

Leek yellow stripe virus の dot-immunobinding assay による検出ならびにその診断への利用

野田千代一・前田 孚 憲・井上 成 信

緒 言

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) が植物ウイルス学の分野に導入されて以来、本法は種々の作物に発生するウイルスの検出、診断に広く用いられている。ELISA 法は通常ポリスチレンプレートを用いているが、最近固相としてニトロセルロース膜を用いる方法 (dot-immunobinding assay, DIBA 法)⁶⁾ が報告された。DIBA 法は ELISA 法に比較して、ウイルスの検出に要する時間が短い、反応液が少量である、反応結果の肉眼判定が容易であるなどの利点を有していることから、各種作物に発生するウイルスの検出、診断に用いられるようになった^{1,2,7,9,11,12,13)}。

本実験では *Allium* 属植物に発生する Potyvirus 群に属する leek yellow stripe virus (LYSV) の DIBA 法による検出を試み、本法が LYSV の検出、診断に有効な手法であることが認められた。

実験材料及び方法

1. 供試ウイルス

本実験には観賞用の *Allium ampeloprasum* (品種, むらさめ) から分離された LYSV を対象ウイルスとして用いた¹⁰⁾。ウイルス抗原には汁液接種により発病させた *A. ampeloprasum* (品種, みやこ) および *Chenopodium quinoa* を供試した。ウイルスの診断試験には 1988年11月に倉敷市玉島のビニールハウスで採集した100株の観賞用 *A. ampeloprasum* (品種, むらさめ) を用いた。

2. 抗血清の作成およびγグロブリンの調製

LYSV に対する抗血清は部分純化したウイルスを家兎に筋肉注射して得たもので、微滴沈降法における力価は 1:512 である¹⁰⁾。γグロブリンは健全 *C. quinoa* 葉より調製した不溶化抗原⁴⁾ で吸収した抗血清から、硫酸塩析および DEAE-セルロースカラムマトグラフィーにより精製した。γグロブリンは残存する健全成分に対する抗体を除去する

ために、以下の方法で健全成分による吸収を再び行った。健全 *C. quinoa* 葉より、0.5M りん酸緩衝液 (pH 7.5) による抽出、四塩化炭素処理、Triton X-100処理、PEG 沈澱により得た健全成分と γ -グロブリンとを混合し (約10mg健全成分/1mg γ -グロブリン)、30℃に3時間置いたのち、8,000 x g、20分間遠心分離して得た上清を一次抗体として用いた。

3. 酵素標識二次抗体 (コンジュゲート) の作成

ウサギ IgG に対する抗体は、抗ウサギ IgG (H+L)-ヤギ血清 (Cappel 社) から、ウサギ IgG を結合させた Affi-Gel 10 (Bio-Rad 社) を用いたアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。精製抗体とアルカリホスファターゼ (Type VII-S, Sigma 社) との結合はグルタルアルデヒド1段階法⁴⁾により行った。抗体と酵素との結合割合は1:2.5 (w/w) であった。

