

イムノクロマト法を用いたサツマイモ基腐病菌検査キットの 開発および茎根腐細菌病菌の土壌検査キットの可能性

小池化学株式会社
新事業企画部 新事業企画課

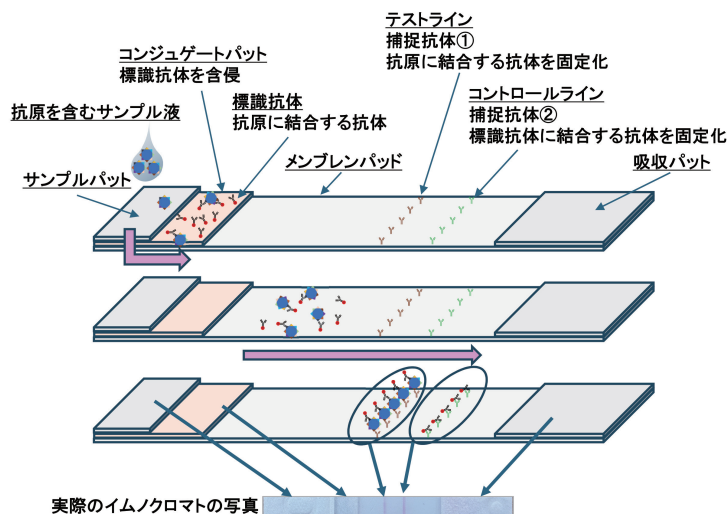
むねとも ありさ わん ちんゆ おみ ひろゆき※
棟朝亜理紗、王 靖嶼、小見 宏幸※
※責任著者

1. はじめに

サツマイモ基腐病は、糸状菌 (*Diaporthe destruens*) を原因菌とし、2018年に鹿児島県・宮崎県で初めて確認され、2021年には北海道でも発生確認がされるなど急速に全国に拡大している病気である。病徴としては、株の地際のあたりが暗褐色～黒色に変色し、株全体が萎凋、枯死するという特徴がある。さらに、塊根はやや硬いスポンジ状に腐敗し、罹病部全体が黒褐色になる。基腐病のこれらの症状は、細菌 (*Dickeya*

sp.) を病因とする茎根腐細菌病と酷似している。専門家が観察をすれば2つの病気を見分けることも可能だが、誰でもできるものではなく目視情報のみで簡単に病名を特定することは難しい。

一方で、基腐病と茎根腐細菌病の病因菌は異なることから、それぞれの病気に対する対策も異なる。そのため、当社はこれら2つの病気の『いつでも・どこでも・誰でも』簡単に検査ができるイムノクロマト法 (図1) を用いた検査キットを開発し早期



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。

診断を可能にすることを目指した。その第一歩として、昨年、茎根腐細菌病菌を検出するイムノクロマト検査キットの開発を行った（小見、2025）。これに続き、今年、『基腐病菌検査キット』の開発を行ったので報告する。

これら2種類の検査キットは、検査対象をサツマイモの茎や塊根とし、「診断」を目的とした検査キットである。基腐病菌および茎根腐細菌病菌は、土壤中に存在しているため、土壤中のこれら菌を直接、測定できれば、病害発生リスクの評価が可能になると考えられる。その第一歩として、当社では将来的に「リスク評価」を目指した『茎根腐細菌病菌の土壌検査キット』の開発を行ったので併せて報告する。

2. 基腐病菌検査キット（検査対象：サツマイモの塊根・茎）

昨年開発したサツマイモの塊根と茎を検査対象とした茎根腐細菌病菌検査キットと同様の方法（小見、2025）で基腐病菌検査キットの開発を行った。

まず、基腐病の症状が出ているサツマイモのサンプルを用いて評価を行った。1 cm角の塊根を処理チューブに入る大きさに切り、全量チューブ内へ入れ、軽く揉みこんだものをサンプル液とした（図2）。サンプル液をイムノクロマトに滴下して評価を行った。その結果、基腐病菌検査キットでは、腐敗部を避けた健全部（健全部）、腐敗部と健全部の境界部（境界部）、腐敗部の全てのサンプルでテストラインを確認することができた。テストラインの濃さは、腐敗部と健全部の境界部が一番濃かった。健全部と腐敗部では、テストラインの濃さは同じぐらいであった。

