琉球大学学術リポジトリ

沖縄本島北部のサトウキビおよびイネ科雑草から分離したサトウキビモザイクウイルスと酵素結合抗体法（ELISA）による血清学的診断

メタデータ	言語:
	出版者: 沖縄農業研究会
	公開日: 2009-01-29
	キーワード (Ja): サトウキビモザイク病, イネ科雑草モザイク病, ウィルス, 酵素結合抗体法（ELISA), 防除対策
	キーワード (En): SCMV
	作成者: 矢野, 博, 沼口, 憲治, 岩井, 久, Yano, Hiroshi, Numaguchi, Kenji, Iwai, Hisashi
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002015383

沖縄本島北部のサトウキビおよびイネ科雑草から分離したサトウキビモザイクウイルスと酵素結合抗体法（ELISA）による血清学的診断

矢野　博・沼口憲治*・岩井　久**
（農林水産省　種苗管理センター）
*（農林水産省　種苗管理センター沖縄農場）
**（九州大学　農学部　植物病理学教室）

Hiroshi YANO, Kenji NUMAGUCHI and Hisashi IWAI : Sugarcane mosaic virus isolated from sugarcane and wild grasses in North Okinawa Main Island, and its serological detection by enzyme-linked immunosorbent assay

はじめに

沖縄本島北部を中心にサトウキビモザイク病の発生が確認され，病勢は拡大の一途をたどっている[17・18]。本病の発生ならびに病原ウイルスを知ることは，その防除対策上はもちろん，無病種苗配布のためにも極めて重要なことである。

そこで，沖縄本島北部のサトウキビおよびイネ科雑草モザイク病株からサトウキビモザイクウイルス（SCMV）を採取し，その性状について検討を加えるとともに，SCMVの抗血清を作製し，既知SCMV系統との血清学的関係を調べた。また，他の方法よりも極めて鋭敏で，かつ多数の試料を一時に処理できることなどが要求される検定業務には最適と考えられる酵素結合抗体法（Enzyme-Linked Immunosorbent Assay : ELISA）によるSCMVの圃場検診を実施したので概要を報告する。

実験材料および方法

供試ウイルス　サトウキビ（宮城株，高江株）およびイネ科雑草（ススキ，オオエノコログサ，オヒシバ，メヒシバ，タチスズメノヒエ，オガサワラスズメノヒエ）モザイク症状葉は1982年7月に国頭郡東村での採取葉を供試した。SCMV－A系統は果樹試験場　大津善弘氏より分譲されたオガサワラスズメノヒエに由来する系統である[12]。また，SCMV－B系統，H系統，I系統は農業資源研究所放射線育種場　永冨成紀氏より分譲された系統であり，種子島で採集され，Gillaspie ら[5]により系統が同定された。

汁液接種　汁液接種はモザイク症状葉の磨砕液を接種源として，カーボランダムを用いた常法によって行なった。寄主範囲の調査に際しては接種源として感染トウモロコシ粗汁液を用いた。

アブラムシ伝搬　アブラムシ伝搬はモモアカアブラムシを3～4時間絶食させたのち，感染トウ

モロコシ（品種：中玉）上にはなち，1～3分間獲得吸汁させた。これをただちに健全トウモロコシに5～7頭移した。

物理性　粗汁液中でのウイルスの物理的性質試験にはトウモロコシの接種病葉をウイルス源に，検定植物にはトウモロコシを用い，常法に準じて行なった。

電顕観察　ウイルス粒子は2％リンタングステン酸を用いた通常のDN法により作製した試料につき電顕（日立H－300）で観察した。感染植物の超薄切片試料はサトウキビ病組織片を2％グルタールアルデヒドと2％オスミウム酸で二重固定し，エタノール脱水後，低粘性エポキシ樹脂に包埋した。包埋試料は超ミクロトーム（PUTER－BLUM MT－2B型）を用い超薄切片を作製し，酢酸ウラニルと酢酸鉛で二重染色して電顕観察した。

