

令和5年3月31日

安全な農畜水産物安定供給のための包括的レギュラトリーサイエンス研究推進
委託事業のうち短期課題解決型研究
研究成果報告書

課題番号：20320466

Tomato brown rugose fruit virus の多検体診断技術および防除技術の開発

研究期間：令和2年度～令和4年度（3年間）

研究総括者名：久保田 健嗣

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
植物防疫研究部門

＜別紙様式３＞最終年度報告書

１ 研究目的

Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV)は、トマトの重要病原体であり、海外で発生事例が相次いでいる。国内では未発生であるため、その国内侵入を未然に防止する、また、万一発生した場合の被害を最小限に食い止めるための技術が求められている。しかし、そのために必要なウイルスの生態の解明、および検出・診断技術、防除技術は極めて不十分であり、これらに関する研究開発を迅速に実施する必要がある。

このため、本研究では、

- １．宿主範囲等生物学的基礎情報の収集
- ２．ToBRFVの防除技術の開発
- ３．ToBRFVの検出技術の開発

により、

- １．宿主範囲、病徴進展の様相、種子伝染リスクおよびそのメカニズムを解明するとともに、
- ２．汚染種子、農機具、土壌等のウイルス不活化等防除技術
- ３．種子、植物体等からのRT-PCR法および血清学的手法によるウイルス検出技術、および多検体からの検出技術

を開発することを目標とする。

その結果、

- １．輸出入・国内検疫における措置内容決定等への貢献
- ２．植物防疫所等における検査業務への技術的貢献
- ３．病害虫防除所等における発生調査等への貢献
- ４．健全種苗の生産・流通への技術的な支援
- ５．被害の発生防止や被害圃場の早期回復を通じた生産者等への貢献

等が期待される。

2 研究内容

(1) 研究課題

1) 宿主範囲等生物学的基礎情報の収集（松下陽介・農研機構植物防疫研究部門）

本小課題では、国内未発生で生物学的基礎情報が乏しいToBRFVについて、海外から輸入したToBRFV株を接種することにより、トマトにおける病徴進展の様相の観察と記録を行うとともに、宿主範囲、種子伝染性の実態等に関する情報等を収集する。これらにより、万一被害が発生した際にいち早く発生を認識できるよう、情報を整備しておくとともに、トマトモザイクウイルス等他のナス科トバモウイルスと比較した種子伝染のリスク評価を行うことを目標とする。

(ア) 病徴進展、宿主範囲及び抵抗性打破能の調査

ToBRFVによる被害の発生を迅速に発見するため、日本の主要トマト品種にToBRFV株を接種し、茎葉及び果実における病徴を経時的に観察、記録する。タバコ等主要なウイルス検定植物へも接種し、接種葉及び全身病徴を記録する。ToBRFVの宿主範囲を把握するため、主要ナス科作物種や圃場周辺雑草となり得る植物種にToBRFVを接種し、感染の有無及び病徴を調査する。ナス科作物が有するトバモウイルス抵抗性遺伝子に対する打破能力を明らかにするため、トマトの *Tm-1*、*Tm-2*、*Tm-2⁺* 及びピーマン・トウガラシ類の *L¹*~*L⁴* 遺伝子を保有する品種に接種し、同様に感染の有無及び病徴を調査する。また、本課題では、小課題2及び小課題3で必要となる感染植物、汚染種子や汚染土壌の作製を行う。

(イ) 種子伝染性のメカニズム及び種子伝染率の調査

ToBRFVの種子を介した伝播の実態を解明するため、国内既発生 of ToMV 等トバモウイルスと比較しつつ、種子発達形成の過程におけるToBRFVの感染分布を明らかにして、種子汚染リスクを検証する。また、感染トマトを栽培して収穫した果実から種子を採取し、播種して、次世代個体の感染率及び発病率を明らかにする。

2) ToBRFVの防除技術の開発（久保田健嗣・農研機構植物防疫研究部門）

本小課題では、これまでにトバモウイルスに対して有効とされている防除技術を参考としつつ、ToBRFVの種子を介した圃場への侵入リスク、圃場内で器具等を介した感染株から非感染株への伝染拡大リスク、及び発生圃場での次作への土壌等を介した伝染のリスクを低減させるための技術を開発し、その効果を定量的に明らかにする。また、論文等により報告することを目指す。

(ア) 種子・器具におけるウイルス不活化条件の調査

実行課題1)-(イ)で作製したToBRFV汚染種子を用いて、第3リン酸ナトリウム溶液処理、乾熱処理等を行うことによる、ウイルス不活化条件の効果を調査する。同様に、圃場内でのほさみ等による感染拡大を防ぐため、器具に対する効果的なウイルス不活化処理条件を明らかにする。

(イ) 土壌中のウイルス不活化および弱毒ウイルスによる防除効果の検討

ToBRFV被害が発生した圃場を迅速に回復する技術を開発するため、ToBRFV汚染土壌を作製し、土壌中のウイルスを不活化するのに適した温度、水分量等条件を明らかにする。また、ToBRFVと同じく、トマトのトバモウイルスであるトマトモザイクウイルス (ToMV) の防除のために用いられてきた弱毒ToMV株 (ToMV-L₁₁A) を苗にあ

らかじめ接種することによる、ToBRFVに対する防除効果を明らかにする。

3) ToBRFVの検出技術の開発（大崎康平・農研機構種苗管理センター）

ToBRFVは種子伝染性であると推定され、日本国内への侵入は輸入種子による可能性が高いと考えられることから、ToBRFVの種子および植物体からの検出手法の開発が必要である。また、圃場で万一発生した場合には、ToBRFVであることを迅速に確定することが必要であり、その診断手法も求められる。そこで、RT-PCR法等核酸増幅による検出技術およびより多検体からの検出に適した血清学的検出技術を開発することを目標とする。

（ア）ToBRFV株の塩基配列情報の収集と解析

実行課題3)-(イ)でのToBRFVの検出技術の開発において、より高性能なプライマーの設計や抗血清の作製に資するため、各国で発生しているToBRFV株の塩基配列を収集・解析するとともに、他のナス科トバモウイルス等との配列比較等を行い、それらの情報を下記の実行課題に提供する。また、配列情報をデータベース化することにより、将来の検出技術の高度化に役立てる。

（イ）核酸増幅および血清学的手法によるウイルス検出技術の基盤構築

ToBRFVに対しては、International Seed Health Initiative (ISHI)によりリアルタイムRT-PCR法に基づく検出法が提案されているものの、その実効性は評価されていない。また、輸出入検査や国内生産地での発生に迅速に対応しうる、簡易で特異的な検出手法が求められている。そこで、ISHI法に加え、新たなプライマーを設計し、他のナス科トバモウイルス等との識別性も考慮しつつ、効果的なRT-PCR法を開発する。また、より多検体からの迅速な検出を可能とするため、ToBRFVに対して特異的に反応する抗体（ポリクローナル及びモノクローナル）を作製し、DAS-ELISA法等による検出技術を開発し、特異性や検出感度を明らかにする。

（ウ）種子等からのウイルス検出技術の開発と評価

実行課題3)-(ア)、3)-(イ)で開発された核酸増幅および血清学的手法による検出技術に基づき、実行課題1)-(ア)で作製された感染植物や汚染種子を用いて、これらサンプルからの検出技術を開発し、評価する。

（2）達成目標及び進捗目標

ToBRFVは2014年にイスラエルで初めて発生が確認されて以降、2020年現在までにヨルダン、ドイツ、ギリシャ、イタリア、オランダ、イギリス、スペイン、トルコ、メキシコ、アメリカ、中国での発生が確認されている。ToBRFVの種子伝染性について直接的なデータはないものの、トバモウイルス属ウイルスであることから、他のトバモウイルスと同様に種子伝染する可能性が高く、各国の植物検疫機関等では、輸入種苗を介した国内侵入を警戒している。未発生の日本においても、その侵入防止措置が検討されており、行政的な措置としては、農林水産省により、植物防疫法施行規則において、ToBRFVを検疫有害動植物（別表1）として規定するとともに、同じく別表2-2において全ての地域に対して輸出前の栽培の用に供しうるとがらし及びトマトの種苗について輸出前の精密検定の実施を要求している。

本研究では、ToBRFVの日本国内への侵入の阻止、及び万一発生したときの迅速な対処を可能にする、検出技術、防除技術の開発と、それを可能にするために必要な、ToBRFVの生物学的情報を収集する。

具体的な達成目標としては、

- 1) トマト（特に国内主要品種）における病徴進展に関する情報
- 2) 宿主範囲（ナス科作物、圃場周辺雑草種）の特定
- 3) トマト及びとうがらし類が保有するトバモウイルス抵抗性遺伝子に対する反応性の情報
- 4) 種子伝染リスクの評価（種子伝染率データ、種子形成過程のウイルス感染部位の特定）
- 5) 種子及び器具に対する消毒処理効果のデータ
- 6) 土壌中ウイルスの不活化条件に関するデータ
- 7) トマトモザイクウイルス弱毒株（ToMV-L11A株等）を用いた防除の有効性に関するデータ
- 8) RT-PCR法等核酸増幅手法による検出技術を1個以上開発
- 9) 血清学的手法による検出技術を1個以上開発
- 10) 多検体サンプル（特に種子）からのToBRFV検出技術を1個以上開発

を想定する。

（3）研究成果の行政施策・措置への貢献

トマトにおけるToBRFVの被害が報告されているイスラエルでは、2014年10月に1箇所の2圃場で確認されたのち、2016年11月には全国の圃場において発生が確認されている（文献1）。また、2018年10月に7箇所の圃場で発生したドイツでは、計25 ha（約50,000株）の撤去が行われるなど、多大の労力が費やされた（文献2）。万一日本国内で同様の被害発生やまん延が起きた場合には、日本のトマト出荷額約2,422億円（文献3）に対する経済的被害とともに、風評被害等も含め、生産地の産業及び経済にも大きな影響が生じるおそれがある。

農林水産省では、ToBRFVを植物防疫法施行規則の検疫有害植物（別表1）として規定するとともに、同じく別表2-2において全ての地域に対して輸出前の栽培の用に供しようとうがらし及びトマトの種苗について輸出前の精密検定の実施を要求している。

また、令和元年11月につくば市で開催された越境性植物病虫害国際研究促進ワークショップ(International Workshop on Facilitating International Research Collaboration on Transboundary Plant Pests)では、国際的に研究推進を進めるべき越境性病虫害の一つとしてToBRFVも取り上げられ、現在までの知見がまとめられているが、種子からの検出法や圃場でのモニタリング技術が不十分とされているほか、種子伝染性や消毒法に対する各国研究者の見解は一致しておらず、野外での宿主範囲等も含め、さらなる研究が必要とされている（文献5）。

本事業は、このように日本のみならず世界的に必要とされる知見の収集及び技術の開発に取り組むものであり、本事業によって得られた成果は、委託元である農林水産省に提供した上で、知的財産権となり得る成果については農林水産省と協議の上特許出願等を行う。また知的財産権とならない成果や特許出願済の成果については学術論文等により国際的な情報提供を行う。なお、新たに明らかになったToBRFVの宿主植物については植物防疫法施行規則別表2-2のリストに反映され、さらに開発された検出方法については行政機関等で利用可能となるように、農林水産省と連携を行う。

これらを通じて、トマト等種苗の輸入に伴うToBRFVの国内侵入リスクの軽減に資するとともに、万一国内で被害が発生した場合にも、農林水産省植物防疫所、都道府県病害虫防

除所等による迅速な発生の認識と拡大阻止、根絶宣言、及び圃場の回復による早期の再生産が可能となるなど、ToBRFVがもたらしうる社会的・経済的影響を最小限にとどめることに貢献する。さらに、種苗メーカー等による海外への種苗輸出の際に輸入国から求められる種苗の健全性の証明や消毒処理にも、本事業の実施により開発される検出技術等が活用されうることから、健全種苗の国際流通の円滑化にも大いに貢献できると考えられる。

