

Broad bean stain virus を特異的に検出する 新規 RT-PCR 法の開発

仁藤 史乃^{1),2)}・今村 友哉^{1),3)}・藤原 裕治¹⁾・松浦 貴之¹⁾・柳澤 広宣⁴⁾

横浜植物防疫所調査研究部

Development of a new RT-PCR method for the specific detection of broad bean stain virus. Fumino Nito^{1),2)}, Yuya Imamura^{1),3)}, Yuji Fujiwara¹⁾, Takayuki Matsuura¹⁾ and Hironobu Yanagisawa⁴⁾ (¹⁾Research Division, Yokohama Plant Protection Station ²⁾Plant Protection Division, Food Safety and Consumer Affairs Bureau, MAFF ³⁾Institute for Plant Protection, NARO ⁴⁾Yokohama Plant Protection Station) *Res. Bull. Pl. Prot. Japan.* 62 : 1-10 (2026)

Abstract: Broad bean stain virus (BBSV; *Comovirus viciae*) infects legumes and reduces their yield. Because BBSV infects host plants during growth and is seed-transmitted in broad beans, peas, and lentils, imports from countries where BBSV occurs are restricted under the Plant Protection Act. Currently, the RT-PCR detection method developed by Pérez-Egusquiza *et al.* (2014) is the only BBSV-specific genetic diagnostic technique available. However, this method produces non-specific PCR products of similar size to BBSV amplicons in healthy broad beans. In this study, we designed a BBSV-specific primer set targeting the polymerase region conserved between two BBSV strains reported by Nito *et al.* (2025) and evaluated its detection sensitivity and specificity in healthy host plants. The new primer set did not generate non-specific reactions in leaves or seeds of healthy hosts and did not cross-react with closely related viruses. It successfully detected the Syrian strain, which could not be identified using the method of Pérez-Egusquiza *et al.* (2014), and detected as few as 400 copies. Moreover, the primer set functioned effectively in both conventional RT-PCR and SYBR Green-based real-time RT-PCR with equivalent sensitivity. Our newly developed assay provides a highly sensitive and reliable method for BBSV detection.

Keywords: broad bean stain virus, RT-PCR, specific primer, detection method, legume seeds

緒 言

Broad bean stain virus (BBSV; *Comovirus viciae*) はマメ科植物に感染するウイルスで、宿主植物の種類や品種、BBSV の系統によって被害程度は異なるが、感染すると葉にモザイク症状を引き起こし、収量を減少させることが知られている (El-Kewey *et al.*, 2007; Kumari and Makkouk, 2007; Lecorre *et al.*, 2019)。また、BBSV の感染種子は種皮が変色し、商品価値が低下してしまう (Kumari and Makkouk, 2007)。本ウイルスは、アジア、中東、ヨーロッパ及びアフリカにおいて発生報告があり、近年ではアメリカ合衆国で発生報告されている (CABI, 2021)。BBSV は、汁液伝染のほか、ゾウムシ (ホソクチゾウムシ科及びゾウムシ科) により伝搬されて生育中に感染するほか、ソラマメ

(*Vicia faba*)、エンドウ (*Pisum sativum* L.) 及びヒラマメ (*Lens culinaris*) では種子伝染の報告がある (Fiedorow and Szlachetka-Wawrzyniak, 2002; Kumari *et al.*, 1996; Kumari and Makkouk, 2007)。日本国内では本ウイルスの発生はこれまで報告されていないが、感染種子が持ち込まれ侵入するおそれがあるほか、BBSV のベクターとして報告されるアカアシチビコフキゾウムシ (*Sitona lineatus*) が国内に発生しているため (日本応用動物昆虫学会, 2006)、侵入後にベクターにより感染拡大することが懸念される。本ウイルスの防除法には、感染植物の除去、健全種子の使用及びベクターの防除が挙げられる。

BBSV の侵入を防ぐため、我が国では、植物防疫法施行規則別表 1-2 に規定されている本ウイルスの発生報告がある国や地域からソラマメ、エンドウ及びヒラマメの栽培用種子を輸

¹⁾横浜植物防疫所調査研究部

²⁾農林水産省消費・安全局植物防疫課

³⁾農業・食品産業技術総合研究機構植物防疫研究部門

⁴⁾横浜植物防疫所

入する場合、輸出国における栽培地検査や血清学的診断法による検査等により BBSV に侵されていないことの証明を求めている（農林省, 1950）。現在、BBSV の検出方法には ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 法 や TBIA (tissue blot immunoassay) 法等の血清学的診断法が主に用いられている (Lecorre *et al.*, 2019)。BBSV の ELISA キットは海外の生化学メーカーから販売されているが、入手には時間を要するうえ、使用期限は 6 か月程度と短いため (Creative Diagnostics, 2025; Nano Diagnostics, 2025)、突発的に生じる疑義症状に対する備えとして、これらの ELISA キットを常備することは経済性が低い。また、Web 上に販売ページが存在するものの、実際に問い合わせると抗血清の製造が中止され販売が停止されていた事例もあり、安定的に検査体系を維持する事が困難な状況にある。このような状況下において、遺伝子診断法は、サーマルサイクラー等の機器やプライマーを含む試薬類を揃えれば、すぐに検定を行うことができる。また、一般的に遺伝子診断法は血清学的診断法よりも検出感度が高いため、種子に混在するウイルス等の検出法として PCR 法等の遺伝子診断法を採用するケースが増えている (Kaur *et al.*, 2020)。しかし、これまで BBSV を特異的に検出する遺伝子診断法は、Perez-Egusquiza *et al.* (2014) の方法のみであった。報告数が少ない原因の 1 つとして、BBSV の遺伝子配列情報が 1 分離株の部分配列のみしか解明されていないことが考えられる。そのため、遺伝子診断法により BBSV を検出するには、*Comovirus* 属のユニバーサルプライマー (Ye *et al.*, 2015) を用いて RT-PCR を行った後、遺伝子配列の解析を行う、または上述の種特異的プライマーによる RT-PCR 法しかない。更に、ユニバーサルプライマーを用いた場合、一旦 RT-PCR を行った後、遺伝子配列解析を実施することとなるため、最終的な検査結果を得るまでにより多くの時間を要する。これらの理由から、Perez-Egusquiza *et al.* (2014) の BBSV 特異的プライマーを用いた RT-PCR 法が検査法として採用されてきた。しかしながら、本法は健全ソラマメ (葉/種子) において、陽性と誤認しうる非特異的な反応が起きることがあった。そこで、新たに BBSV 特異的検出法を開発するために、これまで欠如していた基礎情報である BBSV 2 分離株の遺伝子の全長配列を取得した (Nito *et al.*, 2025)。これにより、遺伝子全領域から BBSV 特異的遺伝子領域を探索することが可能となった。その上で、BBSV 特異的かつ健全植物において非特異的反応が生じないコンベンショナル及びリアルタイム RT-PCR 法を用いた遺伝子診断法を開発することを目的に本研究を実施した。

材料及び方法

1. 供試試料

本研究では、農林水産大臣の許可を得て入手した BBSV のチュニジア株 (許可指令番号・農林水産省指令 5 横植第 325 号; BBSV-TN) 及びシリア株 (許可指令番号・農林水産省指令 5 横植第 326 号; BBSV-SY) を供試した。チュニジア株は、LOEWE Plant Diagnostics (Sauerlach, ドイツ) から、BBSV 感染エンドウ凍結乾燥葉で入手した。シリア株は、ICARDA (レ

