

No. 5 5

September, 2025
ISSN 0388-8339

BULLETIN
OF
THE MIYAZAKI AGRICULTURAL RESEARCH INSTITUTE
Miyazaki city, Miyazaki, Japan

宮崎県総合農業試験場研究報告

第 5 5 号

令和 7 年 9 月
(2 0 2 5)

宮崎総農試研報

Bull, Miyazaki
Agr. Res. Institute

宮崎県総合農業試験場
(宮崎県宮崎市)

宮崎県総合農業試験場研究報告 第55号

目 次

(原著論文)

農産物における γ -アミノ酪酸（GABA）の迅速分析法の開発 福良奈津子・野上麻美子・松石文花・河野雄介・酒井美穂	1
カテキン類およびテアフラビン類17成分の一斉分析並びにカテキン2成分の 定量迅速分析法の開発 福良奈津子・野上麻美子・松石文花・酒井美穂	7
改良DIBA法を用いたサトイモ疫病の迅速診断 櫛間義幸・久野公子	13
画像解析ソフトImageJを活用したDIBA法の結果評価および改良DIBA法の 検出時間短縮 櫛間義幸	21

原 著 論 文

農産物における γ -アミノ酪酸(GABA)の迅速分析法の開発

福良 奈津子¹⁾・野上 麻美子²⁾・松石 文花¹⁾・河野 雄介³⁾・酒井 美穂²⁾

要 約

農産物における機能性成分 γ -アミノ酪酸(GABA)の表示販売を加速化するため、高速液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS/MS)を用いた迅速分析法を開発した。

ミニトマト、切り干し大根、茶における分析法の妥当性を検討した結果、それぞれの品目において、添加回収試験におけるGABAの回収率は94%、102%、97%、枝分かれ試験の併行精度は6.4%、3.2%、2.7%、室内精度は7.2%、5.6%、2.7%であり、各種ガイドラインの妥当性評価目標値内であることから、本法が妥当であることを確認した。

また、ミニトマトについて、消費者庁の定める登録試験機関における定量値と比較した結果、今回の試験では有意差は見られず、LC-MS/MSによるGABAの迅速分析法が登録試験機関における定量法と遜色ないと考えられた。

開発した分析法は、農産物中のGABAを前処理から分析まで最短30 minで迅速に分析できる手法として期待される。

【キーワード：ミニトマト、切り干し大根、茶、GABA、LC-MS/MS】

緒 言

平成27年4月に食品表示法が施行され、「機能性表示食品」制度が開始された。以降、機能性表示食品の市場規模は拡大しており¹⁾、農産物についても更なる商品化の加速化が期待されている。本県においても、平成30年から冷凍ほうれんそう(機能性関与成分：ルテイン)の表示販売が開始され、現在までにルテインを関与成分とする農産物で4件の届出が受理されている²⁾。表示販売には、品目・成分の選定、規格値の設定が必須のプロセスとなるが、特に農産物は、品種、収穫時期、栽培条件等による差が大きく、表示値を担保するには多くのサンプルを分析する必要がある、多検体分析のための分析の迅速化が必要不可欠である。

食品中のGABAの分析方法については、衛生試験法で、水、またはトリクロロ酢酸溶液を抽出溶媒として用い、イオン交換クロマトグラフィー(IEC)によって各アミノ酸を分離し、ニンヒドリン試薬で呈色させて分光光度計で定量する方法²⁾が示されているが、工程が多く煩雑である。従って、一般には、それを自動化したポストカラム誘導体化法 IEC やプレカラム誘導体化法高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により数十種類のアミノ酸を一斉分析できる高速アミノ酸分析計³⁾やシステムも市販されているものの、専用の装置や試薬を必要とする。また、採用する抽出法や分析装置にもよるが、前処理から測定までプレカラ

ム誘導体化法では1.5 h程度³⁾、⁵⁾、ポストカラム誘導体化法では2.5 h程度⁴⁾を要するため、分析の更なる迅速化が求められている。

届出を行おうとする食品の分析方法は、「機能性表示食品の届出等に関するガイドライン(平成27年3月30日 消食表第141号)」および「機能性表示食品に関する質疑応答集(平成29年9月29日 消食表第463号)」に示されているように、妥当性確認を行うことが望ましいとされており、開発した分析法の妥当性を担保することが重要となる。しかし、その妥当性確認に関しては、残留農薬等のように、評価項目に明確な規定はない。

そこで、誘導体化を必要としないLC-MS/MSを用いたGABAの迅速分析法を開発し、「分析法の妥当性に関するガイドライン(令和元年10月農林水産省)」(以下、分析法ガイドライン)および「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性ガイドライン(平成19年11月15日付け食安発第1115001号)」(以下、残留農薬ガイドライン)を参考に設定した項目に基づき、包装資材による表示販売が可能で表示販売見込みの高い品目であるミニトマト、切り干し大根、茶における妥当性評価を実施したので報告する。

I 試験方法

1. 試薬および標準品

GABAは、富士フィルム和光純薬製の標準品を使用した。添加回収試験には、1000 mg/L水溶液、

1) 宮崎県総合農業試験場生産流通部 2) 現 一般社団法人食の安全分析センター

3) 現 宮崎県衛生環境研究所

それ以外には 100 mg/L 水溶液を調製して用いた。
抽出溶媒には、富士フィルム和光純薬製の HPLC グレードのエタノールおよび LC/MS グレードの超純水を使用した。

LC-MS/MS の移動相には、LC/MS グレードの富士フィルム和光純薬製の超純水、Honeywell 製のギ酸およびギ酸アンモニウム、関東化学製のアセトニトリルを使用した。

2. 試料

ミニトマト、切り干し大根（いずれも宮崎県産品）は、購入したものを、茶は、宮崎県総合農業試験場で栽培・加工したものを使用した。

3. 装置

HPLC には、島津製作所製 NexeraUC/s, MS には島津製作所製 LCMS-8060NX を使用した。

4. 分析条件

各装置は、表 1、表 2 の条件で設定した。

表 1 HPLC 条件

カラム	インタクト製 Intradra Amino Acid (50×3.0 mm, 3 μ m)
カラム温度	37°C
移動相A液	100 mM ギ酸アンモニウム水溶液
移動相B液	0.3% ギ酸-アセトニトリル
流速	0.6 mL/min
グラジエント	B conc. 100%(0 min)→0%(7-11 min) →100%(11.01 min)→100%(12 min)
注入量	5 μ L

表 2 MS 条件

イオン化法	ESI (Positive mode)
ネブライザーガス流量	3 L/min
ヒーティングガス流量	15 L/min
ドライイングガス流量	3 L/min
DL温度	250°C
ヒートブロック温度	400°C
測定モード	MRM (104.35>87.3 m/z)

5. 試料の調製

ミニトマトは、ヴァーダー・サイエンティフィック製 Retsch GM200で破碎した。切り干し大根は、凍結試料に 2倍量のドライアイスを加え、山本電気製よめっこさんで粉碎した。茶は、アサヒ軽金属製クダック KDM1で粉碎した。粉碎後の試料はそれぞれ -30°Cで凍結保存し、分析当日に解凍して抽出に供した。

なお、試験機関とのクロスチェックのための試料も同様に調製した。

6. 抽出方法

抽出は、既報^{5), 6)}のエタノールによる抽出方法を参考に以下のとおり実施した。

ミニトマトは、試料 1.00 g を 50 mL チューブに量り取り、80%エタノールを 17.5 mL の目盛りまで加え、ヤマト科学製 SA300にて 5 min 振とうし、メスフラスコで 25 mL に定容した。0.2 μ m メンブレンフィルター (WHATMAN 0.2 μ m PTFE) にてろ過し、抽出試料とした。適宜、80%エタノールで希釈し、LC-MS/MS に供した。

切り干し大根は、試料 0.20 g を 50 mL チューブに量り取り、超純水 1.3 mL を加え、室温で 30 min 膨潤した。80%エタノールを 17.5 mL の目盛りまで加えた以降は、ミニトマトと同様に抽出した。

茶は、試料 0.10 g を 50 mL チューブに量り取り、超純水 1.0 mL を加え 30 min 膨潤した。80%エタノールを 17.5 mL の目盛りまで加えた以降は、ミニトマトと同様に抽出した。

