

[成果情報名] カンキツのウイルス検定における ELISA 法の非特異反応の原因と対策

[要 約] カンキツウイルス病の診断方法として一般的な ELISA 法は、カンキツの種類によって非特異反応による誤判定が起こることがある。この原因は磨砕液中の付着物と考えられ、ユズやザボンの仲間に起こりやすい。

[キーワード] カンキツ、ウイルス、ELISA 法、イムノクロマト法、RT-PCR 法

[担 当] 静岡農林技研・果樹研セ・生産環境科

[連絡先] 電話 054-334-4854、電子メール kaju-kenkyu@pref.shizuoka.lg.jp

[区 分] 果樹

[分 類] 研究・参考

[背景・ねらい]

カンキツにおける温州萎縮病（原因ウイルス：SDV）や接ぎ木部異常病（同：ASGV）のウイルス診断では、ELISA 法が低コストで大量処理が可能なることから、一般的に用いられてきた。しかし、極めて迅速に強く発色する場合や調査する年によって結果が異なる場合がある。そこで、ELISA 法で陽性と判定された個体について複数の検定法で確認し、非特異反応を起こす可能性のあるカンキツの種類を特定するとともに、原因と防止対策を明らかにする。

[成果の内容・特徴]

- 1 春の新梢を材料として ELISA 検定で陽性と診断された個体を、ELISA 法、イムノクロマト法、RT-PCR 法で再検定すると、イムノクロマト法と RT-PCR 法の結果は一致し、ELISA 法では異なることが多い（表 1）。
- 2 ELISA 法で非特異反応を示す種類をカンキツの分類から見ると、ザボンやユズ、ダイダイの仲間で多い（表 1）。
- 3 強い非特異反応を起こす個体では、磨砕液を ELISA プレートに分注し、30℃で 2 時間処理、さらに 4℃で夜越した後、洗浄するとウェルの底に不透明な付着物が認められる（図 1）。
- 4 磨砕液はポリプロピレン製の遠心管に入れて遠心した後、4℃で冷蔵すると、非特異反応を軽減できる（表 2）。
- 5 ELISA プレートへの付着量は、洗浄後の吸光度で測定でき、非特異反応による発色と相関がある（表 2）。
- 6 ELISA 法では非特異反応を防ぐことができない場合があるため、非特異反応を起こしやすい種類を試料とする場合、イムノクロマト法や RT-PCR 法を用いる。

[成果の活用面・留意点]

- 1 SDV ではイムノクロマトキットが利用できる。ASGV は試作段階にある。
- 2 イムノクロマトキットは、ELISA 法に比べキットのコストが 1.5 倍と高くなるが、労力が半分以下になるため、実用的である。

[具体的データ]

表1 カンキツウイルスの検定方法の違いが判定結果に及ぼす影響
(RT-PCR法で陰性となった個体のみ抜粋)

ウイルス名	品種 または種類	1回目		2回目				備考 柑橘の分類 (田中の分類より)	
		エライザ法		エライザ法		クロマト法			RT-PCR法
		OD ₄₀₅	判定*	OD ₄₀₅	判定*	発色 (1~8)	判定**		
SDV	クレメンチン	0.42	+	1.77	+	1	-	-	ミカン区
	谷川文且	2.38	+	0.95	+	1	-	-	ザボン区
	麻豆文且	0.13	-	0.59	+	1	-	-	〃
	大橘	1.78	+	1.54	+	1	-	-	ダイダイ区
	舟床蜜柑	0.68	+	2.87	+	1	-	-	〃
	イーチャンエンシス	1.57	+	3.44	+	1	-	-	ユズ区
	イーチャンレモン	1.62	+	4.07	+	1	-	-	〃
	多田錦	0.38	+	0.53	+	1	-	-	〃
	花柚	1.17	+	0.16	-	1	-	-	〃
	スダチ	0.96	+	0.18	-	1	-	-	〃
	サムソンタンゼロ	0.38	+	0.14	-	1	-	-	ダイダイ区×ミカン区
ASGV	グレープフルーツ	0.37	+	0.13	-	1	-	-	ザボン区
	イーチャンレモン	2.10	+	0.35	+	1	-	-	ユズ区

* 60分後に吸光度(波長405nm)を測定し、陰性試料の2倍以上を+と判定

** 15分後に、色調表により、目視で発色程度を1~8の9段階で識別し、4.5以上を+と判定

表2 SDV 検定試料磨砕液の冷蔵によるウェルへの付着量の減少
とELISA法による診断

品種	SDV 感染	磨砕液 冷蔵時間	磨砕液の付着*		発色用基質添加後時間			
			OD ₄₀₅	有無	60min		90min	
					OD ₄₀₅	判定**	OD ₄₀₅	判定**
イーチャンレモン	-	0hr	0.74	有	3.80	+	3.73	+
宇和ポメロ	-		0.13	有	0.40	+	0.45	+
青島温州	+		0.05	無	0.81	+	1.15	+
青島温州	-		0.05	無	0.08	-	0.08	-
イーチャンレモン	-	4hr	0.61	有	2.51	+	2.93	+
宇和ポメロ	-		0.04	無	0.11	-	0.13	±
青島温州	+		0.04	無	0.86	+	1.22	+
青島温州	-		0.04	無	0.08	-	0.08	-

* ELISAプレートに磨砕液処理し洗浄後、吸光度(波長405nm)を測定し、非特異反応を起こさないことが確認されている対照の2倍以上を付着有りと判定

** 60分後に吸光度(波長405nm)を測定し、陰性試料の2倍以上を+、1.5倍以上2倍未満を±と判定



図1 磨砕液処理後に見られる付着物(下側2ウェル)

[その他]

研究課題名：温州萎縮病等ウイルス病汚染ほ場の管理技術の確立

予算区分：国庫委託(実用技術)

研究期間：2007~2009年度

研究担当者：影山智津子、加藤光弘