バノン) の Kumari 博士から、BBSV 感染ソラマメ凍結乾燥葉 (Kumari and Makkouk, 1996) で分譲を受けた。

供試植物には、BBSV の自然宿主であるソラマメ (品種: 駒栄)、エンドウ (品種: ニムラサラダスナップエンドウ) 及びヒラマメ (商品名: レンズ豆) を用いた。各植物の種子を播種し、発芽した苗は 25°C に設定した温室内で自然光により育成した。なお、ソラマメは花芽分化を促進するため、発芽後 1 か月の間、低温条件下で保管し、その後は同様に 25°C に設定した温室内で育成した。健全株は、5-6 葉期に上位葉を採取し、BBSV 特異的プライマーセット (BBSV-F/R; Perez-Egusquiza *et al.*, 2014)、並びに *Comovirus* 属及び *Fabavirus* 属のユニバーサルプライマーセット (Comfab-F2/R2; Ye *et al.*, 2015) を用いて RT-PCR を行い、BBSV に感染していないことを確認した後、接種試験に使用した。ソラマメへの接種は低温処理後、エンドウへの接種は播種から 1 週間後に Nito *et al.* (2024) の方法に準じて BBSV の両株を汁液接種により接種した。また接種した植物のうち、チュニジア株を接種したエンドウは結実したため、種子を採集し、BBSV が種子バルクサンプルから検出可能か検証するための模擬検出試験に用いることとした。

2. RNA 抽出

ソラマメ、エンドウ及びヒラマメから RNA を抽出するため、植物の状態や部位に合わせ、3 種類の RNA 抽出法を使用した。

BBSV チュニジア株感染エンドウの凍結乾燥葉及び BBSV シリア株感染ソラマメの凍結乾燥葉からの RNA 抽出は、Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を用い、キット付属の手順書に従い実施した。

生葉からの RNA 抽出は、RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用い、キット付属の手順書に従い実施した。

種子からの RNA 抽出には、Vennapusa *et al.* (2020) の SDS-LiCl 法を用いた。種子を LAB MILL OML-1 (大阪ケミカル、大阪、日本) で粉碎し、種子粉末 3 g に対し 30 ml の磨砕緩衝液 (0.1 M Tris-HCl [pH 8.0]、25mM EDTA [pH 8.0]、2.5% PVP、2.5M NaCl、2.5% 2-mercaptoethanol) を加えた。次に、2.6ml の 25% SDS を添加・混合し、室温 (20 - 25°C) で 2 分間静置した。2ml チューブに混合液 1.9 ml を分取後、15,900 ×g で 4°C、5 分間遠心分離し、上清 800µl を新しい 2ml チューブに分取した。同量 (800µl) の phenol : chloroform : isoamyl alcohol (PCI; 25 : 24 : 1) を加えて混合し、15,900 ×g で 4°C、15 分間遠心分離した。上清 600µl を新しい 1.5ml チューブに移した後、chloroform 600µl を添加・混合し、15,900 ×g で 4°C、5 分間遠心分離した。次に、上清 500µl を新しい 1.5ml チューブに取り、1/4 量の 10M LiCl (125µl) と 1/10 量の 3M 酢酸ナトリウム (50µl) を加えて穏やかに混合し、- 20°C で一晩静置した。その後、混合液を 20,000 ×g で 4°C、5 分間遠心分離し、上清を除去した後、ペレットを 2M LiCl 500µl で洗い、20,000 ×g で 4°C、5 分間遠心した。上清を除去し、- 20°C に予冷した 80% エタノール 500µl で再度洗い、20,000 ×g で 4°C、5 分間遠心分離した。上清を除去してペレットを 3 分間風乾させて、RNase-free 水 50µl に溶解させた。

抽出した RNA の濃度は、NanoDrop 1000 spectrophotometer

(Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) で測定した。濃度測定後、抽出 RNA 溶液は RNase-free 水を用いて 50ng/μl に調整した。

3. 特異的プライマーの設計

Nito *et al.* (2025) は、BBSV 2 分離株 (チュニジア株及びシリア株) の遺伝子の全長配列を解析し、BBSV に最も近縁の red clover mottle virus (RCMV) の塩基配列を加えて各遺伝子領域の相同性を比較した結果、RNA1 上のプロテアーゼ-ポリメラーゼ (Pro-Pol) 遺伝子領域や RNA2 上の外被たんぱく質

(CP) -S 遺伝子領域は種特異性及び保存性が高く、BBSV 特異的プライマーの設計に適すると報告した。そこで、GenBank/ENA/DBJ (<http://ddbj.nig.ac.jp>) に登録されている BBSV 及び近縁の *Comovirus* 属ウイルス 3 種 (broad bean true mosaic virus (BBTMV)、cowpea mosaic virus (CPMV) 及び RCMV) の遺伝子の配列データから、Pro-Pol 遺伝子領域や CP-S 遺伝子領域の塩基配列データをすべて取得し、CLUSTAL W 2.1 program (Larkin *et al.*, 2007) により多重比較解析を行い、BBSV チュニジア株 (Accession No. LC848445) の Pol 遺伝子領域の 4,682-4,703 番目の配列からフォワードプライマーとして BBSV-

BBSV-TS-F

Species	Isolate	Accession No.	5'-	T	G	T	A	A	G	G	A	T	A	C	A	G	T	T	G	G	A	G	A	G	-3'
BBSV	Tunisia	LC848445
	Syria	LC848447
RCMV	S	X64886.1	.	C	C	.	G	.	.	.	C	.	G	T	.	.	A	G	A	
	PV1	MG600294.1	.	C	.	.	G	A	.	.	C	.	G	T	.	.	G
BBTMV	VRS-092	OK558628.1	.	.	C	C	.	A	G	A	.	.
	DSMZ PV-0098	OP357932.1	.	.	C	C	.	A	G	A	.	.
	EV-11	GU810903.1	.	.	C	C	.	A	G	A	.	.
CPMV	DSMZ PV-0522	OR879086.1	.	.	C	.	.	.	A	.	C	A
	DSMZ PV-0495	MT723988.1	.	.	C	.	.	.	A	.	C	A
	CPMV-TnT	OL543600.1	.	.	C	.	.	.	A	A
	DSMZ PV-0477	MT815984.1	.	.	C	.	.	.	A	A
	DSMZ PV-0074	MT682297.1	.	.	C	.	.	.	A	A
van Wezenbeek	X00206.1	.	.	C	.	.	.	A	A	

BBSV-TS-R

Species	Isolate	Accession No.	5'-	T	C	A	A	T	A	C	T	G	C	A	T	T	C	A	C	A	C	T	T	A	T	A	A	G	-3'
BBSV	Tunisia	LC848445
	Syria	LC848447	.	.	.	G	.	.	.	A
RCMV	S	X64886.1	.	.	C	C	.	A	G	A	A	.	.	C
	PV1	MG600294.1	.	T	.	C	C	.	A	G	A	A	.	.	C
BBTMV	VRS-092	OK558628.1	.	G	.	T	C	.	A	T	G	A	G	.	.	C	.	A	.
	DSMZ PV-0098	OP357932.1	.	G	.	T	C	.	A	T	G	A	A	.	.	C	.	A	.
	EV-11	GU810903.1	.	G	.	T	C	.	A	T	G	A	A	.	.	C	.	A	.
CPMV	DSMZ PV-0522	OR879086.1	.	T	.	C	A	.	A	T	G	A	A	.	.	C	.	A	.
	DSMZ PV-0495	MT723988.1	.	.	.	C	A	.	A	T	G	A	A	.	.	C	.	A	.
	CPMV-TnT	OL543600.1	.	.	.	C	A	.	A	T	G	A	A	.	.	C	.	A	.
	DSMZ PV-0477	MT815984.1	.	T	.	C	A	.	A	T	G	A	A	.	.	C	.	.	.
	DSMZ PV-0074	MT682297.1	.	.	.	C	A	.	A	T	G	A	A	.	.	C	.	.	.
van Wezenbeek	X00206.1	.	.	.	C	A	.	A	T	G	A	A	.	.	C	.	.	.	

Fig. 1. Sequence comparison among BBSV and closely related comoviruses. The primer regions in the compared sequences are indicated. Alignment analysis was performed on 13 sequences using the CLUSTAL W program, including two isolates (Tunisia and Syria) of BBSV, red clover mottle virus (RCMV), broad bean true mosaic virus (BBTMV), and cowpea mosaic virus (CPMV).

Table 1. List of comovirus isolate sequences used for DNA synthesis and primers designed for RT-PCR in this study.