7. 定量方法

絶対検量線法および標準添加法を検討し、いずれの作物でもマトリックスの影響があったことから、マトリックス影響を低減できる標準添加法を採用した。具体的には、段階的濃度の標準溶液を抽出試料にそれぞれ添加した試料（以下、「標準溶液添加試料」と標準溶液を抽出試料に添加しない試料（本項中以下、「試料」）から得た検量線を作成し、含有量を算出した。ミニトマトおよび切り干し大根については、標準溶液添加試料は、10倍希釈した抽出試料、GABA 水溶液、80%エタノールを 1 : 1 : 8の割合で混合し、調製した。試料は抽出試料を 100倍希釈した。茶は、標準溶液添加試料に 5倍希釈した抽出試料を用い、試料は 50倍希釈した。

8. 妥当性評価

1) 添加回収試験（併行精度、回収率）

試料中 GABA 含量と同程度を添加するように、計量後の試料に 1000 mg/L GABA 水溶液を、ミニトマト 1.00 g に対し 500 μ L、切り干し大根 0.20 g に対し 300 μ L、茶 0.10 g に対し 150 μ L ずつ添加し、GABA の回収率を確認し、分析法ガイドライン値（表 3）と比較した（各 n= 5）。なお、ブランク試料には GABA 水溶液に代えて超純水を添加した。

表 3 回収率および精度の目標値 (抜粋)

濃度	回収率 (%)	併行精度 (RSD%)
1 mg/g $\leq$ ~<10 g/g	95~105	$\leq$ 3.7
100 mg/kg $\leq$ ~<1 mg/g	90~107	$\leq$ 5.3

2) 枝分かれ試験 (併行精度, 室内精度)

試験を分析者 2名が, 同一試料を 1日 1回 (2 併行ずつ), 3日間実施または分析者 3名が, 同一試料を 1日 1回 (2併行ずつ), 2日間実施することにより得られた定量値から本法の併行精度および室内精度を求め, 残留農薬ガイドライン値 (表 4) と比較した。

表 4 精度の目標値

濃度 (ppm)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
$\leq$ 0.001	< 30	< 35
0.001<~ $\leq$ 0.01	< 25	< 30
0.01<~ $\leq$ 0.1	< 15	< 20
0.1<	< 10	< 15

3) 試験機関とのクロスチェック

販売中の機能性表示食品として, 3品目の中で最も届出件数の多いミニトマト (届出件数にはトマトを含む) については, 他の試験機関とのクロスチェックも行った。同一試料を用い, 一般社団法人食品環境検査協会の分析結果 (衛生試験法・注解準拠プレカラム誘導体化法 HPLC (以下, 常法) による) と本法で比較検証した (n= 5)。なお, 本機関は, 特別用途食品の許可試験の実施主体として消費者庁の定める登録試験機関の一つである。

II 結果および考察

1. ミニトマト

ミニトマトの添加回収試験において, 回収率は 94%であり, 併行精度はブランク区で2.0%, 添加区で5.2%であった (表 5)。分析法ガイドラインでは, 試料濃度 $\geq$ 100 mg/kgにおける回収率, 併行精度のガイドライン値は, それぞれ90~107%, $\leq$ 5.3%であり, 試験結果がガイドライン値内であることから, 本法が妥当であることを確認した。

また, 枝分かれ試験による併行精度, 室内精度は, 一元配置分散分析を行った結果, それぞれ 6.4%, 7.2%となった (表 6)。残留農薬ガイドラインでは, 濃度 $>$ 0.1 ppm における併行精度, 室内

精度のガイドライン値は, それぞれ<10%, <15%であり, 試験結果がガイドライン値内であることから, 本法が妥当であることを確認した。

さらに, 本法と登録試験機関とのクロスチェックを行ったところ, 本法での定量値が 29.6 mg/100 g, 併行精度が 7.6%であったのに対し, 試験機関の定量値が 28.4 mg/100 g, 併行精度が 1.9%であった。t 検定の結果, P 値が 0.2 となり, 有意差は認められなかった (表 7)。

表 5 ミニトマトにおける添加回収試験

試料	定量値 (mg/100 g)	併行精度 (%)	回収率 (%)
ブランク (n=3)	41	2.0	94
添加区 (n=5)	88	5.2	

表 6 ミニトマトにおける枝分かれ試験

定量値 (mg/100 g)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
50	6.4	7.2

表 7 ミニトマトにおけるクロスチェック

試験法	定量値 (mg/100 g)	併行精度 (%)	P値
本法	29.6	7.6	0.2
常法	28.4	1.9	

2. 切り干し大根

切り干し大根の添加回収試験において, 回収率は 102%であり, 併行精度はブランク区で 2.3%, 添加区で 1.6%であった (表 8)。分析法ガイドラインでは, 試料濃度 $\geq$ 1 mg/g における回収率, 併行精度のガイドライン値は, それぞれ 95~105%, $\leq$ 3.7%であり, 試験結果がガイドライン値内であることから, 本法が妥当であることを確認した。

また, 枝分かれ試験による併行精度, 室内精度は, 一元配置分散分析を行った結果, それぞれ 3.2%, 5.6%となった (表 9)。残留農薬ガイドラインでは, 濃度 $>$ 0.1 ppm における併行精度, 室内精度のガイドライン値は, それぞれ< 10%, < 15%であり, 試験結果がガイドライン値内であることから, 本法が妥当であることを確認した。

なお, 加熱加工される茶に対し, 切り干し大根は加熱乾燥されないため, 膨潤中に大根中の酵素による GABA の変動が懸念されたが, 試験機関の定量値と比較した結果, 本法においては, 膨潤による影響は無視できると考えられた (データ未掲載)。

表 8 切り干し大根における添加回収試験

試料	定量値 (mg/100 g)	併行精度 (%)	回収率 (%)
ブランク(n=5)	149	2.3	102
添加区(n=5)	302	1.6	

表 9 切り干し大根における枝分かかれ試験

定量値 (mg/100 g)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
135	3.2	5.6

3. 茶

茶の添加回収試験において、回収率は 97%であり、併行精度はブランク区で 2.7%、添加区で 3.5%であった (表 10)。分析法ガイドラインでは、試料濃度 ≥ 1 mg/g における回収率、併行精度のガイドライン値は、それぞれ 95~105%、 $\leq 3.7\%$ であり、試験結果がガイドライン値内であることから、本法が妥当であることを確認した。

また、枝分かかれ試験による併行精度、室内精度は、一元配置分散分析を行った結果、それぞれ 2.7%、2.7%となった (表 11)。残留農薬ガイドラインでは、濃度 > 0.1 ppm における併行精度、室内精度のガイドライン値は、それぞれ $< 10\%$ 、 $< 15\%$ であり、試験結果がガイドライン値内であることから、本法が妥当であることを確認した。

表 10 茶における添加回収試験

試料	定量値 (mg/100 g)	併行精度 (%)	回収率 (%)
ブランク(n=5)	170	2.7	97
添加区(n=5)	316	3.5	

表 11 茶における枝分かかれ試験

定量値 (mg/100 g)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
311	2.7	2.7

以上のことから、今回開発した LC-MS/MS を用いた GABA の迅速分析法の妥当性評価の結果は良好であることがわかり、試験機関とのクロスチェックの結果から常法と遜色ないことが確認できた。

また、開発した分析法では 1 サンプル当たり前処理から測定までを生鮮の場合は 30 min、乾物の場合は 60 min で完了することが可能である。

先述のとおり、採用する抽出法や分析装置にもよるが、誘導体化を必要とする分析法では、前処理から測定まで 1.5 から 2.5 h 程度を要するのと比較すると、少なくとも 30 min、最大で 2 h の短縮となる。開発した分析法は、農産物中の GABA を迅速に分析できる手法として期待される。

III 摘要

農産物中の機能性成分 GABA の表示販売加速化に向け、LC-MS/MS による迅速分析法を開発し、妥当性評価を行った結果は、以下のとおりであった。

1. 農産物またはその乾物に水を膨潤させた試料から 80%エタノールにより GABA を抽出し、LC-MS/MS を用い、標準添加法により定量する手法を開発した。

2. ミニトマト、切り干し大根、茶における回収率、併行精度、室内精度は、全て良好であった。

3. ミニトマトについては、登録試験機関とのクロスチェックにより有意差は認められなかった。

以上のことから、LC-MS/MS による GABA の分析法は、妥当性評価の結果、迅速分析法として利用できる方法であることを確認した。

謝 辞

本研究に携わっていただいた薮押麻希子氏に感謝申し上げます。

引用文献

- 1) 株式会社矢野経済研究所 (2025) : 2025 年版健康食品の市場実態と展望 ～市場調査編～. 市場調査資料 C66122300
- 2) 機能性表示食品の届出情報検索 (消費者庁) https://www.caa.go.jp/policies/policy/food_labeling/foods_with_function_claims/search/
- 3) 公益社団法人日本薬学会 編 (2020) : 衛生試験法・注解 2020. 金原出版株式会社
- 4) 高速アミノ酸分析計 LA8080 日立ハイテック <https://www.hitachi-hightech.com/jp/ja/products/analytical-systems/hplc/amino-acid-analyzers/la8080.html#sec-2>
- 5) 土田永渡ら (2022) : 酵素法を用いたヘチマの γ -アミノ酪酸 (GABA) の簡易定量. 日本食品科学工学会誌. 69 (7). 361-367.
- 6) 高橋匡 (2021) : 産地で作る冷凍食品産業振興事業-冷凍による γ -アミノ酪酸の変動-. 青森県産業技術センター工業部門事業報告書. 2021. 46

Development of Rapid Analysis Method of γ -aminobutyric acid, GABA in Agricultural Products

Natsuko FUKURA, Mamiko NOGAMI, Ayaka MATSUIISHI, Yusuke KAWANO, Miho SAKAI

Summary

To accelerate the sales of agricultural products with function claims of γ -aminobutyric acid (GABA), we developed a rapid analysis method using a high-performance liquid chromatograph mass spectrometer (LC-MS/MS).