ウイルスの純化　ウイルスの純化は感染トウモロコシ葉を等量の0.1M リン酸緩衝液 pH7.0（PB）とともに肉挽機で磨砕し，滅菌ガーゼでろ過した後，清澄化は pH 5.0 に調整する方法によった。蔗糖密度勾配遠心は PB で 10～40%（W／V）の密度勾配を作製し，日立 SRP 28 SA ローターを用い，25,000 rpm で120分間行なった。遠心後のウイルス層は ISCO denstity gradient fractionater で分画し，超遠心によりウイルス濃縮液を得た。

抗血清の作製　抗血清は純化ウイルスに等量の Freund の完全アジュバントを加えて乳化し，筋肉注射を2週間おきに4回行ない，採血前に静脈注射を2回行なうことにより作製した。抗血清をあらかじめ等量の健全成分と 37℃ で2時間反応させた後，4℃に一晩静置し，その上清を吸収抗血清として用いた。

血清学的関係　血清反応は蔗糖密度勾配遠心前の部分純化標品を抗原として，重層法と0.4%ジョードサルチル酸リチウムを含む寒天ゲル内拡散法により調べた。免疫電顕法は Milineら[9]の方法に準じて行なった。

ELISA操作　ELISA に当たって，γ－グロブリンの精製，アルカリンフォスファターゼ（alkaline phosphatase, 7500U, Grade I. from calf intestine. Boehringer Mannheim Gmb H）結合抗体（conjugate）の作成法は Clark と Adams の方法[4]に従い，ELISA 法は Clark と Adams の方法[4]を一部変えて行なった。主な変更点はマイクロプレートII（三光純薬）を用い，Conjugate の反応時間を60分間として，基質（パラニトロフェニールリン酸ナトリウム塩，Sigma 104，5 mg／tablet）を加え，反応停止処理は除き，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，各反応後の洗浄はマイクロプレート自動洗浄装置を用いた。

ELISA検診　ELISAによ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㎜）を採取し，これを 0.05% Tween 20 を含むリン酸生理食塩水（PBS－T）と共にウルトラディスパーサー（LK－21，YAMATO 科学）を用いて破砕した。これを γ－グロブリンをプリコートしたマイクロプレートに投入（250 μℓ）し，一晩（4℃）静置した後，前記した ELISA 操作に準じた。

実験結果

原株の病徴

国頭郡東村宮城地区から採取したサトウキビ（品種：NCo 310）の病徴は緑色地に黄緑色の長楕円型の斑点が葉脈に沿って伸長拡大する。東村高江地区から採取したサトウキビの病徴は宮城株の病徴より鮮明で激しく，黄色の不規則な条斑が葉脈に沿って広がるがクロロシスは現われない。ススキ，オオエノコログサ，オヒシバ，メヒシバ，

タチスズメノヒエおよびオガサワラスズメノヒエでは病徴の差はほとんど認められず，いずれもサトウキビ（宮城株）株の病徴と類似している。

ウイルスの分離

原株病葉のＤＮ法試料にはいずれもひも状ウイルス粒子が多数電顕観察され，ウイルス粒子の長さの分布曲線はいずれもサトウキビから検出されたウイルスと類似し，700〜850 *nm* の範囲に検出数の最大ピークを持っていた。

寄生範囲

サトウキビ（宮城株，高江株）およびイネ科雑草（ススキ，オオエノコログサ，オヒシバ，タチスズメノヒエ）株はトウモロコシとサトウキビ幼苗（NCo 310, IRK67－1，RK67－35, F161）に対して明瞭なモザイク症状を呈した。メヒシバとオガサワラスズメノヒエ系はトウモロコシに軽微なモザイク症状を呈し，サトウキビ幼苗（NCo 310）に対しては潜伏感染したが，他のサトウキビ品種に対しては感染せず，寄生性にわずかの違いが認められた。

アブラムシ伝搬

モモアカアブラムシは供試したすべてのウイルス株を容易に伝搬することが判明した。ワタアブラムシはオヒシバ株を除く，他のウイルス株を伝搬した。二次伝搬試験では二次接種トウモロコシは発病せず，これらウイルス株は非永続的に伝搬されることを示した。