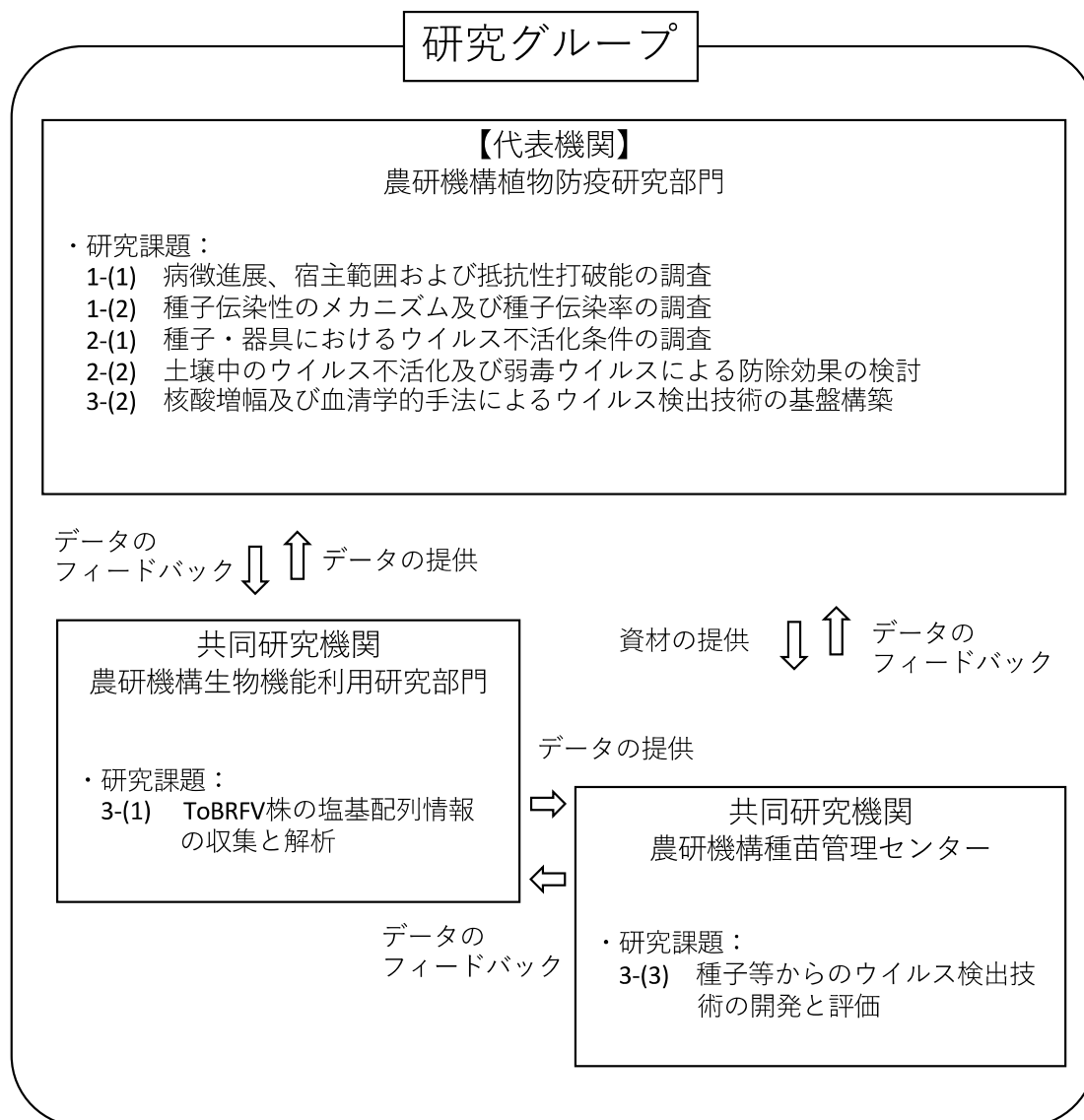
引用文献

1. Luria N et al. (2017) A new *Israeli Tobamovirus* isolate infects tomato plants harboring *Tm-2* resistance genes. PLOS ONE, 12:e0170429.
2. Julius Kühn-Institut (2018) First outbreak of Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) in Germany (North Rhine-Westphalia). Notification of the presence of a harmful organism. https://pflanzengesundheit.julius-kuehn.de/dokumente/upload/ToBRFV_pr2018-11NW.pdf
3. 農林水産省 (2019) 平成 29 年生産農業所得統計.
4. 農林水産省 (2020) 輸入検疫の対象となる病害虫および輸入植物検疫措置の見直し. https://www.maff.go.jp/j/syouan/keneki/kikaku/minaoshi_4ji.html
5. Ziebell H and Fox A (2020) Tomato brown rugose fruit virus. https://www.affrc.maff.go.jp/kokusaikenkyu/attach/pdf/transboundary_plant_pests_e_2019-8.pdf

(4) 年次計画

研究課題	研究年度		
	令2年度	令3年度	令4年度
1. 宿主範囲等生物学的基礎情報の収集			
(1) 病徴進展、宿主範囲及び抵抗性打破能の調査	← 宿主範囲、抵抗性打破能等の調査 →		
(2) 種子伝染性のメカニズム及び種子伝染率の調査	← 種子伝染性に関する調査 →		
2. ToBRFVの防除技術の開発			
(1) 種子・器具におけるウイルス不活化条件の調査	← ウイルス不活化条件の調査情報の収集 →		
(2) 土壌中のウイルス不活化及び弱毒ウイルスによる防除効果の検討	← 各要素技術の防除効果の検討 →		
3. ToBRFVの検出技術の開発			
(1) ToBRFV株の塩基配列情報の収集と解析	← 塩基配列情報の収集と解析 →		
(2) 核酸増幅及び血清学的手法によるウイルス検出技術の基盤構築	← ウイルス検出技術の基盤構築 →		
(3) 種子等からのウイルス検出技術の開発と評価	← ウイルス検出技術の開発と評価 →		

(5) 研究体制



(6) 実施体制

研究項目	担当研究機関・研究室		研究担当者	エフォート (%)
	機関	研究室		
研究総括者	農研機構植物防疫研究部門	基盤防除技術研究領域・越境性・高リスク病害虫対策グループ	◎ 久保田健嗣	20
1. 宿主範囲等生物学的基礎情報の収集	農研機構植物防疫研究部門	基盤防除技術研究領域・越境性・高リスク病害虫対策グループ	○ 松下陽介	5
(1) 病徴進展、宿主範囲及び抵抗性打破能の調査	農研機構植物防疫研究部門	基盤防除技術研究領域・越境性・高リスク病害虫対策グループ	△ 久保田健嗣 竹山さわな	前出 5
(2) 種子伝染性のメカニズム及び種子伝染率の調査	農研機構植物防疫研究部門	基盤防除技術研究領域・越境性・高リスク病害虫対策グループ	△ 松下陽介 久保田健嗣 竹山さわな	前出 前出 前出
2. ToBRFV の防除技術の開発	農研機構植物防疫研究部門	基盤防除技術研究領域・高リスク病害虫対策グループ	○ 久保田健嗣	前出
(1) 種子・器具におけるウイルス不活化条件の調査	農研機構植物防疫研究部門	基盤防除技術越境性・高リスク病害虫対策グループ	△ 松下陽介 久保田健嗣 竹山さわな	前出 前出 前出
(2) 土壌中のウイルス不活化及び弱毒ウイルスによる防除効果の検討	農研機構植物防疫研究部門	基盤防除技術研究領域・高リスク病害虫対策グループ	△ 久保田健嗣 竹山さわな	前出 前出
3. ToBRFV の検出技術の開発	農研機構種苗管理センター	試験・検査部・種苗検査課	○ 大崎康平	5
(1) ToBRFV 株の塩基配列情報の収集と解析	農研機構生物機能利用研究部門	作物生長機構研究領域作物病害制御機構グループ	△ 石橋和大	5
(2) 核酸増幅及び血清学的手法によるウイルス検出技術の基盤構築	農研機構植物防疫研究部門	作物病害虫防除研究領域・生物的病害虫防除グループ	△ 富高保弘 松山桃子	5 5
(3) 種子等からのウイルス検出技術の開発と評価	農研機構種苗管理センター	試験・検査部・種苗検査課	△ 篠坂 響 大崎康平	5 前出

- (注1) 研究総括者には◎、小課題責任者には○、実行課題責任者には△を付すこと。
(注2) 代表機関及び共同研究機関並びに研究総括者の変更を行う必要が生じた場合はその理由を明記した書面を添付すること。

(7) 各年度の研究費

令和2年度	6, 500, 000円
令和3年度	6, 199, 703円
令和4年度	5, 850, 000円

3 研究推進会議の開催状況 別添のとおり。

4 研究成果の概要（別紙参照）

（1）主な成果

1） 成果の内容

- ・小課題（1）「宿主範囲等生物学的基礎情報の収集」においては、トマト品種 19 品種に対して接種試験をおこない、トマトの *Tm-1* をホモで保有する品種は抵抗性を示すものの、*Tm-1* ヘテロおよび *Tm-2* ホモ、*Tm-2* のヘテロおよびホモ品種では、抵抗性は認められなかった。また、国内トマト品種における病徴進展を観察、記録し、葉には明瞭なモザイクを生じることを観察したが、試験した範囲ではすべての品種で、海外で報告されているような果実でのえそ・変色等の症状の発生は認められなかった。ピーマン・トウガラシ類が保有する抵抗性遺伝子に対しては、7 品種に対する接種試験の結果、*L*¹～*L*⁴いずれも有効であると判断された。ナス科作物・雑草等における宿主範囲の調査の結果、ジャガイモには全身感染しなかったが、ナスや多くのナス科雑草には全身感染性を有した。このうちナスは、ToBRFV その他トバモウイルスに対する抵抗性を有すると考えられる品種の存在を明らかにした。

また、ToBRFVの種子伝染について、トマト感染個体における花芽の組織免疫染色により、種子形成過程におけるToBRFVの局在を可視化し、少なくとも種子の胚には感染していないことを明らかにした。トマトモザイクウイルス（ToMV）でも同じ結果であった。抵抗性がないトマト品種、または*Tm-2a*型トマト品種のToBRFV感染トマト株から採取した種子は、ほぼ100%からウイルスが検出されたが、発芽させた個体では、両品種とも約5%の株が感染し、抵抗性の有無で差は認められなかった。ToMV感染トマト株から採取した種子で同様の試験を行った結果（抵抗性のない品種のみ）、12.5%の感染株率となり、ToBRFVの種子伝染率はToMVよりも低い結果となった。このほか、ナスおよびイヌホオズキ、アメリカイヌホオズキToBRFV全身感染個体から採取した種子からの発芽個体の感染状況を調査したが、調査した範囲で種子伝染は確認されなかった。

- ・小課題（2）「ToBRFVの防除技術の開発」においては、小課題（1）で作製したToBRFV汚染トマト種子を用いた調査の結果、有効塩素濃度2.5%以上の次亜塩素酸ナトリウム溶液または5%リン酸3ナトリウム処理により、発芽個体の感染株率は無処理での約5%から0となり、また、個々の種子の摩砕液を*Nicotiana glutinosa*に接種することにより感染性のあるウイルスを検出すると、無処理では多数の局部壊死斑を生じたが、両薬剤処理ではともに局部壊死斑を生じなかった。一方で、RT-PCR検定では依然として陽性となる種子の存在が確認された。ToBRFV汚染器具に対する薬剤を用いた消毒効果では、台所用漂白剤（次亜塩素酸ナトリウム濃度1%以上）、1%消石灰溶液、または5%リン酸3ナトリウム溶液で1時間処理することで、高い消毒効果が得られることが確認された。

土壌中のウイルス不活化効果については、牛糞堆肥または土壌病害虫薬剤であるカーバム剤によるウイルス不活化促進効果の確認を試みたが、土中のウイルス残存量の評価は困難であった。ただし、カーバム剤の精製ウイルス粒子に対する不活化効果が確認できたことから、農業資材等のウイルスの不活化に応用できる可能性が見出された。弱毒ウイルスを用いた防除効果試験では、ToMV-*L*_{11A}株を感染させたトマト苗に対するToBRFVの感染抑制または発病抑制を評価したが、無接種と比較してまったく差がなく、効果がないと判断され

た。

- ・小課題（３）「ToBRFV の検出技術の開発」においては、まず、RT-PCR による検出のためのプライマーを新たに設計・選抜し、検出感度および他のトバモウイルスとの識別性が良好であることを確認した。

また、トマト種子からの安定的な RNA 抽出法を確立するとともに、本法を用いた場合の適正なサブサンプルサイズおよび検出精度を確認した。

さらに、血清学的検出法の開発も進め、これまでに得られた抗 ToBRFV ポリクローナル抗体を用いた DAS-ELISA 法では、トマト葉サンプル中の ToBRFV を検出できたとともに、市販の ToBRFV 検出用 DAS-ELISA 試薬よりも、高い特異性を有すると考えられた。また、抗 ToBRFV モノクローナル抗体を用いた間接 ELISA では、ToBRFV に高い特異性を示すことが明らかとなった。

