

血清を利用したキュウリ新ウイルス病（キュウリ・緑斑モザイク・ウイルス）の簡易診断法

木谷 清美*・木曾 皓*・鄭 鳳朝**

（* 農林省四国農業試験場栽培部病害研究室 ** 韓国農村振興庁植物環境研究所植物ウイルス研究室）

I 緒 言

本年2～4月頃から、徳島県を中心として、中・四国地方のビニールハウス栽培の促成キュウリに、本邦では未だの新しいウイルス病が発生し、とくに徳島県では大きな被害をこうむった。本病は岡山大学農業生物研究所の井上忠男博士によりCucumber green mottle mosaic virus (CGMMV)であることが確認され、キュウリ・緑斑モザイク・ウイルスという名前が与えられた(井上・1966)。

このウイルスは1935年にイギリスのAinsworth (1935)により記載されたのが最初であり、伝染力は極めて強く、タバコ・モザイク・ウイルス(TMV)にまさるとも劣らない感染力をもち、一度寄主に感染するとその被害は驚くべきものがある。外国ではとくにオランダにおいて研究が盛んであるが(Kootら, 1959), 本邦でも今回の発生が発端となって、現在、岡山大学農業生物研究所、植物ウイルス研究所、徳島農試、九州大学、九州農試、四国農試などで防除対策の研究が開始されている。

今回の大発生については、いろいろ原因が考えられるようであるが、決定的な結論は下しえない状況である。本病の激しい蔓延が接触伝染など第2次伝染によるものようで、このことから考えると、まず第1次発生の防止につとめる必要があるものと思われる。これがためには無病苗の定植、罹病株の除去などによる感染防止が大切で、そのためには罹病の有無をできるだけ早期に発見して除去することが必要である。この目的を達するため、現在ウイルスの診断に広く用いられている、血清学的方法が考えられる。そこで筆者らはイネ縞葉枯病ウイルスの抗血清作成に準じて本ウイルス抗血清を作成し、その診断を試みたところ、ほぼその目的を達することが判明したのでここにその大要を報告する。

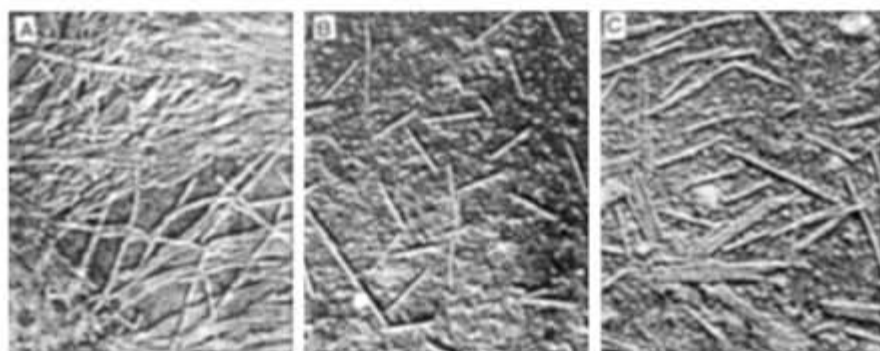
なお、抗原の作成材料については徳島農試の協力をえ、また抗体感作赤血球凝集反応の処理法については、阪大微生物観音寺研究所の菅隆良氏に有益な助言をたまわった。記して深謝の意を表する。

II 抗 体 の 調 製

(1) 抗原材料(ウイルスの純化)

病徴のはっきりした新鮮な病果あるいは病葉1kgをよく水洗した後、M/100磷酸緩衝液(PH 6.8) 200mlを加えてホモゲナイザーで十分磨砕し、汁液をしぼり、遠沈(5000rpm, 20分)して上清液をとる。この上清液は70℃で10分間温湯処理し、健全蛋白の大部分を凝固させ、再び遠心分離によってこれを除くと黄色透明の上清液がえられる。この上清液を氷冷(5℃以下)し、1/4飽和硫酸液とし、数時間氷冷下に放置するとウイルス沈殿がえられる。この淡黄色のウイルス沈殿は遠心分離(8000rpm, 30分)し、再びこの沈殿を少量の磷酸緩衝液に溶解させる。その後上記の硫酸処理を数回繰返し、ウイルスの沈殿が無色になったら、最初に加えた磨砕液の半量の蒸留水に溶解し、不溶解物は遠心分離(3000～4000rpm, 10分)で除く。この上清液を希塩酸でPH 4.8に調整すると純白色のウイルスが沈殿するから、これを遠心分離(20000rpm, 30分)で集める。このウイルス沈殿は再び磨砕液の1/4量の磷酸緩衝液に懸濁し、セロファンチューブに入れ、透析する。透析中は時々外液を取替え、透析後、内液を取出して遠心分離(3000～4000rpm, 10分)する。えられた上清液は不純物を全く含まない純化されたウイルスである(第1図参照)* これを分注してジープリザー(-2℃)あるいは真空凍結乾燥して使用するまで貯蔵した。