物理的性質

物理的性質はCostaら[3]，西沢ら[11]，中田ら[14]が検出しているSCMVと耐保存性において異なったが，その他の諸性質はほぼ一致していた（第１表）。

超薄切片像

感染サトウキビ（宮城株）葉の超薄切片像には細胞内に風車状封入体（pinwheel inclusion）および層板状封入体（bundle inclusion）が観察された（第１図）。

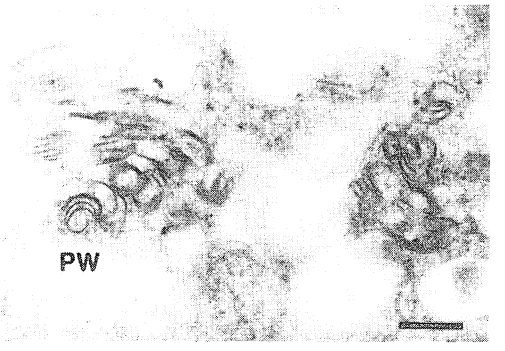
第１表　サトウキビおよびイネ科雑草に由来する病原ウイルスの物理的性質

病原ウイルスの由来植物	耐熱性[a]	耐希釈性[b]	耐保存性[c]
サトウキビ（宮城株）	50℃	1000倍	10時間
サトウキビ（高江株）	50℃	1000倍	10時間
ス　ス　キ	45℃	1000倍	8時間
オオエノコログサ	50℃	1000倍	8時間
オ　ヒ　シ　バ	50℃	500倍	10時間
メ　ヒ　シ　ベ	55℃	1000倍	10時間
タチスズメノヒエ	45℃	1000倍	10時間
オガサワラスズメノヒエ	55℃	5000倍	6時間
Costaら[3]	55℃	1000倍	24時間
西沢ら[11]	50〜55℃	1000〜1200倍	17〜20時間
中田ら[14]	50〜55℃	1000倍	24時間

試験は昭和58年６月27日，７月18日，10月14日に繰返し行なった

ａ）処理時間は10分間　ｂ）蒸留水で希釈した

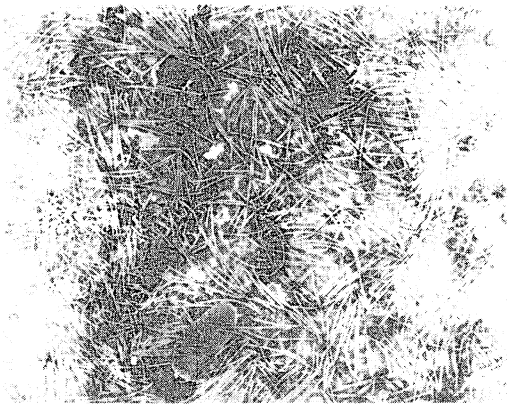
ｃ）24〜25℃の室温に保存



第１図 SCMV感染サトウキビ葉細胞の細胞質に形成された風車状封入体（PW）．スケールは500 *nm*

ウイルスの純化

SCMV感染トウモロコシ葉汁液はpH 5.0の調整処理により，その感染性が保持され，また充分な清澄化が得られた。蔗糖密度勾配遠心後，これを分画し，同時に254 *nm* の吸光度を調べたところ吸収ピークが認められた。吸収分画を超遠心し電顕観察したところ，多数のウイルス粒子が観察された（第２図）。



