

剤散布によるウイルス伝搬の軽減効果は認められなかった。しかしながら、油剤散布によるウイルス病防除の有効性を論じるためには油剤の種類、散布時期、散布濃度など今後さらに検討を要する。

II. Clover yellow vein virus

1. 実験材料および方法

1) 供試ウイルス

Clover yellow vein virus (CYVV) は北海道立中央農試ほ場において、インゲンマメ（品種：改良早生大福）のえそ症状株から分離した後早生ソラマメに汁液接種した。接種 7～10 日後のソラマメ頂葉を生葉または -20°C で凍結保存したものを供試した。

ウイルス接種源の調整および接種方法、ほ場試験、アブラムシの防除、検定植物の育苗、ウイルスの純化、電顕観察、免疫電顕法その他は特記しないかぎり前項（I-1）と同様に行った。

2) 寒天ゲル内拡散法

寒天ゲルは 0.8% Noble agar (Difco 社), 0.85% 塩化ナトリウム, 0.5% 3, 5-ジヨードサリチル酸リチウム, 0.1% アジ化ナトリウムを蒸留水に加熱溶解し作成した。直径 7 mm のコルクボーラーを用いて寒天ゲルの中央（1カ所）および周囲（6カ所）に穴を開けた後、中央の穴に抗血清の原液、周囲の穴に純化ウイルス液（濃度 1 mg/ml）をそれぞれ入れ、一晩静置し反応を観察した。

3) ELISA 法

ウイルス抗血清から γ -グロブリンの精製、アルカリフォスファターゼ (Sigma 社, Type VII-S) と γ -グロブリンの結合および ELISA 検定の手法は Clark and Adams (1977) に準じて行った。ウイルス試料の磨砕用緩衝液は 0.05% Tween-20, 0.85% 塩化ナトリウム, 2% ポリビニルピロリドンを含む 0.02 M リン酸緩衝液（以下 PBST-PVP と略す）を使用した。ウイルス試料 1 検体のプレート (Dynatech 社) のウエル数は定性実験の場合 1カ所、定量実験の場合 2カ所で測定しその平均値を用いた。酵素基質注入後、 37°C で 1 時間保持した後 A_{405} または A_{410} を測定し試

料の判定は対照（健全葉）の 3 倍以上の吸光値を示した場合を陽性とした。

4) ミエローマ細胞の培養

培地 (DMEM) の作成は次のように行った。ダルベッコ変法イーグル培地② (DME, 日水製薬) 4.75 g を 500 ml の蒸留水に溶解した後、オートクレーブで 15 分間滅菌した。牛新生児血清 (Flow Laboratories 社) を最終濃度 15% になるよう加えた後、硫酸カナマイシン (明治製薬) の 20% 液 5 ml, 8-アザグアニン (Sigma 社) の 0.2% 液 5 ml をそれぞれ加えた。次いで 10% 重炭酸ナトリウム液を滴下し、pH 7.1～7.4 に調整し使用した。

次に液体窒素で保存中のミエローマ細胞 SP 2/0-Ag 14 (SP 2) 株を約 45°C の温湯中で溶解した後、DMEM を約 5 ml 加え 1,000 rpm, 7 分間遠心分離した。上清を捨て DMEM を約 5 ml 加え細胞を懸濁した後、1,000 rpm, 7 分間遠心分離した。上清を捨て DMEM で細胞濃度を 5×10^4 個/ml 程度に調整した後、 CO_2 インキュベータ（温度 37°C , 湿度 95%, CO_2 濃度 5%）中で培養した。

5) マウスの免疫

エチルエーテルで麻酔させた 4 週齢のマウス（メス）の左のわき腹を安全カミソリで約 5 mm 切開し脾臓を露出させた。BYMV-S の純化ウイルス 50 μg を脾臓に注射した後、切開したマウスのわき腹をふさいだ。

6) 脾細胞およびミエローマ細胞の調整

脾臓注射 4 日後にマウスの脾臓を摘出した。pH 7.1～7.4 に調整した DME を 10 ml 入れたシャーレ中に脾臓を浸しハサミで縦横に数カ所切った後、ピンセットで丁寧にのみほぐし脾細胞を単離した。1,000 rpm, 7 分間遠心分離した後、沈殿を 20 ml の DME に溶かした。脾細胞を 0.4% トリパンブルーで染色し、トーマ血球計算盤で生細胞数を測定した。次いで遠心分離を二度繰り返した後、沈殿を 10 ml の DME に溶かした。

ミエローマ細胞の調製は次のように行った。培養中のミエローマ細胞を 1,000 rpm, 7 分間遠心分離した後、沈殿を 20 ml の DME に溶かした。生細胞数を測定した後、遠心分離を二度繰り返し沈殿を 10 ml の DME に溶かした。次に脾細胞数：

ミエローマ細胞数=10:1の割合に混合した後、1,000 rpm, 7分間遠心分離した。

7) 細胞融合

ポリエチレングリコール1,000 (PEG, 関東化学)とDMEを当量混合し、0.1 M 水酸化ナトリウムでpH 7.0に調整した。50%PEG 1 mlを脾細胞とミエローマ細胞の混合液中に10秒間隔で3回激しく振とうしながら滴下した。続いて残りのPEGを同様にして40秒間で滴下した後、30秒間隔で振とうした。続いて10%重炭酸ナトリウム液でpH 7.1~7.4に調整したDME 1 mlを10秒間隔で3回激しく振とうしながら滴下した後、残りのDMEを40秒間で滴下した。2, 4, 8, 10 mlのDMEをそれぞれ40秒間隔で軽く振とうしながら滴下した後、1,000 rpm, 7分間遠心分離した。ミエローマ細胞の濃度が 3.5×10^5 個/mlになるよう沈殿をHAT培地(DMEM 100 ml中に0.14%ヒポキサンチン1 ml, 0.009%アミノプテリン0.2 ml, 0.78%チミジン・0.045%グリシンの混合液0.2 mlを添加)に溶かした後、96穴組織培養用プレート(NUNC社)に0.1 mlずつ分注し培養した。

8) ハイブリドーマの選抜とクローニング

ハイブリドーマの抗体産生機能の有無は、炭酸ナトリウム緩衝液(pH 9.6)で希釈した抗原を直接プレートに吸着させる抗原吸着法およびCYVV, BYMV-Sのポリクローナル抗体を用いた二重抗体法による間接ELISA法で調べた。抗原は $1 \mu\text{g/ml}$ の純化ウイルスを用い、酵素結合抗体はパーオキシダーゼ標識抗マウス γ -グロブリン(IgG+IgM+IgA)ヤギ抗体を使用した。基質注入1時間後に A_{492} を測定し、最も抗体産生機能の高いハイブリドーマを選抜した。次に選抜されたハイブリドーマを限界希釈法により96穴組織培養用プレートに1ウエル当りの細胞数が5個になるよう分注した。細胞が増殖後間接ELISA法により抗体価を調べ、最も抗体産生機能が高い細胞を選抜した。再度1ウエル当りの細胞数が1~0.5個になるよう分注し同様の操作を行った。

9) 腹水の採取とモノクローナル抗体の精製

クローニングにより得た抗体産生細胞4株

(1A3-1, 1F11-2, 2E7-3, 1E4-2)を使用した。各細胞を増殖後 5×10^5 個を0.5 mlのDMEに溶かした。あらかじめプリスタン(2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン) 0.5 mlを腹腔注射しておいたマウスの腹腔に抗体産生細胞液を注射した。注射10~14日後に腹部の肥大したマウスから腹水を採取し、リングテストによる力価の測定を行った。次に腹水から硫酸塩析法により抗体を精製した。抗体の濃度は日立U3200自記分光光度計を用いて測定し、 $A_{280}=1.4$ を 1 mg/ml と仮定して計算した。

2. 実験結果

1) 病徴と被害

インゲンマメの病徴を北海道で栽培されている主要4品種についてみると、「大福類」および「手亡類」の場合、CYVVに感染するとPlate IIの1, 4のごとく葉や茎に茶褐色のえそを生じて枯死する。生育初期に感染した場合つる枯れを起こし枯死する。後期の感染では一部の新葉やつるにえそ症状を起こして枯死するが、株全体の枯死までに至らない。莢の形成期に感染した場合、莢に茶褐色のえそ斑を生じ莢の成長は止り、種子の肥大を阻害し甚だしい場合には種子を形成しない。一方、BYMV-O(普通系統)に感染した場合、Plate IIIの1のごとく葉に明瞭な緑色の濃淡を生じるが枯死することはない。インゲンマメの生育初期に感染した場合、葉にモザイク症状を生じたうえちりめん状に縮葉し、生育が遅延し株がわい化する。後期に感染した場合、葉にモザイク症状を生じるのみで茎や莢には症状が現われない。

「虎豆類」および「金時類」の場合CYVVに感染すると、Plate IIの2, 3のごとく葉に網目状に緑白色のえそを生じ葉が裏側に巻く。生育初期に感染した場合株が萎縮し、後期に感染した場合でも生育が遅延する。えそ症状を起こした葉はやがて落葉し、甚だしい場合には葉がすべて落ち茎だけの株も見受けられる。莢の形成期に感染した場合、莢に病徴は現われないが、成長は止り種子の肥大や形成が阻害される。BYMV-Oに感染した場合病徴は「大福類」および「手亡類」に類似し、Plate IIIの2, 3のごとく葉に明瞭な緑色の濃淡を

生じる。インゲンマメの生育初期に感染すると葉にモザイクを生じて縮葉し株がわい化するが、後期に感染した場合は葉にモザイク症状を現わすのみで、茎や莢には症状が現われない。

上記のように本病は激しい病徴を現わし収量に及ぼす影響が甚大と思われる。本項では下記により人工接種による発病株を接種時期別に採取し、収量の比較を行った。

供試品種は「改良早生大福」、「改良虎豆」、「大手亡」、「大正金時」を用いた。

1982年5月31日に1品種30株を北海道立中央農試ほ場には種した。ウイルスの接種は7月2日(本葉第1葉期)に初生葉、7月22日(開花始め～開花期)に本葉第1葉～第2葉、8月18日(莢伸長期～莢肥大期)に中位葉にそれぞれ行った。

収穫は「改良早生大福」が9月29日、「大正金時」および「大手亡」が9月30日、「改良虎豆」が10月12日に接種時期別に発病株を採取した。収量調査は総莢数、総莢重量、子実重および100粒重について行った。

以上の結果をTable 29に示した。「改良早生大福」および「大手亡」は葉脈、分枝、主茎、莢に

えそ症状を現わし、生育初期に接種した株は枯死した。接種後発病までの潜伏期間はおおよそ1～2週間であった。一方、「改良虎豆」、「大正金時」では葉脈えそ、巻葉症状を呈し落葉した。生育初期に接種した場合株が萎縮した。潜伏期間はおおよそ10～14日であった。

収量調査の結果をTable 30に示した。株当りの莢数は各品種とも接種時期が早いほど減少し、特に生育初期～中期に接種した場合は約70～100%の著しい減少を示した。株当りの総莢重量は各品種とも接種時期が早いほど減少し、特に生育初期～中期に接種した場合は約90～100%の著しい減少を示した。株当りの子実重は各品種とも接種時期が早いほど減少し、生育初期～中期接種区で約85～100%、後期接種区でも約40～65%減収した。100粒重は「改良早生大福」、「大手亡」および「大正金時」では接種時期が早いほど減少し、ウイルス感染による種子の肥大抑制が認められたが、「改良虎豆」は接種による影響はほとんど認められなかった。

2) 病原ウイルスの性質

a. 寄主範囲と病徴

Table 29. Effect of leaf stage for inoculation with CYVV on kidney bean plants

Cultivars	Growth stage	Inoculated leaves	Latent period in plants(days)	Symptoms
Kairyo-Wase-Ohfuku	Primary leaf	Primary leaf	13	Veinal necrosis, Death
	Time of flowering	1 st and 2 nd trifoliolate leaves	11	"
	4 weeks after flowering	Middle leaves	7	Veinal necrosis Necrosis(pod)
Ohtebou	"	"	13	"
			15	
			13	
Kairyo-Toramame	"	"	9	Veinal necrosis, Stunt
			11	"
			13	Veinal necrosis Leaf roll
Taisho-Kintoki	"	"	9	"
			11	
			13	

Table 30. Effect of CYVV on bean yields of kidney bean

Cultivars	Inoculation	No. of plants examined	Yields				
			No. of mature pods/plant	Weight of total pods/plant (g)	Weight of mature seed/plant (g)	Weight decrease (%)	100 grain weight (g)
Kairyo-Wase-Ohfuku	Jul. 2	3	0	0	0	100	— ^{a)}
	Jul. 22	15	14.2	21.7	10.3	92	42
	Aug. 18	11	38.7	89.7	50.0	62	51
	Healthy	20	51.7	209.9	131.5	0	71
Ohtebou	"	5	0	—	0	100	—
		7	5.7	—	4.3	97	20
		20	58.3	—	52.5	63	31
	Healthy	17	83.4	—	141.8	0	40
Kairyo-Toramame	Jul. 2	20	3.5	9.1	5.8	96	71
	Jul. 22	20	4.9	19.4	12.5	90	68
	Aug. 18	20	30.6	112.2	76.5	42	69
	Healthy	20	44.6	180.3	131.5	0	73
Taisho-Kintoki	"	20	3.9	—	6.3	90	67
		10	5.9	—	9.0	86	66
		5	21.8	—	25.0	62	84
	Healthy	20	32.8	—	66.0	0	102

a) Not tested.

