

ELISAによる Apple stem grooving virus の 検出について

難波 一郎・前川 晃 演
田中 安彦・山下 博

神戸植物防疫所 国際第二課

Studies on the Detection of apple stem grooving virus by ELISA. Ichiro NAMBA, Akinobu MAEKAWA, Yasuhiko TANAKA and Hiroshi YAMASHITA (Kobe Plant Protection Station). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* 28: 13-19 (1992).

Abstract: ELISA methods was applied to detect apple stem grooving virus (ASGV) from apple and pear leaves. Antiserum was prepared by injection of purified ASGV (p-208) into a rabbit. The antiserum had titre of 1:512 against purified ASGV. Enzyme conjugate was made with alkaline phosphatase. The optimal concentration for coating and conjugated IgG were 5 μ g/ml and 1:100 dilution, respectively. Four apple trees and six pear trees infected with ASGV were used for this test. ASGV was detected from the apple leaves by direct double antibody sandwich method. Test samples were grinded with PBT-PVP (phosphate buffer containing Tween-20 and polyvinyl pyrrolidone: pH 7.0) extraction buffer. Modified ELISA (test sample and conjugated IgG were mixed and incubated simultaneously) was adopted to detect ASGV from the pear leaves. Ovalbumin, nicotine and DIECA were added to the PBT-PVP extraction buffer to grind the pear leaves.

Key words: Apple stem grooving virus, ELISA

はじめに

Apple stem grooving virus (ASGV) は apple chlorotic leafspot virus とならびリンゴでは高接病の病原ウイルスとして重要なウイルスのひとつである。また、本ウイルスはリンゴからだけでなく、隔離検疫においてナン・ウメからも検出されている (元島ら, 1983; 高橋ら, 1990)。

現在 ASGV の検定は *Chenopodium quinoa* への汁液接種およびミツバカイドウ MO-65 等への接木接種により行っているが、これらの方法は検出に長期間を有したり、施設等を必要とする。近年より迅速な検出方法として ELISA がいくつかのウイルスの検出に用いられている。本ウイルスの ELISA の検出については、FUCHS (1980, 1982)、柳瀬ら (1986) による報告がある。そこで検疫に ELISA を導入するためにウイルス抗血清を作製し、ELISA を行う際の条件について検討した。

その結果リンゴでは直接二重抗体法 (CLARK and

ADAMS; 1977) により、またナンではこれを一部改変した方法 (FLEGG and CLARK; 1979) により本ウイルスが検出できることがわかったので報告する。

なお、本試験を行うにあたり、有益な御助言ならびに ASGV 罹病植物を分譲いただいた農林水産省果樹試験場柳瀬春夫博士、前弘前大学農学部沢村健三教授、横浜植物防疫所病菌課および同所大和園場各位に厚くお礼申しあげる。

材料及び方法

供試ウイルス

抗血清作製に用いたウイルス株は果樹試験場から分譲されたリンゴ由来の ASGV 分離株 (P-208) を使用した。

ELISA による検出のために供試した ASGV 罹病樹として、リンゴでは果樹試験場から分譲を受けた P-208, P-1, P-5 (以上国内産) および当所で ASGV を検出したオーストラリア産リンゴ (AW-3)* の 4 分離株を、ナンでは横浜植物防疫所大和園場から分譲を受けた中国産ナン扁菊 (C1) および鴨梨 (C2)**、弘前大学から分譲を受けた西洋ナン fremish beauty (FB) なら

* 農林水産省指令 3 神植第 1116 号

** 農林水産省指令 3 横植第 1631 号

びに当圃場で罹病を確認した日本ナシ（二十世紀：K20C, 二十世紀：T20C, 長十郎：FK）の6分離株を用いた。健全対照区としては実生リンゴおよび実生マメナシを用いた。

ウイルス検出に用いた部位は4~5月に採取した新葉で、一部樹皮も供試した。

純化および抗血清作製

ASGV分離株（P-208）を *C. quinoa* で増殖し、沢村ら（1980）の方法を一部改変してウイルス純化をおこなった（Fig. 1）。

抗血清作製は精製ウイルスを柳瀬ら（1986）の方法に準じて家兎に長い免疫期間（4カ月）をかける方法とし、皮下注射を1回、筋肉注射を4回、静脈注射を3回行い、最後の静脈注射1週間後に採血した。得られた抗血清を *C. quinoa* 健全葉可溶性分画で吸収した。精製ウイルスとのリングテストでの力価は512倍であった。

