

酵素結合抗体法 (ELISA) によるサトウキビモザイク病の血清学的診断

矢野 博・*沼口憲治・**岩井 久

(種苗管理センター・*種苗管理センター沖縄農場・**九州大学農学部)

Hiroshi YANO, Kenji NUMAGUCHI and Hisashi IWAI : Serological Detection of Sugarcane Mosaic Virus by ELISA

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) は他の方法よりも極めて鋭敏なこと, 定量的なこと, 多数の試料を一時に処理できることなど, 多量かつ迅速な診断が要求される検定業務には最適と考えられる。

本報では, 簡略化した ELISA によるサトウキビモザイクウイルス (SCMV) の検出を試みるとともに, ELISA による圃場検診を実施したので概要を報告する。

1. 実験材料および方法

SCMV-B, H, I 系統抗血清は筆者らが前報で作製したものをを用いた。これら抗血清からの γ -グロブリンおよびアルカリフォスファターゼ結合抗体 (conjugate) の作製, ならびに簡略化した ELISA の実施方法は Clark¹⁾ の方法を一部変えて行った。主な変更点は conjugate の反応時間を60分間として, 基質投入後の反応停止処理を除き, 60分後にマイクロプレート光度計パソコンシステム (コロナMTP-22) ですばやく吸光度を測定した。また, 各反応後の洗浄にマイクロプレート自動洗浄装置 (SERAWASHER-96, バイオテック社製) を用いたことである。圃場検診時の検定試料は展開葉 (+1) より若い新葉から葉片ディスク (直径 6 mm) を採取し, これを 0.05% Tween20 を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS-T) と共にウルトラディスペルサー (YAMATO 科学, LK-21) を用いて破碎した。

2. 結果および考察

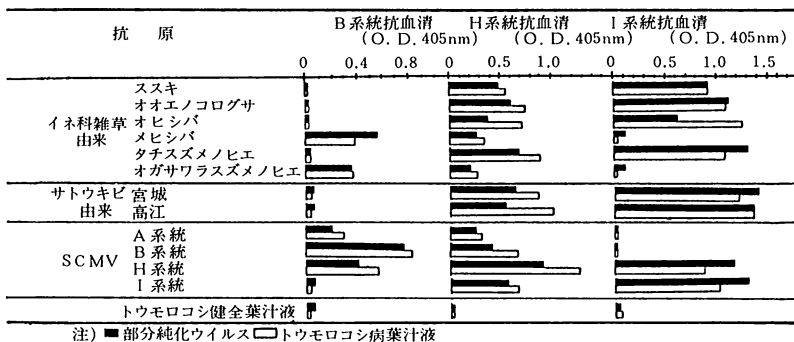
γ -グロブリンおよび conjugate の至適濃度を検討したところ, B, H, I 系統抗血清のいずれにおいてもほぼ同様の結果が得られた。すなわち, γ -グロブリン濃度を 1.0 μ g/ml, conjugate を 2000~4000 倍とした場合, 良好な反応が認められた。純化ウイルス標品を用いてウイルス

の検出限界を調べたところ, 0.1~0.01 μ g/ml まで検出可能であった。また, サトウキビ (品種: NCo310) 病葉汁液の希釈による検出限界は 10,000 倍であった。他系統各分離株との ELISA 反応は第 1 図に示すように, I 系統抗血清は H 系統, I 系統, 宮城株, 高江株, ススキ株, オオエノコログサ株, オヒシバ分離タチスズメノヒエ株と強く反応したが, A 系統, B 系統, メヒシバ株, オガサワラスズメノヒエ株との反応は極めて弱く, これらの検出は困難であった。また, B 系統抗血清は A 系統, B 系統, メヒシバ株, オガサワラスズメノヒエ株と強く反応したが, その他のウイルスとの反応は極めて弱かった。しかし, H 系統抗血清は供試したいずれのウイルスの検出も可能であった。以上のように, H 系統抗血清は血清学的特異性が極めて弱いことから, ELISA による圃場検診に利用できるものと考えられた。

1986年 9 月 4 日から 12 日間, 収穫直前の夏植え用配布苗を対象に, 87,440 茎の新葉からそれぞれ 1 枚の葉片ディスクを採取し, H 系統抗血清を用いた ELISA による圃場検診を試みた。集団破碎は葉片ディスク 10 枚以内とした。その結果, 17 穴において強い発色 (A_{405} : 0.368 ~ 1.743) が認められた。しかし, 他の穴はいずれも極めて弱い発色 (A_{405} : 0.1 以下) を示し, 簡略化した ELISA によるサトウキビモザイク病の圃場検診は SCMV の感染の有無を容易に判定できた。また, 従来の ELISA の操作手順を迅速・簡便・自動化することにより, 大幅な試料処理能力の向上が可能であることが明らかになった。

引用文献

- 1) CLARK, M. F. and ADAMS, A. N., *J. gen. Virol* 34: 475-483, 1977.



第 1 図 サトウキビモザイクウイルス系統の ELISA 反応