病原ウイルスを同定するため、下記の植物にウイルスを汁液接種し寄主範囲と病徴を調べた。

供試植物：インゲンマメ (*Phaseolus vulgaris*) 7 品種 (トップクロープ, マスターピース, 大福, 大手亡, 大正金時, 衣笠, 虎豆), エンドウ (*Pisum sativum*) 2 品種 (三十日絹莢, ウイスコンシンパーフェクション), ダイズ (*Glycine max*, ユウズル), アズキ (*Vigna angularis*, 大納言), ソラマメ (*Vicia faba*, 早生), シロクロローバー (*Trifolium repens*, ニュージランド), アカクロローバー (*Trifolium pratense*, メジウム) アルサイクローバー (*Trifolium hybridum*), アルファルファ (*Medicago sativa*), コモンベッチ (*Vicia sativa*), タバコ (*Nicotiana tabacum*) 2 品種 (Samsun, Xanthi), *Chenopodium amar-*

anticolor, *Chenopodium quinoa*, ホウレンソウ (*Spinacia oleracea*, ピロフレー), セイヨウカボチャ (*Cucurbita maxima*, 黒皮デリシャス), キュウリ (*Cucumis sativus*, 長日落合 2 号), メロン (*Cucumis melo*, キングエース), センニチコウ (*Gomphrena globosa*), ツルナ (*Tetragonia expansa*), トマト (*Lycopersicon esculentum*, 福寿 2 号), *Physalis floridana*, *Datura stramonium*, ナス (*Solanum melongena*, 千両), ピーマン (*Capsicum annuum* var. *angulosum*, 緑王), ナンバン (*Capsicum annuum* var. *parvo-acuminatum*, 札幌大長), スイカ (*Citrullus lanatus*, 縞王), ペポカボチャ (*Cucurbita pepo*, ラージポンキン), ペチュニア (*Petunia hybrida*, スノーボール), ミツバ (*Cryptotaenia japonica*,

Table 31. Host range and symptoms of CYVV

Plants	CYVV isolates					
	N ^{a)}		WC-4 ^{b)}		No.36 ^{c)}	
	Inoculated leaf	Upper leaves	Inoculated leaf	Upper leaves	Inoculated leaf	Upper leaves
<i>Phaseolus vulgaris</i>						
(Top Crop)	NS, VN	VN, N	NS	TN	VN	N
(Kairyo-Ohdebou)			NS	TN	VN	N
(Master Piece)	CS	VN, N	NS	TN	VN	N(M)
(Ohfuku)	VN	VN, N			VN	N
(Ohdebou)	NS, VN	VN, N			VN	N
(Taisho-Kintoki)	CS	ns, N			VN	N
(Kinugasa)	NS, VN	VN, N			VN	N
(Toramame)	CS	ns, N			VN	N
<i>Pisum sativum</i>						
(Kinusaya-sanjuunichi)	N	N, M		VC, TN		
(Wisconsin Perfection)	(-)	(-)	-	-	(-)	(-)
<i>Glycine max</i> (Isuzu)			-	-		
(Yuuzuru)	(-)	(-)				
(Tokachi-Nagaha)					Y	M
<i>Phaseolus angularis</i>						
(Wase-Dairyu)			-	-		
(Sakae-Shozu)					-	-
(Dainagon)	(-)	(-)				
<i>Vicia faba</i> (Wase-Soramame)	NS	VN	NS	TN, VN	NS	N
<i>Vigna sesquipedalis</i>						
(Kurodane-Sanjaku)	-	-	-	-	(-)	(-)
<i>Trifolium repens</i>	-	(+)	-	M	N	M
<i>T. pratense</i>	-	M	-	M	(-)	(-)
<i>T. hybridum</i>	-	M	-	M	(-)	(-)
<i>Medicago sativa</i>	(-)	(-)	-	-	(-)	(-)
<i>Vicia sativa</i>	N	N				
<i>Nicotiana tabacum</i>						
(Samsun)	(-)	(-)	NS	-		
(White Burley)					(+)	(-)
(Xanthi)	-	-				
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	NS	VN	NS	NS, VN	NS, YS	NS, YS, St
<i>C. quinoa</i>	NS	NS, VN			NS	-
<i>Spinacia oleracea</i>						
(Minster Land)					NS	M, St
(Birofley)	NS	M				
<i>Cucurbita maxima</i>						
(Kokuhi-Delicious)	(-)	(-)				
(Sweet Potato)			-	-		
<i>Cucumis sativus</i> (Suuyou)					(-)	(-)
(Chojitsu-Ochiai-2 gou)	(-)	(-)				
<i>Cucumis melo</i>						
(Yuubari-King)					(-)	(-)
(King Ace)	(-)	(-)				
<i>Gomphrena globosa</i>	(-)	(-)	NS	(-)	(+)	-
<i>Tetragonia expansa</i>	CS	(-)				

NS : Necrotic spot, VN : Veinal necrosis, CS : Chlorotic spot, N : Death, M : Mosaic, Y : Yellowing, YS : Yellow spot, St : Stunt, TN : Top necrosis VC : Vein clearing, (+) : Symptomless infection, (-) : Virus not recovered, - : No symptoms.

a) Isolated from kidney bean plant cv. Kairyo-Wase-Ohfuku showing necrotic symptom. b) Data from Tsuchizaki *et al.* (1981). c) Data from Uyeda *et al.* (1981).

白茎みつば), シソ (*Perilla ocymoides*, 青ちりめんしそ), ハクサイ (*Brassica campestris*, 無双), ダイコン (*Raphanus sativus*, 耐病総太り), カンラン (*Brassica oleracea*, ゴールデンエーカー), レタス (*Lactuca sativa*, 早生グレートレーク 366), ブロッコリ (*Brassica oleracea* var. *italica*, 緑嶺), カリフラワー (*Brassica oleracea* var. *botrytis*, スノークラウン), ニンジン (*Daucus carota*, 鮮紅五寸), パセリ (*Petroselinum crispum*, ニューグランドパセリ), セロリ (*Apium graveolens*, コーネル 619), ゴボウ (*Arctium lappa*, 札幌大長白牛蒡), ケイトウ (*Celosia argentea* var. *cristata*, ファイヤーフェザー) の 10 科 50 種の植物を供試した。

接種 21 日後に病徴観察を行いその結果の一部を Table 31 に示した。病徴を現わした植物はインゲンマメ, エンドウ, ソラマメ, アカクローバー, アルサイクローバー, コモンベッチ, *C. amar-anticolor*, *C. quinoa*, ホウレンソウ, ツルナの 10 種であった。シロクローバーは無病徴全身感染が認められた。トマト, *P. floridana*, *D. stramonium*, ナス, ピーマン, ナンバン, スイカ, ポンキン, ペチュニア, ミツバ, シソ, ハクサイ, ダイコン, カンラン, レタス, ブロッコリ, カリフラワー, ニンジン, パセリ, セロリ, ケイトウ,

ゴボウの各植物には病徴を現わさなかった。

b. 物理的性質

本ウイルスの物理的性質を明らかにするため, 下記の方法で罹病葉粗汁液を用いて耐熱性, 耐希釈性, 耐保存性を調べた。

耐熱性試験は, 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で 10 倍に希釈した罹病葉粗汁液を 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C の各温湯中に 10 分間保持した後, ソラマメに接種した。

耐希釈性試験は, 罹病葉粗汁液を 0.1 M リン酸緩衝液で $10^1 \sim 10^{10}$ までの 10 倍段階希釈系列を作り, 各希釈液をソラマメに接種した。

耐保存性試験は, 0.1 M リン酸緩衝液で 10 倍に希釈した罹病葉粗汁液を 20°C の恒温器中に 1 ~ 10 日間保持した後, ソラマメに接種した。

その結果を Table 32 に示した。本ウイルスの耐熱性は 50 ~ 55°C, 耐希釈性は $10^6 \sim 10^7$ 倍, 耐保存性は 10 日以上 (20°C) であった。

c. アブラムシ伝搬

モモアカアブラムシの無翅幼虫を 30 分間絶食させた後, 罹病ソラマメ葉上に 10 分間放置して獲得吸汁させた後, 早生ソラマメに 1 株当たり 10 頭ずつ放ち接種吸汁させた。18 時間放置した後, ピリミカープ (ピリマー) 水和剤の 1,000 倍液を散布し殺虫した。その結果, 接種 88 株中 13 株が発

Table 32. Physical properties of CYVV

Thermal inactivation			Dilution end point			Longevity in vitro		
Temperature (°C)	No. of plants inoculated	No. of plants infected	Dilution	No. of plants inoculated	No. of plants infected	Days	No. of plants inoculated	No. of plants infected
45	6	6	10^1	6	6	1	— a)	—
			10^2	6	6	2	6	6
50	6	6	10^3	6	6	3	6	6
			10^4	6	6	4	6	6
55	6	1	10^5	6	5	5	6	6
			10^6	6	4	6	6	6
60	6	1	10^7	6	1	7	6	6
			10^8	6	0	8	6	6
65	6	0	10^9	6	3	9	6	6
			10^{10}	6	0	10	6	5
70	6	0						

a) Not tested.

病した。

d. 血清試験

寒天ゲル内拡散法を用いて本ウイルスと BCMV, また ELISA 法を用いて本ウイルスと BYMV とのそれぞれ血清関係を調べた。

供試ウイルスは CYVV, BYMV の 3 分離株および BCMV の各純化試料および罹病葉の粗汁液を用いた。BYMV の 3 分離株はインゲンマメ (品種：改良早生大福) のモザイク症状 (BYMV-No.121), アカクローバーのモザイク症状 (BYMV-No.102), ソラマメ (品種：一寸大蚕豆) の種子伝染株 (BYMV-S) からそれぞれ分離した。

供試抗血清：CYVV および BYMV-S の抗血清は後述 (II-2-3)-a-c) の方法で作成した力価 1,024 倍 (リングテスト) のもの, BCMV 抗血清は前述 (I-2-4)-c) の方法で作成した力価 512 倍 (リングテスト) のもの, CYVV-No.36 の抗血清は北海道大学農学部の上田一郎博士, CYVV (Pratt 分離株) 抗血清 (力価 1,024 倍) および BYMV (Scott 分離株) 抗血清 (力価 1,024 倍) は米国クレムソン大学の Barnett 博士から分譲されたものを使用した。ELISA 法の場合, 抗体濃度は CYVV および BYMV-S が $1 \mu\text{g}/\text{ml}$, CYVV-Pratt 株 および BYMV-Scott 株 が $5 \mu\text{g}/\text{ml}$, 酵素結合抗体濃度は各 400 倍で行った。

寒天ゲル内拡散法の結果は Plate VII の 1 および 2 のごとく, CYVV および BYMV-S 抗血清に対して CYVV および BYMV の 3 抗原はいずれも反応したが, BCMV は反応しなかった。沈降

線は BYMV-S, No.121, No.102 の各抗原の間では融合したが, これら 3 抗原と CYVV との間では分枝線を形成した。

BCMV 抗血清に対して Plate VII の 3 のごとく, BCMV, BYMV-S, No.121, No.102 はいずれも反応したが, CYVV は反応しなかった。沈降線は BYMV-S, No.121, No.102 の各抗原との間では融合したが, これら 3 抗原と BCMV との間では分枝線を形成した。

CYVV-No.36 抗血清に対して CYVV は反応し明瞭な沈降線が, また BYMV-S, No.121, No.102 の各抗原との間では弱い沈降線が認められたが, BCMV との間では反応が認められなかった。沈降線は BYMV-S, No.121, No.102 の各抗原との間では融合したが, これら 3 抗原と CYVV との間では分枝線を形成した。

次に各ウイルス間の ELISA 反応を Table 33 に示した。CYVV 抗体に対しては CYVV および CYVV-Pratt 株, CYVV-Pratt 抗体に対しては CYVV が反応した。また BYMV-S 抗体に対しては BYMV-S および BYMV-Scott 株が強く反応したが, CYVV および CYVV-Pratt 株も若干反応を示した。BYMV-Scott 抗体に対しては BYMV-S が反応した。

3) 病原ウイルスの診断

a. ポリクローナル抗体による診断

a) 粒子の形態

北海道立中央農試のほ場内において, インゲンマメ (品種：改良早生大福) のつる枯れ症状株から採取した病葉を DN 法を用いて電顕観察した。

Table 33. Cross-reaction of CYVV, CYVV-Pratt, BYMV-S, and BYMV-Scott in double antibody sandwich ELISA test

Antigen	Virus antiserum			
	CYVV	CYVV-Pratt	BYMV-S	BYMV-Scott
CYVV	>2.00	1.08	0.56	0.07
CYVV-Pratt	0.92	*	0.23	*
BYMV-S	0.01	0.09	>2.00	1.36
BYMV-Scott	0.06	*	>2.00	*
Healthy crude sap	0	0.05	0.05	0

* : Not tested.

電顕観察の結果、粒子の長さ約 750~800 nm のやや屈曲したひも状粒子が多数観察された。

b) ウイルスの純化と抗血清の作出

ソラマメ罹病葉を用いてウイルスの抽出および精製を行った。

純化材料は接種 6~9 日後の早生ソラマメ頂葉(葉脈透化または葉脈えそ症状)を -20°C で凍結保存したものを使用した。純化の方法は Moghal and Francki (1976) に準じて行い、Fig. 4 に示した手順でおこなった。但し、磨砕用に 0.5 M りん酸緩衝液(pH 7.0, 0.5 M 尿素, 1%亜硫酸ナトリウム, 50 mM エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム, 0.5% 2-メルカプトエタノール, 2% トリトン X-100 を含む)を用いた。

純化試料の紫外吸収曲線を Fig. 12 に示した。本ウイルスは波長 260 nm に最大値, 245 nm に最小値を持つ核蛋白特有の吸収曲線を示し, 260 nm/280 nm は 1.35 であった。 $A_{260}=1\text{ mg/ml}$ と仮定して純化標品の収量を算出すると、罹病葉

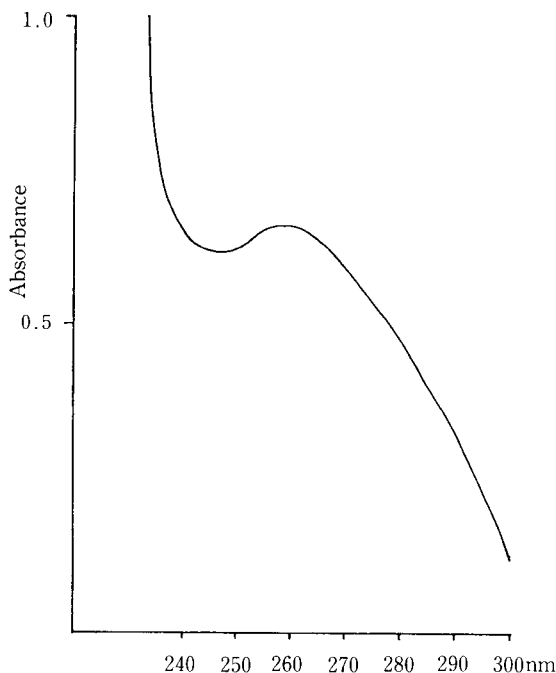


Fig. 12. UV absorption spectrum of purified CYVV.

100 g から約 4 mg のウイルスを得た。また純化標品を電顕観察した結果、Plate V の 2 に示したようにひも状粒子が多数観察された。

純化ウイルスを家兎に免疫してリングテストで力価 1,024 倍の抗血清を得た。

c) 免疫電顕法

ア. 緩衝液の種類と濃度

上記の抗血清を用いて、ウイルスをトラップする抗血清の希釈用緩衝液の種類および濃度について検討した。

供試緩衝液はりん酸緩衝液 (0.01 M, 0.05 M, 0.1 M のいずれも pH 7.0), ほう酸緩衝液 (0.05 M, 0.1 M のいずれも pH 7.0, 0.1 M の pH 8.0), トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0), 0.04 M ペロナル緩衝液 (pH 8.0) を用いた。

ソラマメ罹病葉の生体重の 10 倍希釈粗汁液を用いて、免疫電顕法によりグリッドの 1 目にトラップされたウイルス粒子数を測定した。

その結果を Table 34 に示した。0.1 M ほう酸緩衝液を用いた場合最も多数のウイルス粒子数が観察されたが、粒子像のコントラストが低く不適であった。次いで 0.05 M りん酸緩衝液 (pH 7.0) を用いた場合多数の粒子数が観察され、トラップ用抗血清の希釈緩衝液として最適であった。

イ. 抗血清濃度の検討

Table 34. Effect of buffer solutions for trapping CYVV by immune electron microscopy

Buffer solutions	pH	No. of virus particles detected ^{a)}
0.01 M phosphate	7.0	3,934 ^{b)}
0.05 M "	"	24,600
0.1 M "	"	2,294
0.05 M borate	"	4,070
0.1 M "	"	50,550 ^{c)}
0.1 M "	8.0	2,282
0.05 M tris-HCl	"	3,145
0.04 M barbital	"	4,366

a) Same as b) in Table 15.

b) Virus particles in one grid square at $\times 15,000$.

c) Virus particles were not clearly observed.

次に 0.05 M リン酸緩衝液を用いて抗血清の最適希釈濃度について検討した。

抗血清を 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で 50~12,800 倍までの 2 倍希釈系列を作り、各希釈抗血清をトラップ用に用い、ソラマメ罹病葉の生体重の 10 倍希釈粗汁液を用いてグリッドにトラップされたウイルス粒子数を測定した。

抗血清の希釈倍数とウイルス粒子数の関係を Table 35 に示した。50~6,400 倍までは希釈倍数が大きくなるに従いウイルス粒子数も増加し、6,400 倍希釈において最も多くの粒子数が観察された。

ウ. 免疫電顕法, ダイレクトネガティブ染色法および接種検定によるウイルスの検出

0.1 M リン酸緩衝液でソラマメ罹病葉の生体重の 10^1 ~ 10^8 倍までの 10 倍希釈系列を作り、各希釈液の半量を *Chenopodium amaranticolor* の 4 葉へ接種し、残りの半量を免疫電顕法および DN 法によりウイルスを検出し比較を行った。

免疫電顕法では 10^3 ~ 10^8 倍までの希釈液にはインゲンマメの健全葉汁液を 1% の割合で添加した。結果を Table 36 に示した。免疫電顕法では 10^6 倍希釈までウイルスが検出できたのに対し

Table 35. Effect of antiserum dilutions for trapping CYVV by immune electron microscopy

Antiserum dilution	No. of virus particles detected ^{a)}
50	1,224
100	1,377
200	1,423
400	1,576
800	1,576
1,600	1,530
3,200	3,213
6,400	5,921
12,800	3,565
Physical saline solution	6

a) Same as b) in Table 15.

