

ウメ輪紋ウイルス（plum pox virus）の検定法

東京大学 大学院農学生命科学研究科

前島健作・難波成任

はじめに

plum pox virus (PPV) は *Potyvirus* 属のアブラムシ伝搬性ウイルスであり、セイヨウスモモ (*Prunus domestica*)、アンズ (*P. armeniaca*)、モモ (*P. persica*) などを初めとするサクラ属植物を宿主とする。ヨーロッパを中心にまん延しており、近年、アフリカ、南北アメリカ、アジアの各国においても発生が確認されている。我が国では2009年に東京都青梅市のウメ (*P. mume*) で初めて発生が確認され、ウメ輪紋ウイルスと命名された (萱野ら 2010, MAEJIMA *et al.*, 2010)。

PPVは感染力が強い上、サクラ属の果樹に感染すると果実などに激しい病徴を生じ商品価値が損なわれるため、ヨーロッパでは甚大な経済的損失が報告されている。日本においてもまん延が危惧されるため、農林水産省では2010年2月にPPVの緊急防除に関する省令を施行した。現在、東京都の5市町において防除区域が設定され、根絶を目指した防除事業が進められている (本誌90号参照)。

従来のPPV検定法

PPVの防除には、検定による感染樹の早期特定を行い、感染樹を除去するしかない。病徴のみで感染樹を判別することは難しいため、これまでにELISA法 (VOLLER *et al.*, 1976) など様々な検定法が開発されている。現在最も普及しているのは血清学的手法であるELISA法と、分子生物学的手法であるRT-PCR法である。

ELISA法は抗原抗体反応の特異性を利用した手法であり、PPVの外被タンパク質 (coat protein: CP) を抗原として検出する。二重抗体サンドイッチ (double antibody sandwich: DAS) -ELISA法では、96穴のマイクロタイタープレートの各ウェルに抗体、抗原 (を含む植物の粗汁液)、酵素標識抗体、酵素基質を順に加え、抗原を2つの抗体で挟み込むことにより検出する手法である。本法は、最も一般的なウイルス検定法であるものの、プレートリーダーなど高価な実験機器や複雑な実験操作と労力を必要とするほか、検出に2日を要するという難点がある。

遺伝子増幅技術であるRT-PCR法は、ELISA法よりも高感度かつ迅速な手法である。WETZELら (1991) 及びLEVY、HADIDI (1994) は、それぞれPPVにおいて保存性の高いCP遺伝子領域及び3'非翻訳領域をターゲットとすることにより、信頼性の高い検出系を報告している。近年ではさらに感度、迅速性に優れた手法として、

電気泳動を伴わず遺伝子増幅を検出するリアルタイムRT-PCR法 (SCHNEIDER *et al.*, 2004) が開発されている。しかしながら、これらの手法は、ELISA法よりもさらに精密で高価な実験設備や神経を使う実験操作を必要とする点に難がある。また、検出には数時間を要する。

我が国における新たなPPV検定法

このように、従来のPPV検定法は実験設備と技術を必要とする手法であった。PPVの根絶には、人や場所を問わず扱えるような簡易かつ迅速な検定法を導入する必要があると考えられたため、東京大学植物病院[®]では、株式会社ニッポンジーンと共同でイムノクロマト法、RT-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) 法を用いた新規検定法の開発を検討してきた (図1)。

イムノクロマト法

イムノクロマト法は、抗原抗体反応を利用した手法であり、DAS-ELISA法と同様に、抗原を2つの抗体で挟み込むことにより検出する手法である。しかし、特に器具を必要とせず、簡易・迅速性に極めて優れており、ワンステップの操作により2~15分後には結果を目視判定できる点においても優れている。感度はELISA法と同等である。

本法の原理は以下の通りである。①植物の粗汁液に試験紙の一端を浸すと、抗原が毛細管現象により吸い上げられ、②その途中で金コロイド標識された抗体と結合し、③そのまま上昇したのち試験紙上に線状に固定された抗体に捕捉され、④金コロイドによる紫色のラインが出現する。

東京大学植物病院[®]では、我が国で発生したPPVに最適化された抗体を作出し、本法による簡易・迅速・高感度なPPV検出キットを開発した (前島ら 2010)。このキットは2009年の試験販売により、検出感度と特異性が評価され、2010年からは正式販売されている。

RT-LAMP法

LAMP法は鎖置換型DNA合成酵素を利用した新規遺伝子増幅技術である (本誌82号参照)。本法に逆転写酵素を加えたRT-LAMP法では、RNAウイルスなどのRNA分子の検出が可能である (FUKUTA *et al.*, 2003)。本法はRT-PCR法に較べ、等温で連続的に反応が進み、遺伝子増幅効率が高く、目視判定可能である点で優れている。

東京大学植物病院®では、RT-LAMP 法による PPV の超高感度検出技術を開発中であり、その成果の一部は検出キットとして試作製品化されている。本キットは非常に感度が高いため、抽出 RNA ではなく、爪楊枝で植物を突くという簡便かつ安価なサンプリング法により、30～60 分で迅速に PPV を検出可能である。さらに、保温機能（60℃）付きの家庭用電気ポットがあれば反応するため、高価な実験機器を必要としない。

RT-LAMP 法による PPV 検定法は、植物防疫所からも報告されている（本誌 88 号参照）。

上記の 2 種類のキットは、現状で最も簡易、迅速、高感度な PPV 検定法であり、すでに我が国の PPV 防除に採用されている。今後さらに改善を重ねることにより、我が国のサクラ属果樹生産を脅かす PPV の根絶に貢献するものと期待される。

