業技術総合研究機構中央農業総合研究センター

Ｉ．全体計画

１．研究目的

果樹や球根類の隔離栽培検査における迅速かつ効率的な処理を可能とするよう、分子生物学的な技術等を応用した国内未検出病原体の新たな検査技術を開発する。開発した技術の検出精度や検出感度等を評価し、検査技術として植物防疫事業で利用可能なマニュアルを作成する。

２．研究内容

（１）中課題１：病菌の迅速かつ効率的な検査技術の開発

果樹や球根類の隔離栽培検査における迅速かつ効率的な処理を可能とするよう、分子生物学的な技術等を応用した国内未検出病原体の新たな検査技術を開発する。

１）小課題１：果樹を対象とした病原体の迅速かつ効率的な検査技術の開発【果樹研究所】

輸入数量の多いブドウ属やコケモモ属等に感染し、侵入が警戒されている（または新規に知られた）国内未発生病原体を対象とし、検査に適した植物部位および検定時期等を検討するとともに、多種類のウイルス等を省力的に検定できる PCR 法等を開発する。

２）小課題２：花き類を対象とした病原体の迅速かつ効率的な検査技術の開発【中央農業総合研究センター】

輸入数量の多いスイセン属やグラジオラス属の球根類に感染し、侵入が警戒されている（または新規に知られた）国内未発生病原体を対象とし、検査に適した植物部位および検定時期等を検討するとともに、多種類のウイルス等を省力的に検定できる PCR 法等を開発する。

（２）中課題２：開発された検査技術の評価及びマニュアル作成

開発した技術の検出精度や検出感度等を評価し、検査技術として植物防疫事業で利用可能なマニュアルを作成する。

１）小課題１：開発された検査技術の評価【果樹研究所・中央農業総合研究センター】

開発された検査技術については、健全植物に対して擬陽性反応を示さないことを確認しつつ、プライマーや反応の諸条件を確定する。また、各種情報を研究グループ内で共有し、検査精度、検出感度、検出時間等の事項を評価する。その評価結果を検査技術の改良へフィードバックし、最終的に隔離栽培検査における迅速かつ効率的な新技術として確立する。

２）小課題２：隔離栽培検査体系の見直しのための高度な病害虫検査技術のマニュアル化【果樹研究所・中央農業総合研究センター】

サンプリング方法（時期や検定部位等）、検定に必要な機材および試薬、検定条件、検出結果の診断方法等をとりまとめ、輸入植物検疫で利用可能な検査技術と

してマニュアルを作成する。

３．年次計画

項目	平成２５年度	平成２６年度	平成２７年度
１ 病菌の迅速かつ効率的な検査技術の開発			
（１）果樹類を対象とした病原体の迅速かつ効率的な検査技術の開発	果樹類を対象とした病原体の迅速かつ効率的な検査技術の開発（農研機構果樹研）←→	←→	←→
（２）花き類を対象とした病原体の迅速かつ効率的な検査技術の開発	花き類を対象とした病原体の迅速かつ効率的な検査技術の開発（農研機構中央農研）←→	←→	←→
２ 開発された検査技術の評価及びマニュアル作成			
（１） 開発された検査技術の評価		開発された検査技術の評価（農研機構果樹研・中央農研）←→	←→
（２）隔離栽培検査体系の見直しのための高度な病害虫検査技術のマニュアル化		隔離栽培検査体系の見直しのための高度な病害虫検査技術のマニュアル化（農研機構果樹研・中央農研）	←→
所要経費（合計）	10,000 千円	9,690 千円	9,400 千円

４．実施体制

項目	担当研究機関	研究担当者		エフォート（%）
研究総括者	果樹研究所		中畝　良二	10
１．病菌の迅速かつ効率的な検査技術の開発	果樹研究所	○	中畝　良二	前出
（１）果樹を対象とした病原体の迅速かつ効率的な検査技術の開発	果樹研究所	△	中畝　良二 伊藤　隆男	前出 30
（２）花き類を対象とした病原体の迅速かつ効率的な検査技術の開発	中央農業総合研究センター	△	冨高　保弘 津田　新哉 久保田　健嗣	30 5 10
２．開発された検査技術の評価及びマニュアル作成	果樹研究所	○	中畝　良二	前出
（１）開発された検査技術の評価	果樹研究所		中畝　良二 伊藤　隆男	前出 前出
	中央農業総合研究センター	△	冨高　保弘 津田　新哉 久保田　健嗣	前出 前出 前出
（２）隔離栽培検査体系の見直しのための高度な病害虫検査技術のマニュアル化	果樹研究所 中央農業総合研究センター	△	中畝　良二 伊藤　隆男 冨高　保弘	前出 前出 前出

