

ブドウのファンリーフウイルス検定に対する 酵素結合抗体法の適用

木村 茂・高橋 勤・後藤 正昭

横浜植物防疫所

Application of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to the Indexing of Grapevines for Grapevine Fanleaf Virus. Shigeru KIMURA, Tsutomu TAKAHASHI and Masaaki GOTO (Yokohama Plant Protection Station). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* 22: 61-65 (1986).

Abstract: Factors affecting the detection of grapevine fanleaf virus (GFV) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in grapevine leaves were studied using 4 varieties of infected grapevines, potted and grown in the screenhouse. Of 9 extraction buffers tested, 2.5% nicotine solution containing 2.0% polyvinyl pyrrolidone (PVP) seemed to be the most suitable for ELISA detection of GFV in the leaves, because it gave consistently higher ELISA value (A_{405}) than the other buffers and was more convenient for its preparation.

The leaves sampled in June gave the highest ELISA value. ELISA value reduced with advance of the season, however GFV could be detected from all samples of upper, middle and lower leaves in August and only upper leaves in October. From the comparison of ELISA value in the leaves of different leaf position, the upper leaves (young leaves) appeared to be the best source of antigen for ELISA detection through the growing season. Sensitivity of ELISA detection of GFV in leaf samples mixed with infected and healthy leaves was 1:10 in June, 1:1 in August and 1:0 in October respectively.

From the above results, it is concluded that a number of grapevines could be efficiently indexed for GFV by using young leaves sampled in about June and 2.5% Nicotine+2% PVP solution as extraction buffer for ELISA.

ま え が き

近年、我が国に輸入され、隔離検疫を受けるブドウ苗木類は、年間1万本以上にのぼっており、迅速かつ精密な検査が要求されている。ブドウのウイルス病（ウイルス病様症状を含む）は、田中（1983）によれば世界に約30種類存在する。これらの検定には、一般に指標植物を用いての接木検定および汁液接種検定等の方法がとられている。しかし、これらの方法は指標植物の育成および検定に長期間を要し、広い栽培面積と肥培管理に多大な労力を必要とするので、おのずと検査可能数量は制約される。

近年ブドウの重要ウイルスの1種であるブドウファンリーフウイルス（GFV）の迅速な検出法として、西尾ら（1981）、SHANMUGANATHAN and FLETCHER（1982）、今田・成沢（1984）およびKEARNS and MOSSOP（1984）はELISA法が有効であることを報告している。

植物検疫においても果樹の重要ウイルスに対する検

査精度の向上と迅速化を計るために、1983年より隔離検疫、母樹検疫におけるブドウのウイルス病検査法の1つとして、ELISA法が導入された。ELISA法の導入に当たり、検査法としての斉一化を計ることを目的として、①ブドウ葉の最適磨砕液 ②最良の検査時期等に関してGFVの検出効率の点から検討した。

これらの結果について報告する。

報告に当たり、GFV罹病ブドウ樹の分譲を賜った山梨県果樹試験場、神戸植物防疫所伊川谷圃場および試験を通じて有益な御助言・御指導をいただいた当所病菌課長尾記明課長、西尾 健博士に厚くお礼申し上げます。

材料および方法

1. 供試ウイルスおよび抗血清

GFVは、山梨県果樹試験場から分譲を受けたGFV保毒Missionから分離したものをを用いた。*Chenopodium quinoa*で増殖させたGFVを小林ら（1980）の方法により精製した。精製ウイルスを兎の筋肉に3回および静脈に1回注射して、GFV抗血清を作製した。得られた抗血清は純化ウイルスに対して重層

* 本報告の概要は、1984年日本植物病理学会秋季関東部会において発表した。

Table 1. Extraction buffers tested for ELISA detection of grapevine fanleaf virus

A.	2.5% nicotine
B.	2.5% nicotine+2.0% PVP
C.	2.5% nicotine+0.01 M phosphate buffer+2.0% PVP
D.	0.01 M phosphate buffer+0.1% TGA+2.0% PVP
E.	PBS-T+0.2% albumine+0.2% DIECA+2.0% PVP
F.	PBS-T+2.0% PVP
G.	0.01 M tris buffer+2.0% PVP
H.	0.01 M carbonate buffer+2.0% PVP
I.	0.01 M citrate buffer+2.0% PVP

