

スは接種点から1時間に34 cmの速度で移行したと報告したが、Bennett (1934)の測定結果は毎時145 cmの割であったという。Storey (1928)はmaize streak virusの移行速度を測定したところ1時間に20 cmという数値を得た。孫工(1973)はイネ縞葉枯病ウイルスは1時間に25~30 cmの速度で移行したと報じている。これらのウイルスの媒介昆虫はいずれもヨコバイ、ウンカ類であり、その吸汁部位から一定距離の所で、ある時間後に葉を切りとり、ウイルスがそれ以前にこの所を越えたかどうかを検したものである。これらの結果はタバコモザイクウイルスやジャガイモXウイルスが接種葉から移行するのに数日を要するのと比べて対照的である。これはbeet curly top virusなどは直ちに篩部細胞に注入されるのに対して、タバコモザイクウイルスなどは数日を経て篩部細胞に達するためであろうと考えられる。

本実験によると、ジャガイモヒゲナガアブラムシによって接種されたウイルスは、わずかのものは24時間以内に、多くは24~48時間に接種葉から茎に移行し、3~4日後に頂葉からウイルスが検出された。おそらくこの時間より早くウイルスが増殖しているものと考えられる。これと同じような結果はジャガイモ葉巻病ウイルス(MacKinnon, 1960; 田中・塩田, 1973)やbarley yellow dwarf virus(Gill, 1968)でも得られているが、移行時間はかなりの幅がある。例えば、ジャガイモ葉巻病ウイルスについてMacKinnon(1960)はウイルスが*Physalis floridana*の接種葉から茎に移行するのに20時間を要すると報告し、田中・塩田(1973)は8~16時間であったと述べている。Gill(1968)はbarley yellow dwarf virusは6~12時間に接種葉から茎にわずか移行し、多くは72時間以内に移行したと報告した。以上の結果を総合すると、本ウイルス、ジャガイモ葉巻病ウイルス、barley yellow dwarf virusなどのウイルスの移行時間は、タバコモザイクウイルスなどよりも早く、beet curly top virusなどよりは遅いようである。本ウイルスなどの感染部位がおそらく維管束系であることから、アブラムシの口針によって接種されたウイルスのわずかは直接

篩管に入り、多くは篩部柔細胞に感染すると考えられる。したがって篩管に入ったウイルスはかなり早く24時間以内に移行し、篩部柔細胞などに感染したウイルスは、そこで増殖し、篩管に入るまでに24~48時間を要するものと考えられる。しかしウイルスがどこでどのように増殖しているのか、篩管を通る時の形が完全な粒子であるか否かは明らかでない。

植物体内におけるウイルスの分布をみると、接種時にすでに展開している葉には病徴があらわれず、ウイルスも検出されなかった。すなわち接種時すでに展開している葉にはウイルスは移行しにくいものと考えられる。

E ウイルスの純化および諸性質

ダイズ矮化ウイルスはその伝染方法および病徴からジャガイモ葉巻病ウイルスで代表されるpotato leafroll virus group(Gibbs, 1969)に属するものと考えられる。このグループのウイルス(以下PLRV-グループと略記)は汁液接種ができず、植物体内におけるウイルス濃度がきわめて低いため、ウイルスの純化が困難とされ、現在までジャガイモ葉巻病ウイルス(Peters, 1967 a, b; Kojima *et al.*, 1968, 1969; Kojima and Murayama, 1972 b), barley yellow dwarf virus(Rochow and Brakke, 1964; Rochow *et al.*, 1971)の2種のウイルスについて行なわれたにすぎない。ここでは本ウイルスの活性を検定するため接種方法を確立するとともに純化方法を検討し、ウイルス粒子の形態や諸性質を知るために実験を行なった。

1 実験材料および方法

供試ウイルス：供試ウイルスは矮化強毒系統(SDV-DS)と黄化系統(SDV-Y)で、それぞれダイズ品種「白鶴の子」に接種した。接種後20~50日目に地上部のみを刈りとり、ウイルスの純化材料とした。植物の栽培条件、接種方法は前述の方法に従った。

虫体内注射法：ジャガイモヒゲナガアブラムシに対する機械的注射はMurayama and Kojima(1965)および菅原ら(1970 b)の方法に準じて行なった。すなわちジャガイモヒゲナガアブラムシ

の無毒虫(生後2~5日目の若齢虫)を炭酸ガスで麻酔させた後、1頭ずつ毛筆で昆虫支持台にのせ、解剖顕微鏡下でガラス毛细管針を用いて各試料を虫の腹部に注入した。注射針は直径3mmの硬質ガラス管をバーナーで熱して2回引き伸ばし、さらに先端をマイクロフォージ(高島商会製)で鋭利にした(直径10~20 μ)。注射は低温(4°Cあるいは7°C)で行ない、注射後の虫はベトリ皿内の健全ダイズ切離葉に移し、4°Cで1夜おいた後検定植物に移し、接種した。接種は20°Cの陽光定温器内で行ない、接種吸汁時間は3~4日間とした。

膜吸汁法:直径3cm,高さ4.5cmのプラスチック製円筒の一端にパラフィルム(Marathon products)をできるだけうすく伸ばして張りつけた。その上に20%蔗糖を含むウイルス液を数滴おき、さらに上からもう1枚のパラフィルムで封じた。円筒の中に無毒ジャガイモヒゲナガアブラムシの幼虫を約60頭入れた後、円筒の他の端をナイロンネットで覆い、15°Cの陽光定温器内に2日間おいた。その後1検定植物あたりアブラムシ3頭の集団で接種を行なった。

純化の方法:詳細は各項目ごとに述べるので共通の方法についてのみ記す。罹病ダイズ茎葉(多くは生葉)を肉挽機とすり鉢で磨砕した。沈渣の再懸濁にはテフロンガラスホモジナイザーを用いた。純化の操作は原則的には4°Cの冷室で行なった(ただし0.5M磷酸緩衝液を用いた時には析出を防ぐため室温で行った)。遠心分離機はマルサン高速冷却遠心機、日立40P型超遠心分離機および日立65P型超遠心分離機を用いた。高速遠心はRP40またはRP60Tローターを用いた場合には40,000rpm(100,000g)あるいは36,000rpm(90,000g)、120分間、RP30ローターを用いた場合には27,000rpm(62,000g)、180分間とした。低速遠心はいずれのローターを用いた場合も10,000rpm、15分間とした。

蔗糖密度勾配遠心法:蔗糖密度勾配遠心はRochow and Brakke (1964) および Kojima and Murayama (1972 b) の方法と同じ条件で行なった。すなわち40%, 30%, 20%, 10%蔗糖液

(0.001M EDTA を含む0.01M磷酸緩衝液, pH 7.4, 中に溶解)を直径2.5cm,長さ7.5cmのニトロセルローズチューブに7, 7, 7, 4mlずつ重層し、4°Cの冷室に1夜静置した。そのカラムに分画遠心後の濃縮試料2mlを静かに重層し、RPS25ローターで23,000rpm(52,000g)、180分間遠心した。遠心分離後のウイルスの分画と定量は、ISCO密度勾配分析装置(Model UA 4)によって行なった。その条件は10mmパス・セルを使用、毎分2.5mlの流速で0~0.5の範囲で測定した。

紫外部吸収測定:純化標品の紫外部吸収スペクトルの測定は日立自記分光光度計(Model 356)で行なった。

電子顕微鏡観察:純化標品を2%リンタングステン酸(pH 7.0)で逆染色し、電子顕微鏡観察に供した。HS-7D型電子顕微鏡(日立製作所製, 50KV)を使用し、直接倍率20,000倍で観察した。

2 虫体内注射法による接種

a 罹病植物の磨砕液を接種源とした場合

SDV-DS感染植物25gに50mlの0.01M磷酸緩衝液(pH 7.4)を加え、磨砕、搾汁した後、3,500rpm、15分間遠心分離した。その上清を接種源として無毒アブラムシに注射した。接種は1植物あたり1頭ずつで行なった。その結果は第28表に示すとおりである。

第28表 罹病植物の磨砕液を接種源とした場合(SDV-DS)

実験	注射虫数	接種性数	感染性数	感染率 %
1	47	36	0	0
2	54	38	2	5.3

この結果、実験1では感染は認められなかったが、実験2では低率(5.3%)ながら感染が認められた。すなわち本ウイルスも虫体内接種法によって無毒虫を保毒化させることができた。

b 保毒虫の磨砕液を接種源とした場合

SDV-DS感染葉上で飼育したジャガイモヒゲナガアブラムシ約300頭に0.01M磷酸緩衝液(pH 7.0)1mlを加えテフロンガラスホモジナイザーで磨砕した。その磨砕液を3,500rpm、15分遠心

分離した後、その上清を接種源として無毒虫に注射した。接種は1植物あたり1頭で行なった。

結果は第29表に示すとおりである。

第29表 保毒虫の磨砕液を接種源とした場合 (SDV-DS)

実 験	注射虫数	接種性数	感染性数	感 染 率 %
1	35	25	0	0
2	55	49	2	4.1

この結果、罹病植物を接種源とした場合と同様、低率 (4.1%) ではあったが感染が認められた。

c 保毒虫の体液を接種源とした場合

SDV-DS 罹病葉上で24, 48, 72 および96時間吸汁させたアブラムシの体液をとり、直接無毒アブラムシに注射接種を行なった。接種は1植物あたり1頭で行なった。結果は第30表に示すとおりである。

第30表 獲得吸汁時間の異なる保毒虫の体液を接種源とした場合 (SDV-DS)

接 種 源	注 射 虫 数	接 種 性 数	感 染 性 数	感 染 率 %
24時間獲得吸汁の虫	40	33	4	12.0
48時間獲得吸汁の虫	40	39	5	12.8
72時間獲得吸汁の虫	40	37	9	24.3
96時間獲得吸汁の虫	40	35	4	11.4

保毒虫の体液を接種源として注射接種を行なった場合もアブラムシはウイルスをうつすことができた。獲得吸汁時間の長いアブラムシの体液を接種源とした場合ほど高い感染率を示したが、顕著な差異はみられなかった。なお保毒虫の磨砕液より体液を接種源とした方が感染率が高いようであった。

d 濃縮した罹病植物汁液を接種源とした場合

粗汁液を用いて虫体内に接種した場合にはきわめて感染率が低かったため、つぎに分画遠心法によって濃縮した試料を無毒虫に注射したところ、感染率がより高まった。そこで、つぎの4で示すように虫体内注射法を用いてウイルスの活性を調べながらウイルス純化方法の検討を行なった。

3 膜吸汁法による接種

a 罹病植物および保毒虫の磨砕液を接種源とした場合

実 験 1

SDV-DS 感染植物2gに対して0.01 M 磷酸緩衝液 (pH 7.0) 4 ml を加え、乳鉢内で磨砕し、その磨砕液を3,000 rpm, 15分間遠心分離した。その上清に等量の40% 蔗糖液を加え、これを接種源として膜吸汁法による接種を行なった。このように粗汁液を用いた場合には、アブラムシはよく吸汁せず2日後には死亡虫が多くなったため、1回目の実験は2日間吸汁後の生存虫を、2回目と3回目の実験は1日間吸汁後の生存虫を、それぞれ検定植物に移して感染の有無を確かめた。

その結果は第31表に示すとおりで、粗汁液を接種源とした場合にはアブラムシはウイルスをうつすことができなかった。

第31表 罹病植物および保毒虫の磨砕液を接種源とした場合の膜吸汁法による接種

接 種 源	実 験 a)		
	1	2	3
罹病植物粗汁液	0/5b)	0/12	0/12
保毒虫磨砕液	—	0/11	0/12

a) 実験1は膜上で2日間吸汁、実験2と3は膜上で1日間吸汁させた。

b) 分母：接種性数、分子：感染性数。

実 験 2

保毒虫200頭に対して0.01 M 磷酸緩衝液 (pH 7.0) 1 ml を加え、テフロンガラスホモジナイザーで磨砕した。その磨砕液を3,500 rpm, 15分間遠心分離し、その上清に等量の40% 蔗糖液を加えて、これを接種源として膜吸汁法による接種を行なった。

その結果は第31表に示すとおりで、罹病植物の粗汁液の場合と同様、保毒虫の磨砕液を接種源としても感染は認められなかった。

b 濃縮した罹病植物汁液を接種源とした場合

罹病植物から分画遠心法によって濃縮した試料を用いて膜吸汁法による接種を行なったところ、アブラムシはウイルスを伝搬することができたので、蔗糖液の濃度と膜上での吸汁時間について予備実験を行なった。

実験 1

SDV-DS 罹病植物から第 12 図に示す方法（ただし蔗糖密度勾配遠心は行なわなかった）で原量の 400 倍に濃縮したウイルス液を 4 本の小試験管に分けた。各々に 80, 40, 20 および 10% 蔗糖液を等量加えて、最終蔗糖濃度 40, 20, 10 および 5% を含むウイルス液とした。それらを接種源として膜を通して吸汁させた。その結果は第 32 表に示すとおりである。

第 32 表 膜吸汁のための蔗糖液の濃度

蔗糖液の濃度	接種株数	感染株数
5%	6	5
10	5	5
20	12	12
40	9	9

ウイルス濃度が高かったため、いずれの区も高い感染率を示した。蔗糖液の濃度は 20% がよく、5% と 10% の濃度ではアブラムシの吸汁がよくなかった。

実験 2

20% 蔗糖を含むウイルス液を接種源として、膜上で 1 日、2 日および 3 日間吸汁させたアブラムシを検定植物に移して接種を行なった。その結果は第 33 表に示すとおりで、ウイルス濃度が高いと 1 日間の吸汁でも高率にウイルスを伝搬することができた。

第 33 表 膜吸汁のための吸汁時間

実験	膜上での吸汁時間		
	1 日	2 日	3 日
1	12/12 a)	12/12	8/10
2	0/12	1/12	—

a) 分母：接種株数，分子：感染株数。

c 虫体内注射法と膜吸汁法との比較

SDV-DS 感染植物および SDV-Y 感染植物から第 12 図に示す純化方法（蔗糖密度勾配遠心は行なわなかった）によって、各々原量の 500 倍に濃縮した試料を原液とし、さらに 2 倍および 8 倍に希釈して接種源とした。注射虫は 4℃ で 1 夜おいた後、2 頭ずつ検定植物に移して接種を行ない、また膜吸汁法では膜上で 2 日間吸汁させたア

ブラムシを同様に 2 頭ずつ検定植物に移して接種を行なった。いずれも接種条件は同じとした。結果は第 34 表に示すとおりである。

第 34 表 注射法と膜吸汁法の比較

接種源	注 射 法			膜 吸 汁 法		
	接種株数	感染株数	感染率 %	接種株数	感染株数	感染率 %
SDV-DS 原液 a) ×2 ×8	13	12	92.3	12	12	100.0
	13	12	92.3	12	11	91.7
	13	11	84.6	12	8	66.7
SDV-Y 原液 a) ×2 ×8	14	9	64.3	12	10	83.3
	13	8	61.5	12	9	75.0
	—	—	—	12	1	8.3

a) 500 倍濃縮液。

この表から明らかなように、SDV-DS および SDV-Y はいずれも注射法、膜吸汁法によって、高い感染率を示した。注射法と膜吸汁法はほぼ同等の精度であった。

4 罹病植物汁液の清澄化と濃縮

罹病植物からウイルスを純化するためには、予備分別として粗汁液の清澄化と濃縮が重要な過程である。本実験ではクロロホルム・n-ブタノール混合液を用いて (Steere, 1959) 汁液の清澄化を行ない、また清澄液の濃縮は高速遠心法によって行なった。さらに本ウイルス活性に対する各種緩衝液、ホ素イオン濃度、disodium ethylenediamine-tetraacetate, dihydrate (EDTA) および 2-mercaptoethanol (2-ME) の影響について検討した。

a 分画遠心によるウイルスの濃縮

SDV-DS 感染ダイズ莖葉 100 g に 0.1 M 磷酸緩衝液 (pH 7.4) 200 ml を加え磨碎、搾汁した。その搾汁液を 3,500 rpm, 15 分間遠心し、その上清（一部を対照としてとる）を 10,000 rpm, 15 分間遠心し、さらにその上清を 40,000 rpm, 120 分間の高速遠心を行なった。得られた沈液は 0.01 M 磷酸緩衝液 (pH 7.4) 5 ml に懸濁させた後、10,000 rpm, 15 分間遠心し、その上清を無毒アブラムシに注射した。注射虫は検定植物に 1 頭ずつ移して接種を行なった。

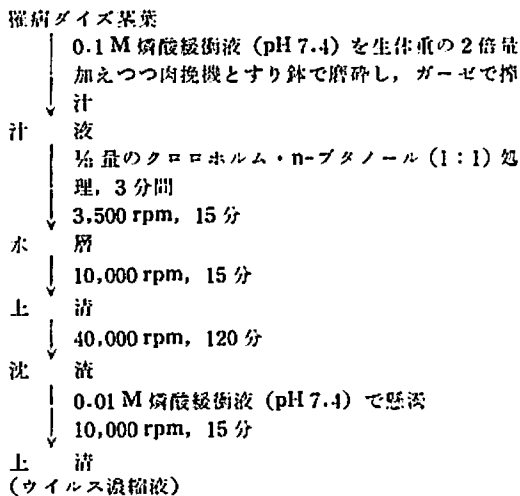
その結果、対照の粗汁液では感染が認められなかったが、分画遠心で原材料の 20 倍に濃縮した

試料は5%の感染率を示した。

b クロロホルム・n-ブタノール混合液による清澄化

方法は第10図に示す。SDV-DS罹病植物の茎葉50gに0.1M 磷酸緩衝液(pH 7.4) 100mlを加え磨碎、搾汁した(ただし実験2ではその汁液の一部をとり、3,500 rpm, 15分間遠心し、その上清を対照として無毒虫に注射した)。その搾汁液に1/2量のクロロホルム・n-ブタノール混合液(1:1)を加え3分間攪拌した後、3,500 rpm, 15分間遠心した。水層をとり10,000 rpm, 15分間遠心し、さらに上清を40,000 rpm, 120分間遠心した。得られた沈渣は0.01M 磷酸緩衝液(pH 7.4) 2mlに懸濁し、10,000 rpm, 15分間遠心後、上清を無毒アブラムシに注射した。注射虫は検定植物に1頭ずつ移して接種を行なった。実験は2回行ない、その結果は第35表に示すとおりである。

