

平成22年度成績概要書

研究課題コード： 689211、未付与（公募型研究）

1. 研究成果

- 1) 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
（予算課題名：ジャガイモYウイルスN系統イムノクロマト試薬の開発、ジャガイモYウイルス（N系統）検出試薬開発）
- 2) キーワード：イムノクロマト、エライザ法、ジャガイモYウイルス、診断、ばれいしょ
- 3) 成果の要約：ジャガイモYウイルスN系統（PVY-N）に対して多検体試料を迅速に診断するエライザキット、生産現場で簡易に使用できるイムノクロマトキットを作製した。エライザキットでは判定まで3時間、イムノクロマトキットでは5分でPVY-Nを広く検出できる。一般ほ場のサンプルを用いて両キットの実用性を明らかにした。

2. 研究機関名

- 1) 担当機関・部・グループ・担当者名：中央農試・病虫部・予察診断G・堀田治邦
- 2) 共同研究機関（協力機関）：(株)ホクドー（空知農業改良普及センター南東部支所）

3. 研究期間：平成20～21年度（2008～2009）

4. 研究概要

- 1) 研究の背景 ばれいしょで最も発生の多いPVY-Nに対して高精度のモノクローナル抗体が作製されている。しかし、これら抗体は一般ほ場での診断に十分活用されていない。
- 2) 研究の目的 PVY-Nのモノクローナル抗体を用いて、ばれいしょ葉から簡易に診断できるエライザキットおよびイムノクロマトキットを開発する。

5. 研究方法

- 1) PVY-Nに対するエライザキットの開発
 - ・ねらい 多検体試料を簡易に検定できるエライザキットを開発し、実証する。
 - ・試験項目等 (1) エライザキット各種検出条件、(2) PVY-Nおよび普通系統（PVY-O）に対するエライザキットの評価、(3) 一般ほ場サンプルを用いたエライザキットの実証
- 2) PVY-Nに対するイムノクロマトキットの開発
 - ・ねらい 生産現場で活用可能なイムノクロマトキットを開発し、実証する。
 - ・試験項目等 (1) イムノクロマトキットの作製、(2) PVY-NおよびPVY-Oに対するイムノクロマトキットの評価、(3) 一般ほ場サンプルを用いたイムノクロマトキットの実証

6. 研究の成果

1) エライザキット

- (1) エライザキットに固相する抗体濃度は5 μ l/mlが最適であった。固相プレートと各種検定試薬が網羅されたエライザキットを作製した。
- (2) 検定条件は試料反応が37°Cで1時間、酵素標識抗体は200倍液で1時間、基質反応は37°Cで20分である。プレートの洗浄を含め、3時間以内で検定が可能である。
- (3) PVY-Nの罹病葉に対して10³倍希釈まで検出できた（図1）。日植防抗体との比較ではほぼ同等に検出されたが、日植防抗体で健全葉の吸光値が高かった。
- (4) 一般ほ場等のサンプルを用いた検定でPVY-Nはすべて陽性と判定され、PVY-OおよびPVY陰性サンプルでは全く反応しなかった（表1）。
- (5) 12ヶ月間冷蔵したキットを用いてもPVY-Nを有効に検出できた。

2) イムノクロマトキット

- (1) 金コロイド標識抗体のパットと捕捉抗体を塗布したメンブレンを組み合わせたイムノクロマトキットを作製した。キットには磨砕液ボトル（PBS-T、10ml）とスポイトも添付されている。
- (2) PVY-Nを5分で判定でき（図2）、罹病葉の1600倍希釈まで検出された。10ヶ月冷蔵したキットも有効に使用できる。
- (3) 一般ほ場から採取した19サンプルを用いて、生産者が自ら診断したところ、7サンプルで陽性となり、エライザ検定の結果と一致した（表2）。

*用語解説

- ・ジャガイモYウイルスN系統（PVY-N）・・・最も問題のウイルスでたばこにえそを起こす系統。
- ・エライザ法・・・プレート上で抗原抗体反応を利用して発色させ、検定する方法。
- ・イムノクロマト・・・短冊状の繊維に試験液を染み込ませ、抗原抗体反応の発色で診断する方法。

