

## ELISAによるキュウリ種子からのキュウリ緑斑 モザイクウイルスの検出\*

川 合 昭・木 村 茂  
西 尾 健・長 尾 記 明

横浜植物防疫所

Detection for Cucumber Green Mottle Mosaic Virus in Cucumber Seeds Using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Akira KAWAI, Shigeru KIMURA, Takeshi NISHIO and Noriaki NAGAO (Yokohama Plant Protection Station). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* 21: 47-53 (1985).

**Abstract:** The comparative tests of the detection for cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV) in cucumber seed extracts showed that the modified enzyme-linked immunosorbent assay (M-ELISA; FREGG and CLARK, 1979) was more sensitive than the standard ELISA (S-ELISA; CLARK and ADAMS, 1977): 10 ng/ml of purified CGMMV in seed extracts were detected by M-ELISA and 40 ng/ml by S-ELISA. With artificially contrived levels of infection, the equivalent of one CGMMV-infected seed homogenized with 800 healthy seeds could be detected by M-ELISA. All seeds obtained from cucumber plants inoculated with CGMMV at early stage contained the virus but seed-transmission was only 4.2 percent (15/355) in those seeds. Therefore, it is supposed that low transmissibility through seed would raise the accuracy of seed-test program and the detection method for CGMMV from seed lots using the sample size of 800 seeds by M-ELISA would have practically sufficient accuracy.

### ま え が き

輸入種子検疫では、種子に混入するシストや、種子伝染性病原菌の検出に、フェンウィック法あるいはプロッター法等の検査法が用いられる。これらの検査法は、いずれも、比較的短期間にその行程を終えることができる。

一方、種子伝染性ウイルスの検査方法としては、

① 一定量の種子を播種して、ウイルス病症状の出現を観察する方法 (McKINNEY, 1954)

② 一定量の種子を緩衝液で磨砕し、特定の指標植物に接種する方法 (KIMBLE *et al.*, 1975)

等の報告があるが、これらは、検査に必要な温室スペースや、検査期間の長さから、輸入種子に対し、輸入港で行う検査にはふさわしい方法とは言えない。

しかし、抗血清の得られたウイルスに対して、近年、血清学的手法を駆使した方法、すなわち、

① SDS-ゲル内拡散法 (CARROLL *et al.*, 1979)

② 免疫電顕法 (SSEM) (BRLANSKY and DERRICK,

1979)

③ 抗素結合抗体法 (ELISA) (LISTER, 1978)

④ 放射性同位元素結合抗体法 (RISA) (GHABRIAL and SHEPHERD, 1982)

等を用いて種子を検査する方法が考案され、検査時間や労力の点では、種子伝染性ウイルスに対する検査法も、プロッター法等の従来行なわれている検査法と比肩されるようになってきた。これらの種子伝染性ウイルス検査法の中でも、特に ELISA は、SSEM や RISA に用いるような大規模な機械装置を必要とせず、しかもこれらに匹敵するウイルス検出感度が得られる点で注目される。

そこで、輸入種子検疫における ELISA による検査法を開発するひとつのモデルとして、キュウリ種子からキュウリ緑斑モザイクウイルス (CGMMV) を検出する方法について検討を行った。

本試験を行うにあたり、ウイルス及び抗血清を分譲下さった (社) 日本植物防疫協会匠原監一郎博士、有益な助言を賜った前当所病原菌課長小林敏郎博士に厚くお礼申し上げる。

\* 本報告の概要は昭和58年度日本植物病理学会秋季関東部会において発表した。

## 材料および方法

### 1. 供試ウイルス

キュウリ緑斑モザイクウイルス—キュウリ系(CGM MV-C)のウイルス純化液を接種源または抗原として使用した。ウイルス濃度は、260 nmにおける吸光度3.0を1 mg/mlとして計算した。

### 2. 供試種子

市販のキュウリ種子品種四葉または地這を供試した。ウイルス保毒種子はつぎのようにして作製した。温室内で育苗した四葉および地這キュウリの子葉にウイルス液(約50 μg/ml)を塗抹接種し、本葉にモザイク症状の現われた実生苗を露地に定植した。これらのり病個体から得られた果実を完熟させ、種子を採集した。採集した種子から未熟な種子を除いて十分乾燥させ、1果実分ごとに紙袋に入れ、供試するまで室温下で保存した。

