

## サツマイモにおける茎根腐細菌病検査キットの開発

小池化学株式会社 新事業企画課

おみ ひろゆき  
小見 宏幸

### はじめに

近年サツマイモでは、サツマイモ基腐病（以下、基腐病）以外にも、サツマイモ茎根腐細菌病（以下、茎根腐細菌病）などの病害の発生が大きくなっている。茎根腐細菌病は、茎や葉柄が軟らかく腐敗し、株全体が萎凋、枯死する（図1 A-D）。塊根も軟らかく腐敗し、健全部との境界が黒褐色になるといった基腐病と似たような症状が見られる。さらに、圃場を俯瞰した時に一見正常に見えても、株元を確認すると黒く変色していることがある（図1 E、1 F）。茎葉が繁茂する生育旺盛期には株の異常に気が付きにくく、収穫期が近づき茎葉の育成が衰える秋になって気が付くこともある。仮に収穫時に発病している株が少なかったとしても、収穫後の圃場や収穫・保管中の種芋や苗に汚染が広まり、数年後にサツマイモを収穫できないほどの被害になってしまうことがある。放置すると甚大な被害が出るため、早期診断および適切な防除対策が必要となってくる。

茎根腐細菌病は基腐病と酷似した症状を呈するが、異なる点も存在する。まず、基腐病はカビ（*Diaporthe destruens*）が病因となっているのに対して、茎根腐細菌病は *Dickeya* 属の細菌（*Dickeya* sp.）に感染す

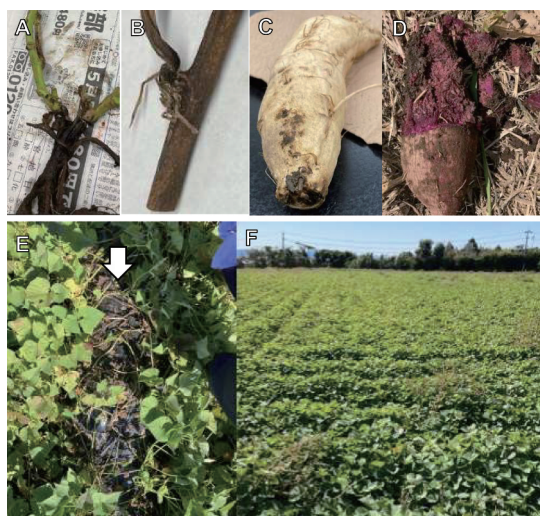


図1 茎根腐細菌病。茎や葉柄、塊根が柔らかく腐敗し、基腐病と似た症状が見られる。茎根腐細菌病に感染をしたサツマイモの茎(A、B)と塊根(C、D)。(E) 黒く変色した株元（白矢印）。(F) 圃場を俯瞰した時には正常に見える。そのため、茎葉が繁茂する生育旺盛期には株の異常に気が付きにくく、収穫期が近づき茎葉の育成が衰える秋ごろまで気が付けないこともある。

ることにより発病する<sup>1)</sup>。感染拡大経路としては、基腐病は畝間感染するのに対して、茎根腐細菌病はマルチ内感染が多いとの報告もある。さらに、現在、茎根腐細菌病に効果のある登録農薬はなく、基腐病に効果のある薬剤であっても、茎根腐細菌病にはほとんど効果がない。これらのことから、茎根腐細菌病と基腐病は、病状は似ているが異なる防除対策が必要である。

これまで、茎根腐細菌病の診断には特定

のDNA領域を増幅させるポリメラーゼ連鎖反応（PCR）検査法が用いられてきた。この検査は、特殊な技術および設備が必要なため、手軽に検査を行い、検査結果を直ぐに知ることができないという問題点があった。そこで、我々は茎根腐細菌病に対して誰でも、どこでも、手軽に検査ができるイムノクロマト検査キットの開発を行った。

### イオノクロマトについて

イムノクロマト法は、「抗原検査キット」という名称で広く認知されている。病院だけでなく、新型コロナウイルスの抗原検査や妊娠検査キットなど一般の人が薬局で手軽に購入および検査できるキットも存在し、様々なところで幅広く応用されている。

イオノクロマト法の原理は、非常にシンプルで「抗原抗体反応」と「毛細管現象」を組み合わせたものである。調べたいサンプルを検査キットに滴下し、約15分待つだけで目視による判定が可能であり、簡便かつ