て、DN 法では 10^4 倍希釈まで、接種検定では 10^3 倍希釈までであった。

d) ELISA 法

ア. 抗体および酵素結合抗体濃度の検討

ELISA 法を実用化するにあたり抗体および酵素結合抗体の濃度を検討した。

マイクロプレートに吸着させる γ -グロブリンの濃度は 0.2, 1, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の 3 処理とし、酵素結

Table 36. Comparison of immune electron microscopy (IEM), direct negative staining (DN) and inoculation test for detecting CYVV in leaf extracts

Dilutions of leaf extracts	Average No. of virus particles detected ^{a)}		No. of local lesions/leaf ^{b)}
	IEM ^{c)}	DN	
10^1	30,800	1,428	19.3
10^2	6,018	612	1.0
10^3	714	26	0.3
10^4	112	3	0
10^5	19	0	-d)
10^6	6	—	—
10^7	1	—	—
10^8	0	—	—

a) Same as b) in Table 15.

b) Four healthy leaves of *Chenopodium amaranticolor* were inoculated with each dilution.

c) Add 1% (V/V) leaf extract of healthy kidney bean plants to a final volume of each dilution.

d) Not tested.

Table 37. Effect of dilutions of coating γ -globulin and enzyme conjugate for detecting CYVV by ELISA

Dilutions of enzyme conjugate	Concentration of γ -globulin ($\mu\text{g/ml}$)					
	5		1		0.2	
	D ^{a)}	H	D	H	D	H
200	>2.00	0.35 ^{b)}	>2.00	0.23	1.66	0.22
400	1.75	0.18	1.84	0.16	1.24	0.10
800	1.04	0.10	0.92	0.06	0.68	0.07

a) Diseased (D) and healthy (H) leaves were homogenized in ten times volume (W/V) of PBST-PVP.

b) ELISA absorbance values at 410 nm.

合抗体濃度は 200, 400, 800 倍の 3 処理で行った。 γ -グロブリンと酵素結合抗体の 9 組み合わせについて、ソラマメ罹病葉重の 10 倍希釈粗汁液を用いて ELISA 検定を行った。

その結果を Table 37 に示した。プレートに吸着させる γ -グロブリンの濃度は $1 \mu\text{g/ml}$ 、酵素結合抗体の濃度は 400 倍希釈が最適条件であった。

イ. 罹病葉粗汁液から病原ウイルスの検出

ソラマメ罹病葉の粗汁液を用いて、ELISA 法と接種検定のウイルス検出精度の比較を行った。

ソラマメ罹病葉を PBST-PVP を用いて生体重の $10^1 \sim 10^7$ 倍までの 10 倍希釈系列を作り、半量を ELISA 検定に供し、残りの半量を

Chenopodium amaranticolor に接種し、8 日後に局部病斑数を数えた。

その結果を Table 38 に示した。ELISA 法では 10^4 倍希釈まで検出できたのに対して、接種検定では 10^3 倍希釈までであった。

ウ. ウイルス系統間の ELISA 反応

純化試料および罹病葉粗汁液を用いて、ウイルスの検出限界および系統間の ELISA 反応を調べた。

供試ウイルスは CYVV および BYMV の 2 系統、すなわち井上 (1968) の分類によるソラマメモザイク (B) 系統 (BYMV-S)、普通 (O) 系統 (BYMV-No.121) である。

上記 3 種の抗血清は前述 (II-2-3)-a-b) の方法で作成した力価 1,024 倍 (リングテスト) のものを使用した。

CYVV および BYMV-S の純化試料を PBST-PVP で $78.125 \mu\text{g/ml} \sim 1 \text{ ng/ml}$ までの 5 倍段階希釈系列を作り、各希釈液について CYVV および BYMV-S の 2 抗体を用いてそれぞれ ELISA 検定を行った。一方、CYVV および BYMV-S, No.121 の各罹病葉を PBST-PVP を用いて生体重の $10^1 \sim 10^7$ 倍までの 10 倍希釈系列を作り、各希釈液を上記 3 系統の抗体を用いてそれぞれ ELISA 検定した。

純化試料を用いた ELISA 検定の結果を Fig.13 に示した。CYVV の抗体を用いた場合、CYVV 抗原に対して 5 ng/ml の低濃度まで検出できた。これに対して、BYMV-S 抗原は全く反

Table 38. Comparison of ELISA and inoculation test for detecting CYVV in leaf extracts

Dilutions of leaf extracts	ELISA absorbance values of diseased and (healthy) leaf	No. of local lesions/leaf ^{a)}
10^1	>2.00(0.10)	319.7
10^2	>2.00(0.09)	214.3
10^3	>2.00(0.09)	26.3
10^4	0.52(0.07)	0.7
10^5	0.12(0.06)	0
10^6	0.08(0.05)	0
10^7	0.06(0.06)	0

a) Three healthy leaves of *Chenopodium amaranticolor* were inoculated with each dilution.

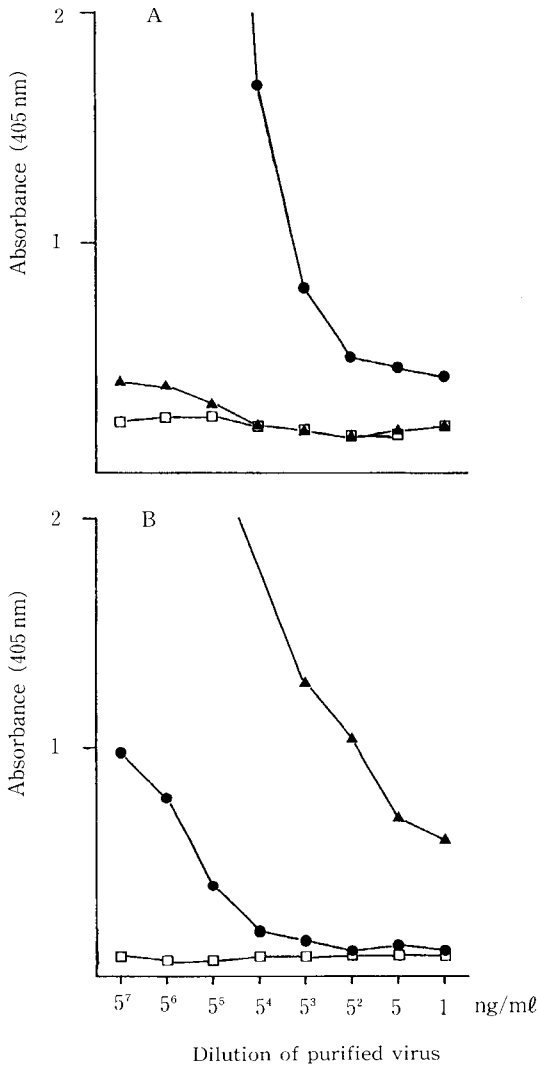


Fig. 13. Detection of CYVV in purified preparations by ELISA.

A : Polyclonal antibody against CYVV.
 B : " " against BYMV
 -S.
 ● : CYVV, ▲ : BYMV-S, □ : PBST-PVP.

応しなかった。一方、BYMV-Sの抗体を用いた場合、S抗原に対して1 ng/mlの低濃度まで検出できた。これに対して、CYVV抗原は78.125~3.125 μ g/mlの濃度まで反応が認められた。

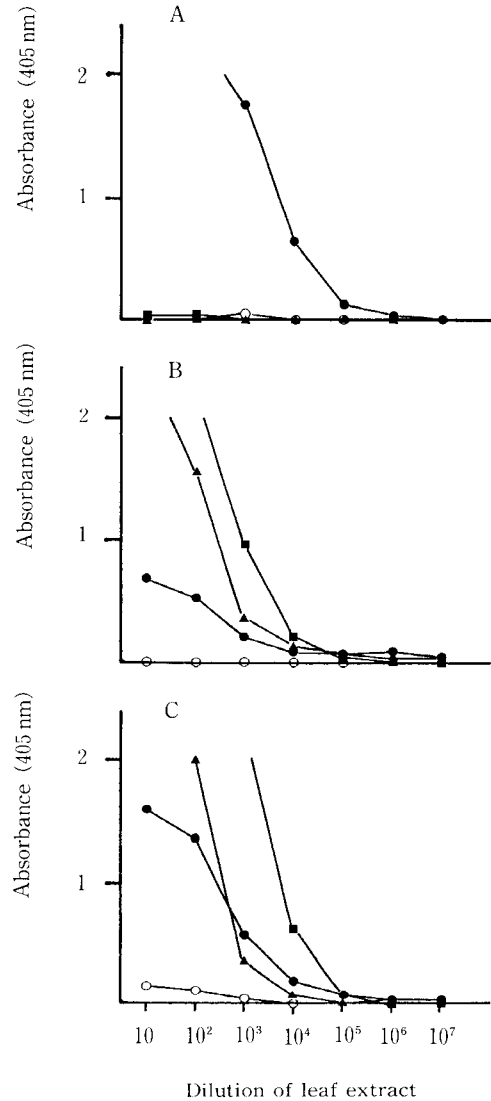


Fig. 14. Detection of CYVV in leaf extracts of infected broad bean plants.

A : Polyclonal antibody against CYVV.
 B : " " against BYMV
 -S.
 C : " " against BYMV
 -No.121
 ● : CYVV, ▲ : BYMV-S, ■ : BYMV-No.121, ○ : Healthy.

罹病葉粗汁液を用いた結果をFig.14に示した。CYVVの抗体を用いた場合、CYVV抗原に対して 10^4 倍希釈まで反応が認められたが、他の2系統は全く反応しなかった。BYMV-Sの抗体を

用いた場合、S および No.121 抗原に対して 10^3 倍希釈まで、CYVV 抗原に対して 10^2 倍希釈まで反応が認められた。BYMV-No.121 の抗体を用いた場合、No.121 抗原に対して 10^4 倍希釈まで、CYVV および BYMV-S 抗原に対して 10^3 倍希釈まで反応が認められた。

エ. 他種ウイルスの ELISA 反応

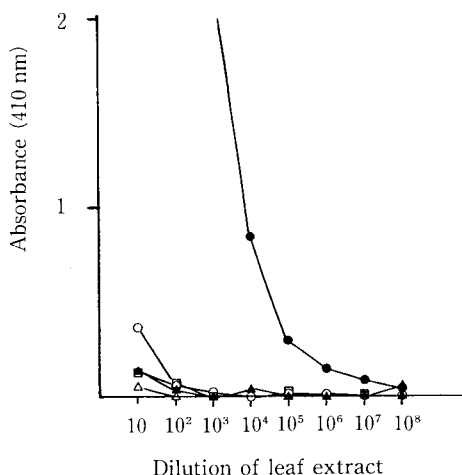


Fig. 15. Detection of turnip mosaic virus (TuMV), bean common mosaic virus (BCMV) and soybean mosaic virus (SMV) in leaf extracts of infected plants by ELISA using polyclonal antidiody against CYVV.
● : CYVV, ○ : TuMV, ▲ : BCMV, △ : SMV, □ : Healthy.

CYVV 抗体を用いて 3 種の PVY 群ウイルスの ELISA 検定を行った。

供試ウイルスは BCMV, ダイズモザイクウイルス, カブモザイクウイルスである。

各ウイルスの罹病葉を PBST-PVP を用いて生体重の $10^1 \sim 10^8$ 倍までの 10 倍希釈系列を作り、各希釈液を CYVV 抗体を用いて ELISA 検定した。

その結果を Fig.15 に示した。CYVV 抗体はカブモザイクウイルスとウイルス濃度が高い場合のみ弱い反応を示した。しかしながら、BCMV およびダイズモザイクウイルスとは全く反応しなかった。

オ. 北海道のインゲンマメから病原ウイルスの検出

北海道の各地から採集したインゲンマメのえそ症状株から病原ウイルス (CYVV) の検出を行った。

1983~1985 年の 3 年間、北海道のインゲンマメの主要栽培地帯の胆振、網走、十勝各管内のインゲンマメ (品種: 大福類, 手亡類, 虎豆類, 金時類) のほ場からえそ症状株を採集し、CYVV 抗体を用いた ELISA 法によりウイルスの検出を行った。

その結果を病徴の類似した「大福類」, 「手亡類」と「虎豆類」, 「金時類」をまとめて Table 39 に示した。「大福類」および「手亡類」からは CYVV が

Table 39. Detection of CYVV in kidney bean plants showing necrotic symptoms by ELISA

Cultivars	Year	No. of plants examined	No. of plants infected	Infected plants (%)
Ohfuku Ohtebou	1983	19	14	73.3
	1984	84	66	78.6
	1985	45	29	64.4
	Total	148	109	73.6
Toramame Taisho- Kintoki	1983	4	2	50.0
	1984	27	15	55.6
	1985	39	32	82.1
	Total	70	49	70.0

Table 40. Detection of the virus in symptomless kidney bean plants inoculated with CYVV by ELISA

No. of cultivars examined	ELISA test ^{a)}	No. of cultivars	Cultivars
25	+	3	Widusa (France), Rojo, Seafarer
	—	22	Ohtebou (Memuro), Blue Butter, Shiki-Mame, Nukamai-Mame, B. O. 19, Chillea Arrowz, Inepuisable, Shiroji-Biruma, Jolanda, G. N. 123, Amanda, Anthracnose, Michelite, Resistant-22, Kransnodaskja 19305, White Haricot, Blanco, Negro, Rojo Chiri Lagur, Frijol Arroz, Cacawte Cargo, Denprovskaja Bonba

a) + : Positive.

3年間の平均で約74%検出された。「虎豆類」および「金時類」からは70%検出された。

カ. インゲンマメ品種のウイルス抵抗性検定

ウイルス抵抗性遺伝子源の探索のため、ウイルス接種後発病しなかった品種についてウイルス感染の有無をELISA法で調べた。

供試品種は財団法人日本豆類基金協会が南米から収集したインゲンマメ218品種、および北海道立十勝農試で保存の176品種の合計394品種である。

インゲンマメを北海道立中央農試のほ場には種した後、初生葉期にウイルスを接種した。接種13～16日後に病徴観察を行った後、病徴の認められなかった25品種をELISA検定した。

その結果をTable 40に示した。供試した25品種中3品種が陽性で無病徴感染が認められた。22品種は陰性でウイルス抵抗性であった。

b. モノクローナル抗体による診断

a) モノクローナル抗体の作出

ミエローマ細胞とBYMV-Sで免疫したマウスから摘出した脾細胞を用いて細胞融合を行った。細胞融合4日後に低倍率(60倍)の顕微鏡でハイブリドーマの形成数を測定した結果、347個であった。

次いで形成されたハイブリドーマの抗体産生機能の有無をELISA法でスクリーニングし、最も

Table 41. Screening of hybridoma cells secreting BYMV monoclonal antibodies by indirect ELISA

Cell lines	CYVV	BYMV
1E4-2	0 ^{a)}	0.87
2E7-3	0	0.90
1F11-2	0.82	0.03
1A3-1	0.90	0.05

a) ELISA absorbance values at 492 nm.