### 3. ELISA の手順

CGMMV-C 抗血清(力価2,084倍)からCLARK and ADAMS (1977)の方法に準じて、γ-グロブリン(IgG)を純化し、アルカリ性リン酸分解酵素(Sigma社, Type VII-S)とIgGを結合させて、酵素結合IgG(コンジュゲート)を調製した。コーティングIgGはγ-グロブリン濃度を0.5 mg/mlに、またコンジュゲートは酵素濃度を1 mg/mlになるように調整し、それぞれを原液とした。

ELISA 検定用試料はすべて、0.85% NaCl, 0.05% Tween-20, 2% ポリビニールピロリドンを含む0.02 M リン酸緩衝液 pH 7.4(PBST・PVP)を用いて調製

し、種子および葉はヒスコトロン(日音医理科器械, NS-50, NS-10T, NS-20TP)で磨砕した。

本試験においては、CLARK and ADAMS(1977)による手順を常法ELISA(S-ELISA)とし、FLEGG and CLARK(1979)の方法を一部修正、すなわち、小試験管に1 ml 又は2 ml の試料をとり、これに原液又は2倍希釈したコンジュゲートを加えて混合したものをコーティングIgGで処理したプレート(Dynatech Microelisa CK223-29)の穴に投入し、37°C 4時間インキュベートする方法を変法ELISA(M-ELISA)とした。(Fig. 1)

ELISA 検定には1試料当りプレートの1穴又は2穴を用い、反応終了後は反応液を小試験管にとり、2.5 ml の蒸留水を加えて、光路長10 mm, 波長405 nm における吸光度を測定した。

### 4. 採取種子の保毒確認

ウイルス保毒種子混入率の明らかな模擬検定試料を調製するために、り病苗から採取した種子の保毒を次の方法で確認した。四葉キュウリから採取した種子を火焰消毒したナイフで1粒ごとに縦に2分割し、対となる組がわかるように整理した。片方の各半割種子を0.5 ml のPBST・PVPで磨砕し、1試料当りプレートの1穴を用いて、S-ELISAで検定した。検定に際しては、反応時間などによって生じるプレート間の発色差を補正するため、各プレートにウイルス希釈液(濃度10 μg/ml)を入れた対照区をもうけ各種子の相対ELISA値(RE値)を次式により求めた。

$$\text{相対 ELISA 値 (RE 値)} = \frac{\text{検定区の吸光度}}{\text{対照区の吸光度}} \times 10$$

(但し、RE 値は小数点以下を四捨五入し、0~10 の

#### STANDARD PROCEDURE

Add 200 μl IgG in coating buffer  
Incubate 4 h at 37°C  
|  
Add 200 μl test sample in PBST・PVP  
Incubate overnight at 6°C  
|  
Add 200 μl conjugate IgG in PBST  
Incubate 3 h at 37°C  
|  
Add 300 μl substrate in diethanolamine buffer  
|  
Stop reaction with 50 μl 3.0 M NaOH

#### MODIFIED PROCEDURE

Add 200 μl IgG in coating buffer  
Incubate 4 h at 37°C  
|  
Add 200 μl mixture of test sample and  
conjugate IgG in PBST・PVP  
Incubate 4 h at 37°C  
|  
Add 300 μl substrate in diethanolamine buffer  
|  
Stop reaction with 50 μl 3.0 M NaOH

Fig. 1. The procedure of standard and modified ELISA.

整数で表示)

### 5. 種子伝染率の調査

果実1個から採取した種子を2等分し、一方は1粒につき1mlのPBST・PVPで磨砕して、1粒ごとにS-ELISAで検定した。他方は播種箱に播種して、十分に子葉が展開したときに、実生苗1本につき1枚の子葉から直径8mmのコルクボーラーで葉片2個を打ちぬき、これに0.5mlのPBST・PVPを加えて磨砕し、ウイルス感染の有無をS-ELISAで検定した。

## 結 果

### 1. ELISA条件の検討

キュウリのウイルス病葉および種子汁液で希釈したウイルス液を用いて、コーティングIgGおよびコンジュゲートの最適使用濃度を検討した。その結果S-ELISAおよびM-ELISA共に、コーティングIgGは検討した10~0.625 $\mu$ g/mlの範囲では2.5 $\mu$ g/ml、コンジュゲートは100~1,600倍の希釈範囲では200倍希釈が最適であった。コーティングIgG 10 $\mu$ g/mlとコンジュゲート100倍希釈の組合せにおいては、非特異発色がやや高くなった。

