

酵素抗体法(ELISA)および迅速免疫ろ紙検定法(RIPA)による 核多角体病ウイルス(NPV)と伝染性軟化病ウイルス(IFV)の 検出

誌名	群馬県蚕業試験場研究報告 = Bulletin of the Gunma Sericultural Experiment Station
ISSN	13412981
著者	小山, 千明
巻/号	2号
掲載ページ	p. 27-30
発行年月	1996年3月

酵素抗体法 (ELISA) および迅速免疫ろ紙検定法 (RIPA) による 核多角体病ウイルス (NPV) と伝染性軟化病ウイルス (IFV) の検出

小山 千明
(群馬県蚕業試験場)

Detection of NPV and IFV by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Rapid Immunofilter Paper Assay (RIPA).

Chiaki KOYAMA
(Gunma Sericultural Experiment Station)

要 旨

高精度で大量な検体について、蚕病判定ができる酵素抗体法 (ELISA) と簡易かつ短時間にウイルス判定が可能な迅速免疫ろ紙検定法 (RIPA) について核多角体病ウイルス (NPV) と伝染性軟化病ウイルス (IFV) の検出を試みた。

1. NPVや膿病多角体、感染組織を抗原として、ELISAでウイルスまたはウイルス関連物質の検出を行った結果では、多角体濃度が $10^5 \sim 10^6$ 個/ml以上、多角体溶解液のタンパク量が $1.6 \mu\text{g/ml}$ (10^3 多角体/ml) 以上で検出可能であった。また、感染後48~72時間でウイルスが検出できた。
2. IFV感染蚕の糞を抗原としてELISAを行った結果、糞中の総タンパク量が $1.3 \mu\text{g/ml}$ (1万倍希釈) 以上でウイルスの検出が可能であった。また、感染後72~96時間で、糞中からウイルスが検出できた。
3. RIPAによるNPVの検出は、反応が明瞭でなく検出困難であったが、IFV感染蚕糞の50~100倍希釈液においては、明瞭な反応が認められた。

緒 言

近年の蚕病発生は、人工飼料育の普及や徹底した防疫管理技術によって繭生産量の約1%にとどまっている。しかし、異常気象や高齢化などによる生産意欲の減退、多回育による蚕期の重複に起因した違作は後が絶えない。

蚕病の中でも膿病などのウイルス病は薬剤抵抗性が高く、不活化されにくく養蚕農家蚕室での発生も多い。また、今までの蚕病診断は、病徴によって行われていたので、その対策が遅れてしまう状況が多かった。そのため、早期診断

が可能で、精度が高く、簡便なウイルス診断方法の確立が重要な課題となっている。

そこで、このような目的にあった診断方法として酵素抗体法 (ELISA) および迅速免疫ろ紙検定法 (RIPA) による血清学的診断方法を検討したので報告する。

本実験を行うにあたり、血清学的診断の手法についてご教示いただいた日本植物防疫協会研究所高橋義行博士、河野敏郎氏に感謝の意を表す。

試験の方法

1. 供試ウイルスおよび抗血清

NPVおよびIFVは群馬県内の養蚕農家で発生した病蚕から分離したウイルスを維持増殖して用いた。抗血清は膿病多角体溶解液の粗精製液およびIFV純化ウイルスを家兔に免疫して作製した。得られた抗血清の力価は重層法で128倍であった。抗血清はゲルろ過（アフィゲルプロテインA MAPS-II KIT バイオラド社）によりIgGを1mg/mlに調製した。

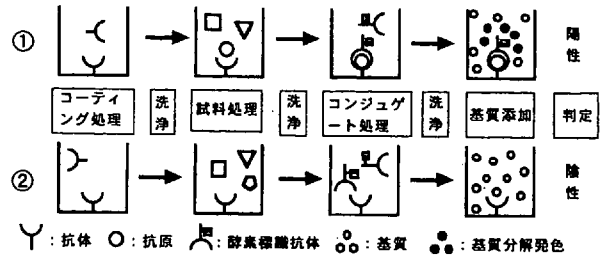
2. ELISAおよびRIPA

ELISAは、CLARK AND ADAMS (1977) の二重抗体法 (double antibody sandwich ELISA) の方法に従った (第1図)。反応は吸着抗体が5℃・一夜、抗原が37℃・2時間、酵素標識抗体が37℃・3時間静置して行った。洗浄後、基質を加えて25℃・30分後に肉眼 ($A_{415} \geq 0.3$) とオートリーダー (MTP120) で測定した。吸着γ-グロブリンの希釈倍数は、500倍 ($2 \mu\text{g/ml}$)、酵素標識抗体の希釈倍数は、400倍とした。