対照の粗汁液では感染が認められなかったが、クロロホルム・n-ブタノール処理後20倍あるいは



第10図 クロロホルム・n-ブタノール処理と分画遠心によるウイルスの濃縮

第35表 クロロホルム・n-ブタノール処理の影響

実験	接種源	注射虫数	接種数	感染数	感染率%
1	20倍濃縮	55	45	5	11.1
2	対照(粗汁液)	32	27	0	0
	25倍濃縮	65	57	9	15.8

は25倍に濃縮した試料は、各々11.1%と15.8%の感染率を示した。すなわち本ウイルスはクロロホルム・n-ブタノール処理によって失活しないことがわかった。

c EDTA, 尿素および2-mercaptoethanolの効果

ウイルス純化のための予備実験として、ウイルスの凝集による損失を少なくするためにEDTAおよび尿素と2-mercaptoethanol(2-ME)の効果について実験を行なった。

実験1

SDV-DS感染植物50gから第10図に示した方法でクロロホルム・n-ブタノール処理と分画遠心を行なった。高速遠心を行なう前に上清を、3本の遠心管に分けておき、高速遠心後に得られた沈渣を0.01M 磷酸緩衝液(pH 7.4)(対照)、0.001M EDTAを含む0.01M 磷酸緩衝液(pH 7.4)および0.5M 尿素と0.1% 2-MEを含む0.01M 磷酸緩衝液(pH 7.4)各々1mlで懸濁し、10,000 rpm, 15分間遠心した。その上清を無毒アブラムシに注射した。注射虫は検定植物に1頭ずつ移して接種を行なった。結果は第36表に示すとおりである。

EDTAを含む磷酸緩衝液で再懸濁した区が12.1%と最も高い感染率を示し、ついで尿素と2-ME添加区で、感染率は8.8%であった。対照の磷酸緩衝液のみの区は2.8%の感染率を示した。

実験2

SDV-DS感染ダイズ茎葉50gを1% 2-MEを含む0.1M 磷酸緩衝液(pH 7.4) 100mlで磨碎した後、第10図に示す方法で有機溶媒処理と分画遠心を行なった。得られた沈渣は0.1% 2-MEを含む0.01M 磷酸緩衝液(pH 7.4)および0.001M EDTAを含む0.01M 磷酸緩衝液(pH 7.4)各々1mlに懸濁した後、同様に低速遠心(10,000 rpm, 15分間)し、上清を原液、5倍および25倍に希釈して無毒アブラムシに注射した。注射虫は検定植物に2頭ずつ移して接種を行なった。結果は第36表に示すとおりである。

EDTA添加区が原液で56.3%の感染率を示

第36表 EDTA, 尿素および 2-mercaptoethanol (2-ME) の効果

実験	抽出用緩衝液 a)	懸濁用緩衝液 b)	注射虫数	接種株数	感染株数	感染率 %
実験 1c)	対 照	対 照	41	36	1	2.8
		0.001 M EDTA	40	33	4	12.1
		0.5 M 尿素+0.1 % 2-ME	42	34	3	8.8
実験 2c)	1 % 2-ME	0.1 % 2-ME (原液)	40	20	4	20.0
		〃 (× 5)	35	17	3	17.6
		〃 (×25)	35	18	0	0.0
		0.001 M EDTA (原液)	33	16	9	56.3
		〃 (× 5)	33	16	4	25.0
		〃 (×25)	32	14	0	0.0
実験 3c)	0.01 M EDTA	0.001 M EDTA (原液)	48	23	18	78.3
		〃 (× 5)	32	16	6	37.5
		〃 (×25)	36	18	2	11.1
		0.5 M 尿素+0.1 % 2-ME (原液)	43	21	17	81.0
		〃 (× 5)	39	19	2	10.5
		〃 (×25)	37	18	0	0.0

a) 抽出用緩衝液には 0.1 M 磷酸緩衝液 (pH 7.4) を用いた。

b) 懸濁用緩衝液には 0.01 M 磷酸緩衝液 (pH 7.4) を用いた。

c) 実験 1 は 1 植物あたり 1 頭ずつで接種を行ない、実験 2 と 3 は 1 植物あたり 2 頭ずつで接種を行なった。

し、2-ME 添加区は 20 % の感染率を示した。接種源を希釈するにつれて感染率は低下したが、概して 2-ME 添加区より EDTA 添加区の方が高い感染性を示した。

実験 3

SDV-DS 感染ダイズ茎葉 50 g を実験 2 とは逆に 0.01 M EDTA を含む 0.1 M 磷酸緩衝液 (pH 7.4) で磨砕、搾汁した後、第 10 図の方法で清澄化と濃縮を行なった。得られた沈渣は 0.001 M EDTA を含む 0.01 M 磷酸緩衝液 (pH 7.4) と 0.5 M 尿素および 0.1 % 2-ME を含む 0.01 M 磷酸緩衝液 (pH 7.4) 各々 1 ml で懸濁した後、同様に低速遠心し、その上清を原液、5 倍および 25 倍に希釈して無毒アブラムシに注射した。注射虫は 2 頭ずつ検定植物に移して接種を行なった。結果は第 36 表に示すとおりである。

EDTA 添加区と尿素および 2-ME 添加区は、原液で各々 78.3 % と 81.0 % の感染率を示したが、希釈液について比較すると、EDTA 添加区の方が高い感染率を示した。

以上実験 1, 2 および 3 の結果から、抽出用には 0.01 M EDTA を含む 0.1 M 磷酸緩衝液 (pH 7.4)、沈渣の懸濁用には 0.001 M EDTA を含む 0.01 M 磷酸緩衝液 (pH 7.4) を用いることにより、高いウイルス活性を保持できることが判明した。なおダイズ茎葉を磨砕すると、その汁液はほとんど褐変しなかったため、DIECA (sodium diethyldithiocarbamate) やアスコルビン酸などの還元剤の効果については検討を加えなかった。

d 罹病茎葉の凍結および分画遠心の回復の影響

実験 1

SDV-DS 感染ダイズ茎葉 100 g に 0.01 M EDTA を含む 0.1 M 磷酸緩衝液 (pH 7.4) で磨砕後、第 10 図に示す方法で清澄化と濃縮を行なった。得られた沈渣は 0.005 M EDTA を含む 0.01 M 磷酸緩衝液 (pH 7.4) で懸濁し、10,000 rpm、15 分間遠心した。その上清を再び 40,000 rpm、120 分間遠心し、得られた沈渣は同じ緩衝液 1 ml で懸濁し、低速遠心 (10,000 rpm、15 分間) 後、

第37表 罹病葉の凍結および2回分画遠心がウイルス活性におよぼす影響

処 理	注射虫数	接種株数	感染株数	感 染 率	2 日 後 (4 °C)				
					注射虫数	接種株数	感染株数	感 染 率	
生 葉	分画 1a)	40	16	2	12.5 ³⁾	25	10	0	0.0 ³⁾
	分画 2	46	16	5	31.3	23	9	1	11.1
凍 結 葉	分画 1a)	40	12	3	25.0	24	11	2	18.2
	分画 2	50	13	5	38.5	25	11	5	45.5

a) 分画1は10倍濃縮, 分画2は50倍濃縮。

上清を原液, 10倍および100倍希釈液として無毒アブラムシに注射した。注射虫は2頭ずつ検定植物に移して接種を行なった。

その結果, 原液の感染率は30%, 10倍希釈液は5.3%, および100倍希釈液は0%であった。

実験 2

SDV-DS 感染ダイズ茎葉 (100g) を50gずつ二つに分けた。一つは生葉のまま, 他の一つは-20°Cで凍結させた後, 実験1と同じ方法で清澄化と濃縮を行なった。ただし沈渣の懸濁には0.001 M EDTA を含む0.01 M 磷酸緩衝液 (pH 7.4) を用いた。1回目の高速遠心で得られた沈渣は5 ml の緩衝液で懸濁し, 1部をとり分画1とした。2回目の分画遠心で得られた沈渣は1 ml で懸濁し, 分画2とした。各分画を用いて無毒アブラムシに注射接種した。なお各試料とも4°Cに2日間保存し, 再びウイルス活性を調べた。結果は第37表に示すとおりである。

その結果, 罹病葉は凍結してもウイルス活性を失わず, 生葉よりもむしろ高い感染率を示した。2回の分画遠心で50倍に濃縮した分画2は, 1回の分画遠心で10倍に濃縮した分画1より, 生葉, 凍結葉いずれも高い感染率を示した。なお4°Cで2日間保存してもウイルスは失活しなかった。

e 水素イオン濃度および各種緩衝液の影響

実験 1

SDV-DS 感染ダイズ茎葉 200g を0.01 M EDTA を含む0.1 M 磷酸緩衝液 (pH 7.4) で抽出後, 第10図に示す方法で清澄化と分画遠心を行なった。得られた沈渣は pH 9.0, pH 8.0, pH 7.4 および pH 6.5 の0.01 M 磷酸緩衝液 (各々0.001 M EDTA を含む) 各々2 ml で懸濁した後, 低速遠心 (10,000 rpm, 15分間) し, その上清を無毒

アブラムシに注射した。なお同じ試料は4°Cで2日間保存した後にもウイルス活性を調べた。結果は第38表に示すとおりである。

その結果, 最初に行なった注射虫は死亡する虫が多く, そのため感染率が低く十分比較することができなかった。そこで2日間保存した試料も舍めて比較すると, pH 7.4, pH 8.0 および pH 9.0 では感染率に差はみられなかったが, pH 6.5 では感染率が若干低下した。

実験 2

SDV-DS 感染ダイズ茎葉 100g を実験1と同じ方法で清澄化と分画遠心を行ない, 得られた沈渣は pH 6.0, pH 6.5, pH 7.4, pH 8.0 および pH 9.0 の0.01 M 磷酸緩衝液 (0.001 M EDTA を含む) で懸濁し, 10,000 rpm, 15分間遠心した。その上清を36,000 rpm, 120分間遠心し, 得られた沈渣は各々前に懸濁したのと同じ pH の緩衝液1 ml で懸濁した。低速遠心後その上清を無毒アブラムシに注射した。なお各試料は4°Cで2日間保存した後もウイルス活性を調べた。結果は第38表に示すとおりである。

各区いずれも高い感染率を示した。すなわち本ウイルスは pH 6.0~9.0 の間ではかなり安定であると考えられる。

実験 3

各種緩衝液の本ウイルスにおよぼす影響について検討した。SDV-DS 感染ダイズ茎葉 100g を用いて実験2と同じ方法で行なった。ただし得られた沈渣はつぎの緩衝液で懸濁した。すなわち0.1 M トリス緩衝液 (pH 8.0), 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 7.0), 0.01 M ホウ酸緩衝液 (pH 8.0), 0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 7.6) および0.01 M 磷酸緩衝液 (pH 7.4, 0.001 M EDTA を含む) である。

第 38 表 各種緩衝液および水素イオン濃度のウイルス活性におよぼす影響

実験	緩 衝 液	pH	注射虫数	接種株数	感染株数	感 染 率	2 日 後 (4 °C)			
							注射虫数	接種株数	感染株数	感 染 率
実験 1	0.01 M 磷酸緩衝液 a)	6.5	42	11	0	0.0 ^{ab}	23	11	1	9.1 ^{ab}
	〃	7.4	37	11	0	0.0	22	9	3	33.3
	〃	8.0	40	9	1	11.1	25	12	4	33.3
	〃	9.0	42	13	1	7.7	21	9	3	33.3
実験 2	0.01 M 磷酸緩衝液 a)	6.0	30	14	11	78.6	15	7	7	100.0
	〃	6.5	30	15	13	86.7	14	7	7	100.0
	〃	7.4	28	14	13	92.9	18	9	7	77.8
	〃	8.0	30	14	11	78.6	16	8	5	62.5
	〃	9.0	30	15	11	73.3	15	8	6	75.0
実験 3	0.1 M トリス緩衝液	8.0	24	12	0	0.0	26	13	0	0.0
	0.1 M 酢酸緩衝液	7.0	25	12	5	41.7	25	13	6	46.2
	0.01 M ホウ酸緩衝液	8.0	26	13	10	76.9	25	11	7	63.6
	0.1 M クエン酸緩衝液	7.6	27	12	1	8.3	26	11	0	0.0
	0.01 M 磷酸緩衝液 a)	7.4	26	13	5	38.5	26	13	8	61.5

a) 0.01 M 磷酸緩衝液にはすべて 0.001 M EDTA を含む。

最後の沈渣は各々 1 ml で懸濁し、低速遠心した後、上清を無毒アブラムシに注射した。なお各試料は 4°C で 2 日間保存した後もウイルス活性を調べた。結果は第 38 表に示すとおりである。

0.01 M ホウ酸緩衝液 (pH 8.0) が最も高い感染率を示し、ついで 0.01 M 磷酸緩衝液 (pH 7.4) と 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 7.4) であった。0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 7.6) では感染率が低く、0.1 M トリス緩衝液 (pH 8.0) では感染が認められなかった。なおクエン酸緩衝液と磷酸緩衝液で再懸濁した液は、他の緩衝液で再懸濁したもの比べて清澄であり、逆にトリス緩衝液と酢酸緩衝液を用いた場合、4°C で保存すると 10 日後に白濁した沈澱を生じた。

5 蔗糖密度勾配遠心法によるウイルスの分離

有機溶媒処理によって清澄化し、分画遠心によって濃縮した試料を、さらに精製するため蔗糖密度勾配遠心法による分画化を行なった。ウイルスの分画と定量は ISCO 密度勾配分析装置によって行ない、純化標品につき生物検定、粒子の形態観察および紫外外部吸収測定を行なった。

a 純化方法の検討

実験 1

SDV-DS 感染ダイズ茎葉 250 g (対照として健全ダイズ茎葉 300 g) に 0.01 M EDTA を含む 0.1 M 磷酸緩衝液 (pH 7.4) を加え磨砕し、その磨砕液をクロロホルム・n-ブタノール混合液 (1:1) ½ 量で処理し、8,000 rpm, 15 分間遠心した。水層をとり、分画遠心 (36,000 rpm, 120 分間と 10,000 rpm, 15 分間) を行なった後、得られた沈渣は 0.001 M EDTA を含む 0.01 M 磷酸緩衝液 (pH 7.4) で懸濁し、蔗糖密度勾配遠心の試料とした。

RPS 25 ローターを用いて 23,000 rpm, 180 分間遠心後のチューブを暗室で上部から照明すると、罹病植物からの試料は液面より 12—28 mm の間がやや白濁しており、とくに 16—18 mm の位置に乳白色の濃いバンドが観察された。これに対して健全植物からの試料は液面より 12—22 mm の位置に白濁したバンドがみられたが、罹病植物からのものよりかなり薄かった。

ISCO 密度勾配分析装置による走査像は、第 11 図に示すとおりで、植物成分の混入が多くウイルスによる単独のピークはみられなかった。なお罹病植物から得た試料は、健全植物からのものより植物成分に由来すると考えられる夾雑物が多いよ

うであった。

つぎにチューブの液面から17—21 mm, 21—25 mm, 25—29 mm および 29—33 mm の部分を取り, 各々緩衝液で希釈した後, 高速遠心 (36,000 rpm, 120 分間) によって蔗糖を取り除き, 各分画を逆染色法で電顕観察した。その結果, 25—29 mm および 29—33 mm の各分画に多くの均一な球形粒子が観察された。

実験 2

SDV-Y 感染植物 150 g から実験 1 とまったく同じ方法で実験を行なった。

その結果, ISCO 密度勾配分析装置による走査像は実験 1 の場合と同様であった (第 11 図)。そこで遠心チューブの液面から 24—26 mm, 26—28 mm, 28—30 mm, 30—32 mm および 32—34 mm の部分を取り, 希釈後高速遠心によって蔗糖を取り除き, 各分画の感染性を虫体内注射法によって確かめた。その結果は第 39 表に示すとおりである。

第 39 表 蔗糖密度勾配カラムの各分画のウイルス活性 a)

分画	液面からの距離 (mm)	注射回数	接種回数	感染数	感染率 %
1	24—26	26	13	5	38.5
2	26—28	27	13	4	30.8
3	28—30	27	13	1	7.7
4	30—32	27	13	0	0.0
5	32—34	27	13	0	0.0

a) SDV-Y 使用。

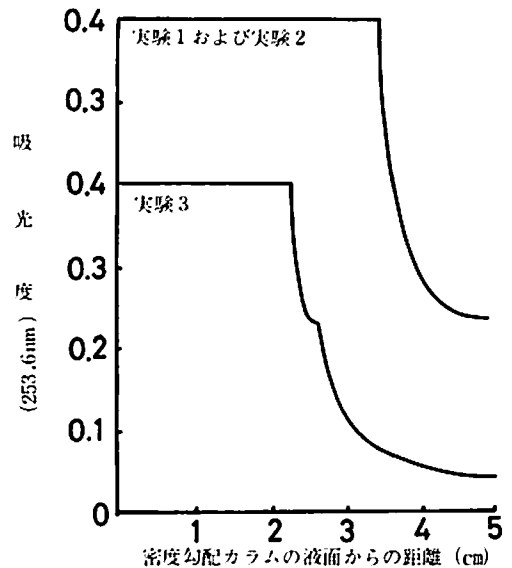
表から明らかなように, チューブの液面から 24—26 mm と 26—28 mm の部分に高い感染性があった。この感染性のある部分は実験 1 でみられた粒子の位置ともほぼ一致しており, 液面から 24—28 mm の部分がウイルス部分と考えられた。

実験 3

植物細胞成分を除去するため, 抽出用を高濃度の磷酸緩衝液を用い, さらに分画遠心の前に polyethylene glycol # 6,000 (PEG) による沈澱の方法を適用してウイルスの純化を行なった。SDV-DS 感染ダイズ茎葉 200 g に対して 0.5 M 磷酸緩衝液 (pH 7.4) を 400 ml 加え善碎し, その善碎液に 1/2 量のクロロホルム・n-ブタノール混合