* ウイルスの電顕撮影に際し、電子顕微鏡の使用便宜を与えられた阪大微生物観音寺研究所および大阪医科大学中央研究所に深謝する。



A 純化ウイルス：高濃度のためウイルスはアグリゲイトしている。(20000倍) B 病果汁をそのままdip法で観察。ウイルス粒子以外に病果中の細胞質がみられる。(20000倍) C 同左、ウイルスが結晶状にみられる。(20000倍)

第1図 純化ウイルスと未純化ウイルスの電顕像

この方法で純化されたウイルスは明らかに活性を保持し、キュウリに接種すると発病がみられた(第1表参照)。

第1表 純化ウイルスのウイルス活性

純化日	事項	発病個体数 供試個体数
1966-6-25		27 *1 30
1966-6-30		50 50
1966-8-9		29 *2 30

- (注) *1 供試個体数の中、3本、1本は
*2 立枯病が発生して枯死
2 純化ウイルスを井戸水に懸濁(濃度0.262mg/mlで1.000~1.500)し、カーボランダム法で第1葉抽出直後、子葉に接種
3 発病個体については電顕でウイルスを再確認した。

射から10~15日目にはブースターを行なった後7日目位に全採血した。

(3) 抗体の精製と抗血清の力価

家兎からの全採血、抗体の精製は木村の方法により(木村, 1965a, d), また抗血清の濃縮、保存および力価の決定法は、筆者らがイネ萎凋枯病ウイルスについて行なった方法に準じた(木谷ら, 1965, '66)。

(2)の方法により純化ウイルスを免疫源として、adjuvant法あるいは静脈注射法で家兎からえられた抗血清の力価判定には、純化したCGMMVをカーボランダム法でキュウリ(翠青2号)の本葉第1葉抽出後子葉に接種し、発病した第3葉を抗原として供試した。

第2表 凝集反応による抗血清の力価

抗血清希釈倍数 抗原(10倍)	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	対照
病 葉	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
健 葉	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

第3表 抗血清の最適

抗原濃度		1:10	1:20	1:40	1:80	1:160
抗血清希釈倍数						
1:	50	+	+	+	+	+
1:	100	+	+	+	+	+
1:	200	+	+	+	+	+
1:	400	+	+	+	+	+
1:	800	+	+	+	+	+
1:	1600	+	+	+	+	+
1:	3200	+	+	+	+	+
1:	6400	+	+	+	+	+

(注) 湯温(37℃)に浸漬後30分して判定した。秒読みによる凝集反応が最も早くあらわれるのは抗原濃度1:40, 抗血清希釈1:100であつた。

その結果は第2, 3表に示したとおりである。すなわち抗原10倍液を供試した場合、凝集反応陽性を示す抗血清希釈倍数は1:512あるいは1:1024であり、また抗血清の最適比は抗原40倍希釈, 抗血清100倍希釈のよう

であつた。

Ⅲ 沈降反応法による検定

(日高ら, 1960・緒方, 1944)

(1) 供試材料

殺菌土壌をつめた素焼鉢(径15cm)にキュウリ(翠育2号)を4粒ずつ播種し、完全に展開した子葉に、純化したCGMMVをM/100磷酸緩衝液(PH6.8)に溶解し(0. D. 260mμで1.00のウイルス濃度)、カーボランダム法で表面に接種し、第10葉展開時に病徴の顕著な葉および同一個体株の花弁、細根、蔓を用い、対照には同じ方法で育成した無接種の同じ生育程度のものを供試した。

