

## 抗血清を利用した *Cymbidium mosaic virus* および *Odontoglossum ringspot virus* の診断法

井 上 成 信

洋ランに発生するウイルス病の中では *Cymbidium mosaic virus* (CyMV) と *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) の発生が最も多く、その被害は著しく大きい。ところがそれらにも病徴がマスクされることがあって、葉に病徴が全く見られないものでも、ウイルス病に罹っていることがしばしば認められ、葉の外観的症狀だけによる診断はかなり不完全である。したがってウイルス病の正確な診断は罹病株の除去あるいは貴重品種で捨てがたい罹病株の隔離などによる伝搬防止対策上極めて重要であり、ランの栽培者間にも現場で簡単に応用できる診断方法が強く要望されている。植物ウイルス病の診断は一般に電子顕微鏡によるウイルス粒子の観察並びに指標植物に接種する生物検定などの方法によって行なわれ、さらに血清検定についての報告も見られる。洋ランのウイルス病の血清学的診断については、Zaitlin ら (1954) が重層法を応用して *Cattleya* に発生するウイルス病を診断し、また Morel (1960) は *Cymbidium* の生長点組織培養苗におけるウイルス・フリー株の検定に利用している。わが国では末次ら (1968) が CyMV と ORSV の 2 価抗血清利用によるウイルス病の診断について報告している。

著者は *Cymbidium* や *Cattleya* 系\* のようなラン科植物では、血清検定で葉を磨砕しただけの粗汁液が抗原抗体反応類似の凝集物を生ずることをしばしば観察している。これが血清検定の正確な判定を混乱させる恐れのあることを知り、簡易診断法における検定葉汁液の簡単な作製法について実験し、若干の結果を得た。さらにこれらのことを十分考慮して *Cymbidium* と *Cattleya* 系における CyMV および ORSV の診断を血清検定によって行ない、その判定結果の信頼度を電子顕微鏡によるウイルス粒子の観察並びに生物検定の結果と比較し検討したので報告する。

本実験を行なうに当り 有益な御助言を賜わった大阪府立大学農学部 井上忠男博士並びに本論文の取りまとめに当って、懇切な御教示をいただいた財団法人発酵研究所 横山竜夫博士に深謝の意を表す。

### 材 料 と 方 法

血清検定に用いる検定葉汁液の簡単な作製法の実験では、健全、CyMV 罹病 および ORSV 罹病 *Cymbidium* 葉をそれぞれ滅菌乳鉢中で葉の重量の 10 倍量の生理食塩水を加

本報告の大要は昭和43年11月日本植物病理学会関西部会で発表した。

\* *Cattleya* 系: *Cattleya* およびその属間交配種 (*Bc.*, *Blc.*, *Lc.*, *Sc.*, *Slc.*) を総称して呼んでいる。

えて磨砕し、粗汁液を4重のガーゼでこして、ろ紙でろ過あるいは遠心分離を行なって血清検定に用いた（以下病汁液と記す）。

血清検定は微凝集反応法 (Slogteren, 1955) で行ない、また、これとスライド法との比較も行なった。微凝集反応法は Polyvinyl Formvar 膜 (Chloroform に1% 溶解) を張ったシャーレに抗血清を1滴 (約0.03 ml) ずつ並べておき、その上に検定葉汁液を同量加え、ガラス棒 (径0.8 mm) で軽く攪拌後、乾燥を防ぐために流動パラフィン油を静かに流し込んで上を覆い、約35°C に15~30分間保ったのち、凝集反応を肉眼判定し、さらにその反応終末点を光学顕微鏡観察で判定した。凝集反応の程度は肉眼判定でⅢ~Ⅳの4段階とし、さらに検鏡により+および± (ごく少量の凝集物) を判定し、凝集物のないものを-とした (第1図)。

ウイルス病の診断に供試した *Cymbidium* および *Cattleya* 系の植物は日本各地から収集したものである。ウイルス病の診断は微凝集反応法による血清検定、電子顕微鏡によるウイルス粒子の観察並びに生物検定による判別を平行して行なった。血清検定には検定葉を滅菌乳鉢中で葉の重量の10倍量の生理食塩水を加えて磨砕し、ガーゼでこしたのち、遠心分離 (3,000 rpm, 10分) を行なって上清を供試した。一部は東洋ろ紙 No. 3 でろ過したろ液を用いた。ウイルス粒子の電子顕微鏡観察は2% リンタングステン酸 (pH 6.9) を用いた DN 法試料について行なった。生物検定はツルナ, *Datura stramonium*, *Cassia occidentalis*, *Chenopodium amaranticolor* などを指標植物として汁液接種を行ない、局部病斑出現の有無によって判定した。

