

## 簡易化した酵素結合抗体法（ELISA）による キュウリモザイク病の診断<sup>1)</sup>

岩崎真人・山本孝<sup>2)</sup>・勝部利弘・稲葉忠興  
（四国農業試験場）

酵素結合抗体法(ELISA)は、ウイルスの検出感度が高く、検出に要する時間も短いことから、多くのウイルス病の診断に用いられている（CLARK, 1981）。我が国のキュウリの病原ウイルスにはキュウリモザイクウイルス（CMV）、キュウリ緑斑モザイクウイルス（CGMMV）、キュウリ黄化ウイルス（CuYV）、カボチャモザイクウイルス（WMV）、ズッキーニ黄斑モザイクウイルス（ZYMV）がある。これらのウイルスの検出に外国および日本でELISAが適用されている（GERA *et al.*, 1978；MARCO and COHEN, 1979；SAKO *et al.*, 1980；PURCIFULL *et al.*, 1984；川合ら, 1985）。しかし、通常のELISAをウイルス病の診断に用いる場合の難点は、手順がやや煩雑であることが挙げられる。そこで、簡易化したELISAでCMV、WMV、ZYMVによるキュウリのウイルス病の診断法を検討したので報告する。

### 材 料 お よ び 方 法

#### 供試ウイルスおよび抗血清

CMV（CM 32分離株）、WMV〔9（M）分離株〕およびZYMV〔8（E）分離株〕を供試した。これらのウイルスをキュウリ品種・久留米落合H型または相模半白節成の幼苗にそれぞれ汁液接種した。接種7～21日後、罹病葉を採取し、生葉または凍結保存葉（-80℃）をELISAの抗原試料として用いた。キュウリ葉にNaCl加用リン酸緩衝液（ツイーン20とNa<sub>3</sub>を含む：以後、PBS-Tweenと略記）を加え乳鉢で磨砕し、希釈汁液を調整した。

抗血清は、CMVではCM32分離株、WMVでは80分離株、ZYMVでは8（E）分離株に対するものを用いた。CMVおよびWMVに対する抗血清は四国農業試験場で作製し、ZYMV抗血清は日本植物防疫協会から分譲して頂いた。

#### 通常のELISA

ELISAの手技はCLARK and ADAMS（1977）の方法に従った。反応板は96穴のプレート（イミュロン・サブストレート・プレートELISA，ダイナテック社）または12穴のストリップ（イミュロン1・リムーバス・ストリップELISA，ダイナテック社）を用いた。吸着 $\gamma$ -グロブリン濃度および酵素結合抗体の希釈倍数は、CMV抗血清ELISAで2  $\mu$ g / ml，1,000倍，WMV抗血清ELISAで2  $\mu$ g / ml，500倍，

---

1) Detection of cucumber mosaic virus, watermelon mosaic virus and zucchini yellow mosaic virus by simplified ELISA.

Mabito IWASAKI, Takashi YAMAMOTO, Toshihiro KATSUBE and Tadaoki INABA.

2) 現在，富山県農業技術センター・野菜花き試験場

Proc. Assoc. Pl. Protec. Shikoku, No. 22 : 57～62 (1987).

ZYMV抗血清ELISAで4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、500倍とした。基質液は各穴に0.2ml注入し、25℃で1時間反応させた。反応停止液は水で4倍に希釈した。吸光度は水を対照にして405 nmで測定し、吸光度0.1以上の試料を陽性と判定した。1試料あたり2～4反復行った。

### ELISAの簡易化の検討

#### 試料・酵素結合抗体の同時処理法（同時法）

試料と酵素結合抗体を0.1 mlずつ同時に反応板の穴に注入し、5℃で1夜静置後、基質液を注入した。なお、試料および酵素結合抗体の希釈倍数は、通常のELISAの1/2とし、注入後の希釈倍数が通常のELISAと同じになるように調整した。また、その他の条件は全て通常のELISAと同じとした。本試験にはCMV、WMVおよびZYMVを供した。

