

# サツマイモウイルスの 複数同時検出技術

宮崎大学 農学部 植物生産環境科学科  
植物病理学研究室 教授 竹下 稔

令和2年12月8日

従来技術の  
課題

開発の  
経緯

技術紹介

将来の  
展望

最後に

## 従来のサツマイモウイルス病害の診断法



- RT-PCR法を用いた個別ウイルスの検出・診断  
⇒各ウイルスを個別診断すると検出コストが高くなる  
場合によっては追加工程を必要とし、迅速性に欠ける

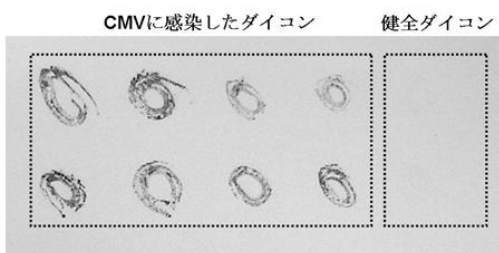


図2. Tissue print法によるウイルスの検出

- ウイルス特異的抗体を用いた検出(ELISA法など)  
⇒PCRと比べて、特異性や検出感度がやや低い  
検出に要する時間が長く、迅速性に欠ける

### <解決すべき課題>

- ①迅速かつ低コストでの検出
- ②高い特異性と検出感度、幅広い変異株への対応力の強化

従来技術の  
課題

開発の  
経緯

技術紹介

将来の  
展望

最後に

## 従来技術と本技術の相違

- 迅速、特異的、高感度かつ遺伝子変異に対応する技術として、  
mRT-PCRによる4種ウイルス同時検出技術を開発した

|                    | 特異性 | 検出感度 | 検出費用 | 迅速性 | 遺伝子変異<br>への対応 |
|--------------------|-----|------|------|-----|---------------|
| 個別診断<br>(RT-PCR)   | ◎   | ◎    | △    | ○   | ○             |
| 血清学的診断<br>(ELISA法) | △   | ○    | ◎    | △   | △             |
| 本技術<br>(mRT-PCR法)  | ◎   | ◎    | ○    | ◎   | ◎             |

本技術は、個別診断と比べて1/4のPCRコスト削減が期待される

従来技術の  
課題

開発の  
経緯

技術紹介

将来の  
展望

最後に

## なぜサツマイモのウイルス？

- 宮崎県は甘藷の主要産地（焼酎用・青果用）
- 甘藷生産で重要なのは収量と品質

|   |     | 生産量(t)  |
|---|-----|---------|
| 1 | 鹿児島 | 282,000 |
| 2 | 茨城  | 174,900 |
| 3 | 千葉  | 101,200 |
| 4 | 宮崎  | 90,000  |

国内甘藷生産量(H29)

生産上の最大脅威は病害!!

サツマイモの病害

糸状菌

細菌

ウイルス

- 1 サツマイモ感染性ウイルスは30種以上
- 2 品質・収量の低下を招く場合がある
- 3 種芋利用によるウイルスの蓄積が生じる

種苗のウイルス検定や、ほ場での発生ウイルスの把握は  
安定生産にとって極めて重要!!!

従来技術の  
課題

開発の  
経緯

技術紹介

将来の  
展望

最後に

## 検定対象として注目したウイルス

- SPFMV (sweet potato feathery mottle virus)
- SPVG (sweet potato virus G)
- SPLCV (sweet potato leaf curl virus)
- SPSMV-1 (sweet potato symptomless virus-1)

＜ウイルス病害の典型的病徴＞



### ＜注目ポイント＞

- 国内で幅広く分布している
- 罹病株の多くに感染が認められる
- 塊根品質や収量に影響を与える

上記4種ウイルスの検出で、90%以上のウイルス感染株を把握できる

参考文献: Virus Incidence of Sweet Potato in Korea from 2011 to 2014 Plant Pathol. J. 33(5): 467-477 (2017)  
Evaluation of resistance to complex infection of SPFMVs in transgenic sweet potato Breeding science 58: 243-250 (2008)

