

迅速免疫ろ紙検定法 (RIPA) による蚕核多角体病の検出法

小林則夫・池上隆文

キーワード: カイコ, ヨウサン, ジンソクメンエキロシケンテイホウ, RIPA, NPV, カクタカクタイビョウ, サンビョウボウジョ

Detection of the Silkworm Nuclear Polyhedrosis Virus by Rapid Immuno Paper Assay (RIPA).

Norio KOBAYASHI, Takafumi IKEGAMI

Summary

1. Rapid Immuno Paper Assay(RIPA) was a simple method for detection of the silkworm Nuclear Polyhedrosis Virus(NPV) from dead larval silkworms or pupa.
2. White latex beads were coated with 1mg/ml AntiNPV IgG, color latex beads were coated with 100 μ g/ml IgG. Polyclonal AntiNPV, and monoclonal antibodies against NPV polyhedrin could be used for latex coating.
3. The protocol was done at room temperature, the sample was ground down with distilled water and diluted with detection buffer at 10 to 100 times. After 1 to 2 hours, the color latex was diluted with the same volume as each sample. After 1 hour, the filter paper strip was dipped in the mixture. When the protocol was taken at 38 $^{\circ}$ C, it saved detection time.
4. RIPA could still detect a Nuclear Polyhedrosis laval sample diluted 640 times.
5. When NPV was infected into 3rd stage laval silkworms, NPV could be detected after 66 hours of infection.

I. 緒 言

最近の蚕病被害は核多角体病が相変わらず猛威を振るっており、収繭量の減少や繭品質の低下を招いている。また、細胞質多角体病も一部の農家で散発しており、ウイルス病による被害は養蚕経営に深刻な影響を与えている。蚕ウイルス病防除のために県内指導機関では寒天ゲル内二重拡散法などによる血清学的な蚕病検査を実施している。しかし、養蚕農家の大部分では蚕病等の異常蚕が発生しても原因を究明しないまま処理することが多く、被害が増大したり、次蚕期に同じ病気が再発している。

一方、植物ウイルスの検出法として迅速免疫ろ紙検定法(RIPA)が開発され、野菜や花卉などのウイルス病

害を簡単に検査できると期待されている。これは抗体感作白色ラテックスをろ紙上に固定し、抗体感作着色ラテックスと検査試料の混合液を展開させて、ろ紙上で抗原抗体反応を行う手法である(5)。ウイルス抗原があれば、白色ラテックスを固定した位置に着色ラテックスがバンド状に集まり、短時間に肉眼で判定することができる。これを蚕ウイルス病検査に適応できれば、農家自らが蚕ウイルス病の発生を把握して蚕病防除に役立てることができる。小山(4)はこの手法で蚕ウイルス病の検出を試みたところ、伝染性軟化病ウイルス(IFV)については検出が可能であったが、核多角体病ウイルス(NPV)は検出ができなかったと述べている。

著者はRIPAによる簡易な蚕核多角体病ウイルス検出法の実用化を目指し、若干の知見を得たので報告す

る。

なお、この課題は平成9~11年度新技術地域実用化研究促進事業「大規模超多回育に対応した健全蚕の生産環境管理技術の確立」の一部として実施したものである。

II. 材料および方法

RIPAは亀谷(2)の手順に準じて行った。核多角体感染蚕をサンプルにしてNPVの検出を試みたところ、全く検出できないか、反応があった場合でも着色ラテックスのバンドは不明瞭で、検出結果は非常に不安定であった。しかし、まれに明瞭な反応バンドが出現する場合があることから、ある一定の条件ではNPVの検出が可能であると考え、この条件の探索を中心に、RIPAによるNPV検出方法を検討した。

1. ラテックスの抗体感作濃度

NPV感染蚕から検出を試みたが、バンドが薄く不明瞭な場合が多かった。そこで、ラテックスに感作する抗体量を増やすことで濃いバンドが現れるのではと考え、それぞれのラテックスに感作する抗体量を増やして検出を行った。