抗体産生機能の高いハイブリドーマの選抜と限界希釈法によるクローニングを行った。

増殖したハイブリドーマの培養上清をELISA法で調べた結果、BYMV-Sに特異的な抗体を産生するハイブリドーマ10株、BYMV-SおよびCYVVの両ウイルスに反応する抗体を産生するハイブリドーマ11株を得た。このうちクローニングを行った結果、Table 41に示したようにBYMV-Sに特異的な抗体を産生する細胞株1E4-2, 2E7-3および両ウイルスに反応する抗体を産生する細胞株1F11-2, 1A3-1の4株を得た。

クローニングにより得た抗体産生細胞株をマウスの腹腔に注射し腹水の採取を行った。その結果マウス1頭から約6～8mlの腹水を得た。リングテストによる力価の測定を行った結果

256~2,048 倍であった。次に腹水から抗体の精製を行った結果、腹水 1 ml から約 3~4 mg の抗体を得た。

b) モノクローナル抗体による ELISA 法

ア. 抗体および酵素結合抗体濃度の検討

ELISA 法を実用化するにあたり抗体および酵素結合抗体濃度について検討した。

供試したモノクローナル抗体(以下 MoAb と略す)は 1E4-2, 1A3-1, 1F11-2 株由来のものである。マイクロプレートに吸着させる γ -グロブリン濃度は 0.2, 1, 5 $\mu\text{g/ml}$ の 3 処理, 酵素結合抗体濃度は 200, 400, 800 倍の 3 処理とした。各 9 組み合わせについて, ソラマメ罹病葉生体重の 10 倍希釈した粗汁液を用いて ELISA 検定を行い, 基質注入 30 分後に A_{405} を測定した。

その結果を Table 42 に示した。 γ -グロブリンの濃度はいずれも 1 $\mu\text{g/ml}$, 酵素結合抗体の濃度は 1F11-2 および 1E4-2 株が 400 倍, 1A3-1 株が 800 倍であった。

イ. ウイルス系統間の ELISA 反応

MoAb を用いて純化試料および罹病葉粗汁液からウイルスの検出を行い, ELISA 法の検出感度およびウイルス系統間の反応を調べた。

供試ウイルスは CYVV および BYMV-S である。

供試抗体は 1E4-2, 1F11-2, 1A3-1 の各細胞株由来のものを使用した。各系統の純化試料を 78.125 $\mu\text{g/ml}$ ~1 ng/ml までの 5 倍段階希釈系列を作り ELISA 検定を行った。一方, 各系統の罹病葉を 10~10 $\times 5^7$ 倍までの 5 倍段階希釈系列を作り, 各希釈汁液を同様に ELISA 検定した。

純化試料を用いた ELISA 検定の結果を Fig.16 に示した。1E4-2 抗体に対して BYMV-S 抗原は 0.625 $\mu\text{g/ml}$ まで反応が認められたのに対して, CYVV 抗原は全く反応しなかった。1F11-2 抗体に対して CYVV 抗原は 0.625 $\mu\text{g/ml}$ まで反応が認められたのに対して, BYMV-S 抗原は全く反応しなかった。1A3-1 抗体に対して CYVV 抗原は 0.125 $\mu\text{g/ml}$ まで反応が認められたのに対して, BYMV-S 抗原は 15.625 $\mu\text{g/ml}$ まで検出できた。

罹病葉粗汁液を用いた ELISA 検定の結果を Fig.17 に示した。1E4-2 抗体に対して BYMV-S 抗原は 10 $\times 5^5$ 倍希釈まで反応が認められたのに対して, CYVV 抗原は全く反応しなかった。1F11-2 抗体に対して CYVV 抗原は

Table 42. Effect of dilutions of coating γ -globulin and enzyme conjugate of BYMV monoclonal antibodies for ELISA

Monoclonal antibodies (cell lines)	Dilutions of enzyme conjugate	Concentration of γ -globulin					
		5		1		0.2	
		D ^{a)}	H	D	H	D	H
1F11-2	200	>2.00 ^{b)}	0.37	>2.00	0.34	>2.00	0.36
	400	>2.00	0.17	>2.00	0.17	1.40	0.21
	800	>2.00	0.18	>2.00	0.15	1.07	0.18
1E4-2	200	1.67	0.38	1.45	0.31	1.03	0.35
	400	1.35	0.25	1.12	0.20	0.70	0.24
	800	1.18	0.19	0.71	0.12	0.50	0.17
1A3-1	200	>2.00	0.32	>2.00	0.27	>2.00	0.23
	400	>2.00	0.25	>2.00	0.20	>2.00	0.14
	800	>2.00	0.22	>2.00	0.17	1.76	0.11

a) Diseased(D) and healthy(H) leaves were homogenized in ten volume (W/V) of PBST-PVP, respectively.

b) ELISA absorbance values at 410nm.

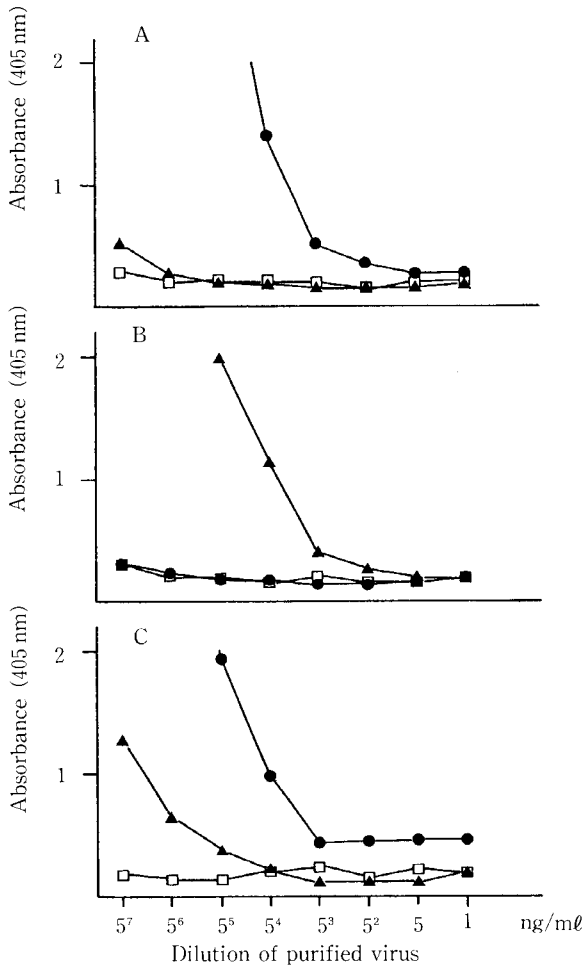


Fig. 16. Detection of CYVV and BYMV in purified preparations by ELISA using monoclonal antibodies. Monoclonal antibody: 1 F 11-2 (A), 1 E 4-2 (B), 1 A 3-1 (C). ●: CYVV, ▲: BYMV-S, □: PBST-PVP.

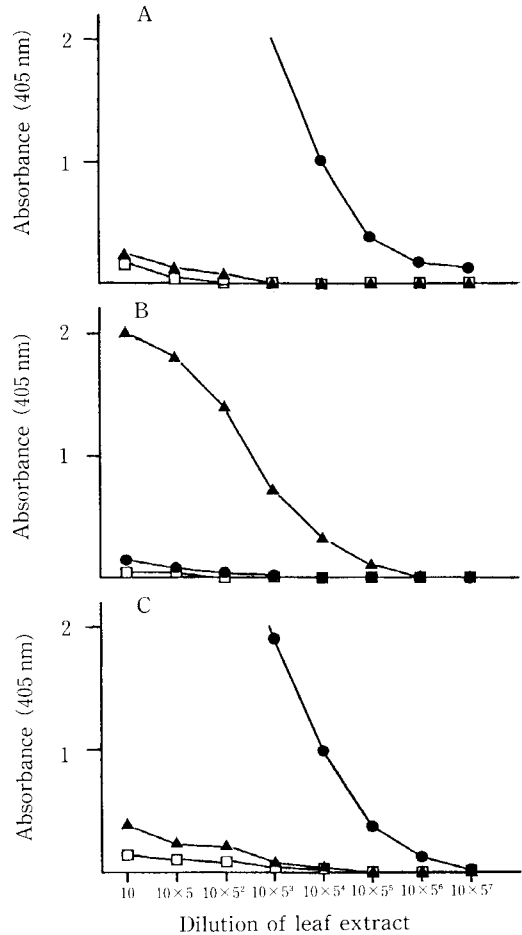


Fig. 17. Detection of CYVV and BYMV in leaf extracts of infected broad bean plants by ELISA using monoclonal antibodies. Monoclonal antibody: 1 F 11-2 (A), 1 E 4-2 (B), 1 A 3-1 (C). ●: CYVV, ▲: BYMV-S, □: PBST-PVP.

10×5⁶ 倍希釈まで反応が認められたのに対して、BYMV-S 抗原は全く反応しなかった。1 A 3-1 抗体に対して CYVV 抗原は 10×5⁵ 倍希釈まで反応が認められたのに対して、BYMV-S 抗原は 10 倍希釈まで反応が認められた。

ウ. 野外のマメ科植物から病原ウイルスの検出

ポリクローナル抗体 (以下 PoAb と略す) および MoAb を用いて現地の農家ほ場から採集した

マメ科植物からウイルスの検出を行い、抗体間の ELISA 反応を比較した。

供試材料は、1988 年 8 月に胆振管内の豊浦町 2, 洞爺村 6, 伊達市 3, 虻田町 2, 壮瞥町 7 の合計 20 筆のインゲンマメほ場から、CYVV および BYMV の典型的な病徴を示した病葉およびほ場周辺のアカクローバー (モザイク症状) とシロクローバー (無病徴) を採集し凍結保存後用いた。

PoAb は CYVV および BYMV-S に対するも

Table 43. Detection of CYVV and BYMV in leguminous plants by ELISA using polyclonal and monoclonal antibodies

Plants	Symptoms	No. of plants examined	No. of infected plants (%)				
			Polyclonal antibody		Monoclonal antibody		
			CYVV	BYMV	1E4-2	1F11-2	1A3-1
<i>Phaseolus vulgaris</i>							
cv. Kairyo-Wase-Ohfuku	Necrosis	49	43(88)	2(4)	1(2)	43(88)	42(86)
	Mosaic	2	1(50)	2(100)	2(100)	0(0)	2(100)
<i>Phaseolus vulgaris</i>							
cv. Kairyo-Toramame	Necrosis	6	6(100)	0(0)	0(0)	6(100)	6(100)
	Mosaic	2	1(33)	2(100)	2(100)	1(33)	2(100)
<i>Trifolium repens</i>	No	35	13(37)	1(3)	0(0)	24(69)	18(51)
<i>T. pratense</i>	Mosaic	11	1(9)	5(46)	0(0)	1(9)	0(0)

の, MoAb は 1E4-2, 1A3-1, 1F11-2 の各細胞株由来のものをそれぞれ使用した。

葉重の約 10 倍希釈した粗汁液について上記 5 種の抗体を用いて ELISA 検定を行った。

各植物を病徴別に類別し, ELISA 検定した結果を Table 43 に示した。「改良早生大福」および「改良虎豆」のえそ症状株からは CYVV および 1F11-2 の 2 抗体によりえそ系統が, モザイク株からは BYMV-S および 1E4-2 の 2 抗体によ

り普通系統が極めて多く検出された。しかしながら, 「改良早生大福」のえそ症状株から BYMV-S 抗体に反応するが, 1E4-2 抗体に反応しない株が, モザイク株から CYVV 抗体に反応するが, 1F11-2 抗体に反応しない株がそれぞれ 1 株認められた。

シロクローバーでは, 1F11-2 抗体による検出率が CYVV 抗体によるものに比べ高かった。しかしながら, BYMV-S 抗体に反応するが 1

Table 44. Comparison of ELISA values between polyclonal and monoclonal antibodies for detecting CYVV and BYMV in leguminous plants

Plants	No.of plants examined	No. of infected plants classified according to ELISA values (%)												
		CYVV ^{a)}			1 F 11-2			No.of plants examined	BYMV			1 E 4-2		
		0.5>	0.5-1.0	>1.0	0.5>	0.5-1.0	>1.0		0.5>	0.5-1.0	>1.0	0.5>	0.5-1.0	>1.0
<i>Phaseolus vulgaris</i>														
var. Kairyo-Wase-Ohfuku	42	8(19)	18(43)	16(38)	1(2)	1(2)	40(95)	2	1(50)	0(0)	1(50)	1(50)	0(0)	1(50)
var. Kairyo-Toramame	6	1(17)	5(83)	0(0)	0(0)	1(17)	5(83)	2	0(0)	0(0)	2(100)	0(0)	0(0)	2(100)
<i>Trifolium repens</i>	17	5(29)	9(53)	3(18)	0(0)	3(18)	14(82)	— ^{b)}	—	—	—	—	—	—
<i>T.pratense</i>	1	1(100)	0(0)	0(0)	1(100)	0(0)	0(0)	—	—	—	—	—	—	—

a) CYVV, BYMV : Polyclonal antibodies. 1F11-2, 1E4-2 : Monoclonal antibodies.

b) Not tested.

E4-2抗体に反応しないものがシロクローバーで1株、アカクローバーで5株認められた。

一方、1A3-1抗体によるえそ系統の検出率は全般的に1F11-2抗体に比べ低かった。ウイルスの検出された同一試料を用いて、PoAbおよびMoAbによるELISAの吸光値の比較を行った結果をTable 44に示した。吸光値は0.5以下、0.5~1.0、1.0以上の3階級に分け示した。

CYVVおよび1F11-2抗体を比較すると、インゲンマメ2品種およびシロクローバーの場合CYVV抗体では0.5~1.0の値を示したものが多かったのに対して、1F11-2抗体では1.0以上の値を示したものが多かった。一方、BYMV-Sおよび1E4-2抗体を比較すると、インゲンマメの2品種とも吸光値に差が認められなかった。

4) 発生生態と防除

a. ウイルス病および媒介アブラムシの生態

a) 伝染源

ア. ほ場内におけるウイルス病の発生分布
インゲンマメほ場における畦の位置と本病の発生状況について調べた。

1981~1985年に北海道のインゲンマメ主要栽培地域の胆振管内を7月下旬~8月上旬に、網走、十勝管内を8月上旬~下旬にウイルス病の調査を行った。調査ほ場数は1981年が胆振29、網走11、十勝11の合計51筆、1982年が胆振25、網走17、十勝25の合計67筆、1983年が胆振19筆、1984年が胆振17、網走10、十勝7の合計34筆、1985年が胆振12、網走7、十勝6の合計25筆であった。調査方法はほ場周辺の雑草に最も近い畦からほ場の中心部へ向かって順に3畦を選定し、各畦について任意に連続して100株調査した。ほ場の中心部のインゲンマメについては任意に200株を選び調査を行った。

その結果をFig.18に示した。各年次ともほ場の最外側の畦が最もウイルス病の発生が多く、中心部へ向かうに従い減少した。

イ. ほ場周辺の雑草から病原ウイルスの検出

ほ場周辺の雑草から病原ウイルスの検出を行い、伝染源植物の探索を行った。1984年にウイル

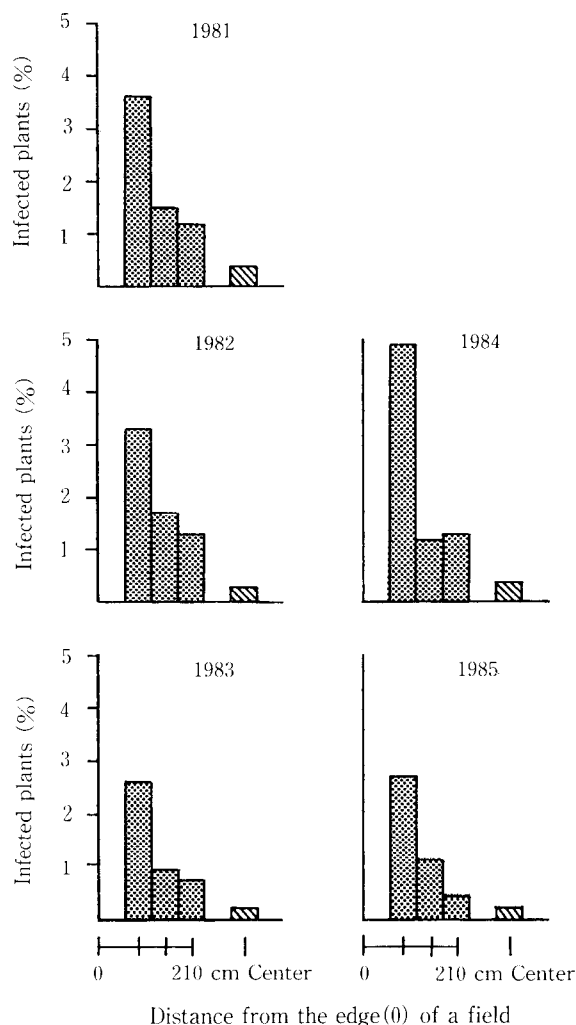


Fig. 18. Relations between the distance from the edge of a field and the incidence of CYVV at 1981~1985.