従来技術の  
課題

開発の  
経緯

技術紹介

将来の  
展望

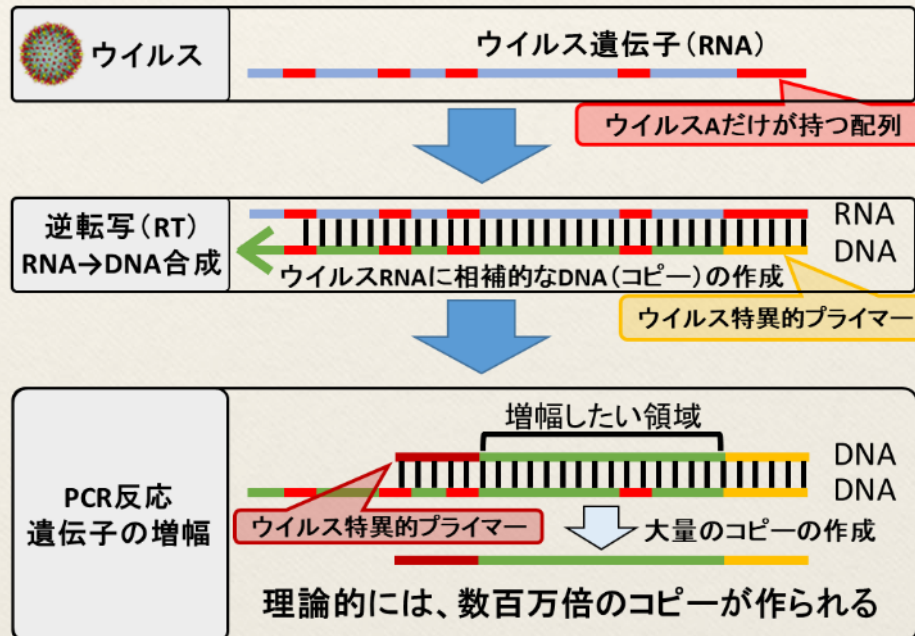
最後に

# 着目したウイルス検出手段

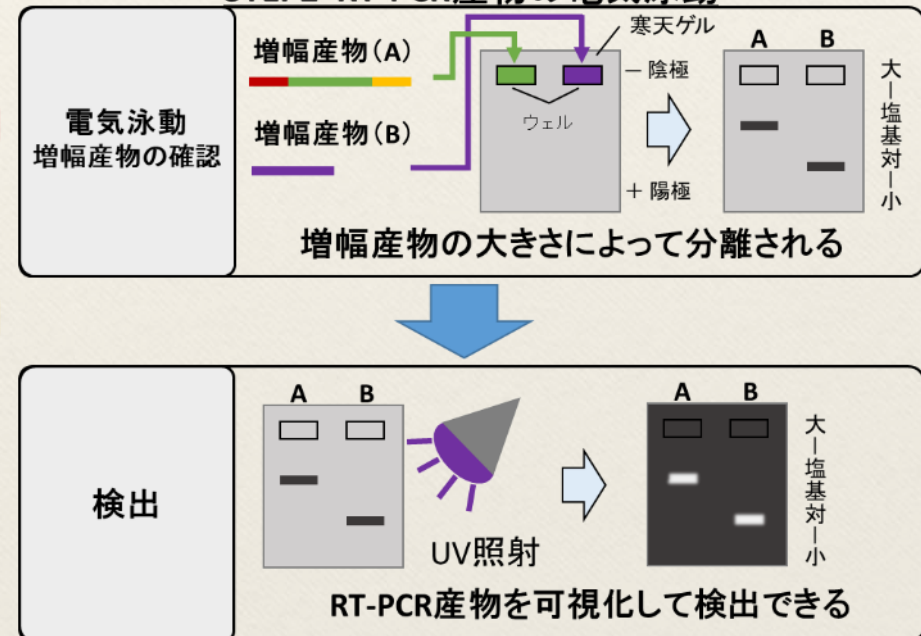
- 検出精度の高いRT-PCR法を用いた同時検出の可能性を探る

## RT-PCRによるウイルス診断・検定の流れ

### STEP1 RT-PCR



### STEP2 RT-PCR産物の電気泳動



従来技術の  
課題

開発の  
経緯

技術紹介

将来の  
展望

最後に

## マルチプレックス(m)RT-PCRの鍵

- mRT-PCRの鍵:どのようなプライマーを用いるか

### プライマーの設計

ウイルスA

共通

Forward

Reverse

ウイルスB

Reverse

ウイルスC

Forward

Reverse

ウイルスD

Forward

Reverse

### <設計上の追加ポイント>

各プライマーは遺伝子変異に対応できる縮重プライマーで作製した

従来技術の  
課題

病害の  
いろは

技術紹介

将来の  
展望

最後に

## 具体的な検出作業の流れ

試料回収  
核酸抽出

mRT-PCR

電気泳動

検出



葉: 50mgを回収



約30分

約1時間30分

約30分

約3時間で  
検出が可能

※使用する試薬、機材等で所要時間は若干変わる

従来技術の  
課題

開発の  
経緯

技術紹介

将来の  
展望

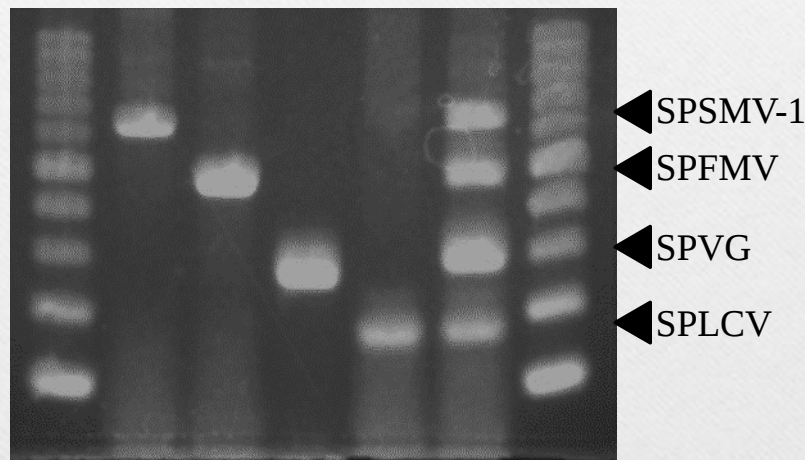
最後に

## 【実施例1】mRT-PCRによる特異的検出

＜mRT-PCRの課題＞

プライマーペアの複数同時使用は、検出に影響を与える恐れがある

検証：各ウイルスを特異的に検出できるか？



各ウイルス個別検出

4種ウイルス同時検出

単独のウイルスを特異的に検出  
mRT-PCRで同時に検出が可能



mRT-PCRでの特異性は、増幅産物の  
シーケンス解析でも確認している

従来技術の  