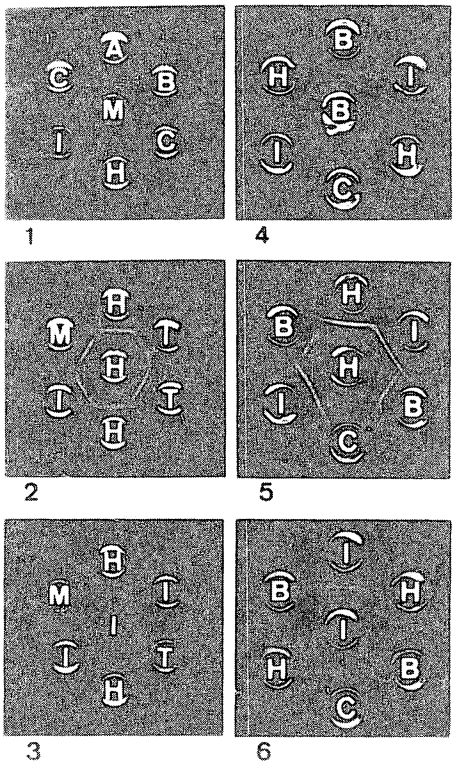
第2図　蔗糖密度勾配遠心による純化ウイルス

血清反応試験

蔗糖密度勾配遠心後の純化ウイルスを抗原として抗血清を作製したところ，力価はサトウキビ（宮城株）32倍，B系統64倍，H系統128倍，I系統256倍であった。

1）寒天ゲル拡散法

宮城株抗血清はH系統とI系統との間に明瞭な沈降線を形成したが，A系統とB系統との間の沈降線は不明瞭であった（第3図の1）。H系統とI系統の抗血清を用い，宮城株，高江株，H系統，I系統との反応を調べたところ，これら抗血清はいずれの系統ウイルスとも，それぞれ沈降線を形成した。しかし，H系統抗血清を用いた場合，H系統との沈降線は宮城株，高江株，I系統に向かってスパー（Spur）を形成した（第3図の2）。また，H系統抗血清とB，H，I系統との反応を調べたところ，いずれの系統との間にも強い沈降線が一本生じた。このうち，H系統との沈降線はB系統あるいはI系統との沈降線と融合し，これらウイルスに向かって Spur が生じた。また，B系統とI系統との沈降線はクロスした（第3図の5）。これら沈降線のパターンから，H系統ウイルスは抗原決定群の異なるB系統とI系統を一部に含んでいるものと考えられた。なお，これら抗血清とイネ科雑草ウイルス株との間における沈降線はいずれの組み合わせにおいても不明確で判定までには至らなかった。



第3図　寒天ゲル内拡散法による反応

中央は抗血清
M：宮城株　B：B系統
H：H系統　I：I系統
周囲は抗原（部分純化ウイルス）
M：宮城株　T：高江株
A：A系統　B：B系統
H：H系統　I：I系統
C：健全葉成分

2）免疫電子顕微鏡法

免疫電顕法により，H系統ウイルスとI系統抗血清との血清反応を調べたところ，ウイルス粒子の周りに抗体の付着（halo現象）がみられるウイルス粒子と halo 現象がみられないウイルス粒子の他に，一部のみ halo 現象がみられるウイルス粒子が観察された（第4図の1）。このような免

疫電顕像はB系統抗血清との血清反応においても同様に観察された（第4図の2）。また，B系統とI系統の抗血清を混合し，これを用いたH系統ウイルスとの免疫電顕像においてはいずれのウイルス粒子も halo 現象が観察されることから，H系統ウイルスは少なくともB系統とI系統との重複感染系であり，一部のウイルス粒子は end to end aggregation をおこしているものと考えられた。

第4図　免疫電顕像

1. H系統ウイルスとI系統抗血清との血清反応像
2. H系統ウイルスとB系統抗血清との血清反応像
3. H系統ウイルスとB系統・I系統混合抗血清との血清反応像

3）ELISA 反応

コーティング 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，コーティング γ－グロブリン濃度を 1.0 μg／ml，conjugate を 2,000～4,000 倍とした場合，吸光度は高かった。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 μg／ml まで検出可能であった。また，サトウキビ（品種：NCo 310）病葉汁液の希釈による検出限界は 1,000 倍まで高い吸高度を示した。他系統との ELISA 反応は第2表に示すように 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，タチスズメノヒエ株と強く反応し，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，その他のウイルス株との反応は極めて弱かった。しかし，H系統抗血清はいずれのウイルス株の検出も可能であった。