抗体感作ラテックスは、日本合成ゴム株式会社製の着色ラテックス(G0301R)と白色ラテックス(G24103)を用いた。ろ紙にはワットマン製ガラス繊維ろ紙(GF/A)を用いた。抗NPV抗体には、ウイルスをウサギに免疫して作製した血清抗体と、多角体タンパクに対するモノクローナル抗体(3)をプロテインA(Biorad社製MAPS-IIキット)で精製したものを、100 μ g/mlまたは1mg/mlでラテックスに感作した。亀谷(2)の手順でラテックスへの抗体感作、および白色ラテックスのろ紙への固定を行った。すなわち、白色ラテックスは0.5%、着色ラテックスは1%に感作用緩衝液(0.45%NaCl, 0.02%含む0.05Mトリス緩衝液pH7.0)で希釈し、100 μ g/ml, 1mg/mlに調整した抗体液を等量混合して所定の手順で感作を行った。検出サンプルは3齢末期NPV感染蚕を適量の蒸留水で磨砕して凍結保存したものを、検査時に0.1% 2-メルカプトエタノール(2-ME), 0.1% 牛血清アルブミン(BSA), 0.15% ポリビニルピロリドン40(PVP)および10mM

EDTAを含んだ0.1Mリン酸緩衝液pH7.0(以下、検定用緩衝液)で100倍希釈してこれをウイルス陽性試料として用いた。同様に健康蚕を陰性試料とし、RIPAでの検出を行い、適切な抗体および抗体濃度を検討した。

2. 試料処理時間と温度条件

NPV感染蚕を検定用緩衝液で磨砕し直ちに着色ラテックスを混合してろ紙を浸すと、着色ラテックスが凝集して検出できないことが多かった。しかし、検定後の残った液にろ紙を再び浸すと凝集が少なくなり、バンドが現れる場合があった。このことから検定用緩衝液中で一定時間経過すれば検出可能になると考え、検査手順のステップに待ち時間を入れることにした。

NPV感染蚕磨砕液を検定用緩衝液で40倍に希釈し、これを室温に置き、希釈直後、2時間、4時間、24時間後に0.025%着色ラテックス液と等量混合した。混合直後、10分、20分、30分、1時間、2時間、3時間、4時間後に白色ラテックスを固定したろ紙を浸して検出し、適切な処理時間の検討を行った。

次に、検定用緩衝液の濃度を高めて検出時間への影響を調べた。検定用緩衝液に1% 2-ME, 1% BSA, 2% PVPおよび10mM EDTA混合0.1Mリン酸緩衝液を用い、同様の処理時間でNPV感染蚕から検出を行った。

さらに、温度を高めた場合に検査時間を短縮できるか検討した。NPV感染蚕磨砕液を検定用緩衝液で希釈後0分、10分、30分間は25 $^{\circ}$ C, 38 $^{\circ}$ C, または50 $^{\circ}$ Cに置き、着色ラテックス液と混合直後、10分、20分、30分、1時間、2時間後に検出した。また、検定用緩衝液で希釈後、1分間煮沸してから室温で着色ラテックスを混合して検出を行った。

3. 検定用緩衝液の条件

検査手順に待ち時間を入れない場合、着色ラテックスが試料液面付近に凝集し、NPVを検出することができなかった。試料液内での着色ラテックスの凝集を防ぐため、亀谷(2)の手順に従ってウイルス試料に浸した後に着色ラテックス液に浸す2段階法を試みたが、解決しなかった。そこで、ろ紙上にNPV抗原が展開しているかの確認を行った。検定用緩衝液で希釈した病蚕磨砕液に、抗NPVウサギ抗体で感作した白色ラテックスを固定したろ紙を浸して液を展開させた。これをニトロセルロース膜に押しつけて抗原を転写し、これに抗NPVマウス抗体、抗マウスIgGペルオキシダーゼ標識抗体の順に反応させ、4-クロル-1-ナフトールで発色させて検出した。

次に、着色ラテックスが良好に展開する緩衝液条件の検索を行った。PBSに3%ポリエチレングリコール(PEG), ゼラチン, Tween20, Triton-X100, スキムミルク, またはSDSを添加し、抗体を感作した0.02%着色

ラテックスが良好に展開してNPVが検出できるか検討した。また、リン酸緩衝液の代わりにトリス緩衝液、2-MEの代わりに10mMジチオトレイトール(DTT)を用いて検出条件を検討した。