迅速に欲しい結果を得ることが可能である。

抗原を含むサンプル液をサンプルパッドに滴下すると、標識抗体が含浸されたコンジュゲートパッドへ浸透し、パッドから標識抗体を溶出しながらメンブレンフィルターへと流れていく（毛細管現象、図2）。同時にサンプル中の抗原は、標識抗体と結合して免疫複合体を形成する。毛細管現象でメンブレンフィルターを移動する“標識抗体-抗原”の免疫複合体は、メンブレン上にライン状固定された抗原に結合する抗体（捕捉抗体①）と結合して“標識抗体-抗原-捕捉抗体①”の複合体を形成し膜状にトラップされていく（テストライン）。このトラップにより捕捉抗体①ライン上に標識抗体由来の着色粒子が濃縮されたような状態となり、目視でも呈色の判定が可能となる。一方で、抗原が結合していない標識抗体は、標識抗体に結合する抗体（捕捉抗体②）が固定化されたラインまで流れていき“標識抗体-捕捉抗体②”を形成する

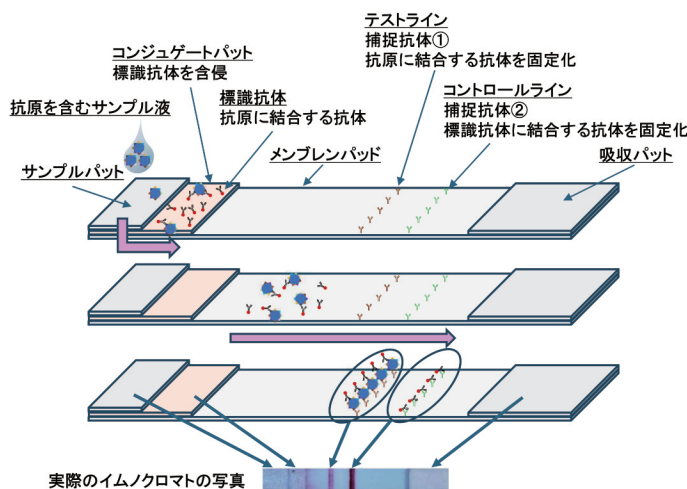


図2 イムノクロマトの原理。  
サンプルパッドに抗原入りのサンプルを滴下すると、コンジュゲートパッドに含浸する。標識抗体と抗原が結合しながらメンブレンパッドを毛細管現象により移動する。抗原が結合した標識抗体は、捕捉抗体①と免疫複合体を形成し、テストライン上で視認可能となる。一方で、抗原が結合しなかった標識抗体は、そのまま捕捉抗体②のあるコントロールラインまで移動し、標識抗体と捕捉抗体②の免疫複合体となりコントロールラインが視認可能となる。それ以外のものは吸収パッドまで移動する。

(コントロールライン)。

イムノクロマトの開発で最も重要なことは、検査対象（抗原）に反応する良い抗体を取得することである。良い抗体を得られれば、正確に感度の良いキットを作製することができる。さらに、抗原抗体反応の正確性は、抗体だけでなく反応時間も大切である。そこで、我々はキットを作製するにあたり、*Dickeya sp.* に対する抗体の作製およびイムノクロマトに使用する最適メンブレンの選定を行った。

### 抗体の作製

*Dickeya sp.* に対する抗体は市販されていないため、イムノクロマトに必要な抗体の作製を行った。霧島酒造株式会社より茎根腐細菌病を発病したサツマイモから単離した *Dickeya sp.* の提供を受けて不活化し（不活化 *Dickeya sp.* = 抗原）、それをウサギに注射し、ウサギに *Dickeya sp.* に対する抗体を産生させた（免疫）。繰り返しウサギに免疫処理を行った後、血液採取を行い血清分画から *Dickeya sp.* に対する抗体を得た。

### 標識抗体の作製

コンジュゲートパッドに含侵させる標識抗体は、作製した抗体に金コロイドを結合させて作製した。金コロイドは、イムノクロマトに汎用されている色素である。金コロイドと抗体の結合しやすさはpHに依存する。表1のように、金コロイドと抗体を入れるバッファのpHを6.0-10.0までふり、OD520/580 $\geq$ 2.0（金コロイドが凝集なく抗体が結合している条件）であることを調べ標識抗体作製の最適pHを調べ