研究担当者欄について、中課題担当者には○、小課題担当者には△を付すこと。

Ⅱ．研究実績報告

１．中課題１：病菌の迅速かつ効率的な検査技術の開発

（１）成果の概要

工程表	進捗状況・成果
果樹および花き球根類に感染し、植物防疫上問題となる病菌を選定・入手するとともに、発生国等における検査技術を調査する（小課題１および２関連）。（平成２５年度）※１ ↓ 対象病菌について、PCR 法等に基づいた迅速かつ効率的な検査技術を開発する（小課題１および２関連）。（平成２５～２７年度）※２ ↓ 中課題２の小課題１の結果を受けて、検査技術の高度化を図り、多種類の病菌を省力的に検査できる手法として確立する（小課題１および２関連）。（平成２７年度）	① 検査対象ウイルス（ブルーベリーに感染する３種ウイルス、ブラックベリーに感染する１種ウイルス、花きに感染する＊種ネポウイルスおよび＊種のポティウイルス）、検査対象細菌（*Xylella fastidiosa*）、検査対象病原体由来の核酸（ファイトプラズマおよび *X. fastidiosa*）を入手した。（平成２５～２７年度） ② 発生国等で実施されている検査技術について学術論文や政府発行の検査マニュアルを調査した（平成２５～２７年度）。 ③ ブドウの簡易抽出試料から、ファイトプラズマと *X. fastidiosa*、内在性コントロールを TaqMan リアルタイムマルチプレックス PCR にて同時検出する技術を開発した。（平成２５～２７年度）（※３、図１） ④クロステロウイルスのワンステップ RT-PCR による同時検出技術を開発した。（平成２５～２７年度）（※４、図２） ⑤ブルーベリーの対象ウイルスのうち、ブルーベリーシューストリングウイルス（BSSV）のゲノム配列を明らかにした。ブルーベリーの対象ウイルス3種を同時に検出するマルチプレックスRT-PCRを開発した。（平成２６～２７年度）（※５、図３） ⑥ ネポウイルスを網羅的に増幅するためのプライマーセットを設計し、最適な検定法を開発した。（平成２７年度）（※６、図４） ⑦ポティウイルス共通プライマーを用いて検出試験を行い、既報プライマーを利用した最適な検査法を開発した。（平成２６～２７年度）（※７、図５）

成果目標：果樹類や花き球根類の隔離栽培検査における迅速かつ効率的な処理を可能とするよう、PCR 法等の分子生物学的な技術を応用した国内未検出病原体の新たな検査技術を開発する。

＜成果の概要の補足＞

※１：対象とする植物および病菌は、果樹類ではブドウ属に感染する *Flavescence doree phytoplasma*（ファイトプラズマ）、*Xylella fastidiosa*（細菌）、クロステロウイルスおよびネポウイルス、コケモモ属（ブルーベリー）に感染する *Blueberry shock virus*、*Blueberry scorch virus* および *Blueberry shoestring virus*、花き球根類では、スイセン属等に感染するネポウイルス属ウイルスおよびポティウイルス属ウイルスを想定している。運営チームと協議しながら、植物検疫で迅速かつ効率的な検査が求められるものを対象に加えた。

※２：植物検疫で求められる迅速かつ効率的な検査技術の開発を目指し、運営チームと協議しながら開発する検査技術は PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）法に基づいたものとした。