供試抗血清は既報の CyMV 抗血清および ORSV 抗血清で、真空凍結乾燥し、ディープフリーザー (-20°C) に貯蔵したものである (Inouye, 1966, 1968)。その抗体価は第1, 2表に示すように微凝集反応法で両抗血清とも1:2,048倍であった。これを生理食塩水で1:8あるいは2倍階段希釈して用いた。

## 実 験 結 果

### 1. 供試抗血清の微凝集反応法による力価検定

抗血清と病汁液の希釈を行ない、微凝集反応法で陽性反応を示すそれぞれの反応限界点を調べた。CyMV 罹病および ORSV 罹病 *Cymbidium* 葉の粗汁液はそれぞれ3,000 rpm, 20分間遠心し、その上清を抗原として用いた。対照としては健全な *Cymbidium* 葉の粗汁液を遠心し、その上清を用いた。

#### (1) CyMV 抗血清による反応

第1表に示すように、病汁液の抗原希釈10倍では抗血清希釈2,048倍まで反応が認められた。同様に病汁液の2倍階段希釈20, 40, 80, 160, 320, 640倍ではそれぞれ抗血清希釈2,048, 1,024, 1,024, 512, 64, 8倍まで反応が認められた。健全葉汁液との反応は現われず、したがって抗血清は CyMV のみに特異的に反応する純度の高いものであると思われた。第1表の結果から本抗血清を用いての微凝集反応法によるウイルス病の診断は検定葉の10倍希釈液では抗血清を約500倍に薄めて用いても、反応の確認が容易にしかも判定が確実にできると考えられた。

(2) ORSV 抗血清による反応

第2表に示すように、病汁液の抗原希釈10倍では抗血清希釈2,048倍まで反応が認められた。同様に病汁液の2倍階段希釈20, 40, 80, 160, 320, 640倍ではそれぞれ抗血清希釈2,048, 1,024, 512, 256, 64, 8倍まで反応が認められた。健全葉汁液との反応は現われず、したがって抗血清はORSVのみに特異的に反応する純度の高いものであると思われた。第2表の結果から、本抗血清を用いての微凝集反応法によるウイルス病の診断は検定葉の10倍希釈液では抗血清を約500倍に薄めて用いても、反応の確認が容易にしかも判定が確実にできると考えられた。

第1表 CyMV 抗血清による微凝集反応

抗原希 釈倍数	抗 血 清 希 釈 倍 数											対 照 (Saline)
	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	
10	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	+	±	-	-
20	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	+	-	-	-
40	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	+	±	-	-	-
80	卍	卍	卍	卍	卍	卍	+	+	-	-	-	-
160	卍	卍	卍	卍	卍	+	+	±	-	-	-	-
320	卍	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-
640	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1280	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2560	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
対照	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

第2表 ORSV 抗血清による微凝集反応

抗原希 釈倍数	抗 血 清 希 釈 倍 数											対 照 (Saline)
	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	
10	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	+	-	-	-
20	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	+	-	-	-
40	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	±	-	-	-
80	卍	卍	卍	卍	卍	+	+	±	-	-	-	-
160	卍	卍	卍	卍	+	+	-	-	-	-	-	-
320	卍	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-
640	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1280	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2560	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
対照	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

2. 血清検定に用いる検定葉汁液の作製法

(1) 遠心法により得た病汁液の微凝集反応

*Cymbidium* の ORSV 罹病葉および健全葉の粗汁液をガーゼでこしたのち、2,000, 3,000, 4,000, 5,000, 7,000 および 10,000 rpm で10分間遠心し、それぞれの上清を検

定汁液として用いた。血清反応は微凝集反応法とスライド法によって行なった。

第3表に示すように、ORSV 罹病葉汁液は2,000~10,000 rpm にて遠心したいずれの上清試料にも血清反応の結果明瞭な綿毛状の凝集物が認められた(第3図 C, D)。一方、健全葉汁液では、2,000 rpm 遠心上清試料に少量の凝集物を生じ、また3,000 rpm 遠心上清試料にもごく少量の沈澱物を生じたが、4,000~10,000 rpm 遠心上清試料には凝集物を生じなかった(第3図 c, d)。しかし2,000 rpm 遠心上清試料の凝集物は血清反応によるものとは異質のものであると判定され、また3,000 rpm 遠心上清試料の沈澱物も血清反応によるものと明確に区別できるものであった。この3,000 rpm 上清試料には沈澱物を生じない場合と生ずる場合があったが、この沈澱物はごく少量であり、これは *Cymbidium* の品種や検定時の温度条件によって生ずるようであった。このような試料は第4表に示すように、粗汁液を約30°Cに1~1.5時間置いたのち、遠心分離(3,000 rpm, 10分)し、その上清を供試するとそのような沈澱物を生じなかった。なお微凝集反応法とスライド法とではともによく凝集反応が認められたが、前方法が反応量確認の点でよりまさるようであった。