昨年開発した茎根腐細菌病菌の検査キットでは、塊根の腐敗部をサンプルとした時に偽陽性が出ていた（小見、2025）。このため、基腐病菌検査キットにおいて、腐敗部のサンプルで出たテストラインが偽陽性かどうかを検証するため、茎根腐細菌病菌の検査キットに対して基腐病菌に感染したサツマイモを用いて評価を行った。その結果、腐敗部ではテストラインが確認できた（偽

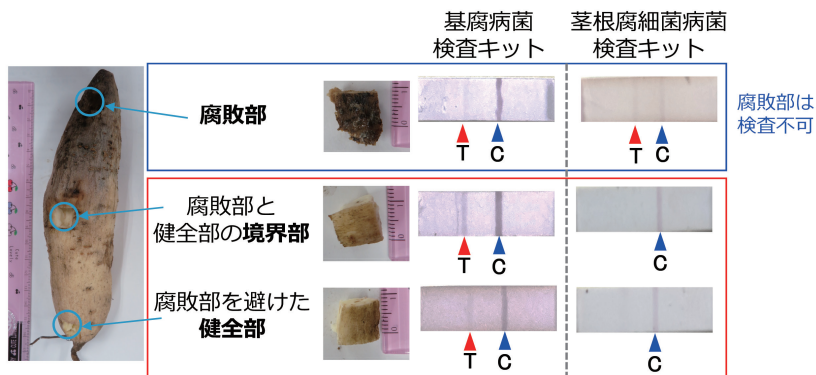


図2 基腐病に感染したサツマイモを用いた基腐病菌検査キットの評価

基腐病菌に感染したサツマイモを用いて、2つの検査キットで評価を行った。サツマイモは1 cm角サイズの塊根を使用している。腐敗部では、両方でテストラインを確認することができた（偽陽性、上段）。腐敗部と健全部の境界部（中段）および健全部（下段）では、基腐病菌検査キットでのみテストラインを視認することができた（陽性判定）。腐敗部では、検体として適さないことが明らかとなった。

▲T：テストライン、▲C：コントロールライン

陽性、図2)が、境界部と健全部では、テストラインを視認することはできなかった。

続いて、つる割病菌に感染したサツマイモと茎を用いて評価を行った。その結果、基腐病菌検査キット、茎根腐細菌病検査キットだけでなく、サツマイモとは全く無関係のトマトの病気に対する検査キットでもテストラインを視認することができた(偽陽性、図3)。このことから、腐敗部ではどのイムノクロマトでも偽陽性が出てしまう可能性が示唆された。

最後に、培養した菌の破碎液を用いて基腐病菌検査キットの評価を行った。基腐病菌の破碎液(1.0 mg/mL)にて評価を行った結果、テストラインを視認することができた。次に、基腐病菌と同じく糸状菌の一種であるつる割病菌の破碎液(1.0 mg/mL)を用いて評価を行った結果、テストラインを確認することはできなかった。さらに、茎根腐細菌病菌の破碎液(1.0 mg/mL)に対しても評価を行った結果、テストラインを視認することはできなかった。これらのことから、培養菌の破碎液を用いた評価の場合には、つる割病菌、茎根腐細菌病菌に対して交差性がないことが明らかとなった。これらの結果から、基腐病菌の感染検査に一番適したサンプリング部位は「腐敗部と健全部の境界部」であることが

判明した。また、今回作製した基腐病菌検査キットでは、培養菌の破碎液をサンプルとした場合には、つる割病菌、茎根腐細菌病菌にそれぞれ交差性がないことを確認できた。しかしながら、これらの菌に感染をしたサツマイモの塊根・茎では評価を行っていない。今後、実際につる割病菌や茎根腐細菌病菌に感染したサツマイモを検体として、今回の試作品の評価を行っていく必要があると考えている。