※３：TaqMan プローブを利用したトリプレックスリアルタイム PCR により、ブドウの病原ファイトプラズマ（PP）と *Xylella fastidiosa*（XF）、および宿主遺伝子（18S）の同時検出が可能である（図１）。粗抽出試料が利用可能であり、PCR 反応自体は、機械にかけるだけで終了し、極めて迅速（1 時間弱）に結果が得られる。また、これまで個別に診断されてきた病原菌を同時に簡易診断できるので、検定作業の高効率化および省力化が図られる。従来法よりも、感度が高くて非特異は少なく、病徴での判断が難しかった病原菌を高感度に検出できる。18S を同時検出することで、抽出操作のミスや PCR エラーの有無も判断もできるため、結果の信頼性も高い。また、他の植物を宿主とする多種類の PP および XF をユニバーサル（網羅的）に検出できる技術となっており、ブドウ以外の植物の輸入検疫にも応用可能である。

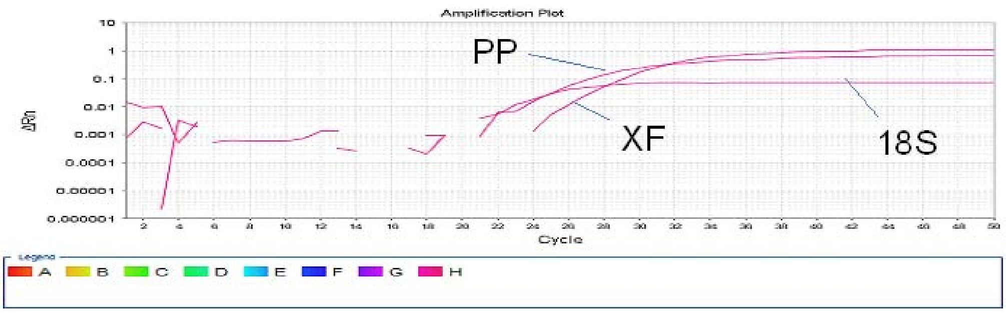
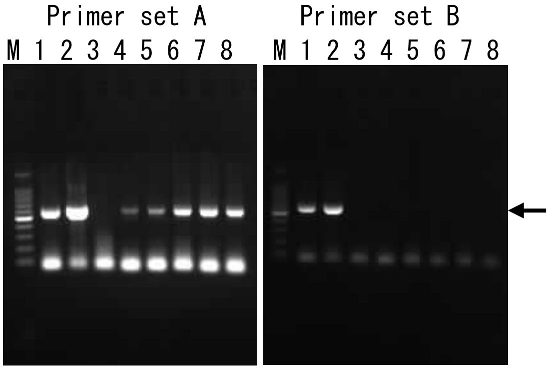


図１　TaqMan トリプレックス PCR によるファイトプラズマ（PP）、*Xylella fastidiosa*（XF）および宿主遺伝子（18S）の同時検出

※４:クロステロウイルス科に属する､ブドウ葉巻随伴ウイルス(GLRaV)は６種類(GLRaV-1～4、-7、-Ak）が知られ、各ウイルス種内に多様な変異株が存在することが知られている。そこで、GLRaV の共通配列を基にして、GLRaV-1、-3、-7、-Ak を検出できるプライマーセットＡと、GLRaV-2、-4 を検出できるプライマーセットＢをそれぞれ設計した。これらを利用してワンステップ RT-PCR（OneStep RT-PCR Kit: QIAGEN）を行ったところ、従来のエライザ法やRT-PCR 法では検出できない系統も含めてGLRaV の全種類を検出できることが示された（図２）。

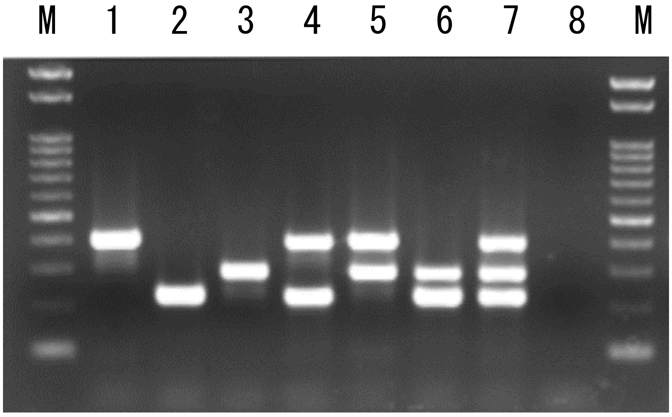


M：Marker
1：GLRaV-4/GLRaV-7
2：GLRaV-3/GLRaV-4/GLRaV-7/GLRaV-Ak
3：Healthy
4-6：GLRaV-3
7：GLRaV-1
8：GLRaV-3