第3表 遠心分離によって得られた病汁液の血清反応

検定方法	試料	遠心分離 (rpm)					
		2,000	3,000	4,000	5,000	7,000	10,000
微凝集反応法	ORSV 葉	卅	卅	卅	卅	卅	卅
	健全葉	(+)	(±)	-	-	-	-
スライド法	ORSV 葉	卅	卅	卅	卅	卅	卅
	健全葉	(+)	(±)	-	-	-	-

( ) 内は抗原抗体反応と異質の凝集物と判定されたもの。以下第4~6表 同

第4表 温度処理による ORSV 罹病粗汁液の血清反応

検定方法	試料	ガーゼろ過	搾汁後の経過時間と温度								
			時間(hr)	1.0		1.5		2.0		3.0	
				温度(°C)	37	26*	37	26*	37	26*	37
微凝集反応法	ORSV 葉	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
	健全葉	(卅)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
スライド法	ORSV 葉	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
	健全葉	(卅)	-	(±)	-	-	-	-	-	-	-

検定試料は搾汁してから所定時間後に3,000 rpm 10分間遠心。\*室内放置温度

(2) ガーゼろ過、ろ紙ろ過および遠心分離により得た病汁液の微凝集反応

健全、CyMV 罹病および ORSV 罹病の *Cymbidium* 葉搾汁液を、それぞれ(a)4重のガーゼでこした粗汁液、(b)東洋ろ紙 No. 1で粗汁液3 ml をろ過したろ液、(c)3,000 rpm で10分間遠心した上清の3処理区において微凝集反応法を行なった。血清は CyMV 抗血清、ORSV 抗血清 および 正常血清を用い、それぞれを8倍に希釈して供試した。

第5表に示すように、病葉汁液の試料では3処理区のいずれとも、CyMV 抗血清と CyMV 病汁液、ORSV 抗血清と ORSV 病汁液との間に明瞭な 特異的凝集反応が認められた(第2図, A, a; 第3図 A, B). 遠心上清試料では CyMV 抗血清と CyMV 病汁液、ORSV 抗血清と ORSV 病汁液との間に凝集反応が認められるのに対し、その他の組合せではすべて凝集が認められず、したがって血清反応の判定が明確にできた. しかるにガーゼでこしただけの粗汁液試料では、正常血清と健全葉汁液、CyMV 病汁液 および ORSV 病汁との間にいずれも多量の凝集物を生じ、また CyMV 抗血清が ORSV 病汁液や健全葉汁液と、ORSV 抗血清が CyMV 病汁液や健全葉汁液との組合せにも多量の凝集物を生じた(第2図 B, C; 第3図 a). このような凝集物はあたかも血清反応であるかのように見られたが、これは同じ粗汁液で遠心した上清試料に凝集を生じなかった(例第2図 c) ことから、血清反応によるものではなく、粗汁液中の諸物質が凝集したものであると判定された.

このように、ガーゼでこしただけの粗汁液はそのまま直ちに血清検定に用いると、抗原抗体反応類似の凝集物を生ずるので、これが血清反応の判定を不正確にするものと考えられる. また、ろ紙 No. 1 のろ液は、健全葉汁液の場合には少量の凝集を生じたが、病葉汁液で抗原抗体が異種の組み合わせの場合には凝集を生じなかったことから、粗汁液は遠心分離しなくても簡単にろ紙でろ過したろ液を血清検定に用いてもよい結果が得られることが示唆された(第2図 b; 第3図 b).

第5表 ガーゼろ過, ろ紙ろ過および遠心分離によって得られた粗汁液の微凝集反応

試料	抗血清		H-s			CyMV-s			ORSV-s		
	抗原	抗原	CyMV	ORSV	H	CyMV	ORSV	H	CyMV	ORSV	H
ガーゼろ過液			(卅)	(卅)	(卅)	卅	(卅)	(卅)	(卅)	卅	(卅)
3,000rpm 遠心上清液			-	-	(±)	卅	-	(±)	-	卅	(±)
ろ紙 No.1 ろ過液			(±)	-	(+)	卅	-	(+)	(±)	卅	(±)

抗血清 H-s: 正常血清. 抗原 H: 健全葉汁液

第6表 ろ紙ろ過によって得られた粗汁液の微凝集反応

抗血清	試料	ガーゼ		ろ紙によるろ過 (東洋ろ紙 No.)									
		ろ過	3,000 rpm 遠心	No. 1				No. 2		No. 3		No. 4	
				ろ過分画	1	2	3	4	1	2	1	2	1
CyMV-s	CyMV 葉	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
	健全葉	(卅)	(±)	(卅)	(±)	-	-	-	-	-	-	-	-
ORSV-s	ORSV 葉	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
	健全葉	(卅)	(±)	(+)	(±)	-	-	(±)	-	-	-	-	-