液 (1:1) を加えた。6,000 rpm, 15 分間遠心後, 水層を集め最終濃度が 8 % になるように PEG を加え, 60 分間スターラーで攪拌した。その液を遠心管に移し 60 分間放置した後, 6,000 rpm, 15 分間遠心した。以上の操作はすべて室温で行なった。得られた沈澱は 0.001 M EDTA を含む 0.01 M 磷酸緩衝液 (pH 7.4) で溶かし, 分画遠心を反復した。得られた濃縮試料を蔗糖密度勾配遠心法によってさらに分画化した。

その結果, ISCO 密度勾配分析装置による走査像は第 11 図に示すとおりである。すなわちチューブの液面から 25—27 mm にウイルスによると考えられる肩がみられたが, まだ植物成分の混入が多く, ウイルスを完全に分離することができなかった。



第 11 図 蔗糖密度勾配遠心分離 (ISCO 密度勾配分析装置による走査像)

b 純化

植物成分を除去するため, 前記実験 3 の方法にさらに fluorocarbon (Daifron S-3) 処理による汁液の清澄化を加えた (Kojima and Murayama, 1972 b)。その方法は第 12 図に示すとおりである。

その結果, 蔗糖密度勾配遠心後のチューブを暗室で上部から照明すると, 液面より 25—27 mm の位置に乳白色の明瞭なバンドがみられた (図版 13—1)。さらにウイルスの量が多いときには, 液

罹病ダイズ葉

汁液
0.5 M 磷酸緩衝液 (0.01 M EDTA を含む, pH 7.4) を生体重の 2 倍量を加えつつ肉挽機で磨砕し, さらにすり鉢で磨砕する。

水層
少量のクロロホルム・n-ブタノール混合液 (1:1) で処理, 3 分間攪拌
6,000 rpm, 15 分間

沈澱
PEG を最終濃度が 8% になるように加える, 60 分間攪拌, 60 分間放置
6,000 rpm, 15 分
〔以上の実験は室温で行ない, 以下は冷室で行なう〕

上清
0.01 M 磷酸緩衝液 (0.001 M EDTA を含む, pH 7.4) で懸濁
少量のダイフロン S-3 処理, 3 分間攪拌
3,500 rpm, 15 分

沈澱
40,000 rpm, 120 分

上清
0.01 M 磷酸緩衝液 (0.001 M EDTA を含む, pH 7.4) で懸濁
10,000 rpm, 15 分

沈澱
40,000 rpm, 120 分

上清
0.01 M 磷酸緩衝液 (0.001 M EDTA を含む, pH 7.4) で懸濁
10,000 rpm, 15 分

沈澱
蔗糖密度勾配遠心分離
RPS 25 ローター, 23,000 rpm, 180 分
(密度勾配カラム; 40:30:20:10% 蔗糖 = 7:7:7:4 ml)

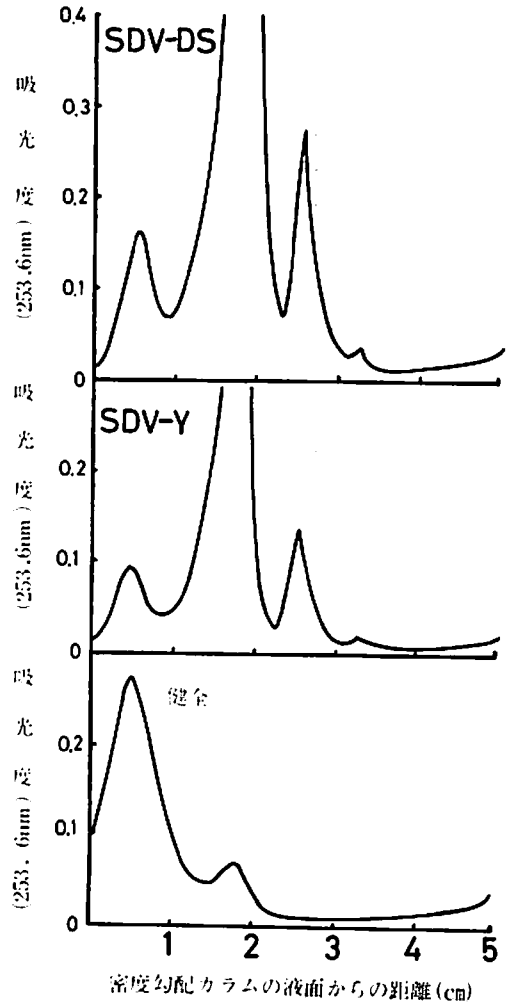
ウイルス分画 (液面から 25—27 mm)
0.01 M 磷酸緩衝液 (0.001 M EDTA を含む, pH 7.4) を加えて 38 ml にする。
36,000 rpm, 120 分

沈澱
0.01 M 磷酸緩衝液 (0.001 M EDTA を含む, pH 7.4) で懸濁

ウイルス液

第 12 図 純化の方法

面から 32—33 mm の位置にも薄いバンドがみえることがあった。ISCO 密度勾配分析装置による走査像は第 13 図に示すとおりで, SDV-DS, SDV-Y 両ウイルス系統はいずれもまったく同じパターンを示した。すなわち液面から 25—27 mm にウイルスによるピークがみられ, さらにそれより低い 32—33 mm の位置にも小ピークがみられ



第 13 図 蔗糖密度勾配遠心分離図 (ISCO 密度勾配分析装置による走査像)

た。健全植物からの試料にはこれらのピークはみられなかった。なお液面より 32—33 mm の部分の小ピークは, 高い感染性があることおよび電子顕微鏡観察では 2 個の粒子が結合した像が多くみられる (図版 13—2) ことから, 密度の異なる粒子ではないことがわかった。健全植物, 罹病植物いずれの材料からも液面より 15—20 mm の位置に植物成分による吸光がみられた (第 13 図)。この部分の吸光は実験材料によって異なるが, 健全植物より罹病植物の試料の方が高かった。

ウイルスの取量は ISCO 密度勾配分析装置による走査像の OD₂₆₀ 値から算定した。1 mg/ml のウイルス量を OD₂₆₀=5 と仮定して, 各実験にお

第40表 ウイルスの収量

実験	ウイルス系統	材料の重量	ISCO 走査像値	採取量	OD ₂₆₀ 値	収量 a)	
						μg	μg/kg
1	SDV-DS	200 ^k	0.28	2 ^m	0.19	76	380
2	SDV-Y	250	0.15	2	0.11	42	168
3	SDV-DS	400	0.28×2	2	0.19	152	380
4	SDV-DS	400	0.42×2	2	0.23	228	570
5	SDV-Y	400	0.14×2	2	0.09	76	190
6	SDV-Y	400	0.12×2	2	0.08	64	160
7	SDV-DS	400	0.60	3	0.27	162	405
8	SDV-Y	500	0.43	3	0.19	114	228
9	SDV-DS	400	0.52	3	0.25	150	375
10	SDV-Y	500	0.15	2	0.11	42	84
11	SDV-DS	600	0.23	2	0.16	62	103

a) ウイルス量は 1 mg/ml の OD₂₆₀=5 と仮定した。ける収量を換算したのが第40表である。表に示すように、収量はウイルスの系統、材料によってかなり異なっていた。SDV-DSは原材料 kg あたりに換算すると 103~590 μg で平均 369 μg, SDV-Y は kg あたり 84~228 μg で平均 166 μg であった。これらの材料は秋から春までの上に冬期間に生育させ、収穫したものであるが、夏期に生育させた材料はこれよりもかなり収量が低いようであった。

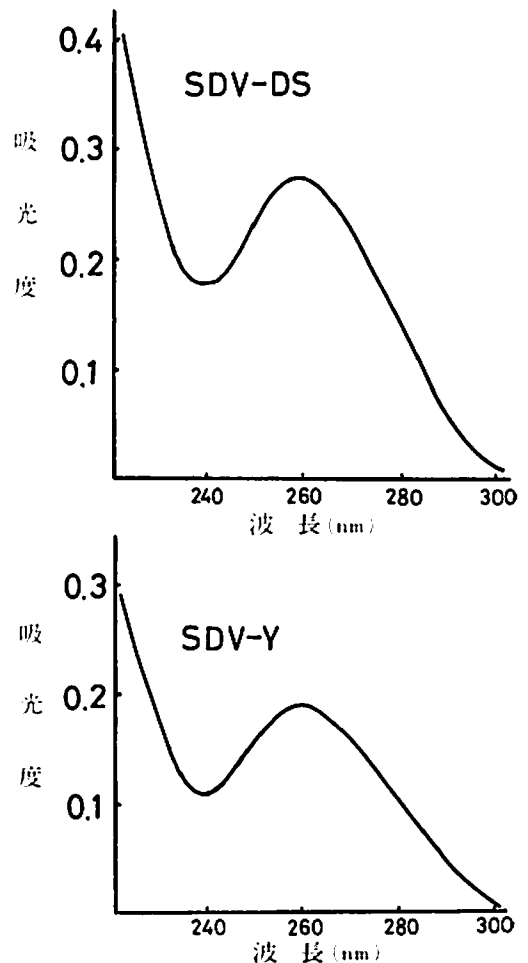
c 純化標品の紫外部吸収スペクトル

純化標品（第40表に示した実験7と8）の紫外部吸収スペクトルは第14図に示すとおりである（ただし光散乱による吸収は補正していない）。

本ウイルスは波長 260 nm に最大、240 nm に最小を示す核蛋白特有の吸収曲線を示した。SDV-DS では最大（260 nm）と最小（240 nm）の比が 1.59 で、260 nm と 280 nm の比は 1.96 であった。SDV-Y では最大（260 nm）と最小（240 nm）の比が 1.76 で、260 nm と 280 nm の比は 1.90 であった。以上のように純化標品の紫外部吸収スペクトルから、本ウイルスは核酸含量の高いウイルスと推定された。

d 純化ウイルスの形態

純化ウイルスを 2% PTA (pH 7.0) でネガティブ染色して電子顕微鏡観察したところ、ウイルス粒子の形態は両系統いずれも直径 25 nm の球形であった（図版 13—3；図版 14—1, 2；図版 15—



第14図 純化標品の紫外部吸収スペクトル

1, 2)。さらにウイルス粒子は外膜を持たず、表面にサブユニット様構造がみられ、球形というよりはむしろ六角形の輪かくであった。純化標品には核酸を含まない、いわゆる“殻の粒子 (empty shell)” はみられなかったが、崩壊した粒子やばらばらになったサブユニット構造様粒子がみられることがあった (図版 13—3; 図版 14—1, 2; 図版 15—1, 2)。

6 ウイルスの物理化学的性質

粗汁液中のウイルス濃度がきわめて低いため、罹病植物から有機溶媒処理と分画遠心によって濃縮あるいは純化したウイルス液について、耐熱性、耐保存性および凍結融解の影響を調べた。ウイルス活性は虫体内注射法と膜吸汁法によって調べた。

a 耐希釈性

第 28 表, 第 31 表および第 35 表に示すように, SDV-DS 感染植物に 0.1 M 磷酸緩衝液 (pH 7.4) を 2 倍量加え磨砕した汁液のウイルス活性はきわ

めて低く, 注射法による 1 回の実験のみが 5.3% の感染率を示した (第 28 表)。SDV-Y については実施しなかった。

b 耐熱性

注射法の場合には, ウイルス液 (0.001 M EDTA を含む 0.01 M 磷酸緩衝液, pH 7.4) を内径 3 mm のガラス細管に入れ, 40~80 °C の範囲で水そう中に 10 分間浸漬した後, 直ちに水道水で冷却した。3,000 rpm, 15 分間遠心分離し, その上清を無毒アブラムシに注射した。

膜吸汁法の場合には, 血清用小試験管に 0.5 ml のウイルス液を入れ, 同様に温度処理した後, 40% 蔗糖液を 0.5 ml ずつ加え接種源とした。各々対照として無処理のウイルス液を用いた。結果は第 41 表に示すとおりである。

表から明らかのように, SDV-DS, SDV-Y いずれの系統も 45 °C, 10 分間処理によってウイルス活性がいちじるしく低下し, 50 °C 処理で失活した。

第 41 表 ウイルスの耐熱性

実験	ウイルスの系統	接種方法	温度処理 (10 分間) (°C)						
			対照	40	45	50	60	70	80
1	SDV-DS	注射法	1/9a)	0/9	—	0/9	0/9	0/4	0/7
2	〃	〃	13/14	11/13	—	0/12	0/12	0/11	0/13
3	〃	〃	8/13	5/11	2/12	0/12	0/13	0/12	—
4	〃	膜吸汁法	12/12	7/12	1/12	0/12	0/12	—	—
5	SDV-Y	注射法	0/8	0/10	0/13	0/9	0/10	0/8	—
6	〃	〃	3/13	3/13	1/15	0/14	0/14	0/12	—
7	〃	〃	5/12	0/12	0/12	0/12	0/12	—	—
8	〃	膜吸汁法	6/12	6/12	0/12	0/12	0/12	—	—

a) 分母: 接種性数, 分子: 感染性数。

第 42 表 4 °C におけるウイルスの耐保存性 a)

実験	保存日数						
	1 日	3 日	5 日	7 日	9 日	12 日	20 日
1	0/11 b)	3/9	4/12	1/11	2/9	—	—
2	0/11	2/7	3/11	1/12	0/11	3/11	—
3	13/14	7/9	6/12	11/13	11/12	8/12	7/12
4	11/14	5/8	9/12	11/13	13/13	12/13	4/13

a) SDV-DS 使用, 虫体内注射法で検定した。

b) 分母: 接種性数, 分子: 感染性数。

c 耐保存性

実験 1

濃縮したウイルス液 (0.001 M EDTA を含む 0.01 M 磷酸緩衝液, pH 7.4) を 4°C の冷室に保存し, 経過日数ごとに保存液の一部をとり出し無毒アブラムシに注射してウイルスの耐保存性を調べた。結果は第 42 表に示すとおりである。

この結果, 4°C で保存したウイルス液は, 12 日間はほとんど活性を失わず, 実験を行なった 20 日間まで活性が認められた。なお 20 日目に注射した虫は死亡することが多かった。

実験 2

蔗糖密度勾配遠心後にそのチューブから採取したウイルス液 (約 20% の蔗糖を含む) を 4°C で保存し, 所定日ごとに保存液の一部をとり, 膜吸汁法によって耐保存性を調べた。結果は第 43 表に示すとおりである。

この結果, ウイルス活性は 4°C で 4 ヶ月後も失われていなかった。すなわち純化したウイルスはかなり安定していると思われる。

実験 3

蔗糖密度勾配遠心後にそのチューブから採取したウイルス液 (約 20% の蔗糖を含む) を 15°C で保存し, 所定の時期に保存液の一部をとり, 膜吸汁法によって耐保存性を調べた。結果は第 44 表に示すとおりである。

この結果, 純化したウイルス液は 15°C で 20 日間保存しても活性が失われなかった。

d 凍結融解の影響

原材料の 500 倍に濃縮したウイルス液 (0.001 M EDTA を含む 0.01 M 磷酸緩衝液, pH 7.4) を -20°C で凍結保存し, 2 日後に取り出し融解させた後, 一部をとり膜吸汁法でウイルス活性を調べた。残りは再び -20°C で凍結保存した。こ

第 43 表 4°C におけるウイルスの耐保存性 a)

実験	ウイルスの系統	保 存 日 数				
		対 照	1 週 間	3 週 間	5 週 間	4 ヶ 月 間
1	SDV-DS	12/12b)	12/12	12/12	10/10	12/12
2	ク	12/12	—	—	8/8	—
3	SDV-Y	8/10	6/12	—	—	8/12

a) ウイルス液は約 20% の蔗糖を含む, 膜吸汁法によって検定した。

b) 分母: 接種株数, 分子: 感染株数。

第 44 表 15°C におけるウイルスの耐保存性 a)

実験	ウイルスの系統	保 存 日 数							
		対 照	1 日	2 日	4 日	6 日	8 日	10 日	20 日
1	SDV-DS	12/12b)	11/12	12/12	12/12	12/12	—	—	—
2	ク	12/12	—	—	12/12	12/12	10/12	12/12	11/12
3	SDV-Y	8/10	—	—	9/12	9/12	—	10/11	6/8

a) ウイルス液は約 20% の蔗糖を含む, 膜吸汁法によって検定した。

b) 分母: 接種株数, 分子: 感染株数。

第 45 表 凍結融解の影響 a)

凍 結 融 解 の 回 数	実 験 1			実 験 2		
	接 種 株 数	感 染 株 数	感 染 率 %	接 種 株 数	感 染 株 数	感 染 率 %
対 照	12	12	100.0 ^{a)}	12	11	91.7 ^{a)}
1 回	12	12	100.0	12	11	91.7
2 回	12	12	100.0	12	11	91.7
3 回	12	12	100.0	12	12	100.0

a) SDV-DS を使用し, 膜吸汁法によって検定。

の操作を3回反復した。結果は第45表に示すとおりである。

この結果、濃縮したウイルス液は凍結・融解を3回繰り返してもウイルス活性の低下は認められなかった。

7 考 察

アブラムシによって永続的に伝搬されるウイルスのうち、現在まで8種類のウイルスについて純化が行なわれ、その粒子形態が明らかにされている。すなわち *barley yellow dwarf virus* (Rochow and Brakke, 1964; Rochow *et al.*, 1971), *carrot mottle virus* (Watson *et al.*, 1964; Murrant *et al.*, 1969), *lettuce necrotic yellows virus* (Crowley *et al.*, 1965; McLean and Francki, 1967), *pea enation mosaic virus* (Izadpanah and Shepherd, 1966; Gibbs *et al.*, 1966; Bozarth and Chow, 1966), *groundnut rosette virus* (Okusanya and Watson, 1966), ジャガイモ葉巻病ウイルス (Peters, 1967 a, b; Kojima *et al.*, 1968, 1969; 荒井ら, 1969; Kojima and Murayama, 1972 b), *sowthistle yellow vein virus* (Peters and Kitajima, 1970), および *broccoli necrotic yellows virus* (Lin and Campbell, 1972) である。これらのウイルスのうち、*lettuce necrotic yellows virus*, *sowthistle yellow vein virus* および *broccoli necrotic yellows virus* の3種は、*rhabdovirus* グループに属するウイルスとされ、粒子の形態は桿菌状である。またアブラムシの伝搬様式は増殖型ウイルスに属する。その他5種のウイルスの粒子形態は直径25~30 nmの球形であり(ただし *carrot mottle virus* は直径50 nm である)、アブラムシによる伝搬様式もよく似ている。しかしこれらのウイルスのうち *carrot mottle virus*, *pea enation mosaic virus* および *groundnut rosette virus* は、寄主植物にモザイク型の病徴を示し、かつ汁液接種が可能であることから、PLRV-グループで代表される *barley yellow dwarf virus* やジャガイモ葉巻病ウイルスとは、かなり性質を異にするようである。したがってここでは本ウイルスと PLRV-グループのウイルスについて、接種方法(ウイルス活性