トマト種子からの ToBRFV 検出については、コンベンショナル RT-PCR およびリアルタイム RT-PCR では 1 サブサンプル当たり 1000 粒の中に汚染種子 1 粒（ToBRFV 精製粒子 50 pg 含有）が混入している試料から、抗体を利用した DAS-ELISA 法では 1 サブサンプル当たり 100 粒の中に汚染種子 1 粒（ToBRFV 精製粒子 1 μg 含有）が混入している試料から、さらに、国際標準法に基づく接種検定法では 1 サブサンプル当たり 200 粒の中に汚染種子 1 粒（ToBRFV 精製粒子 10 μg 含有）が混入している試料から ToBRFV を検出できることを確認した。

以上から、各検出法の性能を確認することができたので、これらの検証結果をもとに種子等からの ToBRFV 検出プロトコル案を作成した。

2) 成果の活用

- ・小課題（１）で得られたトマト品種における病徴進展の様相の情報は、万一国内のトマト圃場において ToBRFV が発生した場合に、いち早く感染を発見し、被害を最小化することにおいて有益である。また、トマト、トウガラシにおける抵抗性遺伝子の有効性の情報は、ToBRFV の発生後に作付け可能な品種の選定に活用できる。また、ナスにおいて新たに ToBRFV を含むトバモウイルスに有効な抵抗性遺伝子の存在が示唆され、本遺伝子を活用した抵抗性育種が期待できる。

これまで ToBRFV の発生が報告されたトマト、トウガラシ以外のナス科作物（ナス、ペチュニア、ホオズキ、ペピーノ等）においても、全身感染することが確認され、その病徴とともに、国内侵入経路として警戒すべき作物が明らかになった。さらに、ナス科雑草にも幅広い種で感染性を有することから、発生圃場等の周辺で優先的に除去すべき植物種の選定に活用できる。また、タバコ等、ウイルス検定に用いられる植物種における感染性と病徴を明らかにしたことから、接種検定での ToBRFV の診断に活用できる。

- ・小課題（２）で得られた、種子および器具における ToBRFV の不活化に有効な薬剤処理法は、トマト等種子におけるウイルスの拡散リスクの低減に有効である可能性があるとともに、発生圃場での器具を通じた圃場内外への拡散の防止、あるいは予防に活用できると考えられる。弱毒ウイルス ToMV-L1A が無効であることが明らかとなり、他の防除法が必要であると考えられた。土壌中のウイルス不活化効果の開発は本プロジェクトでは十分な結果は得られていないが、薬剤による不活化等の効果を踏まえ、他のトバモウイルス種と大きな物理的、化学的特性の違いはないと考えられ、これまでに他のトバモウイルスで開発された技術は応用可能と考えられる。

・小課題（３）で得られた種子等からの ToBRFV 検出法については、まずは日本国への当該ウイルスの侵入を未然に防ぐため、植物防疫所での利用が見込まれる。また、万一侵入した場合における早期発見・診断のために各都道府県の防疫所や検査機関等への導入も可能である。

さらに、本事業においては、遺伝子解析法や血清学的手法など、複数の検出法を開発しているため、現場の設備や技術レベル、また、葉や種子等の検出対象などに合わせた手法を選択、導入することも可能である。

（２）各研究課題の成果

１）小課題名：宿主範囲等生物学的基礎情報の収集

（ア）研究目標

本小課題では、国内未発生で生物学的基礎情報が乏しいToBRFVについて、海外から輸入したToBRFV株を接種することにより、トマトにおける病徴進展の様相の観察と記録を行うとともに、宿主範囲、種子伝染性の実態等に関する情報等を収集する。これらにより、万一被害が発生した際にいち早く発生を認識できるよう、情報を整備しておくとともに、トマトモザイクウイルス等他のナス科トバモウイルスと比較した種子伝染のリスク評価を行うことを目標とする。

（イ）研究内容

実行課題（１）病徴進展、宿主範囲及び抵抗性打破能の調査では、ToBRFVによる被害の発生を迅速に発見するため、日本の主要トマト品種にToBRFV株を接種し、茎葉及び果実における病徴を経時的に観察、記録する。タバコ等主要なウイルス検定植物へも接種し、接種葉及び全身病徴を記録する。ToBRFVの宿主範囲を把握するため、主要ナス科作物種や圃場周辺雑草となり得る植物種にToBRFVを接種し、感染の有無及び病徴を調査する。ナス科作物が有するトバモウイルス抵抗性遺伝子に対する打破能力を明らかにするため、トマトの *Tm-1*、*Tm-2*、*Tm-2'*及びピーマン・トウガラシ類の *L¹~L⁴* 遺伝子を保有する品種に接種し、同様に感染の有無及び病徴を調査する。また、本課題では、小課題2及び小課題3で必要となる感染植物、汚染種子や汚染土壌の作製を行う。

実行課題（２）種子伝染性のメカニズム及び種子伝染率の調査では、ToBRFVの種子を介した伝播の実態を解明するため、国内既発生のToMV等トバモウイルスと比較しつつ、種子発達形成の過程におけるToBRFVの感染分布を明らかにして、種子汚染リスクを検証する。また、感染トマトを栽培して収穫した果実から種子を採取し、播種して、次世代個体の感染率及び発病率を明らかにする。

（ウ）研究結果

実行課題（１）「病徴進展、宿主範囲及び抵抗性打破能の調査」では、一連の植物に対する接種試験を行い、病徴の観察とともに、上位葉のRNAを抽出し、ToBRFV特異的プライマー（引用文献5）を用いたコンベンショナルRT-PCRにより、感染の有無を調査した。まず、トマトのトバモウイルス抵抗性遺伝子（*Tm-1*、*Tm-2*、*Tm-2'*）を有する標準品種9品種に対する接種試験において、*Tm-1*をホモで有するGCR237を除き、全ての品種に全身感染して上位葉にモザイクを発症した。国内の標準的市販トマト品種に対する接種試験では、果実病徴まで観察した。*Tm-1*型または*Tm-2a*型市販トマト10品種すべてに全身感染し、明瞭なモザイクを生じた（図1）。果実には、海外で報告され

ているような、えそ、変色等の症状の発生はほとんど認められなかったが、品種鈴姫では、一部の果実に着色異常が認められた。ピーマン7品種のうち、*L*遺伝子保有品種では接種葉に局部壊死斑を生じて全身感染は阻止された（表1）。ナス9品種では、全身感染して上位葉の細かな波打ちや退緑斑点等を呈する8品種と、接種葉に局部壊死斑を生じて全身感染しない1品種に分かれた。ジャガイモの4品種には全身感染は認められなかった。その他のナス科作物、雑草では、全身感染およびモザイク等の発症が認められた（表1）。また、ウイルス検定植物である*Nicotiana*属植物への試験では、*Nicotiana benthamiana*に全身えそ、*N. tabacum* cv. Samsunにモザイク、*N. tabacum* cv. Xanthi nc、および、*N. glutinosa*、*N. rustica*、*N. sylvestris*には接種葉（および一部の接種株の上位葉）にえそ斑点を生じた。（表1）。



図1. Tm-2a型市販品種における葉のモザイク症状（上段）および果実（下段）（品種は左から麗夏、フルティカ、TY千果、鈴姫）。

表1. 接種試験による病徴および全身感染性調査結果（接種2週間後、上位葉）

種	品種（抵抗性）	病徴	RT-PCR （陽性/調査株数）
トマト	GCR26 (+/+)	モザイク、糸葉	5/5
	Rutgers (+/+)	モザイク	5/5
	GCR237 (<i>Tm-1/Tm-1</i>)	なし	0/5
	桃太郎 (<i>Tm-1</i> 型)	モザイク	5/5
	GCR526 (<i>Tm-2/Tm-2</i>)	モザイク	5/5
	GCR267 (<i>Tm-2^o/Tm-2^o</i>)	モザイク	5/5
	ハウス桃太郎 (<i>Tm-2a</i> 型)	モザイク	5/5
	麗夏 (<i>Tm-2a</i> 型)	モザイク	5/5
	フルティカ (<i>Tm-2a</i> 型)	モザイク	5/5
	TY 千果 (<i>Tm-2a</i> 型)	モザイク	5/5
	おどりこ (<i>Tm-1</i> , <i>2a</i> 型)	モザイク	5/5
	イエローミミ (<i>Tm-2a</i> 型)	モザイク	5/5

	サンチェリーピュアプラス (Tm-2a 型)	モザイク	5/5
	Micro-Tom (+/+)	なし	5/5
ピーマン	昌介 (+/+)	モザイク	5/5
	California Wonder (L^1/L^1)	なし	0/5
	Tabasco (L^2/L^2)	なし	0/5
	台パワー (L^3/L^3)	なし	0/5
	みおぎ ($L^3/+$)	なし	0/5
	L4 台パワー (L^3/L^4)	なし	0/5
	L4 みおぎ ($L^4/+$)	なし	0/5
ナス	黒秀ナス	退緑斑点	5/5
	筑陽	退緑斑点	5/5
	品種 A	なし	0/5
ジャガイモ	男爵薯	なし	0/5
	コナヒメ	なし	0/5
	コナフブキ	なし	0/5
	パールスターチ	なし	0/5
ハリナスビ	-	モザイク	5/5
野生種トマト	ポテモン	モザイク	4/5
ホオズキ	大実ほおずき	モザイク	5/5
ペチュニア	バカラ ホワイト	なし	3/5
イヌホオズキ	-	モザイク	2/5
アメリカイヌホオズキ	-	モザイク	5/5
オオイヌホオズキ	-	モザイク	5/5
ヒロハフウリンホオズキ	-	モザイク、糸葉	5/5
オオセンナリ	-	退緑斑点	5/5
ミナトアカザ	-	モザイク	5/5
<i>Nicotiana benthamiana</i>	-	全身えそ	5/5
<i>N. glutinosa</i>	-	なし	0/5
<i>N. tabacum</i>	Samsun	モザイク	5/5
<i>N. tabacum</i>	Xanthi nc	(えそ斑点)	5/5
<i>N. rustica</i>	-	なし	0/5
<i>N. sylvestris</i>	-	モザイク、全身えそ	4/5
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	-	なし	0/5
<i>C. quinoa</i>	-	(退緑斑点)	1/5

なお、表1に示した接种植物の病徴写真を別紙1にまとめて記載した。

実行課題（２）「種子伝染性のメカニズム及び種子伝染率の調査」では、種子伝染メカニズムの解明のため、令和2年度の試験において、閉鎖系ガラス温室でポット植

えにしたトマト苗（品種 Rutgers）にToBRFVまたはToMVを接種し、栽培した。各ウイルスの感染が確認され、モザイクを発症した個体から、花芽を採取し、組織切片作成用の固定液中で固定した。ToBRFVについてはRNAプローブを用いた*in situ*ハイブリダイゼーションにより、感染部位の可視化に成功した（図2）。開花ステージの子房では胎座や子房壁の維管束でのみ検出されたが、受粉後の種子発達段階においては、一部の胚珠の珠皮（＝将来、種皮になる組織）でシグナルが観察された。胚珠内部ではシグナルは確認されなかったことから、種子の段階ではToBRFVは胚や胚乳などには感染せず、種皮に存在している可能性が示された。対照区であるToMVにおいても同様の感染分布が観察された（データ略）。これより、両者の間で、生殖器官における感染分布に関して差はないと考えられた。

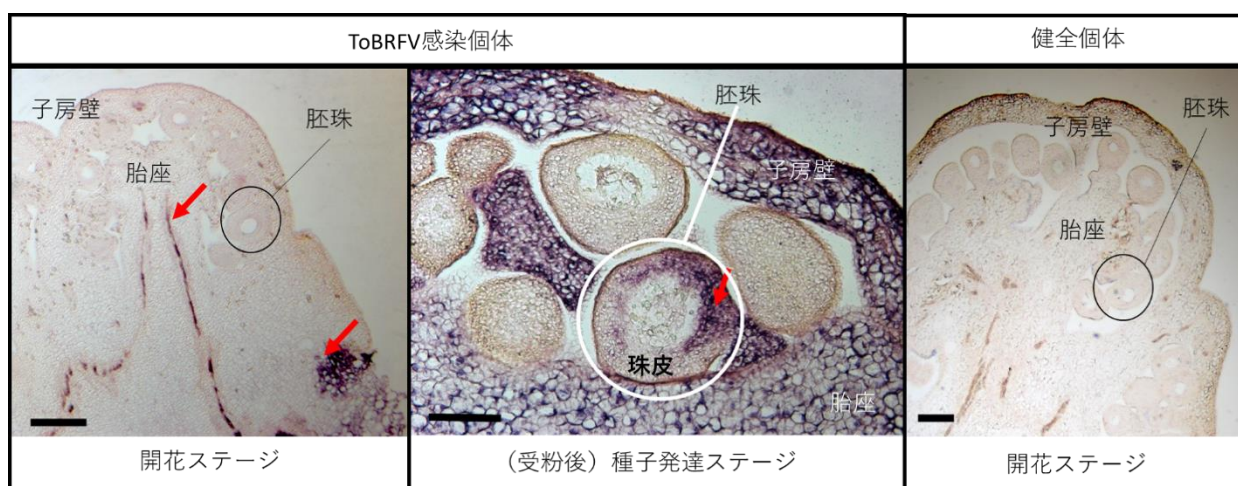


図2. トマト（品種 Rutgers）果実におけるToBRFVの感染部位。紫色シグナルは感染部位を示し、感染株では開花ステージでは維管束で、受粉後では胚珠の珠皮でシグナルが観察される。健全株ではシグナルは観察されない。スケールバーは200 μ m。