第2表　サトウキビモザイクウイルス系統のELISA反応

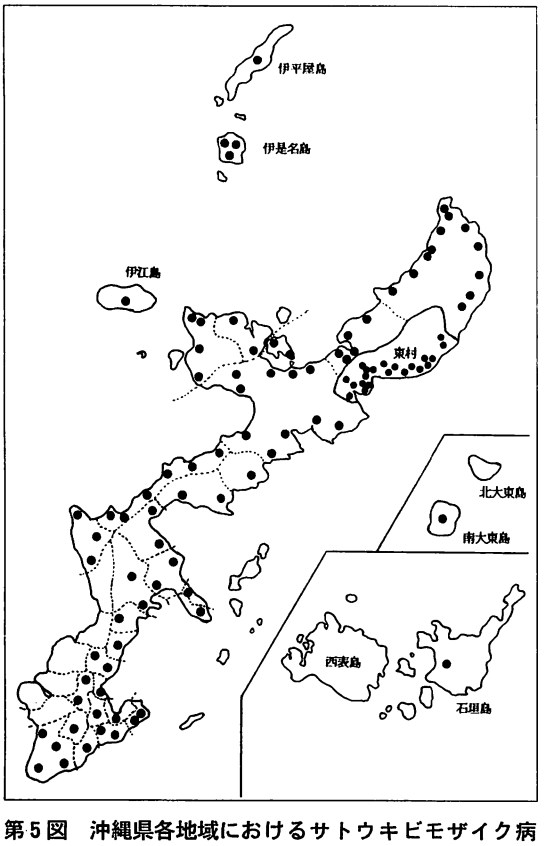
抗　原[a]	抗　血　清		
	B系統	H系統	I系統
サトウキビ（宮城株）	0.060[b]	0.623	1.391
サトウキビ（高江株）	0.094	0.537	1.346
ススキ株	0,037	0.494	0.919
オオエノコログサ株	0.042	0.598	1.160
オヒシバ株	0.024	0.355	0,605
メヒシバ株	0.478	0.237	0.106
タチスズメノヒエ株	0.041	0.673	1.276
オガサワラスズメノヒエ株	0.368	0.200	0.127
SCMV－A系統	0.169	0.236	0.054
SCMV－B系統	0.724	0.406	0.047
SCMV－H系統	0.393	0.905	1.151
SCMV－I系統	0.075	0.555	1.300
トウモロコシ健全葉汁液	0.073	0.059	0.062

a）部分純化ウイルス：トウモロコシ病葉を磨砕し，清澄化した後，濃縮遠心したウイルス標品

b）吸光度：O. D. 405 *nm*

系統の疫学的調査

昭和59年から61年に沖縄県各地のサトウキビ栽培圃場より，モザイク症状葉104検体を採取し（第5図），ELISAによるSCMVの検出を試みた。その結果，H系統とI系統の抗血清を用いた場合，供試した104検体はすべてELISA反応が認められ，容易に感染の有無が判定できた。しかし，B系統抗血清を用いた場合はメヒシバ系とオガサワラスズメノヒエ系とのみELISA反応が認められ，これら検体に対するELISA反応は極めて弱く，SCMVの検出は困難であった（第3表）。これらの結果，沖縄県各地から採取されたサトウキビモザイクウイルスは血清学的にはI系統に類別されるものと考えられた。



第5図　沖縄県各地域におけるサトウキビモザイク病採集地点

第3表　沖縄県各地より採集したサトウキビモザイク病のELISAによる系統判別

抗血清	H系統	
	B系統	I系統
採集地	東村（メヒシバ、オガサワラスズメノヒエ）	東村（21. ススキ、オオエノコログサ オヒシバ、タチスズメノヒエ） 国頭村(12)　大宜味村(5)　今帰仁村(2) 本部町(6)　名護市(12)　恩納村(6) 宜野座村(1)　金武町(2)　伊是名村(1) 伊江村(1)　伊平屋村(1)　石川市(2) 読谷村(3)　沖縄市(2)　具志川市(2) 与那城村(1)　勝連町(1)　北中城村(1) 中城村(1)　西原町(2)　南風原町(2) 与那原町(1)　大里村(1)　佐敷町(1) 東風平町(1)　知念村(2)　玉城村(2) 具志頭村(1)　糸満市(4)　南大東村(1) 石垣市(1)
計	2	102