抗血清からのIgGはアフィゲルプロテインA抗体精製キット（日本バイオ・ラッドラボラトリーズ社）を用いて純化を行い、1 mg/ml濃度に調整した後、一部はコーティング用IgGとして用いた。アルカリフォスファターゼ結合抗体（コンジュゲート）の作製はCLARK and ADAMS（1977）に従い以下の方法により行った。アルカリ性リン酸分解酵素（Phosphatase, Alkaline, Type VII-S, SIGMA社）にIgGを加え溶解し、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で1日透析後、0.2%となるようにグルタルアルデヒドを加え、22~25°Cで2時間静置後PBSおよび0.05 M トリス緩衝液で透析、アルブミン（globulin-free, SIGMA社）を1%、アジ化ナトリウムを0.05%となるように加えて作製した。なお、IgGと酵素の混合比は1:2.4とした。

ELISA

ウイルスの検出は直接二重抗体法でCLARK and

Infected <i>C. quinoa</i> leaves	Add 2-3 vol. (W/V) of 0.02 M phosphate buffer pH 7.2 containing 0.01 M EDTA and L-cysteine monohydrochloride
	Grind
	Squeeze through cheesecloth
Crude sap	Add Mg-bentnite suspension and stir. Repeat several times (total volume 6.5-10.5 mg bentnite /10 g infected leaves-weight) Centrifuge at 3,000 rpm for 10 min.
Supernatant	Store at 4°C for 1 hr.
	Centrifuge at 10,000 rpm for 10 min.
Supernatant	Add 7% PEG and 0.02 M NaCl
	Store at 4°C for 2 hr and centrifuge at 7,000 rpm for 15 min.
Pellet	Resuspend in 0.01 M phosphate buffer pH 7.2 containing 0.01 M EDTA and 1% triton-X
	Store at 4°C overnight
	Centrifuge at 10,000 rpm for 10 min.
Supernatant	Layer on rete sucrose density gradient tubes (10-40%)
	Centrifuge at 23,000 rpm for 100 min.
Viral zone	Centrifuge at 40,000 rpm for 120 min.
Pellet	Resuspend in distilled water

Fig. 1. Procedure of purification of ASGV

ADAMS (1977), FLEGG and CLARK (1979) および柳瀬ら (1986) の方法に準じて行った。1 試料あたりマイクロタイタープレートの 2 well を使用して、405 nm の吸光度の平均値をその試料の ELISA 値とし、健全対照区の 2 倍以上となったものを ASGV が検出された試料とした。

結 果

まずコーティング用 IgG およびコンジュゲートの最適希釈倍率を *C. quinoa* 健全葉と罹病葉 (ASGV P-208) を用いて求めた。この場合の試料は 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0; Tween-20 0.05%, ポリビニルピロリドン 2%, 卵白アルブミン 0.2% 含有) で磨砕した。コーティング IgG の希釈倍率として 50, 100, 200, 400, 800 倍の 5 区を、コンジュゲートの希釈倍率として 50, 100, 200 倍の 3 区を設け試験を行ったところ、同コンジュゲート希釈値の場合コーティング IgG 希釈倍率 50, 100, 200 倍の 3 区の吸光度に差はなかったが、400 倍以上になると、罹病区の吸光度が低下し、健全対照

区との差が明確でなかった。コンジュゲート希釈倍率は 3 区のなかで 100 倍が最も罹病区と健全区が明確であった。

以上の結果から、以降の試験ではコーティング IgG の希釈倍率を 200 倍 (5 µg/ml)、コンジュゲートの希釈倍率を 100 倍とした。

つぎに磨砕緩衝液について検討した。リンゴ (P-208+AW-3 及び実生リンゴ)、ナン (FB 及び実生マメナン) の新葉をリン酸塩、クエン酸塩、炭酸塩および 2.5% ニコチンを基本とした 15 種類の緩衝液の 10 倍容量で磨砕し、ELISA を行い、その値を比較した。その結果、リンゴ新葉の場合、ニコチンを基本とした緩衝液他 2 種類の緩衝液以外の緩衝液で ASGV を検出できたが、緩衝液間では ELISA 値の差はほとんど認められなかった。また、ナン新葉の場合ではどの緩衝液を用いても ASGV を検出できなかった (Table 1)。