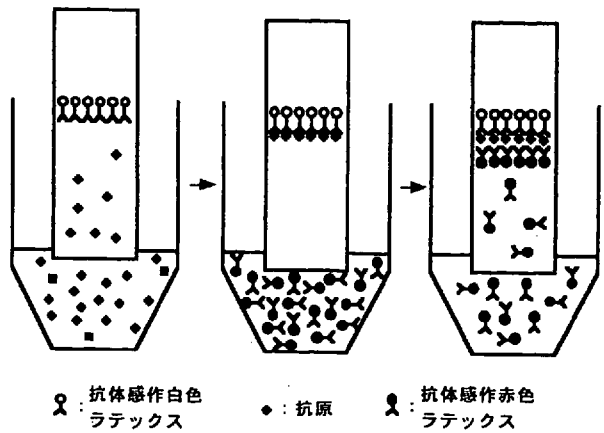
RIPAは、TSUDAら (1992) の方法に従った。ラテックスに感作させる抗体濃度は、白色ラテックス (G24103 日本合成ゴム社)、赤色ラテックス (G6301R 日本合成ゴム社) とともにγ-グロブリン $50 \mu\text{g/ml}$ とした。ウイルス検出にあたっては、ガラス繊維ろ紙GF/A (ワットマン社) に透明シールで裏打ちして、幅5mm、長さ8cmに切り、固相とした。下端から1.5cmにウイルス抗体を感作した白色ラテックス約 $10 \mu\text{g}$ を横一杯に置いた。感作赤色ラテックスは、50倍に希釈して供試した。検定は2段階法 (亀谷、1993: 第2図) で行った。

3. 検定材料

検定には、NPV多角体溶解液の粗精製液と感染組織の希釈液、IFVの粗精製液と感染組織・糞の希釈液を用いた。



第1図 二重抗体法 (ELISA) の概略



第2図 迅速ろ紙検定法 (二段階法) の手順

結 果

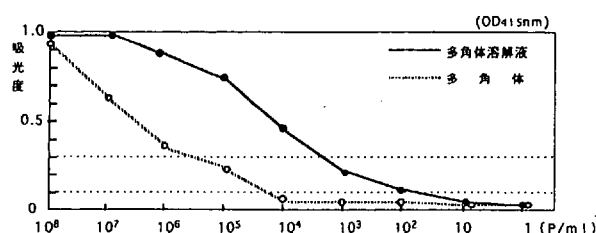
1. ELISAによるNPVおよびIFVの検出

二重抗体法によるNPV多角体とアルカリ溶解液を希釈したもののウイルス検出状況は (第3図)、反応30分後の測定条件で多角体は、肉眼で 10^6 多角体/ml、オートリーダーで $10^5 \sim 10^4$ 多角体/mlの濃度まで検出できた。また、多角体溶解液は、肉眼で $10^4 \sim 10^4$ 多角体/ml ($1.6 \mu\text{g/ml}$)、オートリーダーで $10^3 \sim 10^2$ 多角体/mlまで検出可能であった。

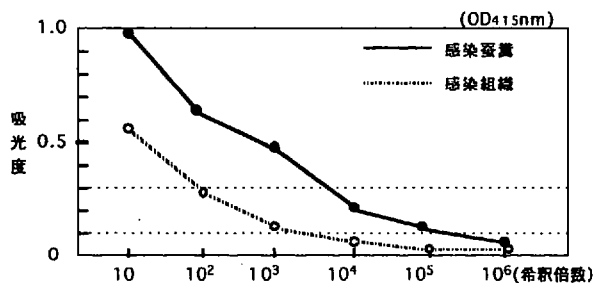
NPVに感染、発病した組織の磨碎希釈液によるウイルス検出状況は (第4図)、オートリーダーで 10^3 倍 $\sim 10^4$ 倍の希釈倍数まで判定可能であった。

また、蚕にNPVを添食した後の経時的な組織の磨碎希釈液 (200倍) からのウイルス検出

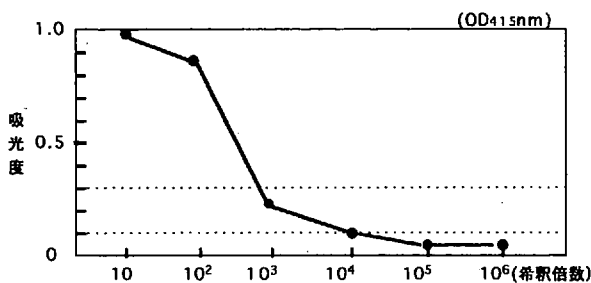
酵素抗体法 (ELISA) および迅速免疫ろ紙検定法 (RIPA) による核多角体病ウイルス (NPV) と伝染性軟化病ウイルス (IFV) の検出