### 2. S-ELISAとM-ELISAとのウイルス検出感度の比較

ウイルス濃度が80, 40, 20, 10 ng/mlになるように健全種子汁液で希釈した試料を抗原として、S-ELISAと、M-ELISAのウイルス検出感度を比較した。

1試験当たりプレートの6穴を用い、2穴ずつ3組の反応液の吸光度を平均し、Fig. 2に示した。M-ELISAの吸光度は、S-ELISAのそれより常に高く、反復試験においても同様の傾向を示した。ウイルスの検出限界は、S-ELISAでは40 ng/ml、M-ELISAでは10 ng/mlであった。

### 3. 模擬検定試料からのウイルスの検出

模擬検定試料を調製するために採種したり病四葉キュウリ3果実の種子全粒についてウイルス検定を行った。

各半割種子のRE値を算出し、1果実分ごとにRE値に対する種子粒数の頻度を調べた結果を、Fig. 3に示した。A果の1粒を除くすべての種子がRE値1以上を示したが、果実によってその頻度分布のパターン

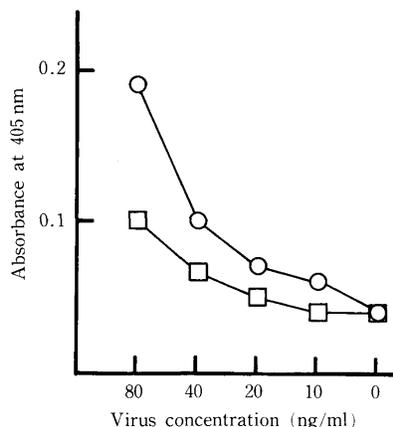


Fig. 2. Comparison of the relative sensitivity of standard and modified ELISA.

Antigen; purified preparation of CGMMV diluted in a 1:10 (w/v) extract of cucumber healthy seeds in PBST・PVP

□; standard ELISA, ○; modified ELISA

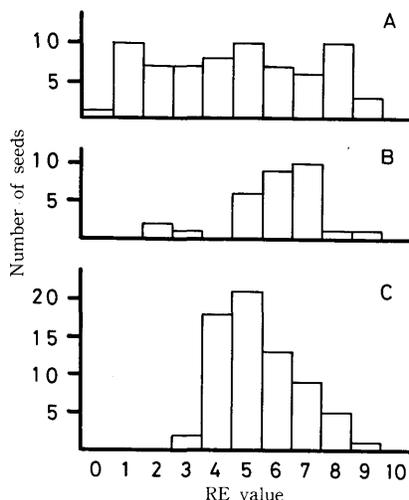


Fig. 3. Frequency distribution plots for RE value of individual seeds from 3 fruities infected with CGMMV

Individual seeds from 3 fruities were cut in half; one half of each seed was indexed for the virus. Relative ELISA value (RE value) of each seed was obtained from following formula;

ER value = (Absorbance value for seed extract / Absorbance value for virus preparation at 10 $\mu$ g/ml)  $\times$  10

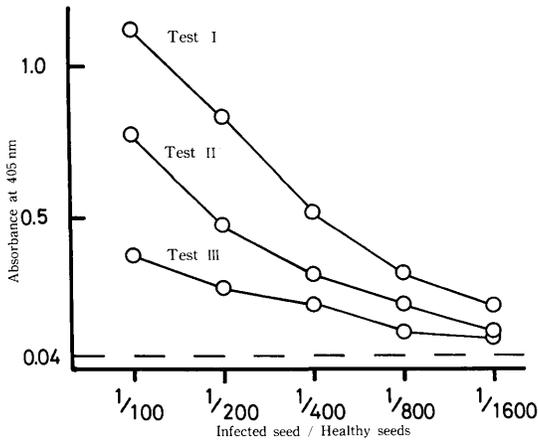


Fig. 4. M-ELISA absorbance value against artificially contrived samples contaminated with a CGMMV-infected seed

The one-half seed portions from infected seeds were mixed with 50-800 healthy seeds to simulate samples with one infected seed in a 100-1,600 seeds/sample.

The infected seeds for mixing had RE value 8-9 (Test I), RE value 6-7 (Test II) and RE value 3-5 (Test III), respectively. Dotted line indicates absorbance value for healthy seed extract.