矢印の位置にウイルス由来の増幅断片を確認できる

図２　プライマーセットＡ（GLRaV-1, -3, -7, Ak 用）とプライマーセットＢ（GLaV-2, -4 用）を用いたGLRaV の検出

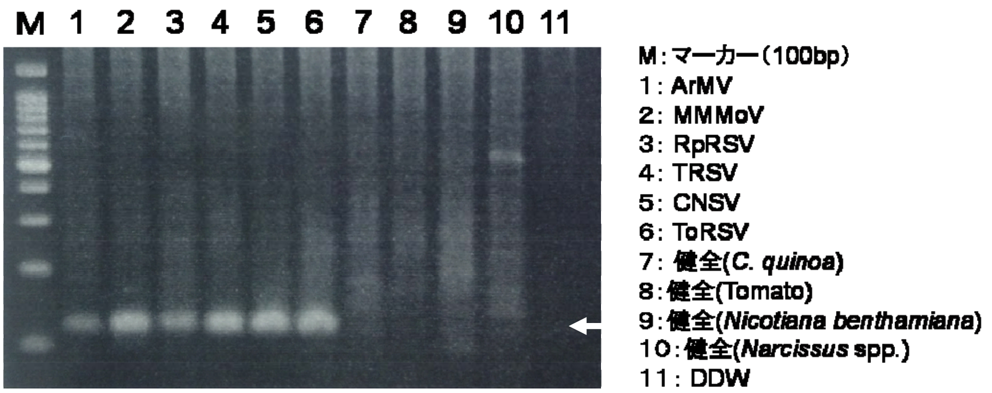
※５：遺伝子配列データベースにBSSVのものは登録されていなかったため、RT-PCRによる検出技術を開発するためBSSVのゲノム配列を解読する必要があった。そこで、BSSVが属するソベモウイルス属共通プライマーを設計し、BSSVゲノムに由来する塩基配列を解析した。得られた配列のうち、ソベモウイルス属の他のウイルスと比較し、保存性の高い領域に複数のPCR用プライマーを設計し、ワンステップRT-PCRによる検出に適する複数のプライマーペアを選抜した。その他の2種の検査対象ウイルスについては遺伝子配列データベースに登録されている配列を使い、それぞれ保存性の高い配列あるいは領域に対して複数のプライマーペアを設計し、ワンステップRT-PCRに適した複数のプライマーペアを選抜した。選抜したプライマーペアを組み合わせて一度のワンステップRT-PCRで３種ウイルスを同時検出できるかどうか検討し、最終的なプライマーペアの組み合わせおよび反応条件を決定した。本法を用いることによって効率的な検査法がなかったBSSVの高感度検出が可能となり、加えてBSSVを含む侵入警戒ウイルス３種を同時に検査できる（図３）。



1：BSSV
2：BlShV
3：BlScV
4：BSSV＋BlShV
5：BSSV＋BlScV
6：BlScV＋BlShV
7：BSSV＋BlScV＋BlShV
8：健全試料
M: マーカー

