

## イネ縞葉枯ウイルス保毒虫検定における DAS-ELISA 法とその他の診断法の比較

一木 (植原) 珠樹†・柴 卓也\*・上野 敬規

笹谷 孝英・早野 由里子・樋口 博也‡

農業・食品産業技術総合研究機構中央農業総合研究センター

Evaluation of the DAS-ELISA as a Detection Method for Rice stripe virus from Its Vector Insect, Small Brown Planthopper, *Laodelphax striatellus*. Tamaki UEHARA-ICHIKI,† Takuya SHIBA,\* Takanori UENO, Takahide SASAYA, Yuriko HAYANO and Hiroya HIGUCHI‡‡ NARO Agricultural Research Center; 3-1-1 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8666, Japan. *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 57: 113-116 (2013)

**Key words:** ELISA; Rice stripe virus; *Laodelphax striatellus*

ヒメトビウンカ *Laodelphax striatellus* (Fallén) が媒介するイネ縞葉枯ウイルス Rice stripe virus (RSV) が原因となるイネの縞葉枯病は、1960年代に東南アジアの水田で広く発生し、東南アジアの食料安定生産上大きな脅威となった。当時、日本においても約65万haの水田で縞葉枯病が発生したが、ヒメトビウンカの防除や縞葉枯病抵抗性品種の継続作付け等により、その発生は沈静化した。近年、中国・韓国では薬剤抵抗性ヒメトビウンカの出現により縞葉枯病が多発し、日本においても縞葉枯病の発生面積（農林水産省消費・安全局農産安全管理課、植物防疫課、2010）やヒメトビウンカのRSV保毒率が増加傾向にあり、本病が再興する兆候がある。媒介虫の薬剤抵抗性の発達（Sanada-Morimura et al., 2011）に加えて、温暖化の進行による媒介虫発生時期の変化や分布域の拡大（Yamamura and Yokozawa, 2002）により本病による被害が深刻化する懸念があり、国内における本病の発生および被害の実態の把握と被害回避戦略の提示が早急に求められている。

媒介虫であるヒメトビウンカのRSV保毒率を詳細に調査することが本病の発生対策や蔓延予測を行う上で不可欠である。2000年頃までは、発生地域の防除所等では圃場から採集したヒメトビウンカのRSV保毒率の調査法は、RSV粒子に対する抗体を利用したラテックス法（大村ら、1983）が一般的に用いられていた。しかし、Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA法、酵素結合抗体法)（高橋、1988）やReverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)法およびReverse Transcription Loop-mediated isothermal amplification of DNA (RT-LAMP)法（Notomi et al., 2000）等、ウイルスの検出技術の開発・発達に伴い、国内各県の防除所等で行われるRSV保毒率検定法も、従来のラテックス法を使用し続け

る地域、ELISA法を採用する地域等、全国的に手法が統一されていない状況になっている。現状のままでは地域ごとの調査結果を単純に比較・検討できない等の問題があるため、全国的に統一した保毒虫検定法の確立が望まれる。

我々の研究グループではヒメトビウンカ体内のRSVを検出する際にDouble antibody sandwich-ELISA (DAS-ELISA)法を常用している。ELISA法は、対象ウイルス粒子または粒子を構成するタンパク質に対する抗体を用いてウイルスを検出する手法で、低コスト、優れた検出感度、特異性、結果の明瞭性、および一度に多試料の検定が可能などの優れた特徴があり、ウイルスの検出法として様々な分野で幅広く利用されている。しかしながら、各県の防除所等でRSV保毒率を調査する際は必ずしもELISA法が使用されていない。その理由の一つは、以前から用いられてきたラテックス法との比較が十分になされておらず、これまでに蓄積されたデータとの継続性が不明確なためである。そこで、DAS-ELISA法と、従来から使用されているラテックス法およびRT-PCR法とRT-LAMP法とを比較し、DAS-ELISA法がヒメトビウンカのRSV保毒虫検定の標準的な手法となり得るか否かを検討した。報告に先立ち、ラテックス法のご指導とご助言を賜った渡辺正幸氏（茨城県病害虫防除所）に厚く感謝の意を表す。本研究は農林水産省委託プロジェクト研究「気候変動に対応した循環型食料生産等の確立のための技術開発」の成果である。