4. Dot-immunobinding assay (DIBA 法)

DIBA 法は基本的には Hibi et al.⁷⁾の方法によった。鉛筆 (6 B) で1cm四方の線を描いたニトロセルロースメンブレン (NCM, Trans-Blot Transfer Medium, Bio-Rad 社) を純水に15分間浸漬したのち、ろ紙上で5分間風乾した。植物葉組織を0.5M りん酸緩衝液、pH 7.5で磨砕して得た汁液をろ紙 (No. 2) でろ過し、それらの2 μ l をマイクロピペットにとり、NCM 上の升目の中央にスポットした。NCM を20-30分間風乾したのち、NCM 上の残存する活性部位をブロックするため、0.5M NaCl を含む0.02M Tris-HCl 緩衝液、pH 7.5 (TBS) に溶解した2% Triton X-100および2% ウシ血清アルブミン (BSA) 溶液に1時間浸漬した^{5,11)}。NCM を0.05% Tween 20 (Sigma 社) を含む TBS (TBST) の中で軽く洗浄したのち、NCM をプラスチック容器に入れ、0.2% BSA および2% polyvinylpyrrolidone を含む TBST に溶解した抗体液を1スポット当り30 μ l ずつ置き、湿室容器に入れ25℃で1時間反応させた。NCM を TBST 中で20分間振とうして洗浄後 (この間 TBST は2回交換)、上記と同様にして酵素標識二次抗体 (コンジュゲート) を1時間反応させた。NCM を洗浄後、基質溶液を置き30分間反応させた。基質溶液²⁾は0.2 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.2) に溶解した6 mg/ml fast red TR salt (Sigma 社) をろ紙でろ過したのち、1 mg/ml naphthol AS-MX (Sigma 社) 溶液と使用直前に等量ずつ混合して作成した。反応後 NCM を純水で洗浄して反応を停止したのち、ろ紙上で風乾した。

5. 診断試験

1988年11月、倉敷市玉島のビニールハウスで採集した営利栽培の観賞用 *A. ampelopersum* (むらさめ) の DIBA 法によるウイルスの診断は以下の方法により行った。試料の調製を簡略化するために、葉の小片をパラフィルム上に置き、少量の0.5M りん酸緩衝液 (pH 7.5) を加えてガラス棒で軽く押しつぶした。その汁液の1 μ l を NCM の5mm四方の升目の中央にスポットした。以後の反応操作は上記と同様にして行った。

実験結果

1. 抽出緩衝液の検討

DIBA 法におけるウイルス抗原の調製に用いる緩衝液の検討を行った。汁液接種した *C. quinoa* の接種葉（接種後10日目）数枚を細断し、それらを混合することにより均一化した。*C. quinoa* 葉300mg当り2.7mlのそれぞれの緩衝液を加え、乳鉢と乳棒で磨砕したのち、ろ紙（No. 2）でろ過した。同一の緩衝液で段階希釈した汁液を NCM 上にスポットし、一次抗体濃度： $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 、コンジュゲート希釈：1,500倍の条件で反応を行った。実験に用いた緩衝液は、0.5M, 0.1M, 0.01M りん酸緩衝液（pH 7.5）、0.5M, 0.1M ほう酸緩衝液（pH 8.0）、0.5M, 0.1M くえん酸緩衝液（pH 6.5）、0.5M 炭酸緩衝液（pH 9.6）、および TBS の9種であった。Fig. 1 に示すように、0.05M 炭酸緩衝液を除くいずれの緩衝液も10倍希釈試料では強く発色したが、100倍希釈試料では差がみられた。すなわち、3種のモル濃度のりん酸緩衝液、0.5M ほう酸およびくえん酸緩衝液では、スポットの全体が強く発色したのに対し、0.1M ほう酸緩衝液、0.1M くえん酸緩衝液および TBS ではスポットの周辺部のみが強く発色し、これらの中で差がみられ、同じ種類の緩衝液でもモル濃度の高いものほど好結果が得られた。さらに、1,000倍および10,000倍希釈試料における発色程度は、0.5M りん酸緩衝液および0.5M くえん酸緩衝液が他のものより比較的明瞭であった。同様の試験を汁液接種により発病させた *A. ampeloprasum*（品種、みやこ）の全身感染葉を用いて行ったところ、同様の結果が得られた。以上のことから、抽出用緩衝液には0.5M りん酸緩衝液あるいは0.5M くえん酸緩衝液を使用するのが良いと判断された。

2. ブロッキング溶液への Triton X-100 添加の影響

植物汁液をスポットした NCM を Triton X-100 を含まないブロッキング溶液（TBS に溶解した2% BSA）で処理した場合、低希釈倍率の試料では植物汁液の緑色成分が残った。一方、2% Triton X-100 を含むブロッキング溶液で処理した場合、NCM 上の緑色成分が完全に除去された。両処理区における特異的発色および非特異的発色を比較したところ、感染試料の特異的発色は両処理区において差がみられなかったが、健全試料の非特異的発色は Triton X-100 を含まない区において顕著であった。