を検定する方法)、諸性質、純化方法、粒子形態などを比較検討する。

PLRV-グループに属するウイルスは汁液接種が不可能であるため純化過程におけるウイルス活性を調べるのが困難とされていた。1955年 Heinze (1955) はジャガイモ葉巻病ウイルス保毒虫の磨砕液および体液を無毒モモアアブラムシの腹部に注射を行ない、感染させることに成功した。一方、Rochow (1960) は *barley yellow dwarf virus* について、うすく引き伸ばしたパラフィルムの膜越しにウイルス液を無毒アブラムシに吸汁させると、そのアブラムシはウイルスを獲得し、保毒になったと述べた。それ以来、虫体内注射法と膜吸汁法は、ジャガイモ葉巻病ウイルス Day, 1955; Harrison, 1958 a; Stegwee and Ponsen, 1958; Day and Zaitlin, 1959; Stegwee and Peters, 1961; Mueller and Ross, 1961; Clark and Ross, 1964; Murayama and Kojima, 1965; Peters, 1967 a, b; Peters and van Loon, 1968; Kojima *et al.*, 1968, 1969; Duffus and Gold, 1969; 菅原ら, 1970 b; 田中・塩田, 1971), *barley yellow dwarf virus* (Mueller and Rochow, 1961; Pang and Rochow, 1963; Rochow and Brakke, 1964; Heagy and Rochow, 1965; Rochow and Ball, 1967; Rochow, 1969, 1970 a; Paliwal and Sinha, 1970; Rochow *et al.*, 1971) および *beet western yellows virus* (Duffus and Gold, 1965, 1967, 1969; Gold and Duffus, 1967; Duffus, 1969; Duffus and Russell, 1970, 1972; 杉本ら, 1970) の検定のために広く用いられている。筆者は本ウイルスに感染した植物から分画遠心法によって濃縮した試料について、虫体内注射法と膜吸汁法を適用したところ、本ウイルスもまた両接種方法によってウイルス活性を検定できることがわかった。虫体内注射法と膜吸汁法を比較すると、本ウイルスの場合にはほぼ同等の精度であった。Rochow (1960) および Mueller and Rochow (1961) は *barley yellow dwarf virus* について虫体内注射法と膜吸汁法を比較したところ、膜吸汁法の方が高い感染率を得ることができたと報告した。Day (1955) および Rochow

(1960) はジャガイモ葉巻病ウイルスは膜吸汁法によって伝搬されないと報じたが、Peters and van Loon (1968) は膜吸汁法でもモモアカアブラムシはウイルスを獲得し、伝搬することができたと報告し、田中・塩田 (1971) もこれを確認している。その伝搬率は用いた接種源によって異なるが、虫体内注射法の方が高い感染が得られたという。杉本ら (1970) は beet western yellows virus についてモモアカアブラムシは膜吸汁法では伝搬しなかったが、虫体内注射法では伝搬したと報告している。しかし Duffus and Gold (1967) は同ウイルスを検定するためにモモアカアブラムシを用いて、膜吸汁法について検討を加えたところ、膜上でのアブラムシの吸汁行動が、虫齢と型、膜の質、汁液の色および蔗糖の濃度で異なることを報告している。このように膜吸汁法の場合には、アブラムシの嗜好性や環境条件がウイルスの伝搬率に影響をおよぼし、これがアブラムシの種類で異なるのかも知れない。膜吸汁法は虫体内注射法よりも労力がかからず、しかも短時間に多くの試料を調べることができる利点がある。一方、虫体内注射法は虫の腹部に直接ウイルスを注入するため、獲得吸汁という不安定な要因を取り除くことができ、ごく少量の標品でも検定できる利点がある。したがって、とくに虫とウイルスとの関係を究明するためには、虫体内注射法は欠くことのできない手技であろうと考えられる。Mueller and Rochow (1961) も指摘しているように、虫体内注射法と膜吸汁法はいずれも誤差が大きいため、より正確にウイルスを定量するためには、両接種法を併用すべきであろう。

ウイルスの物理化学的性質について、本ウイルスと他のウイルスとを比較してみると、本ウイルスの耐希釈性はきわめて低く、生体重の2倍希釈でごくわずかに感染が認められたにすぎない。同じような結果は beet western yellows virus についてもみられ、このウイルスの耐希釈性は8倍とのことである (Duffus, 1969)。一方、ジャガイモ葉巻病ウイルスについて、Murayama and Kojima (1965) は罹病植物の粗汁液を1,000倍まで希釈しても活性があることを認め、Peters

(1967 b) は保毒虫の磨砕液を用いた実験で同じく1,000倍希釈まで活性を認めた。また Heagy and Rochow (1965) は barley yellow dwarf virus について膜吸汁法で調べた結果、同じく1,000倍希釈まで活性があったと報告している。

本ウイルスの耐熱性は比較的低く、矮化、黄化系統いづれも45°Cで活性が低下し、50°Cで失活した。一方、他のウイルスは本ウイルスよりもかなり高い耐熱性である。すなわちジャガイモ葉巻病ウイルスは70~80°Cの範囲にあり (Murayama and Kojima, 1965; Peters, 1967 b), barley yellow dwarf virus は65~70°C (Heagy and Rochow, 1965), beet western yellows virus は約65°C (Duffus, 1969) である。

耐保存性は一般に粗汁液と純化したウイルス液とではいちじるしく異なる。本ウイルスでは粗汁液中のウイルス活性がきわめて低かったため、すべて濃縮あるいは純化標品を用いて保存性を調べた。その結果、4°Cでは少なくとも4ヵ月間以上、15°Cでは20日間以上ウイルス活性が認められた。barley yellow dwarf virus について Rochow and Brakke (1964) は濃縮した試料は3°Cで16週間、15°Cで18時間まで活性を認めている。また部分純化した beet western yellows virus は24°Cで16日後にも感染性があったと報告されている (Duffus, 1969)。一方、ジャガイモ葉巻病ウイルスでは、植物の粗汁液を用いると2°Cで約4日間 (Murayama and Kojima, 1965), 保毒モモアカアブラムシの磨砕液を用いると25°Cで12~24時間ウイルス活性があり、メルカプトニタノールを添加するとより活性が高まると報告されている (Peters, 1967 b)。

凍結融解のウイルス活性におよぼす影響については、本ウイルスは凍結融解を3回繰り返してもほとんどウイルス活性の低下は認められなかった。同様に Duffus (1969) は beet western yellows virus について1ヵ月間、4~5日おきに凍結融解を繰り返したが、ウイルス活性にはほとんど影響をおよぼさなかったと述べている。

ウイルス純化のための予備分別として、一般に有機溶媒による汁液の清澄化が行なわれている。

Schneider (1953) がタバコモザイクウイルスを純化するために植物蛋白を変性させる方法として、クロロホルムを用いたのが最初である。さらに Steere (1956) は tobacco ring spot virus の純化のためには、クロロホルム単独よりクロロホルムと n-ブタノールの混合液の方がより効果的であると指摘した。Shepherd and Pound (1960) は turnip mosaic virus について、n-ブタノールを高濃度で使用するとウイルスが壊れるため、8.5% の濃度がよいと述べた。それ以来、これらの有機溶媒は各種ウイルスの純化によく用いられている。上記有機溶媒のうち清澄化のために最も効果が高いと考えられるクロロホルムと n-ブタノール混合液を本ウイルスに適用したところ、ウイルス活性の低下は認められなかったので、本実験ではすべてこの方法を適用した。しかしクロロホルム・n-ブタノール法のみでは、まだ植物成分を十分除去することができなかつたので、さらに高濃度の緩衝液による抽出とフロコカーボン (ダイフオン S-3) による処理を組合せて純化を行なった。

高濃度 (0.5 M) の緩衝液による抽出の方法は、Shepherd and Pound (1960) が turnip mosaic virus, Tomlinson (1964) が lettuce mosaic virus, Scott (1963) がキュウリモザイクウイルスに用いて以来、多くのウイルスで抽出のために適用されるようになった。この理由は明らかでないが、高濃度の条件下では植物の細胞成分とウイルスとの分離が容易になるためと、植物成分が変性、除去されるためであろうと考えられる (Brakke, 1969)。本ウイルスの場合も 0.5 M 磷酸緩衝液を用いてウイルス活性を失うことなく、よい結果が得られた。

清澄液の濃縮法としては、高速遠心法、沈澱法、ゲル濾過法、分配法などが知られているが、本実験では高速遠心法とポリエチレングリコール (PEG) による沈澱法を用いた。ウイルス純化のための PEG の使用は、Hebbert (1963) によって初めて報告された。Hebbert (1963) によると、PEG-NaCl 法は植物汁液中に低濃度で存在するウイルスの純化に対しては、非常に有益で純化取

量も多く、ウイルス濃縮の場合には分画遠心の前段階にこの方法を応用することが効果的であると報告している。Kojima and Murayama (1972 b) はジャガイモ葉巻病ウイルスの純化のために、この方法を適用し、4% の濃度ではウイルスが沈澱しないが、8% の濃度でよい結果を得ている。また barley yellow dwarf virus でも予備段階で PEG を使用し、その効果が認められている (Rochow, 1970 b)。筆者もこの方法を本ウイルスに適用したところ、純化時間の短縮と大量の材料を処理するために、非常に有益であることを確かめた。

純化にあたって使用する緩衝液の選択は、ウイルスの収量、ウイルスの安定性、ウイルスの凝集などの点からもっとも重要な過程である。磷酸、酢酸、ホウ酸、クエン酸、トリス緩衝液などよく使用されている緩衝液の本ウイルスに対する影響について検討したところ、磷酸緩衝液とホウ酸緩衝液を用いた区に高い感染性が認められたので、本実験ではすべて磷酸緩衝液を用いた。なお pH の影響をみると、本ウイルスは pH 6—9 の比較的広い範囲で安定であった。純化過程におけるウイルスの凝集による損失は、桿状、糸状ウイルスのみならず、球形ウイルスでも重要な問題である。例えば tomato spotted wilt virus やキュウリモザイクウイルスのような球形ウイルスでも、植物汁液中では早く沈澱し、凝集しやすいことが知られている (Black *et al.*, 1963; Scott, 1963)。Takanami and Tomaru (1969) はキュウリモザイクウイルスの純化を行なうにあたり、0.005 M EDTA を加えると単一のピークが得られたが、EDTA を加えないとウイルス粒子の凝集がみられたと報告し、このことから Mg^{++} がウイルスの凝集に関与しているらしいと述べている。本ウイルスについても EDTA の効果について調べたところ、磷酸緩衝液に EDTA を添加した区は、無添加の区より高い感染が得られた。すなわち EDTA は本ウイルスの凝集防止にも効果があったものと考えられる。

以上の諸事実に基づいて考えられた本ウイルスの純化手順をつぎに要約してみる。0.5 M 磷酸緩

衝液による抽出, クロロホルム・n-ブタノール処理による清澄化, PEG による沈澱, フロロカーボン (ダイフロン S-3) 処理による清澄化および2回の分画遠心による濃縮。得られた濃縮試料を蔗糖密度勾配遠心法により分画化すると, チューブの液面から 25—27 mm の位置にウイルスによるバンドがみられ, 明らかに植物成分からウイルスを分離することができた。しかし遠心チューブの液面から 15—20 mm の位置に植物成分に由来したピークがみられた。これは健全ダイズ茎葉から得た試料にもみられたが, 罹病植物からの方がはるかに高く, ウイルスの部分と若干重なり合うことがあった。したがって, より高純度のウイルス標品を得るためには, さらにこの植物成分を除去する必要がある。

一般にウイルスの収量は, ウイルスの種類, 系統, 接種植物 (種類, 生育時期), 環境条件などによりいちじるしく異なる。本ウイルスの収量は接種時期 (植物の生育時期) によってかなり変動があり, 概して夏期よりも冬期に生育させた植物からの方が高いようであった。本ウイルスは冬期間 (春, 秋も含めて) に接種するとはげしい病徴を示すことから, 多分植物体内におけるウイルス濃度が増加したためであろうと考えられる。同じような結果は barley yellow dwarf virus でも得られており, 接種植物中のウイルス量は温度によって大きく影響をうけ, 15—20 °C で生育させた植物からの材料は, 25 °C 以上で生育させた材料と比べて2—5 倍の収量であったと報告されている (Rochow *et al.*, 1971)。またこのウイルスの場合, 感染後2—3 週間で収穫した材料は, 5—8 週間後のものより4 倍の収量があったという (Rochow *et al.*, 1971)。ウイルスの種類, 系統別に収量を比較してみると, 本ウイルスでは罹病ダイズ茎葉 1 kg あたり SDV-DS は平均 369 μg , SDV-Y は平均 166 μg 程度であった。Rochow *et al.* (1971) によると, barley yellow dwarf virus の収量もウイルスの系統によって異なり, 罹病大麦 1 kg あたり MAV は 106 μg , RPV は 79 μg , および PAV は 20 μg であったという。Kojima and Murayama (1972 b) はジャガイモ葉巻病ウイル

スの収量は罹病 *Physalis floridana* 1 kg あたり 10—30 μg であったと報告した。以上のように, PLRV-グループのウイルスの収量は, ウイルスの種類, 系統, 環境条件などで異なるが, 他のモザイク症状を示すウイルスの収量と比較すると, きわめて少ない。このことは後述するように PLRV-グループのウイルスの細胞内所在様式とも関連があると考えられる。

本ウイルスの粒子形態は表面にサブユニット様構造を持った直径約 25 nm の球形ないし多角形であった。また純化標品にはウイルスの表面構造に類似した小粒子やウイルスが崩壊しかけているような粒子が認められることがあった。本ウイルスには核酸を含まない, いわゆる“殻の粒子 (empty shell)”はみられなかった。このようなウイルスの形態上の特徴は, ジャガイモ葉巻病ウイルスの粒子と類似していた (Kojima *et al.*, 1969 ; Kojima and Murayama, 1972 b)。しかし PLRV-グループのウイルス粒子の微細構造は明らかでなく, 今後の研究にまたなければならない。

本ウイルスの沈降恒数は, barley yellow dwarf virus (Rochow and Brakke, 1964) およびジャガイモ葉巻病ウイルス (Kojima and Murayama, 1972 b) の蔗糖密度勾配遠心後のウイルスバンドの位置から推定して, 110—120 s の範囲であろうと考えられる。紫外部吸収スペクトルをみると, 本ウイルスは波長 260 nm で最大, 波長 240 nm で最小を示し, 波長 260 nm と 280 nm の比は 1.96 であった (ただし矮化系統)。同様な例として barley yellow dwarf virus (MAV 系統) は波長 260 nm と 280 nm の比が 1.92 であるという (Rochow *et al.*, 1971)。紫外部吸収スペクトルから, これらのウイルスは核酸含量がかなり高いものと考えられるが, PLRV-グループのウイルスでは粒子の物理化学的性質の詳細はほとんど明らかでなく, 今後の大きな課題であろう。

以上, 現在までの実験結果から本ウイルスの性状や粒子形態は, barley yellow dwarf virus やジャガイモ葉巻病ウイルスのそれとよく類似しており, さらに病徴, 伝染方法の類似性とも関連してきわめて興味深い。なお本ウイルスの矮化系

統、黄化系統は粒子の形態や性状にほとんど差はみられず、このこともまた両者をウイルス系統とした証拠として強く支持される。

F ウイルスの血清反応

植物ウイルスの種類あるいは系統間の近縁関係を知るためには、血清反応を調べるのがよい方法の一つである (Bawden, 1964)。しかし PLRV-グループに属するウイルスは、前述したように植物体内におけるウイルス濃度が低く、ウイルスの純化が困難であったため、血清学的研究はきわめて少なく、現在までにジャガイモ葉巻病ウイルス、barley yellow dwarf virus および beet western yellows virus の3種について血清試験が行なわれたにすぎない。ここでは先に述べた純化方法によって得られたウイルス抗原を用いて抗血清を作成し、重層法 (ring test)、寒天ゲル内拡散法 (agar gel-diffusion test) および中和試験 (infectivity neutralization test) を行ない、ウイルス系統間の血清学的異同を検討した。

1 実験材料および方法

供試ウイルスおよび純化方法：抗原に用いたウイルス系統は矮化強毒系統 (SDV-DS) と黄化系統 (SDV-Y) で、それぞれダイズ品種「白鶴の子」に接種した。接種後約1ヵ月に地上部を収穫し、第12図に示した方法で純化を行なった。

抗血清の作成：ウイルス抗原はすべて純化標品を用い、家兎に対する免疫は adjuvant 法による筋肉注射、ならびに静脈注射によって行なった。供試家兎は各系統2頭ずつとしたが、SDV-Y 抗原を注射したもののうち1頭が死亡したため、抗SDV-Y 血清は1頭の家兎から得た。注射の方法、

回数およびウイルス濃度は第46表に示した。

すなわちウイルス液1 ml に等量の Freund's incomplete adjuvant (Difco 製) を加え、よく乳化した後家兎の両モモに注射した。この筋肉注射は10日間隔で3回行ない、さらに10日後にはSDV-DS 抗原は2回、SDV-Y 抗原は1回の静脈注射 (1回に1 ml ずつ) を行なった。最後の注射からSDV-DS は21日目、SDV-Y は15日目に耳静脈より部分採血した。血液は37℃で1時間放置し、ついで冷室に1晩静置した。その後遠心分離 (3,000 rpm, 5分間) して上清をとり、0.02% NaN₃ を加え、小試験管に分注して-20℃に保管した。