(2) スライド法による検定

供試材料を滅菌乳鉢中で圧搾し、カーゼまたは脱脂綿あるいは遠心分離(3000rpm, 10分)を用い搾汁液(10倍~100万倍希釈液)を作り、これを清拭したスライドグラス上に、ツベルクリン用注射器(1cc)を用いて1滴、滴下し、これに抗血清希釈液(1:50~1:100)1滴を同法により加えた。また対照血清には正常兔血清の同じ希釈度のものを併用した。これらの操作の終わったスライドは、静かに動かして検液と血清を混じ、抗血清の方に微細な糸状沈澱物が生ずるか否かを検討した。温度の低い場合は反応がおそいので、スライドグラスを火焰上で暖めた。反応は肉眼と拡大鏡で検定した。その結果は第4表に示したとおりである。

第4表 スライド法による検定

抗原希釈倍数		10	50	10×10 ²	10×10 ³	10×10 ⁴	10×10 ⁵	10×10 ⁶	対照(10)
材料									
葉	*	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
花		(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
細		(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
根		(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
蔓		(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

(注) 1 使用した抗血清濃度は1:50

2 * 病徴顕著なもの

3 () 内は健全キュウリによるもの

すなわちCGMMVに感染した葉、花弁、細根、蔓はスライド法により抗原希釈倍数100倍位まで検定可能であつたが、100倍以上、および対照試験では凝集反応はみられなかった。

(3) 混合法による検定

滅菌した試験管(長さ9cm, 径1cm)に2倍に希釈した抗血清を原液として、2倍階段希釈法でえられた抗血清を0.5mlずつ分注し、これに(1)でえられた材料の10倍希釈抗原をそれぞれ0.5mlずつ加え、よく振った後抗血清と検液とをよく混じ、37℃の温度に浸漬し、2時間後沈降物の有無を検定し、さらに室温あるいは冷蔵庫内で1夜放置して、ふたたび結果を判定した。その結果は第5表に示したとおりである。すなわち、CGMMVに感染した材料ではいずれも抗血清希釈倍数512~1024倍まで陽性反応を示し、対照材料はすべて陰性であつた。これらのことから混合法によっても充分CGMMVを検定できると考える。

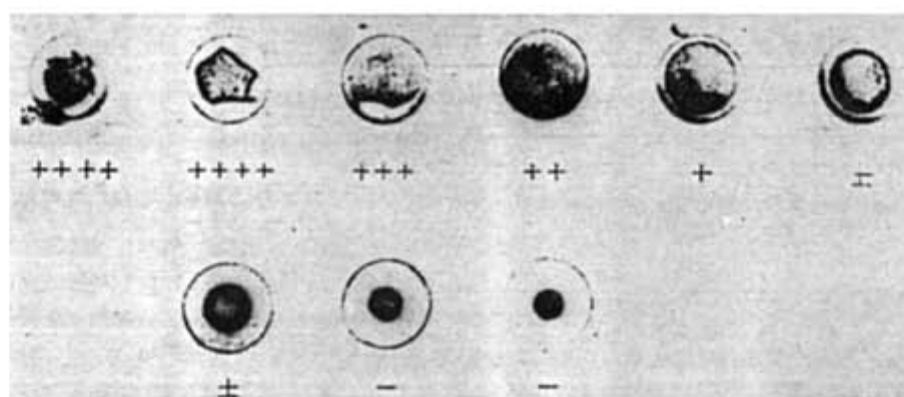
抗血清希釈倍数		2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	対照
材 料												
病 材 料	病徴顯著葉	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	+	+	+	-
	病徴不明葉	卅	卅	卅	+	+	+	+	+	±	-	-
	花	卅	卅	卅	卅	卅	+	+	+	+	-	-
	細	卅	卅	卅	+	+	+	+	±	-	-	-
	蔓	卅	卅	+	+	+	+	+	±	-	-	-
健 全 材 料	葉	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	花	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	細	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	蔓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(注) 抗原は10倍希釈汁液を用い、反応法は抗原0.5cc+抗血清0.5ccで37℃2時間

IV 抗体感作赤血球凝集反応法による検定

スライド法や混合法で検定が可能な範囲は、抗原や抗血清の濃度により左右されることは第4、5表より明らかである。そこで微量の抗原が存在する材料の検定や、ウイルスを定量的に追跡してゆく場合などでは、これらの沈降反応では鋭敏性の上で困難な場合があると思われるので、筆者ら(1965, 66)がイネ縮葉枯病ウイルスの検定に用いている抗体感作赤血球凝集反応の応用について検討した。