課題

開発の  
経緯

技術紹介

将来の  
展望

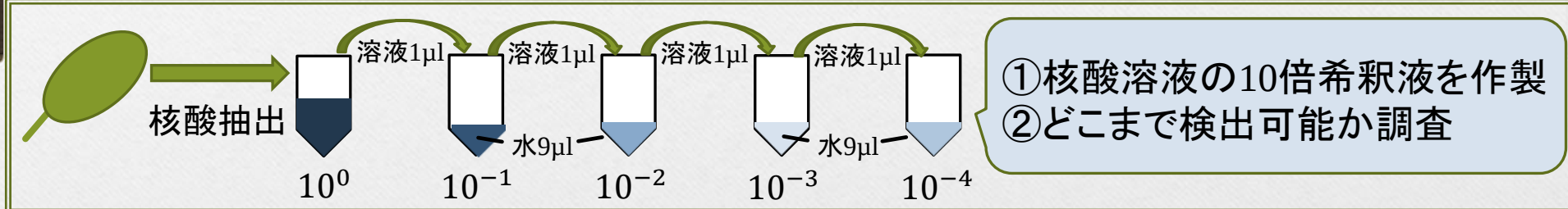
最後に

## 【実施例2】検出感度の比較調査

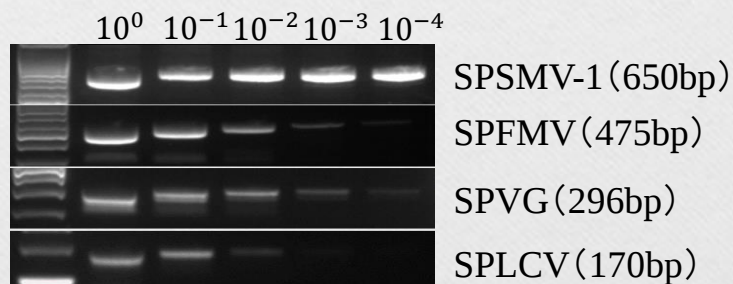
＜mRT-PCRの課題＞

プライマーペアの複数同時使用は、検出に影響を与える恐れがある

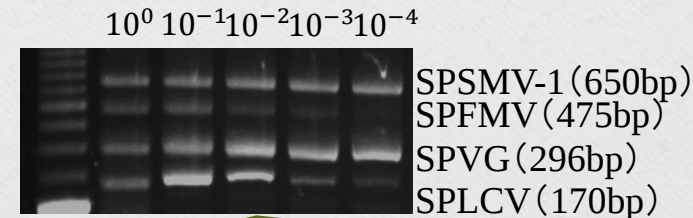
検証：検出感度に影響は見られるか？



1. 各プライマーセット単独使用の場合



1. mRT-PCRの場合



検出感度への影響は認められない

従来技術の  
課題

開発の  
経緯

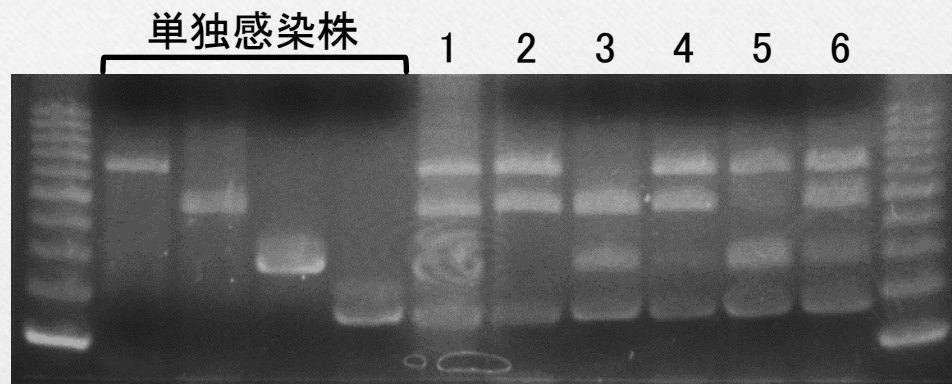
技術紹介

将来の  
展望

最後に

## 【実施例3】栽培株でのウイルスチェック

mRT-PCRは、自然界の様々な感染パターンを確実に検出できるか？  
検証：ほ場栽培株を用いてウイルス検定を実施



2.0%アガロースゲル電気泳動 GelRedによる後染め

| 株 | SPLCV | SPVG | SPFMV | SPSMV-1 |
|---|-------|------|-------|---------|
| 1 | +     | +    | +     | +       |
| 2 | +     | -    | +     | +       |
| 3 | +     | +    | +     | -       |
| 4 | +     | +    | +     | +       |
| 5 | +     | +    | -     | +       |
| 6 | +     | +    | +     | +       |

+: 陽性、- : 陰性

様々な感染パターンでの検出が可能であることが明らかとなった

従来技術の  
課題

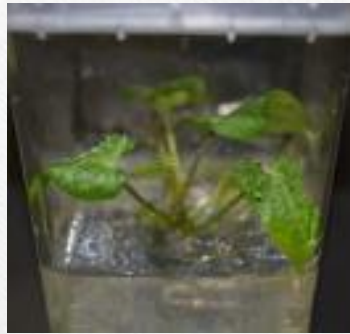
開発の  
経緯

技術紹介

将来の  
展望

最後に