As a result of examining the validity of the analysis method for cherry tomatoes, cut-dried radishes, and tea, the recovery rates of GABA in the additive recovery tests were 94%, 102% and 97%, respectively, and the relative standard deviation of repeatability were 6.4%, 3.2% and 2.7%, and the relative standard deviations of within-laboratory reproducibility in the branching tests were 7.2%, 5.6% and 2.7%. Since those were within the guideline values as the target of the validity evaluation, it was confirmed that this method was valid.

In addition, comparing the quantitative values of cherry tomatoes with the registered testing institute specified by the Consumer Affairs Agency, no significant difference was found. The rapid analysis method of GABA using LC-MS/MS was comparable to the method at the registered testing institution.

This method is useful as a method that can rapidly analyze GABA in agricultural products from pretreatment to measurement in as little as 30 minutes.

Keywords : Cherry tomato, Cut-dried radish, Tea, GABA, LC-MS/MS

カテキン類およびテアフラビン類 17 成分の一斉分析 並びにカテキン 2 成分の定量迅速分析法の開発

福良 奈津子¹⁾・野上 麻美子²⁾・松石 文花¹⁾・酒井 美穂¹⁾

要 約

茶の機能性表示食品としての届出を加速化するため、メチル化カテキンを含むカテキン類およびテアフラビン類計 17 成分について、高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS/MS) を用いた一斉分析法を開発した。

このうち EGCG および EGCG3” Me について分析法の妥当性を検討した。べにふうき茶において、添加回収試験における EGCG および EGCG3” Me の回収率はそれぞれ 95%, 107%, 枝分かれ試験の併行精度は 5.3%, 4.5%, 室内精度は 7.7%, 8.1%であり、各種ガイドラインの妥当性評価目標値内であることから、本法が妥当であることを確認した。

開発した分析法は、前処理から分析まで 1 検体あたり EGCG および EGCG3” Me を最短 45 min で迅速に分析できる手法として期待される。

【キーワード：茶，カテキン，テアフラビン，EGCG，EGCG3” Me，LC-MS/MS】

緒 言

平成 27 年 4 月に食品表示法が施行され、「機能性表示食品」制度が開始された。以降、機能性表示食品の市場規模は拡大しており¹⁾、農産物についても更なる商品化の加速化が期待されている。本県においても、平成 30 年から冷凍ほうれんそう（機能性関与成分：ルテイン）の表示販売が開始され、現在までにルテインを関与成分とする農産物で 4 件の届出が受理されている²⁾。表示販売には、品目・成分の選定、規格値の設定が必須のプロセスとなるが、特に農産物は、品種、収穫時期、栽培条件等による差が生じ、表示値を担保するには多くのサンプルを分析する必要があることから、分析法の迅速化が必要不可欠である。

カテキン類は、特に緑茶葉中に含まれる成分で、食後血糖値の上昇をおだやかにする機能が報告されているエピガロカテキンガレート (EGCG) や花粉等による目鼻の不快感を軽減する機能が報告されているメチル化カテキン (エピガロカテキン 3- (3”-O-メチル) ガレート, EGCG3” Me) を関与成分とする機能性表示食品の届出がなされている²⁾。さらに、カテキン類は、発酵過程で茶葉に含まれる酵素により 4 種のテアフラビン類となる³⁾。これらメチル化カテキンを含むカテキン類およびテアフラビン類を一斉に分析する分析法の報告は、ほとんどない⁴⁾。また、妥当性が確認された試験方法として「べにふうき緑茶中のメチル化カテキンの定量—高速液体クロマトグラフ法 (JAS 0002)」⁵⁾があるが、前処理から測定まで 1 検体あたり約 2 h を要するため、分析の

更なる迅速化が求められている。

届出を行おうとする食品の分析方法は、「機能性表示食品の届出等に関するガイドライン (平成 27 年 3 月 30 日 消食表第 141 号)」および「機能性表示食品に関する質疑応答集 (平成 29 年 9 月 29 日 消食表第 463 号)」に示されているように、妥当性確認を行うことが望ましいとされており、開発した分析法の妥当性を担保することが重要となる。しかし、その妥当性確認に関しては、残留農薬等のように、評価項目に明確な規定はない。

そこで、LC-MS/MSを用いたカテキン類およびテアフラビン類の一斉分析法を開発し、さらに国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 (以下、農研機構) の公開するシステムティックレビュー (SR) のある EGCG および EGCG3” Me の 2 成分について、「分析法の妥当性に関するガイドライン (令和元年10月農林水産省)」(以下、分析法ガイドライン) および「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性ガイドライン (平成19年11月15日付け食安発第1115001号)」(以下、残留農薬ガイドライン) を参考に設定した項目に基づき、茶における妥当性評価を実施したので報告する。

I 試験方法

1. 試薬および標準品

(+) カテキンハイドレート (C), (-) ガロカテキン (GC), (-) エピカテキン (EC), (-) エピガロカテキン (EGC), (-) エピカテキンガレート (ECG), (-) EGCG, エピカテキン 3- (3”-O-メチル) ガレート (ECG3” Me), EGCG3” Me, エ

1) 宮崎県総合農業試験場生産流通部 2) 現 一般社団法人食の安全分析センター

ピガロカテキン 3- (4" -O-メチル) ガレート (EGCG4" Me), (-) カテキンガレート (CG), (-) ガロカテキンガレート (GCG), ガロカテキン 3- (3" -O-メチル) ガレート (GCG3" Me), ガロカテキン 3-(4" -O-メチル) ガレート (GCG4" Me), テアフラビン (TF), テアフラビン 3-O-ガレート (TF2A), テアフラビン 3' -O-ガレート (TF2B), テアフラビン 3, 3' -ジ-O-ガレート (TF3) は, 長良サイエンス製の標準品を使用した. 添加回収試験には, 1000 mg/Lとなるように 1.00 g/L エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物含有 1.76 g/Lアスコルビン酸水溶液 (以下, 希釈溶媒という) に溶解したものを, それ以外には 100 mg/L-希釈溶媒を調製して用いた.

希釈溶媒には, 関東化学製の試薬特級グレードのエチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物およびアスコルビン酸を使用した.

抽出溶媒には, 富士フィルム和光純薬製の試薬特級グレードのジメチルスルホキシドおよび LC/MSグレードの超純水, Honeywell製の LC/MSグレードのギ酸を使用した.

LC-MS/MSの移動相には, LC/MSグレードの富士フィルム和光純薬製の超純水, Honeywell製のギ酸およびメタノール, 関東化学製の 0.1%ギ酸-蒸留水を使用した.

2. 試料

宮崎県産品べにふうき茶粉末を購入し, 使用した.

3. 装置

HPLCには, 島津製作所製NexeraUC/s, MSには島津製作所製 LCMS-8060NXを使用した.

4. 分析条件

各装置は, 表 1, 2 の条件で設定した. 17 成分の MRM条件は, 表 3 のとおりとした.

表 1 HPLC 条件

カラム	COSMOSIL Packed Column 2.5 Cholester (75×2.0 mm, 2.5 μm)
カラム温度	40°C
移動相A液	0.1%(v/v)ギ酸水溶液
移動相B液	ギ酸:MeOH:ACN=1:5:5
流速	0.4 mL/min
グラジエント	B conc. 90%(0 min)→86%(3* min)→85.4%(13 min)→83%(14*-22 min)→60%(23-32 min)→90%(32.01-35 min)
注入量	5 μL

*B Curve.