血清反応：血清試験は重層法、マイクロ寒天ゲル内拡散法および中和試験によって行なった。

重層法 (ring test)——沈降反应用小試験管 (内径約3 mm) にグリセリン20%を含む生理食塩水 (0.85% NaCl) で階段希釈した抗血清を入れ、その上にウイルス液を重層し、1時間冷室において結果を判定した。なお実験によってはグリセリンで抗血清を希釈するかわりに、蔗糖密度勾配遠心後に遠心管から直接とったウイルス液 (約20%の蔗糖を含む) を小試験管に入れ、その上に生理食塩水で段階希釈した抗血清を重層した。同様に1時間冷室において反応を読んだ。

マイクロ寒天ゲル内拡散法 (micro agar gel-diffusion test)——1%寒天 (Special Agar Noble, Difco 製) を磷酸緩衝液—生理食塩水 (0.85% NaCl, 0.02% NaN₃ を含む0.1 M あるいは0.01 M 磷酸緩衝液, pH 7.0) に溶かし、反应用ゲルとした。直径9 cm のペトリ皿に10 ml の寒天液を

第46表 注射の方法、回数およびウイルス濃度

家兎番号	ウイルスの系統	1回 a)	2回	3回	4回	5回
		筋肉注射	筋肉注射	筋肉注射	静脈注射	静脈注射
1	SDV-DS	0.17b)	0.17	0.23	0.23	0.03c)
2	SDV-DS	0.17	0.17	0.23	0.23	0.03c)
3	SDV-Y	0.10	0.10	0.10	0.10c)	—
4	SDV-Y	0.10	0.10	—d)	—	—

a) 10日間隔で注射を行なった。

b) 数字は OD₂₆₀ の値である。

c) SDV-DS は最後の注射日から21日後に採血、SDV-Y は15日後に採血した。

d) 家兎が死亡したため、注射は不能となった。

流し込み (約1.5 mm の厚さのゲルとなる), 凝固させた後直径3 mm の金属管で所定の位置に穴をあけた。主として, 中央に1個, その周囲に6個の穴をあけ, 中央の穴からの距離は, 壁面から壁面までを4 mm あるいは5 mm とした。抗原と抗血清は毛細管を用いて各穴に注入し, 2~3時間後にさらに数回添加した。反応は2日間室温で行ない, その後冷室に移し, 1~2週間後に反応を読み, のち撮影した。

中和試験 (infectivity neutralization test) — ウイルス抗原と生理食塩水で希釈した抗血清とを, それぞれ2滴ずつ小試験管 (内径9 mm) に入れ, よく混合した後冷室に1~2日間おいた。その反応液を膜吸汁法によってウイルスの感染性を調べた。すなわち反応液に等量の40%蔗糖液を加え, パラフィルムを通して無毒ジャガイモヒゲナガアブラムシに吸汁させた。方法は前述のとおりである。アブラムシは膜上で1日間吸汁させた後, 検定植物に4頭ずつ移し, 4日間接種吸汁させた。なお対照として正常血清と生理食塩水と

を用いた。

2 実験結果

a 重層法による沈降反応

SDV-DS および SDV-Y 抗原とそれぞれの抗血清との反応結果は, 第47表に示すとおりである。

表から明らかなように, 抗 SDV-DS 血清は SDV-DS および SDV-Y いずれの抗原に対しても2,048倍まで陽性の反応を示した。抗 SDV-Y 血清は, 抗 SDV-DS 血清よりも高い力価を示し, いずれの抗原に対しても4,096倍まで反応が認められた。しかし抗 SDV-DS 血清は健全ダイズ茶葉から得た試料 (第12図に示した方法に準じたが, 蔗糖密度勾配遠心は省いた) とも反応し, その反応は64倍まで現われた。なお2頭の家兎から得た抗 SDV-DS 血清の抗体価に差は認められなかった。

SDV-DS 抗原とその抗血清を用いたそれぞれの希釈限界は第48表に示すとおりである。

抗原の濃度は高いほど反応が明瞭であり, 抗原

第47表 ウイルス系統とその抗血清との重層法による沈降反応

抗 原	抗 血 清	抗 血 清 希 釈 倍 数													
		2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	
SDV-DS	SDV-DS 1 a)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
SDV-DS	SDV-DS 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
SDV-Y	SDV-DS 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
SDV-Y	SDV-Y 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
SDV-DS	SDV-Y 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
Hb)	SDV-DS 1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	

a) 数字は家兎の個体番号。

b) 健全植物から得た試料 (第12図に示した方法に準じた。ただし蔗糖密度勾配遠心は省いた)。

第48表 SDV-DS 抗原とその抗血清との重層法による沈降反応

希 釈 倍 数	抗 原 ウイルス濃度 (OD ₂₆₀)	抗 血 清 希 釈 倍 数 a)													
		2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	
1	0.20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
2	0.10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
4	0.05	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
8	0.025	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
16	0.013	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
32	0.006	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

a) 抗血清は抗 SDV-DS 1 血清を用いた。

の希釈限界は $OD_{260}=0.025$ であった。本ウイルスの濃度 1 mg/ml を仮りに $OD_{260}=5$ とすれば、重層法によって検出可能なウイルス量は、 $5\text{ }\mu\text{g/ml}$ と考えられる。反応が明瞭にあらわれる抗血清の希釈倍数は 32~512 倍の範囲であった。

b) ミクロ寒天ゲル内沈降反応

寒天ゲル内拡散法による反応結果は第 49 表、第 50 表および図版 16 に示すとおりである。

ウイルス抗原と抗血清とは寒天ゲル内でも反応して、抗原側に弓形の単一の沈降線を生じた。第 49 表から明らかのように、抗 SDV-DS 血清は

128 倍まで、抗 SDV-Y 血清は 1,024 倍までそれぞれ反応が認められた。抗原を希釈するにつれて、反応は弱く、不明瞭となった (図版 16—1, 2, 3, 4, 5, 6)。抗原の希釈限界は第 50 表に示すとおりで、SDV-DS 抗原は抗 SDV-DS 血清および抗 SDV-Y 血清に対して $OD_{260}=0.2$ まで沈降線を生じた。SDV-Y 抗原を用いた場合、 $OD_{260}=0.1$ の濃度のとき抗 SDV-DS 血清は 16 倍希釈、抗 SDV-Y 血清は 32~64 倍希釈で、かすかに沈降帯を生じることがあった (図版 16—3, 6)。高濃度の抗血清と抗原との間の沈降帯は幅が広く、

第 49 表 ウイルス系統とその抗血清との寒天ゲル内沈降反応 a)

抗 原 b)	希 釈 倍 数	抗 血 清	抗 血 清 希 釈 倍 数											
			4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192
SDV-DS	1	SDV-DS 1	≡	≡	≡	≡	≡	+	-	-	-	-	-	-
〃	2	〃	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
〃	4	〃	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
〃	8	〃	±	±	+	+	+	+	±	-	-	-	-	-
SDV-Y	1	SDV-Y 3	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	+	±	-	-	-
〃	2	〃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
〃	4	〃	±	±	±	+	+	+	+	+	+	±	-	-
〃	8	〃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

a) 中央の穴に抗原、周囲の穴に抗血清を入れた。

b) 分画遠心によって SDV-DS は 500 倍、SDV-Y は 600 倍に濃縮した試料を抗原とした。

第 50 表 ウイルス系統とその抗血清との寒天ゲル内沈降反応 a)

抗 原	ウ イ ル ス 濃 度 (OD_{260})	抗 血 清	抗 血 清 希 釈 倍 数					
			2	4	8	16	32	64
SDV-DS	0.40	SDV-DS 1	≡	≡	≡	≡	≡	≡
〃	0.20	〃	+	+	+	+	+	+
〃	0.10	〃	-	-	-	-	-	-
〃	0.05	〃	-	-	-	-	-	-
SDV-Y	0.10	SDV-DS 1	-	-	-	+	±	-
〃	0.05	〃	-	-	-	-	-	-
Hb)	-	SDV-DS 1	+	-	-	-	-	-
SDV-DS	0.40	SDV-Y 3	≡	≡	≡	≡	≡	≡
〃	0.20	〃	+	+	+	+	+	+
〃	0.10	〃	-	-	-	-	-	-
〃	0.05	〃	-	-	-	-	-	-
SDV-Y	0.10	SDV-Y 3	-	-	-	±	+	+
〃	0.05	〃	-	-	-	-	-	-

a) 中央の穴に抗血清、周囲の穴に抗原を入れた。

b) 健全植物から得た試料 (第 47 表で用いたのと同じ)。

抗血清を希釈するにつれて沈降線は鮮明になり、かつ抗血清側に近づく傾向がみられた(図版 16—1, 2, 4)。抗原と抗血清の希釈試験から、明瞭な沈降線を生じさせるための濃度は、ウイルス抗原が $OD_{260}=0.4$ 以上、抗 SDV-DS 血清では 16~32 倍、抗 SDV-Y 血清では 32~64 倍であった。なお 2~4 倍のような濃い濃度の抗血清を用いた場合、植物成分に由来する沈降線が抗原と抗血清のほぼ中央に生じることがあったが、ウイルス抗原による沈降線とは明らかに区別することができた(図版 16—9)。

抗 SDV-DS 血清と SDV-Y 抗原、および抗 SDV-Y 血清と SDV-DS 抗原との間の沈降線は、図版 16—7, 8, 10 に示した。すなわちそれぞれの組合せでまったく同じ沈降線を生じ、それらの沈降線は連続し、いわゆる異種抗原の存在するスパーの形成は認められなかった。以上の結果から本ウイルスの矮化、黄化両系統は抗原的に同一であると考えられた。

c 中和試験

膜吸汁法による中和試験の結果は第 51 表および第 52 表に示すとおりである。

中和試験における抗血清の力価は、第 51 表に示すとおりで、ウイルス抗原の濃度によって異なり、実験 1 のようにウイルス抗原の濃度が高い場合、64 倍希釈まで完全に感染性がブロック(中和)された。これに対して、実験 2 のように抗原濃度が低い場合、1,024 倍と希釈度の高い抗血清でも反応が認められた。すなわち中和反応の程度はウイルス抗原の濃度によって左右された。

SDV-DS および SDV-Y 抗原とそれぞれの抗血清との反応結果は第 52 表に示すとおりで、2~16 倍希釈の抗 SDV-DS 血清および抗 SDV-Y 血清は、両ウイルス抗原を完全に中和し、感染性はまったく認められなかった。一方、同じ希釈度の正常血清はウイルス抗原を中和せず、むしろ対照(生理食塩水)より感染性が高まる傾向がみられた。この理由は明らかでない。以上の中和試験からも矮化、黄化両系統間に血清学的差異を認めることができなかった。

第 51 表 SDV-DS 抗原とその抗血清との中和試験

実 験	抗原濃度 OD_{260}	抗 血 清 希 釈 倍 数							
		16	32	64	128	256	512	1,024	対 照 a)
1	0.20	0/12b)	0/12	0/12	5/12	8/12	9/12	12/12	12/12
2	0.02	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	4/12
3	0.05	—	—	0/12	1/12	0/12	4/12	2/12	6/12

a) 生理食塩水。

b) 分母：接種株数，分子：感染株数。

第 52 表 ウイルス系統とその抗血清との中和試験

実 験	抗 原	血 清				
		希 釈 倍 数	抗 SDV-DS 血清	抗 SDV-Y 血清	正 常 血 清	対 照 a)
1	SDV-DS	2	0/12b)	0/12	6/12	4/12
	SDV-Y	2	0/12	0/12	8/12	5/12
2	SDV-DS	4	0/12	0/12	12/12	11/12
	SDV-Y	4	0/12	0/12	9/12	4/12
3	SDV-DS	16	0/6	0/6	12/12	11/12
	SDV-Y	16	0/12	0/12	11/12	5/12

a) 生理食塩水

b) 分母：接種株数，分子：感染株数

3 考 察

PLRV-グループのウイルスで現在まで血清学的研究が行なわれたのは、ジャガイモ葉巻病ウイルス (村山, 1959; Duffus and Gold, 1969; Kojima and Murayama, 1972 a), barley yellow dwarf virus (Rochow and Ball, 1967; Rochow, 1970 a; Rochow *et al.*, 1971; Aapola and Rochow, 1971) および beet western yellows virus (Gold and Duffus, 1967; Duffus and Gold, 1969; Duffus and Russell, 1970, 1972) の3種である。本実験の結果、さらにダイズ矮化ウイルスについてもその抗血清作成に成功し、血清学的検討を加えることができた。

抗体産生を促進するため、各種 adjuvant の使用が試みられているが、本実験では Freund's incomplete adjuvant による筋肉注射と静脈注射による booster とを組合せて行ない、低濃度のウイルス抗原で比較的高力価の抗血清を得ることができた。重層法では抗 SDV-DS 血清は 2,048 倍、抗 SDV-Y 血清は 4,096 倍まで反応がみられた。マイクロ寒天ゲル内拡散法では抗 SDV-DS 血清は 128 倍まで、抗 SDV-Y 血清は 1,024 倍まで沈降線が認められた。一方、抗原希釈をみると重層法では $OD_{260}=0.025$ 、マイクロ寒天ゲル内拡散法では $OD_{260}=0.1$ まで反応が認められた。本ウイルスの 1 mg/ml の OD_{260} 値を仮りに 5 とすれば、検出可能なウイルス量は、重層法では $5\text{ }\mu\text{g/ml}$ まで、マイクロ寒天ゲル内拡散法では $20\text{ }\mu\text{g/ml}$ までと推定される。抗原ならびに抗血清の希釈試験から、寒天ゲル内拡散法で明瞭な沈降線を生じさせるためには、抗原は $OD_{260}=0.40$ ($80\text{ }\mu\text{g/ml}$) 以上、抗血清の希釈倍数は 16~64 倍であり、抗血清の濃度が高いと沈降帯の幅が広くなり不明瞭となった。

Kojima and Murayama (1972 a) はジャガイモ葉巻病ウイルスについて、重層法で 512 倍の力価の抗血清を得たが、寒天ゲル内拡散法では反応を認めることができなかつたと述べ、これは抗原濃度が低いためであろうと考えた。Aapola and Rochow (1971) は barley yellow dwarf virus について血清学的研究を行ない、ラテックス凝集

反応法では $0.02\sim 0.06\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、マイクロ寒天ゲル内拡散法では $2.5\sim 5.0\text{ }\mu\text{g/ml}$ までのウイルス量を検出できたと報告した。彼らの用いたマイクロ寒天ゲルプレートは、抗原、抗血清とも連続的にゲル中に注入できるように工夫されているため、その鋭敏度が本実験の 10 倍以上であったと考えられる。

寒天ゲル内拡散法は重層法と比べて反応の鋭敏度は低いが、一定条件下で形成された沈降帯を解析することによって、抗原・抗体の分析、最適比の測定、抗原・抗体濃度の定量、拡散定数の測定などが可能であるといわれ、きわめて利用価値の高い方法である (木村, 1964)。したがってこの方法はウイルスの種類あるいは系統間の近縁関係を知るためにもっともよく用いられている。本実験の結果、ダイズ矮化ウイルスの矮化、黄化両系統間に血清学的差異はみられず、いずれの抗原、抗血清の組合せにおいても沈降帯は連続し、いわゆる異種抗原の存在を示すスパーの形成は認められなかった。本実験によると、高い濃度の抗血清を用いた場合、抗原と抗血清のほぼ中間の位置に植物細胞成分による沈降線が生じた。これはウイルスの純化がまだ不十分であることを示しており、おそらく蔗糖密度勾配遠心管の液面から 15~20 mm の位置にみられる寄主由来の細胞成分に対する抗体が産生されたものと考えられる。この寄主細胞成分による沈降線はウイルスによる沈降線と明らかに区別できた。

PLRV-グループのウイルスについて行なわれた血清反応の大部分は、膜吸汁法による中和試験である。中和反応による植物ウイルスの研究は少なく、Chester (1934), Kassanis (1943), Rappaport and Siegel (1955), 村山 (1959) らの研究があるにすぎない。これは反応の結果を検定植物上の病原性により判定するため、他の血清学的手法にみられる簡便さ、迅速さを犠牲にしているためと思われる。しかしこの方法は種々の血清学的手法の中で、中和抗体の産生の有無を直接的に判読できる手法であるため、力価の低い血清しか得られない場合や他の手法で陽性の結果を得るのに困難な場合などには有力である。この方法を最初

に PLRV-グループのウイルスに用いたのは、Gold and Duffus (1967) である。彼らは beet western yellows virus 系統間の血清学的関係を知るため、膜吸汁法を利用して中和試験を行ない、二つの方法を考えた。一つは濃縮したウイルス液と等量の抗血清とを反応させ、ただちに膜吸汁法で感染性を確かめる方法であり、他の一つは濃縮したウイルス液と抗血清とを混合した後、蔗糖密度勾配遠心を行ない、ウイルスの部分を取り膜吸汁法によって感染性を調べる方法である。前者は手法は簡単であるが、正常血清によっても感染性が低下するため、正確な中和反応を読むことが困難であるとのことである。後者は正常血清による影響はほとんどないので、少量のウイルスでも検出が可能であるという。本実験では前者の方法を用いて中和試験を行なったところ、ウイルス抗原は抗血清によって完全に中和されたが、正常血清では感染性は低下することなく、むしろ増加する傾向さえ認められた。この結果は Gold and Duffus (1967) の結果と相反する。これに関しては明らかでない。Gold and Duffus (1967) はモモアカブラムシは血清を含む液をよく吸汁しないと述べているが、本実験によるとジャガイモヒゲナガブラムシは血清を含んだ液の方をよく吸汁するようであった。

本実験の結果、ダイズ矮化ウイルスの矮化、黄化両系統はいずれも異系統の抗血清で中和反応が認められた。すなわち重層法および寒天ゲル内拡散法における結果と同様、中和試験でも本ウイルスの系統間に血清学的差異は認められなかった。beet western yellows virus の系統間には血清学的に関係があると報告されている (Gold and Duffus, 1967) が、このウイルスとジャガイモ葉巻病ウイルスとは血清学的に関係がないという (Duffus and Gold, 1969)。さらに Duffus and Russell (1970) はこの中和試験によってヨーロッパにも beet western yellows virus の系統が存在していることを確かめたが、beet mild yellowing virus との関係は明らかでないと述べている。また最近 beet western yellows virus はヨーロッパに発生している turnip yellows virus と

