

-----  
[ 成果情報名 ] 酵素結合抗体法 (ELISA) における 3 種カンキツウイルスの同時検定法  
[ 要約 ] 温州萎縮ウイルス (SDV) およびカンキツモザイクウイルス (CiMV) ならびにリンゴステムグルーピングウイルス (ASGV) の各固相抗体および酵素標識抗体を混用して ELISA 検定すると、1 回の操作で 3 種、2 種またはいずれか 1 種の保毒の有無が判定できる。この方法では、保毒率が 5 % 程度の場合、1 種ずつ個別に検定する現行法の約 1 / 3 の検査回数で 3 種のウイルス診断が可能となる。

[ キーワード ] カンキツ、E L I S A、同時検定、温州萎縮ウイルス、リンゴステムグルーピングウイルス、カンキツモザイクウイルス

[ 担当部署 ] 果樹苗木分場・果樹苗木チーム

[ 連絡先 ] 0943-72-2243

[ 対象作物 ] 果樹

[ 専門項目 ] 病害虫

[ 成果分類 ] 技術改良

-----

[ 背景・ねらい ]

本県は、全国カンキツ苗木の約 70 %、約 600 万本を生産している。健全なカンキツ苗木を供給するために、年間約 3,000 検体のカンキツウイルス検査を実施している。従来は 1 種類毎に検定を行っているが、多大な労力や時間等を必要とする。そこで、SDV および SDV 近縁ウイルスである CiMV ならびに ASGV を対象に、酵素結合抗体法 (ELISA) において、検定労力や時間等の削減を図るための手法を開発する。

[ 成果の内容・特徴 ]

- 1 . 固相抗体として ASGV、SDV、CiMV 共に濃度 500 倍を混合して使用し、酵素標識抗体として 3 ウイルスとも濃度 700 ~ 1,000 倍で混合使用することで、3 種、2 種またはいずれか 1 種の保毒の有無が判定できる (表 1)。
- 2 . 3 ウイルスの検出限界は CiMV 単独保毒の場合で、磨砕サンプル希釈濃度 500 倍程度であり、通常は 10 倍希釈濃度で検定を行っていることから本方法は使用可能である (表 1)。
- 3 . 今回開発した方法を活用すると、保毒率 5 % のカンキツ母集団の検定回数は現行法の約 60 % 減となり、大幅に労力、資材等が低減できる (表 2)。

[ 成果の活用面・留意点 ]

- 1 . 本県の果樹ウイルス検定事業における簡便なカンキツウイルスの診断に活用する。
- 2 . ELISA に使用するサンプルは、従来通り発芽して展葉する前の新梢を用いる。

[ 具体的データ ]

表1 ASGV、SDVおよびCiMVの同時検出程度

サンプル割合		サ ン プ ル 希 釈 倍 数 ( 倍 )					
		30	60	120	240	480	960
ASGV 1 :SDV 1: CiMV 1	保毒	1386	1382	1404	1067	714	486
	フリー	47	47	52	43	43	47
	吸光度倍率	29.5	29.4	27.0	24.8	16.6	10.3
ASGV1 :SDV 1	保毒	1330	1183	1185	857	578	403
	フリー	47	47	52	43	43	47
	吸光度倍率	28.3	25.2	22.8	19.9	13.4	8.6
単独ASGV	保毒	349	441	492	338	235	157
	フリー	47	47	52	43	43	47
	吸光度倍率	7.4	9.4	9.5	7.9	5.5	3.3
単独SDV	保毒	849	783	707	581	400	285
	フリー	47	47	52	43	43	47
	吸光度倍率	18.1	16.7	13.6	13.5	9.3	6.1
単独CiMV	保毒	391	292	264	180	129	95
	フリー	47	47	52	43	43	47
	吸光度倍率	8.3	6.2	5.1	4.2	3.0	2.0

- 注 1) 固相抗体濃度 : ASGV、SDV、CiMV 各500倍  
 2) 酵素標識抗体濃度 : ASGV、SDV 各1,000倍 ; CiMV 700倍  
 3) 発色時間 : 0.5時間  
 4) 吸光度 : 実数 × 1,000  
 5) サンプル濃度 : 各ウイルス30倍希釈  
 6) 吸光度倍率 : 3倍以上を網掛け  
 7) 保毒の有無の判定基準 : 吸光度倍率3倍以上

表2 3ウイルス同時検定と100検体数当たり検定数、検定削減率

検定方法	保毒率 (%)	検定検体数	検定数削減率 (%)
新検定法	1	103	65.7
	5	115	61.7
	10	130	56.7
従来法	-	300	0.0

[ その他 ]

研究課題名 : カンキツウイルス病の大量検定法および簡易診断キットの開発  
 予算区分 : 国庫受託  
 研究期間 : 平成18年度 (平成16~18年)  
 研究担当者 : 草野成夫、栗原実