そこで、15 種類の緩衝液の中からリン酸塩を基本としたもの (0.01 M リン酸緩衝液, Tween-20 0.05%, ポリビニルピロリドン 2%, 含有; pH 7.0) を用いて、これに卵白アルブミン、ニコチン、ジエチルジチオカル

Table 1. Effect of extraction buffer on ELISA value

buffer	ELISA value			
	apple leaves		pear leaves	
	infected* ¹	healthy	infected* ²	healthy
1. 0.01 M Na PBT-PVP (pH 7.0)	0.20	0.09	0.11	0.10
2. 0.1 M Na PBT-PVP (pH 7.0)	0.20	0.08	0.11	0.11
3. 0.01 M Na-K PBT-PVP (pH 7.0)	0.19	0.09	0.11	0.10
4. 0.1 M Na-K PBT-PVP (pH 7.0)	0.20	0.09	0.11	0.11
5. 0.01 M K PBT-PVP (pH 7.0)	0.19	0.08	0.12	0.10
6. 0.1 M K PBT-PVP (pH 7.0)	0.17	0.08	0.11	0.10
7. 0.01 M Na PBT-PVP (pH 7.8)	0.20	0.08	0.08	0.06
8. 0.1 M Na PBT-PVP (pH 8.0)	0.18	0.08	0.09	0.07
9. 0.1 M Na-K PBT-PVP (pH 8.0)	0.17	0.07	0.09	0.07
10. 0.01 M K PBT-PVP (pH 7.9)	0.22	0.08	0.08	0.09
11. 0.1 M K PBT-PVP (pH 8.0)	0.14	0.08	0.09	0.07
12. 0.01 M K carbonate buffer + 0.05% Tween-20 + 2% PVP (pH 8.3)	0.21	0.08	0.10	0.10
13. 0.01 M Na citrate buffer + 0.05% Tween-20 + 2% PVP (pH 7.0)	0.19	0.10	0.11	0.09
14. 0.1 M K citrate buffer + 0.05% Tween-20 + 2% PVP (pH 7.0)	0.22	0.09	0.11	0.09
15. 2.5% nicotine + 2% PVP	0.11	0.08	0.10	0.10

PBT-PVP: phosphate buffer + 0.05% Tween-20 + 2% polyvinylpyrrolidone, PVP: polyvinylpyrrolidone