血清学的に関係があると報告された (Duffus and Russell, 1972)。中和試験は barley yellow dwarf virus の系統間の関係を知るためにも用いられ、Rochow and Ball (1967) および Rochow *et al.* (1971) はこのウイルスの3種の vector specific strains のうち、MAV と PAV は血清学的に関係はあるが、RPV はこれら2種の系統とは異なると報告した。その後 Aapola and Rochow (1971) はラテックス凝集反応とマイクロ寒天ゲル内拡散法からも RPV は MAV と PAV の2系統とは血清学的に関係がないことを確かめている。

G 罹病植物組織の電子顕微鏡観察

植物寄主体内におけるウイルスの分布と形態および細胞の変化を明らかにするため、超薄切片法によって電子顕微鏡観察を行なった。

1 実験材料および方法

供試ウイルス：本ウイルスの矮化強素系統 (SDV-DS) および黄化系統 (SDV-Y) に感染したダイズ品種「白鶴の子」を用いた。これらのウイルスは常法により接種を行ない、感染後15日目、20日目および40日目の病徴のあらわれた葉の葉脈および葉柄を用いた。

試料作製法：罹病葉の葉柄および葉脈の部分を取り、70%のエタノールに浸し、蒸留水に移しかえた。つぎに5%グルタルアルデヒド (0.1 M 磷酸緩衝液, pH 7.0, で溶解) を滴下したスライドグラス上に、葉片をおきカミソリ刃で幅約1.5 mm, 長さ約6 mm の小片とした (葉脈の部分を残す)。その小片を5%グルタルアルデヒド溶液で120分間固定した。固定後0.1 M 磷酸緩衝液で洗い、さらに2%オスミック酸で90分間固定した。以上の操作は4°Cで行なった。固定後試料を75%エタノールで洗い、75%, 80%, 90%, 95%, 99.8%で30分ずつ脱水し、その後100%エタノール中で30分間ずつ2回脱水を繰り返した。つぎにこの試料をプロピレンオキサイドに移し、30分間ずつ2回処理した後、エボン・プロピレンオキサイド (1:1 混合液) 中に移しかえ、1晩減圧状態で保ち、純エボンに移しかえた。純エボン中でも試料への浸透をよくするため、1日減圧状態に保った後、ゼラチンカプセル

に包埋した。45°Cで1日、60°Cで2日間おいてエポンを重合させた。包埋された試料はトリミングした後、ウルトラマイクローム (Porter-Blum MT-1, ガラスナイフ使用) で超薄切片を作製した。カーボン蒸着したホルムバール支持膜上に切片をとり、6% 酢酸ウラニウムで60分間染色し、蒸留水で洗浄後、さらに Millonig 氏染色を15分間行なった。日立 HS-7D 型電子顕微鏡 (50 KV) で観察した。

2 実験結果

各種材料について観察した結果、罹病植物の篩部組織は壊死を起こしているものが多く (図版 17—1), きわめてまれではあるが、篩部組織にウイルス様粒子を認めることができた。

篩部組織の壊死については、完全に壊死した細胞は膨圧を失い電子密度の高い均一な像として認められた (図版 17—1; 図版 19—1, 2)。また細胞成分が崩壊し繊維状構造物の認められる細胞 (図版 18—1; 図版 19—1) や細胞質や核膜がくずれはじめた細胞 (図版 18—2) などいろいろな段階あるいは状態の壊死、退化細胞が観察された。このような壊死細胞は感染後まもない若い植物にはみられないかまたはきわめて少なかったが、日数が経過し病徴がはげしくなるほど多いようであった。またウイルス系統別にみると、SDV-Y 感染植物より SDV-DS 感染植物の方がはるかに多くの壊死、退化細胞が観察された。なおいずれの系統に感染した植物でも病徴が進んだ成葉では、葉緑体内に澱粉粒の蓄積が顕著に認められた (図版 17—2)。

篩部組織の篩管、柔細胞および伴細胞には、きわめて頻度は少ないが電子密度の高い均一なウイルス様粒子 (直径 23~25 nm) が認められた (図版 20)。しかしこのような粒子は葉肉細胞や表皮細胞にはみられなかった。ウイルス様粒子は細胞質中より液胞中に見出される例が多く (図版 20—1), また変性した細胞の中に集塊をなしてみられることもあった (図版 20—3)。さらに細胞全体がウイルス様粒子で充満している例もみられた (図版 20—4)。木部導管にもウイルス様粒子が観察されることもあった (図版 20—5)。図版 18—1 に示

すような繊維状構造物で充たされた細胞内にも電子密度の高い像がみられたが、ウイルス粒子かどうかは明らかでなかった。本実験ではウイルス粒子の結晶状配列像は観察できず、また細胞質中ではウイルス粒子とリボソームとを区別することができなかった。

3 考 察

先に土居ら (1968) は本病罹病植物の細胞内にウイルス様粒子を観察し、このウイルスの細胞内所在様式がジャガイモ葉巻病ウイルスのそれとよく類似していたと述べた。本実験でもほぼ同じ結果が得られた。

超薄切片法で罹病植物組織から見出された電子密度の高い直径 23~25 nm の粒子は、健全植物の組織からはみられず、また先に記述した純化ウイルス粒子とも類似していることから、本病の病原ウイルスと考えられる。超薄切片法と純化ウイルス粒子 (ネガティブ染色像) の大きさは必ずしも一致せず、前者は一般に小さい例が多いようである (Kojima *et al.*, 1969; 荒井ら, 1969)。本実験でも純化ウイルス粒子が直径約 25 nm であったのに対して、超薄切片像でみられた粒子はそれよりもいくらか小さかった。

超薄切片法によるウイルス様粒子は、篩部組織のみに認められ、他の葉肉、表皮組織にはみられなかった。篩部組織ではウイルス様粒子は細胞内に集団をなしており、きわめて電子密度が高かった。しかし細胞質中では、細胞の主成分であるリボソームもかなり電子密度が高かったため、ウイルス粒子を区別することができなかった。ウイルス様粒子は変性した細胞の細胞質あるいは液胞中に集団として見出されることが多く、これは細胞質あるいは核内で産出されたウイルスが凝集して、液胞中に放出されたためであろうと考えられる。

本ウイルス感染植物の篩部組織には頻繁に種々の変性細胞や壊死細胞がみられた。

以上のような篩部組織の壊死およびウイルス粒子の細胞内所在様式は、ジャガイモ葉巻病ウイルス (Kojima *et al.*, 1968, 1969; 荒井ら, 1969; 田中・塩田, 1973) および barley yellow dwarf

virus (Jensen, 1969 ; 島山・与良, 1972) で報告されており, PLRV-グループのウイルスに共通した特徴と考えられる。ウイルスが篩部組織に局在していることは, 前述したように植物体内でウイルスが低濃度で存在する理由でもあろう。また篩部組織にみられる壊死は外部病徴の共通性とも関連があると考えられる。一般にウイルス粒子は変性, 壊死細胞に多くみられるようであるが, ウイルスが直接関与して細胞を崩壊させるのか, あるいはウイルス感染によって間接的に細胞を壊すのかは明らかでなく, 今後ウイルスの感染, 増殖様式を経時的に追求する必要がある。

最近, Esau and Hoefert (1972) は beet western yellows virus が篩部柔細胞の核内で増えていることを示し, 核内増殖までの過程を詳細に述べている。

V ジャガイモヒゲナガアブラムシの伝搬に関する研究

先に本ウイルスがジャガイモヒゲナガアブラムシによって永続的に伝搬されることを示したが, その伝搬様式の詳細については明らかでない。よってここでは各地産アブラムシ類のウイルス伝搬能力を調べるとともに, 媒介虫であるジャガイモヒゲナガアブラムシと本ウイルスとの関係およびアブラムシのウイルス伝搬能力について実験を行

第53表 各地産アブラムシ類の採集地とその個体数

採集年月	採集地	アブラムシ個体数
1971年6-7月	夕張郡長沼町(中央農試)	40
1971. 7	河西郡芽室町(十勝農試) a)	3
1972. 6	帯広市川西	12
1972. 6	河西郡芽室町(十勝農試)	5
1972. 6	河西郡芽室町	8
1972. 7	夕張郡長沼町(中央農試)	6
1972. 7	虻田郡留寿都村	8
1972. 8	夕張郡長沼町(中央農試)	8
1972. 8	亀田郡大野町(道南農試)	5
1972. 8	青森県むつ市	7
1972. 8	岩手県岩手郡滝沢村(岩手農試) b)	4

a) 十勝農試 佐藤謙氏の好意による。

b) 岩手農試 関沢博氏の好意による。

なった。

A 各地産アブラムシ類のウイルス伝搬能力の差異

1 実験材料および方法

供試したアブラムシの採集地および個体数は第53表に示した。採集したアブラムシは個体別に健全ダイズ「白鶴の子」にうつし, ウイルス保毒の有無を確かめた後, 各々ダイズ葉を入れたペトリ皿(直径9cm)内で継代飼育, 増殖させた。なお採集したアブラムシ類のうち, エンドウヒゲナガアブラムシはエンドウで飼育した。ウイルス伝搬能力はこれらのアブラムシの若齢虫について調べた。接種源には矮化強毒系統(SDV-DS)と黄化系統(SDV-Y)を用い, 接種植物にはダイズ品種「白鶴の子」を用いた。アブラムシの獲得吸汁時間と接種吸汁時間はいずれも2日間とし, 20°Cの陽光定温器内で接種を行なった。

2 実験結果

実験 1

1971年, 中央農試ほ場(長沼町)から集めたアブラムシ類の伝搬能力を調べた結果は第54表に示すとおりである。

この実験は1植物あたり1頭ずつで接種したものである。供試ジャガイモヒゲナガアブラムシはすべて両ウイルス系統をうつすことができたが, その分離系間にわずか差がみられた。対照に用いたアブラムシは比較的よくうつしたのに対して, B-17およびB-18は低い伝搬率を示した。B-1のアブラムシの種はコンドウアミナシヒゲナガアブラムシ(*Acyrtosiphon kondoi* Shinji et Kondo)であり, この種は本ウイルスを媒介することができなかった。

実験 2

各地産アブラムシ類の伝搬能力を調べた結果は第55表に示すとおりである。

採集地のうち本病の多発地は, 長沼町, 留寿都村, 大野町であり, 少発地は芽室町, 帯広市, 青森県むつ市である。なお岩手県岩手郡滝沢村(岩手農試)ではまだ本病の発生が確認されていない。本実験は1植物あたり3頭ずつを用い接種したので実験1(第54表, 1植物あたり1頭ずつで接種)

第54表 中央農試産アブラムシ類のウイルス伝播力の差異(1971年)

分離番号	アブラムシの種名	採集時の寄主植物	アブラムシの体色	ウイルスの系統	
				SDV-DS	SDV-Y
対 照 a)	<i>Au. solani</i>	ダイズ	淡黄色	11/12d)	10/12
B-1	<i>Ac. kondoi</i>	インゲン	緑色	0/12	0/9
B-17	<i>Au. solani</i>	インゲン	黄緑色	1/9	5/12
B-18	〃	インゲン	淡緑色	7/12	4/12
S-1	〃	ダイズ	緑色	9/12	8/12
S-9	〃	ダイズ	淡黄色	7/12	8/12
S-15	〃	ダイズ	淡黄色	10/12	5/12
P-5	〃	ジャガイモ	緑色	11/12	7/12
P-8	〃	ジャガイモ	淡黄色	11/12	6/12
P-10	〃	ジャガイモ	淡黄色	9/12	9/12
T-1b)	〃	ダイズ	淡黄色	8/12	6/12

- a) 1968年, ダイズから採集し, 継代飼育した虫。
 b) 十勝農試(芽室町)ほ場から採集した虫。
 c) *Au. solani*: ジャガイモヒゲナガアブラムシ, *Ac. kondoi*: エンドウアミナシヒゲナガアブラムシ。
 d) 分母: 接種株数, 分子: 感染株数。

第55表 各地産アブラムシ類のウイルス伝播力の差異

実験	分離番号	アブラムシの種名	採集場所	採集時の寄主植物	ウイルスの系統	
					SDV-DS	SDV-Y
1	対 照 a)	<i>Au. solani</i> a)	長沼町(中央農試)	ダイズ	6/6b)	6/6
	OP-2	〃	帯広市	エンドウ	6/6	5/6
	OP-5	〃	帯広市	エンドウ	6/6	6/6
	M-3	〃	芽室町(十勝農試)	シロクローバ	6/6	6/6
	I-4	〃	岩手県岩手郡(岩手農試)	ダイズ	5/6	5/6
	CH-2	<i>Ac. kondoi</i>	長沼町(中央農試)	ダイズ	0/6	0/6
2	対 照	<i>Au. solani</i>	長沼町(中央農試)	ダイズ	6/6	6/6
	OP-1	〃	帯広市	エンドウ	5/6	6/6
	M-2	〃	芽室町(十勝農試)	ダイズ	6/6	4/6
	OS-12	〃	帯広市	ダイズ	5/6	3/6
	RP-2	〃	留寿都村	エンドウ	6/6	5/6
	I-1	〃	岩手県岩手郡(岩手農試)	ダイズ	5/6	5/6
3	OP-6	<i>Au. solani</i>	帯広市	エンドウ	6/6	6/6
	OD-1	〃	大野町(道南農試)	ダイズ	4/6	4/6
	CH-1	〃	長沼町(中央農試)	ダイズ	6/6	6/6
	CH-2	<i>Ac. kondoi</i>	長沼町(中央農試)	ダイズ	0/6	0/6
	AG-1	<i>Ap. glycines</i>	青森県むつ市	ダイズ	0/6	0/6
	AG-2	〃	大野町(道南農試)	ダイズ	0/6	0/6
4	AM-3	<i>Au. solani</i>	青森県むつ市	ダイズ	6/6	5/6
	OD-3	〃	大野町(道南農試)	ダイズ	6/6	6/6
	AM-1	〃	青森県むつ市	ダイズ	5/6	6/6
	I-2	〃	岩手県岩手郡(岩手農試)	ダイズ	6/6	5/6
	AC-1	<i>Ac. pisum</i>	長沼町(中央農試)	エンドウ	0/6	0/6
	AC-2	〃	留寿都村	エンドウ	0/6	0/6

- a) 第54表の脚注と同じ。
Ap. glycines: ダイズアブラムシ, *Ac. pisum*: エンドウヒゲナガアブラムシ。
 b) 分母: 接種株数, 分子: 感染株数。

よりもかなり高い伝搬率を示した。この表から明らかかなように、多発生地、少発生地および未発生地にかかわらず、供試したジャガイモヒゲナガアブラムシはいずれも両ウイルス系統を媒介することができ、伝搬力に大きな差異はみられなかった。なお前実験と同様、コンドウアミナシヒゲナガアブラムシ（長沼町産）およびダイズアブラムシ（大野町産および青森県むつ市産）は本ウイルスを媒介することができなかつた。さらにこの実験で新たに長沼町および留寿都村でエンドウから採集したエンドウヒゲナガアブラムシを用いて接種を行なったが、本ウイルスを媒介することができなかつた。

3 考 察

本ウイルスはジャガイモヒゲナガアブラムシによって媒介され、ダイズアブラムシ、モモアカアブラムシ、マメアブラムシ、エンドウヒゲナガアブラムシおよびコンドウアミナシヒゲナガアブラムシなど5種のアブラムシでは媒介されなかつた。ジャガイモヒゲナガアブラムシとダイズアブラムシ以外のアブラムシ類はダイズでの吸汁状態が必ずしも良好とはいえず、ダイズほ場ではほとんど認められなかつた。前述したように本ウイルスはダイズ以外の多くのマメ科植物に感染性を有することから、さらに今後ダイズ以外の寄主植物、例えばエンドウあるいはクローバ類などに寄生するアブラムシ類を用いて、伝搬試験を行なう必要がある。

本ウイルスのように永続的に伝搬されるウイルスは特定の種類のアブラムシによって媒介される例が多い (Kennedy *et al.*, 1962)。また barley yellow dwarf virus では、ウイルスの系統とそれを媒介するアブラムシの種類との間に特異的な親和関係が認められている (Rochow, 1959)。このような vector specificity はアブラムシによって非永続的 (口針伝搬型) に伝搬されるウイルスでもいくらかみられるが、とくに永続的伝搬性ウイルスではいちじるしい。これはウイルスが長時間虫体内で保有されるため、host specificity と同じように虫とウイルスとの間に密接な親和関係が存在するものと思われるが、この理由はほと

んど明らかでない。

アブラムシの strains, clones, biotypes などでウイルス伝搬力に差がみられる例はいくつか報告されている。例えば spinach yellows virus とモモアカアブラムシ (Stubbs, 1955), groundnut rosette virus とマメアブラムシ (Storey and Ryland, 1955; Watson and Okusanya, 1967), ジャガイモ葉巻病ウイルスとモモアカアブラムシ (Mueller and Ross, 1961; Clark and Ross, 1964; Hinz, 1966) などで認められている。本実験の結果、ジャガイモヒゲナガアブラムシの分離系統間には、本ウイルスを媒介する能力に顕著な差異は認められなかつた。本実験はウイルス系統の vector specificity の存在を確かめるための予備試験として行なったものであるが、今後さらに各地の発病状況、ウイルス系統の分布、アブラムシの種類と系統などを明らかにしながら広範囲に実験を行なう必要がある。

B ジャガイモヒゲナガアブラムシとウイルスとの関係

ジャガイモヒゲナガアブラムシのウイルス伝搬様式を知るため、ウイルス獲得吸汁時間、接種吸汁時間、虫体内潜伏期間、保有期間および胎生虫による伝搬について実験を行なった。