また、令和2年度に実行課題（1）で栽培したTm-2a型市販トマト3品種（麗夏、フルティカ、TY千果）および抵抗性遺伝子を持たないRutgersから、計約5,000粒の汚染種子を採種した。本汚染種子は、小課題3におけるToBRFVの検出技術の開発の試験に用いるとともに、種子伝染試験に供試した。ToBRFVの種子伝染率の比較対象として、トマトモザイクウイルス（ToMV）のL株を接種したRutgersからも汚染種子を採取した。

令和3年度の試験では、上記のToBRFV汚染種子のうち‘フルティカ’（Tm-2a型）、および別途採取したトマト品種‘Rutgers’（抵抗性なし）の汚染種子を播種し、発芽個体をポット苗に定植した。試験は一度に96株とした。発芽個体のうち、播種2～3週間後にモザイクや生育不良を生じる株が認められた（図3）。播種後約4週間で株の上位葉をサンプリングしてRNA抽出し、RT-PCRによる感染検定を実施した結果、発病個体と陽性個体は概ね一致した。ToBRFV-ILの種子伝染率（陽性株数/調査株数）は、品種Rutgersで5.6%、フルティカで4.6%となった（表2）。一方で、同じ条件で試験したToMV-Lの種子伝染率はRutgersで12.5%となり、ToBRFV-ILよりも有意に高い結果となった（表3）。よって、ToBRFVが近年世界に急速に拡散した要因として、他のトバモウイルスよりも種子伝染率が著しく高いため、という可能性は否定できるものと考えら

れた。



図3. トマト (Rutgers) 汚染種子発芽個体のToBRFV非感染株 (左) および感染株 (中, 右)

表2. ToBRFV-IL株汚染トマト種子の発芽個体の感染株率

品種 (抵抗性遺伝子)	試験	感染株数	調査株数	感染株率 (%)
Rutgers (+/+)	1	8	96	8.3
	2	5	96	5.2
	3	3	96	3.1
	計	16	288	5.6
フルティカ (<i>Tm-2^a</i> /+)	1	3	96	3.1
	2	6	96	6.3
	計	9	192	4.6

表3. ToMV-L株汚染トマト種子の発芽個体の感染株率

品種 (抵抗性遺伝子)	試験	感染株数	調査株数	感染株率 (%)
Rutgers (+/+)	1	18	96	18.8
	2	6	96	6.3
	計	24	192	12.5

さらにトマト以外の植物の種子伝染リスクを評価するため、ナス(黒秀ナス 紫彩)、イヌホオズキ、アメリカイヌホオズキのToBRFV全身感染個体から採取した汚染種子をトマトと同様に播種し、発病および上位葉の感染をRT-PCRにより調査した。ナス40株、イヌホオズキ65株、アメリカイヌホオズキ55株を調査した結果、感染個体は認められなかった。ただし、ナスの汚染種子は破碎液を*Nicotiana glutinosa*に接種すると、20粒中全粒が局部壊死斑を生じ、感染性を有するウイルス粒子を保持していることが確認され、中には100個以上の壊死斑を生じる種子も存在した。よって、ナスの種子がToBRFVの移動・拡散の媒体になりうることが示唆された。

(エ) 研究成果の活用における留意点

全身感染性の有無における試験結果について、全身感染が認められなかった種、品種においても、栽培環境や接種してからの時間経過によっては、感染する可能性が残されていることに留意する必要がある。

(オ) 研究目標の達成に当たっての問題点

当初計画を上回る品種数の病徴写真、種子伝染の調査等を実施した。一方で、国内トマト品種の果実においてほとんど症状が認められなかったことについては、品種特性によるものか、栽培環境によるものか等の解明が必要と考えられる。

<引用文献>

5. Alkowni R et al. (2019) Molecular identification of tomato brown rugose fruit virus in tomato in Palestine. J Plant Pathol 101:719-723.

2) 小課題名：ToBRFVの防除技術の開発

(ア) 研究目標

本小課題では、これまでにトバモウイルスに対して有効とされている防除技術を参考としつつ、ToBRFVの種子を介した圃場への侵入リスク、圃場内で器具等を介した感染株から非感染株への伝染拡大リスク、及び発生圃場での次作への土壌等を介した伝染のリスクを低減させるための技術を開発し、その効果を定量的に明らかにする。また、論文等により報告することを目標とする。

(イ) 研究内容

実行課題（１）「種子・器具におけるウイルス不活化条件の調査」では、実行課題1-(2)で作製したToBRFV汚染種子を用いて、第3リン酸ナトリウム溶液処理、乾熱処理等を行うことによる、ウイルス不活化条件の効果を調査する。同様に、圃場内でのほさみ等による感染拡大を防ぐため、器具に対する効果的なウイルス不活化処理条件を明らかにする。

実行課題（２）「土壌中のウイルス不活化及び弱毒ウイルスによる防除効果の検討」では、ToBRFV被害が発生した圃場を迅速に回復する技術を開発するため、ToBRFV汚染土壌を作製し、土壌中のウイルスを不活化するのに適した温度、水分量等条件を明らかにする。また、ToBRFVと同じく、トマトのトバモウイルスであるトマトモザイクウイルス（ToMV）の防除のために用いられてきた弱毒ToMV株（ToMV-L₁₁A）を苗にあらかじめ接種することによる、ToBRFVに対する防除効果を明らかにする。

(ウ) 研究結果

実行課題（１）「種子・器具におけるウイルス不活化条件の調査」では、ToBRFV感染トマト葉摩砕汁液で汚染し、乾燥させた使い捨てカミソリ刃を模擬的な汚染器具として（図4）、各種薬剤による不活化効果を評価した。各種薬剤液に一定時間浸し、水洗後、トマト株の主茎に切りつけることにより接種し、その後の感染株率を調査することにより、薬剤処理によるウイルスの不活化効果を評価した（表4）。台所用漂白剤（6倍希釈液）、5%リン酸3ナトリウム、1%消石灰で1時間処理することにより、高い不活化効果が認められた。一方、滅菌水、70%エタノールおよびオキシドール（2.5-3.5%過酸化水素水）には不活化効果は認められなかった（表4）。



図4. 作製した汚染カミソリ刃（左）によるトマト株への切りつけ接種痕（右）。切り付けは茎の裏側に同様にさらに5箇所計10箇所に行った。

表 4. ToBRFV 汚染カミソリ刃に対する各種薬剤処理による不活化効果

処理薬剤	処理時間	ToBRFV 陽性株数/調査株数 (%)
滅菌水	15 秒	20/20 (100.0)
	1 時間	23/23 (100.0)
70% エタノール	15 秒	29/30 (96.7)
2.5-3.5% 過酸化水素水	15 秒	20/20 (100.0)
	1 時間	20/20 (100.0)
台所用漂白剤 (60 倍希釈, ~0.1% NaClO)	15 秒	20/20 (100.0)
	1 時間	7/30 (23.3)
同上 (開封後約 1 ヶ月)	15 秒	10/10 (100.0)
	1 時間	3/19 (15.8)
台所用漂白剤 (6 倍希釈, ~1% NaClO)	15 秒	0/29 (0.0)
	1 時間	3/39 (7.7)
同上 (開封後約 1 ヶ月)	15 秒	5/10 (50.0)
	1 時間	1/18 (5.6)
5% リン酸 3 ナトリウム	15 秒	12/20 (60.0)
	1 時間	0/30 (0.0)
1% 消石灰	15 秒	11/20 (55.0)
	1 時間	0/30 (0.0)

次に、汚染器具において不活化効果が確認された薬剤を参考に、次亜塩素酸ナトリウム溶液（有効塩素濃度2.5%以上）および5%リン酸3ナトリウム溶液を用いて、汚染種子の消毒効果を調査した（表5）。未処理では感染株率が約5%となったのに対し、薬剤処理区では両薬剤とも0%となったが、次亜塩素酸ナトリウム溶液では発芽率の低下が観察された。

表5. 薬剤または乾熱処理による汚染種子のウイルス不活化効果

試験	処理区	種子汚染率 (RT-PCR)	種子汚染率 (生物検定)	14 日後 発芽率	感染株率
1	無処理	20/20	18/20	60/64	3/60
	次亜塩素酸ナトリウム 溶液 ¹ , 15 分	6/20	0/20	50/64	0/50
2	無処理	20/20	20/20	62/64	3/62
	5%リン酸3ナトリウム, 15 分	20/20	0/20	61/64	0/61
3 ²	無処理	11/20	19/20	63/64	5/62
	70℃, 24 時間	19/20	3/20	60/64	0/60
	80℃, 24 時間	19/20	2/20	0/64	–
4 ³	無処理	11/20	17/20	62/64	6/62
	70℃, 24 時間	20/20	2/20	62/64	0/62
	80℃, 24 時間	16/20	1/20	58/64	0/58

¹有効塩素濃度 2.5%以上。 ²予備乾燥なし。 ³予備乾燥実施（40℃, 3 日間）。

未処理種子または処理種子各20粒を1粒ずつ破碎して、生物検定を行うと、未処理では多数の局部壊死斑を生じる種子が認められたが、処理種子では両薬剤とも局部壊死斑を全く生じなかった。ただしRT-PCR検定では、未処理種子では全粒からウイルスが陽性となったのに対して、次亜塩素酸ナトリウムでは20粒中3～7粒、5%リン酸3ナトリウムでは全粒が陽性と判定されたことから（結果省略）、RT-PCR検定の結果と感染性の有無は必ずしも相関しないことが明らかとなった。

同様に、汚染種子の乾熱処理によるウイルス不活化効果を検討した。汚染トマト種子を70℃または80℃で24時間処理した後、各20粒を1粒ずつ破碎し、破碎液を *Nicotiana glutinosa* への接種に供試した。無処理種子では平均で42.7個（最多で約300個）の局部壊死斑が生じたのに対し、80℃では平均0.1個（1個の局部壊死斑様の斑点を生じたものが2粒、残り18粒は0個）、70℃では平均1.0個（12個、6個、1個、1個、他は0個）であったことから、70℃, 24時間では不十分であるが、80℃, 24時間であれば十分な不活化効果を示すと考えられた。また、RT-PCRでは、両処理区とも20粒中19粒が陽性となった。発芽率は、乾熱処理の前に予備乾燥をしなかった場合、80℃の処理区で0となってしまったが、予備乾燥を適切に行うことで、発芽率の低下はほぼ認められなくなった。感染株率は、未処理区で62株中5または6株の感染に対して、乾熱処理区はいずれも0株となり、不活化効果が確認された。

実行課題（2）「土壌中のウイルス不活化及び弱毒ウイルスによる防除効果の検

討」では、育苗培土をつめたポットでToBRFV感染トマトを約1年間栽培し、汚染土壌を作製した。この汚染土を、異なる含水比（46%（乾燥土），80.6%（適湿土），100%（過湿土））および温度（10℃，20℃，25℃，30℃，40℃）におき、一定期間経過後に、土壌中からウイルスを抽出し、ウイルス量をDAS-ELISA法での吸光値（および濃度既知の精製粒子により作製した検量線）に基づき、ウイルス量を定量する方法を検討した。健全土壌からはウイルスは検出されず、汚染土壌からは高い吸光値を生じるとともに、経時的にウイルス量が減少していく傾向が認められたが、処理区による減少速度の明瞭な差を見出すことはできなかった（図5）。