図３　ブルーベリー3種ウイルスのマルチプレックス RT-PCR による検出

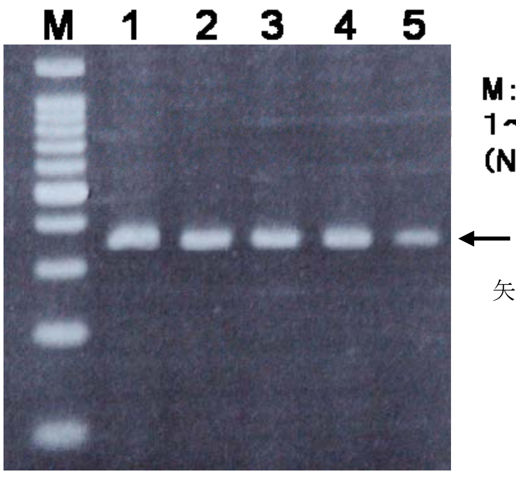
※６：ネポウイルスを網羅的に増幅するプライマーセットを設計するため、DDBJ/EMBL/NCBI に登録されているネポウイルスの配列を入手した。プライマーの設計に用いた配列数は、RNA1 では 44、RNA2 では 124 であった。共通プライマー設計ソフトウェアを用いてそれらの配列の保存性の高い領域を探索したところ、RNA1 の２領域が候補として選定された。それらの領域を基に１組のプライマーセットを設計した。その後､本プライマーセットを用いた検出に最適な RT-PCR 条件および試薬類を決定した。海外の研究者らが報告している従来の手法では、ネポウイルスのすべての種を検出することはできず、反応が認められたとしてもその再現性は乏しい。ところが、本研究で開発したプライマーを至適条件で反応させると、これまで困難だったネポウイルスの全てのサブグループ(A, B および C)の同時検出が再現性よく実施できた。これにより、植物検疫の検定業務で被検サンプルに潜在感染している RpRSV 等のネポウイルスを一括して検査できるようになった（図４)。



矢印の位置にウイルス由来の増幅断片を確認できる

図４　ネポウイルスユニバーサルプライマーを用いた各種ネポウイルスの検出

※７：ポティウイルス種共通プライマーの作製にあたり、既報の文献を探索したところ、既に多くの研究が報告されていた。それらの中から極めて再現性の高いプライマーセットが確立されていることを見出した（Zheng et al. 2010）。しかしながら、本研究が対象とするスイセン等の花き球根類における有効性は未評価だったため、罹病スイセンサンプルから抽出した核酸を基にそのプライマーを用いてRT-PCR法を実施した。その結果、スイセン罹病葉から抽出した核酸を用いても再現性良く検出できることが明らかとなった。したがって、その既報プライマーを用いた検査法が最適な検定法であることを検証した（図５）。



M：マーカー（100bp）
1～5：スイセン罹病株
（NYLSVおよびNDV感染）

矢印の位置にウイルス由来の増幅断片を確認できる

図５　ポティウイルスユニバーサルプライマーを用いた罹病スイセンからのウイルスの検出

２．中課題２：開発された検査技術の評価及びマニュアル作成

（１）全体計画の概要

工程表	進捗状況・成果
中課題１で開発した検査技術について、検出感度や精度等を評価し、中課題１へフィードバックする（小課題１関連)。(平成２６～２７年度）※８ ↓ 中課題１で開発した検査技術においてサンプリング法（時期や植物部位）等を十分に評価し、隔離栽培検査における迅速かつ効率的な検査技術として確定する（小課題１関連)。（平成２６～２７年度） ↓ 隔離栽培検査体系の中で利用可能な病菌検査技術としてマニュアル化を図る（小課題２関連)。(平成２７年度）※９	果樹類について試料調製法を検討した結果、簡易抽出試料がブドウおよびブルーベリーともに実用的に利用できることを確認した。（平成２６年度）（※１０、図６） 検査手順をまとめたマニュアル（案）を作成し、農林水産省横浜植物防疫所および神戸植物防疫所の隔離栽培担当官等による技術の試行を実施した。(平成２７年度）（※１１、図７～９） 試行の結果に基づいて花き球根類のネポウイルスの検査技術を改良し、これまでにない効率的な同時検出技術を開発した。（平成27年度）（※６、図４） ３年間の事業成果を検査マニュアルとして取りまとめ、平成27年度内に行政部局へ提示する予定。（平成２７年度）（※１２、図１０）
成果目標：開発した技術の検出精度や検出感度等を評価し、検査技術として植物防疫事業で利用可能なマニュアルを作成する。	

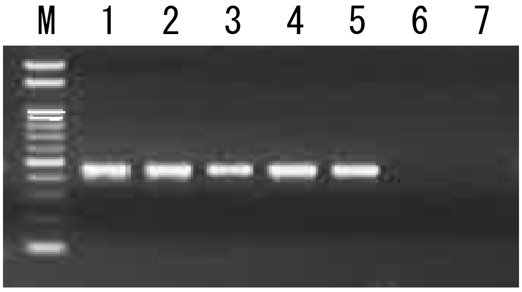
<計画の概要の補足>

※８：検査技術の評価項目については、研究課題運営チームと協議して決定することとし、植物検疫で求められる迅速かつ効率的な検査技術の開発を目指すものとした。

※９：マニュアルの作成にあたっては、その内容等について研究課題運営チームと協議しながら作業を進めることとした。

※１０:試料重の 20 倍のクエン酸バッファーで調製したニホンナシ(Apple stem grooving virus を保毒）の粗抽出液とブルーベリーおよびラズベリーの粗抽出液の混合液