## 材料と方法

### 供試虫

中央農業総合研究センターにおいて1980年から300世代以上にわたって杉本（1981）の方法に準じて飼育・維持しているヒメトビウンカのRSV保毒系統を供試した。なお、本実験供試前の保毒虫率は60%程度であった（DAS-ELISA法による）。また、RSVを保毒していないヒメトビウンカを同様に維持し、健全虫として用いた。

### 4種の検出法の比較

DAS-ELISA法とラテックス法の比較には、RSV保毒系統から雄成虫16個体、雌成虫16個体および4～5齢幼虫24個体を供試した。また、非感染個体として健全虫6個体（雄成虫、雌成虫および幼虫各2個体）を供試した。虫体を頭部から腹部に向けて縦に切断し、半分をラテックス法に、残り半分をDAS-ELISA法でのウイルス検出に使用した。

DAS-ELISA法、RT-PCR法、RT-LAMP法の比較には、上述した62検体に加え、RSV保毒系統から雄成虫34個体、雌成虫34個

日本応用動物昆虫学会誌（応動昆）第57巻 第2号：113-116（2013）

<http://odokon.org/>

\* E-mail: takuyas@affrc.go.jp

† 現在 農業生物資源研究所

‡ 現在 農業・食品産業技術総合研究機構九州沖縄農業研究センター

†† Present address: National Institute of Agrobiological Sciences, 2-1-2 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan.

‡‡ Present address: NARO Kyushu Okinawa Agricultural Research Center, 2421 Suva, Koshi, Kumamoto 861-1192, Japan.

2012年6月6日受領 (Received 6 June 2012)

2013年2月6日登載決定 (Accepted 6 February 2013)

DOI: 10.1303/jjaez.2013.113

体および幼虫 26 個体を追加した 156 検体で比較試験を行った。ELISA 用マイクロプレートのウェル内で 50  $\mu$ l の PBS-T [0.5% の Tween 20 を含むリン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.2, 2.8mM リン酸二水素ナトリウム二水和物, 7.2mM リン酸水素二ナトリウム・12 水, 150mM 塩化ナトリウム)] で虫を磨砕した後, 10  $\mu$ l を分取し RT-PCR 法と RT-LAMP 法に, ウェル内の残液 40  $\mu$ l を DAS-ELISA 法に使用した。

#### DAS-ELISA 法による検出

RSV ポリクローナル抗体利用 DAS-ELISA 用セット (日本植物防疫協会) を使用し, 添付説明書の方法に準じて行った。すなわち, 500 倍の濃度に希釈した一次抗体液をマイクロプレート 1 ウェルあたり 200  $\mu$ l ずつ分注して 4°C で一晩静置した後, PBS-T で 3 回洗浄した。次いで, あらかじめ 50  $\mu$ l の PBS-T を添加した各ウェルに虫体を入れプラスチック棒で磨砕した。後述の遺伝子診断法に用いるため, 各ウェルの磨砕液から直ちに 10  $\mu$ l ずつを取り分け, 実験に使用するまで -70°C で保存した。残り 40  $\mu$ l ずつの試料が入ったマイクロプレートは 37°C で 2 時間静置し, プレートを PBS-T で 3 回洗浄後, 500 倍に希釈した二次抗体液を各ウェルに 200  $\mu$ l ずつ添加した。37°C でさらに 2 時間静置した後, プレートを PBS-T で 5 回洗浄し, 基質溶液 (10% ジエタノールアミン溶液 (pH 9.8) に *p*-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム 1mg/ml を混合したもの) を 200  $\mu$ l ずつ分注し, 室温で約 1 時間反応させた。診断は, 肉眼観察および 405 nm の波長での吸光度をプレートリーダー (Bio-Rad 社, Model550) で測定した。