ス病の発生が多かった胆振管内の洞爺村および壮瞥町のインゲンマメ（品種：大福）のほ場周辺から主要な雑草を採集した。各雑草をCYVVのPoAbを用いてELISA検定した。

結果をTable 45に示した。壮瞥町のほ場ではシロクローバー33株中8株からウイルスが検出された。しかしながら、アオビユ (*Amaranthus retroflexus*), イヌタデ (*Polygonum longisetum*), エゾノギシギシ (*Rumex obtusifolius*), シロザ (*Chenopodium album*), アカクローバーからはウ

Table 45. Detection of CYVV in weeds by ELISA

Locality	Wild plant	No. of plants examined	No. of plants infected
Soubetsu	<i>Amaranthus retroflexus</i> L.	4	0
	<i>Polygonum longisetum</i> De Bruyn.	3	0
	<i>Rumex obtusifolius</i> L.	5	0
	<i>Chenopodium album</i> L.	2	0
	<i>Trifolium repens</i> L.	33	8
	<i>Trifolium pratense</i> L.	10	0
Tohya	<i>P. longisetum</i> De Bruyn.	4	0
	<i>P. nepalense</i> Meisn.	3	0
	<i>P. aviculare</i> L.	4	0
	<i>Plantago asiatica</i> L.	1	0
	<i>Amphicarphaea edgeworthii</i> Benth. var. <i>japonica</i> Oliver	5	0
	<i>T. repens</i> L.	23	4
	<i>Oxalis stricta</i> L.	8	0

イルスが検出されなかった。洞爺村のほ場ではシロクローバー23株中4株からウイルスが検出されたが、イヌタデ、オオバコ (*Plantago asiatica*), タニソバ (*Polygonum nepalense*), ミチヤナギ (*Polygonum aviculare*), ヤブマメ (*Amphicarphaea edgeworthii* var. *japonica*), エゾタチカタバミ (*Oxalis stricta*) のいずれから検出されなかった。

ウ. ほ場周辺のクローバー類から病原ウイルスの検出

1984～1985年の2年間、北海道内のインゲンマメほ場周辺および道路沿いに自生しているクローバー類を1ほ場1～30株ずつ任意に採集し、CYVVおよびBYMV-SのPoAbを用いてELISA法で検定した。採集地点数は胆振24、網走16、十勝15、上川1、空知2、日高2、渡島6、松山3の合計69地点であった。

結果をTable 46に示した。CYVVのシロクローバーからの検出率は胆振、網走、十勝、上川で比較的高く、空知、日高、渡島、松山で低かった。各支庁内における市町村間の検出率はほぼ同程度で大差が認められなかった。一方、アカクローバーからの検出率は全般的に低く、最も高い場合で日高の15%であった。BYMVのシロクロー

バーからの検出率はいずれの地域も極めて低く、最も高い場合で日高の5%であった。一方、アカクローバーからの検出率は地域間差が認められ、十勝、日高で比較的高かったがその他の地域では低かった。

b) ウイルス媒介アブラムシ類の発消長

ア. 粘着式トラップによる有翅アブラムシ類の飛来消長

ア) トラップの設置場所と有翅アブラムシ類の捕獲量

粘着板の設置場所および高さとの有翅アブラムシ類の捕獲量の関係について調べた。

1981年に北海道立中央農試のインゲンマメほ場において、粘着剤を噴霧した黄色の円筒（塩化ビニール製、直径14 cm、長さ30 cm）を5カ所に設置し、6月下旬～7月下旬までの期間、5日間隔で円筒に付着した有翅アブラムシ数を調査した。円筒の設置場所はつる性インゲンマメ（品種：改良早生大福）ほ場中央部の高さ30 cmおよび2 mの2カ所、わい性インゲンマメ（品種：大正金時）ほ場中央部の高さ30 cmの1カ所、インゲンマメほ場周辺の裸地の高さ30 cmおよび2 mの2カ所の合計5カ所で試験を行った。

その結果をFig.19に示した。有翅アブラムシ

Table 46. Detection of CYVV and BYMV in clover plants by ELISA

District	Locality	No. of fields surveyed	White clover			Red clover		
			No. of plants examined	CYVV infected(%)	BYMV infected(%)	No. of plants examined	CYVV infected(%)	BYMV infected(%)
Iburi	Date	6	71	43.7	0	28	0	0
	Soubetsu	8	154	39.6	0	41	4.9	4.9
	Abuta	4	45	40.0	4.4	13	7.7	30.8
	Toyoura	2	32	43.8	0	10	0	0
	Tohya	3	62	30.6	0	10	0	0
	Hobetsu	1	8	12.5	62.5	1	0	0
	Total	24	372	38.7	1.9	103	2.9	5.8
Abashiri	Oketo	3	54	50.0	0	12	0	0
	Rubeshibe	5	63	54.0	7.9	28	0	14.3
	Kitami	5	60	35.0	0	26	3.8	0
	Tsubetsu	1	22	36.4	0	9	11.1	0
	Tanno	1	4	0	0	3	0	0
	Memambetsu	1	— ^{a)}	—	—	2	50.0	0
	Total	16	203	44.3	2.5	80	3.8	5.0
Tokachi	Ashoro	5	89	44.9	1.1	32	0	12.5
	Ikeda	2	34	17.6	0	5	0	60.0
	Toyokoro	1	21	38.1	0	5	0	60.0
	Shikaoi	4	47	19.1	6.4	11	0	18.2
	Memuro	1	21	57.1	0	5	0	60.0
	Honbetsu	2	14	50.0	21.4	4	0	25.0
	Total	15	226	36.3	3.1	62	0	25.8
Kamikawa	Kamikawa	1	5	60.0	0	6	0	0
Sorachi	Fukagawa	1	3	0	0	1	0	0
	Chippubetsu	1	1	0	0	1	0	0
	Total	2	4	0	0	2	0	0
Hidaka	Biratori	1	13	23.1	0	8	25.0	62.5
	Hidaka	1	9	11.1	11.1	5	0	20.0
	Total	2	22	18.2	4.5	13	15.4	46.2
Oshima	Yakumo	4	38	7.9	0	4	0	0
	Hakodate	2	24	33.3	0	—	—	—
	Total	6	62	17.7	0	4	0	0
Hiyama	Assabu	3	33	3.0	0	10	0	0

a) Not tested.

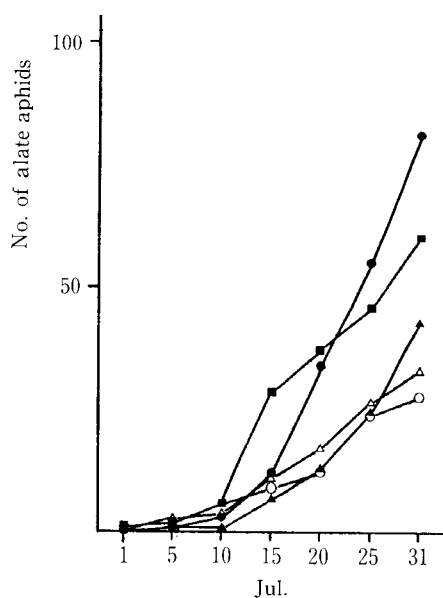


Fig. 19. Relations between the location of cylindrical yellow sticky traps and the number of alate aphids trapped.
At a height of 30 cm (●) and 2 m (○) in a bare land,
at a height of 30 cm (▲) and 2 m (△) in a kidney bean field of cv. Kairyō-Wase-Ohfuku,
at a height of 30 cm (■) in a kidney bean field of cv. Taishō-Kintoki.

の捕獲数は円筒の設置場所に関係なく7月上旬まではほぼ同数であったが、それ以降差が認められた。インゲンマメは場周辺の裸地の方がほ場内よりも、また低位置(30 cm)に設置した方が高位置(2 m)のものより有翅アブラムシの捕獲数が多かった。

イ) 粘着式トラップによる有翅アブラムシ類の飛来調査

1981~1982年の2年間、北海道立中央農試のインゲンマメほ場周辺の裸地の高さ30 cmの位置に粘着剤を噴霧した黄色の円筒を設置した。調査は1981年では6月20日~7月31日まで、1982年では6月20日~8月31日までの期間、それぞれ5日間隔で円筒に付着したアブラムシ数を調べた。

結果をFig.20に示した。有翅アブラムシ類の

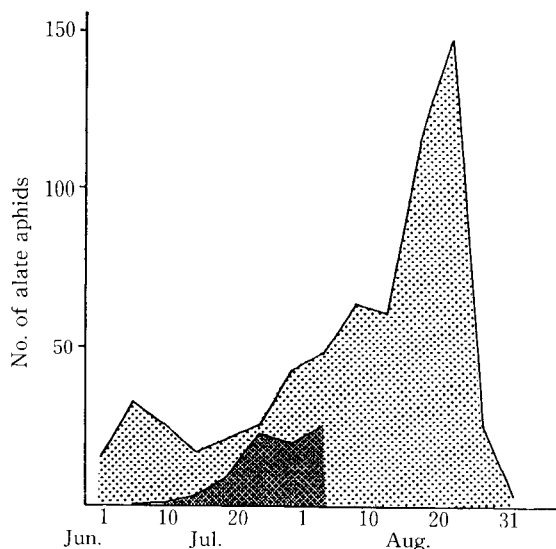


Fig. 20. The number of alate aphids caught on cylindrical yellow sticky traps at 1981~1982.
1981: 1982:

捕獲は1981年および1982年とも6月下旬から始まったが、その後の捕獲数は両年では大きく異なり、1982年の捕獲数が1981年に比べ著しく多かった。飛来のピークは1981年では7月中旬に認められたが、8月以降は台風の影響でインゲンマメが枯死したため不明であった。一方、1982年では6月下旬、8月中旬の2回認められ、8月中旬に最大のピークを示した。

イ. 黄色水盤による有翅アブラムシ類の飛来消長

1983~1985年の3年間、北海道立中央農試のインゲンマメほ場周辺の裸地に黄色水盤(鉄製、縦22.5 cm、横16.5 cm、深さ3.3 cm)を地上約30 cmの高さに設置した。調査は6月20日~8月31日までの期間、1~2日間隔で飛来した有翅アブラムシ数を調べた。

結果をFig.21に示した。有翅アブラムシは3年間とも6月下旬には既に発生が認められた。その後の捕獲数は年次により異なり、1985年が最も多く1983年が最も少なかった。飛来のピークは1983年では7月下旬の1回のみであったが、1984年では8月上旬、中旬の2回認められ、8月上旬

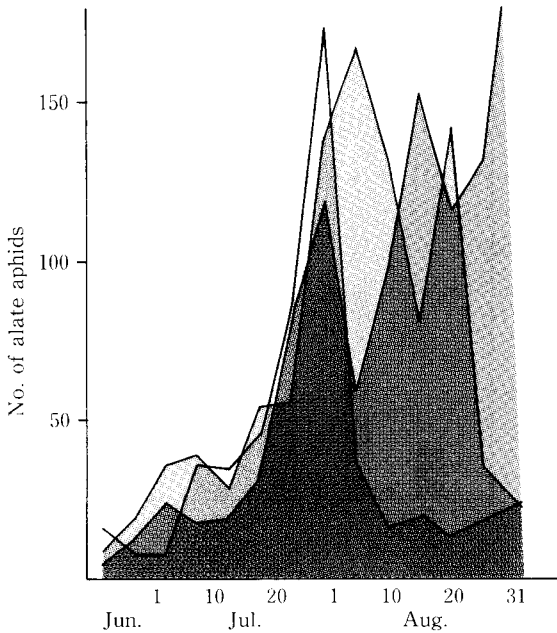


Fig. 21. The number of alate aphids caught in yellow water pan traps at 1983~1985.
□ : 1983, □ : 1984, ■ : 1985.

に最大のピークを示した。1985年では7月下旬，8月中旬，下旬の3回認められ，8月下旬に最大のピークを示した。

ウ．インゲンマメに寄生するアブラムシ類の発生消長

1981~1982年の2年間，北海道立中央農試のインゲンマメほ場において6月~8月までの期間，5~7日間隔でアブラムシ類の寄生数を調べた。

その結果を Fig. 22 に示した。1981年ではアブラムシの初発日は7月1日，寄生のピークは7月上旬と下旬の2回認められたが，8月以降台風の影響でインゲンマメが枯死したため調査不能であった。1982年では初発日は7月5日，寄生のピークは7月下旬と8月下旬の2回認められた。アブラムシ類の寄生総数は1982年が1981年に比べ著しく多かった。

ｃ）ウイルス病の発生推移

ア．ほ場内におけるまん延

1981年5月27日，北海道立中央農試ほ場にインゲンマメをA区（110株），B区（216株）の2



Fig. 22. The number of aphids counted on kidney bean plants at 1981~1982.
□ : Alatae, ■ : Apterae.

カ所には種した。発芽後自然感染によるウイルス病の発生時期およびほ場内の発生位置を調べた。

その結果を Fig. 23 に示した。A, Bの両区とも8月上旬に1株発生が認められ，その後8月下旬に発生が増大した。その分布は一部集中している場合も認められたが散発的であった。

イ．農家ほ場における発生の推移

現地の同一農家ほ場を7月と8月の2回調査を行い，時期別のウイルス病の発生状況を調べた。

1981年に胆振管内のインゲンマメ（品種：大福）のほ場4カ所（豊浦町，虻田町各1カ所，伊達市2カ所）について7月20日（開花始め~開花期）と8月31日（莢黄変期）の2回ウイルス病の調査を行った。調査は1ほ場について500~1,400株を任意に抽出し，発病株率を調べた。

その結果を Fig. 24 に示した。各ほ場とも7月下旬に比べ8月下旬では発病が著しく増大し，虻田町のほ場では約20倍に増大した。7月下旬に発

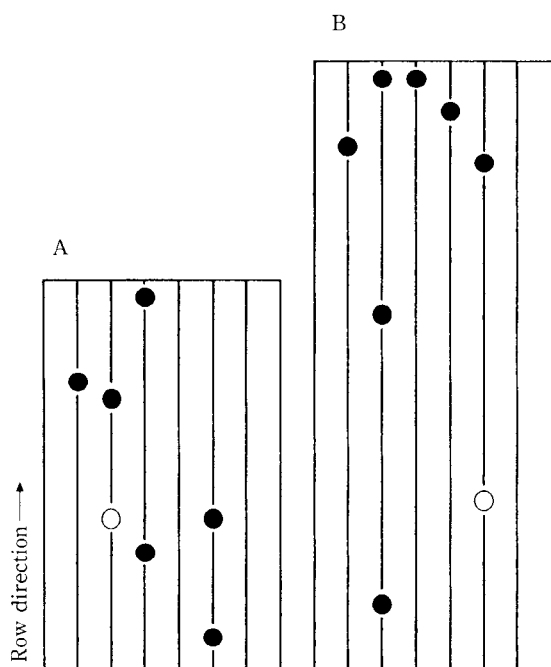


Fig. 23. Spread of CYVV in a kidney bean field. Symptoms appeared on Aug. 3(○) and 21(●).