ろ過分画 1~4 はろ液を 0.5 ml 宛分画して得た試料の採取順位を示す

### (3) ろ紙ろ過粗汁液の微凝集反応

東洋ろ紙 No. 1, 2, 3, 4 を用い、健全、CyMV 罹病および ORSV 罹病の *Cymbidium* 葉粗汁液をろ過して血清検定に供試した. ろ液はろ紙 No. 1, 2 など初め緑色で次第に淡

褐色透明化してきたので、ろ液を0.5 ml ずつ分画した。血清検定には CyMV 抗血清と ORSV 抗血清を用い、微凝集反応法で行なった。

第6表に示すように、ろ紙 No. 1~4 のいずれのろ液試料にも、CyMV 抗血清と CyMV 病汁液、ORSV 抗血清と ORSV 病汁液との間には明瞭な特異的凝集反応が認められた。一方健全葉汁液では、ろ紙 No. 1 の分画1 のろ液に両抗血清とも淡緑色の凝集物を生じたが、これは綿毛状ではなく、顆粒状のものであり、血清反応によるものとは異種のものであった。ろ紙 No. 1 の分画2 と No. 2 の分画1 のろ液には少量の凝集物を生じたが、これは血清反応と容易に区別できるものであった。ろ紙 No. 1 の分画3, No. 2 の分画2, No. 3 および No. 4 の各分画はいずれも緑色が少なく、両抗血清とも凝集物が見られなかった。ろ紙 No. 4 のろ液はかなり清澄化し、血清検定の供試汁液として適当であったが、ろ過に時間がかかり過ぎ不便であった。

このような結果から、血清検定には検定葉の粗汁液を東洋ろ紙 No. 2 あるいは No. 3 でろ過し、緑色が少なく透明化したろ液を供試すると、健全植物か病植物かの正しい判定ができることが認められた。

### 3. 希釈抗血清の冷蔵庫保存と力価

CyMV 抗血清と ORSV 抗血清とをそれぞれ生理食塩水で8倍に希釈し、マーゾニン ( $C_2H_5HgS \cdot C_6H_4COONa$ ) 0.02% 加用と無加用とを設けて冷蔵庫(約4°C)に保存し、保存日数と力価の推移について微凝集反応法で調べた。

第7表に示すように、保存6ヵ月後まで検定したが、両抗血清とも力価の大きな低下は見られず、またマーゾニン加用と無加用との差も殆ど見られなかった。この結果から、本供試抗血清は希釈してからも冷蔵庫に保存すると、半年以上血清検定に十分利用できることが認められた。

第7表 冷蔵庫保存による希釈抗血清の凝集反応能力

抗血清	抗原	マーゾニン 加用の有無*	保 存 日 数					
			0	10日	1ヵ月	2ヵ月	4ヶ月	6ヵ月
CyMV-s	CyMV	-	卅	卅	卅	卅	卅	卅
		+	卅	卅	卅	卅	卅	卅
ORSV-s	ORSV	-	卅	卅	卅	卅	卅	卅
		+	卅	卅	卅	卅	卅	卅

\* Merzonin: 0.02%

### 4. CyMV 抗血清と ORSV 抗血清の混合による効果

CyMV 抗血清と ORSV 抗血清とを希釈(8倍)後に1:1に混合し、CyMV および ORSV 罹病葉汁液に対する微凝集反応試験を行なった。

第8表に示すように、混合抗血清は単一抗血清と同じく CyMV および ORSV 罹病葉汁液とそれぞれよく反応し、希釈後の混合血清でも両ウイルス病の診断に有効であることが認められた。

5. *Cymbidium* と *Cattleya* 系における CyMV および ORSV の診断

*Cymbidium* および *Cattleya* 系について、あらかじめ葉の病徴により、a) 葉に症状がなく健全と思われたもの、b) CyMV 病、c) ORSV 病および d) 判別困難なもの、とに分け、前記3検定法による判定結果を比較した。

(1) *Cymbidium* における診断

第9表に示すように、*Cymbidium* では血清検定による判別が電子顕微鏡検査や生物検定とまったく同じ結果が得られ、検定に供試した120株のうち13株が CyMV、32株が ORSV と判定された。葉に外観上の病徴がなく、健全と思われた75株でも9株が ORSV と判定され、無病徴株であっても ORSV に感染している病株のあることが認められた。しかしそれらの株からは上記方法によって CyMV は検出されなかった。葉の病斑型により CyMV と判別した12株はいずれの検定法でもすべてが CyMV と判定されたが、その

第9表 *Cymbidium* における CyMV および ORSV の診断

葉の病徴による判別	検定株数	ウイルス検定			
		ウイルス	電顕検査	生物検定	血清検定
健全(無病徴)	75	CyMV	0	0	0
		ORSV	9	9	9
		—	66	66	66
CyMV	12	CyMV	12	12	12
		ORSV	1	1	1
		—	0	0	0
ORSV	19	CyMV	0	0	0
		ORSV	19	19	19
		—	0	0	0
CyNRSV	3	CyMV	0	0	0
		ORSV	0	0	0
		—	3	3	3
判別不明	11	CyMV	1	1	1
		ORSV	3	3	3
		—	8	8	8
計	120	CyMV	13	13	13
		ORSV	32	32	32
		—	77	77	77