表 2 MS 条件

イオン化法	ESI (C: Positive mode, C以外:Negative mode)
ネブライザーガス流量	2.5 L/min
ヒーティングガス流量	10 L/min
ドライイングガス流量	10 L/min
DL温度	250°C
ヒートブロック温度	4°C
測定モード	MRM

表 3 MRM 条件

成分	MRM Transition (<i>m/z</i>)	Collision Energy (V)
GC	305.25>125.20	23
EGC	305.25>125.20	23
C	291.15>139.25	-16
EC	289.15>245.25	15
EGCG	456.85>169.20	19
GCG	457.25>125.10	40
EGCG4"Me	471.10>287.15	12
EGCG3"Me	470.90>183.10	15
ECG	441.25>169.30	18
CG	441.25>169.20	22
GCG4"Me	471.20>287.30	14
ECG3"Me	455.20>289.20	18
GCG3"Me	471.20>183.20	15
TF1	563.00>241.00	34
TF2B	714.90>219.00	46
TF2A	715.20>407.25	26
TF3	867.20>389.20	38

5. 試料の調製および抽出方法

抽出は, 平成 28 年度「革新的技術開発・緊急展開事業 (うち経営体強化プロジェクト)」(農研機構生物系特定産業技術研究支援センター) で得られた成果を参考に以下のとおり実施した.

べにふうき茶粉末 0.250 gを超純水に懸濁し, 25 mLに定容したもの (以下, お茶という) を試料とした.

抽出溶媒は, 超純水とギ酸を 48:2v/vで混合したものとジメチルスルホキシドを 50:50 v/vになるよう混合し, 調製した.

お茶を 0.2 μmメンブレンフィルター (ADVANTEC 製 DISMIC 25HP020AN) にてろ過し, 抽出溶媒で適宜希釈したものを希釈溶媒で 10 倍希釈し, LC-MS/MSに供した.

6. カラム性能評価

カテキン類 13 成分はそれぞれ, 10, 30, 100, 300, 500, 750, 1000, 1500 $\mu\text{g/L}$, テアフラビン類 4 成分はそれぞれ, 100, 300, 1000, 3000, 5000, 7500, 10000, 15000 $\mu\text{g/L}$ -希釈溶媒となるように 17 成分の混合標準溶液を調製した.

ピーク面積RSD< 10% ($n=3$) かつ寄与率 (r^2) >0.99 となる濃度範囲を定量範囲とした.

7. 定量方法

定量方法は, 絶対検量線法を採用した. 試料は, カテキン類の一部およびテアフラビン類定量用として抽出溶媒で 10 倍希釈, またはカテキン類定量用として 100 倍希釈し, 希釈溶媒でさらに 10 倍希釈した.

8. 妥当性評価

17 成分のうち, 機能性表示食品としての届出の可能性が高い成分として, 農研機構の公開するSRのあるEGCGおよびEGCG3" Meの 2 成分について, 妥当性評価を行った.

1) 添加回収試験 (併行精度, 回収率)

試料中含量と同程度を添加するように, 計量後の試料に 1000 mg/L EGCGおよびEGCG3" Me標準溶液を, お茶 250 μL に対しそれぞれ 187.5 μL および 37.5 μL ずつ添加した. 30 min静置後, 抽出溶媒 2025 μL を添加し, 0.2 μm フィルターでろ過した. ろ液を抽出溶媒で 10 倍希釈後, 希釈溶媒で 10 倍希釈し, 分析に供した. 回収率を確認し, 分析法ガイドライン値(表 4)と比較した(各 $n=5$). なお, ブランク試料には標準溶液に代えて希釈溶媒を添加した.

表 4 回収率および精度の目標値 (抜粋)

濃度	回収率 (%)	併行精度 (RSD%)
1 $\text{mg/g} \leq \sim < 10 \text{ g/g}$	95~105	≤ 3.7
100 $\text{mg/kg} \leq \sim < 1 \text{ mg/g}$	90~107	≤ 5.3

3) 枝分かれ試験 (併行精度, 室内精度)

試験を分析者 1 名が, 同一試料について 1 日 1 回 (2 併行ずつ), 5 日間実施することにより得られた定量値から本法の併行精度および室内精度を求め, 残留農薬ガイドライン値 (表 5) と比較した.

表 5 精度の目標値 (抜粋)

濃度 (ppm)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
0.01< $\sim \leq$ 0.1	< 15	< 20
0.1<	< 10	< 15

II 結果および考察

1. カテキン類およびテアフラビン類の一斉分析

カラム性能評価を行ったところ, 定量範囲は表 6 のとおりとなった.

なお, GC, EC, Cについては異性体 ((+) および (-)) の分離を試みたものの, 区別することができなかった.

茶のカテキン類およびテアフラビン類の一斉分析法については, メチル化カテキンを含むカテキン類 10 成分およびカフェインの一斉分析法⁴⁾やメチル化カテキンを除くカテキン類およびテアフラビン類 12 成分の一斉分析法⁶⁾について報告がある. 本法では, 新たに, メチル化カテキンを含むカテキン類及びテアフラビン類 17 成分の一斉分析について開発した. 今回は 17 成分全てについて妥当性評価を実施してはいないものの, お茶に含まれる機能性成分のスクリーニング分析法として活用が期待される.

表 6 定量範囲

成分	定量範囲 ($\mu\text{g/L}$)	寄与率 r^2
GC	10 - 1,500	0.9934
EGC	100 - 1,500	0.9926
EC	10 - 1,500	0.9974
C	10 - 1,500	0.9929
EGCG	10 - 1,500	0.9968
GCG	10 - 1,500	0.9974
EGCG4Me	10 - 1,500	0.9928
EGCG3Me	10 - 1,500	0.9912
ECG	10 - 1,500	0.9969
CG	10 - 1,500	0.9912
GCG4Me	10 - 1,500	0.9962
ECG3Me	10 - 1,500	0.9965
GCG3Me	10 - 1,500	0.9954
TF1	100 - 15,000	0.9978
TF2B	1,000 - 10,000	0.9927
TF2A	100 - 15,000	0.9976
TF3	1,000 - 15,000	0.9932

2. お茶試料における妥当性評価

お茶の添加回収試験において、EGCGおよびEGCG3” Meの回収率はそれぞれ 95%，107%であり，併行精度はブランク区でそれぞれ 2.8%，2.6%，添加区でそれぞれ 2.7%，2.6%であった（表 7）．分析法ガイドラインでは，試料濃度 ≥ 100 mg/kgにおける回収率，併行精度のガイドライン値は，それぞれ 90～107%， $\leq 5.3\%$ であり，試験結果がガイドライン値内であることから，本法が妥当であることを確認した．

また，枝分かれ試験によるEGCGおよびEGCG3” Meの併行精度はそれぞれ 5.3%，4.5%，室内精度はそれぞれ 7.7%，8.1%となった（表 8）．残留農薬ガイドラインでは，濃度 > 0.1 ppmにおける併行精度，室内精度のガイドライン値は，それぞれ $< 10\%$ ， $< 15\%$ であり，試験結果がガイドライン値内であることから，本法が妥当であることを確認した．

表 7 お茶試料における添加回収試験

成分	試料	定量値 (mg/100 g)	併行精度 (%)	回収率 (%)
EGCG	ブランク	641	2.8	95
	添加区	1353	2.7	
EGCG3”Me	ブランク	158	2.6	107
	添加区	318	2.6	

n=5

表 8 お茶試料における枝分かれ試験

成分	定量値 (mg/100 g)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
EGCG	350	5.3	7.7
EGCG3”Me	82	4.5	8.1

以上のことから，今回開発したLC-MS/MSを用いたカテキン類の分析法について，お茶におけるEGCGおよびEGCG3” Meの分析妥当性を確認した．

1 サンプル当たり，前処理から測定まで公定法では 2 h程度を要するのに対し，開発した分析法では約 45 minまで短縮することができた．開発した分析法は，お茶に含まれるEGCGおよびEGCG3” Meを迅速に分析できる手法として期待される．