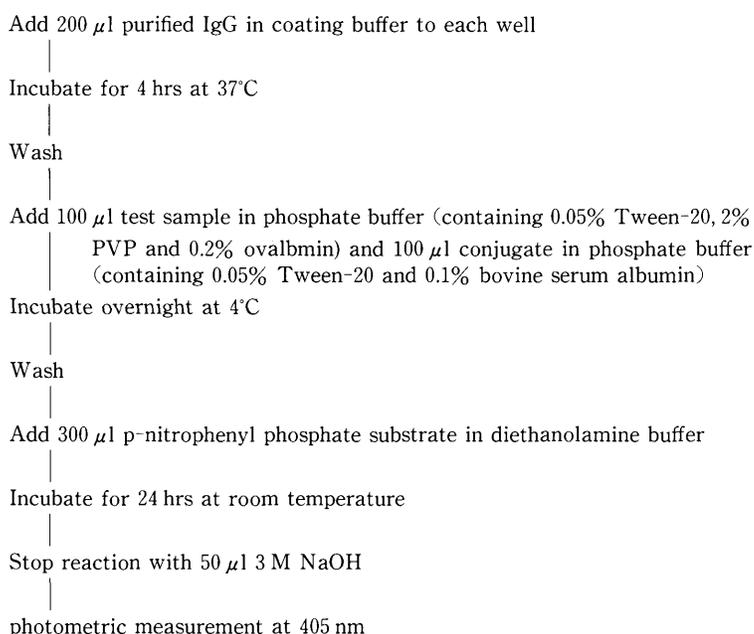
*¹ Isolate: P-208+AW-3, *² Isolate: FB

Table 2. ELISA value on different extract buffers and procedures

buffer	ELISA value of apple leaves				ELISA value of pear leaves			
	procedure A		procedure B		procedure A		procedure B	
	infected* ¹	healthy	infected* ¹	healthy	infected* ²	healthy	infected* ²	healthy
a	0.41	0.05	0.39	0.14	0.06	0.09	0.09	0.16
b	0.23	0.04	0.26	0.10	0.03	0.06	0.05	0.07
c	0.29	0.06	0.41	0.19	0.05	0.06	0.09	0.15
d	0.11	0.04	0.24	0.08	0.02	0.01	0.06	0.07
e	0.20	0.06	0.38	0.18	0.06	0.08	0.04	0.06
f	0.04	0.05	0.11	0.08	0.04	0.07	0.06	0.09
g	0.21	0.06	0.13	0.09	0.59	0.09	0.03	0.04
h	0.25	0.06	0.22	0.10	0.06	0.13	0.02	0.06

a: PBT-PVP (0.01 M Na-K phosphate buffer containing 0.05% Tween-20 and 2% polyvinyl pyrrolidone, b: a+nicotine (0.05%), c: a+ovalbumin (0.2%), d: a+nicotine (0.5%)+ovalbumin (0.2%), e: a+ovalbumin (0.2%)+sodium thioglycollate (0.1%), f: a+nicotine (2.5%), g: a+nicotine (0.5%)+ovalbumin (0.2%)+DIECA (0.01 M), h: a+ovalbumin (0.2%)+DIECA (0.01 M)

*¹ Isolate: P-208+AW-3, *² Isolate: FB

**Fig. 2.** Modified procedure of ELISA (procedure A)

バミン酸ナトリウム(DIECA), チオグリコール酸ナトリウムを添加した合計8種類の緩衝液を作製し, その効果について比較検討した(Table 2)。また, この試験に並行して川合・西尾(1989)の方法に準じ, 試料磨砕液とコンジュゲートを等量(100 μl)同時にwellに投入して(コンジュゲート最終希釈倍率100倍)4°C

一晩静置した場合(操作A: Fig. 2)を設けて, 従来の手順どおり磨砕試料処理とコンジュゲートの処理を別々に行う常法(操作B: Fig. 3)とのELISA値を比較した(Table 2)。

その結果, リンゴでは両操作方法でも添加物によってELISA値が低下し, ニコチン, DIECAを加えた区

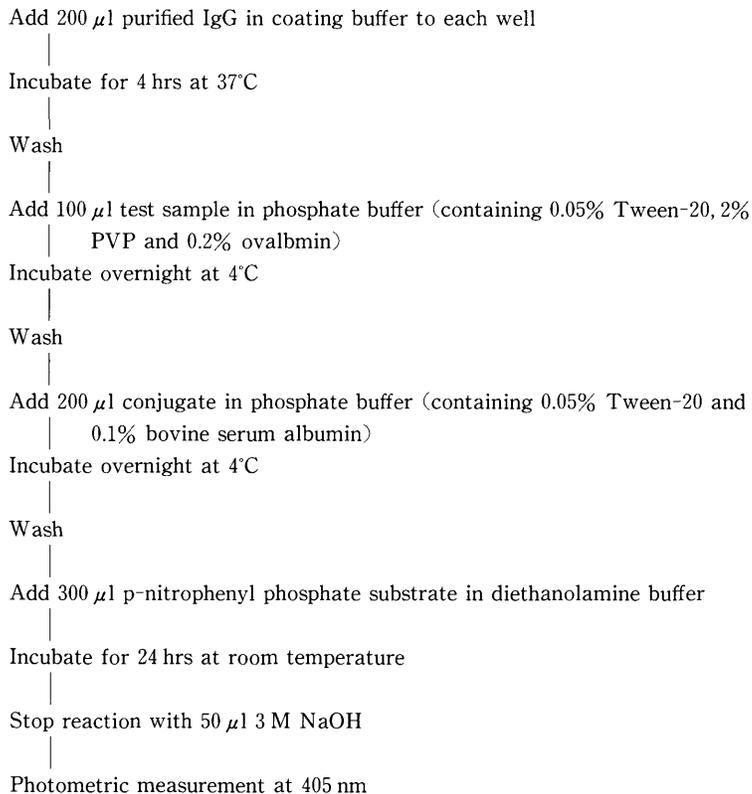


Fig. 3. procedure of ELISA (procedure B)