現場で使用する際には検定用緩衝液が簡素な組成であることが必要なので、組成の簡素化について検討した。2-ME, BSA, PVP, EDTAのそれぞれの組み合わせについて調査し、検出に必須なものを検討した。また、検定用緩衝液のpH、2-ME, PVPの濃度について検討した。pHは0.1Mリン酸緩衝液をpH5~8に調整した。2-ME, PVP, EDTAは2倍階段で濃度を高めて検出結果に与える影響について調査した。

4. RIPAによるNPV検出感度

NPV感染蚕サンプルを希釈し、検出可能な希釈倍数を調べた。3齢末期の感染蚕を10倍量の検定用緩衝液で磨砕してサンプル10倍液とし、検定用緩衝液で2倍階段希釈した。これと0.025%着色ラテックス液を等量混合して検出可能な希釈倍数を調べた。

次に、蚕がNPV感染後に検出可能になる時間を調査した。3齢起蚕にNPVを接種し、0, 18, 42, 66, 90時間後に採取し、調査時まで凍結保存した。これを用いてRIPA、鏡検による多角体検査、寒天ゲル内二重拡散法(MO法)、酵素標識抗体法(ELISA)による検査で、検出可能になる時間を比較した。

養蚕現場では繭中死蚕から病原検査を行う場合が多いので、NPVによる繭中死蚕から検出を行った。5齢5日目にウイルスを添食し、営繭後に死亡した蚕を少量の蒸留水で磨砕し、検査時まで凍結保存した。これを用いてRIPA、生物検定、ELISA(間接法)による検出で、検出感度を比較した。生物検定は検査試料を10倍量に希釈して人工飼料に滴下し、2齢起蚕に添食する方法で行った。

養蚕農家の病蚕をサンプリングして、RIPAの現場サンプルでの検出感度を調べた。県内養蚕農家の春蚕内部汚染繭を採取し、RIPA、MO法、生物検定を行い、それぞれの検出感度を比較した。

Ⅲ. 結 果

1. ラテックスの抗体感度濃度

白色ラテックスに血清抗体100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1mg/mL、モノクローナル抗体100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1mg/mLで感作して作成したそれぞれのろ紙に、血清抗体100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で感作した着色ラテックスでNPVを検出した結果、バンド

の濃さは血清1mg>血清100 μg \approx モノクロ1mg>モノクロ100 μg の順であり、白色ラテックスは血清抗体1mg/mLで感作した場合にもっともよい結果が得られた。

同様にして着色ラテックスに血清抗体100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1mg/mL、モノクローナル抗体100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1mg/mLで感作し、ろ紙には血清抗体1mg/mLで感作した白色ラテックスを固定して検出した結果、モノクロ、血清抗体ともに1mg/mLで感作したものは着色ラテックスが凝集して展開しなかった。100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で感作したものはいずれも良く展開してバンドもはっきりと現れたが、ややモノクロの方が凝集が少ない傾向であった。

以上の結果から、白色ラテックスは血清抗体1mg/mLで、着色ラテックスはモノクロ100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で感作したものをを用いることにした。

2. 試料処理時間と温度条件

検査試料を検定用緩衝液で希釈直後に0.025%着色ラテックス液を混合したところ、2~4時間経過後にろ紙を浸した場合に薄いバンドが現れた。磨砕後2~4時間置いてから着色ラテックス液を混合した場合には、混合20分後にろ紙を浸せば薄いバンドが現れ、1~4時間後ではっきりとしたバンドが現れた。検定用緩衝液または蒸留水でサンプルを磨砕し、24時間後に着色ラテックス液を混合して検出したところ、混合直後にろ紙を浸した場合でもバンドがはっきりと現れた。以上のことから、室温で検出操作を行う場合には、NPV病蚕サンプルを検定用緩衝液で希釈後2時間以上おいてから着色ラテックス液を混合し、1時間以上経過後にろ紙を浸すことで検出できることが明らかになった(図1)。