#### 反応板の凍結保存の影響

r-グロブリン吸着後、洗浄を行った反応板を-20℃で1～410日間凍結保存し、ウイルスの検出に及ぼす影響を調べた。本試験にはCMVを供した。

#### 凍結保存した反応板を用いた同時法（凍結・同時法）

r-グロブリン吸着処理後、2か月間凍結保存した反応板を用いた同時法（凍結・同時法）によるウイルスの検出を検討した。本試験にはCMV、WMVおよびZYMVを供した。

#### 静置条件

2か月間凍結保存した反応板を用い、試料と酵素結合抗体を同時注入した反応板の静置温度および時間がウイルス検出に及ぼす影響を調べた。基質は37℃で30分間反応させた。本試験にはCMVを供した。

## 結 果

### 通常のELISA

CMV、WMVおよびZYMV抗血清を用いた通常のELISAでそれぞれのウイルスが検出された。供試抗血清に対して異なる種類のウイルス感染葉汁液および健全葉汁液は、反応しなかった。各ウイルス感染葉汁液の検出希釈限界は、CMVで1～100万倍、WMVで1万倍、ZYMVで5,000倍であった。

### ELISAの簡易化の検討

#### 試料・酵素結合抗体の同時処理法（同時法）

試料・酵素結合抗体の同時処理法によって各ウイルスが検出され、検出希釈限界は通常のELISAとほぼ同程度であった（第1図）。いずれのウイルス感染葉でも、ELISA反応は100倍希釈液より20倍希釈液で低かった。希釈倍数が100倍以上の場合のELISA反応は、CMVとZYMVでは通常のELISAより同時法で高かったが、WMVの100～500倍では同時法で低かった。

#### 反応板の凍結保存の影響

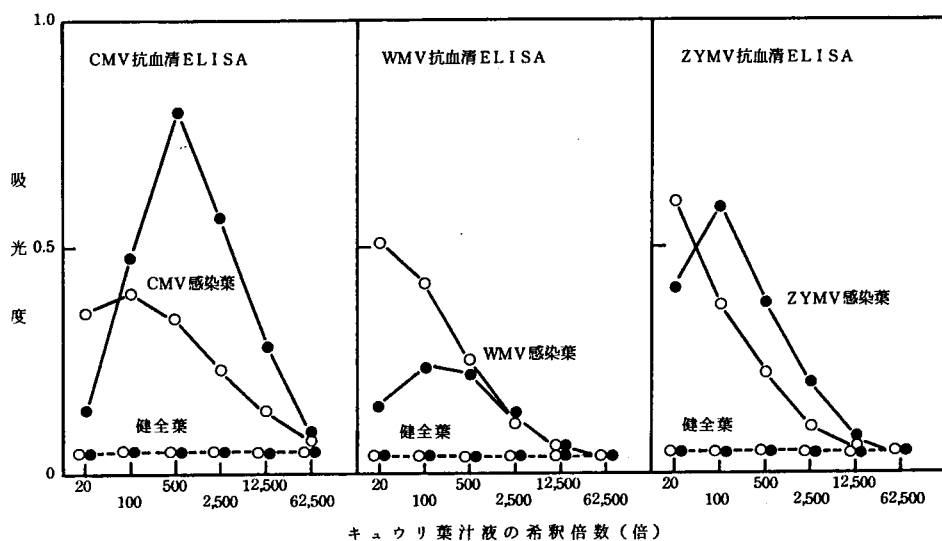
あらかじめr-グロブリン吸着処理を行った反応板を1～410日間凍結保存し、CMVの検出を試みた。ELISA反応は、207日間以内の保存では保存しない場合と同程度であった（第1表）。しかし、336日および410日間の保存では反応が低下した。

#### 凍結保存した反応板を用いた同時法（凍結・同時法）

同時法および反応板の凍結保存は、ともにELISAの簡易化に有効であると認められた。そこで、r-グロブリン吸着処理後、凍結保存した反応板を用いて、試料と酵素結合抗体の同時処理法によるウイルスの検出（凍結・同時法）を試みた。その結果、本法では通常のELISAと同様に各ウイルスが特異的に検出された（第2表）。