CyNRSV: *Cymbidium* necrotic ringspot virus

第8表 CyMV 抗血清と ORSV 抗血清の混合による凝集反応

抗原	抗血清		
	CyMV-s	CyMV-s+ORSV-s	ORSV-s
CyMV	卅	卅	—
ORSV	—	卅	卅
健全葉汁	—	—	—

抗血清の希釈濃度：16倍

うちの1株からは ORSV も検出され、CyMV と ORSV との混合感染であることが認められた。また葉の病斑型により ORSV と判別した19株はいずれの検定法でもすべてが ORSV と判定された。葉になんらかの症状を現わしているが、ウイルス種類の判別が困難であった11株のうち3株から ORSV が検出され、そのうちの1株は CyMV と ORSV との混合感染であった。Necrotic ringspot 症状を示す株からは CyMV および ORSV はいずれも検出されなかった。

このように *Cymbidium* では CyMV または ORSV の典型的な病徴を現わしている株は間違いなくそれぞ

れ CyMV あるいは ORSV に感染しており、そのうちの CyMV の病徴を示す株では ORSV と混合感染しているものがある。典型的な病徴を示す株以外は病斑型によってウイルスを判別することはかなり困難であることが認められた。

(2) *Cattleya* 系における診断

第10表に示すように、*Cattleya* 系では電子顕微鏡検査と生物検査とはまったく同じ

第10表 *Cattleya* 系における CyMV および ORSV の診断

葉の病徴による判別	検定株数	ウイルス検定			
		ウイルス	電顕検査	生物検定	血清検定
健全(無病徴)	15	CyMV	6	6	5
		ORSV	2	2	2
		—	7	7	8
CyMV	11	CyMV	11	11	11
		ORSV	1	1	1
		—	0	0	0
ORSV	10	CyMV	5	5	5
		ORSV	10	10	10
		—	0	0	0
判別不明	10	CyMV	4	4	4
		ORSV	1	1	1
		—	6	6	6
計	46	CyMV	26	26	25
		ORSV	14	14	14
		—	13	13	14

結果が得られ、検定に供試した46株のうち26株が CyMV, 14株が ORSV と判定され、そのうちの7株は両ウイルスの混合感染であり、他の13株は陰性で健全株と判定された。電子顕微鏡検査と生物検定とによって CyMV と判定された26株中1株が血清検定では陰性となり、逆の結果であったが、これは葉に病徴が見られなかった株であった。葉に症状がなく外見上健全と思われた15株のうち6株が CyMV, 2株が ORSV と判定され、無病徴株であっても CyMV や ORSV が感染しているもの

があることが認められた。葉の病斑型により CyMV と判別された11株はいずれの検定法によってもすべてが CyMV と判定されたが、そのうちの1株は ORSV との混合感染であった。また ORSV と判別された10株はすべて ORSV と判定されたが、そのうちの5株は ORSV との混合感染であった。葉になんらかの症状が見られるが、ウイルスの判別が困難であった10株のうち4株が CyMV と判定され、そのうちの1株は ORSV との混合感染であった。

以上の結果が示すように、*Cymbidium* と *Cattleya* 系における CyMV および ORSV の診断に当っては、微凝集反応法で行なった血清検定が電子顕微鏡によるウイルス粒子の観察並びに生物検定の結果ときわめてよく一致した。したがって微凝集反応法による血清検定はウイルスの検出が容易であり、しかもその信頼度が高く、また、葉に症状がまったく見られないものであってもウイルス罹病株を正確に判別できることが認められた。

6. ORSV 罹病 *Cymbidium* の葉位別並びに部位別に見た病徴とウイルスの検出

ORSV 罹病 *Cymbidium Rangoon* 株について、上位6葉を選び、各葉を先端部、中央部、基端部とに分け、それぞれの部位(長さ5cm)における病徴を調べ、さらに血清検



定、電子顕微鏡検査並びに生物検定によってウイルスの検出を行なった。

第11表に示すように、いずれの検出方法によっても同ように各部位から、すなわち病徴の見られなかった部位からもウイルスが検出され、株全体にウイルスの存在が示唆された。DN法試料について行なった電子顕微鏡検査では検定部位の症状によりある程度ウイルス粒子の量的差異が見られ、退色部位に多く、正常緑色部位に少ない傾向があったが、血清検定では各部位ごとに長さ5cm ずつの葉を切り取って搾汁して調べた結果、病徴が見られなかった部位でも血清反応による凝集が明確にできた。しかし退色部の多い部位では緑色部に比較して凝集物がやや多い傾向が見られた。この結果から感染植物各部位の搾汁液中のウイルスの量的比較を微凝集反応法によりある程度測定できるように思われた。