供試材料としては、とくに顕著な発病葉と経症な発病葉および同一罹病株における病徴顯著な葉、不明瞭な葉、無病徴葉、初発病徴葉を用いた。抗原は100倍希釈液を原液として、5倍階段希釈法により、安尾ら(1963, '64)の感作の手技および木谷ら(1966)の改良方法を併用した。その結果、ODMMVが存在すると、反応は陽性を示し、赤血球は凝集して試験管の管底に広く分散するか、あるいは凝塊を作るが、陰性の場合には管底の中央に集まり平滑な感じの小円を形成した(第2図参照)。



第2図 抗体感作赤血球凝集反応結果の判定模式図

これらの判定結果からみると(第6、7表参照)、抗体感作赤血球凝集反応法では、抗原求釈倍数30万～150万倍の抗原濃度でも検定が可能であり、さきに述べた沈降反応法に比べて、その鋭敏性は非常に高いものと思われる。

第6表 抗体感作赤血球凝集反応

事 項		抗原稀釈倍数									対照
		5 ⁰	5 ¹	5 ²	5 ³	5 ⁴	5 ⁵	5 ⁶	5 ⁷	5 ⁸	
1%正常兎血清加用ベロナール緩衝液(c)		0	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
抗 原 * (c)		0.5 0.1 2 5 → 以下 5 ² ~ 5 ⁸ 迄は前濃度の中から 0.1 2 5 cc を 次の濃度に添加									
顕 著 な 病 徴 発 現 葉		—	++	++	++	++	+	+	+	±	—
軽 症 な 病 徴 発 現 葉		—	++	++	++	+	+	+	±	—	—

(注) * 抗原は100倍希釈液を原液(5⁰)として、以後5倍階段希釈法である。(5⁷=1562500倍希釈 5⁸=7812500倍希釈に相当する。)

第7表 同一個体における病徴の強弱に対する抗体感作赤血球凝集反応

材 料	抗原希釈倍数											対照
	5 ⁰	5 ¹	5 ²	5 ³	5 ⁴	5 ⁵	5 ⁶	5 ⁷	5 ⁸	5 ⁹	5 ¹⁰	
病 徴 顕 著	—	++	++	++	++	++	+	+	+	—	—	—
不 明 瞭	—	++	++	+	+	+	+	+	±	—	—	—
無 病 徴	++	++	+	+	+	+	+	±	—	—	—	—
初 発 病 徴	+	++	++	++	+	+	+	+	+	—	—	—
健 全 株	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

V 抗血清反応の特異性

抗血清を用いた沈降反応や抗体感作赤血球凝集反応による陽性反応が、CGMMVに特異的であるかどうかを調べた。抗原液としては、イネ縮葉枯病葉(ヒメトビウカの接種による発病イネ「金剛風」)、イネ萎縮病葉(愛媛・砥部町で採集)、イネ黄萎病葉(高知・農技で採集)、イネ黒条萎縮病葉(四国農試で採集)ならびに殺菌土壌をつめた葉焼鉢にトマト、カボチャ、キュウリ、タバコ種子をそれぞれ別個に4粒ずつ播種し、本葉が1枚抽出した時にカーボランダム法で接種して発病したCMV* 接種によるトマト、キュウリ、タバコ葉、WMV* 接種によるカボチャ、キュウリ葉およびTMV* 接種によるタバコ、トマト葉ならびにセラチン液(1%)、アルブミン液(1%)を供試した。

スライド法では上記の病葉を滅菌乳鉢中で圧搾し、ガーゼを用いて搾汁した液を生理食塩水で10倍希釈し、抗血清は1:50でⅢ-②の方法により、混合法では、スライド法に用いたと同じ搾汁液を生理食塩水で40倍に希釈し、遠心分離(4000 rpm, 10分)した上清を抗原液とし、抗血清は8倍から2倍階段希釈法で1024倍まで希釈してⅢ-③の方法で検定した。

また抗体感作赤血球凝集反応は、抗原として沈降反応に用いたと同じ材料を正常兎血清加用ベロナール緩衝液*で100倍に希釈したものを原液として供試し、アルブミン液とセラチン液は同緩衝液で100倍液を作成し抗原原液とし、いずれも5倍階段希釈法で781万倍まで希釈したものについて、前項の方法に準じて行なった。また対照に用いたCGMMVに感染したキュウリ葉はⅢ-①の方法によったものである。その結果は対照として用いたCGMMVに感染したキュウリ葉のみが陽性反応を示し、それ以外の供試材料はすべて陰性であった(成績省略)。これらの結果から、CGMMVを免疫原として家兎からえられた抗血清およびそれから精製した抗体(γ-グロブリン)は、CGMMVにのみ特異的に反応する性質を有することが明らかである。しかし、純化したTMVを混合法で検定すると、TMVの濃度が非常に濃いところ(TMV50mg/10cc)では、陽性反応の結果らしい僅かな沈降物がみられたが、CGMMV抗血清を用いたスライド法や混合方法および抗体感作赤血球凝集反応による陽性反応の結果は、ウイルス感染植物を抗原に用いる限りCGMMVによるものと診断して差支えないと考えられる。