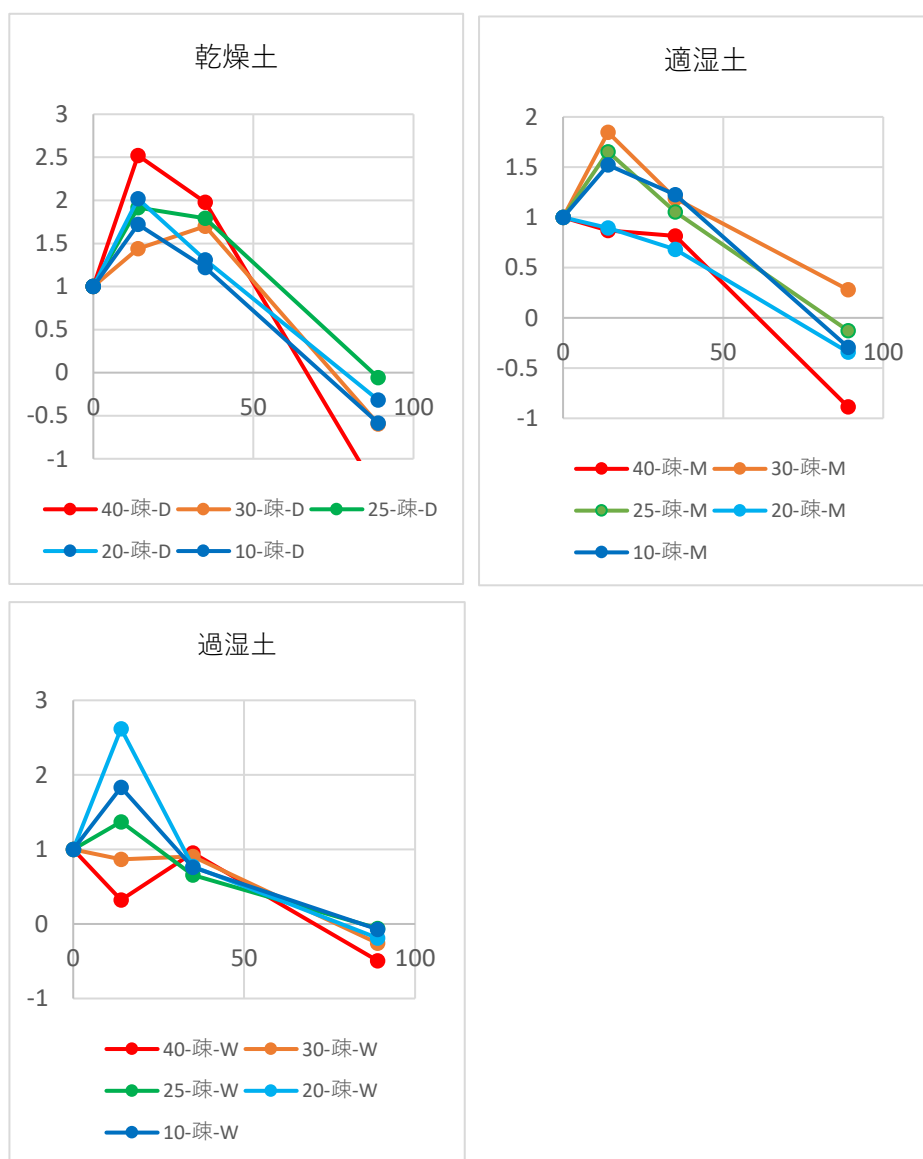


図5. 水分および温度条件によるウイルス不活化効果の影響。横軸は処理日数。凡例の数字は処理温度を示し、土を疎につめて、乾燥（D），適湿（M），過湿（W）においたことを示す。縦軸はDAS-ELISAの吸光値を、処理初日の値を1として相対値で示した。

DAS-ELISA法では不活化効果の評価が難しいと考えられたため、令和4年度は、土壌中のウイルスを抽出し、*Nicotiana glutinosa*への接種により生じる局部壊死斑の形成数を元に、ウイルス量の定量を試みた。また、処理区として、牛糞堆肥施用または土壌消毒等に用いられる農薬のカーバム剤（商品名 NCS、濃度50%）を設定した。育苗培土をつめたポットで栽培したToBRFV感染トマト苗から地上部を除去して、土と根を混和したのち、牛糞堆肥、NCS（3倍希釈液）、または水を加えて、28℃で12日間で保存した。処理後に土を良く攪拌して2 gを回収して、ウイルス抽出を行い、抽出液を*N. glutinosa*に接種した。しかしながら、土壌中から抽出サンプルでは、土壌中の何らかの成分が局部壊死斑の形成を阻害し、壊死斑数が少なかったため、この方法では処理区間の差の有無を検出することが難しく、さらに手法の改良が必要と考えられた。

次に、カーバム剤そのものにウイルス不活化効果がある可能性を想定し、ToBRFV-IL精製粒子（100 ng/μl）とNCS（原液、または3～100倍希釈液）を等量ずつ混合し、室温で1時間または2時間静置。ゲル濾過カラムにより低分子化合物を除去後、20 μlを*Nicotiana glutinosa*に接種し、接種葉に生じた局部壊死斑を観察した（図6）。水との混合と比較して、NCS30倍希釈液以上の濃度で明確な局部壊死斑数の減少が認められ、原液との混合（カーバム剤終濃度25%）では、局部壊死斑は形成されなかった。処理時間（1時間または2時間）では大きな差は認められず、不活化はより短時間で完了することが示唆された。

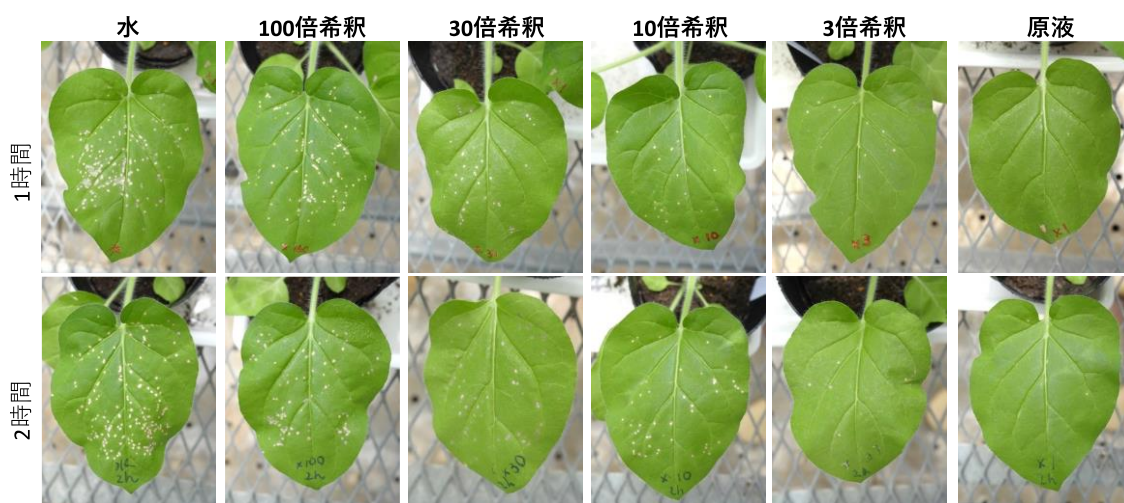


図6. ToBRFV精製粒子に対するカーバム剤（NCS）による不活化効果。NCS濃度が高いほど、局部壊死斑数が減少した。

また、弱毒ウイルスによる防除効果について、ToMVの弱毒株L₁₁Aを本葉2枚期のトマト苗（品種 Rutgers、抵抗性をもたない）に接種し、感染を確認後、ToBRFV精製粒子を機械接種して、その後の発病の観察および上位葉RNAサンプルのRT-PCRにより感染を調査した（表6）。L₁₁A非接種株では、3回の試験で合計24株中全株がモザイクを発症し、ToBRFV陽性となったが、L₁₁A接種株においても、合計26株中全株が同様に

ToBRFV陽性となったことから、ToMV-L₁₁Aを用いることによる防除は困難であると判断された。

表6. トマトモザイクウイルス弱毒株L₁₁Aの接種によるToBRFVに対する防除効果

試験 No.	結果 (ToBRFV 陽性株数/調査株数)			
	L ₁₁ A 非接種区		L ₁₁ A 接種区	
	ToBRFV 非接種	ToBRFV 接種	ToBRFV 非接種	ToBRFV 接種
1	n. d.	4/4	n. d.	6/6
2	n. d.	10/10	n. d.	10/10
3	0/10	10/10	0/9	10/10
計	0/10	24/24	0/9	26/26

(エ) 研究成果の活用における留意点

薬剤による器具・種子の消毒効果については、小規模な試験による結果であることを考慮し、実際に消毒が行われる場面に合わせて適用性を評価することが望ましい。土壌中のウイルス不活化については、本事業では実施できなかった圃場条件での試験実施も含めさらに検討が必要である。

(オ) 研究目標の達成に当たっての問題点

土壌中の不活化技術について、不活化効果を定量的に評価する手法の改良が必要である。ポット試験で行わざるを得ないこと、土壌中のウイルス量の評価が難しいこと、また、実際の圃場での次作での作付け時の感染リスクとの関係性の評価が困難であることなどの課題が明確になった。一方で、薬剤によるToBRFVの不活化効果試験等から、ToBRFVの物理的、化学的性質が他のトバモウイルスと大きく異なるわけではないと考えられ、他のトバモウイルスで開発された、残根の腐熟促進等による不活化法（引用文献6）は有効であると考えられる。また最近、海外では、ToBRFV汚染土壌に対してジクロロイソシアヌル酸ナトリウム等の処理の有効性が報告されており（引用文献7）、今後国内圃場への適用性評価等を進めることが適切かもしれない。

<引用文献>

- 宮崎県農業総合試験場編（2014）宮崎県のキュウリ産地のための脱臭化メチル栽培マニュアル。
https://www.affrc.maff.go.jp/docs/pdf/miyazaki_manual.pdf
- Dombrovsky A et al.(2022) Disinfection efficacy of tobamovirus-contaminated soil in greenhouse-grown crops. Horticulturae, 8:563.

3) 小課題名：ToBRFVの検出技術の開発

(ア) 研究目標

ToBRFVは種子伝染性であると推定され、日本国内への侵入は輸入種子による可能性が高いと考えられることから、ToBRFVの種子及び植物体からの検出手法の開発が必要である。また、圃場で万一発生した場合には、ToBRFVであることを迅速に確定することが必要であり、その診断手法も求められる。そこで、RT-PCR法等核酸増幅による検出技術およびより多検体からの検出に適した血清学的検出技術を開発することを目標とする。

(イ) 研究内容

実行課題（１）ToBRFV株の塩基配列情報の収集と解析では、実行課題3)-(イ)でのToBRFVの検出技術の開発において、より高性能なプライマーの設計や抗血清の作製に資するため、各国で発生しているToBRFV株の塩基配列を収集・解析するとともに、他のナス科トバモウイルス等との配列比較等を行い、それらの情報を下記の実行課題に提供する。また、配列情報をデータベース化することにより、将来の検出技術の高度化に役立てる。また、設計したプライマーによるトウガラシ微斑ウイルス（Pepper mild mottle virus, PMMoV）との識別性を評価する。

実行課題（２）核酸増幅及び血清学的手法によるウイルス検出技術の基盤構築では、RT-PCR法、リアルタイムRT-PCR法及びDAS-ELISA法によるToBRFVの検出技術を開発する。ToBRFVに対して、International Seed Health Initiative (ISHI)によりリアルタイムRT-PCR法に基づく検出法が提案されているものの（引用文献8）、その実効性は評価されていない。また、輸出入検査や国内生産地での発生に迅速に対応しうる、簡易で特異的な検出手法が求められている。そこで、ISHI法に加え、新たなプライマーを設計し、他のナス科トバモウイルス等との識別性も考慮しつつ、効果的なRT-PCR法を開発する。また、より多検体からの迅速な検出を可能とするため、ToBRFVに対して特異的に反応する抗体（ポリクローナル及びモノクローナル）を作製し、DAS-ELISA法による検出技術を開発し、特異性や検出感度を明らかにする。

実行課題（３）種子等からのウイルス検出技術の開発と評価では、実行課題3-(1)、3-(2)で開発された核酸増幅及び血清学的手法による検出技術に基づき、実行課題1-(1)で作製された感染植物や汚染種子を用いて、これらサンプルからの検出技術を開発し、評価する。

(ウ) 研究結果

実行課題（１）「ToBRFV株の塩基配列情報の収集と解析」では、令和２年度に63株、令和３年度に45株、令和４年度に6株の塩基配列情報を収集し、合計114株の塩基配列を得た。分離株間における塩基配列の差異はわずかであり、図6において配列の比較を分岐図として示した。塩基配列のばらつきには、採集地との多少の相関が見られた。また、令和２年度４月時点で報告されたToBRFVを含むトバモウイルスのCP配列（合計1502配列）のアラインメント結果ももとに、実行課題（２）において、令和２年度にToBRFVを検出するためのRT-PCR用プライマーを複数設計した（表7）。これらの中でトマトにおいてToBRFVの検出に有効だったもののうち、プライマーセットNAR02が標的とする塩基配列は、収集した全ての分離株で100%保存されていたことから、偽陰性を防ぐのに非常に有効と考えられた。