<具体的データ>

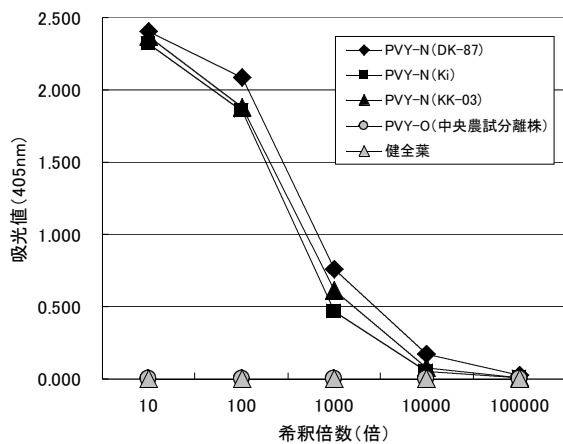


図1 PVY各系統の罹病葉における希釈濃度とPVY-Nエライザキットの反応

表1 PVY-N等の中央農試保存株におけるエライザキットの反応

No.	サンプル採取地ほか	品種およびウイルス株	吸光値405nm	判定
PVY-N陽性サンプル				
1	訓子府町	「トヨシロ」	3.462	+
2	共和町S2	「男爵薯」	3.373	+
3	共和町S5	「男爵薯」	3.413	+
4	共和町S6	「男爵薯」	3.403	+
5	長沼町①	「男爵薯」	3.490	+
6	長沼町②	「男爵薯」	3.432	+
7	たばこ接種株	DK-87	3.457	+
8	冷凍保存葉	DK-87	3.380	+
9	冷凍保存葉	Ki	3.463	+
10	冷凍保存葉	KK-03	3.454	+
PVY-Oサンプル				
11	たばこ接種株	中央農試	-0.004	-
PVY陰性サンプル				
12	共和町S1	「男爵薯」	0.022	-
13	共和町S3	「男爵薯」	-0.001	-
14	共和町S4	「男爵薯」	-0.006	-
15	長沼町②	「男爵薯」	-0.005	-
16	長沼町①	「メークイン」	-0.005	-
17	長沼町②	「メークイン」	-0.010	-
18	長沼町③	「メークイン」	0.004	-
19	中標津町	「アスタルテ」	-0.011	-
20	中標津町	不明	0.001	-



図2 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-O中央農試株、PLRV葉およびPVS葉

表2 生産者によるイムノクロマトキットの診断結果とエライザ検定結果

番号	品種名No.	生産者の判断	イムノクロマト判定	エライザ判定
1	キタアカリ2	発病株	+	PVY-N
2	ニシユタカ2	発病株	-	-
3	とうや2	発病株	+	PVY-N
4	ホッカイコガネ1	発病株	+	PVY-N
5	男爵薯	疑似症状	+	PVY-N
6	キタアカリ1	疑似症状	-(再+)	PVY-N
7	ホッカイコガネ2	疑似症状	+	PVY-N
8	ホッカイコガネ3	疑似症状	+	PVY-N
9	男爵薯	疑似症状	-	PVY-O
10	男爵薯	疑似症状	-	-
11	メークイーン	疑似症状	-	-
12	メークイーン	疑似症状	-	-
13	メークイーン	疑似症状	-	-
14	さやあかね	疑似症状	-	-
15	ニシユタカ1	疑似症状	-	-
16	ニシユタカ3	疑似症状	-	-
17	とうや3	疑似症状	-	-
18	さやあかね	健全株	-	-
19	とうや1	健全株	-	-

注) (再+) は再検定で陽性となったことを示す

7. 成果の活用策

1) 成果の活用面と留意点

- (1) エライザキットはPVY-N系統の診断に有効で、エライザ検定が実施できる機関（農業団体、普及センター等）で多検体を診断する場合等に活用できる。
- (2) イムノクロマトキットは迅速かつ簡易に検定できることから、ほ場で活用できるほか、緊急を要する診断にも対応できる。
- (3) エライザキットは（株）ホクドーより販売されている。イムノクロマトキットも同社から平成23年に販売予定である。
- (4) 両キットに用いた抗体はPVY-Oの一部ウイルス株に反応する。

2) 残された問題とその対応