に差が認められた。また、A果の種子でみられるように各種子のRE値は0~9まで幅広く分布し、種子によってウイルス含量がかなり異なることがわかった。

このことから、検定した半割種子と対をなす残りの半割種子をRE値によりI(8~9)、II(6~7)、III(3~5)の3群に分け、各群に属する種子を模擬検定試料作製時の保毒種子として用いた。

また、一定粒数の健全種子に加える保毒種子のウイルス含量をさらに齊一化し、均質な模擬検定試料を作製するため次の様に検定試料を調製した。各群に属する保毒半割種子5粒を5mlのPBST・PVPで磨砕後、これを5等分して健全種子50, 100, 200, 400, 800粒をそれぞれ10倍量のPBST・PVPで磨砕した各汁液に加えた。これらは健全種子100~1,600粒に対し保毒種子1粒(1/100~1/1,600)が混入しているものと等価の種子汁液であり、これらを模擬検定試料として、I~IIIの3区、5段階についてM-ELISAで検定した。その結果の一例をFig. 4に示した。

健全種子汁液の吸光度は0.04であり、この値の2倍以上(>0.08)のものをウイルスが検出された試料と判定した。I, II群の保毒種子を混入した場合は1/1,600まで、また、III群の種子を用いたときは、1/800

までウイルスの検出が可能であった。このことからM-ELISAによる保毒種子混入率の検出限界は1/800(健全種子800粒中に保毒種子1粒)と判断した。

#### 4. 種子伝染率

四葉キュウリ5果(D~H)、地這キュウリ5果(I~M)計10果から採種した種子を用いて、種子のウイルス含量と種子伝染率との関係を調査した。

結果はFig. 5に示したとおりで、検定したすべての種子がRE値1以上を示し、ウイルスを保毒していた。

比較的RE値の高い種子が多かったG果, M果において、子葉からウイルスが検出された個体がなく、逆に、I果, L果のようにRE値が比較的低い種子において、子葉からウイルスが検出される個体が多かった。このように、RE値の高い種子が必ずしも種子伝染率が高いとは言えず、種子のウイルス含量と種子伝染率との関係は、明らかに出来なかった。

本試験における種子伝染率は、四葉で0~2.8%、地這で0~7.8%、10果平均で4.2%(15/355)であった。

#### 考 察

M-ELISAは、apple chlorotic leafspot virusの検出にFREGG and CLARK(1979)が用いた方法である。彼らの方法に準じて予備試験を行ったところ、種子汁液とコンジュゲートをプレート上で混合する方法は、種子汁液中のデンプン等の果粒が穴の底部に厚い層となって沈澱し、良い結果は得られなかった。このため、本試験においては、小試験管中であらかじめ試料とコンジュゲートとを良く攪伴した後プレートの穴へ投入する方法を取り、通常使用しているS-ELISAの検出感度より4倍高い10 ng/mlのウイルス濃度まで検出できるようになった。また、このM-ELISAによる保毒種子混入の検出限界は、健全種子800粒:1粒であった。

近年種子伝染性ウイルスに対する種子検査方法の開発が重要視されるようになり、これに関連した報告が多く見られるようになってきた。その主なものをTable 1に示した。主にSSEMとELISAが検定法として利用されているが、それらの検出感度は種子とウイルスの組合せによって異なっており、一概にどの検出法が優れているとは言えない。

Table 1に示しているELISAは全て本報告のS-ELISAに相当するが、ダイズやエンドウの種子検定における検出感度を高めるためには、ELISAの手順や試料の調整法等について、さらに検討する必要があるよ