PBS-T: 0.02 M Na-K phosphate buffer+0.1 M NaCl+0.05% Tween-20, PVP: polyvinyl pyrrolidone MW. 40,000, TGA: thioglycolic acid, DIECA: sodium diethyldithiocarbamate

法で2,048倍希釈まで反応した。

抗血清からの γ -グロブリンの純化は硫酸塩析およびDEAEセルロースカラムクロマトグラフィーによって行った。 γ -グロブリンと酵素との結合は、アルカリ性リン酸分解酵素 (Alkaline phosphatase, Type VII, Sigma 社) の3.2 M 硫酸懸濁液を遠心し、沈殿に純化 γ -グロブリンを加え溶解し、透折後、2%となるようグルタルアルデヒドを加え、静置後再び透折することによって行った。なお、 γ -グロブリンと酵素の混合比は1:2.4とした。

2. 供試ブドウ樹

GFV罹病樹の“西管”(中国産)、“Cabernet Sauvignon”(フランス産)、“Merlot N”(西ドイツ産)および *Vitis rupestris* “St. George”(U.S.A産)は、隔離検疫における検査でGFVに感染していることが明らかになったもの*であり、また、“Rkaciteli rozovj”は神戸植物防疫所伊川谷圃場から分譲を受けたものである。また、健全樹として当圃場で保存しているウイルスフリーの“St. George”または“Cabernet Franc”を用いた。ブドウ樹はすべて鉢植とし、網室内で栽培した。

3. ELISA 法

ELISA法の手順は、CLARK and ADAMS (1977) および西尾ら (1981) の方法に準じた。コーティング用 γ -グロブリン濃度は1.25 mg/ml、また酵素結合 γ -グロブリンは調整原液の1/800希釈液を使用した。ブドウの葉または根の10倍容量(w/v)の磨砕液を加え

てすり鉢で磨砕し、その上清をELISA検定用試料とした。

ELISA値は、1試料あたり2穴分の反応液をひとまとめにし、2 mlの蒸留水を加えて、405 nmの吸光度を測定し、その値とした。なお、ELISA値が健全対照区の2倍以上となったものを、GFVが検出された試料(陽性)と判定した。

実験結果

1. ELISA値に及ぼすブドウ葉磨砕液の影響

ブドウ葉の最適磨砕液を選定するために、ニコチンを基本としたもの3種、リン酸塩を基本としたもの3種およびウイルスの精製に常用される緩衝液3種の計9種について磨砕液の種類とELISA値との関係を比較検討した (Table 1: A-I)。GFV罹病樹の“Cabernet Sauvignon”および“St. George”の上位葉(新葉)を採取してA-Iの各磨砕液ですりつぶし、その上清をELISA検定用試料とした。ELISA検定は6月、8月および10月の3回行った。そのうちの6月に行った結果をFig. 1に示した。磨砕液A・BおよびCを用いた場合は、2品種のELISA値はすべて0.5以上と高かった。磨砕液Eでは、“Cabernet Sauvignon”のELISA値は0.7と高かったが、“St. George”の値は0.1と低く、“St. George”からのGFVの検出はできなかった。他の磨砕液D, F, G, HおよびIでは、ELISA値はいずれも0.1以下となり、健全対照区の値より若干低い値を示した。8月および10月に行った結果においても、これらの傾向はほとんど変わらなかったが、磨砕液Eでは“Cabernet Sauvignon”からもGFVは検出されなかった。

* 農林水産省指令59横植第944号

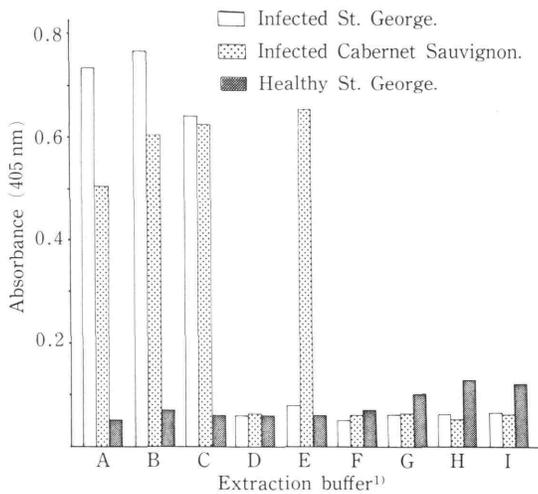


Fig. 1. Effect of extraction buffers on ELISA detection²⁾ of grapevine fanleaf virus in grapevine leaves.