図8. ヒーマンからのToBRFVの検出

PMMoV検出用プライマー (P) はToBRFVを誤検出しているが、ToBRFV検出用プライマー (NAR02及びNAR0-A) は、アニーリング64-68°C、30サイクルの条件でToBRFV特異的な検出に成功した。

実行課題 (2) 「核酸増幅及び血清学的手法によるウイルス検出技術の基盤構築」での、核酸増幅手法についてはまず、実行課題 (1) でのToBRFVの配列解析結果に基づき、ToBRFV特異的プライマーを合計10セット設計した (表7)。

表7. 本研究においてToBRFV 検出に用いたプライマー

セット名 ¹	プライマー名	塩基配列 (5' - 3')	位置 ² (nt)	増幅長 (bp)	反応性
CaTa28	CaTa28 Fw	GGTGGTGTCACTGTCTGTTT	5159-5178	140	識別性弱い
	CaTa28 Rv	GCGTCCTTGGTAGTGATGTT	5298-5279		
NAR01	NAR01-F	省略	省略	省略	非特異反応有
	NAR01-R	省略	省略		
NAR02	NAR02-F	省略	省略	省略	良好
	NAR02-R	省略	省略		
NAR03	NAR03-F	省略	省略	省略	非特異反応有
	NAR03-R	省略	省略		
NAR04	NAR04-F	省略	省略	省略	非特異反応有
	NAR04-R	省略	省略		
NAR05	NAR05-F	省略	省略	省略	良好
	NAR05-R	省略	省略		
NAR06	NAR06-F	省略	省略	省略	非特異反応有
	NAR06-R	省略	省略		
NAR0-A	NAR0-A-F	省略	省略	省略	良好
	NAR0-A-R	省略	省略		
NAR0-B	NAR0-B-F	省略	省略	省略	非特異反応有
	NAR0-B-R	省略	省略		
NAR0-C	NAR0-C-F	省略	省略	省略	非特異反応有
	NAR0-C-R	省略	省略		
NAR0-D	NAR0-D-F	省略	省略	省略	非特異反応有
	NAR0-D-R	省略	省略		

¹ Cata28はISHIが公表しているプライマー、NAR01～6およびNAR0-A～Dは本研究で開発したプライマーである。

² ToBRFV-DSMZ PV-1241分離株 (アクセッション番号: MZ202349) の5' 末端からの位置を示す。同分離株にコードされる遺伝子及びその位置は、ORF1 (130 kDa protein): nt73-3423, ORF2 (180 kDa protein): nt73-4920, ORF3 (movement protein): nt4907-5707, ORF4 (coat protein): nt5710-6189。

これらと、ISHI-Vegが公表しているプライマーセットCata28 (ISHI-Veg, 2019)を用い、ワンステップRT-PCRによりToBRFV及びToMVの検出の有無を評価した。本評価には、トマトの健全葉またはToBRFVまたはToMVの感染葉から抽出したTotal RNAをサンプルとし、異なるアニーリング温度で実施した。PrimeScript II High Fidelity One Step RT-PCR kit (タカラバイオ社)及びRT-PCR Quick Master Mix (Toyobo社)を用いてRT-PCRを実施した結果、プライマーセットNAR02、NAR05及びNAR0-Aを用いた際に、非特異的増幅産物が少なく、アニーリング温度は55℃が最適であることが明らかとなった(データ非掲載)。さらに、ISHI標準プライマーセットCaTa28、プライマーセットNAR02、NAR05並びにNAR0-Aを用いてToBRFVの検出感度を評価したところ、プライマーセットNAR02及びNAR0-Aはいずれも0.01 ngまで検出できることを明らかにした(図9)。

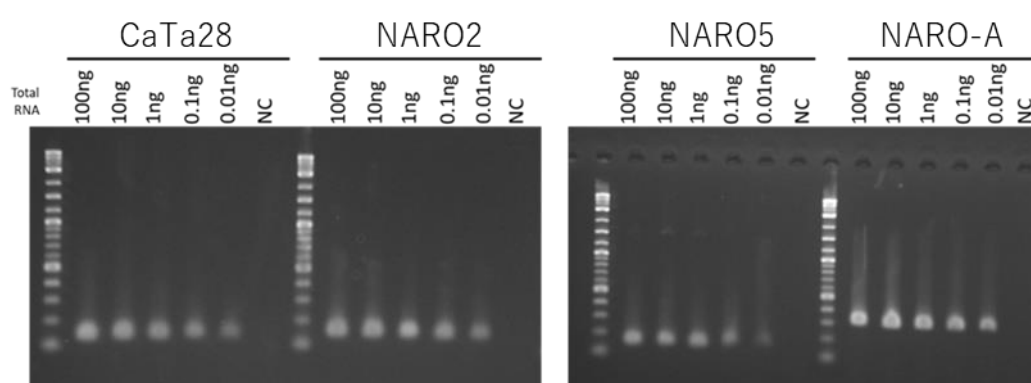


図9. 各プライマーセットによる検出感度の評価結果。各レーンは表示した量のToBRFV感染トマト葉の抽出RNA。NCは陰性対照(健全葉RNA, 100 ng)。

次に、ワンステップリアルタイムRT-PCRにより、ISHI標準プライマーセット(CaTa28)と本課題で開発したプライマーセット(NAR02、NAR05及びNAR0-A)を用いて特異的検出の有無を調査した。その結果、アニーリング温度60℃においてCaTa28はToBRFVだけでなく健全葉でも偽陽性を示したが、セットNAR02、NAR05及びNAR0-Aでは、ToBRFVのみを特異的に検出できた(図10)。最終的に、コンベンショナルPCR用にセットNAR0-A、リアルタイムPCR (SYBR Green) 用にセットNAR02を選定した。

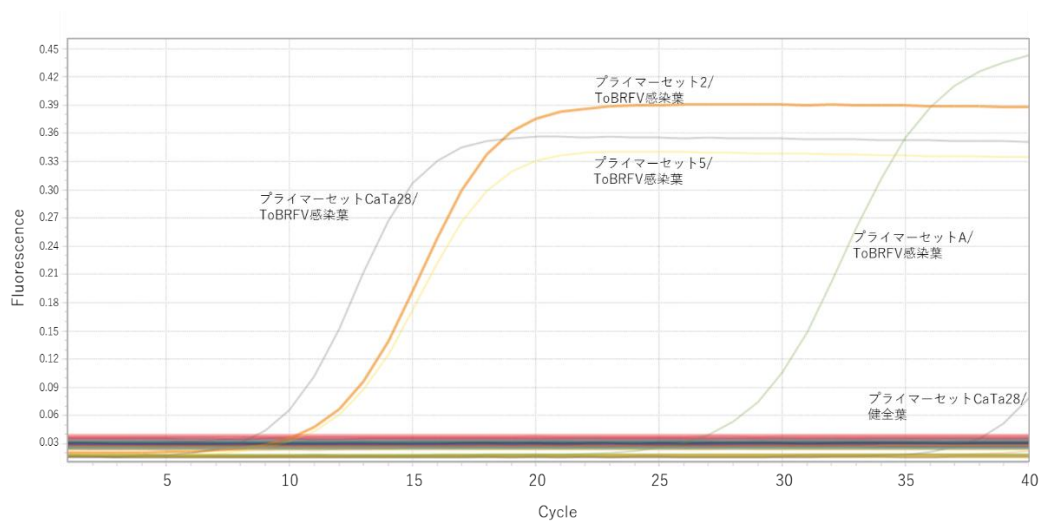
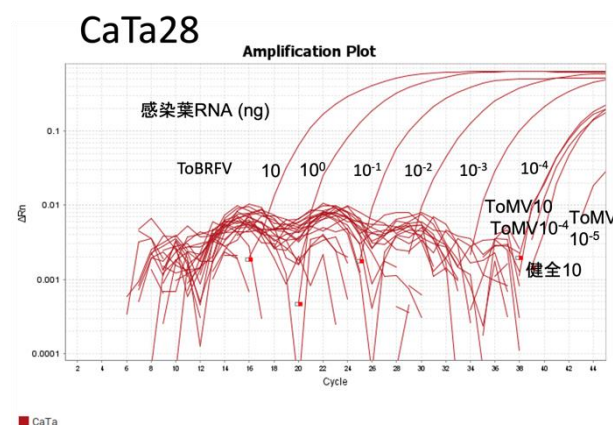


図10. リアルタイムRT-PCR (SYBR Green)法によるToBRFV、ToMV感染葉及び健全葉の識別性の評価結果。

トマト（品種Rutgers）の健全葉、ToBRFV感染葉、またはToMV感染葉のTotal RNAをサンプルとした。図に表示していないプライマー／サンプルの組み合わせからは、増幅は認められなかった（最下部の線）。

さらに、プライマーセットNAR05を用いて、TaqManプローブ法への適用性を評価した。それらプライマーが増幅する領域のなかにプローブを設計し、ToBRFV検出の有無を評価した。その結果、ISHI標準プライマーセット（CaTa28）とプローブを用いた際には、ToMV感染葉及び健全葉から抽出したRNAでも疑陽性が認められたが、一方でNAR05とプローブを用いた際には、ToBRFVだけを特異的に検出できた（図11）。



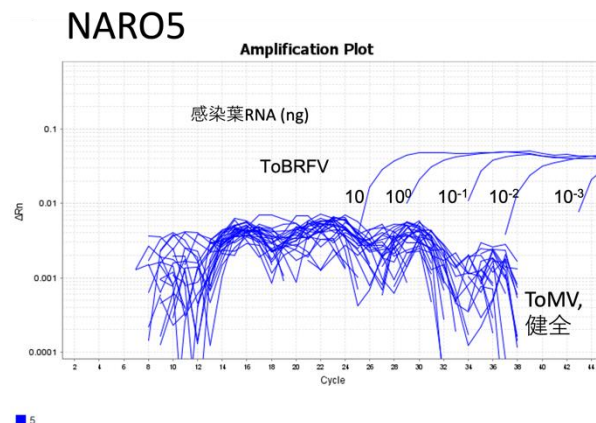


図11. リアルタイムRT-PCR (TaqManプローブ) 法によるToBRFV及びToMV感染葉並びに健全葉の識別性の評価結果。トマト (品種Rutgers) の健全葉、ToBRFV感染葉、またはToMV感染葉から抽出したTotal RNAをサンプルとした (図中の数値はtotal RNA量 (ng))。Cata28 (上図) と比較してNAR05 (下図) プライマーではToMVおよび健全株サンプルからは非特異反応が認められず、特異性により優れていた (最下部の線)。

さらに、本研究において開発したNAR02プライマーセットを用いたSYBR法とCaTa28プライマーセットとプローブを用いたTaqMan法の検出感度を比較した。その結果、TaqMan法と比較して、NAR02プライマーセットを用いたSYBR法は、検出に用いたすべてのRNA濃度においてCt値が小さく、より高感度でToBRFVを検出できると考えられた。

表8. ToBRFVが感染したトマト葉から抽出した全RNAを用いたリアルタイムRT-PCR法によるCt値の比較

リアルタイムRT-PCRの手法	プライマーセット	各RNA濃度におけるCt値				
		100ng	10ng	1ng	0.1ng	0.01ng
SYBR Green	NAR02	6.48	10.22	13.47	17.36	20.93
SYBR Green	CaTa28	6.41	9.92	13.07	16.95	20.96
TaqMan	CaTa28	12.23	14.32	18.23	22.26	26.82

血清学的手法の開発については、まず、ToBRFVのCP全長を大腸菌組み換えタンパク質として発現させ、ウサギ2羽に免疫して抗血清を得た。これら抗血清からIgG画分を精製した抗体 (以下、抗CP抗血清) を用いて、間接ELISA法で特異性と力価を評価した。その結果、いずれの抗CP抗体を用いた場合にもToBRFVとToMVに対する吸光値は高いことから感度は高いと考えられた。一方で、ToBRFVとToMVに対する吸光値は同程度であったことから、抗CP抗体はToBRFVとToMVの識別性は低いと考えられた (データ非掲載)。

次に、ToBRFVを特異的に認識する抗体を作製するため、ToBRFVとToMVのCPのアミノ酸配列を比較して、ToBRFV CPの中でうちToMVと配列が共通しない領域を選定し、ペプチド抗原として作製し、これをウサギに免疫して抗血清を得た。これら抗血清から

IgG画分を精製した抗体（以下、抗ペプチド抗体）、およびマウスに免疫してモノクローナル抗体（以下、抗ペプチドモノクローナル抗体）を得た。まず、抗ペプチド抗体の特異性と力価を、ToBRFVとToMVの精製粒子をサンプルとして間接ELISA法により評価した。その結果、1次抗体として抗ToBRFVペプチド抗体（以下、抗ペプチド抗体）を1000倍希釈で利用することにより、ToBRFVとToMVを識別できると考えられた（データ非掲載）。