3. 一次抗体およびコンジュゲート濃度の決定

前項の実験において、DIBA 法が LYSV の検出に有効であると考えられたので、*Allium* 属植物からの本ウイルスの検出を試みた。汁液接種により発病させた *A. ampeloprasum*（品種、みやこ）の全身感染葉および実生から育てた健全植物葉を0.5M りん酸緩衝液で磨砕して得た汁液を試料として用いた。予備実験において、 $4\mu\text{g}/\text{ml}$ の一次抗体および1,000倍希釈のコンジュゲートを用いた場合、低希釈倍率の健全試料（10, 100倍希釈）において非特異的発色が認められた。この原因を明らかにするために以下の実験を行った。健全アリウム葉の粗汁液を用いて、1) 健全葉汁液のみ、2) 健全葉汁液とコンジュゲート、3) 健全葉汁液、一次抗体、コンジュゲートの3区を設定してそれぞれの発色をみた。1区においては全く発色しなかったが2区においてはかすかに発色した。しかし、一次抗

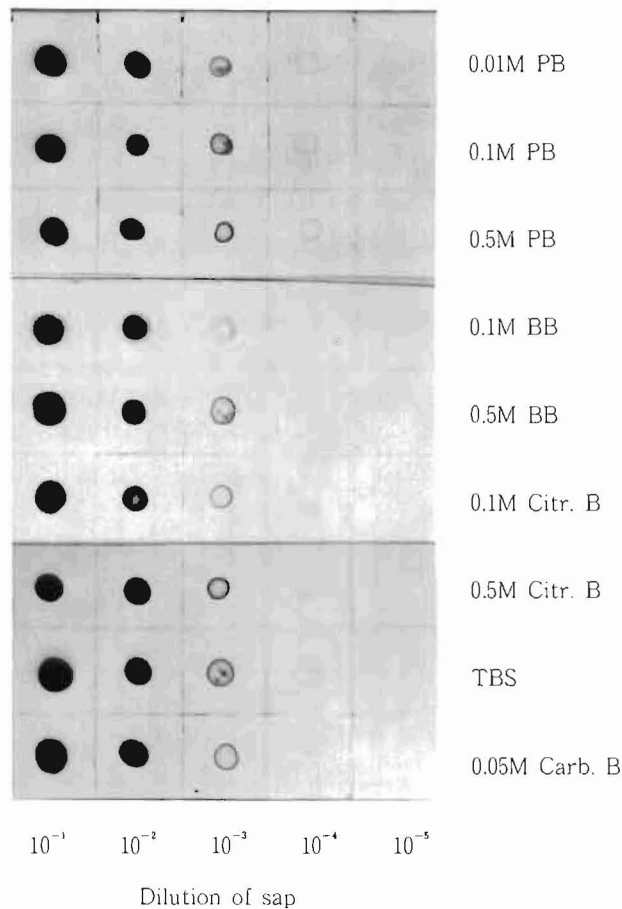


Fig. 1. Effect of extraction buffers on detection of leek yellow stripe virus in sap from infected *Chenopodium quinoa* leaves by dot-immunobinding assay. PB: phosphate buffer, pH 7.5; BB: borate buffer, pH 8.0; Citr. B: citrate buffer, pH 6.5; TBS: 0.02M Tris-HCl buffer containing 0.5M NaCl, pH 7.5; Carb. B: carbonate buffer, pH 9.6.