（１：１あるいは１：４）からウイルスの検出を試みたところ、ブルーベリー・ラズベリーともに粗抽出液からの検出が可能であることが示された（図６）。



M: マーカー; 1: ニホンナシのみ; 2: ニホンナシ＋ブルーベリー（１：１）; 3: ニホンナシ＋ブルーベリー（１：４）; 4: ニホンナシ＋ラズベリー（１：１）; 5: ニホンナシ＋ラズベリー（１：４）; 6: ブルーベリーのみ; 7: ラズベリーのみ

図６　ブルーベリーおよびラズベリーの粗汁液からのウイルスの検出

※１１：本課題で開発した各検査技術についてマニュアル（案）を作成した。農林水産省横浜植物防疫所および神戸植物防疫所にて技術の試行ならびに検証を実施いただいた。その結果、ブドウのクロステロウイルス、ブルーベリーの３種ウイルスおよび花き球根類のポティウイルスの検査技術についてはマニュアルに示した方法と手順に従って作業することで問題なく検査できることが確認された。（図７～９）。

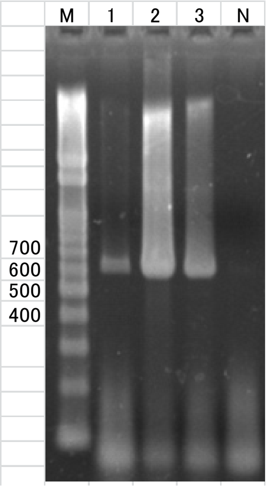


図７　ブドウのクロステロウイルス検査技術の試行結果

1, GLRaV1 感染ブドウ A
2, GLRaV3 感染ブドウ
3, GLRaV1 感染ブドウ B
M, 100bp ladder DNA maker
N, Negative control（滅菌水）

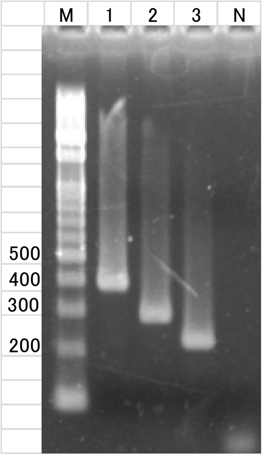


図８　ブルーベリー３種ウイルス検査技術の試行結果

1, BSSV 感染苗
2, BlScV 感染苗
3, BlShV 感染苗
M, 100bp ladder DNA maker
N, Negative control（滅菌水）

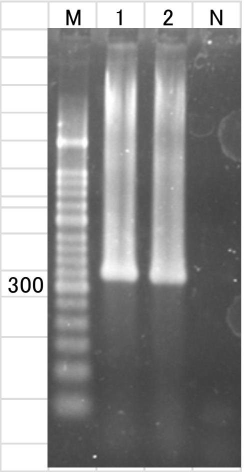


図９　花き球根類ポティウイルス検査技術の試行結果

1, スイセン核酸抽出物 A
2, スイセン核酸抽出物 B
M, 50bp ladder DNA maker
N, Negative control（滅菌水）

※１２：開発した検査技術の試行・評価により、検査マニュアル（案）（図１０）を修正、改良した。平成２８年３月２日に農林水産省担当官出席のもと推進会議を開催し、３年間の成果およびマニュアル（案）について検討し、最終的なマニュアルとしての取りまとめ方向を決定した。平成２７年度内にマニュアル完成版を提出する予定である。