第11表 ORSV 罹病 *Cymbidium* の葉位別並びに部位別におけるウイルスの検定

上葉より の葉位	検定 部位	病 徴	電 顕 検 査	生 物 検 定	血 清 検 定	
					ORSV 抗血清	CyMV 抗血清
1	先端部	なし	+	+	卅	-
	中央部	なし	+	+	卅	-
	基端部	なし	+	+	卅	-
2	先端部	なし	+	+	卅	-
	中央部	クサビ型退色斑	+	+	卅	-
	基端部	なし	+	+	卅	-
3	先端部	ごく軽い退色斑	卅	+	卅	-
	中央部	なし	+	+	卅	-
	基端部	クサビ型退色斑	卅	+	卅	-
4	先端部	なし	+	+	卅	-
	中央部	長い退色斑	+	+	卅	-
	基端部	長い退色斑	卅	+	卅	-
5	先端部	葉が少し黄緑化し病徴不明	卅	+	卅	-
	中央部	"	卅	+	卅	-
	基端部	"	卅	+	卅	-
6	先端部	"	卅	+	卅	-
	中央部	"	卅	+	卅	-
	基端部	"	卅	+	卅	-

電顕検査の卅～+は DN 法による観察のウイルス粒子の多少を示し、  
生物検定の+はウイルス陽性結果を示す  
血清検定の卅～+はその反応程度を示し、-は陰性を示す（第1図）

### 考 察

洋ランのウイルス病の血清学的診断については Zaitlin ら（1954）が重層法による血清反応を応用して病株を診断し、病徴による診断結果の69%が血清検定の結果と一致したことを報告している。また末次ら（1968）は93株の *Cattleya* 系についてスライド法による血清検定を行ない、指標植物による陽性結果の82%強が抗血清による診断結果と一致した

とし、抗血清診断の有用性を指摘しているが、血清検定による結果が必ずしも完全であったとは言えないようである。

一般に植物ウイルスの血清学的診断に当っては、正確であることと同時に、迅速かつ簡便な方法が要望されている。そのためにはある程度力価の高い抗血清を利用する必要があるが、検定植物の種類によって見られる検定条件についても正しく認識しておくことがその信頼度を高める上に重要のようである。血清検定による簡易診断法としては一般に手技が簡単なスライド法や鋭敏性が優れている微凝集反応法が用いられ、また検定葉汁液には粗汁液がしばしば供試抗原として用いられている。ラン科の *Cymbidium* や *Cattleya* 系のような植物ではウイルス・フリーの健全葉でも搾汁したままの粗汁液を直ちに血清検定に供試すると、抗血清だけでなく正常血清とでも一見血清反応と見間違いを起こすような凝集物を生ずることがある。この凝集は血清反応による綿毛状の凝集物とは異なり、また同じ試料を遠心分離したのものには、このような凝集物を生じないことなどから抗原抗体反応による凝集物とは異質のものであることがわかる。しかし、これは大いに誤診をまねく原因となるようである。このような現象はすべての植物に起るというものではないが、*Cymbidium* や *Cattleya* 系のようなラン科の植物ではよく起る。このことを十分認識しておかないと、簡易診断法によって血清検定を行なった場合、健全植物であってもウイルス病と判定してしまう結果になりかねないと思われた。したがって検定葉汁液の作製は血清反応結果の判定を正確にする上に大変重要であり、搾汁液はそのまま供試しないで、3,000 rpm 以上、10~20 分間遠心して上清を用いることが望ましい。しかしこのような試料も冬期など低温時では不適當なことがあり、この場合対象とするウイルスが CyMV または ORSV であれば搾汁液を約 30~35°C に 1~2 時間放置したのち遠心分離を行なって上清を用いるとよい結果が得られる。Zaitlin ら (1954) は *Cattleya* の粗汁液に 1/2 量のクロロホルムを加えて振とう処理後、3,500 rpm、20 分間遠心し、その上清を重層法で血清検定した結果を報告しているが、このような試料では誤診がなかったものと思われる。搾汁液の簡単な作製法としては磨砕液を東洋ろ紙 No.2 または No.3 でろ過し、半透明化したろ液を用いると、遠心分離の試料と同様に血清反応以外の凝集物を生じないので、検定試料として適当であった。このようにして作製された葉汁液の血清検定は少なくとも健全株をウイルス病株と判定するような誤診はさけられ、その判定に信頼がおけると思われた。

また血清検定を行なうに当って、2種のウイルスが混合感染する病株を1回の検定で診断ができれば実用上大変有利である。洋ランには CyMV と ORSV との混合感染する病株がかなりあり、すでにこれらを同時に抗原として作製した2価抗血清による診断が行なわれている(末次ら, 1968)。本実験でも、別々に作製した CyMV 抗血清と ORSV 抗血清をそれぞれ希釈した後に混合しても、混合感染植物の診断に有効であることが認められた。また希釈した後の抗血清でも冷蔵庫に保存すれば半年間は力価が低下せず十分利用できることも認められた。

