

虫検体圧搾処理を組み合わせた簡易ELISA法はRSV保毒虫検定に有効である			
<p>[要約] イネ縞葉枯ウイルス(RSV)保毒虫検定において、簡易ELISA法に虫検体圧搾処理を組み合わせた新手法は、ラテックス凝集反応法(従来法)と比較し、虫検体処理は簡便、判定は容易で、検定結果は同等であり、本県で行うRSV保毒虫検定手法として採用できる。</p>			
農業総合センター農業研究所	平成26年度	成果区分	技術情報

### 1. 背景・ねらい

イネ縞葉枯病の発生予察には、病原ウイルスの媒介虫であるヒメトビウンカ越冬世代の保毒虫率を把握することが重要である。本県の病害虫防除所が行う保毒虫検定では、抗原抗体反応を利用してイネ縞葉枯ウイルスを検出するラテックス凝集反応法が用いられているが、反応が不明瞭なことがあり判定が難しい。そこで、従来法に代わる検定手法として、従来法より結果の明瞭性に優る簡易ELISA法に簡便な虫検体処理を組み合わせた新手法の採用の妥当性を検討する。

### 2. 成果の内容・特徴

- 1) 保毒虫検定において、ラテックス凝集反応法はマイクロプレートのウェルに虫検体を投入した後摩砕処理するのに対して、新手法は虫検体の胸部をピンセットで挟んで圧搾処理しウェルに投入する。新手法では、虫検体処理に要する作業時間は、ラテックス凝集反応法と比べてやや短く(表1)、虫検体の摩砕にかかる労力が軽減される。
- 2) 結果の判定は、ラテックス凝集反応法ではラテックス粒子の凝集の有無によって、新手法では発色反応の有無によって行う。ラテックス凝集反応法においては、凝集が不明瞭なものがあるために観察と判定に時間を要するのに対して、新手法では発色が明瞭で判定が容易である(表1, 図1)。
- 3) 検定結果についてロジスティック回帰分析を行ったところ、検定手法が検定結果に及ぼす影響は認められず、サンプリング時期および供試虫のステージ毎に概ね同様の結果が得られる(表2)。このことから、新手法を本県で行うRSV保毒虫検定手法として採用できる。

### 3. 成果の活用面・留意点

- 1) 本法は、病害虫防除所で行う保毒虫検定に活用可能である。
- 2) ラテックス凝集反応法には抗体感作ラテックス液(日本植物防疫協会製)を、新手法にはポリクローナル抗体利用DAS-ELISA用セット(日本植物防疫協会製)を使用した結果である。
- 3) 新手法による保毒虫検定の実施にあたっては、農研機構webページの保毒虫検定マニュアルを参考にする。[https://ml-wiki.sys.affrc.go.jp/rsv\\_web/rsv/elisa](https://ml-wiki.sys.affrc.go.jp/rsv_web/rsv/elisa)
- 4) 本成果は、発生予察調査実施基準改良事業において得られたものである。

#### 4. 具体的データ

表1 各検定手法のRSV保毒虫検定に要する作業時間（96穴マイクロプレート1枚あたり）

ラテックス凝集反応法		簡易ELISA法（虫検体圧搾処理）	
工程	時間(分) 最長～最短	工程	時間(分) 最長～最短
①虫検体の投入・摩砕	20～23	①プレートの洗浄	2～3
②試薬の分注	2	②試薬の調整・分注	2～5
③インキュベーション	60	③虫検体の胸部圧搾・投入	14～17
④判定	5～18	④インキュベーション	120
		⑤試薬の調整	1～4
		⑥プレートの洗浄	2～3
		⑦試薬の分注	1
		⑧発色	30
		⑨判定	1
作業時間	27～43	作業時間	23～34
待ち時間（③）	60	待ち時間（④+⑧）	150
合計	87～103	合計	173～184

注1) 簡易ELISA法は、あらかじめ一次抗体によるプレートのコーティングを行った場合の結果である。

注2) 作業時間は、測定した作業時間を分単位に切り上げたものを用いている。

表2 検定手法がヒメトビウカでのRSV保毒虫検定結果に及ぼす影響

検定手法	6月採集		9月採集		統計検定の結果
	幼虫	成虫	幼虫	成虫	
ラテックス凝集反応法	11/95	13/95	9/95	23/95	]n. s.
簡易ELISA法（虫検体圧搾処理）	17/95	16/95	14/95	26/95	

注1) 表中の値は、陽性と判定した検体数/総検体数である。

注2) 統計検定では、検定手法が検定結果に及ぼす影響を、ロジスティック回帰分析によって解析した。  
(n. s. は有意差なし、 $p > 0.05$ )

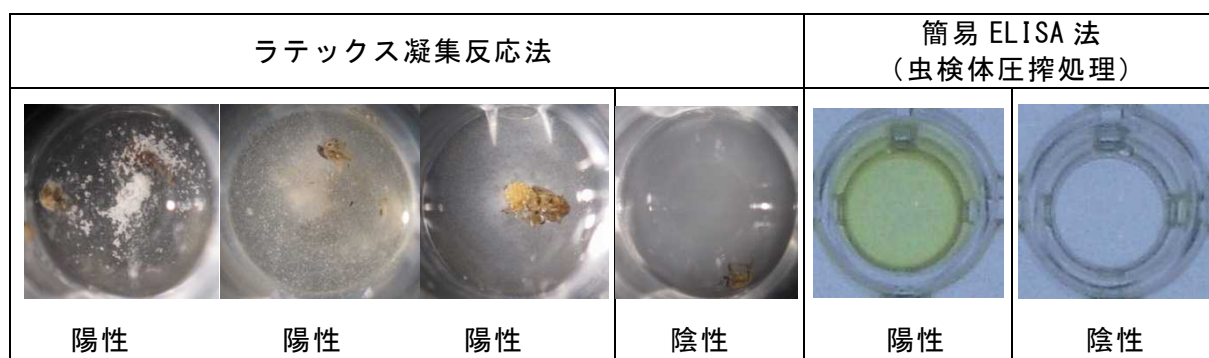


図1 ラテックス凝集反応法及び新手法による保毒虫検定の判定例

#### 5. 試験課題名・試験期間・担当研究室

発生予察調査実施基準改良事業・平成26年度・病虫研究室