* 接種原に用いたCMVは植物ウイルス研究所および岡山大学農業生物研究所、WMVは植物ウイルス研究所、TMVは名大農学部植物病理学教室より分譲をうけたものである。

** 安尾ら(1963)の用いた正常兎血清加用ベロナール緩衝液からブドウ糖を除外したものである。

VI 沈降反応法および抗体感作赤血球凝集反応法による診断

(1) 沈降反応法による種子の検定

CGMMVに侵された徳島県のハウス栽培キュウリの病果(1966・6)および硝子室でポット栽培したキュウリ(翠青2号)に純化したCGMMVをカボランダム法で接種してえられた病果の両者から種子を採集し(病果のまま0-4℃に3.5ヶ月冷蔵したもの),まず種子表面を滅菌水で充分洗滌し,さらに10% Teepolあるいは3% Na₃PO₄で2時間(25℃)消毒したものの中から無作為に種子をえらび種皮,子葉,胚軸を注意して取出しⅢ-(2),(3)の方法に準じてスライド法と混合法で検定した。その結果の1例を示せば第8表のとおりである。

第8表 沈降反応による種子の検定。

方法 材料	スライ ド法	混合法(抗血清稀釈倍数)								食塩水
		8	16	32	64	128	256	512	1024	
種皮	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	3	—	+	±	—	—	—	—	—	—
	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	5	—	+	±	—	—	—	—	—	—
子葉	1	+	+	+	±	—	—	—	—	—
	2	—	+	+	—	—	—	—	—	—
	3	—	+	+	±	—	—	—	—	—
	4	—	+	—	—	—	—	—	—	—
	5	—	+	+	—	—	—	—	—	—
胚軸	1	+	+	+	—	—	—	—	—	—
	2	+	+	+	—	—	—	—	—	—
	3	—	+	—	—	—	—	—	—	—
	4	—	+	—	—	—	—	—	—	—
	5	—	—	—	—	—	—	—	—	—

すなわち,スライド法によるウイルスの検出は困難であったが,混合法では種皮,子葉,胚軸の部分に陽性反応がみられウイルスの存在がみられた。

(2) 抗体感作赤血球凝集反応による診断

(i) CGMMVに感染したキュウリの各部におけるウイルス検出

Ⅲ-(1)の方法に準じて育成したキュウリ(翠青2号)に,同じ方法でCGMMVを接種し,10~13葉の頃,最頂葉には病徴がみられ,下方の古葉の病徴は不明瞭な株から,花卉,蒴,花粉,蔓,蕾(長5mm),毛茸,根,種子,果肉,果皮を採取し,各部位について(Ⅳ)の方法に準じて検定した。その結果は第9表のとおりである。すなわち,下方の古葉の病徴は不明瞭でも,頂葉に病徴がみられるような場合には,抗体感作赤血球凝集

反応によれば,抗原希釈で30~150万倍でもすべて明らかに陽性反応を示した。このことから考えるとほとんどどの部分にも濃厚なウイルスが存在しているものと思われる。

(ii) 野外放置の病莖葉と室温乾燥の病果に対するウイルス検出

検定に用いた材料は,徳島県から送付された病莖葉を4ヶ月間野外に放置したものと,同じ病果を細切して室内で4ヶ月間自然乾燥させたもので,これらを抗原として,(Ⅳ)の方法に準じて抗体感作赤血球凝集反応を行なったが,いずれも第10表のように高い陽性反応を示し,CGMMVの存在が確認された。