#### ラテックス法による検出

RSV 抗体感作ラテックス液 (日本植物防疫協会) を用い, 茨城県病害虫防除所の渡辺正幸氏より提供された手法に準じて行った。すなわち, 分割した虫体の片方をマイクロプレートに入れ, すりつぶした後, ラテックス液 50  $\mu$ l を添加し, 37°C で 1 時間振盪した後, 肉眼によりラテックスの凝集を観察し, ウイルスの有無を判定した。

#### RT-PCR 法

OneStep RT-PCR kit (QIAGEN 社) を使用し, 添付されている製品説明書の手法で行った。なお RSV の遺伝子を検出するために, 著者はウイルス外被タンパク質遺伝子を標的にプライマーを設計した (プライマーの配列: フォワードプライマー: 5'-TGTGAGAGGCACTGG-3', リバースプライマー: 5'-TTCACCAACCCGCTG-3', 想定 PCR 産物のサイズは約 705bp)。また鋳型とする RNA 試料として, DAS-ELISA 法による検出の過程で取り分けた磨砕液を超純水で 50 倍に希釈した溶液を試料として使用した。反応産物 3  $\mu$ l をアガロースゲル電気泳動し, 増幅の有無を確認した。

#### RT-LAMP 法

Loopamp RNA 増幅試薬キットおよび蛍光・目視検出試薬 (栄研化学株式会社) を使用し, キットに付属の製品説明書に準じて実施した。使用した RSV-FIP, RSV-BIP, RSV-F3, RSV-R3 の各プライマーは, 既報に従った (Le et al., 2010)。鋳型とする RNA 試料として, DAS-ELISA 法による検出の過程で取り分けた虫体の PBS-T 磨砕液を超純水で 50 倍に希釈した溶液を使用した。反

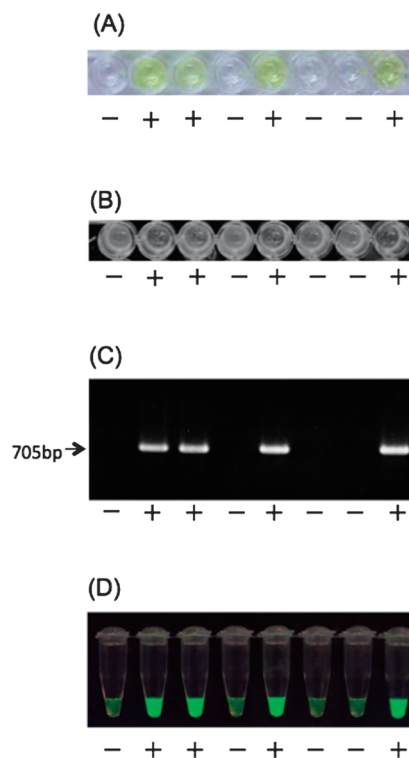
応後, 紫外線照射による蛍光観察により検出の有無を確認した。

## 結 果

4 種の診断法によるヒメトビウンカからの RSV の検出例を第 1 図に示した。DAS-ELISA 法では, 黄色の発色により肉眼で陽性と判定したものについては吸光値の平均が  $2.59 \pm 0.92$  (平均  $\pm$  標準偏差) であったのに対し, 肉眼で発色が確認できないことから陰性と判定したものの吸光値の平均は  $0.12 \pm 0.03$  であった。ヒメトビウンカの雌雄や虫齢に関わらず明瞭な発色の差が見られ, 肉眼による陽性・陰性の判定が容易であった。また, RT-PCR 法と RT-LAMP 法についても, DAS-ELISA 法と同様に明瞭な結果が得られ, 肉眼による結果の判定が容易であった。一方, ラテックス法は凝集反応が不鮮明で肉眼での判定に時間を要した。

DAS-ELISA 法とラテックス法の比較試験では, 供試した 62 個体中 60 個体で陰性および陽性の反応結果が一致した。DAS-ELISA 法で陰性と判断されラテックス法で陽性と判断されたもの, DAS-ELISA 法で陽性と判断されラテックス法で陰性と判断されたものが, それぞれ 1 個体ずつ認められた。しかしながら, どちらの方法でもほぼ同等の結果が得られることが明らかになった (第 1 表)。