体とコンジュゲートを反応させた3区では弱い発色が認められた。また、一次抗体のかわりにウサギ正常血清から精製したγグロブリンを用いても同様の結果が得られたことから、非特異的反応の原因はγグロブリンの健全植物成分への非特異的吸着によるものと考えられた。

Allium 属植物からの LYSV の検出における一次抗体およびコンジュゲートの最適濃度を決定するために、一次抗体濃度：4, 1, 0.25 μ g/ml およびコンジュゲート希釈：2,000, 4,000, 8,000倍を用いて、それぞれを組み合わせる試験した。その結果、一次抗体濃度あるいはコンジュゲート濃度が高いほど感染試料の特異的発色が強くなったが、同時に低希釈倍率(10倍)の健全試料において非特異的発色が認められた。とくに、一次抗体濃度：4 μ g/ml, コンジュゲート希釈：2,000倍の区で非特異的発色が顕著であった。LYSV の

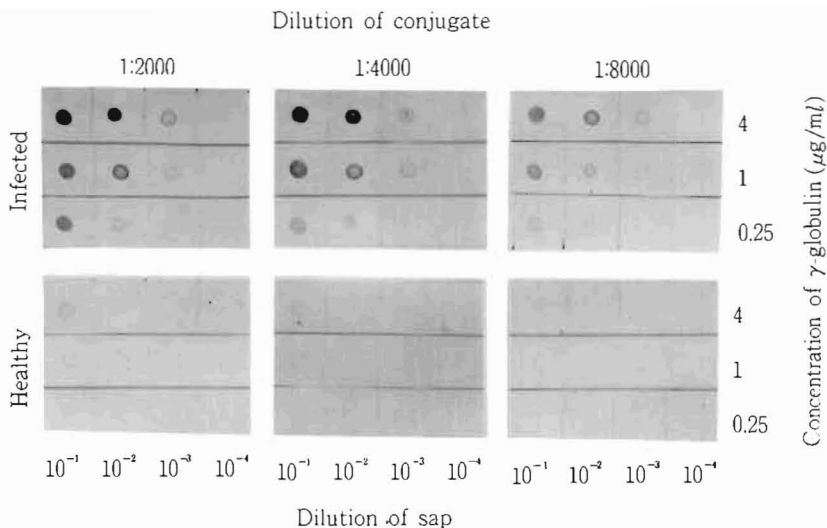


Fig. 2. Effects of concentration of first antibody and enzyme conjugate on reactions of infected and healthy extracts of *Allium* plants in dot-immunobinding assay.

検出限度は一次抗体濃度およびコンジュゲート希釈が $4\mu\text{g}$ と2,000倍, $1\mu\text{g}$ と2,000倍, $4\mu\text{g}$ と4,000倍の区においては 10^{-4} 希釈であり, 他の区はすべて 10^{-3} 希釈であった (Fig. 2). また, 感染試料の発色程度, 検出限界から判断してアリウムのウイルス濃度は *C. quinoa* の接種葉の約1/10以下であると考えられた. 上記のそれぞれの区における特異的発色と非特異的発色の強さおよびウイルスの検出限界から判断して, *Allium* 属植物からの LYSV の検出には, 一次抗体濃度: $1-2\mu\text{g}/\text{ml}$, コンジュゲート希釈: 2,000-3,000倍を用いるのが妥当であると思われた. この条件下では, 感染試料と非感染試料とを容易に識別でき, 実際の診断に利用できると思われた.

4. 圃場より採集した *Allium* 属植物の DIBA 法による診断試験

上記の実験において DIBA 法が LYSV の検出に有効な手法であることがわかったので, 本法を圃場より採集した *Allium* 属植物のウイルスの診断への応用を試みた. *Allium* 属植物は1988年11月に倉敷市玉島のビニールハウスで採集した営利栽培用の *A. ampeloprasum* (品種, むらさめ) で, 100個体からそれぞれ葉1枚を切取って検定に用いた. いずれの個体もモザイク等のウイルス病の症状を呈していた. 葉の少片をパラフィルム上におき少量の0.5Mりん酸緩衝液を加えてガラス棒で軽く押しつぶして得た汁液の $1\mu\text{l}$ をマイクロピペットに取り NCM 上にスポットした. $2\mu\text{g}/\text{ml}$ の一次抗体濃度, 2,000倍希釈のコンジュゲートの条件下で反応させた結果, 100個体中59点から LYSV が検出された. Fig. 3 に診断の結果の一部を示したが, LYSV 感染試料は明瞭なピンクのスポットとして発色し, 非感染試料とは容易に区別することができた. これらのアリウムはすべてモザイク等のウイルス病の症状を示しており, 病徴の比較的軽いものから激しいものまで色々あった. また, LYSV が検出されなかった個体および LYSV 感染試料の一部について