1 実験材料および方法

接種源には矮化系統 (中～強) を用い、接種植物にはダイズ品種「白鶴の子」を用いた。なお虫体内保有期間の実験では黄化系統 (SDV-Y) も供試した。ジャガイモヒゲナガアブラムシは昆虫飼育箱 (高さ 45 cm, 横・幅 30 cm) 中の健全ダイズで飼育した。ウイルスの獲得吸汁は罹病植物の切離葉を用いて行ない、保毒虫はその上で少なくとも 2 日間以上吸汁させた。接種は 15～25 °C の範囲内で準備室あるいは温室の日陰の場所で行なった。接種中の植物にはガラス円筒 (図版 4-1) をかけて、アブラムシが逃亡するのを防いだ。接種後の植物は温室にうつし、病徴出現の有無を観察した。

2 接種虫数とウイルス伝搬との関係

保毒ジャガイモヒゲナガアブラムシを 1, 2, 3, 5 および 10 頭ずつ検定植物につけ、24 時間吸汁

させた。実験は5回反復し、その結果は第56表のとおりで、1頭のアブラムシは35%の植物にウイルスをうつした。虫数を増加するにつれて伝搬率は増大し、5頭以上のアブラムシで接種した場合100%の伝搬率を示した。

第56表 接種虫数とウイルス伝搬との関係a)

実験	1植物あたり虫数				
	1	2	3	5	10
1	3/12b)	5/12	10/12	12/12	12/12
2	2/12	6/12	9/12	12/12	12/12
3	3/12	8/12	12/12	12/12	12/12
4	7/12	12/12	11/12	12/12	12/12
5	6/12	10/12	12/12	12/12	12/12
合計	21/60	41/60	54/60	60/60	60/60
感染率(%)	35.0	68.3	90.0	100.0	100.0

- a) 接種吸汁時間は24時間とした。
- b) 分母：接種株数，分子：感染株数。

3 ウイルス獲得吸汁時間

無毒ジャガイモヒゲナガアブラムシを罹病植物の切離葉上で30分、1時間、3時間、6時間および24時間吸汁させた後、1植物あたり5頭ずつ健全ダイズに移し、4日間吸汁させた。実験は5回反復した。その結果、ジャガイモヒゲナガアブラムシは30分間ではウイルスを獲得できなかったが、1時間の吸汁で3.3%と低率ながらウイルスを獲得できた。獲得吸汁時間を長くするにつれて感染率(獲得率)は増大した(第57表)。

第57表 ウイルス獲得吸汁時間a)

実験	獲得吸汁時間				
	30分	1時間	3時間	6時間	24時間
1	0/12b)	0/12	2/12	8/12	12/12
2	0/12	1/12	5/12	6/12	12/12
3	0/12	1/12	9/12	12/12	12/12
4	0/12	0/12	5/12	6/12	12/12
5	0/12	0/12	4/12	7/12	12/12
合計	0/60	2/60	25/60	39/60	60/60
感染率(%)	0.0	3.3	41.7	65.0	100.0

- a) 1植物あたり5頭のアブラムシで接種。
- b) 分母：接種株数，分子：感染株数。

4 ウイルス接種吸汁時間

罹病ダイズ上で飼育した(あるいは罹病切離葉を入れたベトリ皿内で2日間吸汁させた)保毒虫

を2頭の集団で健全ダイズに10分、30分、1時間、3時間、6時間および24時間吸汁させた。5回の反復実験を行なった結果、保毒ジャガイモヒゲナガアブラムシは10分の吸汁ではウイルスをうつすことができなかったが、30分吸汁させたアブラムシは10%の伝搬率を示した。接種吸汁時間も長くするにつれて感染率は増大した(第58表)。

第58表 ウイルス接種吸汁時間a)

実験	接種吸汁時間					
	10分	30分	1時間	3時間	6時間	24時間
1	0/12b)	4/12	3/12	4/12	5/12	7/12
2	0/12	0/12	1/12	0/12	0/12	2/12
3	0/12	1/12	3/12	6/12	4/12	8/12
4	0/12	0/12	0/12	0/12	3/12	6/12
5	0/12	1/12	3/12	2/12	6/12	10/12
合計	0/60	6/60	10/60	12/60	18/60	33/60
感染率(%)	0.0	10.0	16.7	20.0	30.0	55.0

- a) 1植物あたり2頭のアブラムシで接種。
- b) 分母：接種株数，分子：感染株数。

5 ウイルスの虫体内潜伏期間

実験 1

まず虫体内においてウイルスの潜伏期間があるかどうかを知るために実験を行なった。無毒ジャガイモヒゲナガアブラムシを罹病葉上で30分、1時間、3時間および24時間吸汁させた後、5頭ずつの集団で直ちに健全ダイズに移し、各々獲得吸汁と同じ時間接種吸汁させた。3回の実験結果は第59表に示すとおりで、30分、1時間および3時間の吸汁では感染が認められなかったが、24時間吸汁させたアブラムシは100%の感染率を示した。すなわち本ウイルスは少なくとも6時間以上の虫体内潜伏期間が必要であった。

第59表 ウイルスの虫体内潜伏期間a)

獲得吸汁時間	接種吸汁時間	実験			合計	感染率
		1	2	3		
30分	30分	0/12b)	0/12	0/12	0/36	0.0
1時間	1時間	0/12	0/12	0/12	0/36	0.0
3時間	3時間	0/12	0/12	0/12	0/36	0.0
24時間	24時間	12/12	12/12	12/12	36/36	100.0

- a) 1植物あたり5頭のアブラムシで接種。
- b) 分母：接種株数，分子：感染株数。

第60表 ウイルスの虫体内潜伏期間とアブラムシのウイルス保有期間

アブラムシ 番号	獲得 吸汁 時間	獲得吸汁時間後の日数と接種吸汁時間																	
		1a) 3b)	6	12	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24
1	1	5c)	5	5	5	4	4+	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
2		5	5	5	5	5	5	5+	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
11	3	5	5	5	5+	5+	5+	5+	5	5+	5	5+	5+	5+	5+	5	5	5	5
12		5	5	5	5	5+	5	5+	5	5	5+	5	5+	5+	5	5	5	5+	5
13		5	5	5	5	5	5+	5	5+	5	5	5	5	5+	5	5	5	5	5
14		5	5	5	5	5	5+	5	5+	5	5	5	5	4	4+	4	4	4	4
15		5	5	5	5+	5	5+	5	5	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4
16		5	5	5	5	5	5+	4	4+	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3
17		5	5	5	5	5	5	5+	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4
21	6	5	5	5+	5+	5+	5	5+	5+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4	4	4	4+
22		5	5	5+	5+	5+	5+	5+	5+	5+	5	5+	5+	5+	5	5	5	5	5
23		5	5	5+	4	4+	4+	4+	4	4+	4+	4	4+	4+	4	4	4	4	4
24		5	5	5	5+	5	5+	5+	5+	5+	5+	5	5+	5+	5	5	5	5	5
25		5	5	5	5+	5	5+	4+	4	4+	4+	4	4	3+	3	3	3	3	3
26		5	5	5	5	5+	5+	5+	5+	5	5	5	5+	5	5	5	5	5	5
27		5	5	5	5	4+	4	4+	4+	4+	4	4	4	4	4	4	4	4	4
28		5	5	5	5	4+	4	4	4	4	4	4	4	4+	4	4	4	4	4
29		5	5	5	5	5	5	5+	5	5	5+	5	5	5	5	5	5	5	5
30		5	5	5	5	4	4	4+	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4

a) 獲得吸汁時間後の日数。

b) 接種吸汁時間。

c) 数字は生存虫数, +は感染したことを示す。

実験 2

つぎに虫体内潜伏期間を知るため、継代接種を行なった。無毒ジャガイモヒゲナガアブラムシを罹病葉上で1, 3および6時間吸汁させた後、1植物あたり5頭の集団で順次健全植物に移しかえた。接種吸汁時間は最初の植物には3時間、2番目のものには6時間、3番目のものには12時間とし、それ以後は毎日移しかえた。各々接種した植物10組のうち、1時間獲得吸汁虫では2組、3時間では7組、6時間では10組すべてに感染が認められた。感染が認められた組のみを第60表に示す。虫体内におけるウイルスの最短潜伏期間は獲得吸汁および接種吸汁時間を含めて、6時間獲得吸汁虫は17時間、3時間獲得吸汁虫は48時間であった。また1時間獲得吸汁虫は4日目までウイルスの伝搬が認められなかった。すなわち本ウイルスの虫体内潜伏期間は獲得吸汁時間の長さによ

って異なり、獲得吸汁時間を短くするほどその期間は長くなるようであった。

6 ウイルスの虫体内保有期間

第60表に示すようにジャガイモヒゲナガアブラムシのウイルス保有期間は、1時間獲得吸汁虫は4~5日間、3日間獲得吸汁虫は5~15日間、および6時間獲得吸汁虫は5~17日間であった。アブラムシは獲得吸汁後3~10日の間にウイルスをよくうつした。このようにアブラムシのウイルス保有期間もまた獲得吸汁時間の長さによって異なっていた。

つぎにアブラムシの個体別にウイルスの保有期間をみるため、無毒若齢幼虫(生後1日目)を矮化強毒系統(SDV-DS)罹病植物上で24時間吸汁させた後、毎日健全植物に1頭ずつ死亡するまで移しかえた。接種はすべて20°Cの条件下で行なった。その結果は第61表に示すように、供試し

間を増加するにつれて伝搬率は高くなった。このことはアブラムシがウイルスを獲得するためには、植物組織の内部まで、いわゆる篩部組織まで口針を挿入する必要があることを示唆しているようである。また前に述べたように植物体内におけるウイルス濃度が低いこともウイルスを獲得するために、長時間吸汁しなければならない理由かも知れない。一方、保毒虫が健全植物を感染させるには、最短10~30分の吸汁時間が必要であった。この時間もまた植物の表皮細胞には感染できないことを意味していると思われる。以上の結果は口針伝搬型ウイルスが秒または分単位で伝搬されるのと比較すると非常に異なる点である。循環型ウイルスの伝搬についてはジャガイモ葉巻病ウイルスについてもっともよく研究されており、その結果は研究者によって異なるが、モモアカアブラムシの最短獲得吸汁時間は1~24時間であり、最短接種吸汁時間は5分~2時間であるという (Webb *et al.*, 1952; Kassanis, 1952; MacCarthy, 1954; Day, 1955; Heinze, 1959; 大島・玉田, 1966; 宮本・宮本, 1966; 田中・塩田, 1970)。そして一般にモモアカアブラムシは1日以上吸汁すると、ウイルスを容易に伝搬するようである。このような傾向は beet western yellows virus や barley yellow dwarf virus などの循環型ウイルスでもみられる。

つぎに虫体内潜伏期間をみると、本ウイルスはジャガイモヒゲナガアブラムシの体内で最短15~27時間の潜伏期間が必要であった。ジャガイモ葉巻病ウイルスはモモアカアブラムシの体内で9.5~46時間の潜伏期間を必要とし、beet western yellows virus も同媒介昆虫体内で12~24時間の潜伏期間が必要であると報告されている (Duffus, 1960)。また barley yellow dwarf virus では獲得吸汁時間を1日以内にするると潜伏期間がみられるという (Rochow, 1963)。他方、ジャガイモ葉巻病ウイルスとモモアカアブラムシの場合には、虫体内潜伏期間が認められず、短時間でウイルスが伝搬されたという例がある (Kirkpatrick and Ross, 1952; Klostermeyer, 1953)。この結果はジャガイモ葉巻病ウイルスはきわめてまれに

口針型伝搬する可能性があることを示すものであろうが、これはむしろ例外と考えた方が妥当のようである。数10時間という比較的短時間(増殖型ウイルスと比べて)の虫体内潜伏期間が必要なことは循環型ウイルスの一つの特徴である。この時間はおそらくアブラムシの口針から取り込まれたウイルスが中腸を経て体液に入り、最後にだ腺から体液とともに吐出されるまでの時間であろうと推定される。

ウイルス保有期間をみると、ジャガイモヒゲナガアブラムシは最長25日まで本ウイルスを保有していた。しかし大部分のアブラムシは接種源を離れた後、日数が経過するにつれて伝搬力を低下する傾向が認められた。また本ウイルスの保毒成虫から胎生虫への移行は認められなかった。これらの結果もまた循環型ウイルスの大きな特徴である。しかし胎生虫へのウイルスの移行について、宮本・宮本 (1966, 1971) はジャガイモ葉巻病ウイルス保毒モモアカアブラムシの成虫から産出した胎生虫を健全植物に吸汁させると低率ながらウイルスの保毒および伝搬が認められたと報告した。ただし子孫へのウイルスの伝搬は冬期間の比較的低温の条件で実験を行なった場合のみであるという。

以上の結果、本ウイルスの伝搬様式はジャガイモ葉巻病ウイルスで代表される循環型ウイルスのそれと多くの点で一致するが、アブラムシのウイルス獲得吸汁時間、接種吸汁時間、虫体内潜伏期間および保有期間は、アブラムシの種類、系統、個体、齢、接種源の状態、接種植物の状態、接種条件などによって異なると思われる。

C ジャガイモヒゲナガアブラムシのウイルス伝搬能力

前述の実験結果から、本ウイルスは循環型ウイルスであることが判明した。しかし本ウイルスが虫体内で単に循環しているかどうかは明らかでない。よってここではジャガイモヒゲナガアブラムシの伝搬能力、とくにウイルス保有期間について、虫齢、ウイルス獲得および接種の面から検討を加えた。

1 実験材料および方法

供試ウイルスは矮化強毒系統 (SDV-DS) で、接種植物にはダイズ品種「白鶴の子」を用いた。ジャガイモヒゲナガアブラムシの飼育、ウイルスの獲得および接種はすべて 20 °C の陽光定温器内で行なった。接種はすべて 1 植物あたり 1 頭のアブラムシで行ない、接種期間中植物にはガラス円筒 (図版 4—1) をかけた。接種後の植物は温室に移し、病徴発現によって感染の有無を判定した。

2 虫齢と獲得吸汁時間との関係

a 実験方法

生後 24 時間程度のジャガイモヒゲナガアブラ

ムシの幼虫を、罹病ダイズ切離葉上で 3, 6, 12, 24, 48, 72 および 96 時間吸汁させた後、1 日ずつ健全植物に 10 回 (10 日間) 移しかえた。一方、生後 10 日目の成虫には 24, 48, 72 および 96 時間獲得吸汁させ、同様に 10 日間健全植物に移しかえた。1 回の実験に各々 10 頭ずつ用い、4 回反復した。なおアブラムシを健全植物に移しかえるごとに、各虫について産生された仔虫数を調べた。

b 実験結果

結果は第 63 表に示すとおりである。

獲得吸汁時間と保毒虫率および保毒虫の伝搬率

第 63 表 ジャガイモヒゲナガアブラムシの虫齢と獲得吸汁時間との関係

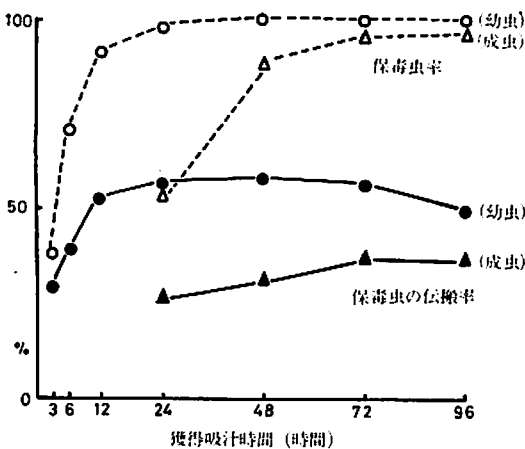
獲得吸汁後の日数	3a)	6		12		24		48		72		96	
	Nb)	N	N	N	A	N	A	N	A	N	A	N	A
	15/42	30/42	40/43	42/43	24/44	42/42	35/39	44/44	37/38	44/44	41/42		
1	6.7c)	33.3	60.0	45.2	0.0	59.5	8.6	56.8	24.3	70.5	19.5		
2	20.0	40.0	65.0	69.0	41.7	71.4	31.4	65.9	32.4	47.7	36.6		
3	53.3	50.0	67.5	78.6	50.0	73.8	48.6	61.4	37.8	43.2	61.0		
4	53.3	60.0	85.0	61.9	29.2	66.7	34.3	70.5	37.8	70.5	46.3		
5	60.0	43.3	72.5	59.5	29.2	66.7	34.3	65.9	62.3	38.6	46.3		
6	26.7	50.0	50.0	61.9	33.3	54.8	45.7	43.2	54.1	50.0	43.9		
7	33.3	43.3	57.5	57.1	25.0	54.8	28.6	47.7	54.1	47.7	39.0		
8	20.0	26.7	50.0	57.1	20.8	57.1	28.6	54.5	37.8	40.9	63.4		
9	6.7	26.7	45.0	45.2	29.2	52.4	22.9	36.4	40.5	45.5	43.9		
10	13.3	30.0	17.5	45.2	12.5	42.9	42.9	43.2	35.1	34.1	39.0		

a) 獲得吸汁時間。

b) N: 幼虫, A: 成虫。

分母: 供試虫数, 分子: 保毒虫数。

c) 保毒虫のウイルス伝搬率 (%)。



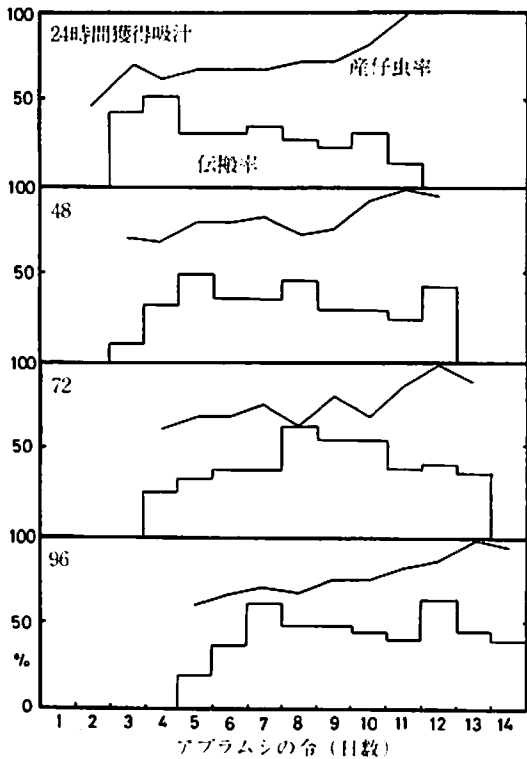
第 15 図 獲得吸汁時間を異にした幼虫と成虫の保毒虫率と保毒虫のウイルス伝搬率