3. 茎根腐細菌病菌の土壌検査キット

茎根腐細菌病は、病原菌が付着した苗や塊根が持ち込まれて発病する場合だけでなく、土壌中に生存している病原菌が傷ついた塊根や茎などから感染し発病する可能性が示唆されている。これは感染拡大のリスクにつながるが、一般的に土壌自体の感染検査は手間がかかり、難しいとされている。そこで、当社は土壌自体の茎根腐細菌病菌を簡単に検査できるイムノクロマト検査キットの開発をすることとした。

当社では、昨年、茎根腐細菌病菌検査キットの開発・上市を行っている(小見、2025)。この検査キットを土壌用に改良することとした。イムノクロマトは「抗原抗体反応」と「毛細管現象」を利用した検査キットであることから(図1)、土壌用検

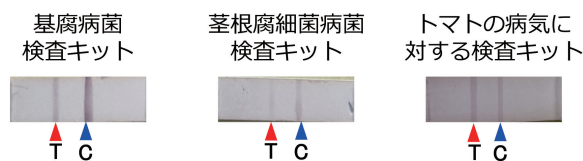


図3 つる割病菌に感染した茎(腐敗部)を用いた基腐病菌検査キットの評価

つる割病菌に感染したサツマイモの茎(腐敗部)をサンプルとして、基腐病菌(左)、茎根腐細菌病菌(中央)、トマトの病気に対する(右)検査キットで評価を行った。全ての検査キットでテストラインを視認することができた(偽陽性)。腐敗部は評価に適さないことが明らかとなった。

▲T: テストライン、▲C: コントロールライン

査キットの開発に着手するにあたり、次の3つの懸念点(①イムノクロマトへの土壌の細かい粒子の流れ込み、②土壌pH変動の影響、③土壌中の常在菌による偽陽性)が考えられた。

懸念点①は、土壌の細かい粒子がイムノクロマトへ流れ込むことにより、バックグラウンドが上がり、テストラインやコントロールラインが見えなくなってしまうことや、偽陽性が出てしまう危険性である。実際に、昨年開発した茎根腐細菌病菌検査キット(検査対象:サツマイモの塊根・茎)に土壌サンプルを添加して評価を行った結果、土壌がイムノクロマトへ流れ込んで評

価ができなくなってしまった(図4A)。このため、イムノクロマトへの細かい土壌の流れ込みが抑制されるように、サンプル滴下で使用するフィルターの孔径と、イムノクロマトのサンプルパットのメッシュを細かくした(図4B)。その結果、イムノクロマトへの土壌の流れ込みを抑制することができた(図4C)。

懸念点②は、土壌pHの影響でコンジュゲートパットに含まれる標識粒子が凝集して偽陽性が出てしまうことや、抗原抗体反応が阻害されてテストライン・コントロールラインが出なくなる可能性である。はじめに、精製水にサツマイモが栽培されている圃場の土壌を溶かしpH測定を行ったところ、pH4.5であった。このpH領域は標識粒子を凝集させ、抗原抗体反応を阻害するように作用する。このことから、処理チューブに土壌を加えてサンプルを調整した後、サンプル液が中性になる条件を検討する必要があると考えた。展開液の組成の見直しに加えて、土壌の量と処理チューブ内に入れる展開液量の検討を行った。その結果、「展開液1 mLに対して、土壌を約0.6 g加えてよくもみこみ、20分静置した後、イムノクロマトにサンプルを添加する。」という検査方法が良いことが明らかとなった。

懸念点③は、土壌中には一般的に多種の常在菌が存在しているため、茎根腐細菌病菌以外の細菌に反応し偽陽性が出てしまう可能性である。そこで、茎根腐細菌病が発生していない土壌を用いて偽陽性が出るか否かを検証した。その結果、この土壌では、テストラインを確認することができなかった(図5A)。次に検査キットの感度を調

