

## PPV 高感度検知系の構築

試験研究計画名：プラムポックスウイルスの検知、予防および治療法の開発

地域戦略名：青梅市及び川西市におけるプラムポックスウイルスの感染拡大の阻止及び果樹産業と観梅観光の安定

研究代表機関名：国立大学法人岡山大学

### 地域の競争力強化に向けた技術開発のねらい

プラムポックスウイルス（PPV）は、ウメ、モモ、ネクタリン、プルーン、アンズ、サクランボなどのバラ科サクラ属の果樹に感染するウイルスです。海外では、果実が成熟する前に落果することによる減収や果実表面に斑紋などが現れることによる商品価値の損失といった PPV 感染による多額の生産被害が報告されており、国内では 2009 年に PPV 感染樹が確認されました。PPV 感染の拡大を防ぐためには、その早期発見が特に重要となります。PPV 感染検査では、感染病徴が見られる果樹の葉（右の写真）について、まずはイムノクロマト法による検査が実施されます。この方法では、PPV 粒子とその検出用抗体との結合を呈色シグナルへ換え、それを目視で確認して PPV 感染を判定します。しかし、検出感度がそれほど高くないため感染初期などウイルス量が低い PPV 感染を見落とす可能性があり、改善の余地があります。そこで、PPV 粒子を現行のイムノクロマト法よりも高感度で検出可能な PPV 検知系の構築を目指しました。



### 開発技術の特性と効果：

PPV 感染が疑われる葉の検査試料中のウイルス粒子と PPV を認識する抗体の結合によって生じるシグナルを高感度に検出可能な PPV 高感度検知系を開発しました。この検知系は、結合シグナルを効率的に増大させることにより、（別途遺伝子解析により確認された）PPV 感染したウメの葉由来の抽出液を 1000 倍希釈した微量の PPV 粒子でも検出可能です（図 1）。また、南高や梅郷などのウメの主要な栽培品種において、用いる抗体の特異性が高いため、未感染の健全なウメの葉のバックグラウンド・シグナルは緩衝液のみのシグナルと同じレベルで低く、品種を問わず本手法が適用できると考えています。