生の多かったほ場ほど8月下旬の発病も増大する傾向が認められた。

b. 防除

a) アブラムシ防除によるウイルス病の伝搬防止試験

本病の媒介者であるアブラムシ類を防除することによるウイルス病の伝搬防止効果の可否を検討した。

試験は北海道立中央農試ほ場には種した「改良早生大福」において行った。

ア. 1981年の試験

1区面積(株数)は0.4a(110株)~0.8a(216株)で防除区および無防除区の2処理を2反復で行った。防除区は5月27日のは種時にエチルチオメトン粒剤を施用後、7月24日にMPP乳剤を散布した。アブラムシ調査は6月25日、7月1日、8日、13日、17日、23日、27日、8月3日の合計8回行った。発病調査は発芽後~8月21日まで

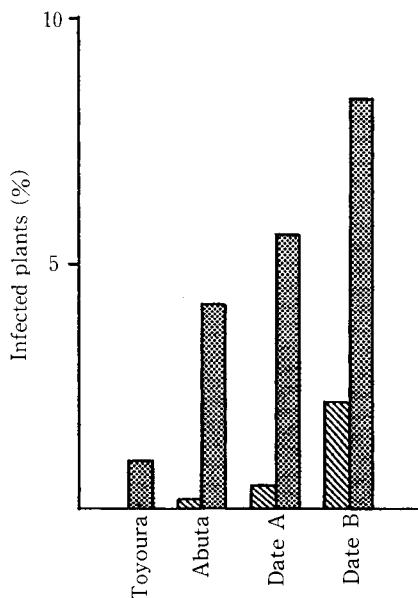


Fig. 24. The incidence of CYVV at the early and late stages of kidney bean plants. Field survey were carried out on Jul. 20 (hatched) and Aug. 31 (solid).

の期間、1~2日間隔で全株調査し、発病株率を調べた。

イ. 1983年の試験

1区面積(株数)は2.2a(600株)で防除区および無防除区の2処理を反復なしで行った。防除区は6月8日、7月28日の2回MEP乳剤を散布し、7月28日にエチルチオメトン粒剤を株元に施用した。発病調査は7月27日、8月19日、22日の合計3回全株調査し、発病株率を調べた。

ウ. 1984年の試験

1区面積(株数)は0.4a(104株)で防除区および無防除区の2処理を2反復で行った。防除区は5月28日のは種時にエチルチオメトン粒剤を施用した後、7月20日、27日、8月3日、10日、17日の合計5回MPPおよびMEP乳剤を散布した。伝染源としてウイルスを接種したアカクロバー(品種:メジウム)を7月5日にほ場に移植した。モモアカアブラムシの無翅虫および有翅虫を7月21日、8月14日、20日の3回アカクロバー上に放した。アブラムシ調査は7月11日、30日、8月25日の3回行った。発病調査は7

月 11 日, 30 日, 8 月 31 日の 3 回全株調査し, 発病株率を調べた。

エ. 1985 年の試験

1 区面積 (株数) は 0.9 a (240 株) で防除区および無防除区の 2 処理を反復なしで行った。防除区は 5 月 21 日のは種時と 7 月 11 日の 2 回エチルチオメトン粒剤を施用した後, 7 月 25 日, 8 月 7 日, 15 日の 3 回 MPP および MEP 乳剤を散布した。伝染源としてウイルスを接種したシロクロバー (品種: ニュージーランド) を 7 月 11 日にほ場に移植した。モモアカアブラムシの無翅虫および有翅虫を 8 月 9 日, 23 日の 2 回シロクロバー上に放した。アブラムシ調査は 7 月 30 日, 8 月 6 日の 2 回行った。発病調査は 7 月 30 日, 8 月 6 日, 30 日の 3 回全株調査し, 発病株率を調べた。

1981 年の試験結果を Table 47 に示した。アブラムシ総数は防除区が無防除区に比べ, 無翅虫が約 90%, 有翅虫が約 45% それぞれ減少し防除効果が認められた。発病株率は 8 月 3 日, 21 日の調査

とも防除区での発生が認められず, ウイルス病の伝搬防止効果が認められた。

1983 年の試験結果を Table 48 に示した。ウイルス病の発生は 7 月下旬から認められ, その後 8 月下旬までまん延増大した。3 回の調査とも防除区, 無防除区とも発病株率に大差がなく, ウイルス病の伝搬防止効果は認められなかった。

1984 年の試験結果を Table 49 に示した。アブラムシ総数は防除区が無防除区に比べ, 無翅虫が約 90%, 有翅虫が約 30% それぞれ減少し防除効果が認められた。ウイルス病の発生は 7 月下旬から認められたが, 8 月下旬の最終調査では防除区は無防除区の約 2 倍の発生を示し, ウイルス病の伝搬防止効果は認められなかった。

1985 年の試験結果を Table 50 に示した。アブラムシ総数は防除区が無防除区に比べ, 無翅虫が約 75% 減少し防除効果が認められたが, 有翅虫はほとんど差が認められなかった。ウイルス病の発生は 7 月下旬から認められたが, 3 回の調査いずれも防除区が無防除区よりも発生が多く, ウイル

Table 47. Effect of insecticides on the incidence of CYVV in kidney bean fields (1981)

Insecticides	Infected plants(%)		No. of aphids counted ^{a)}	
	Aug. 3	Aug. 21	Alatae	Apterae
Disulfoton + fenthion	0	0	36	18
Non-treated	0.6	4.0	65	149

a) Total number of aphids counted on 400 kidney bean plants.

Table 48. Effect of insecticides on the incidence of CYVV in kidney bean fields (1983)

Insecticides	Infected plants(%)		
	Jul. 27	Aug. 9	Aug. 22
Disulfoton + fenitrothion	0.3	2.5	5.0
Non-treated	0.8	2.8	3.3

Table 49. Effect of insecticides on the incidence of CYVV in kidney bean fields (1984)

Insecticides	Infected plants(%)			No. of aphids counted ^{a)}	
	Jul. 11	Jul. 30	Aug. 31	Alatae	Apterae
Disulfoton + fenthion + fenitrothion	0	1.5	19.7	9	63
Non-treated	0	1.5	10.6	13	592

a) Total number of aphids counted on 150 kidney bean plants.

Table 50. Effect of insecticides on the incidence of CYVV in kidney bean fields (1985)

Insecticides	Infected plants(%)			No. of aphids counted ^{a)}	
	Jul. 30	Aug. 6	Aug. 30	Alatae	Apterae
Disulfoton + fenthion + fenitrothion	0.4	0.8	19.2	7	31
Non-treated	0	0	13.8	6	124

a) Total number of aphids counted on 50 kidney bean plants.

ス病の伝搬防止効果は認められなかった。

5) 論議および結論

インゲンマメ (品種: 改良早生大福) のえそ症状から分離した病原ウイルスは、粒子の形態と長さ、寄主範囲と病徴、物理的諸性質、アブラムシ伝搬試験、血清試験などから clover yellow vein virus (CYVV) と同定した。

CYVV に感染したインゲンマメは, Bednarek *et al.* (1988) によると莢, 種子および 100 粒重が減少したと報告されている。本実験で用いた品種, 病原ウイルスならびに接種方法は既報のものと異なったが, インゲンマメに著しい減収をもたらした。特に生育初期～中期に感染した場合ほとんど収穫皆無で, 生育後期に感染した場合でもその影響は大きく, 株当りの総重量が 40～65%, 莢数が 25～35%, 子実重が 40～60%, 100 粒重が 5～30% 減少した。ウイルス感染による減収は品種によって異なり, 「改良早生大福」および「大手亡」などのように, 激しいえそ症状を現わして枯死する品種において特に著しかった。これら品種の発病株は葉がえそを起こして枯死するため, 総重量および莢の形成数も無接種に比べ著しく少なかった。莢が形成された場合でも, 種子の形成や肥大が阻害され子実重が著しく減少した。本ウイルスは感染後発病までの潜伏期間が BCMV に比べ約 1～2 週間短く, 強い病原性と増殖力の大きさにより, インゲンマメに与える被害が甚大と思われる。CYVV は BCMV と同様に potyvirus 群に属するウイルスであるが (Hollings and Brunt, 1971 a,

b; Hollings and Stone, 1974), BCMV に比べ寄主範囲が広く, 外国においてはクローバー類 (Gibbs *et al.*, 1966; Pratt, 1968; Lucas and Harper, 1972; Barnett and Gibson, 1975; Lindsten *et al.*, 1976; Harville and Derrick, 1978; Leath and Barnett, 1981; Alconero, 1983; McLaughlin *et al.*, 1984; Forster and Musgrave, 1985; Demski *et al.*, 1986; Johnstone and McLean, 1987; McLaughlin and Boykin, 1988), インゲンマメ (Lisa and Dellavalle, 1983; Walkey *et al.*, 1987), ソラマメ (Munro, 1981), エンドウ (Kowalska, 1979), Winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus*, Fox and Corbett, 1985), ニンジン (Howell and Mink, 1981), コエンドロ (Singh and Lopez-Abella, 1971), スターチス (Lawson *et al.*, 1985), グラジオラス (Nagel *et al.*, 1983) などから分離されている。本邦ではスターチス (井上ら, 1985), エビネ (井上ら, 1986) から分離された。

CYVV はしばしば BYMV および PNV との類縁関係が問題とされる。Bos *et al.* (1977) は寄主範囲, 血清反応, 細胞質封入体から CYVV と PNV はそれぞれ同一ウイルスの系統であり, CYVV と BYMV はシロクローバー, キュウリ, *Chenopodium quinoa* での病徴が異なること, さらに血清学的にも多少異なることなどから別種のものであると結論した。Pratt (1969) によると, CYVV と BYMV は血清反応と封入体の形成パターンで異なるとされている。一方, Jones and

Diachun (1977) は, BYMV および CYVV 各分離株のインゲンマメ, ソラマメ, キュウリ, タバコ, エンドウに対する病徴と血清反応から 3 つのサブグループに分類し, Lawson *et al.* (1985) は BYMV と CYVV は寒天ゲル内拡散法でスパーを形成し, 間接 ELISA でもかなり反応することを示した。最近では, Reddick and Barnett (1983) はウイルスゲノムの cDNA を用いたハイブリダイゼーションの解析により, BYMV と CYVV は類縁関係があるが別種のものであると結論した。一方, Walkey and Webb (1984) は免疫電顕法を用いて BYMV と CYVV は近い類縁関係があると報告した。このように BYMV, PNV および CYVV の関係は複雑であるが, 今では PNV は BYMV の 1 系統 (Taylor and Smith, 1968; Bos *et al.*, 1974; Beczner *et al.*, 1976; Jones and Diachun, 1977) とするのが一般的である。

本実験に供試した分離株は, CYVV-No.36 抗血清 (Uyeda *et al.*, 1975) に対して寒天ゲル内拡散法で反応した。また, 本分離株は接種試験の結果からダイズ, アズキ, ササゲ, アカクローバー, タバコ, キュウリでの病徴は若干異なったものの, インゲンマメ, エンドウ, ソラマメに激しいえそ症状を生じ枯死に至らしめる特徴的な病徴から, 井上 (1968) の分類による BYMV-N (えそ系統) に相当すると思われた。本系統はすでに北海道内各地のインゲンマメから分離同定されており (菅野ら, 1980; 土崎ら, 1981; 上田ら, 1981; 萩田, 1986), 既報の分離株と寄主範囲および病徴について比較した結果, ダイズ, シロクローバー, タバコ, センニチコウで若干病徴が異なったものの, 本分離株は既報のものとはほぼ同一と思われる。

本ウイルスの物理的諸性質は, 既報 (Hollings and Nariani, 1965; Singh and Lopez-Abella, 1971; Hollings and Stone, 1974; Fox and Corbett, 1985; 井上ら, 1985, 1986) のものと比較すると耐熱性および耐保存性がほぼ同程度であったが, 耐希釈性がやや高かった。

本ウイルスはモモアカアブラムシ (Hollings and Nariani, 1965; Singh and Lopez-Abella, 1971; Hollings and Stone, 1974; Fox and Cor-

bett, 1985; 井上ら, 1985, 1986), エンドウヒゲナガアブラムシ (Hollings and Nariani, 1965; Hollings and Stone, 1974), チューリップヒゲナガアブラムシ (Singh and Lopez-Abella, 1971; Hollings and Stone, 1974) などで非永続的に伝搬される。本実験においてモモアカアブラムシを用いたウイルス伝搬試験の結果から, 本ウイルスは比較的よく伝搬されたが, 他のアブラムシおよび各種の病植物を用いた伝搬試験や吸汁時間と伝搬率の関係などについては未検討であった。アブラムシのウイルス伝搬率は接種源の汁液接種による継代維持の繰り返し, 温度変化や栄養状態による植物の感受性の変異, アブラムシのコロニーの新しさ, 植物の個体差および同一植物の葉位の差などにより変動し, これらの要因が実験的な伝搬率の差に大きく影響を与えるとされている (Swenson and Sohi, 1961; Swenson, 1962)。本実験では接種源を汁液接種により継代維持しているので, 用いた病葉がウイルスの伝搬試験に好適なものと言いがたかった。従って, 本実験で得たモモアカアブラムシのウイルス伝搬率は, ほ場におけるそれよりは低いものと思われた。

インゲンマメのえそ症状株 (CYVV: 井上 (1968) の BYMV-N 系統に相当), モザイク症状株 (BYMV-No.121: 井上 (1968) の BYMV-O 系統に相当), ソラマメの種子伝染株 (BYMV-S: 井上 (1968) の BYMV-B 系統に相当), アカクローバーのモザイク株 (BYMV-No.102: 系統不明) から得た CYVV および BYMV 3 分離株と BCMV 間の血清学的関係を寒天ゲル内拡散法で調べた結果, CYVV および BYMV-S 抗血清に対して BYMV-S, No.121, No.102 抗原はいずれも反応し, 沈降線が融合したので血清学的には同一と考えた。これに対して, CYVV 抗原は他の 3 抗原と分枝線を形成したので血清学的には近い関係にあるが, 同一と認められなかった。北海道のクローバー類から BYMV-N (CYVV に相当), O および P 系統に相当するウイルスが分離され, P と O 系統は血清学的に同一であるが N 系統は異なることが明らかにされている (土崎ら, 1981)。今回 B 系統に相当するウイルスの血清関係

が明らかにされたので、これらのことから CYVV はインゲンマメおよびクローバー類に発生する BYMV の 3 種の系統と血清学的に異なるものと思われる。

CYVV と BYMV の血清学的関係は全く反応しなかった (Hollings and Nariani, 1965; McLaughlin *et al.*, 1984), 程度の差はあるが異なる (Varma and Gibbs, 1967; Pratt, 1969; Bos *et al.*, 1977; Jones and Diachun, 1977; Lisa and Dellavalle, 1983; Nagel *et al.*, 1983; Walkey and Webb, 1984; Foster and Musgrave, 1985; Lawson *et al.*, 1985; Barnett *et al.*, 1987; 高橋ら, 1989) とそれぞれ報告されているが本実験の結果は後者と一致した。本実験から BCMV 抗血清に反応した BYMV-S, No.121, No.102 の 3 分離株は全く反応しなかった CYVV 分離株に比べ、血清学的に BCMV より近い関係にあることが判明した。