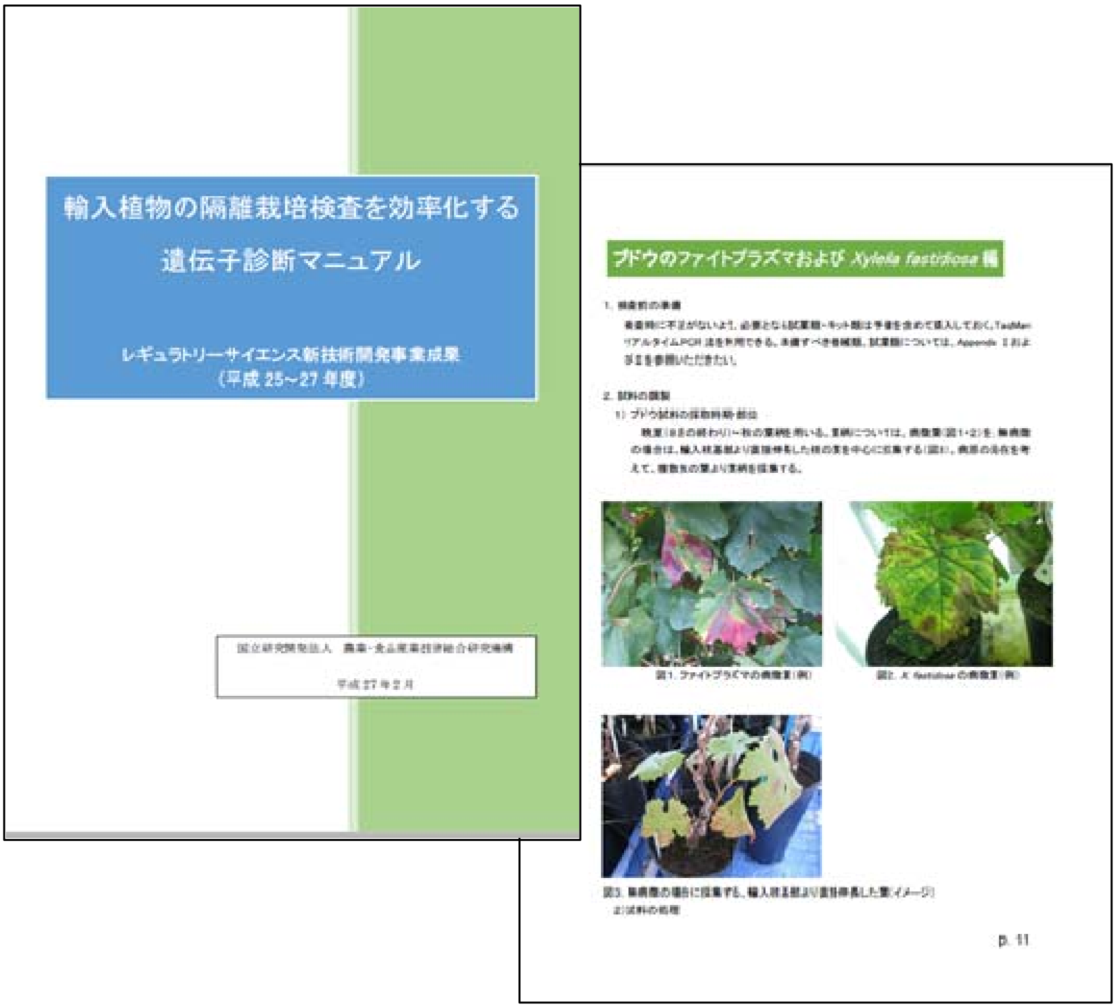


図１０　マニュアルの一部

Ⅲ．主要な成果

１．成果の内容

１）ファイトプラズマおよび *Xylella fastidiosa* の効率的検出法の開発

ファイトプラズマ（PP）と *X. fastidiosa*（XF）および宿主遺伝子の同時検出はこれまで報告が無く、本法が、世界初の技術である。また、複数種の PP および XF について、それぞれの共通配列に対するプライマーおよびプローブを設計しており、各病原菌をユニバーサル（網羅的）に検出できる。PP と XF ともに宿主範囲が広く、ブドウだけでなく、カンキツやナシ、モモなど、両者に感染する宿主も多い。また、世界的に分布が拡大しており、宿主によっては、無病徴感染した潜在的な伝染源も存在する。そのため、本法は、ブドウに限らず、他植物でも、植物検疫の場面で利用できると見込まれる。(p６～７)。