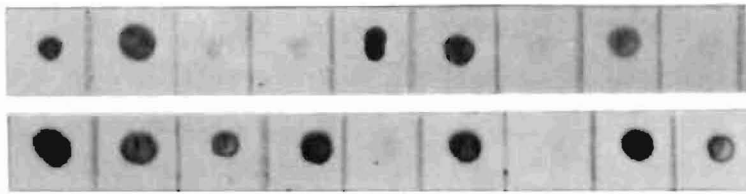


Fig. 3. An example of LYSV detection from naturally infected ornamental *Allium* plants by dot-immunobinding assay. Samples are prepared by crushing leaf tissue on a Parafilm sheet and 1 μ l of sap was dotted on the nitrocellulose membrane.

LYSVの抗血清を用いた免疫電顕法で調べたところ、すべての試料からLYSVの抗血清と反応しない長さ約650 nmのひも状ウイルスが検出された。このウイルスはgarlic latent virus (GLV)の抗血清とよく反応したことからGLVと同定された。また、これらのアリウムにはこれらのウイルス以外のウイルスにも重複感染している可能性もあり、LYSVの感染とそれぞれの個体における病徴との関係を明らかにすることはできなかった。

考 察

さきに、筆者らは観賞用アリウムからわが国で未記録のLYSVが分離されたことを報告した¹⁰⁾。LYSVは諸外国においてはリーキ等の重要な病原ウイルスであることが知られている³⁾。しかし、日本における本ウイルスの発生実態については不明である。本実験ではこれらの点を明らかにするための基礎実験として、DIBA法によるLYSVの検出、診断を試みた。DIBA法は、従来ウイルスの検出、診断に広く用いられてきたELISA法に比較して、ウイルス試料および反応液が少量でよい、検出に要する時間が短い、反応結果の肉眼判定が容易であるなどの利点を有している。一方、ウイルス濃度の定量性に関してはELISA法より劣るが、圃場から採集した試料のウイルス病の診断には有効であると考えられる。これまでに、DIBA法はtobacco mosaic virus^{7,11)}、potato virus S, X, Y²⁾、barley yellow striate mosaic virus⁹⁾、strawberry pseudo mild yellow edge virus¹³⁾、peanut mottle virus¹²⁾、tobacco ringspot virus¹¹⁾、tomato ringspot virus¹¹⁾、wheat soil-borne mosaic virus¹⁾などの植物ウイルスの検出、診断に用いられてきた。しかし、観賞用*Allium*属植物に発生するLYSVのDIBA法による診断についての報告はみられない。

DIBA法におけるLYSVの抽出緩衝液について検討したところ、0.05M炭酸緩衝液をのぞくいずれの緩衝液でも10倍希釈試料では強く発色したが、高希釈倍率の試料では差がみられた。すなわち、試験した9種の緩衝液の中では0.5Mりん酸、ほう酸、くえん酸緩衝液が他のものより強く発色し、同じ種類の塩でもモル濃度の高い緩衝液が低いものよりよかった。また、緩衝液の種類ではりん酸緩衝液が他の塩類に比較して好結果が得られた。DIBA法における抽出緩衝液は、ウイルスの抽出、安定化、NCM上へのウイルスの吸着効率に影響を及ぼすと考えられるが、本実験で得られた、緩衝液の種類による発色程度の差異が何の原因によって生じたかは明かにできなかった。LYSVの純化過程において、