（　）は市町村内の採集病葉数およびイネ科雑草モザイク症状葉

圃場検診

昭和61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。集団破砕は葉片ディスク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。このうち，新葉にモザイク病徴が認められなかった茎については収穫後の萌芽にモザイク病徴が認められた。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，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，大幅に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。

考　察

本報のサトウキビ（宮城株）ウイルスは700〜850 *nm* の範囲に検出数の最大ピークを持つひも

状粒子であり，感染サトウキビ細胞内にpinwheelやbundleなど細胞質内封入体を形成し，アブラムシで非永続的に伝搬されることから，potyvirus群に属するものと考えられる。また，東村内で採集したイネ科雑草モザイク病株に由来するウイルスについて調べてみると，粒子の長さ，寄生性，物理的性質などの性質はサトウキビ由来系ウイルスとほぼ同様であった。以上の所見はCastaら[3]，西沢ら[11]，中田ら[14]，鳥山ら[16]が報告しているSCMVとほぼ一致することから，サトウキビおよびイネ科雑草から分離した病原ウイルスはSCMVと同系統のウイルスと推定された。しかし，メヒシバ株とオガサワラスズメノヒエ株はサトウキビ品種に対する寄生性や病徴などが異なり，系統の存在が示唆された。

これまで，SCMVの系統はSummerら[13]，Abbott[1]の基準に従い，系統判別品種上での病徴からA～H群に類別され，その後Tippettら[15]，Gillaspie[6]，Zummoら[19]，Koike[8]らはI～M群に属する系統の発生を追加し，13系統といくつかの亜系統の存在が明らかにされている。

また，Gillaspie[7]らは台湾に発生する従来の壊疽型（necrotic type）と細条型（fine stripe type）のSCMV系統はA系統とB系統との混合感染であること，またH系統抗血清はこれらの系統とD系統のいずれの系統とも血清反応が認められることを報告している。また，Abbott[2]らの細条型の同定ではA系統とB系統の激しい病徴によってF系統の軽微な病徴がmaskされている可能性を示唆している。

本報においても，H系統の重複感染系と考えられる結果が得られたことから，現在系統判別品種上の病徴から系統判別されている，[10] SCMVの系統については血清学的な方法を用いて再検討を要するものと思われる。

今回，圃場検診として利用したELISAの長所は，他の手法よりもきわめて鋭敏なこと，多数の試料を一時に処理できることなどである。逆に本法の欠点としては同一圃場で血清学的にわずかでも異なる系統のウイルスが存在する場合は，1種類の抗血清でこれらのウイルスをすべて検出することは困難なことが起こりうる。

このような欠点を克服するため，沖縄県各地から採取したSCMVの血清学的類縁関係を調べたところ，H系統の抗血清は今回供試したすべてのウイルスにELISA反応が認められたが，B系統・I系統の抗血清は一部の系統ウイルスの検出が困難であった。H系統抗血清の血清学的特異性が弱い理由は，血清型の異なる2種のウイルスによって抗血清が作製されているものと考えられるが，H系統抗血清はELISAによる圃場検診に利用できるものと考えられる。

一方，この現象は圃場における特定の系統の疫学的調査に応用できる可能性がある。しかしながら，今回沖縄県各地から採取したサトウキビモザイク病葉は，ELISA反応により血清学的にはI系統に類別されたものの，さまざまな病徴を呈していることから，本報で供試した抗血清と血清学的に異なる系統のウイルスとの重複感染系を含んでいることも考えられ，今後の再検討が望まれる。

