９）簡単・高精度！　ばれいしょ・ながいも・ねぎのウイルス病診断

研究成果名：ジャガイモＹウイルス（Ｎ系統）のエライザキットおよびイムノクロマトキット
エライザ法によるナガイモえそモザイク病の診断
ねぎ（千本ねぎ）のウイルスフリー苗生産のためのウイルス検査法

道総研 中央農業試験場 病虫部 予察診断Ｇ
（株）ホクドー
十勝農業組合連合会
ＪＡぴっぷ町

１．はじめに

北海道では、ばれいしょ等の栄養繁殖性作物が栽培されていますが、様々なウイルスが発生して問題となっています。これは、ウイルスが一度感染してしまうと種いもや母株から次世代に年々広がってしまうためです。例えば、ながいもにえそ症状を示すヤマノイモえそモザイクウイルス（CYNMV）や、ねぎ（千本ねぎ）に条斑症状を示すネギ萎縮ウイルス（SYSV）などが問題となっています（図 1、図 2）。しかし、ながいもやねぎのウイルスは簡易な検出方法がありません。そこで、ながいも、ねぎのウイルスに対する抗体を作製し、高精度に診断する検査法を開発しました。

また、ばれいしょで最も発生するジャガイモ Y ウイルスえそ系統（PVY-N）では、より迅速なウイルス検査法が求められています。 そこで、ばれいしょでは高精度に診断できる市販のキットを開発しましたので、ご紹介します。

２．試験の方法

１）ウイルス遺伝子を利用した抗体の作製
２）ウイルス抗体を使った簡易・高精度な検査法の開発

３．試験の結果

１）ウイルス抗体の基になる抗原（ウイルス外被タンパク質（CP、注 1）をながいもとねぎのウイルスで作製しました。CP 遺伝子を解析し、大腸菌内で CP を大量に作らせて、抽出・精製してウイルス抗原としました。これを、ウサギに免疫して、抗体を作製しました。

２）ながいもでは、抗体を用いて簡易な検査法であるエライザ法（注 2）を試みました。サンプルの凍結方法（-15 ℃以下で 6 時間以上凍結）や磨砕バッファー（常法に 1 ％スキムミルク、2 ％ Tween20 添加）を改良し、ながいもの葉から CYNMV をエライザ法により 2 日間で検出する手法を初めて開発しました（図 3）。

３）ねぎでも同様に、抗体を用いてエライザ法を試みました。検出時期（7 月下旬～ 9 月上旬）やサンプリング部位（展開した新葉の 10cm の切り口側）を明らかにし、SYSV を 2 日間で検出することができました。

また、ねぎの苗ほ場の約 1400 株について検査を行い、有効性を実証しました（表 1）。

４）ばれいしょの PVY-N については、すでに同様の方法でマウスに免疫して抗体が得られていましたので、エライザ法とイムノクロマト法（注 3）の検査キットの開発を試みました。その結果、ばれいしょの葉からエライザ法では 3 時間、イムノクロマト法では 5 分で PVY-N を検出するキットを作製しました（図 4）。

【用語の解説】

1)外被タンパク質：ウイルスは遺伝子とタンパク質で構成されており、ウイルス抗体は外被タンパク質を抗原として反応する。

2)エライザ法：抗原と抗体を反応させ発色反応でウイルスを検出する。簡易で多検体検査が可能。医療や BSE の 1 次検査等で利用されている。

3)イムノクロマト法：インフルエンザ検査等で利用されている、簡易・迅速な検査法。

図１　ながいものCYNMVによるえそ症状

図２　ねぎのSYSVによる条斑症状

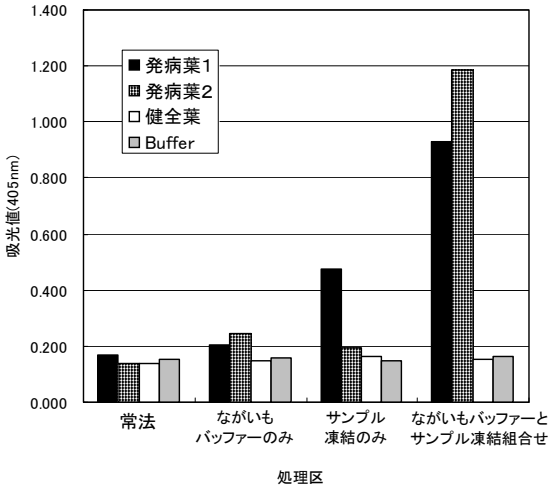

図３　ながいものCYNMVのエライザ法の改良

表1　SYSV検査法の実証試験（平成22年）

検定株数		エライザ検査数	
		検定数	陽性数
維持ほ場[a)]	990	99[b)]	1
増殖ほ場[a)]	402	134[c)]	0

a)ウイルスフリー株維持・増殖ほ場（JAぴっぷ町管理）

b)10株分を混ぜて１サンプルで検定

c)1集団(20～30株)から3株サンプリングし１サンプルとして検定

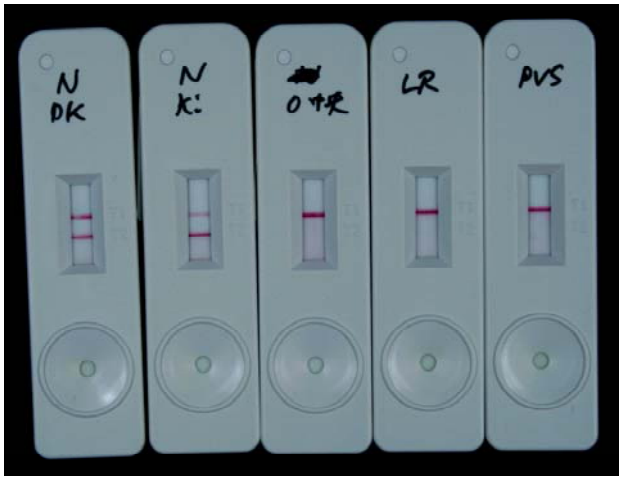

図４　ジャガイモＹウイルスＮ系統のイムノクロマトキットによる検出

注）赤線が 2 本で、陽性、1 本で陰性、左から PVY-N の DK-87 株、PVY-N の Ki 株、PVY-普通(O)系統中央農試株、ジャガイモ葉巻ウイルス（PLRV）葉およびジャガイモ S ウイルス（PVS）葉