¹⁾ See table 1.

²⁾ ELISA was done in June.

GFVの検出ができなかった磨砕液D, F, G, HおよびIの各液に2.5%となるようニコチンを加えてブドウ罹病葉を磨砕し、ELISA検定を行った結果、ニコチンを添加したすべての磨砕液の区のELISA値が0.43~0.82と高い値を示し、一様にGFVの検出が可能となった。

これらのことから、ブドウ葉の磨砕液としては、ニ

コチンを基本とした液がGFVの検出にとって良い結果をもたらすことがわかった。

磨砕液A, B, Cのうち、BはELISA値が常に安定して高く、調整も簡単であることから、ブドウ葉の磨砕液として最適であると判断した。以下の試験は磨砕液Bを用いて行った。

2. 生育時期および葉位とELISA値との関係

ブドウ樹のGFVに対する検定を行う場合に、何月ごろまた何処の葉位の葉を試料とするのが最も良いかを明らかにするため、6月、8月、10月に上位葉（展開まもない新葉）、中位葉（つるの中間の葉）および下位葉（下から2~3枚目の葉）を採取して、時期別、葉位別のELISA値の変動を調査した。その結果をFig. 2に示した。

6月においては、供試した4品種のどの葉を用いてもELISA値は0.9以上と高く、容易にGFVを検出できた。気温の高い8月では、6月に比べて全体的にELISA値は低下したが、4品種のすべての葉からGFVを検出できた。10月では、4品種の上位葉からは、GFVを検出できたが、“Rkaciteli rozovjy”を除いて中・下位葉からは検出できなかった。

また、10月に白色の新根を試料として、ELISA検定を行ったところ、ELISA値が0.43~1.64と高かった。特に“Cabernet Sauvignon”と“Merlot N”では同時期の上位葉の値より高く、白色の新根も十分GFV検定の試料として使用できることがわかった。

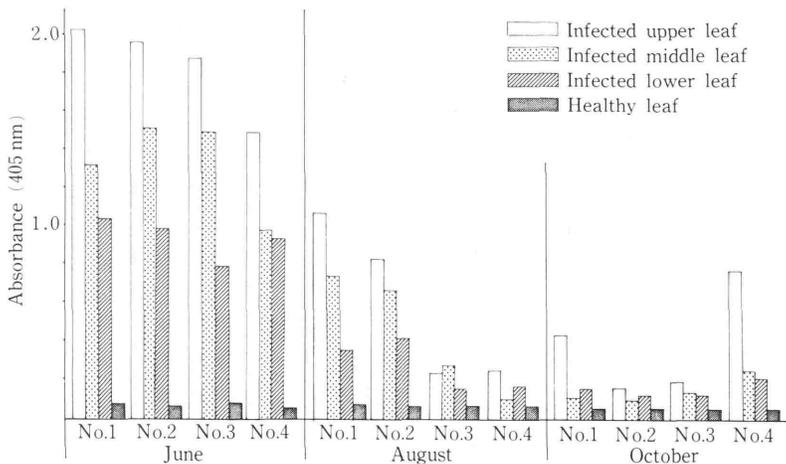


Fig. 2. ELISA detection of grapevine fanleaf virus in grapevine leaves of different growing seasons and leaf positions.

No. 1: Hsikuan, No. 2: Cabernet Sauvignon, No. 3: Merlot N, No. 4: Rkaciteli rozovjy, Healthy: Cabement Franc

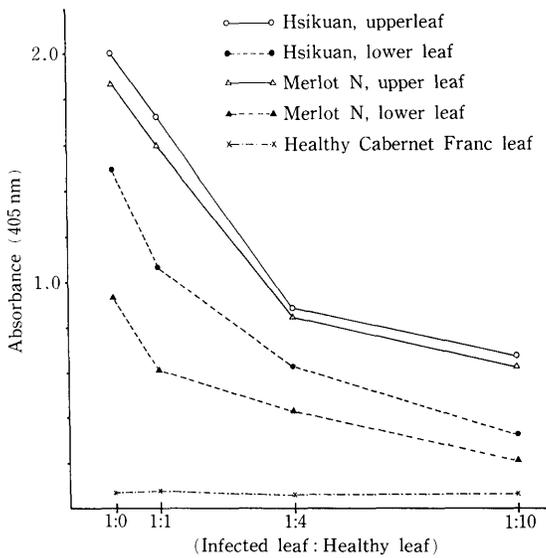


Fig. 3. ELISA detection¹⁾ of grapevine fanleaf virus in the samples mixed with infected and healthy grapevine leaves.