ELISAによるサトウキビモザイク病の圃場検診が広く普及し活用されるためには，少なくとも感染植物を確実に診断できること，できるだけ簡便に，しかも多数の検体を迅速に処理できることが望ましい。また，ELISAによる圃場検診を実施するには，今後も分布する病原ウイルスの系統を常に明らかにしておくと共に，血清学的な相関関係を検討した上で取り組まなければならない。

ELISAによるSCMVの診断は原原種苗配布時における保毒検定などに大いに役立つものと思われる。また，一方では野外でのウイルス感染の実態調査，伝染機構の解明，潜伏感染を含めた寄生植物の調査など，ウイルスの生態の調査と実際の防除の両面で極めて利用価値の高い重要な診断法

になるものと思われる。

引用文献

1）. Abbott, E. V. and R. L. Tippett (1966) Strains of sugarcane mosaic virus. USDA Tech. Bul. 1340 : 1～25

2）. Abbott, E. V. and I. E. Stockes (1966) A world survey of sugarcane mosaic virus strains. SUGAR Y AZUGAR 61 : 27～29

3）. Costa, A. S. and M. P. Penteado (1951) Corn seedlings as test plants for the sugarcane mosaic virus. Phytopathology 41 : 758～763

4）. 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.

5）. Gillaspie, A. G. jr., and R. G. Mock (1979) Recent survey of sugarcane mosaic virus strains from colombia, Egypt and Japan. Sug. Path. Newsl. 22 : 21～23

6）. Gillaspie, A. G. Jr. (1967) Maize dwarf mosaic virus recovered from commercial varieties of sugarcane. Plant Dis. Reptr. 51 : 761～763

7）. Gillaspie, A. G. jr., C. T. Chen, R. G. Mock and R. W. Harris (1980) Sugarcane mosaic virus in Taiwan. ISSCT 17 : 1505～1509

8）. Koike, H. and A. G. Gillaspie Jr. (1976) Strain M. a new strain of SCMV. Plant Dis. Reptr. 60 : 50～54

9）. Milne, R. G. and E. Luisoni (1977) Rapid immune electron microscopy of virus preparations. Pages 265～281 in : Methods in Virology, vol. 6 . Acadamic Press, New York.

10）. 永冨成紀（1981）サトウキビモザイク病病系統分類とその耐病性育種の問題点について 沖縄甘蔗糖年報 20 : 19～46

11）. 西沢正洋・西 泰道（1965）サトウキビモザイク病に関する研究（予報）日植病報 30 : 87

12）. Ohtsu, Y. and T. Gomi (1985) Strain A of sugarcane mosaic virus isolated from sour grass in Ishigaki Island, Okinawa, Japan Ann. phytopath. Soc. Japan 51 : 616～622

13）. Summers, E. M., E. W. Brands and R. D. Rands (1948) Mosaic of sugarcane in the United States, with special reference to straims of the virus. USDA Tech. Bul. 955 : 1～124.

14）. 中田栄一郎・日高 醇（1975）サトウキビモザイク病の発生・分布および病原ウイルスに関する研究 九州病害虫研究会特別報告 3 : 1～32

15）. Tippett, R. L. and E. V. Abbott (1968) A new strain of sugarcane mosaic virus in Louisiana. Plant. Dis. Reptr. 52 : 449～451

16）. 鳥山重光・與良 清（1972）イネ科植物とくに野草に発生するウイルス病に関する研究 東京大学出版会

17）. 山内昌治・上原勝江・渡嘉敷唯助・宮良安正・下地俊夫・宮良高忠・金城常雄・玻名城晋（1978）沖縄におけるサトウキビモザイク病の初発生について 九州病害虫研究会報 24 : 26～29

18）. 山内昌治（1982）沖縄県におけるサトウキ

ビモザイク病の発生と伝染について
沖縄県農林水産部　植物防疫技術資料 No. 4
19）. Zummo, N.（1974）Sugarcane mosaic virus strain L : A new virulent strain of sugarcane mosaic virus from Meigs, Georgia. ISSCT 15 : 305〜309