III 摘要

茶の機能性表示食品としての届出加速化に向け，LC-MS/MSによる迅速分析法を開発し，妥当性評価を行った結果は，以下のとおりであった．

1. メチル化カテキンを含むカテキン類およびテアフラビン類計 17 成分について，LC-MS/MSを用いた一斉分析法を開発した．

2. このうちEGCGおよびEGCG3” Meについて妥当性評価を行った結果，お茶における回収率，併行精度，室内精度は，全て良好であった．

以上のことから，LC-MS/MSによるEGCGおよびEGCG3” Meの分析法は，妥当性評価の結果，迅速分析法として利用できる方法であることを確認した．

謝 辞

本研究に携わっていただいた藪押麻希子氏に感謝申し上げます．

引用文献

- 1) 株式会社矢野経済研究所 (2025) : 2025 年版健康食品の市場実態と展望 ～市場調査編～．市場調査資料C66122300
- 2) 機能性表示食品の届出情報検索 (消費者庁) https://www.caa.go.jp/policies/policy/food_labeling/foods_with_function_claims/search/
- 3) 柳瀬笑子 (2022) : 発酵茶製造時におけるカテキン類の酸化重合反応に関する研究 食品加工中の化学変化．化学と生物．60 (7) . 346-351
- 4) 藤崎真一 (2023) : AIアルゴリズムによるグラジエント条件の自動最適化～機能性成分一斉分析のLCメソッド開発への適用～島津製作所アプリケーションニュース 01-00664-JP
- 5) 農林水産省 (2018) : 日本農林規格．JAS0002
- 6) 南元彩花，小林まなみ (2021) : トリプル四重極型LC/MS/MSを用いたお茶中のカテキン類／テアフラビン類一斉分析．島津製作所アプリケーションニュース 01-00034-JP
- 7) 山部恵子，吉岡拓哉，市来弥生，川嶋美帆 (2020) : 茶葉に含まれるカテキン類の定量分析．島津製作所アプリケーションニュースL-583B

Development of a Simultaneous Analysis Method for 17 components of Catechins and Theaflavins, and Rapid Quantification Method for 2 components of Catechins

Natsuko FUKURA, Mamiko NOGAMI, Ayaka MATSUIISHI, Miho SAKAI

Summary

To accelerate the notification of tea as a food with functional claims, we developed a simultaneous analysis method for a total of 17 components of catechins and theaflavins, including methylated catechins, using a high-performance liquid chromatograph mass spectrometer (LC-MS/MS).

Among the 17 components, the validity of the method was examined for EGCG and EGCG3"Me. In Benifuki tea, the recovery rates of EGCG and EGCG3"Me in the additive recovery tests were 95% and 107%, respectively, and the relative standard deviation of repeatability were 5.3% and 4.5%, and the relative standard deviations of within-laboratory reproducibility in the branching tests were 7.7% and 8.1%. Since those were within the guideline values as the target of the validity evaluation, it was confirmed that this method was valid.

The developed analytical method is useful as a rapid method for analyzing EGCG and EGCG3"Me per sample in as little as 45 min from pretreatment to measurement.

Keywords : Tea, Catechin, Theaflavin, EGCG, EGCG3"Me, LC-MS/MS

改良 DIBA 法を用いたサトイモ疫病の迅速診断

櫛間義幸¹⁾・久野公子²⁾

要 約

サトイモ疫病を迅速に診断するため、市販の疫病菌診断試薬(DAS-ELISA キット)を利用し、改良 DIBA 法による診断法を開発した。TBST で磨砕したサトイモ疫病罹病葉の汁液及び健全葉汁液をメンブレンシートに固着させた後、ブロック処理を行い、次いでキットのコンジュゲート液を TBSTPB で 200 倍に希釈して作成した検出液と 30 分間反応させた。TBST で洗浄したのち BCIP/NBT 溶液を添加して 15 分後に判定した。改良 DIBA 法による疫病菌の検出限界は病組織磨砕液の 100 倍(w/v)程度、疫病菌体沫 10 µg で、DAS-ELISA 法やイムノストリップ法よりも劣った。しかし、特殊な機材を必要としないこと、一度に複数のサンプルを同時に検査可能で検出液も反復利用できるためコストパフォーマンスも優れることから現地診断に適すると考えられた。

【キーワード：疫病菌，診断，改良 DIBA 法，DAS-ELISA 法，RIPA 法】

緒 言

Phytophthora colocasiae によるサトイモ疫病は、近年、宮崎県内全域で激発し、大被害をもたらした重要病害である^{1) 3) 5) 6)}。「疫病菌(*Phytophthora*)」⁸⁾の名前のおり、まさに「Phyto(植物)」の「*phthora*(破壊者)」であるが、*Phytophthora* 属菌は、ジャガイモやトマトなど多くの作物で知られている有名な病原菌で、遊走子のうの形態も特徴的なことから、顕微鏡下でも比較的容易に判定できる病害である。しかしながら、本病原菌は植物侵害後、寄主植物が枯死、分解過程に進むと、二次的に侵入してくる雑菌の増殖等により、速やかに消失し、検出・分離されにくくなる傾向があり、診断に苦慮する例も多々見られる。

Phytophthora 属菌の鑑定には、Agdia 社より、DAS-ELISA (dable-sandwich-enzyme linked immunosorbent assay) キット (*Phytophthora* Reagent set (SRA92601)) 及びイムノストリップ

(Rapid immunofilter paper assay, 以下, RIPA) キット (*Phytophthora* ImmunoStrip test (AG92601025)) の 2 つの診断薬が提供されており、表 1 に記載された疫病菌が診断可能とされているが、これらの試薬はいずれも抗原抗体反応を利用したものである。現在、本県では DAS-ELISA 法の試薬を利用した改良 DIBA (Dot immuno-binding assay) 法によるキュウリ黄化えそ病の診断が広く活用されていることから、サトイモ疫病の現場での迅速な診断を行うため、上記試薬を活用した改良 DIBA 法の開発を行ったので報告する。

脚注：DIBA 法とは、日比(1984)が報告した一次抗体との二次抗体を個別に処理する間接 ELISA 法をメンブレン上で行う手法を指す。改良 DIBA 法は、一次抗体と二次抗体を混合して同時に処理し、酵素結合抗体をダイレクトに処理することにより抗体感作反応を 1 ステップで行う手法をいう。

表 1 Agdia 社 *Phytophthora* DAS-ELISA キット対象菌

Phytophthora Species Tested			
<i>P. asparagi</i>	<i>P. cryptogea</i>	<i>P. lateralis</i>	<i>P. quercina</i>
<i>P. alni</i>	<i>P. drechsleri</i>	<i>P. lavandula</i>	<i>P. ramorum</i>
<i>P. boehmeriae</i>	<i>P. europaea</i>	<i>P. meadii</i>	<i>P. richardiae</i>
<i>P. bisheria</i>	<i>P. erythrosepica</i>	<i>P. medicaginis</i>	<i>P. taxon Agatis (PTA)</i>
<i>P. cambivora</i>	<i>P. fragariae</i> var. <i>fragariae</i>	<i>P. megasperma</i>	<i>P. sinensis</i>
<i>P. cactorum</i>	<i>P. fragariae</i> var. <i>rubi</i>	<i>P. melonis</i>	<i>P. siskiyouensis</i>
<i>P. cajani</i>	<i>P. gonapodyides</i>	<i>P. nemorosa</i>	<i>P. sojae</i>
<i>P. canalensis</i>	<i>P. glovera</i>	<i>P. nicotianae</i>	<i>P. syringae</i>
<i>P. capsici</i>	<i>P. heveae</i>	<i>P. niederhauserii</i>	<i>P. tentaculata</i>
<i>P. cinnamomi</i> var. <i>parvispora</i>	<i>P. hibernalis</i>	<i>P. palmivora</i>	<i>P. tropicalis</i>
<i>P. cinnamomi</i> var. <i>robiniae</i>	<i>P. infestans</i> (6 isolates)	<i>P. pistaciae</i>	<i>P. uliginosa</i>
<i>P. citricola</i>	<i>P. kernoviae</i>	<i>P. porri</i>	

※ User Guide: DAS-ELISA Reagent Set(SRA 92601) より引用

I 試験方法

1. 材料及び方法

改良 DIBA 法は、櫛間 (2017)⁴⁾ に準拠して実施した。サンプル支持体として、ニトロセルロースメンブレン (Bio Rad 社製 孔径 0.45 μm 、以下 NCM シートという) を用いた。