Virus species	Taxon name	NCBI accession number	Position of sequences used to DNA synthesis ^a	Primer name	Nucleotide sequence (5'-3')	Target amplification (Position number ^b)	Product size (bp)
Cowpea mosaic virus (CPMV)	<i>Comovirus vignae</i>	X00206.1	4,513-5,012	CPMV-F	TCAACTCAAAAATGCAAGGCGA	4,595-4,616	387
				CPMV-R	TCCAATCTGCGAAAAGGAAGT	4,961-4,981	
Red clover mottle virus (RCMV)	<i>Comovirus trifolii</i>	X64886.1	4,567-5,066	RCMV-F	ACTTACTGATGGCTTGTGTCT	4,672-4,694	341
				RCMV-R	GGCACTTGTITGCTTACCA	4,991-5,012	
				BBSV-TS-F	TGTAAGGATACAGTTGGAGAG	4,682-4,703	
Broad bean stain virus (BBSV)	<i>Comovirus viciae</i>	LC848445	NA ^c	BBSV-TS-R	TCAATACTGCAITCACACTTATAAG	4,877-4,901	220
				T7-BBSV-TS-F	TAATACGACTACTATAGGAGATGTAAGGATACAGTTGGAGAG ^d	4,682-4,703	
		LC848447	NA	BBSV-SY-R	TCAGTACAGCAITCACACTTATAAG	4,888-4,912	NA

(a) Each sequence was derived from a 500-bp region of the BBSV-Tunisia (BBSV-TN) RNA1 segment (GenBank accession number LC848445, positions 4,542–5,041), which contains the target sequence of the newly designed primer set (BBSV-TS-F/R).

(b) Each position number corresponds to the base positions in the respective GenBank accession number.

(c) Not applicable.

(d) The T7 RNA polymerase binding site is underlined.

TS-F (5'-TGTAAGGATACAGTTTGGAGAG-3') を、4,877-4,901 番目の配列からリバースプライマーとして BBSV-TS-R (5'-TCAATACTGCATTCACACTTATAAG-3') を BBSV 特異的プライマー (増幅サイズ:220 bp) として設計した (Fig. 1, Table 1)。本プライマーセットは Primer3Plus (<https://www.primer3plus.com>) を使用して、GC 含量、プライマー内部及びプライマー間の相補性を調査し、プライマーダイマーの発生リスクが低いことを確認した。

4. コンベンショナル及びリアルタイム RT-PCR の反応条件

本試験において実施したコンベンショナル及びリアルタイム RT-PCR は以下の反応条件に基づき行った。

コンベンショナル RT-PCR には、QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN) を用いた。反応液 20 μ l の組成は下記のとおり； 鋳型 2.0 μ l (RNA 約 100 ng)、5 \times QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer 4.0 μ l、dNTP Mix (各濃度 10mM) 0.6 μ l、QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix 0.6 μ l、各プライマー (終濃度 0.6 μ M)。RT-PCR は、SimpliAmp Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて実施した。

コンベンショナル RT-PCR の反応条件は、プライマーセット毎に以下のとおり。

【BBSV-TS-F/R (本研究)】 50 $^{\circ}$ C 30 分、95 $^{\circ}$ C 15 分、(94 $^{\circ}$ C 30 秒、55 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 30 秒) \times 40 サイクル、72 $^{\circ}$ C 5 分。

【Comfab-F2/R2 (Ye *et al.*, 2015)】 50 $^{\circ}$ C 30 分、95 $^{\circ}$ C 15 分、(94 $^{\circ}$ C 50 秒、42 $^{\circ}$ C 50 秒、72 $^{\circ}$ C 50 秒) \times 5 サイクル、(94 $^{\circ}$ C 50 秒、50 $^{\circ}$ C 50 秒、72 $^{\circ}$ C 50 秒) \times 30 サイクル、72 $^{\circ}$ C 10 分。

【BBSV-F/R (Perez-Egusquiza *et al.*, 2014)】 50 $^{\circ}$ C 30 分、95 $^{\circ}$ C 15 分、(94 $^{\circ}$ C 30 秒、50 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 1 分) \times 40 サイクル、72 $^{\circ}$ C 5 分。

PCR 産物は、2% のアガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドを用い染色後、標的増幅バンドの有無を確認した。また、ソラマメ由来の核酸を含む鋳型に対して BBSV-F/R を用いて得られた PCR 産物を電気泳動する場合は、非特異的 PCR 産物との識別を容易にするため、3% のアガロースゲルを使用した。

リアルタイム RT-PCR には、Power SYBR Green RNA-to-CT 1-Step Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いた。反応液 20 μ l の組成は下記のとおり； 鋳型 2.0 μ l (RNA 約 100ng)、Power SYBR Green RT-PCR Mix (2 \times) 10.0 μ l、RT Enzyme Mix (125 \times) 0.16 μ l、各プライマー (終濃度 200nM)。リアルタイム RT-PCR は、QuantStudio 3 (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて、48 $^{\circ}$ C 30 分、95 $^{\circ}$ C 10 分、(95 $^{\circ}$ C 15 秒、58 $^{\circ}$ C 1 分) \times 40 サイクルの反応条件で行い、その後 95 $^{\circ}$ C 15 秒、60 $^{\circ}$ C 1 分、95 $^{\circ}$ C 15 秒の反応条件で融解曲線分析を行った。

5. 特異性試験

新規プライマーセット (BBSV-TS-F/R) が BBSV のみを検出し、かつ、健全な宿主植物 (ソラマメ、エンドウ及びヒラマメ) の葉及び種子に対して非特異的増幅を生じないことを確かめるため、BBSV 2 分離株、並びに上記の健全宿主植物 3 種の葉及び種子由来の抽出 RNA を鋳型として、コンベンシヨ

ナル RT-PCR を実施した。さらに、本プライマーセットが近縁の *Comovirus* 属ウイルス 3 種 (BBTMV、CPMV 及び RCMV) に反応しないか確かめた。BBTMV は、DSMZ から入手したウイルス株 (PV-0098 株) を供試した。一方、RCMV 及び CPMV は、日本未発生かつ入手困難であるため、各ウイルスの基準株の塩基配列情報からプライマー設計領域を含めた 500 塩基に対応する塩基配列を DNA 合成した (Table 1)。各合成 DNA は、健全エンドウ葉由来の RNA (50ng/ μ l) 溶液 45 μ l に合成 DNA (100pg/ μ l) 溶液 5 μ l を添加し、この溶液の 2 μ l をコンベンショナル RT-PCR の鋳型とした。別途、BBTMV の存在を確認するため、BBTMV-F2/R1 (Nito *et al.*, 2024) を用いてコンベンショナル RT-PCR を実施した。RCMV 及び CPMV の鋳型 DNA についても同様の確認を行うため、Table 1 に示す各プライマーセットを用いて、BBSV-TS-F/R と同一の試薬及び反応条件で RT-PCR を実施した。

6. 検出感度試験

(1) BBSV コピー数の定量

検出感度をウイルスのコピー数に基づいて評価するため、新規プライマーセット (BBSV-TS-F/R) を用いたリアルタイム RT-PCR により絶対定量を行った。絶対定量用の BBSV の RNA 標準コントロールを作製するため、前記 4. に記載の BBSV-TS-F/R と同じ反応条件で、T7-BBSV-TS-F (5'-TAATACGACTC ACTATAGGGGAGATGTAAGGATACAGTTTGGAGAG-3')； BBSV-TS-F の 5' 末端に T7 プロモーター配列 (下線部) を付加) 及び BBSV-TS-R を用い、BBSV チュニジア株凍結乾燥葉由来の抽出 RNA を鋳型にコンベンショナル RT-PCR を実施した。また、T7-BBSV-TS-F と BBSV-SY-R (5'-TCAGTACAGCATTACACTTATAAG-3')； BBSV シリア株の RNA1 (Accession No. LC848447) の 4,888-4,912 番目) を用いて、BBSV シリア株凍結乾燥葉由来の抽出 RNA を鋳型にコンベンショナル RT-PCR を行った。得られた T7 プロモーター配列が付加された各 cDNA を鋳型として、T7 RiboMAXTM Express Large Scale RNA Production System (Promega, Tokyo, Japan) を用いて、Yanagisawa and Matsushita (2022) の方法に従って RNA に転写した。転写 RNA の濃度は Quantus Fluorometer (Promega) 及び QuantiFluor RNA System (Promega) により測定した。次に転写 RNA の分子量をオンラインソフトウェア (<https://www.encorbio.com/protocols/Nuc-MW.htm>； EnCor Biotechnology Inc., Gainseville, FL, USA) で計算し、アボガドロ定数から BBSV ゲノムのコピー数を算出した (Tsai *et al.*, 2012)。その後、算出されたコピー数を基に転写 RNA の原液を RNase-free 水で希釈し、10 倍希釈系列 (10¹-10⁸ コピー) となる RNA 標準コントロールを作製した。