#### 凍結・同時法での静置条件

診断時間を短縮するため、凍結・同時法での試料・酵素結合抗体の同時注入後の反応板の静置温度お



第1図 通常のELISAと試料・酵素結合抗体の同時処理法(同時法)によるウイルス検出の比較

注) ○通常ELISA, ●同時法, 実線はウイルス感染葉, 破線は健全葉

第1表 反応板の凍結保存期間がCMVの検出に及ぼす影響

| キウリ葉汁液<br>(100倍希釈) | 反応板の保存期間(日)        |      |      |      |      |      |      |      |
|--------------------|--------------------|------|------|------|------|------|------|------|
|                    | 0                  | 1    | 7    | 14   | 70   | 207  | 336  | 410  |
| CMV感染葉             | 0.35 <sup>a)</sup> | 0.37 | 0.32 | 0.41 | 0.33 | 0.35 | 0.13 | 0.21 |
| 健全葉                | 0.05               | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.04 | 0.05 | 0.05 |
| 対照(PBS-Tween)      | 0.05               | 0.05 | 0.05 | 0.04 | 0.04 | 0.05 | 0.05 | 0.05 |

a) 405 nmの吸光度

第2表 通常のELISAと凍結保存した反応板を用いた同時法(凍結・同時法)による3種ウイルスの検出の比較

| キウリ葉汁液<br>(200倍希釈) | CMV抗血清ELISA        |        | WMV抗血清ELISA |        | ZYMV抗血清ELISA |        |
|--------------------|--------------------|--------|-------------|--------|--------------|--------|
|                    | 通常のELISA           | 凍結・同時法 | 通常のELISA    | 凍結・同時法 | 通常のELISA     | 凍結・同時法 |
| CMV感染葉             | 0.95 <sup>a)</sup> | 0.53   | 0.03        | 0.04   | 0.04         | 0.07   |
| WMV感染葉             | 0.04               | 0.07   | 0.43        | 0.21   | 0.04         | 0.08   |
| ZYMV感染葉            | 0.05               | 0.07   | 0.03        | 0.04   | 0.26         | 0.29   |
| 健全葉                | 0.05               | 0.05   | 0.03        | 0.03   | 0.04         | 0.05   |
| 対照(PBS-Tween)      | 0.05               | 0.05   | 0.05        | 0.03   | 0.05         | 0.05   |

a) 405 nmの吸光度

よび時間についてCMVを供試して検討した。試料と酵素結合抗体の同時注入後18, 25, 30, 37℃で1時間静置したところ、ELISA反応は高い温度で高かった(第3表)。しかし、37℃では健全葉汁液およびPBS-Tweenで非特異的反応が認められた。したがって、30℃が最適静置温度であることが判明した。

そこで、静置温度を30℃とし、静置時間を5分～4時間と変えて、CMVの検出を行った。いずれの時間でもCMVの検出は可能であったが(第4表)、確実に検出するためには10分間以上の静置が必要であった。

WMVおよびZYMVについても凍結・同時法での静置条件をCMVと同様に検討したが、いずれの条件でもELISA反応は低く、時間の短縮化は困難であった。したがって、WMVおよびZYMVでは、凍結・同時法を用いた場合の静置温度および時間は5℃、1夜が適当であった。

第3表 凍結・同時法における静置温度がCMVの検出に及ぼす影響<sup>a)</sup>

| キュウリ葉汁液<br>(100倍希釈) | 同時注入後の静置温度(℃)      |      |      |      |
|---------------------|--------------------|------|------|------|
|                     | 18                 | 25   | 30   | 37   |
| CMV感染葉              | 0.16 <sup>b)</sup> | 0.23 | 0.32 | 0.52 |
| 健全葉                 | 0.04               | 0.05 | 0.06 | 0.22 |
| 対照(PBS-Tween)       | 0.04               | 0.04 | 0.05 | 0.19 |