CYVV の免疫電顕法に関する報告は少なく、potyvirus 群の血清学的関係を調べた報告がある (Walkey and Webb, 1984)。CYVV を早期かつ簡便に検定するため免疫電顕法について検討した。ソラマメ罹病葉の粗汁液を用いてウイルスの検出精度を比較した結果、免疫電顕法は DN 法に比べ 100 倍、接種検定に比べ 1,000 倍低濃度のウイルスも検出できた。このことから、免疫電顕法が従来の DN 法や接種検定に比べ、ウイルス検出法として優れていることが明らかになった。

近年、酵素反応を利用した ELISA 法が開発され、植物ウイルスの検出に応用された (Voller *et al.*, 1976; Clark and Adams, 1977)。その簡便、高感度、迅速、定量、多数の検体を処理できるなどの優れた特徴から急速に普及し、今日では多くの植物ウイルスの検出および診断に利用されている (Bar-Joseph and Garnsey, 1981; Van Regenmortel, 1982)。ソラマメ罹病葉の粗汁液を用いてウイルスの検出精度を比較した結果、ELISA 法は接種検定に比べ 10~100 倍低濃度まで検出できた。上田・四方 (1980) によると、ソラマメへの接種検定は ELISA 法より 4 倍検出感度が高かったとし本実験結果と異なったが、これは接種検定

に用いた *Chenopodium amaranticolor* とソラマメの CYVV に対する感受性が異なることに起因すると思われる。純化ウイルスを用いて検出を行った結果、1~5 ng/ml まで検出可能で既報 (上田・四方, 1980) のものと一致した。CYVV および BYMV 2 系統を用いて ELISA 反応を調べた結果、CYVV のポリクローナル抗体 (PoAb) を用いた場合、BYMV の 2 系統は全く反応しなかった。これに対して、BYMV-S および No.121 の各 PoAb を用いた場合、CYVV は反応が認められた。抗原の濃度が異なるため比較はできないが、これらの結果は寒天ゲル内拡散法で行った結果と異なり、ELISA の方がより系統間の特異性が高いことが示唆された。またこの結果から、家兎の抗体を用いて CYVV 抗原を特異的に検出することは可能であるが、BYMV-S および No.121 抗原を特異的に検出することが困難であることが明らかになった。

ELISA 検定をほ場でのウイルス診断に利用するためには、系統間および他のウイルスとの判別が可能でなければならない。そこで CYVV と同じ PVY 群に属する BCMV、ダイズモザイクウイルスならびにカブモザイクウイルスの 3 種類のウイルスを用いて ELISA 反応を調べた結果、CYVV の PoAb に対してウイルス濃度が高い場合カブモザイクウイルスが若干反応したが、他のものは全く反応しなかった。このことから、CYVV の PoAb を用いた ELISA 検定は他のウイルスとの判別も可能で実用的であると判断した。CYVV の PoAb を用いた ELISA 法により、北海道内各地のインゲンマメのえそ症状株からウイルスの検出を行った結果、CYVV が高率で検出されたが、CYVV 以外の原因によるえそ症状も多数認められた。このことから、ウイルス病の診断には病徴による肉眼鑑定より ELISA 法が信頼度の高いことが明らかになった。

抵抗性品種の育成および利用は CYVV の有効な防除法の 1 つである。そこで抵抗性遺伝子源を探索するため国内外の約 400 品種にウイルスを接種した結果、ほとんどが罹病性であったのに対して、25 品種は無病徴で抵抗性と思われた。この 25

品種のウイルス感染の有無を調べるため ELISA 検定を行った結果、3 品種に無病徴全身感染が認められた。感染の認められなかった 22 品種については、抵抗性か否かについては今後更に検討を要する。しかしながら、これらは抵抗性品種育成のための遺伝子源として有望と思われる。その内訳は国内産 4 品種、外国産 18 品種であった。以上のように ELISA 法は迅速に検定結果が判明するばかりでなく、1 度に大量の検体を処理できるため、抵抗性品種の開発など育成系統の個体数が多い場面では有効な検定法である。

CYVV やジャガイモ Y ウイルス (PVY) のように、血清学的に関係のある複数の系統が存在するウイルスの場合、前述したように PoAb では系統間の判別が困難で (Rose *et al.*, 1987), モノクローナル抗体 (MoAb) の利用が考えられる。MoAb は Kohler and Milstein (1975) が細胞融合の技術を確立して以来、抗体生産に革命的進歩をもたらしたものである。その特徴は 1) 1 個の抗原決定基にのみ反応する抗体が得られる。2) 抗体産生細胞株は半永久的に保存可能である。3) 少量の抗体産生細胞をマウスに免疫すると、大量の抗体を含む腹水を生じる。4) 定性的、定量的に変異のない安定した特異抗体が常に得られる。など今日では 20 種以上の植物ウイルスで作出されている (Halk and De Boer, 1985)。しかしながら、BYMV に対する MoAb はまだ作出されていないので、BYMV-S 抗原をマウスに免疫し、S 抗原に特異的な MoAb の作出を試みた。純化ウイルスおよび罹病葉粗汁液を用いて作出された抗体の性質を調べた結果、S 抗原に特異的な抗体産生細胞株 (1E4-2) と S および N 抗原の両者に反応する細胞株 (1F11-2, 1A3-1) を得た。MoAb の力価は細胞株により異なり、リングテストで 256~2,048 倍を示し家兎の抗血清と大差なかった。純化ウイルスを用いて検出限界を PoAb と MoAb 間で比較すると、125~625 倍 PoAb の検出感度が勝った。1F11-2 抗体は高濃度では S 抗原に反応するが、罹病葉の 10~100 倍希釈程度の実用的検定濃度では S 抗原との反応が認められず、CYVV 抗原に特異的な抗体として利用可能で

あった。

MoAb および PoAb を用いた ELISA 法により、現地農家ほ場から採集したインゲンマメ、アカクローバー、シロクローバーからウイルスの検出を行った結果、PoAb, MoAb いずれの抗体ともインゲンマメのえそ症状株から CYVV, モザイク症状株から BYMV-S, シロクローバーの無病徴株およびアカクローバーのモザイク株から CYVV の分離頻度が高かった。しかしながら、「改良早生大福」のえそ症状株から PoAb で BYMV-S の反応が 2 例認められたのに対して、MoAb の 1E4-2 抗体では 1 例しか反応しなかった。このことから、PoAb では系統間の判別が困難であることが明らかになった。「改良早生大福」のモザイク株から PoAb で CYVV が検出されたが、MoAb の 1F11-2 抗体からは検出されなかった。同様にシロクローバーおよびアカクローバーから PoAb で BYMV-S が検出されたが、MoAb の 1E4-2 抗体からは全く検出されなかった。これらのことから、CYVV および BYMV-S の PoAb による ELISA 検定に、若干非特異的反応が生じている可能性も示唆されたが今後の検討を要する。北海道のインゲンマメのモザイク株からすでに O 系統が分離されているので (土崎ら, 1981), 今回インゲンマメのモザイク株から BYMV-S および 1E4-2 抗体を用いて検出された BYMV は O 系統と考えられる。

ウイルスに感染しているインゲンマメ、アカクローバー、シロクローバーを用いて、PoAb と MoAb による ELISA の吸光値を比較した結果、いずれの植物においても PoAb に比べ、MoAb の吸光値が高い傾向を示した。純化ウイルスの検出限界では PoAb の方が勝り、これに対して病葉を用いた吸光値は MoAb が高かった。このことから、PoAb の検出精度は純化ウイルスなど精製された試料では MoAb より勝るが、病汁液など夾雑物を含んだ試料では MoAb より劣ることが示唆された。

本病のほ場内における発生分布はほ場の端に多く、中心部では少ない傾向が認められた。そこで多発生ほ場の周辺に生育する主要な雑草から、

ELISA 法で病原ウイルス (CYVV) の検出を行った結果、シロクローバーだけから検出され本病の主要な伝染源であることが明らかになった。北海道内各地域のクローバー類から CYVV および BYMV の検出を行い、その発生分布を調べた結果、CYVV は全道各地に広く発生分布しており、特に胆振、網走、十勝、上川管内のインゲンマメ栽培地帯のほ場周辺に自生するシロクローバーに多く感染していた。一方、BYMV は十勝、日高管内のアカクローバーに比較的多く感染していた。BYMV の伝染源としてアカクローバーの草地が重要であるとされている (Hanson and Hagedorn, 1952; Hampton, 1967; Jones and Diachun, 1976; 秋田, 1981 b; Leath and Barnett, 1981; Alconero, 1983)。しかしながら、インゲンマメほ場の周辺にクローバー類の草地が少ない北海道においては、野生のシロクローバーが重要な伝染源であると思われる。

CYVV は前述したように、モモアカアブラムシ (Hollings and Nariani, 1965; Singh and Lopez-Abella, 1971; Hollings and Stone, 1974; Fox and Corbett, 1985; 井上ら, 1985, 1986), エンドウヒゲナガアブラムシ (Hollings and Nariani, 1965; Hollings and Stone, 1974), チューリップヒゲナガアブラムシ (Singh and Lopez-Abella, 1971; Hollings and Stone, 1974) などで伝搬される。ウイルス伝染源はほ場周辺の野生のクローバー類であり、有翅アブラムシによってインゲンマメほ場に伝搬される。従って、ほ場における本病の発生量は有翅アブラムシの発生量に大きく影響される。有翅アブラムシの発生消長を粘着式トラップ法で調査した結果、トラップの設置場所はインゲンマメのほ場内よりもほ場外の裸地の方が、また高さは高位置 (2 m) よりも低位置 (30 cm) にそれぞれ設置した方が、最も有翅アブラムシの捕獲数が多かった。中沢 (1974) によると、作物が栽培されたほ場で有翅虫の飛しょう消長を調べるためには、黄色水盤を裸地部分の地表面近く (地上 20 cm 程度) に設置すべきであるとされている。このことはトラップの方法は異なるものの本実験結果とも一致した。有翅ア

ブラムシは 6 月下旬から捕獲され、捕獲数は年次により異なった。飛来のピークは年間 1 ~ 2 回で、最大のピークは 7 月中旬 ~ 8 月下旬であった。アブラムシとウイルス病の関係について、Jayasena and Randles (1985) は浸透性殺虫剤処理によりアブラムシの寄生数を抑えたが、BYMV の伝搬を防止できなかったことから、BYMV のまん延にはモモアカアブラムシおよびチューリップヒゲナガアブラムシの有翅虫が関与していると報告した。農試ほ場における自然感染によるインゲンマメの発病株の分布は散発傾向であり、ウイルスの伝搬に有翅虫が関与していることが示唆された。現地ほ場におけるウイルス病の発生は 8 月以降に増大した。これらのことから、感染から発病までの潜伏期間を約 3 週間程度とすると、7 月中 ~ 下旬の有翅アブラムシがウイルスの伝搬に重要であることが示唆された。

Jayasena and Randles (1984) はソラマメの発病株の分布を調べ、BYMV の 2 次伝搬は感染源植物の外に集中的に発生すると報告した。しかしながら、本実験において現地インゲンマメほ場のウイルス病調査から、発病株はほ場の端に多く中心部で少なかった。このことから、「大福類」および「虎豆類」のようなつる性のインゲンマメではソラマメと異なり、草丈が高く茎葉も繁茂するので、アブラムシの株間の移動が困難なため 2 次伝搬が起こりにくいことも考えられた。

ウイルス病を防除するためには媒介者であるアブラムシを防除し、伝搬を防止できるか否か検討した。その結果、防除区はアブラムシ無翅虫をよく抑えたが有翅虫の減少度合いはそれより少なかった。ウイルス病の伝搬防止効果は 4 試験中 1 試験で認められたが、3 試験では認められなかった。このことから、CYVV のようにウイルス伝染源がほ場外にある場合、有翅虫がウイルス伝搬の主体であるので、インゲンマメほ場のみを対象としたアブラムシの防除だけではウイルスの伝搬を阻止することは困難と思われる。Leuck *et al.* (1962) によると、処理区間を 400 m 離れた条件下で浸透性殺虫剤でアブラムシの寄生を抑えた場合、黄花ルーピンの BYMV の 2 次伝搬を防止で

きたとされている。一方, Jayasena and Randles (1985) は処理区間を 5 m 離れた条件下でアブラムシを防除しても, BYMV の伝搬を防止できなかったとした。両者の結論の違いは処理区外からのウイルス伝搬が起こったか否かであると思われる。BYMV の伝染源は CYVV 同様に主体がほ場外の雑草および草地のクローバー類と考えられるので, ほ場内における 2 次伝搬よりもほ場外からの 2 次伝搬の方が重要と考えられる。従って, アブラムシの防除によるウイルス伝搬防止効果に対する評価としては, Jayasena and Randles および本実験結果の方が妥当と思われる。

III. ダイズわい化ウイルス

1. 実験材料および方法

1) 供試ウイルス

SDV のわい化 (D) 系統は, 北海道立中央農試ほ場の周辺に自生していたアカクローバーから分離し, 同じく黄化 (Y) 系統は当時畑作部で継代維持してあった病株を分譲してもらい使用した。各系統をジャガイモヒゲナガアブラムシを用いてダイズ (品種: 白鶴の子) に接種し, 25~50 日後の病葉を供試した。

2) ウイルスの接種方法

SDV 罹病葉上にジャガイモヒゲナガアブラムシを 2 昼夜放置して獲得吸汁させた。次にダイズ

Infected leaves	Homogenize with 2 vol(V/V) 0.5 M citrate buffer, pH 6.0 containing 1% Driselase and 0.1% thioglycollic acid Incubate at 25°C for 2 hr. with shaking Add 1/2 vol(V/V) of a chloroform and n-butanol(1 : 1) Incubate at 25°C for 30 min. with shaking Centrifuge at 5,000 rpm for 15 min.
Supernatant	Add 8% PEG and 0.4 M NaCl Stir for 30 min. and stand for 30 min. at room temperature Centrifuge at 8,000 rpm for 15 min.
Pellet	Resuspend in 0.01 M phosphate buffer Keep overnight at -20°C Thaw and centrifuge at 3,000 rpm for 15 min.
Supernatant	Centrifuge at 32,000 rpm for 2.5 hr.
Pellet	Resuspend in 0.01 M phosphate buffer, pH 7.6 Centrifuge at 10,000 rpm for 15 min.
Supernatant	Centrifuge at 40,000 rpm for 1.5 hr.
Pellet	Resuspend in 0.01 M phosphate buffer, pH 7.6 Centrifuge at 10,000 rpm for 15 min.
Supernatant	Rate zonal centrifuge at 23,000 rpm for 3 hr. in 10-40% sucrose density gradient
Virus zone	Centrifuge at 40,000 rpm for 2 hr.
Purified virus	

Fig. 25. Purification of SDV

の幼植物上に1株当たり5～7頭ずつ2昼夜放置して接種吸汁させた後、ピリミカーブ（ピリマー）水和剤の1,000倍液を散布して殺虫した。

3) ウイルスの純化

ウイルスの純化材料はSDVのわい化(D)系統接種26～30日後のダイズ(品種:白鶴の子)の病葉を用いた。純化の方法はTakanami and Kubo (1979)に準じて行いFig.25に示した。高速遠心分離はコントロンT 2060超遠心分離機を用い、TFT 70.38ロータで35,000 rpm, 120分間行った。ショ糖密度勾配遠心分離はTST 28.38/17ロータで23,000 rpm, 180分間行った。純化標品の紫外外部吸収スペクトルの測定は日立U 3200形自記分光光度計を用いた。電顕観察は日本電子JEM 100 CX II型電子顕微鏡を用いて行った。