また、試薬溶液は以下の通りである。

【改良 DIBA 法】

TTBS : 0.02M トリスヒドロキシアミノメタン 2.4 g, 塩化ナトリウム 29.2 g, pH7.5 ツイーン 20 0.5 ml, 蒸留水 1,000 mL ブロック液 : TTBS 50 ml, ポリビニルピロリドン 1 g, 牛血清アルブミン Fr5 1 g TTBSPB (抗体希釈液) : TTBS 50 ml, ポリビニルピロリドン 1 g, 牛血清アルブミン Fr5 0.1 g AP9.5 緩衝液 (AP バッファー) : トリスヒドロキシアミノメタン 12.1 g, 塩化ナトリウム 5.8 g, 塩化マグネシウム・6水和物 0.2 g, 蒸留水 1,000 ml, pH9.5 発色液 : SigmaFast NBT/BCIP タブレット (シグマ社) 1錠を蒸留水 10 ml に溶解して使用した。

Phytophthora colocasiae の検出試薬として、Agdia 社製 *Phytophthora* Reagent set (SRA92601) のうちコンジュゲート液 (アルカリフォスファターゼ標識抗体液) を利用し、TBSTPB を用いて 200 倍に希釈した。

【DAS-ELISA 法】

CB : 0.05M 炭酸緩衝液 (pH9.6, 0.02 %アジ化ナトリウム)

PBST : 0.02M リン酸緩衝液 (pH7.4, 0.85 %塩化ナトリウム, 0.05 %ツイーン 20 0.02 %アジ化ナトリウム)

DA : ジェタノールアミン溶液 (pH9.8, 0.02 %アジ化ナトリウム)

基質 : パラニトロフェニルリン酸

【RIPA 法】

Agdia 社から提供されている *Phytophthora* Immunostrip test (AG92601025) のイムノストリップを用いた。

1) 改良 DIBA 法の適用

検出液の適切な濃度を調べるため、コンジュゲート液を 200 倍, 400 倍, 800 倍, 1,600 倍及び 3,200 倍に TBSTPB で希釈して検出試薬液とした。

供試したサンプルは、疫病菌を接種後、25 $^{\circ}\text{C}$ 、72 時間培養して得られたサトイモ葉リーフディスク (品種 : 石川早生, 径 5 cm) を用いた。すな

わち、①病変部位から約 1 cm 離れた健全部、②病変部位に隣接する境界部及び③明瞭な病変部、からそれぞれ直径 5 mm の葉片 (約 5 mg) として生検トレパンを用いて打ち抜き、200 μl の TBST を加えて摩砕し、原液 (40 倍) とした。各サンプルは原液及びその 10 倍希釈液を NCM シートに図 1 のようにそれぞれ 1 μl ずつスポットした。

NCM シートは風乾後にブロック液処理を行い、先に調整した各濃度の検出試薬液に、それぞれ 30 分浸漬し、AP9.5 緩衝液で前処理後に基質・発色剤を添加して遮光条件下、15 分反応させた。処理終了後は、反応停止液で 5 分間処理、水洗後、風乾した。

2) DAS-ELISA 法及び RIPA 法との検出感度の比較

改良 DIBA 法をサトイモ疫病の診断に利用するにあたり、使用した血清診断試薬 (DAS-ELISA キット及びイムのストリップキット) のプロトコルに則った場合との検出感度の比較を行った。サトイモ疫病に罹病した葉片 0.1 g を乳鉢で摩砕したのち PBST 1 ml を添加してサンプル原液 (10 倍) とし、以後 10 倍ずつ段階希釈して被検液系列を作成した。対照として健全なサトイモ葉片も供試し同様に 10 倍量のサンプル原液とした。また、農業試験場で分離したサトイモ疫病菌 2 菌株 (No 184, No 293) を、それぞれ V8 液体培地 (V8 ジュース 80 ml, 炭酸カルシウム 3 g, 蒸留水) を用いて 5 日間静置培養したのち、菌そうを遠心 (3,000 rpm, 15 分間) して回収した。得られたペレットを再度滅菌蒸留水に懸濁し、遠心を 2 回繰り返して洗浄したのち、ペレットをクリーンベンチ内で 6 時間風乾して疫病菌の菌体粉末を得た。菌体粉末 1 mg を各々 1 ml の TBST に懸濁して、原液とし、同様に段階希釈を作成した。

DAS-ELISA 法は、Agdia 社のプロトコルに従って試験を行った。すなわち、コーティング液 (100 倍希釈) を 37 $^{\circ}\text{C}$ 、2 時間処理したマイクロプレートに、サンプル液をウェルあたり 100 μl 添加後、4 $^{\circ}\text{C}$ 、16 時間インキュベートした。その後コンジュゲート液 200 倍液を 37 $^{\circ}\text{C}$ 、2 時間反応させ、基質を添加して 1 時間後にマイクロプレートリーダーを用いて 405 nm における吸光度を測定した。

RIPA 法は、先に得られたサンプル液の希釈系列を各 100 μl ずつ、1.5 ml のマイクロチューブにとり、イムノストリップの下端を差し込み、検定を実施した。

改良 DIBA 法は、先に得られたサンプル液を 1 μl ずつメンブレンシートにスポットし、風乾後

に、1)と同様に改良DIBA法に供試した。

3) 検出試薬液の反復利用が検出感度に及ぼす影響

菌体及び罹病植物汁液をスポットしたNCMシートを複数枚作成し、同一の検出試薬液を用いて10回反復利用して反応性の低下がないか検証した。

4) 実用性の検証

自然発生したサトイモ疫病の罹病した感染葉や葉柄等を供試し、病変箇所や健全部との隣接箇所から径5 mmのコルクボーラーで打ち抜き、改良DIBA法による疫病菌の検出を試みた。

Ⅲ 結 果

1) 改良DIBA法の適用

コンジュゲート液を段階的に希釈して得られた各検出試薬液は200倍から3,200倍まで反応が認められたが、200倍が最も明瞭に反応が認められた(図1)。また、サンプリングした境界部及び病変部では濃い発色が得られ疫病菌が検出されたが、罹病葉であっても健全部位では反応が認められず検出されなかった。

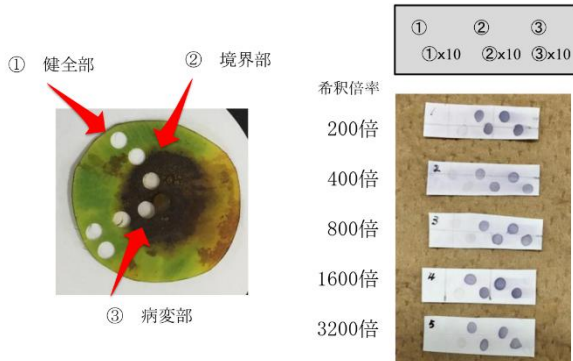


図1 サンプリング部位とコンジュゲート液の希釈倍数

2) DAS-ELISA法及びRIPA法との比較

サトイモ葉のサンプルを用いたDAS-ELISA法の結果を表2に、RIPA法及び改良DIBA法の結果をそれぞれ図2、図3に示す。DAS-ELISA法ではサンプル原液(重量比10倍)の1,000倍まで、健全株と罹病株との吸光度(405 nm)に明らかに差異が認められ容易に判定が可能であった(表2)。RIPA法では、罹病株汁液の1,000倍希釈まで反応が認められたのに対し、健全株では原液でも反応がみられなかった(図2)。一方、改良DIBA法では、健全株汁液でも非特異発色が見られるため、罹病株汁液の希釈系列と比較し

て100倍希釈までは、陽性と判定できるものの1,000倍以上では判定が困難であった(図3)。

次に、疫病菌の菌体粉末を用いたDAS-ELISA法、RIPA法及び改良DIBA法の結果を表3に示す。DAS-ELISA法及びRIPA法の検出限界は、それぞれ0.1 µg及び1 µgと考えられるが、改良DIBA法の検出限界は10 µgと劣る結果であった。

表2 DAS-ELISA

希釈倍数	罹病葉	健全葉
(原液) 10倍	4.4	0.58
100倍	4.47	0.57
1,000倍	3.87	0.46
10,000倍	0.98	0.47
100,000倍	0.49	0.38
PBST	0.36	0.37