a) -20℃で2か月間保存した反応板を用い、試料・酵素結合抗体の同時注入後の静置時間は1時間とした。基質は37℃で30分間反応させた。

b) 405 nmの吸光度

第4表 凍結・同時法における静置時間がCMVの検出に及ぼす影響<sup>a)</sup>

| キュウリ葉汁液<br>(100倍希釈) | 同時注入後の静置時間         |      |      |      |      |      |
|---------------------|--------------------|------|------|------|------|------|
|                     | 5分間                | 10分間 | 30分間 | 1時間  | 2時間  | 4時間  |
| CMV感染葉              | 0.11 <sup>b)</sup> | 0.15 | 0.23 | 0.32 | 0.45 | 0.73 |
| 健全葉                 | 0.04               | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.05 | 0.06 |
| 対照(PBS-Tween)       | 0.04               | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.05 | 0.04 |

a) -20℃で2か月間保存した反応板を用い、試料・酵素結合抗体の同時注入後の静置温度を30℃とした。基質は37℃で30分間反応させた。

b) 405 nmの吸光度

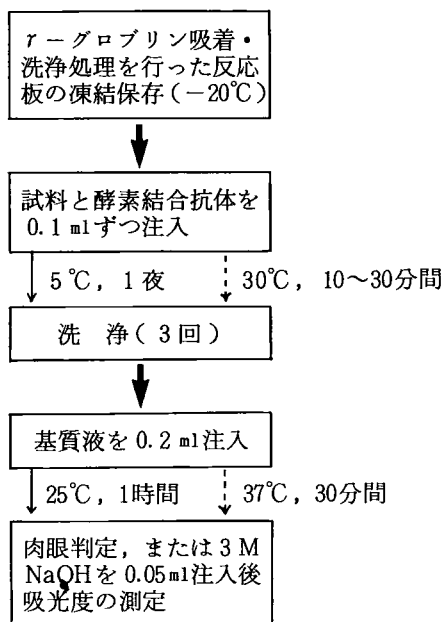
### 簡易化したELISAの手順

以上の結果、簡易化したELISAによるウイルスの検出手順は、ウイルスの種類によって異なる。その手順を第2図に示した。すなわち、CMV、WMV、ZYMVでは凍結保存した反応板を用いた同時法(凍結・同時法)を導入し、同時注入後は5℃で1夜静置後、基質を25℃で1時間反応させることにより検出できる。さらにCMVでは、試料・酵素結合抗体の同時注入後に30℃で10～30分間静置し、基質を37℃で30分間反応させることにより、短時間に検出できる。ただし、この方法ではWMVおよびZYMVの検出は困難である。

## 考

## 察

試料・酵素結合抗体の同時処理法(同時法)によってELISAの手順を簡易化した事例として、リンゴ



第2図 簡易化したELISAの手順

注) ← : CMV, WMV, ZYMV  
の検出法  
←---- : CMVの検出法

報告している。r-グロブリン吸着処理後に反応板を冷蔵・凍結保存する方法は、診断時におけるELISAの手順の簡易化を図る上で有用であり、他のウイルス病の診断にも応用できるものと思われる。

筆者らは、凍結保存した反応板を用いた同時法（凍結・同時法）を案出した。本法によってCMV、WMVおよびZYMVがそれぞれ特異的に検出でき（第3表）、診断に有用であると認められた。

診断時間をさらに短縮するため、試料・酵素結合抗体の同時注入後の静置条件について検討したところ、30℃で10～30分間の静置によってCMVが検出できた（第3、4表）。この方法では、基質の反応条件は37℃で30分間なので、試料を調整後1時間以内に診断が可能である（第2図）。しかし、WMVおよびZYMVではELISA反応が低く、時間を短縮化することができなかった。したがって、WMVおよびZYMVを検出する場合、凍結・同時法を導入できるが、試料と酵素結合抗体を注入後は5℃で1夜静置し、基質の反応条件は25℃で1時間が適当であると思われる。

## 摘 要

キュウリモザイクウイルス（CMV）、カボチャモザイクウイルス（WMV）、ズッキーニ黄斑モザイクウイルス（ZYMV）に感染したキュウリ葉から各ウイルスを簡便に検出するため、酵素結合抗体法（ELISA：CLARK and ADAMS, 1977）の簡易化について検討した。ELISAの簡易化は、反応板の凍結保存と試料・酵素結合抗体の同時処理によって行った。簡易化したELISAによるCMV、WMV、ZYMVの検出手順は次のとおりである。あらかじめr-グロブリン吸着処理を行った反応板を-20℃で凍結保存し、この反応板の穴に試料と酵素結合抗体を0.1 ml（希釈倍数はともに通常のELISAの1/2）ずつ注