DAS-ELISA 法と RT-PCR 法および RT-LAMP 法の比較では, 156 個体中 145 個体でそれぞれの手法での陽性・陰性の結果が完



第 1 図 4 種の検出法によるヒメトビウンカからのイネ縞葉枯ウイルス (RSV) の検出結果の例  
DAS-ELISA 法 (A), ラテックス法 (B), RT-PCR 法 (C) および RT-LAMP 法 (D) において同じ検体を検出したときの肉眼による診断例 (+: 陽性, -: 陰性)。

第1表 DAS-ELISA法とラテックス法によるRSVの検出結果の比較

		ラテックス法	
		+	-
DAS-ELISA法	+	<b>29</b>	1
	-	1	<b>31</b>

+: 陽性, -: 陰性, 太字は一致した結果が得られた個体数.

全に一致した. いずれの方法でも雌雄や虫齢に関わらずほぼ同等の結果が得られた(第2表).

なお, 健全虫については, 検討した4種の診断法すべてで陰性を示し, 偽陽性は認められなかった(データ非掲載).

### 考 察

ウイルスの検出技術は目的に応じ多様化しており, 調査対象となる検体内で非常に低濃度に存在するウイルスでも検出可能な高感度な技術が開発されている. しかし, 農業現場においては, コストを抑えながら被害実態を正確に把握し得る診断を行う必要性, 長期にわたる病害の年次変動を把握するために従来の手法で得られた結果との一致性・継続性を求められることから, 新たなウイルス検出技術が開発されても導入までには慎重に検討を重ねる必要がある.

本研究において, 同一のサンプルを用いて行ったDAS-ELISA法とラテックス法の診断結果の比較・検討により, DAS-ELISA法によるヒメトビウンカからのRSVの検出は, ラテックス法とほぼ同様の結果が得られることが明らかになった. この結果は, 保毒虫検定法をラテックス法からDAS-ELISA法に切り替えた場合でも, データの継続性に大きな問題が生じないことを示している. 加えて, DAS-ELISA法は, 発色が明瞭であることから検査人の経験に左右されず, 肉眼でも正確かつ容易に結果の診断ができるほか, マイクロプレートリーダーを用いて吸光度を測定することにより診断作業の機械化と診断結果の定量化も可能であるなど, ラテックス法の欠点である判定の難しさが無い. これらのことから, RSV保毒虫検定法としてラテックス法を使用している防除所等にとっては, DAS-ELISA法への切り替えによって得られ

るメリットは大きいと考えられる.

ウイルス遺伝子を検出する診断法は, 一般的に, 抗原抗体反応を利用した方法より高感度であることが知られているが(Niimi et al., 2003; Usta et al., 2005)ヒメトビウンカからのRSVの検出に関してはDAS-ELISA法の結果と遺伝子診断法の結果は90%以上一致した. RSVは経卵伝染して虫体内で増殖する永続伝搬性ウイルスであるため, 今回供試したヒメトビウンカはふ化直後からRSVを保持しており, 生育期間を通して虫体内のウイルス濃度は非常に高い水準に達していたと考えられる. このような理由からDAS-ELISA法でも遺伝子診断法と同等の判別能が発揮されたと推測される.

今回報告したDAS-ELISA法では, 虫検体の磨砕液を通常の50~100倍まで希釈してもウイルスを検出できるよう十分に余裕のある条件設定がなされている(一木ら, 未発表). したがって, ウイルス保毒量のばらつきを伴う野外のヒメトビウンカサンプルに対しても, このDAS-ELISA法は頑健であると示唆される. 加えて, 虫検体をマイクロプレートのウェル内で磨砕することより, 一日あたり500検体/人の診断を行うことが可能で, 比較したほかの手法と遜色ない速さで大量のサンプル処理が可能であるなど迅速性に優れるほか, ウェル内でのサンプル磨砕の後は洗浄と静置を繰り返すのみと簡便性にも優れた方法である. また, 今回使用した試薬などを販売する各社のウェブサイトで公開されている情報をもとに算出した1検体あたりの試薬費は, RT-PCR法570円, RT-LAMP法495円, ラテックス法60円に対してDAS-ELISA法は18円であり, 経済性にも優れている.