注) 数値は405 nmでの吸光度
3反復の平均値

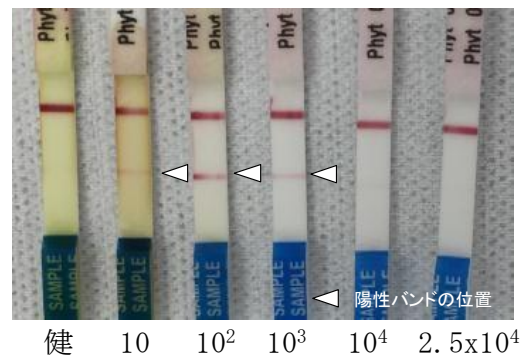


図2 RIPA法

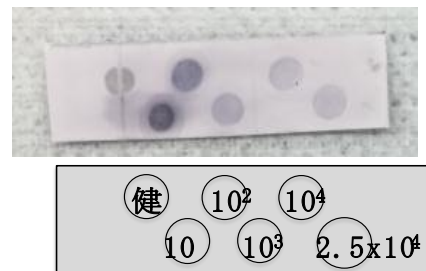


図3 改良DIBA法

表 3 各検出法の検出限界

希釈倍数	菌量(μg)	改良DIBA法		DAS-ELISA法		RIPA法
		No184	No253	No184	No253	No184
10倍	100	+	+	4.54	4.73	+
100倍	10	+	+	4.5	4.48	+
1,000倍	1	—	—	4.51	4.45	+
10,000倍	0.1	—	—	4.22	3.23	—
100,000倍	0.01	—	—	1.01	0.69	—
P B S T				0.33	0.32	

注) No184、253 は疫病菌の分離株

DAS-ELISA 法の数値は 405 nm の吸光度

RIPA 法・改良 DIBA 法は目視による判定

＋：陽性 —：陰性

3) 検出試薬液の反復利用性

いずれのサンプルを利用した試験でも，検出試薬液は 10 回程度反復使用しても反応の低下は認められなかった（データ省略）．

4) 実用性の検証

検証に用いたサトイモ葉及び葉柄の各サンプルの採取部位及びその検定結果を図 4 に示す．いずれも疫病菌による明らかな病変部位では陽性の反応が認められたが，病変部から離れた部位，あるいは疫病の症状を伴わない葉柄部位では陰性と判断された．また，枯死した葉片や葉柄からも検出が可能であった．

IV 考 察

Agdia 社製の疫病菌診断試薬（DAS-ELISA キット）のコンジュゲート液を利用した改良 DIBA 法により，サトイモ疫病の病変部位から疫病菌を検出できたことから，本研究により当該キットの適応表にないサトイモ疫病菌（*Phytophthora colocasiae*）へも適用できることが確認された．同一サンプルの健全部位から検出されなかったことは，本病原菌がキュウリ黄化えそ病のように全身感染するウイルスと異なり発病箇所の周辺にしか寄生していないことによると推察される．

改良 DIBA 法の検出限界は，DAS-ELISA 法が罹病植物汁液の 1,000 倍，菌体沫 0.1 μg であったのに対してそれぞれ 100 倍，10 μg で劣る結果であったが，DAS-ELISA 法が専用プレートのコーティング処理から一連の過程を経て判定できるまでに 1～2 日間を要するのに対して，本手法はサンプルの摩砕から判定までに約 50 分程度しかかからず，短時間での判定が可能であった．また，同社が提供している PhytoRIPA 法の検出感度は改良 DIBA に勝る結果であった．一方，DAS-ELISA 法や RIPA 法では試薬やストリップ片が 1 回しか使用できないのに比較し，改良 DIBA 法に使用した検出試薬液は 10 回程度反復利用が可能

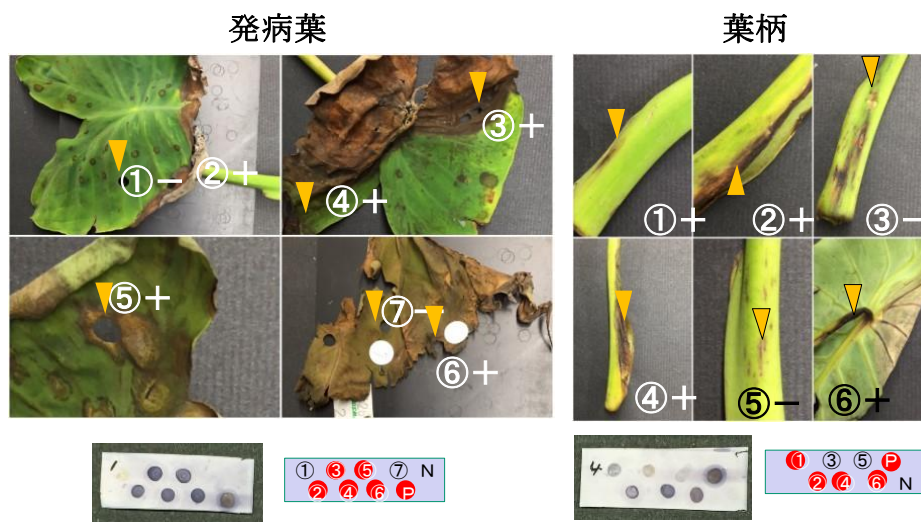


図 4 症状の異なるサンプルを用いた実用性の検証

- 発病葉：①汚斑のある健全部位（生葉 1） ②病変部位（生葉 1） ③病変枯死部位（生葉 2）
 ④病変部位（生葉 2） ⑤病変枯死部位（半枯死葉） ⑥病変部位（枯死葉）
 ⑦健全部位（枯死葉）
 葉 柄：①疫病の初期病変部位 ②疫病の病変部位 ③ 褐変のみの部位 ④疫病の病変部位
 ⑤褐変のみの部位 ⑥葉の疫病菌斑に隣接した葉柄（枯死）

各々、下段に検定シートを示した。模式図に赤く示したものが陽性と判定され写真には「＋」で示した。「－」は陰性。

であることから検定コストの低減に有効と考えられる。

実際に圃場から採取した種々のサトイモ葉及び葉柄等を供試して、本手法の実用性を検証した結果、明瞭な病変部はもとより初期病変等から疫病菌が検出された。疫病菌は一般に古い病組織や枯死部分からは分離が困難であるが、本試験では改良 DIBA 法により枯死した組織からも検出可能であることから、見落とされやすい初期の疫病診断にも有効と考えられる。

現在、改良 DIBA 法に使用している NCM シートの小片 (8×25 mm) には、複数のサンプルをスポットすることが可能であり、実際にキュウリのウイルス病であるキュウリ黄化えそ病やキュウリ緑斑モザイク病の検定では、NCM 小片の上下辺上に複数の陽性・陰性対照 (コントロール) を配置したものを配布している。そこで検出試薬液を 10 回反復使用し、NCM シート 1 枚につき 5 検体を同時に検査すると仮定して、試薬等検定に要するコストを試算するとともに、DAS-ELISA 法及び RIPA 法との比較を行った。各診断手法のコストや所要時間等の特徴を整理して表 4 に示す。DAS-ELISA 法及び RIPA 法の 1 テストあたりのコストがそれぞれ 267 円及び 1,112 円であるのに対し、改良 DIBA 法の場合、約 34 円程度と廉価である。RIPA 法では 1 ストリップにつき 1 検体しか検査できないのに対して、改良 DIBA 法は複数の検体を同時に検査できること、また抗体希釈液は 10 回程度反復利用が可能であることから、疑わしいサンプルを一度に複数検査したり、やり直すことも可能であり、生産現場でも有効な技術と考えられる。

表 4 各種診断法の特徴

	改良DIBA法	DAS-ELISA法	RIPA法
製品名	同左	Phytophthora (ERS)	Phytoイムノストリップキット
規格	750 test*	96 test	25 test
価格(円)	25,600	25,600	27,800
1件あたり試薬単価(円)	34	267	1,112
所要時間	約1時間	1～2日	約10分

注) DAS-ELISA 用試薬のコンジュゲート液を利用して作成し、検査液は 10 回反復利用、1 回あたり 5 検体を検査すると仮定して計算。

筆者らは、スターチス疫病 (*P. nicotianae*)、イチゴ疫病 (*P. nicotianae* 他)、及びカンキツ褐色腐敗病 (*Phytophthora sp.* 他) に対して本手法を適用し検出可能 (データ省略) であることを

確認しており、本手法は、表 1 に示した他の多くの疫病菌の検出に利用できる可能性がある。

なお、本手法の判定は比色判定であることから、検定に際しては必ず同一種の健全植物も陰性対照として同時に参照し、被験植物 (サンプル) がより強く (濃く) 呈色することを確認しなければならない。また、反応する *Phytophthora* 属菌の近似種が多数あることから、病害を診断する際には、かならず作物の病徴等を観察し、疫病の特徴の有無を確認する必要がある。

植物病害を的確に防除するには正確な診断が必要不可欠であるが、病原の種類に応じて、その診断方法は様々である。ウイルス病と異なり、糸状菌病の多くは光学顕微鏡で発病した植物体に寄生する形態の観察が可能である。また、直接病植物を観察して見えない場合でも、定法に従い分離培養を行い、菌糸や胞子の性状をつぶさに観察することで診断できることも少なくない³⁾。