クロロティックリーフスポットウイルス（FLEGG and CLARK, 1979）、レタスマザイクウイルスとpeach early-browning virus（Vuurde and Maat, 1985）、peach rosette mosaic virus（Stobbs and Barker, 1985）、キュウリ緑斑モザイクウイルス（川合ら, 1985）、イネ縞葉枯ウイルス（Takahashi *et al.*, 1987）がある。筆者らが行った同時法では通常のELISAと同程度にウイルスの検出ができた（第1図）。本法において、感染葉の濃厚汁液では反応の低下がみられたが、同様な現象はFLEGG and CLARK（1979）およびVuurde and Maat（1985）によっても報告されている。その原因として、汁液中にウイルス抗原が過剰に存在すること（CLARK, 1981）、および汁液中にELISA反応を阻害する成分が存在することが考えられる。

r-グロブリン吸着処理を行った反応板を凍結保存した場合、CMVでは約7か月以内であればELISA反応の低下はなく、1年を越えても診断可能であった（第1表）。また、WMVおよびZYMVでは、2か月以内の凍結保存で検出に支障がなかった（第2表）。Takahashi *et al.*（1987）は、r-グロブリン溶液を入れた反応板を4℃で8か月間保存してもウイルスの検出は可能であり、-10℃に凍結保存してもよいと

入後、5℃で1夜静置する。反応板の洗浄後、基質液を25℃で1時間反応させ、発色程度を判定する。この方法によって、CMV, WMV, ZYMVを特異的に検出することができた。さらにCMVについては、凍結保存した反応板を用いて、試料・酵素結合抗体の同時注入後、30℃で10～30分間静置し、基質液を37℃で30分間反応させることにより、1時間以内に検出できることが判明した。

## 引用文献

- CLARK, M. F. (1981) : Immunosorbent assays in plant pathology. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 19 : 83 - 106 .
- 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 .
- FLEGG, C.L. and M.F.CLARK (1979) : The detection of apple chlorotic leafspot virus by a modified procedure of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) . *Ann. Appl. Biol.*, 91 : 61 - 65 .
- GERA, A., G. LOEBENSTEIN and B. RACCAH (1978) : Detection of cucumber mosaic virus in viruliferous aphids by enzyme-linked immunosorbent assay. *Virology*, 86 : 542 - 545 .
- 川合 昭・木村 茂・西尾 健・長尾記明 (1985) : ELISAによるキュウリ種子からのキュウリ緑斑モザイクウイルスの検出. *植防研報*, 21 : 47 - 53 .
- MARCO, S. and S. COHEN (1979) : Rapid detection and titer evaluation of viruses in pepper by enzyme-linked immunosorbent assay. *Phytopathology*, 69 : 1259 - 1262 .
- PURCIFULL, D. E., W. C. ADLERZ, G. W. SIMONE, E. HIEBERT and S. R. CHRISTIE (1984) : Serological relationships and partial characterization of zucchini yellow mosaic virus isolated from squash in Florida. *Plant Disease*, 68 : 230 - 233 .
- SAKO, N., K. MATSUO and F. NONAKA (1980) : The detection of watermelon mosaic and cucumber mosaic viruses in cucurbitaceous plants by enzyme-linked immunosorbent assay. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 46 : 647 - 655 .
- STOBBS, L. W. and D. BARKER (1985) : Rapid sample analysis with a simplified ELISA. *Phytopathology*, 75 : 492 - 495 .
- TAKAHASHI, Y., T. OMURA, K. SHOHARA and T. TSUCHIZAKI (1987) : Rapid and simplified ELISA for routine field inspection of rice stripe virus. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 53 : 254 - 257 .
- VUURDE, J. W. L. VAN and D. Z. MAAT (1985) : Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and disperse-dye immuno assay (DIA) : comparison of simultaneous and separate incubation of sample and conjugate for the routine detection of lettuce mosaic virus and pea early-browning virus in seeds. *Neth. J. Pl. Path.*, 91 : 3 - 13 .