(2) 検出法比較試験

新規プライマーセット (BBSV-TS-F/R) を用いたコンベンショナル及びリアルタイム RT-PCR 法、並びに既報の BBSV 特異的プライマーセット (BBSV-F/R, Perez-Egusquiza *et al.*, 2014) を用いたコンベンショナル RT-PCR 法の 3 種の検出法間で検出感度を比較した。

まず、BBSV 感染植物の凍結乾燥葉から抽出した RNA 液と前

記 6.(1) で作製した RNA 標準コントロールを使用し、前記 4. のリアルタイム RT-PCR により、検量線を作成し、抽出 RNA 溶液中の BBSV のコピー数を測定した。次に、宿主植物の生葉をサンプルとした場合の BBSV の検出限界を調査するため、各宿主植物（ソラマメ、エンドウ及びヒラマメ）の健全生葉から抽出した RNA 溶液（50ng/μl）で BBSV 感染植物の凍結乾燥葉由来の抽出 RNA 溶液（50ng/μl）を希釈し、植物種毎に 10 倍希釈系列を作製した。これらを鋳型として、前記 4. に記載の方法によりコンベンショナル及びリアルタイム RT-PCR を実施した。

同様に、宿主植物の種子をサンプルとした場合の BBSV の検出限界を調査するために、各宿主植物の健全種子から抽出した RNA 溶液（50 ng/μl）を用いて同様の希釈系列を作製した。これらを鋳型として、コンベンショナル及びリアルタイム RT-PCR を実施した。

(3) バルク種子からの模擬検出試験

ソラマメ種子からの BBTMV の検出法を報告した Nito *et al.* (2024) の方法に準じて、本研究により開発した検出法を取り入れた検査法により、各宿主植物の種子 100 粒中に含まれる 1 粒の BBSV 汚染種子を検出できるか検証した。そのため、各宿主植物（ソラマメ、エンドウ及びヒラマメ）の健全種子 3g の磨砕液に Table 3 に示す既知のコピー数の BBSV（チュニジア株）を添加し、前記 2. に記載の方法で RNA の抽出を行った。具体的には、前記 2. に記載される 800μl の種子磨砕液の上清に既知のコピー数の BBSV を添加し、それ以降の抽出工程は記載のとおり実施した。これにより得られた抽出 RNA を鋳型として、前記 4. に記載の BBSV-TS-F/R を用いたコンベンショナル及びリアルタイム RT-PCR により検出を試みた。

(4) BBSV 自然汚染種子からの BBSV 検出試験

前記 1. において作出した BBSV 感染エンドウ苗から自然汚

染種子を採取し、種子 1 粒毎に存在する BBSV のコピー数を測定した。その後、下記のとおり BBSV 自然汚染種子の磨砕液を健全種子磨砕液と混和し、前記 6. (3) の試験同様に BBSV を検出できるか検証した。

はじめに、マルチビーズショッカー（安井器械、大阪、日本）を用いて BBSV 自然汚染種子を 2,000rpm、2 分で 1 粒ずつ粉砕した。この種子粉末を使用し、種子 1 粒に存在する BBSV のコピー数の測定、及び前記 6. (3) の試験同様に、種子 100 粒中の自然汚染種子 1 粒を検出可能か確認した。

種子 1 粒に存在する BBSV のコピー数の測定は、種子粉末 0.1g に 1 ml の磨砕緩衝液を加えて、以降は前記 2. の方法に従い、RNA を抽出した。この抽出 RNA 溶液を用いて、前記 6. (2) の方法に準じて BBSV のコピー数を測定し、汚染種子 1 粒に含まれる BBSV のウイルス量を算出した。

次に、上記のコピー数を測定した自然汚染種子の磨砕液と健全種子由来の種子磨砕液を準備し、自然汚染種子：健全種子 = 1:99 になるよう混和し、前記 2. に記載の方法で RNA を抽出した。この RNA 溶液を鋳型として、前記 4. に記載の BBSV-TS-F/R を用いたコンベンショナル及びリアルタイム RT-PCR により BBSV の検出を試みた。

結 果

1. 特異性試験

BBSV の新規プライマーセット（BBSV-TS-F/R）の特異性を確認するために、健全宿主植物（ソラマメ、エンドウ及びヒラマメ）の葉及び種子、BBSV 2 分離株、BBTMV（PV-0098 株）、並びに RCMV 及び CPMV の人工合成 DNA を使用し、コンベンショナル RT-PCR を実施した。その結果、BBSV 2 分離株で

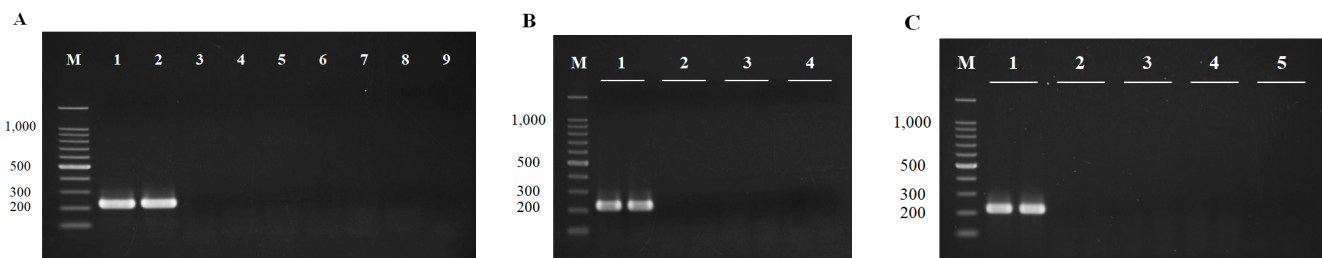


Fig. 2. Detection of BBSV using RT-PCR with the newly designed primer set (BBSV-TS-F/R). (A) Nucleic acids extracted from BBSV-Tunisia (BBSV-TN)-inoculated pea leaves, BBSV-Syria (BBSV-SY)-inoculated broad bean leaves, healthy broad bean leaves, and healthy leaves and seeds of host plants. Lane 1: BBSV-TN-inoculated pea leaves; Lane 2: BBSV-SY-inoculated broad bean leaves; Lane 3: healthy broad bean leaves; Lane 4: healthy pea leaves; Lane 5: healthy lentil leaves; Lane 6: healthy broad bean seeds; Lane 7: healthy pea seeds; Lane 8: healthy lentil seeds; Lane 9: non-template control; M: 100 bp DNA ladder (Dye Plus) (Takara Bio, Kyoto, Japan). (B) Nucleic acids extracted from BBTMV (isolate DSMZ PV-0098)-inoculated pea leaves. Lane 1: BBSV-TN-inoculated pea leaves; Lane 2: BBTMV isolate PV-0098-inoculated pea leaves; Lane 3: healthy pea leaves; Lane 4: non-template control. (C) Artificially synthesized DNAs of CPMV and RCMV were used as templates for RT-PCR. As shown in Table 1, the synthetic DNAs of each virus contained the region corresponding to the target sequence of BBSV-TS-F/R. Lane 1: BBSV-TN-inoculated pea leaves; Lane 2: synthetic DNA of CPMV; Lane 3: synthetic DNA of RCMV; Lane 4: healthy pea leaves; Lane 5: non-template control.