つぎに各地から収集した *Cymbidium* と *Cattleya* 系における CyMV および ORSV の診断では、微凝集反応法による血清検定、電子顕微鏡によるウイルス粒子の観察並びに生物検定を並行して行ない、これらを比較して血清検定の信頼度を確かめた。診断は *Cymbidium* と *Cattleya* 系合せて 166 株について行なったが、電子顕微鏡検査と生物検定との

判定結果は完全に一致し、これらの判定結果と血清検定の結果とは、*Cymbidium* (120株)では完全に一致し、*Cattleya* 系 (46株)では CyMV 陽性株中1株が血清検定で陰性となった以外はすべて一致した。この血清検定の結果が逆の陰性を示した1株は葉に病徴がまったく見られず健全と思われた株であった。これは葉中のウイルス濃度に関係があったものと考えられ、とくにウイルス濃度が低い植物における血清検定は今後の課題であると思われる。

このように CyMV および ORSV について行なった血清診断の信頼度は99.4%でいちじるしく高い結果が得られた。葉の病斑型によってウイルスの判別がある程度可能であるが、これは各ウイルスの典型的な病徴を示す株についてのみであり、CyMV の病徴を示す株の中には ORSV が混合感染するものも存在し、また病斑型によってウイルスの判別が困難であった株からも CyMV あるいは ORSV が検出されている。また肉眼で葉に病徴が全く見られず、外見上健全と思われた株からもウイルスの保毒株が検出されたことは重要である。しかし *Cattleya* 系では ORSV が感染すると一般に葉に病徴を現わさないが、花に斑入りを生ずるので、花の病徴によって診断が可能であるが、本報において健全とした株は花をつけず葉のみの症状によって判別したものであった。Zaitlin ら (1954) も葉の症状によってウイルス・フリーであると考えた13株のうち8株が血清反応陽性を示し、ウイルス病と診断されたことを報告している。これらのことはまた、肉眼観察による葉の病徴の有無だけで直ちに保毒の有無を判定できないことを示すものである。

末次ら (1968) は指標植物による判定が陰性であった36株のうち8株が血清反応陽性であった結果を得、血清検定が生物検定の結果より鋭敏であった例を示しているが、著者の結果では電子顕微鏡検査や生物検定で、陰性であった *Cymbidium* と *Cattleya* 系の合計85株は血清検定でもすべて陰性となり、末次らが得た血清検定が優るような結果は得られなかった。

つぎに ORSV 罹病 *Cymbidium* について、葉位別並びに葉の先・中・基部における病徴の有無や程度とウイルスの検出とを比較した結果、血清検定では病徴を現わさない部位でもよく反応が認められ、病徴の強弱にほとんど無関係に各部位からウイルスが検出され、電子顕微鏡検査や生物検定の結果と完全に一致した。

## 摘 要

ラン科植物のウイルス病の血清検定に用いる検定葉汁液の簡易作製法を検討し、さらに CyMV および ORSV の抗血清を用いて *Cymbidium* と *Cattleya* 系におけるウイルスの血清学的診断を行なった。

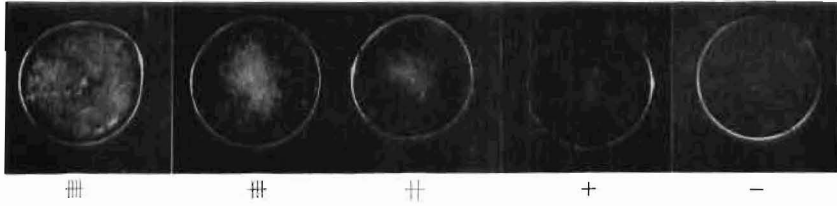
1) *Cymbidium* のようなラン科植物では、葉を磨碎しガーゼでこしただけの粗汁液を血清検定に用いると、ウイルス・フリーの健全株であっても血清反応類似の凝集物を多量に生じ、これがために特異的血清反応の正しい判定を誤らせる原因となることを認めた。そこで検定葉の磨碎粗汁液は遠心分離 (3,000 rpm 以上、10~20分) して用いるか、より簡便には東洋ろ紙 No. 2 または No. 3 でろ過し、清澄化したろ液を用いると誤診がなく、検定試料として良好であることを認めた。また希釈した後の抗血清でも冷蔵庫に保存すれば、半年以上力価の低下が少なく、検定に十分利用できた。