との関係は第 15 図に示した。幼虫の保毒虫率は 3 時間の獲得吸汁では 35.7% であり、6, 12 時間と獲得吸汁時間を長くするにつれて増加し、24 時間ではほぼ 100% に近い値を示した。これに対して、成虫の保毒虫率は 24 時間の獲得吸汁では 54.5% であり、獲得吸汁時間を長くするにつれて増大し、96 時間の吸汁でようやく 97.6% となった。すなわち保毒虫になるための獲得吸汁時間は、幼虫では 24 時間であったのに対して、成虫では 72~96 時間が必要であった。

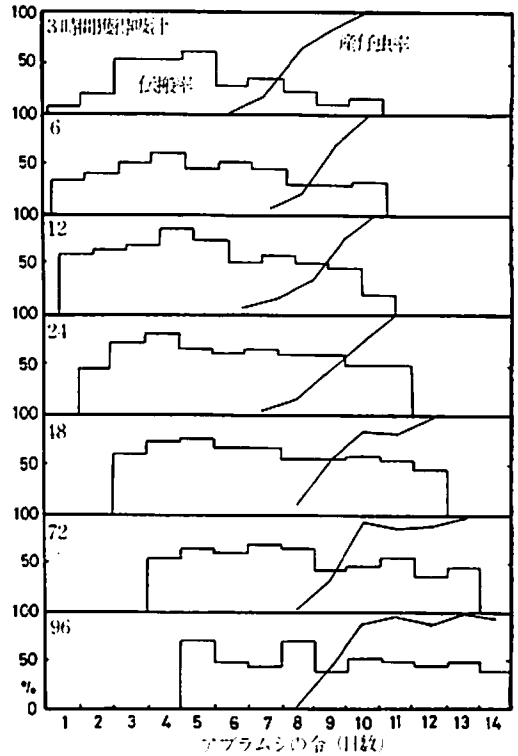
つぎに保毒虫の伝搬率 (保毒虫が植物にウイルスを感染させた割合) をみると、幼虫は 3 時間獲得吸汁で 29.3% の伝搬率を示し、獲得吸汁時間を長くするにつれて伝搬率は高まり、24~48 時間

で最大(60%)に達したが、72、96時間では逆に減少した。これに対して、成虫は24時間の獲得吸汁で27.1%の伝搬率を示し、獲得吸汁時間を長くするにつれていくらか伝搬率の増加がみられたが、96時間でも45%の伝搬率を示したにすぎなかった。以上の結果、幼虫は成虫よりも高い保毒虫率、伝搬率を示した。すなわち幼虫は成虫よりも本ウイルスを獲得、伝搬する能力がすぐれていることが判明した。

第16図には幼虫時にウイルスを獲得させたアブラムシの伝搬率を示した。3時間獲得吸汁区における伝搬率は獲得吸汁後3~4日目まで急激に増加し、5日目以後徐々に低下した。6、12および24時間の獲得吸汁区でも獲得吸汁後3~4日目ごろまで伝搬率が上昇する傾向が認められた。しかしいずれの区も虫齢が進むにつれて(獲得吸汁後の日数が経過するにつれて)、伝搬率が次第に低下する傾向を示した。この伝搬力が低下する時期は胎生仔虫が産出される少し前の第4脱皮期ご



第16図 獲得吸汁時間を異にしたジャガイモヒゲナガアブラムシの伝搬力(幼虫)



第17図 獲得吸汁時間を異にしたジャガイモヒゲナガアブラムシの伝搬力(成虫)

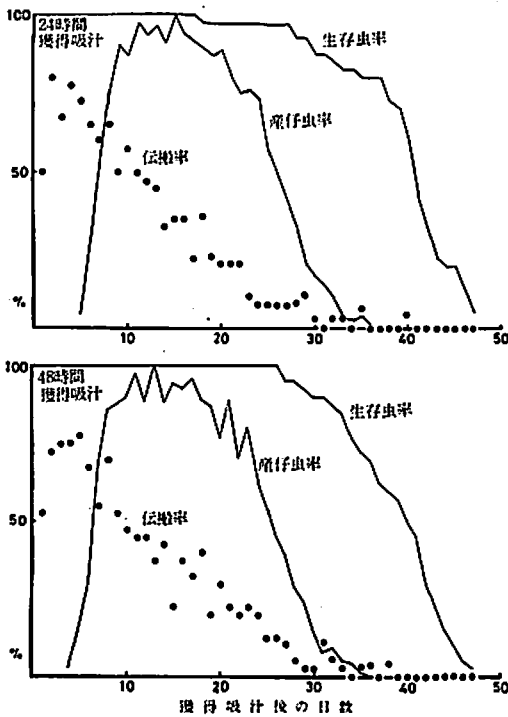
ろと推定された。

第17図は生後10日目の成虫にウイルスを獲得させたアブラムシの伝搬率を示したものである。24時間獲得吸汁区における伝搬は、最初の1日目ではまったく認められず、2日目から認められた。このことは成虫は最短24~48時間の虫体内潜伏期間が必要であることを示している。48、72および96時間獲得吸汁区では、いずれも病原を離れた後2~3日目ぐらいまでは伝搬率の増加がみられたが、その後は次第に低下する傾向を示した。成虫ではその伝搬力が日によっていちじるしく異なることがあり、何かウイルスの伝搬にリズムがあるようにもみうけられた。例えば、24および48時間獲得吸汁区をみるとほぼ3日目ごとに伝搬にピークがみられた。

3 獲得吸汁時間を異にしたアブラムシの伝搬能力

a 実験方法

生後24時間目のジャガイモヒゲナガアブラム



第18図 ジャガイモヒゲナガアブラムシの伝播能力

シの幼虫を罹病植物上で24および48時間吸汁させ、その後健全植物にアブラムシが死亡するまで毎日移しかえた。1回の実験に各々10~12頭を用い、5回反復した。なおアブラムシを植物に移しかえるごとに個体別に産仔虫数を調べた。

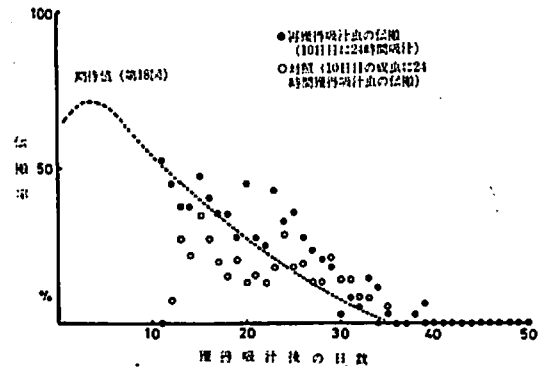
b 実験結果

結果は第18図に示すとおりである。

産仔虫率は産仔虫数の最高値を100%としてプロットしたものである。24および48時間獲得吸汁したアブラムシの伝播率は、いずれも成虫になる少し前ごろ(産仔虫が認められるころ)からほぼ直線的に低下した。そうして産仔虫率が低下し、死亡虫が認められる25~30日後には、大部分のアブラムシは伝播力を消失した。24時間獲得吸汁虫は最長40日まで、48時間獲得吸汁虫は最長38日までウイルスを保有していた。図から明らかなように、ジャガイモヒゲナガアブラムシの伝播率および伝播能力保有期間に獲得吸汁時間の長短の差はほとんど認められなかった。

4 再獲得吸汁させたアブラムシの伝播能力

a 実験方法



第19図 伝播能力におよぼす再獲得吸汁時間の影響

生後24時間目のジャガイモヒゲナガアブラムシの幼虫に24時間獲得吸汁させた後、健全植物に9日間毎日移しかえた。10日目にはそのアブラムシを罹病葉に移し、さらに24時間吸汁させた。その後再び同様に健全植物にアブラムシが死亡するまで移しかえた。対照として生後10日目の成虫を24時間罹病葉上で吸汁させた後、同様にアブラムシが死亡するまで健全植物に移しかえた。1回の実験に各々10~12頭のアブラムシを用いて、5回反復した。

b 実験結果

結果は第19図に示すとおりである。

この結果、幼虫時より連続的に移しかえ接種を行なったジャガイモヒゲナガアブラムシに、10日目に再びウイルスを獲得させると、アブラムシの伝播率は第18図から得た期待値(再獲得させない場合)と比べてはるかに高く、ウイルス保有期間も長くなった。すなわち伝播力の低下しはじめたジャガイモヒゲナガアブラムシは明らかにウイルスを再獲得し、伝播力を高めることができた。対照として行なった生後10日目の成虫からスタートしたアブラムシの伝播力は10~30日の比較的産仔虫数の多い間はほぼ一定の値を示したが、虫齢が進み死亡虫が目立つ時期には、ほとんど伝播力を失った。しかし、20~30日の間の伝播力は期待値より高い値を示した。以上の結果、ジャガイモヒゲナガアブラムシの伝播能力保有期間は獲得吸汁時間よりも獲得時の虫の齢にかなり左右されると考えられた。

5 虫齢と接種吸汁時間との関係

a 実験方法

生後24時間目のジャガイモヒゲナガアブラムシの幼虫を罹病葉を入れたペトリ皿内で飼育した。そのアブラムシは5日ごとに健全植物に移し、24, 48 および 72 時間接種吸汁させた。ペトリ皿内の罹病葉は3~4日おきに新鮮なものにとりかえた。1回の実験に各区それぞれ10頭ずつ供試し、4回反復した。

b 実験結果

結果は第20図に示すとおりである。

ジャガイモヒゲナガアブラムシの伝搬率は若齢虫ほど高く、虫齢が進むにつれて低下した。また伝搬率におよぼす接種吸汁時間の影響は、若齢虫ほど明瞭にあらわれた。すなわち若齢虫は接種吸汁時間を長くすると高い伝搬率を示したが、虫齢が20日目以後のアブラムシでは伝搬率にほとんど差がみられなかった。

このように罹病葉上で飼育した各齢のアブラムシの伝搬力と連続的に毎日健全植物に移しかえ接種で得られた伝搬力(第18図)とを比較してみると、前者は後者よりかなり高い伝搬率を示した。とくに連続的に移しかえ接種した場合、虫齢が30日目ではほとんど伝搬力を失ったのに対して、罹病葉上で飼育した同齢のアブラムシは45%と高い伝搬率を示した。以上の結果、連続的に移しかえ接種を行なって生じたアブラムシの伝搬能力の低下は、虫齢と虫体内におけるウイルス量の減少

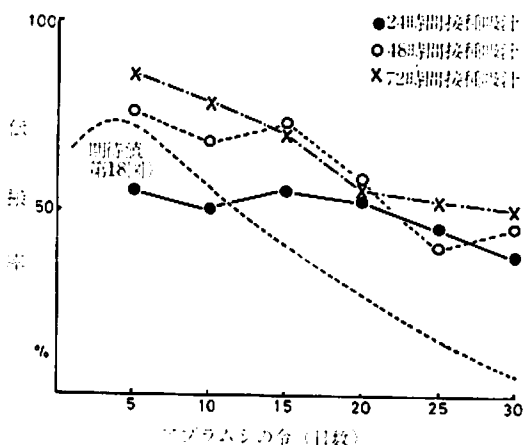
によると考えられた。

6 考 察

本ウイルスのジャガイモヒゲナガアブラムシによる伝搬様式がジャガイモ葉巻病ウイルスで代表される循環型ウイルスのそれとよく類似していることはすでに述べた。しかしながら、この型のウイルスが虫体内にとり込まれた後、単に体内を循環しているだけか、あるいは体内で増殖しているかは明らかでない。本実験はこの疑問を解明する手掛を得るためにウイルス伝搬能力および伝搬力保有期間について行なったものである。

ジャガイモヒゲナガアブラムシのウイルス伝搬力におよぼす獲得吸汁時間の影響をみると、保毒虫率および保毒虫の伝搬率は獲得吸汁時間を長くするにつれて増大した。しかし幼虫の保毒虫率は24時間の獲得吸汁によって100%に達し、保毒虫の伝搬率は24~48時間の獲得吸汁で最大に達した。これに対して、成虫の保毒虫率は96時間の獲得吸汁でほぼ100%に達し、保毒虫の伝搬率は96時間までわずかに増加したにすぎなかった。このことから、ジャガイモヒゲナガアブラムシが罹病葉を吸汁しウイルスを獲得、伝搬する場合、ある限度があり、ある時間以上いくら吸汁させても伝搬力の増加は起らないと結論される。そして伝搬力を最大に発揮できる獲得吸汁時間はアブラムシの齢で異なり、幼虫ほど短時間で最大になるのに対して、成虫は長時間が必要である。またアブラムシが獲得吸汁後伝搬力を持つまでの期間(虫体内潜伏期間)あるいは伝搬力が上昇し最大になるまでの期間も幼虫より成虫の方が長かった。

このようにアブラムシの幼虫が成虫よりもウイルスの媒介者として優れていることは、ジャガイモ葉巻病ウイルス(Kassanis, 1952; MacKinnon, 1962; 大島・玉田, 1966; 菅原ら, 1970 a), filaree red-leaf virus (Anderson, 1951), pea enation mosaic virus (Simons, 1954; Nault *et al.*, 1964; Ehrhardt and Schmutterer, 1965; Sylvester and Richardson, 1966 a, b; Chapman and Bath, 1968; Kyriakopoulou and Sylvester, 1969), barley yellow dwarf virus (Gill, 1970) などのウイルスとそれらの媒介昆虫との間で認められて



第20図 虫齢と接種吸汁時間との関係

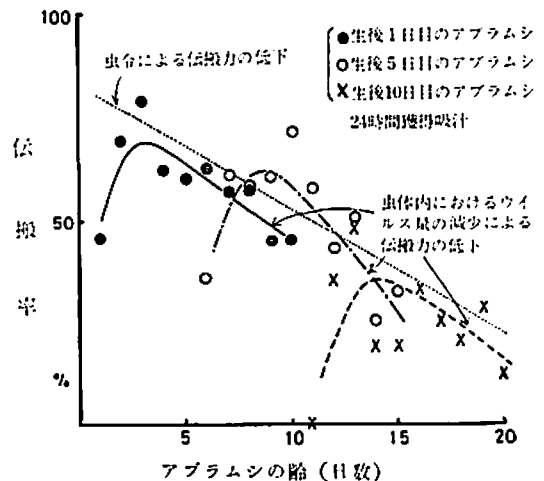
いる。その理由はつぎのように考えることができる。すなわち(1)幼虫の方が罹病植物をよく吸汁し、多量のウイルスを獲得する。そのため haemolymph 中のウイルス濃度が高くなり、だ腺に多量のウイルスが入ってくる。(2)幼虫は代謝機能が旺盛である。アブラムシはマルピギー氏管を持たないため、だ腺は排泄器管の役目も果している。したがってウイルス粒子は代謝産物の廃物とともにだ腺に蓄積し、だ液とともに排泄される。(3)ウイルスが中腸から haemolymph 中に移行する場合、幼虫の組織の方がウイルスは通過しやすく、そのためより早く、より多量のウイルスがだ腺に達する。

ジャガイモヒゲナガアブラムシの伝搬力の保有期間をみるため、ウイルス獲得吸汁後の虫を順次健全植物に移しかえ接種を行なうと、ウイルス伝搬力の低下が認められる。この伝搬力の低下は、幼虫からスタートすると、獲得吸汁時間に関係なく成虫になる少し前(第4脱皮期)ごろから生じているようである。そしてアブラムシが死亡するまで移しかえていくと、ほぼ直線的に伝搬力の低下がみられた。アブラムシが老化し、その産仔虫数が少なくなり、死亡虫が出始めるころには大部分のアブラムシは伝搬力を消失した。この傾向は獲得吸汁時間の長さに影響されず、獲得吸汁時間を長くしても変らなかった。このように伝搬力が徐々に低下することは循環型ウイルスの大きな特徴でもある。pea enation mosaic virus について Ehrhardt and Schmutterer (1965) はこのウイルスの伝搬力はエンドウヒゲナガアブラムシの胎と密接な関係があり、伝搬力の低下は本ウイルスの場合と同様成虫になる前の最後の脱皮期ごろから生じると報告している。また Sylvester and Richardson (1966 a, b) は同ウイルス伝搬力の保有期間は獲得吸汁時間の長短よりもむしろ獲得時のアブラムシの胎によって左右され、さらにまた温度条件でも異なると述べた。さらに Sylvester (1967) は伝搬力の低下はアブラムシの産仔虫数と排泄量に関係があると報じている。このことはアブラムシの生理状態がウイルス伝搬力に影響をおよぼしていることを示しているようである。

それではこのような伝搬力の低下が虫体内におけるウイルス量とどのような関係にあるのであろうか。この点を解明するため二つの実験を行なった。すなわち一つは再獲得吸汁 (recharging) の影響であり、他の一つは虫胎と接種力との関係である。

本実験の結果によると、伝搬能力の低下しはじめた時期のアブラムシに再びウイルスを獲得させたところ、明らかに伝搬力の回復が認められた。再獲得吸汁の実験は Freitag (1936) がヨコバイ (*Eutettix tenellus*) によって媒介される beet curly top virus で行なったのが最初であり、このウイルスは再獲得吸汁によって伝搬力の回復が認められている (Bennett and Wallace, 1938)。また Ling (1966) はヨコバイ (*Nephotettix impicticeps*) によってうつされる rice tungro virus でも同様の結果を得ている。これら両ウイルスはいずれも循環型ウイルスに属し、虫体内での増殖は認められていない。Sylvester and Richardson (1966 b) は pea enation mosaic virus についても再獲得吸汁による伝搬力の回復を認めており、菅原ら (1970 a) もジャガイモ葉巻病ウイルスについて同様の結果を得ている。しかしこれらの現象は必ずしも虫体内増殖を否定する根拠とはならないであろう。

本実験の結果、ジャガイモヒゲナガアブラムシ



第21図 ジャガイモヒゲナガアブラムシの伝搬力低下の原因