のみ標的増幅産物（約 220 bp）が確認され、健全宿主植物及び近縁ウイルスでは非特異増幅産物は認められなかった（Fig. 2）。なお、各ウイルスの検出用のプライマーセットを用いてコンベンショナル RT-PCR を行ったところ、各ウイルス由来の RNA 又は DNA が検出された（データ未掲載）。また、BBSV-TS-F/R

の増幅産物の塩基配列を解析した結果、プライマー設計領域の塩基配列は BBSV の各分離株の塩基配列と 100% 一致した。以上から、新規プライマーセット（BBSV-TS-F/R）は BBSV に対し特異性を有することが確認された。

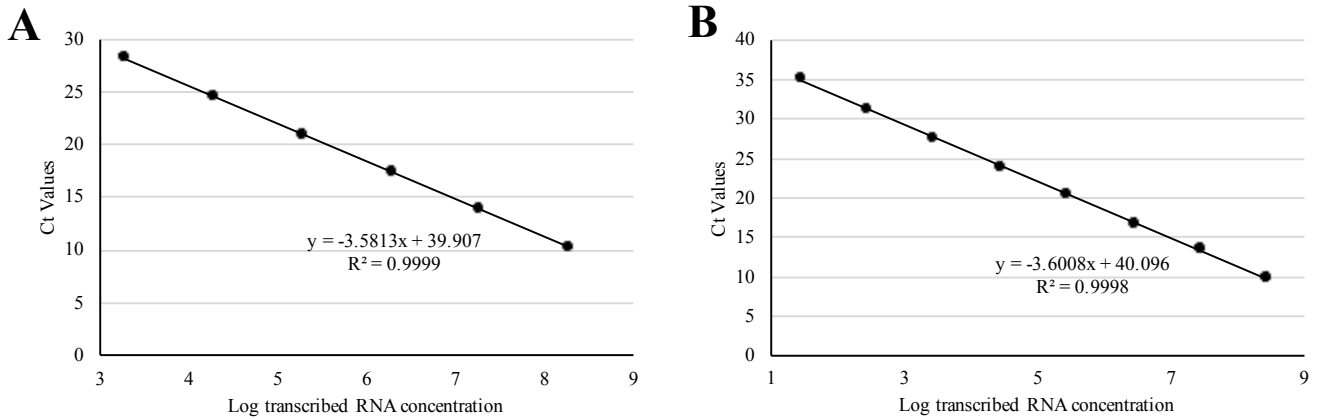


Fig. 3. Standard BBSV curves plotted from cycle threshold (Ct) values obtained using a tenfold serial dilution of transcribed BBSV RNA for in vitro real-time RT-PCR assays. (A) BBSV-TN; (B) BBSV-SY. A linear relationship between Ct values and the log of transcribed RNA standards was shown, with regression coefficients (R^2) exceeding 0.99, and the amplification efficiency (E) was calculated as 90 % for both (A) and (B).

2. 絶対定量用の検量線の作成

BBSV の絶対定量を行うため、作製した RNA 標準コントロールを用いて検量線を作成した。得られた検量線の直線性は、チュニジア株及びシリア株のいずれの場合も相関係数 (R^2) > 0.99 となった（Fig. 3）。この時、増幅効率 (E) は両分離株とも 90% であったことから、供試した 2 分離株間で検出能に差異は認められなかった。また、チュニジア株の融解温度 (T_m 値) は 80.0-80.3°C（平均 80.2°C）、シリア株は 77.2-77.6°C（平均 77.4°C）となり、分離株間で約 3°C の差が生じた。

3. ウイルスコピー数の定量

BBSV 感染植物の凍結乾燥葉由来の RNA 溶液に含まれる BBSV のコピー数を絶対定量した。その結果、各 RNA 溶液中の BBSV のコピー数は次のとおりであった：チュニジア株； 1.7×10^9 コピー/μl、シリア株 1； 2.0×10^8 コピー/μl、シリア株 2； 4.5×10^8 コピー/μl。なお、シリア株については、チュニジア株に比べウイルス濃度が低かったことからウイルス量を確保するため、2つの RNA 溶液を測定した。これらの RNA 溶液を用いて検出感度試験に用いる各希釈系列を調製し、各検出法の感度を調査した。

Table 2. Detection sensitivity of conventional and real-time RT-PCR.

Strain of BBSV	BBSV-TN								BBSV-SY							
	Copy number of template*	3.5×10^6	3.5×10^5	3.5×10^4	3.5×10^3	3.5×10^2	3.5×10^1	Control ^b	4.0×10^6	4.0×10^5	4.0×10^4	4.0×10^3	4.0×10^2	4.0×10^1	Control	
Broad bean	leaves	Conventional RT-PCR	2/2	2/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	NT ^c	NT	NT	NT	NT	NT	
	leaves	Conventional RT-PCR	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	0/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	0/2	
	leaves	Real-time RT-PCR	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	1/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3	1/3	0/3	
	leaves	Real-time RT-PCR	25.0 ^d , 25.0, 25.1	28.3, 28.5, 28.6	32.1, 32.2, 32.4	34.3, 34.6, 35.6	36.9, ND ^e , ND	ND, ND, ND	ND, ND, ND	25.0, 25.1, 25.1	28.5, 28.5, 28.6	32.0, 32.4, 32.5	35.0, 35.8, 36.8	37.1, ND, ND	ND, ND, ND	ND, ND, ND
	seeds	Conventional RT-PCR	2/2 ^f	2/2	2/2	1/2	0/2	0/2	0/2	NT ^g	NT	NT	NT	NT	NT	
	seeds	Real-time RT-PCR	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	0/2	0/2	2/2	2/2	2/2	1/2	0/2	0/2	
Pea	leaves	Conventional RT-PCR	2/2	2/2	2/2	1/2	0/2	0/2	0/2	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2	0/2	
	leaves	Real-time RT-PCR	3/3	3/3	3/3	3/3	1/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3	0/3	
	leaves	Real-time RT-PCR	25.0, 25.0, 25.0	28.5, 28.5, 28.7	32.0, 32.4, 32.4	34.8, 34.8, 35.4	36.9, ND, ND	ND, ND, ND	ND, ND, ND	24.6, 24.6, 24.6	28.3, 28.3, 28.3	31.5, 31.5, 32.1	35.4, 35.7, 36.2	ND, ND, ND	ND, ND, ND	
	seeds	Conventional RT-PCR	2/2	2/2	2/2	1/2	0/2	0/2	0/2	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
	seeds	Real-time RT-PCR	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2	0/2	0/2	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2	0/2	
	seeds	Real-time RT-PCR	23.0, 23.1, 23.2	26.4, 26.5, 26.7	29.8, 30.0, 30.5	32.4, 33.9, 34.2	35.0, 35.5, ND	ND, ND, ND	ND, ND, ND	22.7, 22.8, 22.8	26.2, 26.3, 26.4	29.4, 29.4, 29.9	34.8, 35.3, 36.0	35.5, 35.7, 36.1	ND, ND, ND	
Lentil	leaves	Conventional RT-PCR	2/2	2/2	2/2	1/2	0/2	0/2	0/2	NT	NT	NT	NT	NT		
	leaves	Real-time RT-PCR	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2	0/2	0/2	2/2	2/2	2/2	2/2	0/2		
	leaves	Real-time RT-PCR	23.3, 23.4, 23.5	26.6, 26.9, 26.9	30.1, 30.4, 30.6	33.5, 33.9, 34.8	34.4, ND, ND	ND, ND, ND	ND, ND, ND	23.1, 23.1, 23.2	26.7, 26.7, 26.7	30.2, 30.5, 30.7	33.6, 34.2, 34.9	37.0, ND, ND	ND, ND, ND	
	seeds	Conventional RT-PCR	2/2	2/2	1/2	0/2	0/2	0/2	0/2	NT	NT	NT	NT	NT		
	seeds	Real-time RT-PCR	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2	0/2	0/2	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2		
	seeds	Real-time RT-PCR	25.4, 25.4, 25.5	28.8, 28.8, 32.3, 32.3	32.6, 34.7, 35.5, 38.1	37.4, ND, ND	ND, ND, ND	ND, ND, ND	23.7, 23.7, 23.8	27.4, 27.4, 27.5	30.5, 30.9, 31.9	32.8, 34.9, 36.2	34.9, ND, ND	ND, ND, ND		

(a) Estimated copy number of BBSV used as template.