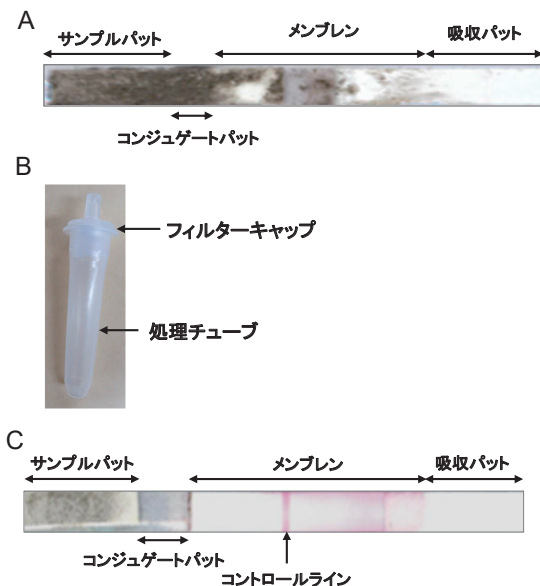


図4 土壌用検査キットの改良点

- (A) 茎・塊根用の検査キットで土壌の評価を行った結果、イムノクロマトに土壌が流れ込み評価ができなかった。
- (B) イムノクロマト検査で使用する処理チューブとフィルターキャップ。フィルターキャップのフィルター孔径を小さくすることでメンブレンへの土壌粒子の流れ込みを抑えた。
- (C) 茎根腐細菌病菌の陰性土壌をサンプルとして検査を行ったイムノクロマトの写真。サンプルパットのメッシュを細かくすることでコンジュゲートパットやメンブレンへの土壌粒子の流れ込みを抑えた。フィルターキャップとサンプルパットで土壌用粒子をトラップしたことにより、検査時のバックグラウンドの上昇や偽陽性を抑えることに成功した。

べるため、土壌用検査キットと現在販売をしている検査キット（サツマイモの塊根・茎用）のデータを比較した（図5 B）。茎根腐細菌病が発生していない土壌または展開液に茎根腐細菌病菌破碎液0.01、0.1、1、10 mg/mLの濃度になるように加えたサンプルを用いて評価を行った。その結果、塊根・茎用検査キットと同様に、土壌用検査キットも破碎液0.01 mg/mLでテストラインを視認することが可能であった（図5 A）。また、濃度依存的にテストラインが濃くなることも確認できた。このことから、今回開発した土壌用検査キットは、昨年開発した塊根・茎用検査キットと同様の検出能力があることが判明した（図5）。

最後に、実際に茎根腐細菌病菌に感染したサツマイモが栽培されていた土壌を使用して、検査キットの評価を行うこととした。茎根腐細菌病菌に感染したサツマイモが栽培されている圃場の土壌（8月採取）と、

それと同じ圃場でサツマイモを収穫後かつ少し乾燥した土壌（11月採取）を使用して評価を行った。その結果、感染したサツマイモが栽培されている最中の圃場では、はっきりとしたテストラインを確認することができた（図6 A）。一方で、サツマイモ収穫後の圃場からサンプリングした土壌では、テストラインを確認することはできたが8月に採取した土壌と比較すると薄かった（図6 B）。これらの結果から、実際の圃場の土壌でも検査を行えることが明らかとなった。ただし、サンプリングをする場所や時期などを今後検証していく必要があると考える。

これらの結果から「現在、当社で販売をしている茎根腐細菌病菌検査キットを一部改良することで土壌用検査キットとして開発することに成功した」と言える。今後、基腐病やつる割病が発生している圃場の土壌での評価や、検査に適している土壌の条