第9表 抗体感作赤血球凝集反応によるCGMMVの検出。

材 料	抗原希釈倍数	X 1 0 0										対照
		50*	51	52	53	54	55	56	57	58	59	
花 卉	蒴	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	—
	粉	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—
	蔓	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—
	蕾	—	+	+	+	+	+	+	+	±	—	—
毛 茸	根	+	+	+	+	+	+	+	+	±	—	—
	皮	+	+	+	+	+	+	+	+	±	—	—
	葉	+	+	+	+	+	+	+	+	±	—	—
	肉	—	+	+	+	+	+	+	+	±	—	—
果 皮		+	+	+	+	+	+	+	+	±	—	—

(注) * 抗原原液(5⁰)は100倍希釈液で以後5倍階段希釈法によつた。

第10表 野外放置の病莖葉と室温乾燥の病果に対する抗体感作赤血球凝集反応

材 料	抗原希釈倍数	X 1 0 0										対照
		50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	
野外放置(4ヶ月間)の病莖葉		—	+	+	+	+	+	+	±	—	—	—
室温乾燥(4ヶ月間)の病果		—	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—

またこの材料をM/100磷酸緩衝液で1万倍に希釈し、ポット栽培したキュウリ（翠青2号）の、本葉第1葉にカーボランダム法で接種したところ、感染がみられた（第11表参照）。すなわちこのような処理では、ウイルスは不活化しないことが明らかである。

第11表 野外放置の病莖葉と室温乾燥病果のウイルス活性。

材 料	事 項	発病個体数 接種個体数
野外放置（4ヶ月間） 病 莖 葉		36 / 40
室温乾燥（4ヶ月間） 病 果		25 / 30

(注) CGMMV接種後のウイルスの動向

(注) 発病個体数の不足は、立枯病のため枯死株

Ⅲ-1)の方法に準じて育苗したキュウリ（翠青2号）の発芽後間もない子葉にカーボランダム法でⅢ-1)と同じ濃度のCGMMVを接種し（25℃±2℃の温室管理）、その日を追って各部位におけるウイルスの動向を(Ⅳ)の抗体感作赤血球凝集反応法に準じて追跡した。その結果は第12表のとおりである。

第12表 抗体感作赤血球凝集反応を用いたCGMMV接種後のウイルスの動向

接種後日数	方 法	スライ ド 法	混合法	抗 体 感 作 赤 血 球 凝 集 反 応 × 1 0 0							
				5 0	5 1	5 2	5 3	5 4	5 5	5 6	
2 日 目	子 葉	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	莖	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	根	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4 日 目	子 葉	—	—	+	+	±	—	—	—	—	—
	莖	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—
	根	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6 日 目	本葉第1葉	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	子 葉	—	—	++	++	++	+	±	±	—	—
	莖	—	—	++	+	+	—	—	—	—	—
8 日 目	根	—	—	+	±	—	—	—	—	—	—
	本葉第1葉	—	—	+	±	—	—	—	—	—	—
	子 葉	—	—	++	++	++	++	+	+	+	+
8 日 目	莖	—	—	++	+	+	—	—	—	—	—
	根	—	+	+	+	±	—	—	—	—	—
	本葉第1葉	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—

(注)

- 1 CGMMVの接種はカーボランダム法で子葉に接種
- 2 スライド法は抗原10倍希釈液、抗血清50倍希釈液
- 3 混合法は抗原50倍液を原液（♀）とし以後5倍階段希釈法

すなわち、接種後2日目では、接種葉、莖、根いずれの部分も陰性反応を示したが、4日目では明らかに接種葉と莖では陽性反応を示した。しかし根は陰性であった。6日目には接種葉、莖、根いずれも陽性反応を示し、また本葉（第1葉）にも陽性反応を示す個体が現われた。しかし病徴はまだ認められなかった。8日目には、本葉に星型のクロロナツクススポット状の病徴が僅かにみられ、ほとんどどの部分でも陽性反応を示した。その頃になるとスライド法や混合法による検定も可能であったが、接種6～7日目頃までの無病徴の時期においては、これらの方法では検定は不可能で（第12表参照）抗体感作赤血球凝集反応によらねば、ウイルスの検出はみられなかった。

(注) 種子中のウイルス検定

Ⅳ-1)と同じ材料を用いて、抗体感作赤血球凝集反応を行なった結果は第13表のとおりである。すなわち、種皮、子葉、胚軸いずれも抗原希釈100倍から6～30万倍まで陽性反応を示し、病果中で育成した種子のいずれの部分にも、かなりの濃度でウイルスが存在することが明らかとなり、さきのべたⅥ-1)および混合法（第8表参照）よりもウイルスの検出に対する鋭敏性は高いことが確認された。