では、検出できないものもあり、基本としたリン酸緩衝液（緩衝液 a）が最も良い結果となった。ナシで ASGV を検出できたのは卵白アルブミン・ニコチン・DIECA を加えた磨砕緩衝液（緩衝液 g）を用い、操作 A を行った場合のみで、同緩衝液を用いた操作 B とくらべて健全区ではあまり変化がないが、罹病区の ELISA 値が高くなった。

以上の結果より、リンゴの磨砕緩衝液に（a）を、ナシの磨砕緩衝液に（g）を使用し、春期（4～5月）の新葉及び樹皮（休眠枝）を用いて ELISA による ASGV 各分離株の検出状況および操作 A と操作 B での ELISA 値の違いについて比較した（Table 3）。

リンゴでは、操作 B により、新葉から 4 分離株とも ASGV を検出でき、ナシでは操作 A により調査した 6 分離株の新葉および 3 分離株の樹皮すべてから ASGV が検出できた。

また、樹皮については秋期（10月、当年枝）にリンゴでは操作 B、ナシでは操作 A により、各分離株の検出状況を調査した（Table 4）。

その結果、リンゴからは各分離株とも秋期当年枝の樹皮から ASGV を検出できたが、ナシからは ASGV の 1 分離株を検出できなかった。

考 察

FUCHS（1980）がリンゴから直接二重抗体法による ASGV の検出で、草本検定の結果とよく一致したことを報告しているが、柳瀬ら（1986）はこれに対し、直接二重抗体法では使用する抗血清によっては検出できない ASGV の系統が存在し、特にリンゴとナシの ASGV の間で血清反応の特異性が大きいことを示唆している。

今回筆者らは、リンゴ由来の抗原で作製した抗血清を使用し、柳瀬ら（1986）が行った直接二重抗体法とほぼ同様の方法で ELISA を行い、供試したリンゴの 4 分離株すべてが検出可能であった。しかし、ナシからは同方法では検出できなかった。

ナシから ASGV を検出できたのは、変法によってで

Table 3. Detection of ASGV from bark and young leaves of apple and pear trees in spring

plant tested	ELISA value			
	procedure A		procedure B	
	bark	leaves	bark	leaves
APPLE*¹				
P-1	0.69	0.56	0.66	0.89
P-5	0.67	0.64	0.65	0.70
P-208	—	0.96	—	1.14
AW-3	0.50	0.36	1.35	0.99
healthy	0.37	0.22	0.33	0.32
PEAR*²				
C1	0.27	0.27	0.10	0.25
C2	0.46	0.41	0.22	0.15
FB	0.46	0.31	0.23	0.58
K20C	—	0.30	—	0.39
T20C	—	0.29	—	0.59
FK	—	0.25	—	0.91
healthy	0.13	0.11	0.09	0.55

*¹ extract buffer: PBT-PVP*² extract buffer: PBT-PVP+nicotine (0.5%)+ ovalbmin (0.2%)+DIECA (0.01 M)**Table 4.** Detection of ASGV from bark of apple and pear trees in autumn

plant tested	ELISA value	plant tested	ELISA value
APPLE*¹		PEAR*²	
P-1	1.36	C1	0.01
P-5	1.17	C2	0.16
P-208	1.62	FB	0.23
AW-3	1.25	K20C	0.17
healthy	0.51	T20C	0.21
		FK	0.13
		healthy	0.02

*¹ extract buffer: PBT-PVP procedure B*² extract buffer: PBT-PVP+nicotine (0.5%)+ ovalbmin (0.2%)+DIECA (0.01 M) procedure A