表1 金コロイドと抗体を反応させたときの吸光度

| pH          | 6.0   | 6.5   | 7.0   | 7.5   | 8.0   | 8.5   | 9.0   | 10.0  |
|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| OD520       | 0.459 | 0.558 | 0.686 | 0.792 | 0.767 | 0.786 | 0.839 | 0.838 |
| OD580       | 0.586 | 0.587 | 0.512 | 0.386 | 0.434 | 0.449 | 0.364 | 0.354 |
| OD520/OD580 | 0.783 | 0.951 | 1.340 | 2.052 | 1.767 | 1.751 | 2.305 | 2.367 |



た。その結果、バッファのpH9.0以上が適していることが明らかとなった。標識抗体は、pH10.0のバッファを用いて作製した。

### メンブレンの選択

メンブレンは流速（秒/40mm）の違いで様々な規格が販売されている。イムノクロマト作製には、抗体同様に流速も大切になってくるため、メンブレンの選定を行った。

流速が速いとテストライン上での非特異結合が抑制され正確性は高まるが、目的の抗原抗体反応を示す抗体も減るため感度（視認性）が悪くなる傾向にある。さらに、粘性の高いサンプルが目詰まりしにくく、色の濃いサンプルはバックグラウンドが低く、テストライン上の標識抗体の色が確認しやすくなるといった特徴も流速の速いメンブレンにはある。一方で、流速が遅いとテストライン上での抗原抗体反応を示す抗体は多くなり感度が良くなる傾向にあるが、特異性が下がり偽陽性が出やすくなる特徴がある。

このようにサンプルの状態により適しているメンブレンが異なってくる。今回いくつか流速の異なる規格のメンブレンを試した結果、茎根腐細菌病には流速が速めのメンブレンが適していることが明らかとなった。

## 検査キットの試作

選定したメンブレンやコンジュゲートパッド等を使用してイムノクロマトの試作品を作製した。茎根腐細菌集菌液（約 $1.0 \times 10^{11}$  cells/mL）を用いて正しくテストおよびコントロールラインが観察できるかを調べた。その結果、 $\times 10^{-5}$  倍より濃い濃度でテストラインを確認することができた（視認限界濃度＝茎根腐細菌集菌液 $\times 10^{-5}$ 、図3）。明確なテストラインは、茎根腐細菌集菌液 $\times 10^{-4}$ の濃度で確認することができた。テストラインの濃さは、集菌液の濃度に依存的であった。このことは、サンプル中の細菌数がイムノクロマト試験を行う上で大切であることを意味し、実際の検体（塊根、茎など）をどの部位からサンプリングするかが重要であることを示唆している。

次に、茎根腐細菌病に感染および非感染

のサツマイモ株を使用してイムノクロマトの試作を行った。使用したサンプルは以下の通りである。ネガティブコントロールとして、茎根腐細菌病・基腐病共に非感染のサツマイモ株の茎と、茎根腐細菌病非感染・基腐病感染のサツマイモ株の茎を使用した。ポジティブコントロールとして、PCR検査にて茎根腐細菌病が陽性診断されたサツマイモ株の茎（病変部位、病変部から20cm離れた健全部位）および塊根（病変進行部位）を使用した。その結果、ポジティブコントロールのサンプルでのみテストラインを確認することができた（表2）。茎根腐細菌病に感染し病変した部位から20cm離れた健全部位をサンプルとした時、テストラインの濃さが視認限界に近かった。実験結果（図3）から予測した通り、サンプリング部位が重要であることが示唆された。茎根腐細菌病に非感染・基腐病感染の株からはテストラインの確認ができなかった。さらに、茎根腐細菌病に非感染・茎根腐細菌病以外のウイルス感染株でもテストラインを確認することはできなかった（データ非表示）。我々は、茎根腐細菌病感染株と基腐病感染株の区別だけでなく、他のウイルス感染株とも区別することができる信頼性の高いキットの開発に成功した。