高モル濃度の緩衝液、特にりん酸緩衝液を抽出緩衝液として使用することにより、ウイルスの凝集を防ぎ収量が増加することから¹⁰⁾、DIBA法においてもこれらの緩衝液を使用することにより感染組織から抽出されるウイルス量が多くなったために好結果が得られたと推察された。Yoshikawa et al.¹³⁾は strawberry pseudo mild yellow edge virus のDIBA法による検出における抽出緩衝液について検討を加え、使用する緩衝液の種類によって検出効率が大きく異なることを報告している。DIBA法の抽出緩衝液としては通常TBSが用いられているが、抽出緩衝液はウイルスの検出効率に大きく影響を及ぼすことから、それぞれのウイルスに最適の緩衝液を用いる必要がある。

ブロッキング溶液に Triton X-100 を添加することにより NCM 上の緑色成分を容易に除去することができ、同時に健全試料の非特異的発色を減少させた。同様の効果は 2, 3 の植物ウイルスの DIBA 法による検出においても報告されており^{5, 11)}、*Allium* 属植物からの LYSV の検出においてもブロッキング溶液への Triton X-100 添加の効果が認められた。

DIBA 法をウイルスの検出、診断に利用するためには、発色程度から感染試料と非感染試料とを容易に識別できることが必要である。予備実験において高濃度の一次抗体およびコンジュゲートを用いた場合、低希釈倍率の健全試料において非特異的発色が認められた。この原因を明らかにするために 2, 3 の実験を行ったところ非特異的発色の原因は主として一次抗体の健全成分への非特異的吸着であり、植物の内在酵素やコンジュゲートの非特異的吸着はほとんどないと判断された。また、この現象は一次抗体のかわりにウサギ正常血清から精製した γ -グロブリンを用いても認められたことから、非特異的発色は一次抗体液中に残存する健全成分に対する抗体によるものではなく、IgG 分子の健全成分への抗原抗体反応によらない単なる物理的な結合と考えられた。

LYSV 感染アリウムおよび健全植物を用いて LYSV の検出における一次抗体およびコンジュゲートの希釈倍率の検討を行った。一次抗体あるいはコンジュゲートの濃度が高くなるほど感染試料の特異的発色は強くなったが、同時に低希釈倍率の健全試料においても弱く発色した。感染試料および健全試料の発色程度から判断して、*Allium* 属植物からの LYSV の検出には、一次抗体濃度：1-2 μ g/ml, コンジュゲート希釈：2,000-3,000 倍を用いるのが良好であると考えられた。この条件で LYSV は感染葉汁液の 10^{-3} 希釈まで検出でき、健全試料とは容易に識別できることから、DIBA 法は実際の診断に十分利用できると判断された。

圃場より採集した *Allium* 属植物の診断において、試料の作成を簡略化するために葉の少片をパラフィルム上でガラス棒を用いて押しつぶし¹³⁾、汁液をそのまま NCM 上にスポットした。この方法を用いることにより *A. ampeloprasum* (品種、むらさめ)、100 個体中 59 個体から LYSV が検出された。LYSV 感染試料は明瞭なピンクのスポットとして発色し健全試料とは容易に識別された。これらの植物はすべてモザイク等のウイルス病の症状を呈していたが、検定したすべての個体から Carlavirus 群に属する garlic latent virus (GLV)⁸⁾ が検出された。また、これらのアリウムは LYSV, GLV 以外のウイルスにも重複感染している可能性もあり、LYSV の感染と個々の植物における病徴との関連は明らかにすることはできなかった。

摘 要

Dot-immunobinding assay (DIBA 法) による leek yellow stripe virus (LYSV) の検出条件を検討した。感染葉からの試料の作成に用いる抽出用緩衝液には0.5Mリン酸緩衝液 (pH7.5) あるいは0.5Mくえん酸緩衝液 (pH6.5) がすぐれていた。一次抗体濃度: 1-2 μ g/ml, アルカリフォスファターゼ標識抗ウサギ-IgG-ヤギ抗体 (コンジュゲート) 希釈倍率: 2,000-3,000倍を用いて *Allium* 属植物からの LYSV の検出を行った結果, 粗汁液の10⁻³倍希釈まで検出可能であった。