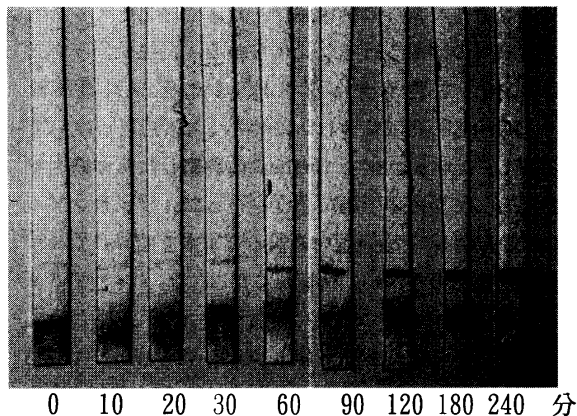


図1 着色ラテックス液混合後の経過時間によるNPV検出

病蚕磨砕物を検定用緩衝液で40倍にし、室温2時間放置後に0.025%着色ラテックス液と混合して所定時間後に検出した。

2-MEなどの濃度を高めた緩衝液を用いて調査したところ、希釈後2時間おいたものは、着色ラテックス液混合後に検出可能になる時間が短縮できた。しかし、希釈後4時間ではバンドが不明瞭になる場合があり、24時間おいた場合は検出できない場合があった。

処理時に加温することによって検査時間が短縮できるか調査した結果、室温25℃より38℃で処理した方が短時間でバンドが明瞭に現れる傾向があった。サン

ルを検定用緩衝液で磨砕後すぐに着色ラテックス液と混合しても、38℃で1時間以上保温することで検出が可能であった(表1)。38℃では3時間以上おいても検出できたが、50℃では30分以上処理すると感度が悪くなった。また、サンプルを1分間煮沸すると、その後室温に戻してから着色ラテックスを混合しても検出できなくなった。

表1 試料処理温度条件による病原検出

温度	試料希釈後の時間	着色ラテックス混合後の時間					
		0分	10分	20分	30分	1時間	2時間
25℃	0分	-	-	-	-	-	+
	10分	-	-	-	-	++	++
	30分	-	-	-	+	++	++
	1時間	-	-	+	+	++	++
	2時間	-	+	+	++	+++	+++
	4時間	-	++	+++	+++	+++	+++
	24時間	+++	+++	+++	+++	+++	+++
38℃	0分	-	-	-	++	+++	+++
	10分	-	-	-	++	+++	+++
	30分	-	-	+	++	+++	+++
50℃	0分	-	+	++			
	10分	-	+++	+++			
	30分	+	+	-			
煮沸(*)	1分	-	-	-	-		

+++>++>+ : 出現したバンドの濃さ - : バンドが現れない
 (*): 煮沸後は室温に戻してから着色ラテックスを混合した

3. 検定用緩衝液の条件

NPV抗原が紙上に展開し、白色ラテックスと反応しているかについて調べた。その結果、NPV抗原はろ紙の上の方まで展開しており、また、白色ラテックスの位置にNPV抗原のバンドが検出されたことから、NPV抗原は、白色ラテックスと反応していることが分かった。このことからバンドが現れない場合は着色ラテックスとの反応に問題があると考え、着色ラテックスが良好に展開し、かつ、反応を阻害しない検定用緩衝液の条件を検討した。

PBSにPEG、ゼラチン、Tween20、Triton-X100、スキムミルク、またはSDSを添加して着色ラテックスの展開を調査したところ、ゼラチンを添加した場合が最も展開が良かった。ポリエチレングリコールは効果がなく、スキムミルク、SDSは反応を阻害した。Tween20、Triton-X100は着色ラテックスの展開を向上させた。ゼラチン添加PBSでNPVウイルス試料を希釈

した場合、128倍希釈で検出できたが、検出結果は不安定で、検出手順に待ち時間を入れる方が検出は安定していた。また、検定用緩衝液に、0.05M トリス緩衝液を用いても差はなかった。2-MEの代わりにDTTを用いた場合は検出できなかった。