(b) Healthy leaves or seeds.

(c) Number of positive samples per number tested. Conventional RT-PCR was performed in duplicate, and real-time RT-PCR in triplicate.

(d) Ct values obtained from SYBR Green real-time RT-PCR using the newly designed primer set (BBSV-TS-F/R).

(e) Not detected.

(f) Not tested.

4. 検出感度試験

BBSV-F/R (Perez-Egusquiza *et al.*, 2014) を用いたコンベンショナル RT-PCR 法、BBSV-TS-F/R を用いたコンベンショナル及びリアルタイム RT-PCR 法の3種の検出法について、ソラマメ、エンドウ及びヒラマメの生葉及び種子における BBSV の検出感度を調査した。ただし、BBSV-F/R はシリア株に反応しないため、BBSV-F/R の試験はチュニジア株のみで実施した。

生葉における検出感度は、各検出法間で植物種によって明瞭な差はなかった (Table 2)。宿主植物3種類とも、BBSV-TS-F/R を用いたコンベンショナル及びリアルタイム RT-PCR 法は、BBSV-F/R を用いたコンベンショナル RT-PCR 法より 10-100 倍感度が高かった。また、分離株間による感度差は認められず、チュニジア株における BBSV-TS-F/R は 3.5 コピー/反応まで検出でき、35 コピー/反応までは全ての反復で検出され、シリア株では 4 コピー/反応まで検出でき、91 コピーまで全ての反復で検出された (Table 2)。

種子における検出感度は、宿主植物3種類とも、BBSV-TS-F/R (コンベンショナル)の方が BBSV-F/R よりも 10~100 倍感度が高かった (Table 2)。ソラマメ種子において、BBSV-TS-F/R を用いたコンベンショナル及びリアルタイム RT-PCR 法間で比較した場合、チュニジア株ではコンベンショナル RT-PCR 法の方が、シリア株ではリアルタイム RT-PCR 法の方が、10 倍感度が高い結果となり、検出法の違いによる一貫した傾向は認められなかった。一方、エンドウ及びヒラマメ種子では、コンベンショナル及びリアルタイム RT-PCR 法の検出感度は同程度であり、チュニジア株における検出限界は 3.5 コピー/反応で、35 コピー/反応までは全ての反復で検出された。また、シリア株における検出限界は 4 コピー/反応で、400 コピー/反応までは全ての反復で検出された。ただし、コンベンショナル RT-PCR 法を用いてソラマメ種子からシリア株を検出する試験区以外では、91 コピーまで全ての反復で検出され、生葉における検出感度と同程度になった (Table 2)。

Table 3. Detection sensitivity of conventional and real-time RT-PCR from broad bean, pea, and lentil seed samples.

Plant	Detection method	Copy number spiked sample ^a					Control-1 ^b	Control-2 ^c
		1.7×10 ⁶	1.7×10 ⁵	1.7×10 ⁴	1.7×10 ³	1.7×10 ²		
Broad bean	Conventional RT-PCR	4/4 ^d	4/4	4/4	1/4	0/4	0/4	0/4
	Real-time RT-PCR	6/6 26.8 ^e , 27.1, 27.2, 29.0, 29.1, 29.1	6/6 29.9, 30.2, 31.3, 32.3, 32.8, 32.9	6/6 32.1, 33.9, 34.0, 35.0, 35.1, 37.2	2/6 35.2, 37.6, ND ^f , ND, ND, ND	0/6 ND, ND, ND, ND, ND, ND	0/6 ND, ND, ND, ND, ND, ND	0/6 ND, ND, ND, ND, ND, ND
Pea	Conventional RT-PCR	4/4	4/4	4/4	1/4	0/4	0/4	0/2
	Real-time RT-PCR	6/6 28.8, 28.9, 28.9, 29.0, 29.0, 29.1	6/6 31.7, 31.8, 32.1, 32.4, 32.4, 32.9	6/6 35.1, 35.5, 36.1, 36.7, 36.8, 38.7	2/6 37.0, 38.7, ND, ND, ND, ND	0/6 ND, ND, ND, ND, ND, ND	0/6 ND, ND, ND, ND, ND, ND	0/3 ND, ND, ND
Lentil	Conventional RT-PCR	4/4	4/4	4/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	Real-time RT-PCR	6/6 28.5, 28.5, 28.5, 28.6, 28.6, 28.7	6/6 31.6, 31.6, 32.0, 32.0, 32.1, 32.3	6/6 34.6, 35.0, 36.1, 36.3, 36.7, 37.1	1/6 36.9, ND, ND, ND, ND, ND	0/6 ND, ND, ND, ND, ND, ND	0/6 ND, ND, ND, ND, ND, ND	0/3 ND, ND, ND

(a) An estimated copy number of BBSV was added to 800 µl of supernatant from ground seed solutions. A dilution series prepared from nucleic acids containing a known number of BBSV copies (see 3. Copy number of extracts from BBSV-infected plants in the Results section) was added to the seed samples.

(b) RNase-free water was added to 800 µl of supernatant from ground seed solutions.

(c) Non-template control (RNase-free water).

(d) Number of positive samples per number tested. Seed nucleic acids were extracted twice using the same dilution series. Conventional RT-PCR was performed in duplicate, and real-time RT-PCR in triplicate for each extracted nucleic acid.

(e) Ct values obtained from SYBR Green real-time RT-PCR using the newly designed primer set (BBSV-TS-F/R).

(f) Not detected.

5. バルク種子からの模擬検出試験

各宿主植物の種子 100 粒中に含まれる 1 粒の BBSV 汚染種子を検出できるか検証した。その結果、コンベンショナル及びリアルタイム RT-PCR 法は、いずれも種子磨砕液の上清 800µl 中に 1.7×10³ コピー存在すれば検出でき、1.7×10⁴ コピー存在すれば全ての反復で検出可能であった (Table 3)。

また RNA の抽出効率が 100% であると仮定した場合、種子粉末 3g 中に含まれる BBSV のコピー数を計算したところ、種

子粉末 3g 中に BBSV が 6.9×10⁵ コピー (=1.7×10⁴ コピー × (種子粉末 3g 時の磨砕液総量 : 32.6ml/ 種子磨砕液の上清 : 800µl)) 存在すれば、本法により BBSV を高い再現性で検出可能と推定された。また、試験に供試した健全エンドウ種子の重量を測定したところ、平均重量 0.29g/粒であったことから、エンドウ種子 100 粒 (29g) では、6.7×10⁶ コピーの BBSV が存在すれば検出可能と算出された。

Table 4. Amount of BBSV in seeds collected from BBSV-TN–infected peas and results of conventional and real-time RT-PCR tests.

Sample No.	1	2	3	4	5	Control ^a
BBSV copy number in a seed	2.0×10^8	1.1×10^8	2.4×10^8	4.5×10^7	8.1×10^7	0
1st ^b						
Conventional RT-PCR	2/2 ^c	2/2	2/2	2/2	2/2	0/2
Real-time RT-PCR	3/3 31.6 ^d , 31.6, 31.8	3/3 32.6, 32.9, 33.3	3/3 32.1, 32.4, 32.7	3/3 31.6, 31.7, 31.9	3/3 33.4, 34.3, 34.8	0/3 ND ^e , ND, ND
2nd						
Conventional RT-PCR	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	0/2
Real-time RT-PCR	3/3 31.6, 31.7, 31.8	3/3 32.8, 33.5, 33.9	3/3 32.3, 32.3, 32.6	3/3 31.5, 31.7, 31.9	3/3 34.7, 35.1, 36.3	0/3 ND, ND, ND

(a) Healthy pea seed.