本法を圃場より採集した観賞用 *Allium* 属植物の診断に適用したところ, LYSV を容易に検出することができた。

文 献

1. Bahrani, Z., Sherwood, J. L., Sanborn, M. R. and Keyser, G. C. 1988. The use of monoclonal antibodies to detect wheat soil-borne mosaic virus. J. gen. Virol. 69 : 1317-1322.
2. Bantari, E. E. and Goodwin, P. H. 1985. Detection of potato viruses S, X, and Y by enzyme-linked immunosorbent assay on nitrocellulose membranes (dot-ELISA). Plant Disease 69 : 202-205.
3. Bos, L. 1981. Leek yellow stripe virus. CMI/AAB Descriptions of plant viruses, No. 240. pp. 4.
4. Clark, M. F. and Bar-Joseph, M. 1984. Enzyme immunosorbent assays in plant virology. In Methods in Virology, Vol. VII (Maramorosch K. and Koprowski, H. ed.). pp. 51-85. Academic Press, INC.
5. 藤田 隆. 1988. ヤマノイモ類 (*Dioscorea* spp.) のウイルス病に関する研究(6) DIBA 法によるヤマノイモモザイクウイルス (YMV) の検出. 日植病報 54 : 402 (講演要旨)
6. Hawkes, R., Niday, E. and Gordon, J. 1982. A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. Anal. Biochem. 119 : 142-147.
7. Hibi, T. and Saito, Y. 1985. A dot immunobinding assay for the detection of tobacco mosaic virus in infected tissues. 1985. J. gen. Virol. 66 : 1191-1194.
8. 李 龍雨・山崎昇三・尾崎武司・井上忠男. 1979. ニンニクに見出される2種のひも状ウイルス, ニンニク潜在ウイルス (garlic latent virus) ならびにニンニクモザイクウイルス (garlic mosaic virus). 日植病報 45 : 727-734.
9. Lockhart, B. E. L., El Maataoui, M., Carroll, T. W., Lennon, A. M. and Zaske, S. K. 1986. Identification of barley yellow striate mosaic virus in Morocco and its field detection by enzyme immune assay. Plant Disease 70 : 1113-1117.
10. Noda, C. and Inouye, N. 1988. Leek yellow stripe virus isolated from an ornamental *Allium* plant in Japan. Ann. Phytopath. Soc. Japan (in press).
11. Powell, C. A. 1987. Detection of three plant viruses by dot-immunobinding assay. Phytopathology 77 : 306-309.
12. Sherwood, J. L., Sanborn, M. R. and Keyser, G. C. 1987. Production of monoclonal antibodies to peanut mottle virus and their use in enzyme-linked immunosorbent assay and dot-immunobinding assay. Phytopathology 77 : 1158-1161.
13. Yoshikawa, N., Poolpol, P. and Inouye, T. 1986. Use of dot immunobinding assay for rapid detection of strawberry pseudo mild yellow edge virus. Ann. Phytopath. Soc. Japan 52 : 728-731.

Detection of Leek Yellow Stripe Virus by Dot-immunobinding Assay

Chiyoichi NODA, Takanori MAEDA and Narinobu INOUE

Summary

An indirect dot-immunobinding assay (DIBA) on nitrocellulose membrane was evaluated for detection of leek yellow stripe virus (LYSV). The use of a 0.5 M phosphate buffer, pH 7.5 for extraction of the virus gave a highly positive reaction. Addition of 2% Triton X-100 in the blocking solution removed the green stain of the plant sap without reducing the color intensity of the positive reaction of the infected *Allium* plant at dilutions of up to 1 : 10,000. The DIBA procedure was equally effective for detection of the virus in extracts of infected ornamental *Allium* plants collected from the commercial field.