検定用緩衝液の簡素化について検討した結果、2-MEとPVPが含まれている場合にのみバンドが現れた。検定用緩衝液にPVPが入っていない場合は、検定用緩衝液にEDTAが含まれ、かつ着色ラテックス希釈液にPVPが含まれている必要があった。BSAは検出結果に影響を与えなかった(表2)。各成分の濃度を高めた場合、2-MEおよびPVPは2%までは検査結果に影響がなかった。EDTAは20mMで感度が低下した。このことから、検定用緩衝液は0.1% 2-ME、0.2% PVP、10mMEDTAを含む0.1Mリン酸緩衝液(0.02% NaN₃含)とした。また、着色ラテックスは0.2% PVPを含むリン酸緩衝液で0.025%に希釈することとした。

表2 検定用緩衝液の条件による反応結果

検定用緩衝液				着色ラテックス液		反 応
2-ME(%)	BSA(%)	PVP40(%)	EDTA(mM)	BSA(%)	PVP(%)	
0.1	0.1	0.15	10	0.1	0	+
				0	0.2	+
0.1	0.1	0.15	0	0.1	0	+
				0	0.2	+
0.1	0.1	0	10	0.1	0	-
				0	0.2	+
0.1	0	0.15	10	0.1	0	+
				0	0.2	+
0	0.1	0.15	10	0.1	0	-
				0	0.2	-
0.1	0.1	0	0	0.1	0	-
				0	0.2	-
0.1	0	0.15	0	0.1	0	+
				0	0.2	+
0.1	0	0	10	0.1	0	-
				0	0.2	+
0.1	0	0	0	0.1	0	-
				0	0.2	-
0	0	0.15	0	0.1	0	-
				0	0.2	-
0	0	0	10	0.1	0	-
				0	0.2	-

4. RIPAによるNPV検出感度

サンプルを希釈して検出感度を調べたところ、10~160倍希釈でバンドが濃く現れ、640倍までは肉眼で判別できる場合もあった。サンプル10倍液は茶色いものであったが、検出結果に影響を与えることはなかった。

NPV感染後に検出可能になる時間を調査したところ、RIPAでは感染後42時間まではウイルスを検出できなかったが、66時間で検出することができた。同時にMO法、ELISAで検出を試みたところ、同様の検出結果であった(表3)。

繭中死蚕サンプル34点を2齢起蚕に添食して生物検

表3 NPV接種蚕からの病原検出

接種後時間	検鏡による 多角体検査	MO法	ELISA 間接法	RIPA
0	-	-	0.050	-
18	-	-	0.060	-
42	-	-	0.045	-
66	+	+	0.627	+
90	+	+	1.784	+

ELISA陽性判定: $X_9 \geq 0.089$

定を行ったところ、全ての蚕が発病しNPVが確認された。この試料をELISAで検出したところ、33点からNPVが検出された。RIPAでは21点から検出することができた。しかし、ELISAでの吸光度とRIPAでの検出結果とは一定の傾向が見られなかった。

農家の春蚕内部汚染繭から試料をBPB染色して検鏡したところ、13点中4点に多角体が認められた。この4点からはMO法、RIPAでもNPVが検出された。また、生物検定ではこれ以外の4点からもNPVが検出された(表4)。このことから、RIPAの検出感度は現在普及指導機関で行われているMO法と同等であることが明らかになった。

表4 八郷町農家の春蚕選除繭からの病原検出

試料No	検鏡による 多角体検査	生物検定 2齢蚕10頭	MO法	RIPA
1	-	0	-	-
2	+	10	+	+
3	-	1	-	-
4	+	10	+	+
5	-	0	-	-
6	-	0	-	-
7	-	2	-	-
8	-	0	-	-
9	-	0	-	-
10	-	1	-	-
11	+	10	+	+
12	-	1	-	-
13	+	10	+	+

IV. 考 察

ウイルス病検出は、簡易な操作で短時間に高感度に検定できることが望ましく、特に農家現場で使用する際には特殊な器材が不要で、反応が明確で判定が容易

でなければならない。RIPAは蚕核多角体病ウイルスを検出するのに十分な感度があり、操作も簡単で判定も容易なので、養蚕農家が自ら実施できる蚕病検出法として適用できると思われる。今回の試験結果から、現場で行う検査手順を策定した(図2)。