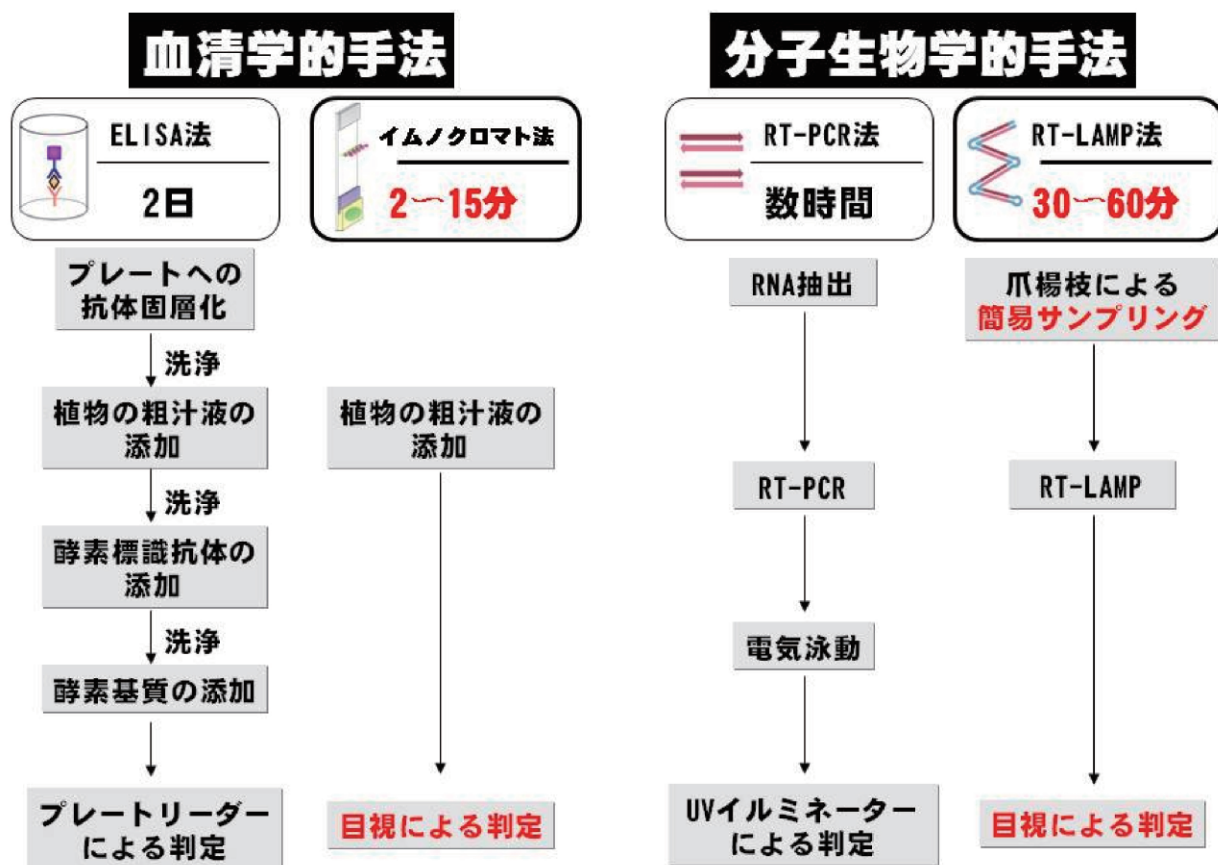


図 1 簡易・迅速・高感度な PPV の新規検定法の開発

参考文献

- FUKUTA, S., T. IIDA, Y. MIZUKAMI, A. ISHIDA, J. UEDA, M. KANBE, Y. ISHIMOTO (2003) Detection of Japanese yam mosaic virus by RT-LAMP. *Arch. Virol.* 148:1713-1720.
- 萱野佑典・小野剛・前島健作・星秀男・川西剛史・山次康幸・橋本光司・濱本宏・難波成任 (2010) 我が国のウメにおいて初めて感染が確認された plum pox virus (PPV) (ウメ輪紋ウイルス：和名新称) について. *日植病報* 76:36 (講要).
- LEVY, L., A. HADIDI (1994) A simple and rapid method for processing tissue infected with plum pox potyvirus for use with specific 3' non-coding region RT-PCR assays. *EPPO Bulletin* 24: 595-604.
- 前島健作・萱野佑典・姫野末紗子・小松健・白石拓也・山次康幸・北村暢夫・大上光明・濱本宏・難波成任 (2010) イムノクロマト法によるウメ輪紋ウイルス (plum pox virus, PPV) の簡易迅速高感度検出キットの開発. *日植病報* 76:36 (講要).
- MAEJIMA, K., H. HOSHI, M. HASHIMOTO, M. HIMENO, T. K. AWANISHI, K. KOMATSU, Y. YAMAJI, H. HAMAMOTO, S. NAMBA (2010) First report of plum pox virus infecting Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) in Japan. *J. Gen. Plant Pathol.* Published online.
- SCHNEIDER, W. L., D. J. SHERMAN, A. L. STONE, V. D. DAMSTEEGT, R. D. FREDERICK (2004) Specific detection and quantification of Plum pox virus by real-time fluorescent reverse transcription-PCR. *J. Virol. Methods* 120:97-105.
- VOLLER, A., A. BARTLETT, D. E. BIDWELL, M. F. CLARK, A. N. ADAMS (1976) The detection of viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Gen. Virol.* 33:165-167.
- WETZEL, T., T. CANDRESSE, M. RAVELONANDRO, J. DUNEZ (1991) A polymerase chain reaction assay adapted to plum pox potyvirus detection. *J. Virol. Methods* 33:355-365.