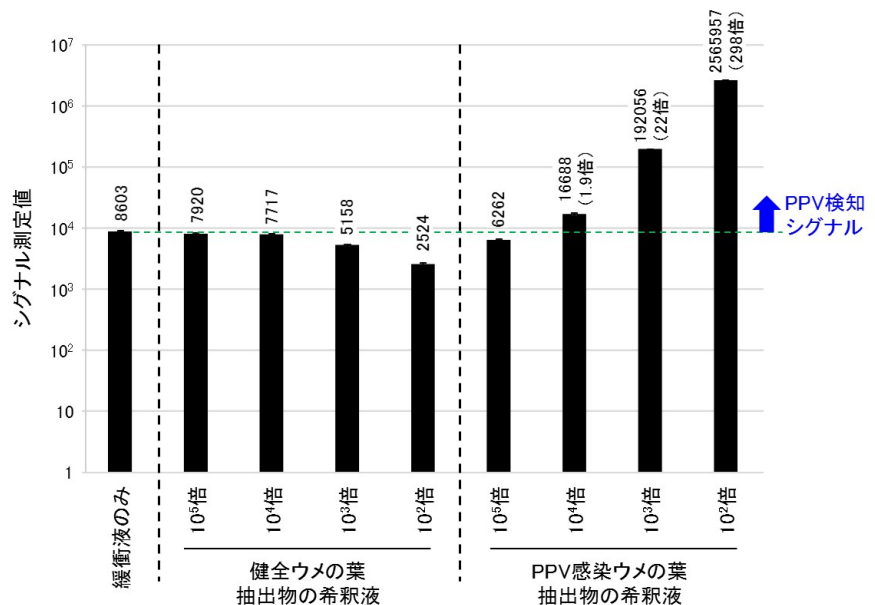


図 1 高感度検知系を用いた PPV 検出

従来のイムノクロマト法

(PPV 感染判定に使用されている市販品のキット)と、構築した PPV 高感度検知系との PPV 検出感度の比較を実施したところ、従来のイムノクロマト法では、病徴の見られる PPV 感染ウメの葉由来の抽出物の原液に対しても PPV 陽性を示しませんでした。今回開発した高感度検知系では同一の検査試料の 100 倍希釈液において PPV 陽性を示しました(図 2)。このことから、開発した高感度検知系は、従来のイムノクロマト法よりも少なくとも 100 倍以上高感度で PPV を検出可能です。さらに、イムノクロマト法では検出できなかった、PPV 感染樹由来の病徴が現れていない葉に含まれる極微量の PPV も高感度検知系で検出可能でした。

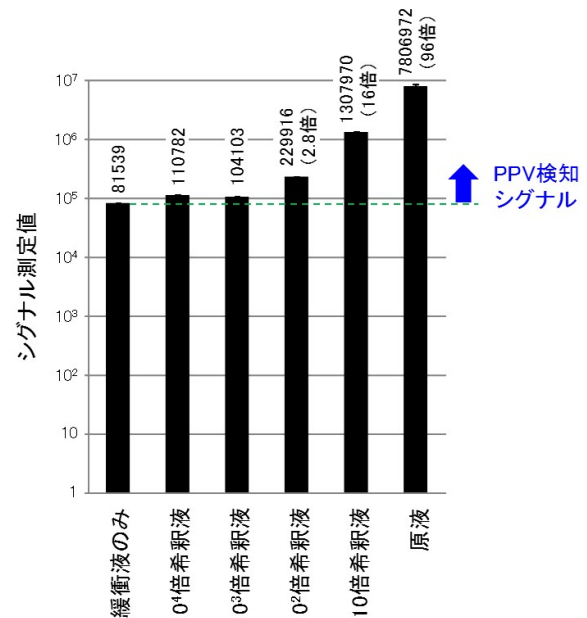


図 2 PPV 検出感度の評価

### 開発技術の経済性:

現在実施されている PPV 感染検査の手順では、感染が疑われる樹木から 5 枚以上の葉を採取し、イムノクロマト法で検査して PPV 陽性判定が出たものについて、さらに核酸レベル(LAMP 法)で検査して最終的な PPV 感染の判定がなされます。当該技術を用いた場合、イムノクロマト法よりも 100 倍以上高感度で PPV を検出できるため、現在実施されているイムノクロマト法と LAMP 法での二段階 PPV 感染検査を、将来的に一段階の PPV 感染検査で代替できる可能性があり、労働コストの削減が見込まれます。

当該技術を用いた PPV 感染検査法の試薬類コストとして、現在の 1 検体あたりの感染検査に要するコスト 2 千円弱 (イムノクロマト法でのコスト 660 円と LAMP 法でのコスト 1000 円の合計) の半以下を目指しています。

### こんな経営、こんな地域におすすめ:

当該技術は、PPV 感染拡大防止に取り組み、感染の早期確認が必要な地域での利用を想定しています。当該技術により今まで検出困難であった微量の PPV 感染を判定することができ、PPV 感染拡大の防止に貢献することが期待されます。なお、本技術の特徴は、用いる抗体を替えることにより、基本的にどのウイルスにも適用できる可能性があります。

### 技術導入にあたっての留意点:

当該技術は、現段階では実験室での検査を想定しており、検査試料を準備してから測定終了まで 40 分程度かかります。更なる操作工程の最適化により、20 分以内への時間短縮に取り組んでいます。また、当該技術は 96 ウェル装置の使用により多検体処理にも適用できますが、現時点では測定は 1 サンプルずつとなります。なお、現時点では初期投資として 50 万円程度の機器が必要です。今後、多検体の同時測定ができるよう改良を加えたのち、論文化し、普及を目指します。

研究担当機関名: (国) 岡山大学

お問い合わせは: (国) 岡山大学 研究推進産学官連携機構 知的財産本部

電話 086-251-8476 E-mail y-hirano@cc.okayama-u.ac.jp

執筆分担 (国) 岡山大学 世良 貴史