次に、抗ペプチド抗体をアルカリフォスファターゼで標識したコンジュゲートを作製し、DAS-ELISA法を行った。同時に、市販のToBRFV診断用DAS-ELISAキット（Loewe社）と特異性を比較した。その結果、抗ペプチド抗体を用いたDAS-ELISA法は、市販のDAS-ELISAキットと比較して、ToBRFVに対する検出感度は同等以上であるが、ToMVに対する交叉反応は半分程度に抑えられることが明らかとなった（図12）。

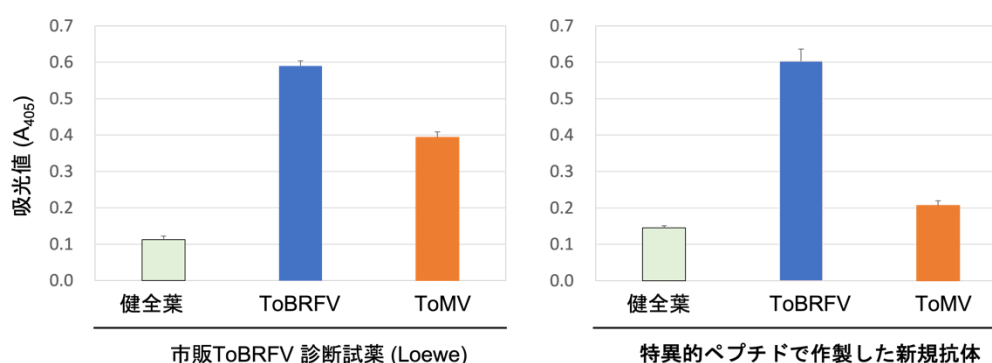


図12. 市販のToBRFV抗体（Loewe社）（左）および本研究で作製した抗ToBRFVペプチドモノクローナル抗体（右）により実施したDAS-ELISA法の結果。トマトの健全葉、ToBRFV感染葉及びToMV感染葉をサンプルとした。

さらに、抗ペプチドモノクローナル抗体について、ToBRFV、ToMVを含めナス科作物に発生するトバモウイルス7種の精製粒子に対して、間接ELISA法により、特異性を評価した。ToBRFVに対しては高い吸光値が得られ、反応性は良好であったが、ToMVからもその6割程度の吸光値を生じ、交叉反応していると考えられた。他の5種のトバモウイルスに対してはほとんど反応せず、識別が可能と考えられた（図13）。

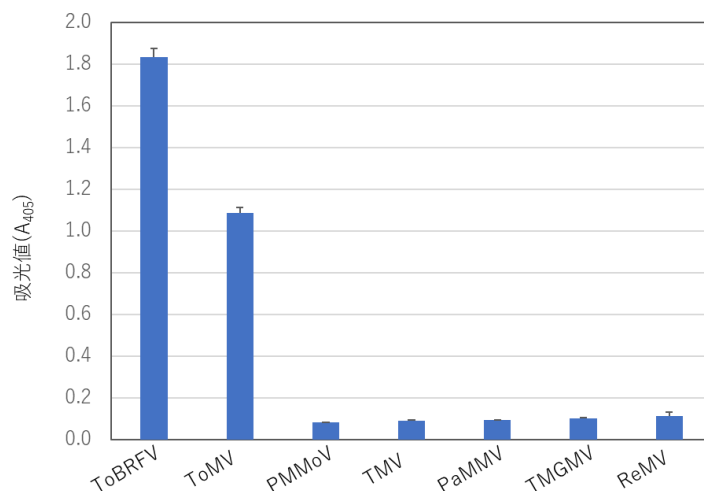


図13. 本研究で作製した抗ペプチドモノクローナル抗体により実施した間接ELISA法の結果。いずれのウイルスも精製粒子 (10 ng) をサンプルとした。

さらに、抗ペプチド抗体を用いて、発生圃場等現場での迅速診断が可能なrapid immunofilter paper assay (RIPA)法によりToBRFV感染葉からのウイルスの検出を試みたが、健全葉と同じ結果となり、検出技術としての確立はできなかった（データ非掲載）。

実行課題（3）「種子等からのウイルス検出技術の開発と評価」では、トマト種子の粉砕方法にビーズショッカー、シェイクマスター、ミルを選定した。また、種子からのRNA抽出方法については、カリウム-SDS法及び市販のRNA抽出キット「RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen社)」並びに「Viral Nucleic Acid Extraction Kit II (Favorgen社)」の標準プロトコルを、トマト種子粉砕物からRNAを抽出できるように最適化し、それぞれの手順書案を作成した。

次に、上記の粉砕方法及びRNA抽出法を用いて小課題1で作製されたToBRFV自然汚染種子からRNA抽出を試みた。また、その抽出RNAをサンプルとして、実行課題3-(2)で開発されたToBRFV検出用プライマー (NAR02及びNAR0-A) 及びRT-PCR Quick Master Mix (Toyobo社) を用いてRT-PCRを行った結果、本法により1サブサンプル当たり健全トマト種子400粒、500粒、または1000粒中に汚染種子1粒が混入している試料から当該ウイルスを検出できることが確認できた。

さらに、コンベンショナルRT-PCR (RT-PCR) 及びリアルタイムRT-PCRにおいて、サブサンプル内の汚染種子1粒に含まれるToBRFV粒子量と検出性の関係性を評価し、検出限界を調べた。

トマト品種 (中玉品種) にToBRFVイスラエル株 (ToBRFV-IL) を接種した株から採種した自然汚染種子、及び、トマト (大玉品種) に、所定の濃度のToBRFV精製粒子溶液 (10倍希釈系列) を滴下して、1粒あたり10 µg~100 µg、500 ng~0.5 fgの粒子を添

加した人工汚染種子を作製し、各評価試験に供試した。

① コンベンショナル RT-PCR 及びリアルタイム RT-PCR (SYBR Green 法)

1粒、400粒、500粒及び1000粒中の1粒の汚染種子がどの程度ToBRFVに汚染されている場合に、RT-PCR, RT-qPCRで検出できるかを評価した (図14, 15, 16, 17)。

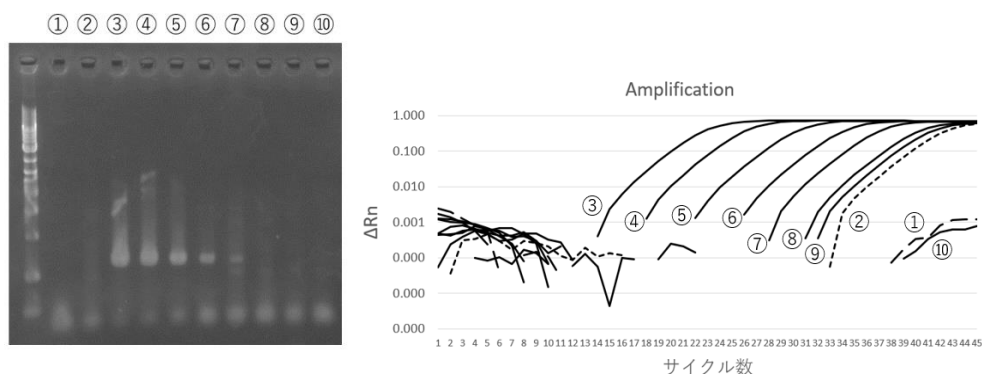


図14. 種子1粒から抽出した全RNAでのコンベンショナルRT-PCR産物の泳動像 (左) 及びリアルタイムRT-PCR (SYBR Green法) の増幅曲線 (右)

① : RNase-free water、② : 健全種子試料、③ : 5 ng人工汚染種子混入試料、④ : 500 pg人工汚染種子混入試料、⑤ : 50 pg 人工汚染種子混入試料、⑥ : 5 pg人工汚染種子混入試料、⑦ : 500 fg人工汚染種子混入試料、⑧ : 50 fg人工汚染種子混入試料、⑨ : 5 fg人工汚染種子混入試料、⑩ : 0.5 fg人工汚染種子混入試料

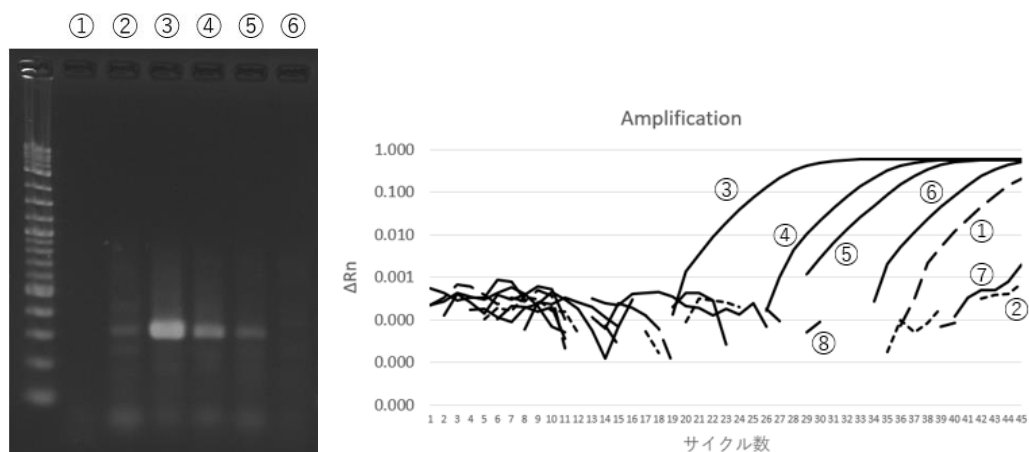


図15. 種子400粒から抽出した全RNAでのコンベンショナルRT-PCR産物の泳動像 (左) 及びリアルタイムRT-PCR (SYBR Green法) の増幅曲線 (右)

① : RNase-free water、② : 健全種子試料、③ : 自然汚染種子混入試料、④ : 500 pg人工汚染種子混入試料、⑤ : 50 pg人工汚染種子混入試料、⑥ : 5 pg人工汚染種子混入試料、⑦ : 500 fg人工汚染種子混入試料、⑧ : 50 fg人工汚染種子混入試料

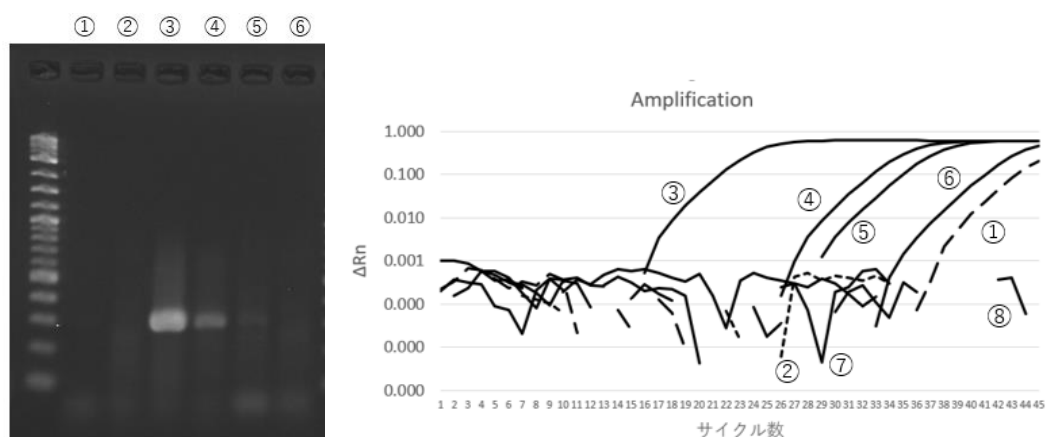


図16. 種子500粒から抽出した全RNAでのコンベンショナルRT-PCR産物の泳動像（左）及びリアルタイムRT-PCR（SYBR Green法）の増幅曲線（右）
 ①：RNase-free water、②：健全種子試料、③：自然汚染種子混入試料、④：500 pg人工汚染種子混入試料、⑤：50 pg人工汚染種子混入試料、⑥：5 pg人工汚染種子混入試料、⑦：500 fg人工汚染種子混入試料、⑧：50 fg人工汚染種子混入試料