(b) For each infected seed, two mixtures were prepared with a healthy seed ground solution, using the same infected seed ground solution.

(c) Number of positive samples per number tested. Conventional RT-PCR was performed in duplicate, and real-time RT-PCR in triplicate for each extracted nucleic acid.

(d) Ct values obtained from SYBR Green real-time RT-PCR using the newly designed primer set (BBSV-TS-F/R).

(e) Not detected.

6. BBSV 自然汚染種子からの BBSV 検出

BBSV チュニジア株感染エンドウから得られた5粒の自然汚染エンドウ種子に存在する BBSV のコピー数を種子毎に測定した。その結果、1粒の種子に存在する BBSV の平均コピー数は、 1.3×10^8 コピー/粒 (最大: 2.4×10^8 コピー/粒 (No.3)、最小: 4.5×10^7 コピー/粒 (No.4)) であった (Table 4)。

以上の結果から、前記5.において、エンドウ種子100粒内に 6.7×10^6 コピーの BBSV が存在すれば検出されると算出されたことから、BBSV 汚染エンドウ種子における最小コピー数 (4.5×10^7 コピー/粒) は、この値を約6.7倍上回っており、サンプル中に1粒でも汚染種子が存在すれば、BBSV を検出可能となる結果であった。

続いて、実際に BBSV 自然汚染エンドウ種子を使用し、自然汚染エンドウ種子:健全種子=1:99となるように混合したサンプルから検定を試みた結果、全ての試験区において、コンベンショナル及びリアルタイム RT-PCR 法のいずれの検出法を用いた場合も BBSV を安定して検出することができた (Table 4)。

考 察

新規設計した BBSV 特異的プライマーセット (BBSV-TS-F/R) の検出特異性について調査した結果、BBSV のみが検出され、供試した近縁ウイルス及び健全植物由来のサンプルには反応しなかった (Fig. 2)。Fig.1 に示すように、BBSV シリア株は、BBSV-TS-R の3'末端側から18番目及び22番目の塩基に不一致があったが、プライマー配列と完全に一致するチュニジア株と同等の感度が認められた (Table 3, 4)。3'末端寄りの不一致は、5'末端寄りの不一致よりも増幅効率への影響が大きいことが報告されており (Ye *et al.*, 2012)、新規プライマーと標的遺伝子間のミスマッチは、位置的に増幅に対する影響が小さいと考えられる。Nito *et al.* (2025) は、チュニジア株とシリア株の2分離株間において大きな遺伝的相違が認められたことから、BBSV は遺伝的多様性を有する可能性があることを報告している。また、BBSV には、宿主植物毎に血清型の異なる系統が存在することが知られている (Musil and Gallo, 1993)。これらのことから、今後、新たに遺伝的に異なる変異株が発見されることが考えられる。本研究で開発したプライマーセットは、新たな変異株にも対応できるよう Nito *et al.* (2025) により遺伝的

に保存性の高いと報告されたポリメラーゼ遺伝子領域上に設計されているが、BBSV の新規変異株の報告について注視する必要がある。

コンベンショナル及びリアルタイム RT-PCR 法における BBSV-TS-F/R の検出感度は、BBSV-F/R (Perez-Egusquiza *et al.*, 2014) と比べ、同程度から100倍高いことが認められた (Table 2)。この傾向は、いずれの供試植物においても同様であった。一方、BBSV チュニジア株感染エンドウ由来の抽出 RNA 溶液を RNase-free 水で希釈した系列を用いたコンベンショナル RT-PCR では、2組のプライマーセットは同程度の検出感度だった (データ未掲載)。このことから、結果の4.の BBSV-F/R の反応は、希釈に用いた健全植物の RNA 溶液中の植物由来の阻害成分が影響している可能性が考えられる。

一般に、リアルタイム RT-PCR 法の方がコンベンショナル RT-PCR 法よりも検出感度が優れているとされている (Rizzo *et al.*, 2021; Yanagisawa and Matsushita, 2017)。しかしながら、BBSV-TS-F/R は、コンベンショナル及びリアルタイム RT-PCR のいずれにおいてもほぼ同等の検出感度を示した (Table 2-4)。通常、SYBR Green を用いたリアルタイム RT-PCR の最適増幅サイズは、100-150 bp とされているため、BBSV-TS-F/R (220 bp) はやや増幅サイズが大きいことから、これら2法間の検出感度は同程度となったと推察する (https://www.thermofisher.com/blog/learning-at-the-bench/primer_qpcr_gsd_ts_1/; https://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic_info.php?unitid=U100004242)。しかしながら、いずれの手法を用いた場合にも、種子100粒中に含まれる汚染種子1粒を検出できる十分な検出感度を有していた (Table 3, 4)。そのため、BBSV-TS-F/R を用いたコンベンショナル及びリアルタイム RT-PCR 法のいずれの検出法も有効と考える。

リアルタイム PCR 法のインターカレーター法で融解曲線分析により得られる Tm 値は、偽陽性との識別を行う際に有効な判断材料である。BBSV チュニジア株の Tm 値は平均 80.3℃、シリア株は平均 77.3℃と、明瞭な温度差が認められた。これら2分離株間には、BBSV-TS-F/R の増幅サイズ 220 bp 中に 39 塩基の違いがあり、この塩基配列の相違が、Tm 値の約 3℃の差を生じさせた原因と推測される。上述のとおり、BBSV は遺伝的多様性が高いと考えられるため、今回得られた Tm 値を1つの基準値としながら、新たなウイルス株の検出例があった際に

は BBSV 由来の Tm 値の情報を更新・蓄積していくことが重要である。

また、リアルタイム PCR 法は電気泳動の必要性が無く、コンベンショナル PCR 法に比べ短時間で検出結果を得られる他、PCR 産物を扱う必要が無いためコンタミネーションリスクを低減できるという利点もある。そのため、ウイルス等を対象とする種子検査法として、リアルタイム PCR 法が選ばれることが多い (Kaur *et al.*, 2020)。しかし、国や検査機関によっては、リアルタイム PCR 装置を所有していない場合も考えられるため、コンベンショナル PCR 法にも対応できるよう考慮しプライマーを設計した。複数の比較試験の結果から、リアルタイム RT-PCR 法だけでなくコンベンショナル RT-PCR 法でも同等の検出能を有することが確認された (Table 2-4)。以上から、両検査法は幅広い検査施設において利用可能と考える。

本研究では種子からの検出能を評価するため、各宿主植物の汚染種子の採種を試みた結果、エンドウから汚染種子を得ることができた。Table 4 に示すエンドウの No.4 の汚染種子は 4.5×10^7 コピー/粒の BBSV が存在していた。一方、Table 3 に示すエンドウ種子における BBSV の検出下限は 1.7×10^4 コピーであった。この値から、100 粒中に BBSV が 6.7×10^6 コピー存在していれば BBSV を検出できると推定された。以上から、検出限界値よりも、種子 100 粒中に BBSV 自然汚染種子 1 粒により持ち込まれるウイルスが多いため検出可能であると推察する。

BBSV は、植物防疫法で規制される種子伝染性のウイルスの 1 種である。既報の検出法は存在するものの、非特異的の反応が生じにくく高精度かつ高感度な検出法は、これまで無かった。本研究では、既報の検出法よりも検出能に優れ、結果判定の容易な RT-PCR 法による検出法の開発に成功した。また、本法は BBSV と同じく植物防疫法の規制対象で、かつ宿主植物も類似する BBTMV の検出法 (Nito *et al.*, 2024) と同一の反応条件で検出可能であることから、同時並行してこれら 2 種のウイルスを検定することも可能となるため、検定作業の効率化も期待される。