２）ネポウイルスの効率的検出法の開発

本法はネポウイルスのサブグループ共通配列に対してプライマーを設計しているため、既知３グループ(サブグループＡ，ＢおよびＣ)の網羅的検出が可能である。これまで３つのサブグループを一度に検出できる遺伝子検査法はなく、世界初の技術である。今後、本事業で開発したプライマー配列および検出法の特許を申請する予定であり、キット化等により検疫現場だけでなく種苗会社などへ広く普及することも見込まれる。(p８～９)。

３）輸入植物の隔離栽培検査を効率化する遺伝子診断マニュアル

本事業の成果として取りまとめた「輸入植物の隔離栽培検査を効率化する遺伝子診断マニュアル」は、本マニュアルに示した手順に従って作業することで、経験が少ない者でも対象ウイルスの検査が行えるよう工夫している。今後、植物防疫所において活用されることが見込まれる。(p１２)

２．成果の活用

現在のところ無し。ただし、植物防疫所における隔離栽培検査において活用されることが見込まれる。

Ⅳ．論文、特許等の実績及び推進会議の開催状況等

別紙のとおり

別紙

論文、特許等の実績及び研究推進会議開催状況等

試験研究課題名	隔離栽培検査体系の見直しのための高度な病害虫検査技術の開発

課題番号	（1）行政が活用しうる成果の有無	（2）学術論文数		（3）口頭発表回数		（4）出版図書数	（5）国内特許権等数		（6）国際特許権等数		（7）報道件数	物品購入の有無	研究推進会議等開催回数
		和文	欧文	国内	国際		出願	取得	出願	取得			
2508	有	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	有	7

※以下、（1）～（7）において、下線は平成27年度の実績

（1）行政が活用しうる成果

区分；①行政がすでに活用した成果、②行政が活用する目途がたった成果

区分	成果の内容	主な利用場面	活用状況	機関名
<u>②</u>	<u>輸入植物の隔離栽培検査を効率化する遺伝子診断マニュアル</u>	<u>植物防疫所における隔離栽培検査</u>	<u>果樹および花卉球根類の輸入植物検査への利用を検討中</u>	<u>国立研究開発法人農業･食品産業技術総合研究機構</u>
<u>①</u>	<u>Rubus属植物のウイルス診断技術</u>	<u>植物防疫所におけるウイルス検査</u>	<u>クロミラズベリーのBlackberry yellow vein-associated virusの検査に使用</u>	<u>国立研究開発法人農業･食品産業技術総合研究機構</u>

（2）学術論文

タイトル、著者名、学会誌名、巻、ページ、発行年月	機関名

（3）口頭発表

タイトル、発表者名、学会等名、発表年月	機関名
ブドウとカキが保毒する2種のクロステロウイルスとユニバーサルプライマーを用いたRT-PCRによる検出　伊藤隆男、中畝良二、須崎浩一、佐藤明彦　平成26年度日本植物病理学会大会、平成26年6月	農研機構果樹研究所
A novel ampelovirus from grapevine, and RT-PCR detection using universal primers for closteroviruses. 伊藤隆男、中畝良二　18th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG). 平成２７年９月	農研機構果樹研究所
A novel closterovirus from persimmon, and RT-PCR detection using mixed universal primers for closteroviruses. 伊藤隆男、須崎浩一、佐藤明彦　23rd International Conference on Virus and Other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops (ICVF). 平成27年６月	農研機構果樹研究所
TaqManリアルタイムPCRによるファイトプラズマとXylella fastidiosaの同時検出　伊藤隆男、須崎浩一　平成２７年度日本植物病理学会大会、平成２７年３月	農研機構果樹研究所

（4）出版図書

区分；①出版著書、②雑誌、③年報、④広報誌、⑤その他

区分	著書名、（タイトル）、著者名、出版社名、発行年月	機関名

（5）国内特許権等

特許権等の名称	発明者	権利者 （出願人等）	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日	機関名

（6）国際特許権等

特許権等の名称	発明者	権利者 （出願人等）	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日	機関名

（7）報道件数
区分；①プレスリリース、②新聞記事、③テレビ放映

区分	記事等の名称	掲載紙・放送社名	年月日	機関名	備考