第13表 抗体感作赤血球凝集反応法による種子中のCGMMVの確認

抗原希釈倍数		× 1 0 0								対照
材 料		5 ⁰	5 ¹	5 ²	5 ³	5 ⁴	5 ⁵	5 ⁶	5 ⁷	
種 皮	1	+	+	+	+	±	—	—	—	—
	2	+	+	+	+	+	—	—	—	—
	3	—	+	+	+	+	—	—	—	—
	4	+	+	+	—	—	—	—	—	—
	5	+	+	+	+	—	—	—	—	—
子 葉	1	+	+	+	+	+	+	±	—	—
	2	+	+	+	+	+	—	—	—	—
	3	+	+	+	+	+	+	±	—	—
	4	—	+	+	+	+	+	±	—	—
	5	+	+	+	+	—	—	—	—	—
胚 芽	1	+	+	+	+	+	±	—	—	—
	2	+	+	+	+	+	+	—	—	—
	3	+	+	+	+	+	±	—	—	—
	4	+	+	+	+	+	+	±	—	—
	5	—	+	+	+	+	+	±	—	—

その濃度は分光光電光度計を用いて260 m μ と280 m μ の吸光度を測定した。また抗体感作赤血球液は、病徴の明瞭な病葉を用いて抗原希釈100倍液を作り、これを起点として5倍段階希釈をした場合、5～6本目（6～30万倍希釈）まで陽性反応を認める程度の力価をもつものを使用した。その結果は第14表に示したとおりである。

第14表 CGMMVの濃度と抗体感作赤血球凝集反応の陽性反応出現範囲。

ウイルス量 (γ)		160	40	8	16×10^{-1}	32×10^{-1}	64×10^{-2}	128×10^{-3}	256×10^{-3}	512×10^{-3}	1024×10^{-4}	2048×10^{-5}
抗体感作赤血球凝集反応結果		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
紫外部吸収	O. D. 260 m μ	0.680	0.170	0.042	0.015	0.008	0.004	—	—	—	—	—
	O. D. 280 m μ	0.520	0.129	0.033	0.012	0.008	0.004	—	—	—	—	—

すなわち、抗原のウイルス量として、最少量 0.51×10^{-3} ないしは $1.02 \times 10^{-4} \gamma$ まで確実に検出が可能であり、抗体感作赤血球凝集反応の鋭敏性はきわめて高いことを確認することができた。

VIII 総 括

筆者らは、キュウリの病果あるいは病葉よりCGMMVを純化し、これを免疫原として Adjuvant の筋肉注射と静脈注射の併用あるいは静脈注射のみで家兎に注射し、力価の高い抗血清を作ること成功した。そしてこの抗血清を用いたスライド法あるいは混合法によって、CGMMVにのみ特異的に反応する働きにより、大量の植物を容易に、かつ迅速に検定しうることを認め、本法がCGMMVの診断にきわめて有効であることを認めた。

さらに筆者らは、イネ縞葉枯病ウイルスについて斉藤ら（1964）および安尾ら（1963）ならびに筆者らが改良を行なった（木谷ら・1966）抗体感作赤血球凝集反応を応用してCGMMVの検定を行なったところ、沈降反応にくらべ、はるかに鋭敏で、かつ精度の高いことを確認した。これは抗原であるウイルス粒子と比較してはるかに大きいヒツジ赤血球を媒介に使ったために、きわめて少数のウイルスでも検出できるためであろう。これに反して、沈降反応ではウイルスが抗体と結合して凝集し、肉眼的にみえるには多数のウイルスが必要であるから、ヒツジ赤血球を利用する抗体感作法にくらべると鋭敏度が低下したためであると考えられる。したがって病徴を現わさない株からのCGMMVの検出、種子のCGMMVによる汚染あるいはCGMMVの定量などの場合には、抗体感作赤血球凝集反応を用いる方が、沈降反応にくらべて確実にして、かつ有効であると考え

VII 抗体感作赤血球凝集反応の鋭敏性

感染植物体内のCGMMVの濃度定量を行なうことは、本病防除の上からもきわめて大切なことである。そこでII-(1)の方法で純化したウイルス（電顕観察により確認）を用い、ウイルス濃度、紫外部吸収、抗体感作赤血球凝集反応の陽性出現範囲の関係を実験した。すなわち、純化したウイルスを精秤し、M/100磷酸緩衝液（pH6.8）に溶解して、160 γ を含む原液を作成し、順次希釈して $2 \times 10^{-5} \gamma$ までの間を5倍段階希釈法で分画し、さらにそれ