摘 要

Broad bean stain virus (BBSV, *Comovirus viciae*) は、マメ科植物に感染し、収量を減少させる。ソラマメ、エンドウ及びヒラマメでは種子伝染することから、植物防疫法施行規則の別表 1 の 2 の対象として、輸出国に栽培地検査等を求め、国内への侵入防止を図っている。既報の RT-PCR 法による検出法 (Perez-Egusquiza *et al.*, 2014) では、健全ソラマメ (葉/種子) において陽性と近似するサイズの非特異的の増幅が生じたため、BBSV に対して既報と同程度以上の感度を持ち、かつ結果判定が容易な、新規プライマーセットを用いた検出法の開発を試みた。

新規 BBSV 特異的のプライマーは、Nito *et al.* (2025) により決定された BBSV 2 株 (チュニジア株及びシリア株) の全長配列情報をもとに設計した。本稿では、これら BBSV 2 分離株に加え近縁ウイルスの遺伝子配列と比較することで、BBSV に特異的かつ保存性の高い遺伝子領域を見出し、BBSV 特異的のプラ

イマーセットを設計した。そして、本プライマーセットの検出感度、健全植物での非特異的の増幅の有無等を調査した。その結果、設計したプライマーセットは、宿主の健全葉及び種子では非特異的の増幅は生じず、近縁ウイルスへの反応もなかった。また、本プライマーセットは、既報のプライマーセットでは検出されないシリア株も検出し、チュニジア株に対して既報と同程度以上の検出感度を有し、BBSV が 400 コピー存在すれば検出可能であった。さらに、本プライマーセットはコンベンショナル RT-PCR 法及び SYBR Green によるリアルタイム RT-PCR 法の両方で使用可能であり、手法間の検出感度差はほぼなかった。また、健全種子磨砕液に BBSV 感染葉抽出 RNA 溶液を添加した時、BBSV の検出限界は 100 粒当たり 6.7×10^6 コピーであった。さらに、BBSV チュニジア株感染エンドウから採取した自然汚染種子と健全エンドウ種子を 1 : 99 に調整したサンプルからも BBSV を検出することができた。以上から、本新規プライマーセットを用いた RT-PCR 法は、BBSV の特異的の検出法として有効であることが示唆された。

謝 辞

本研究で使用した BBSV は、LOEWE Plant Diagnostics の C. Freye-Minks 博士からご提供いただいた BBSV チュニジア株感染エンドウ凍結乾燥葉と、ICARDA の S. Kumari 博士からご提供いただいた BBSV シリア株感染ソラマメ凍結乾燥葉から分離したものである。2 分離株の配列決定及び検定法の開発は、お二方をはじめとする関係者の親切な対応のおかげである。ご対応いただいた方々に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- CABI (2021) Broad bean stain virus, CABI Compendium. CAB International, Wallingford, UK. (Online), available from <<https://www.cabdigitalibrary.org/doi/10.1079/cabicompendium.8672>>, (accessed 2024_03_14).
- Creative Diagnostics (2025) Broad bean stain virus (BBSV) ELISA Kit (DEIAPV100) (Online), available from <<https://www.creative-diagnostics.com/BBSV-EIA-Kit-256105-468.htm>>, (accessed 2025_03_14).
- El-Kewey, S.A., S.A. Sidaros, H.S. Abdelkader, A.A. Emeran and M. El-Sharkawy (2007) Molecular detection of *Broad bean stain Comovirus* (BBSV) and *Cowpea aphid borne mosaic Potyvirus* (CABMV) in faba bean and cowpea plants. *J. Appl. Sci. Res.* **3**: 2013-2025.
- Fiedorow, Z. and E. Szlachetka-Wawrzyniak (2002) Transmission of broad bean stain virus (BBSV) by seeds of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Breed Seed Sci.* **46**: 81-88.
- Kaur, S.I., P.L. Kashyap, S.S. Kang and A. Sharma (2020) Detection and diagnosis of seedborne viruses and virus-like pathogens. in: *Seed-Borne Diseases of Agricultural Crops: Detection, Diagnosis & Management*. Springer Nature Singapore Pte Ltd, Singapore,

- pp. 169–199.
- Kumari, S. and K. Makkouk (1996) Inactivation of broad bean stain comovirus in lentil seeds by dry heat treatment. *Phytopathol. Mediterr.* **35**: 124–126.
- Kumari, S., K. Makkouk and I.D. Ismail (1996) Variation among isolates of two viruses affecting lentils: their effect on yield and seed transmissibility. *Arab. J. Plant Prot.* **14**: 81–85.
- Kumari S. and K. Makkouk (2007) Virus diseases of faba bean (*Vicia faba* L.) in Asia and Africa. *Plant Virus* **1**: 93–105.
- Larkin M.A., G. Blackshields, N.P., Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson and D.G. Higgins (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**: 2947–2948.
- Lecorre, F., J. Lai-Kee-Him, S. Blanc, J.L. Zeddani, S. Trapani and P. Bron (2019) The cryo-electron microscopy structure of broad bean stain virus suggests a common capsid assembly mechanism among comoviruses. *Virology* **530**: 75–84.
- Nano Diagnostics (2025) Broad Bean Stain Virus (BBSV) - DAS ELISA Kit (Cat#:V143) (Online), available from <<https://www.nanodiagnos.com/prod-ucts/goods/?id=548547541713555456&cate=26>>, (accessed 2025_03_14).
- 日本応用動物昆虫学会 (2006) 農林有害動物・昆虫名鑑増補改訂版. 日本植物防疫協会. 東京. 日本: 387pp.
- Nito, F., H. Oya, T. Matsuura and H. Yanagisawa (2024) Advancing broad bean true mosaic virus detection using conventional RT-PCR and real-time RT-PCR with novel primer set design. *J. Virol. Methods* **327**: 114946.
- Nito, F., Y. Imamura, Y. Fujiwara, T. Matsuura and H. Yanagisawa (2025) Complete genome sequences of two different broad bean stain virus isolates. *Arch. Virol.* **170**: 93.
- 農林省. 植物防疫法施行規則 (昭和 25 年 6 月 30 日農林省令第 73 号) .
- Perez-Egusquiza, Z., J.Z. Tang, L.I. Ward and J.D. Fletcher (2014) The truth about *Pea mild mosaic virus*. *Australas. Plant Pathol.* **43**: 193–196.
- Rizzo, D., D. Da Lio, A. Panattoni, C. Salemi, G. Cappellini, L. Bartolini and G. Parrella (2021) Rapid and sensitive detection of tomato brown rugose fruit virus in tomato and pepper seeds by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assays (real time and visual) and comparison with RT-PCR endpoint and RT-qPCR methods. *Front. Microbiol.* **12**: 640932.
- タカラバイオ株式会社. リアルタイム PCR のプライマー設計について (online). https://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic_info.php?unitid=U100004242 (2025.3.21 閲覧)
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2020) 初心者でも安心! リアルタイム PCR 用プライマーデザインのコツ (online). https://www.thermofisher.com/blog/learning-at-the-bench/primer_qpcr_gsd_ts_1/. (2025.3.21 閲覧) .
- Vennapusa, A.R., I.M. Somayanda, C.J. Doherty and S.V.K. Jagadish (2020) A universal method for high-quality RNA extraction from plant tissues rich in starch, proteins and fiber. *Sci. Rep.* **10**: 16887.
- Yanagisawa, H. and Y. Matsushita (2017) Host ranges and seed transmission of *Tomato planta macho viroid* and *Pepper chat fruit viroid*. *Eur. J. Plant Pathol.* **149**: 211–217.
- Yanagisawa, H. and Y. Matsushita (2022) Effect of potato spindle tuber viroid variants and infection stage on seed transmission through pollen. *Lett. Appl. Microbiol.* **75**: 836–843.
- Ye, J., G. Coulouris, I. Zaretskaya, I. Cutcutache, S. Rozen and T.L. Madden (2012) Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinform.* **13**: 134.
- Ye, Z., F. Liao, M. Guo, Z. Fang, Q. Chen, H. Chen, S. Lin and Y. Lin (2015) A universal RT-PCR method for the simultaneous detection of the viruses in genera *Comovirus* and *Fabavirus*. *Sci. Agric. Sin.* **48**: 1527–1537.