あった。FLEGG and CLARK (1979) および FUCHS (1982) が apple chlorotic leaf spot virus (CLSV) を、川合・西尾 (1989) が citrus tatter leaf virus をこの方法によって検出している。検出できた磨砕緩衝液は

リン酸緩衝液 (0.01 M, pH 7.0; Tween-20 0.05%, ポリビニルピロリドン 2%, 含有) に卵白アルブミン (0.2%), ニコチン (0.5%), DIECA (0.01 M) を加用したもので、ニコチン, DIECA のどちらか一方が欠けても検出できなかった。

また、この試料磨砕液とコンジュゲートを同時に well に投入する変法は、上記磨砕緩衝液を用いた場合、常法とくらべて罹病区の ELISA 値が高くなった。FLEGG and CLARK (1979) は CLSV の ELISA の場合にはコンジュゲートがウイルスに結合する前にツィーン加用リン酸緩衝生理食塩水 (PBS-T) で洗浄すると、PBS-T 中の食塩成分がウイルスに悪影響を与えているのではないかと推測している。

ASGV の場合も、試料磨砕液とコンジュゲートを同時に well に投入する変法でナンからも十分検出されることが分かった。また本法は、検疫に導入する場合常法と比較すると、検定時間の短縮につながり、有益な方法と考える。

今後はより多くの分離株・系統に対する調査を行うとともに、罹病区の ELISA 値を上げるように改良して行きたい。

摘 要

1. リンゴの高接病の病原ウイルスである ASGV は、柳瀬ら (1986) が ELISA で各種系統について検出を行っている。近年、隔離検疫において、リンゴばかりでなく、ナンやウメからも ASGV が検出されている。そこで、リンゴ・ナンからの ELISA による ASGV の検出条件を検討した。

2. 試料磨砕液は計 23 種の緩衝液について検討したところ、リンゴでは PBT+2% PVP で最も良い結果を得、供試した 4 分離株から ASGV を検出した。しかし、ナンでは直接二重抗体法ではどの緩衝液でも検出できなかった。

3. PBT+2% PVP+0.5% nicotine+0.2% 卵白アルブミン+0.01 M DIECA を磨砕緩衝液とし、試料磨砕液とコンジュゲートを同時に well に投入する変法によりナンから供試した 6 分離株から ASGV を検出した。

引用文献

- CLARK, M.F. and ADAMS, A.N. (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of plant vir-

- uses. *J. Gen. Virol.* **34**: 475-483.
- FLEGG, C.L. and CLARK, M.F. (1979) The detection of chlorotic leafspot virus by a modified procedure of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Ann. appl. Biol.* **91**, 61-65.
- FUCHS, E. (1980) Serological detection of apple chlorotic leafspot virus (CLSV) and apple stem grooving virus (SGV) in apple trees. *Acta Phytopathol. Acad. Scient. Hung.* **15**: 69-73.
- FUCHS, E. (1982) Studies of the development of concentration of apple chlorotic leafspot virus (CLSV) and apple stem grooving virus (SGV) in apple trees. *Acta Phytopathol. Acad. Scient. Hung.* **17**(1-2): 23-27.
- 川合 昭・西尾 健(1989) Horseradish Peroxydase 標識抗体を用いたELISAの検討 植防研報 **25**: 35-37.
- 沢村健三・長田 茂(1980) リンゴスターククリムソン・デリジャスより分離した stem grooving ウイルス 弘大農報 **33**: 19-27.
- 高橋 勤・斎藤範彦・後藤正昭・川合 昭・難波成任・山下修一(1990) 隔離検疫中の中国産ウメ苗木から分離された apple stem grooving virus 植防研報 **26**: 15-21.
- 元島俊治・加藤幹雄・西尾 健・小林敏郎(1982) 隔離検疫中のナンから分離された汁液伝染性ウイルス 植防研報 **19**: 29-37.
- 柳瀬春夫・中谷房治・宗形 隆・町田郁夫(1986) 酵素結合抗体法の直接二抗体サンドイッチ法並びに間接法 (F(ab)₂法) による apple chlorotic leafspot virus 及び apple stem grooving virus の各種系統の検出 果樹試報 A **13**: 69-81.