今回の実験で, DAS-ELISA法は, ヒメトビウンカからのRSV検出においては, 古くから実施されているラテックス法や優れた検出感度を持つとされているRT-PCR法およびRT-LAMP法等の遺伝子診断法と比較して, ほぼ同等の結果が得られることが明らかになった. DAS-ELISA法の簡便性, 経済性および明瞭性等の長所に加え, 今回明らかにしたラテックス法や遺伝子診断法との検出結果との一致は, 現場におけるRSV保毒虫率を調査する手法としてDAS-ELISA法の採用の妥当性を示したものと見える. 本報告が, 保毒虫検定法としてラテックス法を採用する防除所等において, DAS-ELISA法への切り替えを検討する際の考慮されるべき参考資料となるものと期待する.

第2表 DAS-ELISA法とRT-PCR法, RT-LAMP法によるRSVの検出結果の比較

雄成虫				雌成虫				幼虫			
個体数	ELISA <sup>a</sup>	PCR <sup>b</sup>	LAMP <sup>c</sup>	個体数	ELISA	PCR	LAMP	個体数	ELISA	PCR	LAMP
<b>31</b>	+	+	+	<b>29</b>	+	+	+	<b>27</b>	+	+	+
<b>16</b>	-	-	-	<b>18</b>	-	-	-	<b>24</b>	-	-	-
1	+	-	-	2	-	-	+	1	-	-	+
1	-	-	+	2	+	-	+				
1	-	+	+	1	+	+	-				
2	+	-	+								
一致率	47/52			47/52				51/52			

+: 陽性, -: 陰性, 太字は3つの手法で一致した結果が得られた個体数.

<sup>a</sup>: DAS-ELISA法, <sup>b</sup>: RT-PCR法, <sup>c</sup>: RT-LAMP法.

## 引用文献

- Le, D. T., O. Netsu, T. Uehara-Ichiki, T. Shimizu, I. R. Choi, T. Omura and T. Sasaya (2010) *J. Virol. Methods* 170: 90–93.
- Niimi, Y., D. Han, S. Mori and H. Kobayashi (2003) *Sci. Hort.* 97: 57–63.
- 農林水産省消費・安全局農産安全管理課, 植物防疫課監修 (2010) 農薬要覧 2010 年版. 日本植物防疫協会, 東京, pp. 562–563. [Plant Protection Division and Plant Products Safety Division, Food Safety and Consumer Affairs Bureau, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries (2010) *Noyaku Yoran 2010*. Japan Plant Protection Association, Tokyo, pp. 562–563.]
- Notomi, T., H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino and T. Hase (2000) *Nucleic Acids Res.* 28: 472–481.
- 大村敏博・日比野啓行・宇杉富雄・井上 斎・守中 正・鶴町 昌市・土崎常男・齊藤康夫 (1983) *日植病報* 49: 441–442.
- [Omura, T., H. Hibino, T. Usugi, H. Inoue, T. Morinaka, M. Tsurumachi, T. Tsuchizaki and Y. Saito (1983) *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 49: 441–442.]
- Sanada-Morimura, S., S. Sakumoto, R. Ohtsu, A. Otuka, S. Huang, D. V. Thanh and M. Matsumura (2011) *Appl. Entomol. Zool.* 46: 65–73.
- 杉本 渥 (1981) *応動昆* 25: 77–83. [Sugimoto, A. (1981) *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 25: 77–83.]
- 高橋義行 (1988) *植物防疫* 42: 88–92. [Takahashi, Y. (1988) *Plant Prot.* 42: 88–92.]
- Usta, M., H. M. Sipahioglu and B. Polat (2005) *Tarım Bilimleri Dergisi* 15: 153–158.
- Yamamura, K. and M. Yokozawa (2002) *Appl. Entomol. Zool.* 37: 181–190.