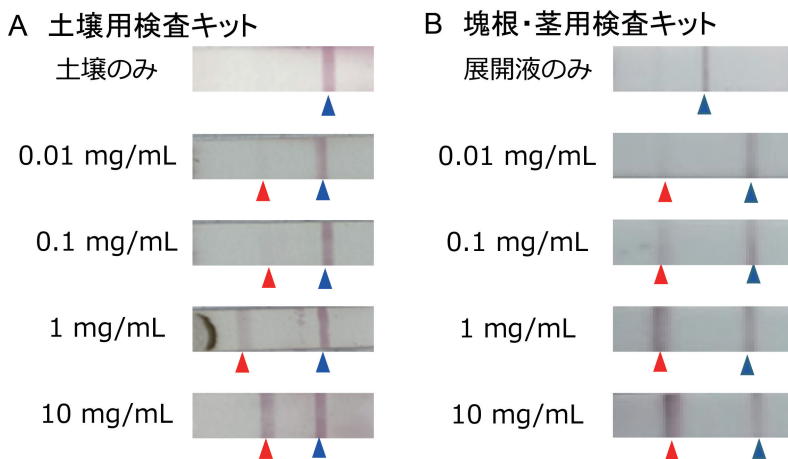


図5 茎根腐細菌病検査キット（土壌用と塊根・茎用検査キットの比較）

(A) 土壌を用いた評価結果。検査には、茎根腐細菌病菌陰性土壌を使用した。上より、土壌のみ、土壌+茎根腐細菌病菌破碎液0.01、0.1、1、10 mg/mL。土壌のみの場合にはテストラインを確認することはできなかった。菌破碎液0.01 mg/mL以上の時、テストラインを視認することができた。ラインの濃さは濃度依存的であった。

(B) いも類情報誌No. 163（小見、2025）の改訂図。サツマイモの塊根・茎用の検査キットのデータ。上から、展開液のみ、展開液+茎根腐細菌病菌破碎液0.01、0.1、1、10 mg/mL。破碎液0.01 mg/mL以上でテストラインを確認することができた。土壌用検査キットと、塊根・茎用検査キットの検出感度は、同じぐらいであることが明らかとなった。

▲T：テストライン、▲C：コントロールライン

件などを検証していきたい。

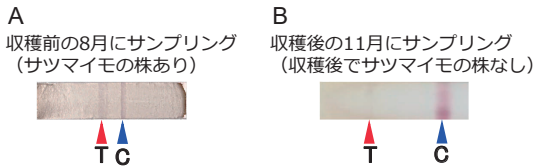


図6 茎根腐細菌病が発生した圃場の土壌を用いた評価結果

- (A) と (B) の土壌は、同じ圃場より異なる時期にサンプリングを行った。
(A) 茎根腐細菌病が発生している圃場より土壌をサンプリングした (8月にサンプリング)。コントロールライン、テストライン共にはっきりと確認することができた。
(B) 茎根腐細菌病が発生していた圃場より収穫後に土壌をサンプリングした (11月にサンプリング、乾燥気味の土壌)。コントロールラインは確認できたが、テストラインは8月に採取した土壌と比較すると薄かった。
▲T: テストライン、▲C: コントロールライン

4. 開発したイムノクロマト検査キットの将来性

サツマモの病気を診断する検査キットとして、昨年の茎根腐細菌病菌検査キットに続いて、類似の病気に感染したサツマイモ検体で未評価ではあるが基腐病菌検査キットの開発に成功した。南九州の地域で被害が比較的大きい基腐病と茎根腐細菌病の検査が「どこでも・誰でも・かんたんに」可能

となったことは大変意義あることである。

さらに、茎根腐細菌病菌に関しては、土壌用検査キットの開発にも成功した。検査結果と発病の関係性の評価は今後の課題ではあるが、土壌中の茎根腐細菌病菌の有無を簡単に検査できるようになったことは将来的に茎根腐細菌病の発病リスク管理に繋がり、感染拡大防止に大きく貢献できる可能性を秘めていると言える。今回の土壌用検査キットのノウハウを基腐病菌や土壌中に存在している作物に病害を起こす他の原因菌へも応用してききたい。

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には、基腐病・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る。

引用文献

小見宏幸、サツマイモにおける茎根腐細菌病検査キットの開発、いも類振興情報、163号、7-12ページ、2025年04月