2) *Cymbidium* と *Cattleya* 系における CyMV および ORSV の診断に当って、微凝集反応法による血清検定を行ない、これと電子顕微鏡によるウイルス粒子の観察並びに生物検定の結果とを比較し、血清検定の信頼度を調べた。*Cymbidium* 120株、*Cattleya* 系46株、合計166株について、あらかじめ葉の病斑型により健全（無病徴）、CyMV、ORSV および判別不明とに分けて検定した。その結果、39株が CyMV、46株が ORSV と判定され、そのうちの9株は両ウイルスの混合感染であった。葉の病斑型により CyMV または ORSV と判別されたものは3検定法のいずれによっても正しく CyMV または ORSV と判定されたが、その中には病徴によって判別できなかった他方のウイルスが混合感染する株もあった。葉に症状がなく健全と思われた *Cymbidium* 75株のうち9株が ORSV、*Cattleya* 系15株のうち6株が CyMV、2株が ORSV と判定され、葉に症状がまったく見られないものでも、ウイルスを保毒する株のあることが認められた。

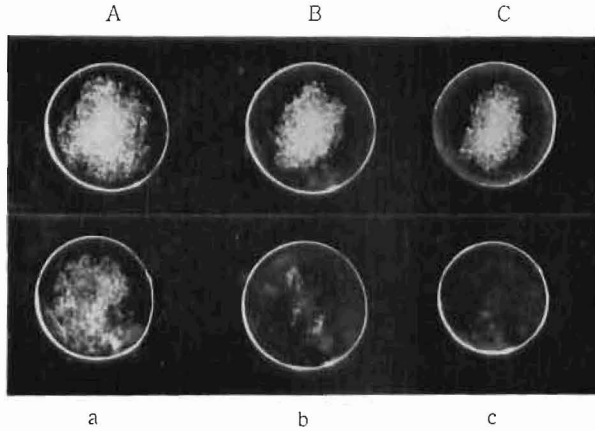
血清検定による判定結果は電子顕微鏡検査や生物検定の判定結果の99.4% (165/166株) が一致した。このように血清検定の信頼度が著しく高かったのは、抗血清の高い特異性や力価によることと共に、検定葉を搾汁したままの粗汁液を供試しないで、これを遠心分離あるいはろ過によって得た試料を用いたことによるものと考えられた。

## 文 献

- Inouye, N. 1966. A virus disease of *Cymbidium* caused by *Odontoglossum* ringspot virus. Berichte Ohara Inst. landw. Biol. Okayama Univ. 13 : 149~159.
- Inouye, N. 1968. Virus disease of *Cymbidium* and *Cattleya* caused by *Cymbidium* mosaic virus. Berichte Ohara Inst. landw. Biol., Okayama Univ. 14 : 161~170.
- Morel, G. M. 1960. Producing virus-free *Cymbidiums*. Amer. Orchid Soc. Bull. 29 : 495~497.
- Slogteren, D. H. M. van 1955. Serological micro-reactions with plant virus under paraffin oil. Proc. 2nd conf. Potato Virus Diseases, Lisse-Wageningen, 1954, 51~55.
- 末次哲雄, 松原芳久. 1968. *Cymbidium* mosaic virus と *Odontoglossum* ringspot virus の混合抗血清による洋ランの診断. 植物防疫所調査研究報告 5 : 1~6.
- Zaitlin, M., Schechtman, A. M., Bald, J. G. and Wildman, S. G. 1954. Detection of virus in *Cattleya* orchids by serological methods. Phytopathology 44 : 314~318.

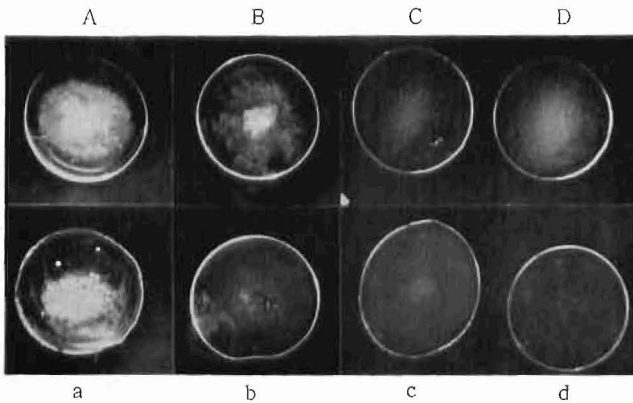


第1図 微凝集反応法による血清反応程度の基準



第2図 CyMV 抗血清による微凝集反応

抗原；A, a: CyMV, B, b: 健全葉汁液, C, c: ORSV,  
 抗原試料の作製法；A~C: ガーゼでこした粗汁液, a~c: 上記  
 粗汁液をろ紙 No. 1 でろ過した病汁液



第3図 ORSV 抗血清による微凝集反応

抗原；A~D: ORSV, a~d: 健全葉汁液,  
 抗原試料の作製法；A, a: ガーゼでこした粗汁液, B, b: 上記粗  
 汁液をろ紙 No. 1 でろ過した病汁液, C, c: 3,000 rpm 遠心  
 分離の上清, D, d: 10,000 rpm 遠心分離の上清