純化ウイルスの紫外外部吸収曲線はFig.26に示した。本ウイルスは波長258 nmに最大値, 245 nmに最小値を示す核蛋白特有の吸収曲線を示し, 260

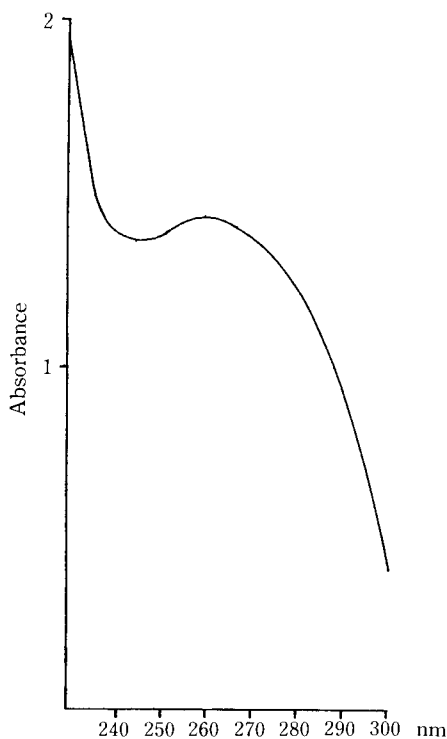


Fig. 26. UV absorption spectrum of purified SDV.

nm/280 nm は1.42であった。 $A_{260}=5.0$ を1 mg/mlと仮定して純化標品の収量を算出すると、罹病葉1 kg から約0.6 mgのウイルスが得られた。純化ウイルスを電顕観察した結果、Plate Vの3に示したように直径約25 nmの球状粒子が多数検出された。

4) ウイルス抗血清の作出と抗体の精製

純化ウイルス1回30 μ gを家兎に筋肉注射3回、静脈注射1回それぞれ1週間間隔で行い免疫した。最終注射10日後に部分採血を行い、リングテストによる力価の測定を行った。抗血清から抗体の精製は硫酸塩析法で行った。

リングテストで抗血清の力価を測定した結果2,048倍であった。抗血清から抗体の精製を行った結果、抗血清1 mlから約13.8 mgの抗体蛋白質が得られた。

5) ELISA 法

ELISA法を実施するに当り、抗体および酵素結合抗体の適正濃度について検討を行った。

マイクロプレートに吸着させる γ -グロブリンの濃度は0.2, 1, 5 μ g/mlの3処理とし、酵素結合抗体濃度は200, 400, 800の3処理で行った。 γ -グロブリンと酵素結合抗体の9組み合わせについて、ダイズ罹病葉重の10倍希釈粗汁液を用いてELISA検定を行った。

抗体および酵素結合抗体濃度とELISA値の関係をTable 51に示した。この結果、抗体濃度1 μ g/ml, 酵素結合抗体濃度800倍がELISAの条

Table 51. Effect of dilutions of coating γ -globulin and enzyme conjugate for detecting SDV by ELISA

Dilutions of enzyme conjugate	Concentration of γ -globulin (μ g/ml)					
	5		1		0.2	
	D ^{a)}	H	D	H	D	H
200	1.95 ^{b)}	0.14	1.82	0.04	0.65	0.07
400	1.92	0.06	1.79	0.10	0.61	0.10
800	1.65	0.03	1.53	0.02	0.56	0.01

a) Diseased(D) and healthy(H) leaves were homogenized in a hundred times volume(W/V) of PBST-PVP, respectively.

b) ELISA absorbance values at 410 nm.

件として最適であった。

2. 実験結果

1) 病徴

本病はダイズわい化ウイルス (soybean dwarf virus, SDV) の黄化 (Y) 系統によって引き起こされる。インゲンマメにおける病徴は Plate IV の 1, 2 のごとく、葉脈間が退緑、黄化し、葉脈の部分のみが緑色に残る。葉は粗剛で触れるとごわごわした感じがする。甚だしい場合は株全体が黄化する。古い葉では表面に不定形の茶褐色のえそを生じ、部分的に黒いすす状の糸状菌が付着する場合がある。北海道で栽培されている主要品種の「虎豆類」, 「金時類」および「手亡類」などに発生し、なかでも「金時類」での発生が多く、近年十勝管内の山間部で多発し問題となっている。これに対して、品種「大福」は本病に感染しないとされており (玉田ら, 1973; 玉田, 1975), 今日まで発生の報告はない。

2) 病原ウイルスの診断

a. ウイルス系統間の ELISA 反応

ELISA 法によるウイルスの検出精度と系統間の反応を明らかにするため、純化ウイルスおよび罹病葉粗汁液を用いてウイルスの検出を行った。

SDV のわい化 (D) および黄化 (Y) 系統の各純化ウイルスを PBST-PVP を用いて $10 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 0.64 \text{ ng}/\text{ml}$ までの 5 倍段階希釈系列を作り、各希釈液について D 系統の抗体を用いて ELISA 検定した。一方、SDV-D および Y の病葉をそれぞれ PBST-PVP を用いて $10 \sim 10 \times 5^9$ 倍までの 5 倍段階希釈系列を作り、各希釈液について同様に、D 系統の抗体を用いて ELISA 検定した。

純化ウイルスを用いてウイルスの検出を行った結果を Fig. 27 に示した。SDV-D および Y の 2 抗原とも $16 \text{ ng}/\text{ml}$ まで検出できた。一般的に Y 抗原の吸光値が高かったが、系統間では大きな差が認められなかった。

一方、罹病葉粗汁液を用いてウイルスの検出を行った結果を Fig. 28 に示した。両抗原とも 250 倍希釈まで検出できた。一般的に Y 抗原の吸光値が高かったが、系統間では大きな差が認められな

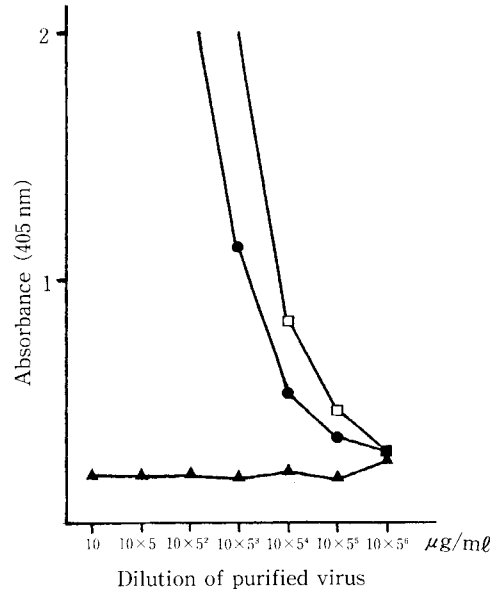


Fig. 27. Detection of SDV in purified preparations by ELISA using antibody against SDV-D.
●: SDV-D, □: SDV-Y, ▲: PBST-PVP.

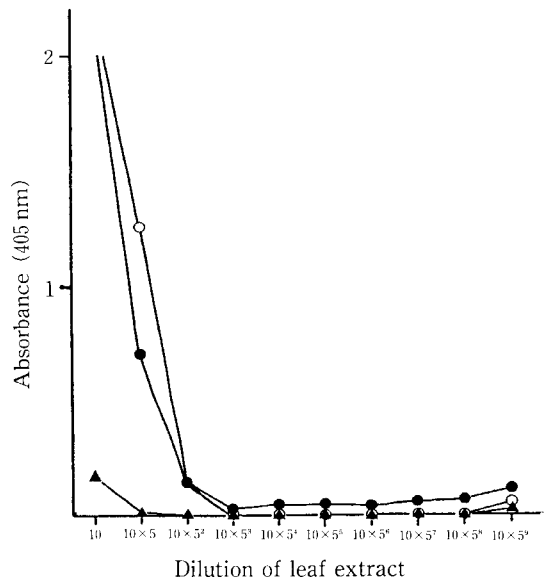


Fig. 28. Detection of SDV in leaf extracts of infected soybean plants by ELISA using antibody against SDV-D.
●: SDV(D)-infected, ○: SDV(Y)-infected, ▲: Healthy.

かった。

以上の結果から、D抗体を用いたELISA検定はDおよびYの両系統が同程度に反応するので、以後の実験はD系統の抗体を用いて行った。

b. 野外のクローバー類から病原ウイルスの検出

ELISA法により北海道内の農家ほ場周辺のクローバー類から病原ウイルスの検出を行った。胆

振、網走、十勝、日高、空知、上川各管内から1984年に14市町村35筆、1985年に17市町村24筆の農家ほ場をそれぞれ抽出し、ほ場周辺のシロクローバー、アカクローバーを任意に1地点1～35株採集し、D抗体を用いてELISA検定した。

結果をTable 52に示した。SDVの保毒率はシロクローバーでは洞爺村、豊浦町、虻田町、津別町、豊頃町、足寄町、日高町において、アカクロー

Table 52. Detection of SDV in clover plants by ELISA

District	Locality	White clover			Red clover		
		No. of fields surveyed	No. of plants examined	Infected plants (%)	No. of fields surveyed	No. of plants examined	Infected plants (%)
Iburi	Soubetsu	8	152	25.0	6	44	38.6
	Abuta	4	46	45.6	3	13	0
	Toyouura	2	31	48.4	2	10	40.0
	Date	6	68	36.8	5	26	23.1
	Tohya	3	63	60.3	2	10	30.0
	Hobetsu	1	8	50.0	1	1	0
	Total	24	368	38.6	19	104	28.8
Abashiri	Rubeshibe	5	65	3.1	4	33	45.5
	Kitami	5	64	35.9	5	26	73.1
	Oketo	3	68	16.2	1	2	100.0
	Tsubetsu	1	23	43.5	1	10	50.0
	Tanno	1	4	0	1	3	0
	Memambetsu	—	—	—	1	2	50.0
	Total	15	224	20.5	13	76	56.6
Tokachi	Ikedai	2	34	32.4	1	5	0
	Toyokoro	1	21	71.4	1	5	100.0
	Shikaoi	4	47	31.9	3	11	9.1
	Ashoro	5	64	56.3	5	32	31.3
	Memuro	1	10	50.0	1	5	0
	Honbetsu	2	5	35.7	2	4	25.0
	Total	15	181	59.7	13	62	35.5
Hidaka	Biratori	1	9	33.3	1	5	0
	Hidaka	1	13	69.2	1	8	100.0
	Total	2	22	54.5	2	13	61.5
Sorachi	Fukagawa	1	3	0	1	1	0
	Chippubetsu	1	1	0	1	1	0
	Total	2	4	0	2	2	0
Kamikawa	Kamikawa	1	5	0	1	6	66.7

バーでは豊浦町、留辺蘂町、北見市、津別町、豊頃町、日高町で高かった。地域別にはシロクロバーでは十勝、日高管内、アカクロバーでは網走管内で比較的高かった。

3) 論議および結論

ダイズわい化病は玉田ら(1969)が発見したダイズの重要なウイルス病である。本病はダイズわい化ウイルス(SDV)によって起こるが、玉田(1973)はダイズにおける病徴からわい化系統(SDV-D)と黄化系統(SDV-Y)に分けた。このうち、インゲンマメに感染するのはSDV-Yで、玉田ら(1973)はインゲンマメ黄化病と命名した。本病に感染したインゲンマメの被害は著しく、節数の減少、節間の短縮、着莢数の減少、莢の短小化、子実数および子実重の減少となり、発病株は症状の軽重にかかわらずほとんど収獲皆無で、「大正金時」の場合減収率95%以上であった(北海道立中央農業試験場・北海道立十勝農業試験場, 1976)。

本ウイルスは節部局在性のため植物体内における濃度は低く、罹病葉からのウイルスの純化は困難を極めた。Takanami and Kubo (1979)は節部局在性のウイルスに対して、酵素を利用した純化法を開発した。本実験において、Takanami and Kubo (1979)に準じてわい化系統の病葉からウイルスの純化を行った結果、病葉1 kg から約0.6 mgのウイルスを得ることができ、既報(Kojima and Tamada, 1976; Hewings *et al.*, 1986)のものに比較して約2～3倍の収量を得ることができた。

純化ウイルスを家兎に免疫して力価2,048倍の抗血清を得た。抗血清から精製した抗体を用いてELISAの条件について検討した結果、抗体濃度1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、酵素結合抗体濃度800倍が最適であった。

わい化系統の抗体を用いて、SDV 2系統の純化ウイルスおよび病葉からELISA法によるウイルスの検出を行った。その結果、2系統とも純化ウイルスで16 ng/ml、病葉で250倍希釈まで検出できた。吸光値は全般的に黄化系統の方が高かったが、系統間では大きな差が認められなかった。

SDV 系統間の血清学的関係では差が認められないと報告されており(玉田, 1975; Kojima and Tamada, 1976), 本実験結果とも一致した。D'Arcy and Hewings (1986)はSDV-D抗体を用いたELISA法により、1.6 ng/mlの低濃度までウイルスが検出できたと報告した。本実験では16 ng/mlまでしか検出できなかったが、これは陽性反応の判定基準が異なるためで、両者のELISA値を比較した結果、ほぼ同程度の検出精度と思われる。

インゲンマメ黄化病の病原ウイルス(SDV-Y)は伝染源がシロ(ラジノ)クロバーで(Tamada, 1970; 玉田, 1973; 玉田・馬場, 1973; 玉田, 1975; Tamada and Kojima, 1977), ジャガイモヒゲナガアブラムシによって伝搬される(Tamada, 1970; 玉田・馬場, 1973; 玉田, 1975; Tamada and Kojima, 1977)。本病の発生量はウイルス伝染源の量および媒介アブラムシの発生量に影響される。北海道内各地のクロバー類から病原ウイルスの検出を行い、その発生分布を調べた。その結果、病原ウイルスは全道各地に広く発生分布し、シロクロバーでは胆振、網走、十勝、日高管内などインゲンマメおよびダイズ栽培地帯の山間部において保毒率が高く、空知、上川管内の平野部で少なかった。最も保毒率の高い町村では約60%から検出され、クロバーのSDVによる汚染が進行していることが明らかになった。アカクロバーでは網走管内で保毒率が高かったが、SDV-Dしか感染しないのでインゲンマメ黄化病の伝染源とはならない。シロ(ラジノ)クロバーには両系統が感染するが(Tamada, 1970; 玉田, 1973; 玉田・馬場, 1973; 玉田, 1975), ELISA法など血清学的手法では系統の判別が困難なため、黄化系統による保毒率は不明である。

谷村ら(1985)は生物検定法を用いて、北海道内各地のラジノクロバーからウイルスの検出を行った。それによると、保毒率の高い地域は本実験の結果とほぼ似た傾向を示した。しかしながら、各町村の保毒率は全般的に本実験で得た値より高い傾向にあった。この原因が検定法の違いによる差か、それ以外の原因によるものか今後の検討を

要する。本実験結果から、北海道内全域に SDV によるクローバー類の汚染が進行していることは明らかであるので、今後インゲンマメを作付けする場合には注意が必要である。

本ウイルスは永続（循環）型伝搬し、虫体内潜伏期間は 15～27 時間とされている（玉田，1975）。一方、浸透性殺虫剤で処理したインゲンマメ上でのジャガイモヒゲナガアブラムシの生存期間は 18 時間前後とされているので、本病の有効な防除

法として浸透性殺虫剤の土壌施用が指導されている（北海道立中央農業試験場・北海道立十勝農業試験場，1976）。しかしながら、本病は有翅虫が伝搬の主体であり（花田，1974），保毒虫の飛来を薬剤だけで防止することは困難である。従って、より有効に本病を防除するためには伝染源の除去，アブラムシ忌避資材の利用，抵抗性品種の育成など総合的な防除法の実施が望まれる。