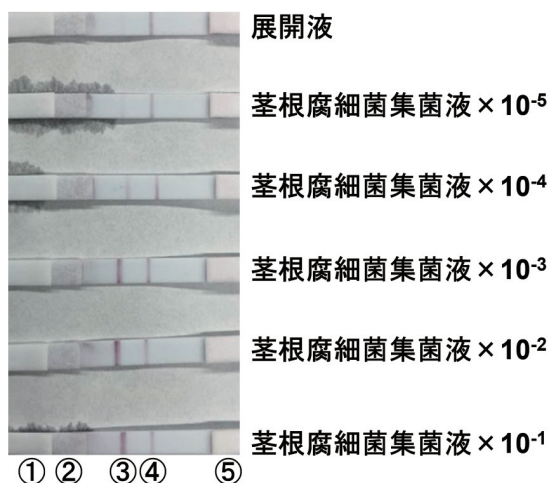


図3 茎根腐細菌集菌液を用いたイムノクロマトの検査結果。上から順に展開液、茎根腐細菌集菌液 $\times 10^{-5}$ 、 $10^{-4}$ 、 $\times 10^{-3}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-1}$ 倍希釈溶液と並ぶ。 $10^{-3}$ 希釈溶液よりも濃いサンプルにおいて、テストラインがしっかりと視認可能であった。テストラインの濃さは、集菌液の濃度に依存的であった。メンブレンも詰まりなく、バックグラウンドも低いことから、テストおよびコントロールラインをしっかりと視認することができた。  
①サンプルパッド、②コンジュゲートパッド、③テストライン、④コントロールライン、⑤吸収パッド。

## サンプル採取部位の検討

我々は、より精度高く茎根腐細菌病検査キットを使用できるよう感染株を用いて最適サンプリング部位の検討を行った。サンプルとして、塊根（腐敗部、腐敗部より5cm離れた部位）、茎（腐敗部、腐敗部より5cm離れた部位、枯れた部位）を使用した。その結果、腐敗部および腐敗部より5cm

表2 サツマイモ株を用いたイムノクロマトの結果

| サンプル   |     |       |    |                 | 結果                                                                                |        |            |
|--------|-----|-------|----|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------|--------|------------|
| 茎根腐細菌病 | 基腐病 | 株     | 部位 | 状態              | 写真                                                                                | テストライン | イムノクロマトの判定 |
| -      | -   | 圃場採取株 | 茎  | 健全全部            |  | 無      | ○          |
| -      | +   | 圃場採取株 | 茎  | 柄子殻有硬い状態        |  | 無      | ○          |
| +      | -   | 圃場採取株 | 茎  | 病変部             |  | 有      | ○          |
| +      | -   | 圃場採取株 | 茎  | 病変部から20 cmの健全全部 |  | 有(薄)   | ○          |
| +      | -   | 圃場採取株 | 塊根 | 腐敗進行中の病変部       |  | 有      | ○          |

※+：陽性、-：陰性

※圃場採集株は、茎根腐細菌病をPCR検査にて陽性確認株を使用

離れた健全部位において、塊根・茎共にテストラインを視認することができた(表3)。ただし、腐敗部より5 cm離れた健全部位では、テストラインが腐敗部よりも薄かった。感染部位から20cm離れた健全部のサンプル(表2)では、5 cm離れた部位よりも著しくテストラインの視認が困難であったことから、腐敗部からの距離はサンプル採取において大切であると考ええる。感染株でも枯れてしまった部位では、テストラインを視認することはできなかった(表3)。枯れた部位では生存している *Dickeya sp.* が著しく少なく検出限界以下になっていると考えられる。

我々が茎根腐細菌病に感染したサツマイモ株の様々な部位を用いてイムノクロマト検査を行った結果、サンプル採取には以下の注意が必要であると考ええる。まず、枯れた部位からのサンプル採取は行わない。腐敗部位や腐敗部位から少し離れた部位での検査は可能であったが、腐敗が進行しすぎた部位ではサンプルの粘性が高くメンブレンが詰まったり、メンブレン内で流速が遅くなることで偽陽性が出てしまう可能性があることから避けることを推奨する。一方

表3 茎根腐細菌病感染株における最適サンプル採取部位の検討

| サンプル |                 | 結果                                                                                |        |            |
|------|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------|--------|------------|
| 部位   | 状態              | 写真                                                                                | テストライン | イムノクロマトの判定 |
| イモ   | 腐敗部             |  | 有      | ○          |
|      | 腐敗部から5cm離れた健全全部 |  | 有(薄)   | ○          |
| 茎    | 腐敗部             |  | 有      | ○          |
|      | 腐敗部から5cm離れた健全全部 |  | 有(薄)   | ○          |
|      | 枯れた部位           |  | 無      | ×          |