## 想定される用途



- ウイルスフリー化苗の作製・検定

＜ねらい＞

- ・健全種苗の配布による病害リスクの低減



- ほ場流行ウイルス種の把握

＜ねらい＞

- ・病害を伝搬する昆虫を効果的に防除可能

2つの戦略を組み合わせることで、サツマイモの安定生産を後押しする

## 実用化に向けた課題

- 本技術は既に社会実装レベルの段階に達している。

### ＜今後の課題＞

- さらなる利便性を高めるためのキット化を進めたい。
- 実証試験を含めた利用実績の蓄積が必要である。

従来技術の  
課題

開発の  
経緯

技術紹介

将来の  
展望

最後に

## 企業への期待

- 技術面の後押し:キット化(簡便化と迅速化)

利用実績の蓄積

- 期待する利用者:種苗会社、JA、都道府県、農業法人
- 特に、サツマイモウイルスフリー化苗の生産・導入を検討中の企業等には本技術の導入が有効と思われる。

併せて、サツマイモ以外の病害においても同様の技術の開発、その他ウイルス病害に関するご相談を受け付けています。

従来技術の  
課題

開発の  
経緯

技術紹介

将来の  
展望

最後に

## 本技術に関する知的財産権

- 発明の名称: サツマイモ病原ウイルス検出用プライマーセットおよびサツマイモ病原ウイルスの検出方法
- 出願番号 : 特願2019-227418
- 出願人 : 宮崎大学
- 発明者 : 竹下稔、小倉李来

従来技術の  
課題

開発の  
経緯

技術紹介

将来の  
展望

最後に

## 産学連携の経歴

- 2018年-2020年 (株)くしまアオイファームと共同研究実施
- 2019年-2021年 JST A-STEP機能検証フェーズ  
試験研究タイプ採択

従来技術の  
課題

開発の  
経緯

技術紹介

将来の  
展望

最後に

## お問い合わせ先

宮崎大学

産学地域連携センター 知的財産部門

TEL 0985-58-7592

FAX 0985-58-7793

e-mail [chizai-s@of.miyazaki-u.ac.jp](mailto:chizai-s@of.miyazaki-u.ac.jp)