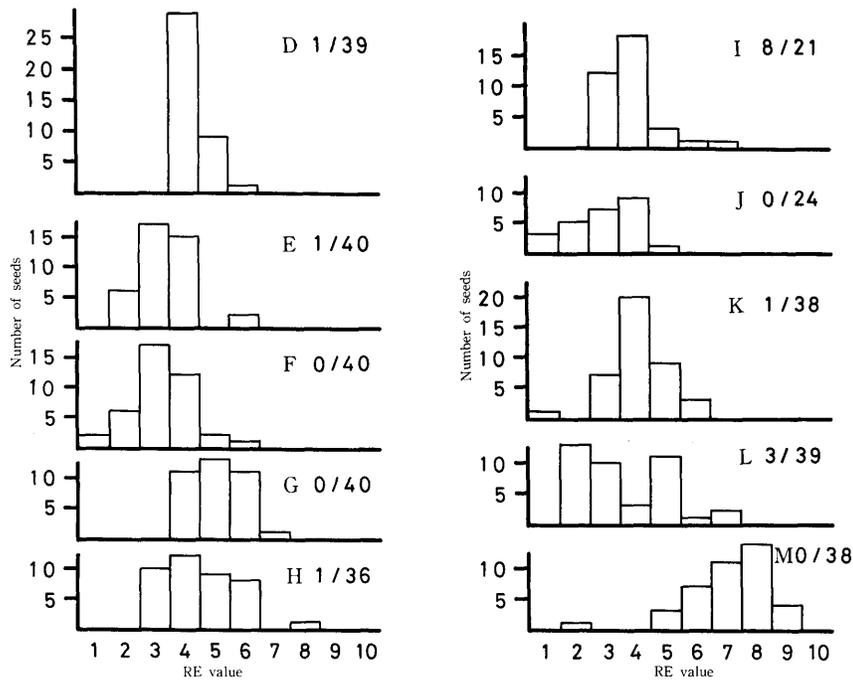


Fig. 5. The relation between RE value of infected seeds and rate of seed transmission  
 The half number of seeds obtained from one CGMMV-infected fruit were indexed individually for the virus and another half were used for seed-transmission test. Seed lots from 10 fruits (D-M) were assayed. Numelic; no. infected seedlings/no. germination

Table 1. Detectability of viruses in seed lots on previously published references

Seeds	Viruses	Methods	Detectability Infected Seeds/Healthy Seeds	References
lettuce	lettuce mosaic virus	Chenopodium method	1/500	KIMBLE et al, 1975
soybean	tobacco ringspot virus	ELISA	1%	LISTER, 1978
soybean	soybean mosaic virus	ELISA	2-4%	LISTER, 1978
pea	pea seedborne mosaic virus	ELISA	25%	HAMILTON and NICHOLS, 1978
pea	pea seedborne mosaic virus	SSEM	1%	HAMILTON, and NICHOLS, 1978
soybean	tobacco ringspot virus	SSEM	1/1000	BRLANSKY and DERRICK, 1979
soybean	soybean mosaic virus	SSEM	1/1000	BRLANSKY and DERRICK, 1979
barley	barley stripe mosaic virus	SSEM	1/1000	BRLANSKY and DERRICK, 1979
lettuce	lettuce mosaic virus	SSEM	1/100	BRLANSKY and DERRICK, 1979
lettuce	lettuce mosaic virus	ELISA	1/1400	JAFARPOURE <i>et al.</i> , 1979
bean	bean common mosaic virus	ELISA	1/2000	JAFARPOURE <i>et al.</i> , 1979
lettuce	lettuce mosaic virus	RISA	3/30000*	GHADRIAL and SHEPHERD, 1982

\* when 5 to 10 samples (500 seeds each) per seed lot were assayed.

ELISA=enzyme-linked immunosorbent assay

SSEM=serologically specific electron microscopy

RISA=radioimmunosorbent assay

うに思われる。また、アメリカ合衆国においてレタス種子に求められている lettuce mosaic virus 保毒種子の混入率、サンプル 30,000 粒中に保毒種子 0 粒 (0/30,000) という厳しい検査の場合 (KIMBLE *et al.*, 1975) 等で、用いる検定法の検出感度が、求められるサンプル量を 1 度に検定できる程高感度でない場合、検出限界以内のサンプル量による検定 (例えば、検出限界 1/500 の場合 1 検定当り 500 粒) を、求められるサンプル量に達するまで反復する (KIMBLE *et al.*, 1975; FALK, 1983) 等の工夫が必要となる。

CGMMV の場合、保毒種子から生じた苗の発病率 (種子伝染率) は、本試験においても、従来報告 (西・西沢, 1967; 山本, 1975) と同様に 4.2% と低かった。このことは、保毒種子の混入許容率をある値に定めて設計した検子検査プログラムの検査精度を、実用上ひき上げる効果をもたらすものと考えられる。すなわち、本試験における M-ELISA の保毒種子検出限界 800 粒を 1 検査単位に用いた場合、この検査で陰性の結果を得た荷口の中に見込まれる保毒種子混入率を Thorndike のチャート (GENG *et al.*, 1983) から求めると、信限限界 99.9% において、0.875% 以下となるが、このような荷口の種子を播種した場合の発病率は、たとえば保毒種子混入率 0.875% の場合、 $0.875\% \times 4.2\%$  (種子伝染率)  $\approx 0.037\%$  (発病率) の例のように、かなり低くなることが期待される。