A: 茎



B: 塊根

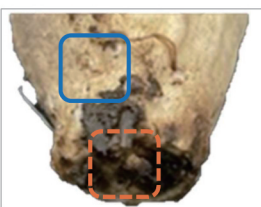


図4 サンプル採取最適部位。茎根腐細菌病に感染した茎(A)と塊根(B)の写真。サンプリングの最適部位は、腐敗部位(オレンジ点線)ではなく、腐敗部と健全部の境界部位(青実線)が最適であった。

で、腐敗部より離れすぎてしまうと細菌数が少なくテストラインの視認が難しくなるため、腐敗部より10 cm以内の部位をサンプルとして使用していただきたい。

これらのことから、イムノクロマト検査における最適サンプル採取部位は、茎根腐細菌病に感染したサツマイモ株の腐敗部位と健全部の境界であると我々は結論付けた(図4)。

## サツマイモにおける茎根腐細菌病検査キットの広がる可能性

本キットの開発により、従来の特殊な技術や環境が必要だったPCR検査と異なり、誰でも手軽に検査できるようになった(図5)。それにより、サツマイモの茎根腐細菌病と基腐病を早期に判別可能となった。茎根腐細菌病は土壌中にも存在しており、

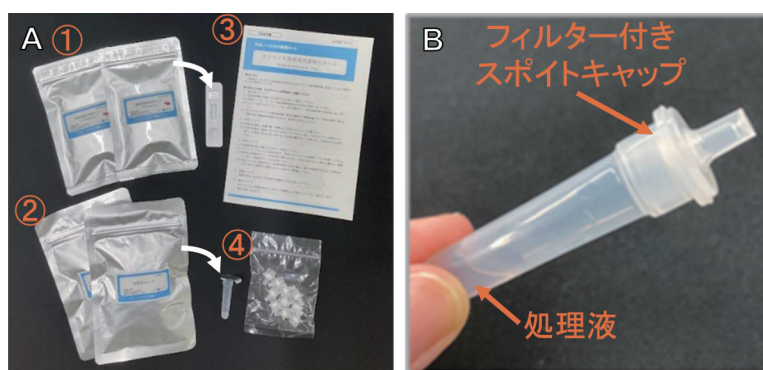


図5 サツマイモ茎根腐細菌病検査キット。(A) 検査キット一式。①検査用プレート、②処理用チューブ（処理液入り）、③説明書、④フィルター付きスポイトキャップ。(B) 処理用チューブにサンプルを入れ、フィルター付きスポイトキャップをして軽くチューブを揉みスポイトの先から検査プレートにサンプル液を滴下するだけで検査が可能である。

翌年の作付け前の検査を実施することで感染抑止に繋がる可能性がある。現在、我々は土壌中の *Dickeya* 属の細菌も検査できるように本キットの改良を進めている。

さらに、本キットはサツマイモ以外にも役立つ可能性がある。茎根腐細菌病の病因である *Dickeya* 属の細菌は、サツマイモ以外のジャガイモ（萎凋細菌病、黒あし病）やサトイモ（立枯細菌病）でも病気を引き起こすことが知られている。さらに、モモ、リンゴ、ナシ、イチゴ、マンゴーなどでも病気を引き起こすとの報告がある。今回、我々が開発した検査キットは、予備試験において、種が同定されていない、若しくは異なっていたとしても *Dickeya* 属全般の細菌を検出することを示唆する結果を出している。このことから、我々が開発したキッ

トは、サツマイモにとどまることなく、色々な植物において *Dickeya* 属が原因である病気に利用できると思われる。

## 謝辞

本イムノクロマト検査キットの開発において、霧島酒造株式会社様、宮崎県総合農業試験場様ならびに農研機構九州沖縄研究センター様には、茎根腐細菌病に関する知見やサンプルの提供および各種評価に協力いただいた。この場を借りて感謝を申し上げます。

## 引用文献

- 1) 農業生物資源ジーンバンク、日本植物病名データベース（2025年01月最終検索）、[https://www.gene.affrc.go.jp/databases-micro\\_pl\\_diseases.php](https://www.gene.affrc.go.jp/databases-micro_pl_diseases.php)