¹⁾ ELISA was done in June.

3. 大量一括検定法の検討

多数の個体から採取した葉を1検体として取りあつかってもELISA法によるGFVの検出が可能であれば、大量の個体について効率よく検査ができる。そこで罹病葉と健全葉とを重量比で1:0から1:10の割合で混合し、どの割合までGFVが検出できるかを調査した。

GFV罹病葉として“西管”と“Merlot N”の、また健全葉としてウイルスフリーの“Cabernet Franc”のそれぞれの上位葉と下位葉を用いた。GFVのウイルス濃度を均一にするため採取葉を安全カミソリで品種ごとに細切した後、健全葉と一定割合で混合して検定用試料とした。

試験は、6月、8月および10月の3回行ったが、6月の結果のみをFig. 3に示した。6月においては、“西管”と“Merlot N”の上位葉・下位葉とも、罹病葉と健全葉との混合比が1:10でも十分にGFVが検出できた。8月においては“西管”の上位葉では1:10、下位葉では1:4、また“Merlot N”の上位葉では1:1までGFVを検出することができた。10月においては“西管”の上位葉では1:1まで、また、“Merlot N”においては健全葉を混合しない1:0の区のみでGFVを検出することができた。

全期間を通じて“西管”のELISA値が“Merlot N”の値より、また上位葉の値が下位葉の値より高く、品

種や葉位によりGFV濃度に差異が認められた。

これらのことから、6月にブドウ葉を採取して、それらの10個体分を1検体として検定を行っても、仮に1本の罹病個体があったとしても、十分GFVの検出が可能と思われた。

考 察

検討した磨砕液のうちPBS-T+0.2%アルブミン+0.2% Sodium diethyldithiocarbamate (DIECA)+2.0% Polyvinyl pyrrolidone (PVP)は西尾ら(1981)が、また2.5%ニコチン加用リン酸緩衝液は今田・成沢(1984)がブドウ葉からのGFVの検出に適していると報告したものである。

本試験では、これらを含めて9種の磨砕液(Table 1)を用いて、ELISA検定における発色の程度を詳細に比較した結果、ニコチンを基本とする溶液でブドウ葉を磨砕すればELISA値が常に高く、容易にGFVを検出できることがわかった。

発色が悪く、ブドウ葉の磨砕液として不適當であったクエン酸緩衝液などにニコチンを加えれば、一様にELISA値が高くなることから、ブドウ葉中のGFVを検出するのにニコチンが重要な働きをしていることが確認された。

PVPは、CLARK and ADAMS (1977) や久原(1980)が非特異発色をおさえる作用があることを報告しており、本試験においてもPVPを加えたニコチン溶液は、ニコチン単独の場合より、ELISA値が若干高く、結果も安定していることおよびニコチン加用リン酸緩衝液より調整が簡単なことから、ブドウ葉の磨砕液として2.0% PVPを加えた2.5%ニコチン溶液が最適であると判断した。

また、このPVPを加えたニコチン溶液は*C. quinoa* や干日紅などの草本植物に接種しても葉害は全く現われず、ELISA検定用の磨砕液の一部を同時に草本検定用の接種源として、GFVや他のNepovirusの検出を行うことができた(未発表)。

4品種の鉢植えブドウ樹を用いて、季節および葉位によるELISA値の変動を検討した試験で、6月、8月では上・中・下位葉、10月においても上位葉からGFVを検出することができた。

ブドウ樹からのGFVのELISA検定において、今までに西尾ら(1981)は春の新芽と夏の未展開葉から、また、SHANMUGAMATHAN and FLETCHER (1982)、今田・成沢(1984)およびKEARNS and MOSSOP (1984)は春葉または若葉からGFVが検出されることを報告