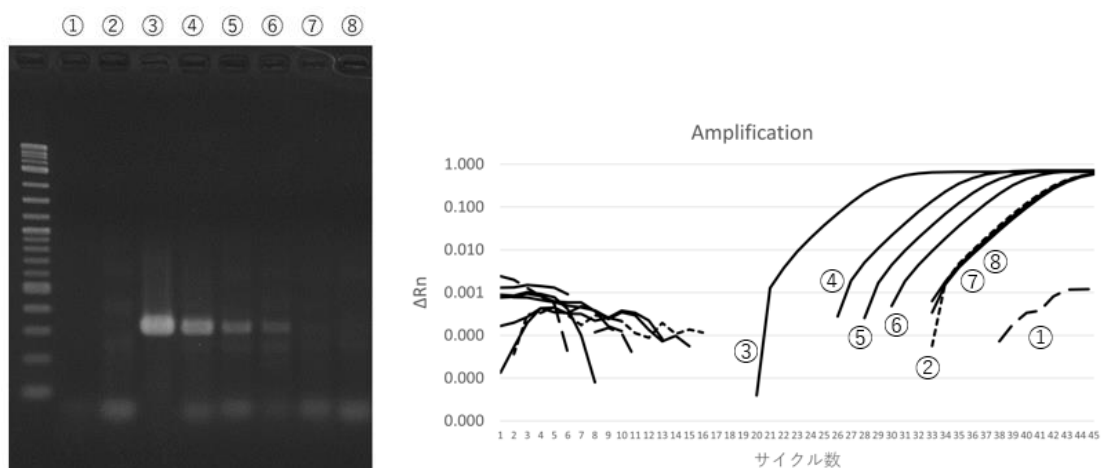


図17. 種子1000粒から抽出した全RNAでのコンベンショナルRT-PCRの泳動像（左）及びリアルタイムRT-PCR（SYBR Green法）の増幅曲線（右）
 ①：RNase-free water、②：健全種子試料、③：自然汚染種子混入試料、④：5 ng人工汚染種子混入試料、⑤：500 pg人工汚染種子混入試料、⑥：50 pg人工汚染種子混入試料、⑦：5 pg人工汚染種子混入試料、⑧：500 fg人工汚染種子混入試料

表8に、図14～17で示したそれぞれの結果の検出限界をまとめて示す。コンベンショナルRT-PCRでは、健全種子400、500、1000粒でのサンプルサイズにおいて、50または500 pgのToBRFV粒子を添加した人工汚染種子1粒を含むサンプルから検出できたのに対して、リアルタイムRT-PCR法では5または50 pgの検出限界であった。

表9.

試料当たりのトマト 種子粒数 ¹	コンベンショナルRT- PCR (プライマー:NAR0-A)	リアルタイム RT-PCR (SYBR Green法) (プライマー: NAR02)	データ
1粒	500 fg (7.6×10^3) ²	5 fg (7.6×10^1)	図14
400粒	50 pg (7.6×10^5)	5 pg (7.6×10^4)	図15
500粒	500 pg (7.6×10^6)	5 pg (7.6×10^4)	図16
1000粒	50 pg (7.6×10^5)	50 pg (7.6×10^5)	図17

¹ 健全トマト種子(0, 399, 499, 999粒)と人工汚染種子1粒の合計の粒数

² 各試験区で検出されたサンプル中の人工汚染種子に含まれるToBRFV粒子の最小値(括弧内はウイルス粒子量から推定されるウイルスRNAのコピー数)

② DAS-ELISA 法

次に、実行課題 3-(2)で開発された血清学的手法による検出技術に基づき、実行課題 1-(1)で作製された汚染種子を用いてこれらサンプルからのDAS-ELISA法の検出技術を開発し、評価した。健全種子100粒中に1粒の自然汚染または人工汚染種子を混入した試料を用意し、DAS-ELISAを実施した。引用文献9を参考に、ToBRFV検出とする判定基準を健全種子試料の吸光値の2倍した値を超えたものを「検出」とし、この基準においては1 µgまでの試料を特異的に検出できた。手法及び開発された抗体について種子からの検出に使用できることを確認し、手順書案を作成した。なお、抗体は製造ロットによって抗体濃度に差があることから、今回の試験結果がDAS-ELISA法の検出限界として断定することはできない。

表10. 作製したウサギ抗ペプチド抗体を用いたDAS-ELISAによるトマト種子からのToBRFV検出試験結果及び吸光値(+: 検出、-: 不検出)

	大玉種子(吸光値)	小玉種子(吸光値)
PBS-Tween(緩衝液)	(0.17)	(0.19)
健全種子試料	(0.15)	(0.14)
(健全種子試料吸光値×2)*	(0.30)*	(0.28)*
自然汚染種子混入試料	— (0.22)	+ (0.32)
10 µg人工汚染種子混入試料	+ (1.13)	+ (1.07)
1 µg人工汚染種子混入試料	+ (0.51)	+ (0.46)
100 ng人工汚染種子混入試料	— (0.25)	— (0.26)
10 ng人工汚染種子混入試料	— (0.18)	— (0.20)

*ToBRFV検出と判定する基準として、健全種子試料の吸光値の2倍の値を超えたものを「検出」とした。

③ 国際標準法(接種検定法)

さらに、既存の検出技術である国際標準法(引用文献8, 10)に準じた接種検定法を実

施し、ToBRFVにおいても検出できるかを評価した。健全種子200粒中に自然汚染種子を1粒混入した試料、または、精製粒子10 µgを含む人工汚染種子を混入した試料を供した。各試料を磨砕してその磨砕液を検定植物であるタバコ（品種Xanthi nc）に接種した結果、全ての接種葉に病斑（えそ斑点）が見られた。この結果から、国際標準法（引用文献8, 10）による接種検定法はToBRFVの検出に有効であることが確認された。



図18. 汚染種子試料を接種したタバコ葉のえそ斑点症状

以上の検出技術のうち、RT-PCR法（コンベンショナル、リアルタイム（SYBR Green））、及びDAS-ELISA法による、トマト葉またはトマト種子からの検出について、それぞれの手順を解説した検出プロトコル案を冊子（マニュアル）としてとりまとめを進めている（図19）。



図19. 作成中の検出マニュアル

（エ）研究成果の活用における留意点

リアルタイムRT-PCR（SYBR Green法）では、陰性対照区でも非特異反応による偽陽性が稀に生じるが、その際は、コンベンショナルRT-PCR（およびその産物のダイレクション）と併用することでその結果を検討することが可能である。

開発した抗ToBRFVポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体はToBRFVに対して高い特異性を有するが、ToMVに対しても反応性を有するため、ウイルス検出の際には注意が必要である。

各検出法における特異性や検出感度は、これらを実施する施設における機器や検査員の技量、使用する試薬等のメーカーによっては本研究結果とは必ずしも一致しないことに留意する。

(オ) 研究目標の達成に当たっての問題点

研究目標は達成できたが、DAS-ELISA法において自然汚染種子を1粒加えた一部の試料で不検出となる場合があることについては留意する必要がある。この原因は健全種子試料の吸光値が高くなり、検出の判定基準の値も高くなってしまうことが挙げられる。判定基準の値を下げるために、健全種子試料の吸光値を下げる処理（ブロッキングや希釈倍率）等の検討が今後必要な課題になりうる。

<引用文献>

8. International Seed Federation (2020) Detection of infectious *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) in tomato and pepper seed. https://259970.vserv2152.swisslink.ch/wp-content/uploads/2020/11/Tomato-ToBRFV_2020v1.5.pdf
9. International Seed Testing Association (2023) International rules for seed testing 2023. 7-026: Detection of *squash mosaic virus*, *cucumber green mottle mosaic virus* and *melon necrotic spot virus* in cucurbit seed. <https://www.seedtest.org/api/rm/ZP69S3NUD374656/7-026-detection-of-squash-mosaic-virus-cucumber-gr-4.pdf>
10. International Seed Testing Association (2023) International rules for seed testing 2023. 7-028: Detection of infectious *tobacco mosaic virus* and *tomato mosaic virus* in *Solanum lycopersicum* (tomato) seed by the local lesion assay (indexing) on *Nicotiana tabacum* plants. <https://www.seedtest.org/api/rm/M35ZVY588DFHVS/7-028-detection-of-infectious-tobacco-mosaic-virus-4.pdf>

5 研究成果の発表 別添のとおり。

6 目的の達成に当たっての現時点での問題点等

小課題1では、各種植物への感染性および病徴進展の把握および種子伝染性について、当初計画を上回る成果を上げたと考える。ただし、トマト品種への接種では、海外のトマトでの発生報告と比較して、茎葉のモザイクは一致したものの、果実における着色異常やえそ症状は、ごく一部をのぞき観察されず、正常に着果した。この要因は明らかではないが、栽培環境によるものであるとすると、同じ品種であっても現地圃場で発生する場合には海外で報告されたような果実被害が生じる可能性は残されている。また種子伝染性について、トマトでの試験では海外の報告とほぼ一致したが、ナス、イヌホオズキ、アメリカ

イヌホオズキで調査した種子伝染性については、調査株数が多くはないため、種子伝染が無視できない可能性は残されており、より大規模な試験を行うことが望ましいと考える。さらに、多くのナス科植物が全身宿主となりうることが示されたことから、これらにおける種子伝染性も今後考慮する必要があると考えられる。

小課題2では、薬剤による器具の不活化効果を定量的に評価でき、他のトバモウイルスで有効とされた薬剤の効果が改めて確認された。ただし、カミソリ刃を用いた模擬的な汚染器具での試験結果であるため、現場で用いたときの効果や耐久性、コストや労力を含めた実用性について検討の余地が残されている。種子のウイルス不活化についても、トマト種子の小規模な試験によるものであるため、他の品種ないしピーマン等他種、また大量の種子を処理する場合での実効性を確認する必要があると考えられる。さらに、種子に残存するウイルスの感染性とRT-PCR法による検出結果との不整合（不活化処理により感染性がなくなっても陽性と判定されうること）が見いだされ、今後整理が必要な課題と考えられた。土壌中のウイルスの不活化効果については、残存ウイルスの感染性の定量的評価が困難であったこと、また圃場試験ができない状況のため、有効な不活化法を提示することはできなかった。NCSがウイルス粒子に対して不活化効果を示すことが見いだされたが、汚染土壌の回復にどのように利用するかは残された課題である。弱毒ウイルス株ToMV-L11Aによる防除効果は期待できないことが明確となったため、別のウイルス株の利用等を視野に入れる必要性が明らかとなった。

小課題3では、種子等からのウイルス検出技術の開発と評価について、リアルタイムRT-PCR（SYBR Green）法での検出時に、陰性対照区でも陽性と判定されうるような非特異反応が稀に起きることがあり、プロトコルの改良等により回避が可能か、あるいは回避が難しい場合に判定基準の改良等を検討することが必要かもしれない。非特異反応は試薬や検査室の環境、検査員の技量など、原因と考えられる要素が多数あり、非特異反応を抑える方法については今後検討する必要がある。しかし、非特異反応が起きた際はコンベンショナルRT-PCRと併用することでその結果を検討することが可能である。

DAS-ELISA法については、抗体の製造ロットによって抗体濃度に差があることから、今回の試験結果がDAS-ELISA法の検出限界として断定できないため、抗体の希釈倍率やバックグラウンドの発色は抗体ロットごとに確認する必要がある。

本小課題において開発された各種検出法の精度については、試験、研究を実施したラボにおける結果であるため、他のラボでも同様の検出精度を得られるとは限らない。したがって、より高い精度、検出感度が必要とされる場合には、更なる手法の改良や新規プライマー、抗体等の開発を検討しなければならない。

なお、本課題では、得られた成果を想定される利用者にいち早く、広く知っていただくために、これまで学会発表等を積極的に行ってきたが、知見や技術のさらなる普及のために、今後も学会、さらに論文での公表を進めるとともに、学会シンポジウムでの発表や講習会の開催等を検討したい。また、特に検出技術については、検査現場に実装するにあたり、作成した検出マニュアル、抗体、陽性対照サンプル（抗原、RNA等）が必要となるため、これらの公開や配布方法については、ある程度方針が定まっていることが望ましいと考える。

<研究総括者の自己評価>

項目		評価結果
試験研究全体		A : 順調 B : 概ね順調 C : やや遅れている D : 遅れている
研究 小 課 題	宿主範囲等生物学的基礎情報の収集	A : 順調 B : 概ね順調 C : やや遅れている D : 遅れている
	ToBRFV の防除技術の開発	A : 順調 B : 概ね順調 C : やや遅れている D : 遅れている
	ToBRFV の検出技術の開発	A : 順調 B : 概ね順調 C : やや遅れている D : 遅れている
自己評価コメント 小課題 1 および小課題 3 では、当初計画を上回る知見の収集や検出技術開発が達成されたと考える。小課題 2 では土壌中のウイルス不活化技術の開発は目標にいたらなかったが、ウイルス粒子に対して不活化効果をもつ土壌消毒剤を見いだすとともに、他の目標は達成されたことから、B とした。試験研究全体としては計画を上回る成果が得られたと判断し、A とした。		