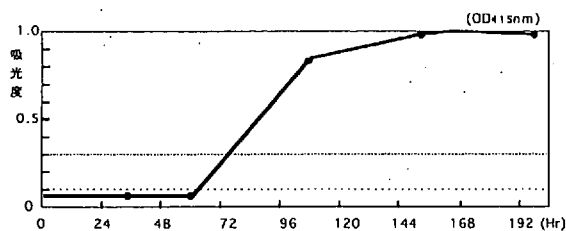
第3図 NPV多角体および溶解液の希釈とNPV検出状況



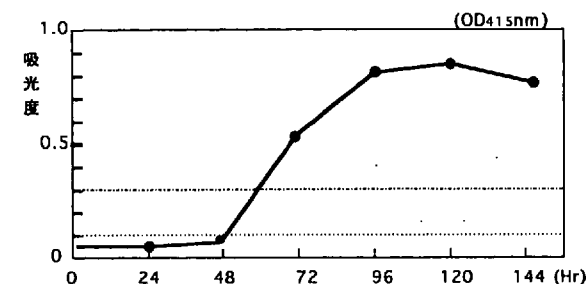
第6図 IFV感染組織および感染蚕糞の希釈とIFV検出状況



第4図 NPV感染組織の希釈とNPV検出状況



第7図 IFV感染蚕糞添食後の時間とIFV検出状況



第5図 多角体添食後の時間とNPV関連物質の検出状況

第1表 抗原希釈とRIPAによるウイルス検出状況

希釈倍数	NPV	IFV
×50	+	++
×100	±	++
×200	-	±
×400	-	-
×800	-	-

状況は (第5図)、添食後48~72時間後にはウイルスまたはウイルス関連物質の検出ができた。

一方、IFVに感染した蚕の組織と糞の希釈におけるウイルス検出状況は (第6図)、感染組織は、肉眼で100倍、オートリーダーで 10^3 倍ぐらいまで検出でき、感染蚕糞では、肉眼で 10^3 ~ 10^4 倍希釈 (総タンパク量 $1.3\mu\text{g}$)、オートリーダーで 10^4 ~ 10^5 倍希釈で検出できた。

また、蚕にIFVを添食した後の経時的な蚕糞磨砕希釈液 (200倍) からのウイルス検出状況 (第7図) は、72時間後には反応が現れ、ウイルスが検出された。

2. RIPAによるNPVおよびIFVの検出

NPV感染組織の50倍希釈液では、明瞭では

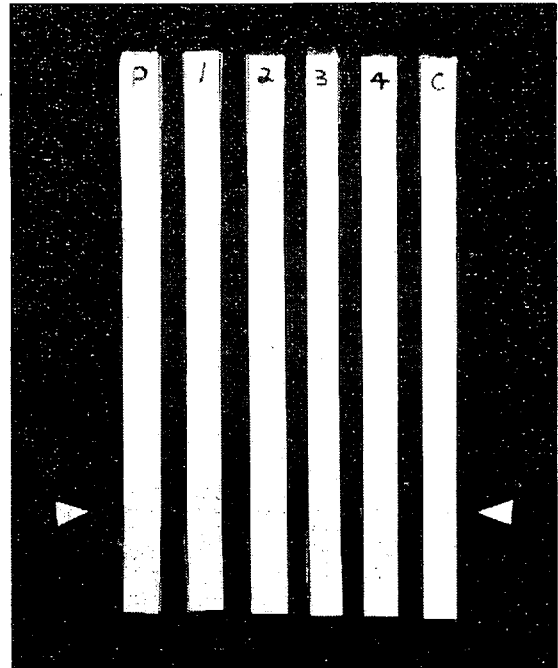
なかったが、薄くバンドが現れ、100倍以降は反応は陰性であった (第1表)。また、IFV感染蚕糞の希釈液では、50、100倍液において明瞭にバンドが現れた (第8図、第1表)。非特異反応は、認められなかった。

考 察

ELISAやRIPAなどの血清学的手法を用いた診断法は、植物ウイルスの診断や妊娠検査薬などに実用化されている。蚕においても寒天ゲル拡散法や蛍光抗体法、酵素抗体法による病理組織診断がすでに行われている。二重抗体法は、96穴マイクロプレートを用いているので、多く

の検体を一度に判定できる利点があり、ウイルス抗原希釈によるウイルス検出の結果からもわかるように高精度な診断が可能であるので、蚕体、蚕沙や内部汚染繭からの検出に適していると考えられる。また、感染してから2～3日でウイルスの検出が可能なので早期診断による事後対策にも役立つと考えられる。しかしながら、ELISAを行う場合、他の試験方法に比べて操作が複雑であり、また、一連の手順の中で、わずかな誤操作が結果に重大な影響を与える場合があり、養蚕現場での診断に適さない欠点がある。このような欠点を補う診断方法として、RIPAは簡単に、短時間に養蚕農家での蚕病ウイルスの判定が可能な方法として注目されている。

今回の結果では、IFVにおいて判定ができたが、抗体の調製やラテックス粒子の濃度や大きさの調製で、実用化の可能性は十分あると考えている。



P : 対照(陽性) 1 : 50倍 2 : 100倍
3 : 200倍 4 : 400倍 C : 対照(陰性)

第8図 RIPAによるIFVの検定

引用文献

CLARK, M.F. and ADAMS, A.N. (1977) : J. Gen. Virol, 34, 475~483
 亀谷満郎(1993) : 植物防疫, 47, 33~36
 河野敏郎、高橋義行、中野正明、津田新哉、高橋幸吉(1994) : 関東東山病虫害年報, 41,

169~170
 TSUDA, S., KAMEYA-IWAKI, M., HANADA, K., KOUUDA, Y., HIKATA, M. and TOMARU, K. (1992) : Plant Disease, 76, 466~469