しているが、夏期から秋期のブドウ葉からの検出は成功していなかった。本試験においては、8月・10月のブドウ葉からもGFVの検出は可能であったが、これは主としてニコチン溶液を葉の磨砕液として用いたことにより、ウイルスの検出感度が向上したためと思われる。

ELISA法によるGFVの検出限界については、多数の苗木について検査するという実用的観点から罹病葉と健全葉とを混合してGFVの検出を試みた。6月においてはいずれの葉を用いても罹病葉と健全葉との重量比が1:10でも十分にGFVの検出は可能であった。しかし供試した2品種のうち“西管”のELISA値が“Merlot N”のそれより常に高く、品種によって葉中のGFV濃度に差があることが予想されるので、一括検定を行う場合には上位葉を検定試料とする方が良いように思われる。

また、ブドウ樹の白色の新根は、ELISA値も高く、十分検定用試料となり得ること、およびSHANMUGANATHAN and FLETCHER (1982)が休眠芽からGFVを検出していることなどから、葉・新根・休眠芽などいずれかを生育時期に応じて試料とすれば、周年GFVのELISA検定は可能であると思われる。

ELISA法によるGFVの検出感度は、西尾ら(1981)やSHANMUGANATHAN and FLETCHER (1982)によれば、*C. quinoa*による検出より鋭敏であることを報告している。したがって特に多数の苗木を検査する隔離検疫に、本試験で得られた知見を生かして、ELISA法を導入することは、検疫の効率化・迅速化が計られると同時に検査精度を一段と向上させることができるといえる。

摘 要

ブドウ樹からELISA検定によってgrapevine fanleaf virus (GFV)を検出するさい、その検出精度に影響する種々の要因について、網室内で鉢植栽培した4品種のGFV罹病ブドウ樹を用いて検討した。

9種類の磨砕液を用いて、GFVの検出精度を比較検討したところ、2.0% polyvinyl pyrrolidone (PVP)を含む2.5%ニコチン溶液が、ELISA値も常に安定して高く、また溶液の調整も簡単なことから、GFV検出に最も適していると思われた。

葉の採取時期については、6月に採取した葉が最も高いELISA値を示した。ELISA値は季節が進むにつれて低下したが、8月では、上・中・下位葉すべてから、また10月では上位葉からGFVが検出された。葉位の異なる葉のELISA値の比較から、上位葉(若葉)はブドウ樹の生育時期に関係なく、ELISA検定にとって最もよい試料であることがわかった。

罹病葉と健全葉とを混合した試料からGFVが検出される混合割合は、6月では1:10、8月では1:1、10月では1:0であった。

以上の結果から、6月ごろの若葉を採取し、磨砕液として2.0% PVPを含む2.5%ニコチン溶液を用いることによって、大量のブドウ樹についてGFVに対するELISA検定を最も効率良く行うことができるといえる。

引 用 文 献

- 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.
- 今田 準・成沢信吉(1984) 酵素結合抗体法(ELISA)によるGrapevine fanleaf virusの検出. 果樹試報 **E5**: 71-76.
- KEARNS, C.G. and D.W. MOSSOP (1984) Detection of nepoviruses of *vitis vinifera* in New-Zealand using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *N.Z. Journal of Agric. Hural Research* **27**: 431-435.
- 小林敏郎・川合 昭・西尾 健・松寿美文(1980) 輸入検疫中にヨーロッパ産ブドウから分離されたGrapevine fanleaf virusおよびArabis mosaic virus. 植防研報 **16**: 49-57.
- 久原重松(1980) 酵素結合抗体法(ELISA)による植物ウイルス病の診断. 植物防疫 **34**(3): 129-135.
- 西尾 健・小林敏郎・加藤幹雄(1981) ELISA法(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)によるGrapevine fanleaf virusの検出. 植防研報 **17**: 43-50.
- SHANMUGANATHAN, N and G. FLETCHER (1982) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Detect Fanleaf virus in Grapevine Grown in Containers. *Plant Diseases*. **66**(8): 704-707.
- 田中寛康(1983) ヨーロッパおよびアメリカで見たブドウウイルス病. 植物防疫. **37**(4): 162-166.