検定用緩衝液		着色ラテックス希釈液	
2-ME	0.1%	PVP40	0.2%
PVP40	0.2%	0.1Mリン酸緩衝液pH7.0	
EDTA・2Na	10mM	(0.02%NaN ₃ 含)	
0.1Mリン酸緩衝液pH7.0 (0.02%NaN ₃ 含)			
1) 病蚕を磨砕して検定用緩衝液で10~100倍に希釈し、室温で2時間おく。 2) サンプルと0.025%着色ラテックス液を等量混合し、1時間おく。 3) ろ紙を0.3~0.5cmくらい浸して検出する。			

図2 RIPAによる蚕核多角体病ウイルス検査方法の手順

RIPAでNPVを検出する際には、植物ウイルスを検定する手順をそのまま適用しては検出できず、検査手順のステップに一定の待ち時間を入れることで検出可能になることが明らかになった。この待ち時間は、室温より38℃に加温することで短縮でき、また、磨砕後のサンプルを予め一晚おいてから検査を行うことでも短くできる。しかし、サンプルを50℃で30分、または1分間煮沸するとバンドが現れなくなることから、サンプル中の何らかの酵素が反応に関与している可能性がある。この要因を明らかにすれば、検出結果が不安定なサンプルからでも安定して短時間に検出できると思われるので、今後解明していきたい。

県内の普及指導機関では出荷繭からサンプリングを行い、当研究所から配布された抗血清による蚕ウイルス病の検査で蚕病発生傾向の把握につとめている。当所では抗血清調製に関する問題を解決するため、モノクローナル抗体の調製に取り組んできたが、作製したモノクローナル抗体は現在普及指導機関で行われているMO法には活用できないと言う問題を抱えていた。モノクローナル抗体を活用できるELISAや蛍光抗体法による検査手法導入も考えられたが、普及指導機関での検定技術の習熟や検査体制、当所での標識抗体の調製、供給体制を考慮すると、普及現場への導入は困難と思われた。今回、RIPAを蚕病検査に実用化するに当

たって、モノクローナル抗体を活用できることが明らかになったので、この手法を普及現場に導入することで、蚕病検査の簡易化を図るとともに、モノクローナル抗体の活用を図ることができる。また、著者らは大量に調製可能な卵黄抗体の調製にも取り組んできた(1)が、これをRIPAに活用できれば、抗体調製に関する様々な問題を解決することができるので、今後の課題としたい。

V. 摘 要

- 迅速免疫ろ紙法(RIPA)は、へい死蚕やビショ繭から簡単な操作で蚕核多角体病ウイルス(NPV)を検出することができた。
- 抗NPV抗体は、白色ラテックスに抗体1mg/mlで、着色ラテックスに抗体100 μg/mlで感作した。ラテックスに感作する抗体には血清抗体、またはポリヘドリンに対するモノクローナル抗体が使用できた。
- 室温で検査を行う場合は次の手順で行った。試料を蒸留水で磨砕し、検定用緩衝液で10~100倍に希釈して1~2時間放置した。希釈した試料と等量の着色ラテックスを混合し、1時間後にろ紙を浸して検定した。温度を38℃で行うと、検査時間を短縮できた。
- RIPAはNPV感染蚕試料を640倍に希釈しても検出

できる感度があった。

5. NPVを接種した3齢蚕からは、接種後42時間では検出できないが66時間で検出できた。

引用文献

1. 池上隆文・小林則夫(1998)蚕ウイルスに対する卵黄抗体の調製法と保存法. 茨城農総セ蚕研研報 6:6-10
2. 亀谷満朗(1993)RIPA法による植物ウイルスの簡易迅速診断. 植物防疫 47:189-192
3. 小林則夫・池上隆文(1998)NPVポリヘドリンに対するモノクローナル抗体の調製. 茨城農総セ蚕研研報

6:1-5

4. 小山千明(1996)酵素抗体法および迅速免疫ろ紙検定法による核多角体病ウイルスと伝染性軟化病ウイルスの検出. 群馬蚕試研報 2:27-30
5. Tsuda, S. et al(1992)A Novel Detection and Identification Technique for Plant Viruses:Rapid Immunofilter Paper Assay(RIPA). Plant Disease76:466-469