られる。

筆者らは、キュウリ・緑斑モザイク・ウイルスの第2次伝染防止の立場から、ウイルス罹病キュウリの除去を目的として、血清利用による診断法を試みたが、沈降反応法、抗体感作赤血球凝集反応法のいずれによっても、容易にかつ確実に診断できることを認めた。したがって、これらの方法を適宜防除に応用することにより、かなりの効果が期待されるものと考えられる。

IX 摘 要

1 病果あるいは病葉より硫酸塩析法と分画遠心法の併用によりキュウリ・緑斑モザイク・ウイルス(CGMMV)を純化したところ、電子顕微鏡学的にも純粋なウイルスがえられた。

2 純化ウイルスをadjuvant法と静脈注射法の併用あるいは静脈注射法単用のみで家兎に注射することにより、沈降混合法で1:1024の力価をもつ抗血清がえられた。また抗血清の最適比は抗原希釈40倍、抗血清希釈100倍であった。

3 CGMMVの保毒検定の血清学的方法として、えられた抗血清を用いてスライド法と混合法を行なったところスライド法では抗血清希釈1:50~1:100、抗原希釈1:10~1:100、混合法では抗原希釈10倍液を用いた場合、抗血清希釈1:8~1:1024まで陽性反応が現われ、ウイルスの検出にきわめて有効なことが認められた。

4 綿羊赤血球を用いた抗体感作赤血球凝集反応法を用いれば、微量のウイルス抗原(30万~150万倍)を検出することができ、またこの方法を用いるとスライド法や混合法よりも鋭敏性は高く、CGMMVの保毒検定には最良の方法であることが確認された。

5 CGMMVを免疫原とし家兎からえられた抗血清は、CGMMVにのみ特異的に血清学的反応を生じ、他のウイルスや蛋白質には反応しなかった。

6 スライド法と混合法および抗体感作赤血球凝集反応法を用いて、種子、葯、花粉、蔓、蕾、毛茸、根、果肉、などにおけるウイルスの存在の有無について検定を行なったところ、いずれにおいてもウイルスの存在が確認された。

7 抗体感作赤血球凝集反応法により、野外に放置(4ヶ月間)した病莖葉と室温乾燥(4ヶ月間)した病果におけるウイルス検出を試みたところ、いずれも活性のあるウイルスの存在が確認された。

8 CGMMV接種後のウイルスの動向を、抗体感作赤血球凝集反応で追跡したところ、接種後2日目では、どの部分にも反応がみられなかったが、4日目からは、接種葉をはじめとして他の部分でも反応がみられ、6日目では根にも反応があり、8日目で発病をみた。

9 抗体感作赤血球凝集反応の鋭敏性はきわめて高く、純化ウイルスの最少量 0.51×10^{-3} ないしは 1.02×10^{-4} μ まで確認することができた。

スライド法と混合法は簡易で判定が早く利用価値が高いが、微量なウイルス抗原や、ウイルス定量には鋭敏性と精度の点に難点がある。

X 文 献

Ainsworth, G. C. (1935): Ann. Appl. Biol., 22:55-67

日高 醇・平井篤造・村山大記・与良 清 編集(1960):植物ウイルス病・朝倉書店・東京,
pp129-151.

緒方富雄(1944):血清学実験法・南山堂、東京

井上忠男(1966):植物防疫, 20:375-378.

木村一郎(1964)a:蛋白質・核酸・酵素, 8:833-838.

——(1965)b: 同 上 9:48-49.

——(")c: 同 上 9:49-50.

——(")d: 同 上 9:46-52.

Koot, Y. vao en H. J. M. van Dorst (1959): Overdruk Nit Tijdschrift Over Plantezieen, 65:257-271.

木谷清美・木曾 皓・山本孝希(1965):昭和39年度稲縞葉枯病に関する研究成績, PP80-82。

木谷清美・木曾 皓(1966):四国植物防疫研究, 第1号:9-11。

農林省農事試験場病害第1研究室(1964):昭和38年夏作病害に関する試験成績(稲ウイルス病に関する研究), pp1-9。

斉藤康夫・高梨和雄・岩田吉人(1964):農業技術研究所報告。C第17号:23-39。

安尾 俊・柳田淇策(1963):植物防疫, 17:215-218。