以上のことから、本試験で検討した変法 ELISA は、ウイルス検出感度が十分に高いこと、試料とコンジュゲートを混合することにより作業行程が少なくなり、検定時間が短縮されたこと (コーティングされたプレートをあらかじめ準備しておくことにより、1 日で検定が終了する) から、輸入種子検疫等の検査時間を極端に制限される場合に、実用性の高い手法であると考えられる。

今後はさらに、他の重要な種子伝染性ウイルスについて、検出技法の開発を行っていく必要があると考えられる。

## 摘 要

キュウリ種子-CGMMV の系を用いて、ELISA による種子からのウイルス検出方法について検討した。

S-ELISA と M-ELISA のウイルス検出限界を比較したところ、それぞれ 40 ng/ml と 10 ng/ml であり、M-ELISA によるウイルス検出感度は S-ELISA より 4 倍高かった。

健全種子中に保毒種子を混入し、M-ELISA を用い

て保毒種子の検出限界を調べたところ、健全種子 800 粒中に保毒種子 1 粒の混入まで検出可能であった。

り病苗から採取した果実中の種子は、全てウイルスを保毒していた。これらの種子を播種して発病する個体 (種子の伝染率) は 4.2% (15/355) であった。

以上のことから、CGMMV-C の検定は、800 粒を 1 検体として M-ELISA で検定することにより、高い精度の検査が可能である。

## 引用文献

- BRLANSKY, R.H. and K.S. DERRICK (1979) Detection of seedborne plant viruses using serologically specific electron microscopy. *Phytopathology* **69**: 96-100.
- CARROLL, T.W., P.L. GOSSEL and D.L. BATCHELOR (1979) Use of sodium dodecyl sulfate in serodiagnosis of barley stripe mosaic virus in embryos and leaves. *Phytopathology* **69**: 12-14.
- CLARK, M.F. and A.N. ADAMS (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. gen. Virol.* **34**: 475-483.
- FALK, B.W. (1983) Development and application of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test to index lettuce seeds for lettuce mosaic virus in Florida. *Plant Disease* **67**: 413-416.
- FLEGG, C.L. and M.F. CLARK (1979) The detection of apple chlorotic leafspot virus by a modified procedure of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Ann. appl. Biol.* **91**: 61-65.
- GENG, S., R.N. CAMPBELL, M. CARTER and F.J. HILLS (1983) Quality-control programs for seedborne pathogens. *Plant Disease* **67**: 236-242.
- GHABRIAL, S.A., D. LI and R.J. SHEPHERD (1982) Radioimmunosorbent assay for detection of lettuce mosaic virus in lettuce seed. *Plant Disease* **66**: 1037-1040.
- HAMILTON, R.I. and C. NICHOLS (1978) Serological method for detection of pea seed-borne mosaic virus in leaves and seeds of *Pisum sativum*. *Phytopathology* **68**: 539-543.
- JAFARPOUR, B., R.J. SHEPHERD and R.G. GROGAN (1979) Serologic detection of bean common mosaic and lettuce mosaic viruses in seed. *Phytopathology* **69**: 1125-1129.
- KIMBLE, K.A., R.G. GROGAN, A.S. GREATHEAD, A.O. PAULUS and J.K. HOUSE (1975) Development, application, and comparison of methods for indexing lettuce seed for mosaic virus in California. *Plant Dis. Repr.* **59**: 461-464.

LISTER, R.M. (1978) Application of the enzyme-linked immunosorbent assay for detecting viruses in soybean seed and plants. *Phytopathology* **68**: 1393-1400.

McKINNEY, H.H. (1954) Culture methods for detecting seed-borne virus in Glacier barley seedlings. *Plant Dis. Repr.* **38**: 152-162.

西 泰道・西沢正洋 (1967) 九州におけるキュウリ緑斑モザイクウイルス病に関する研究, 九州農試集報 **13**: 89-111.

山本 勉 (1975) キュウリ緑斑モザイク病に関する研究 とくに発生環境, 伝搬方式ならびに防除法について, 徳島農試特報 **5**: 1-66.