しかしながら、生産現場で働く農業改良普及員や営農指導員が初見で病害を診断するには、技術的にハードルが高く、疑わしいけれども確信が持てないといった場合が多いと思われる。改良 DIBA 法による疫病の診断は、簡単な操作でかつ短時間に確定診断が可能であることから、現場での迅速な防除対策の指導に寄与できると考える。

IV 摘 要

近年、宮崎県内で多発し問題となっているサトイモ疫病 (病原菌 *Phytophthora colocasiae*) を迅速に診断するため、市販の疫病菌診断試薬 (Agdia 社製 DAS-ELISA キット) を利用し、改良 DIBA 法による診断法を開発した。

1. TBST で磨砕したサトイモ疫病罹病葉の汁液及び健全葉汁液をメンブレンシートに固着させ、次いで TBSTPB で 200 倍に希釈した DAS-ELISA キットのコンジュゲート液と 30 分間反応させた。
2. 改良 DIBA 法による疫病菌の検出限界は病組織磨砕液の 100 倍 (w/v)、DAS-ELISA 法および RIPA 法ではそれぞれ 1,000 倍であった。
3. 改良 DIBA 法で 10 回の抗体液再利用、同時に 5 検体を検査すると仮定した場合、1 件当たりの試薬コストは約 34 円で、イムノストリップ法の 1/30 以下であった。
4. 改良 DIBA 法は疫病菌の分離が困難な枯死病斑からも検出可能で、現地での診断に有効と考えられた。

謝 辞

本研究を実施するにあたり協力いただいた生物環境部および病害虫防除・肥料検査課の研究員、会計年度任用職員の方々に深く感謝の意を表する。

引 用 文 献

- 1) 桂琦一(1971)：植物の疫病 理論と実際 誠文堂新光社東京 128pp
- 2) 黒木修一 (2016)：宮崎県におけるサトイモ疫病の被害と今後の防除対策 植物防疫 第 71 巻
- 3) 植松清次 (2015)：疫病菌類の同定のための簡易な分離・培養・形態形成法 Ver3：疫病 植物防疫 特別増刊号 No17

- 4) 櫛間義幸ら (2016)：サトイモ疫病菌 *Phytophthora colocasiae* Raciborski の諸性質 九州病害虫研究会報 第 62 巻
- 5) 櫛間義幸 (2017)：改良 DIBA (Dot Immuno-binding Assay) 法を用いたキュウリウイルス病の簡便かつ低コスト診断法 九病虫研究会報 第 63 巻
- 6) 櫛間義幸ら (2017)：改良 DIBA 法を用いたサトイモ疫病の低コスト診断法 日植病報 第 83 巻
- 7) 久野公子ら (2016)：宮崎県におけるサトイモ疫病発生の推移 九病虫研究会報 第 63 巻
- 8) 日比忠明 (1984)：DIBA 法による植物ウイルスの検出法 植物防疫 第 38 巻
- 9) 宮路寛輝ら (2016)：宮崎県で発生したサトイモ疫病菌の 2, 3 の性状 日植病報 第 82 巻

Rapid diagnosis of taro leaf blight by modified the DIBA method

Yoshiyuki KUSHIMA, Kohko KUNO

Summary

To diagnose quickly of the taro epidemic "Leaf blight" (pathogen *Phytophthora colocasiae*), which has become a problem in Miyazaki Prefecture, we have developed a diagnostic method based on the improved DIBA(dot immuno-binding assay) method using commercially available diagnostic reagent (DAS-ELISA kit manufactured by Agdia).

1. The juice of taro latex diseased leaves and healthy leaf juice ground with TBST were adhered to a membrane sheet, and then the conjugate solution of the DAS-ELISA kit, which was diluted 200-fold with TBSTPB for 30 minutes, was reacted.
2. The detection limit of the fungi "*P. colocasiae*" by the modified DIBA method was 100 times (w/v) that of the diseased tissue homogenate, and 1,000 times that of the DAS-ELISA method and the immunostrip method.
3. Assuming that the modified DIBA method reuses of the antibody solution 10 times and apply 5 cases at the same time, the reagent cost per case is estimated about 34 yen, which is less than 1/30 of the immunostrip method.
4. The modified DIBA method was able to detect the fungi from blight lesion, which is difficult to isolate, and was considered effective for on-site diagnosis.

Keyword : Phytophthora, diagnosis, the modified DIBA method, DAS-ELISA method, RIPA method

画像解析ソフト ImageJ を活用した DIBA 法の 結果評価および改良 DIBA 法の検出時間短縮

楢間義幸¹⁾

要 約

改良 DIBA 法の結果判定を数値化し、抗体処理時間及び基質・発色処理時間の短縮化について検討した。各処理時間を 5 分間隔で段階的に変化させて、得られたメンブレンシートの発色スポットをイメージスキャナ及び画像解析ソフト ImageJ を用いて解析した。キュウリ黄化えそウイルス (MYSV) では、抗体の処理 20 分間までは時間に応じて発色が徐々に強くなる傾向が見られた。一方、サトイモ疫病菌 (*Phytophthora colocasiae*) では、処理 5 分間で強い発色が見られ、その後の顕著な変化は見られなかった。また、両病原体の基質発色剤の反応は露光条件下、処理時間 5 分で強い発色が認められた。これらの結果から、両病害とも抗体処理時間 10 分間、基質・発色処理時間 5 分間で十分に判定することが可能と考えられる。

【キーワード：DIBA 法, ImageJ, 診断, MYSV, サトイモ疫病菌】

緒 言

DIBA (Dot Immuno-Binding Assay) 法は、ニトロセルロースメンブレン (以下、NCM シート) 上のサンプル汁液から抗原抗体反応により標的タンパク質を検出する方法で、DAS-ELISA 法と同等の感度を有しながら特殊な機材を使用せず、簡単な手順でかつ迅速に実施できる診断法である²⁾。筆者らはウイルス病やサトイモ疫病の診断を農業改良普及センター等で実施することを目的に改良 DIBA 法を開発した^{6) 7) 8)}。しかしながら、サンプル調整に約 10 分、抗体反応に 30 分、基質・発色反応に 15 分の処理時間がかかるため、判定までに約 1 時間を要しており、さらなる短縮化が求められている。

ところで、DIBA 法も DAS-ELISA 法も、標的タンパク質 (ウイルスあるいは病原菌) の有無 (多寡) を、結合させた酵素 (アルカリフォスファターゼ) の反応量で評価する手法であるが、DAS-ELISA 法が専用のプレートリーダーを用いて基質の反応量を数値として評価するのに対して、DIBA 法では NCM シート上に沈着する色素の呈色反応を目視で評価するため定量できない点が異なっている。このため、DAS-ELISA 法では一定の基準 (例：対照値の 2 倍以上を陽性と評価) で判定できる客観性があるが、DIBA 法では陰性対照 (健全植物) でやや強い発色があった場合には判定に苦慮することが考えられる。

そこで、プリンター複合機のスキャナー機能とフリーの画像解析ソフトを利用して、DIBA 法の呈色反応と抗体処理時間及び基質・発色処理

時間の関係などについて検討し、検査時間短縮のための知見を得たので報告する。

I 試験方法

1. 材料及び方法

試験は、種類の異なる 2 つの病原体、ウイルスについてキュウリ黄化えそウイルス (MYSV: *melon yellow spotted wilt virus*)、糸状菌についてサトイモ疫病菌 (*Phytophthora colocasiae*) を対象に行い、それぞれ抗体液の処理時間及び基質・発色剤の処理時間を変えて発色程度がどのように変化するかを調査した。

1) MYSV

抗体液は、(一社) 日本植物防疫協会製の MYSV 抗体 (コーティング液) 500 倍及び AP 標識抗ウサギ抗体 (ナカライテスク) 3,000 倍を混合して調整した。抗原として、キュウリ黄化えそ病罹病葉及び健全葉から 0.2 g の葉片を採取し、TBST 5 ml で摩砕してサンプル原液 (抗原濃度：25 倍) とした。サンプル原液 (25 倍)、4 倍希釈液 (100 倍) 及び 16 倍希釈液 (400 倍) をそれぞれ 2 μ L ずつ 3 カ所スポットした NCM シートを複数枚作成した。

抗体液の処理時間は、5 分、10 分、15 分、20 分及び 25 分間とし、それぞれ 3 シートずつ行った。処理後は TBST 中で 3 回濯いだのち、AP バッファーで 1 分間処理、余分な液を濾紙で拭き取ってから基質・発色剤を添加して暗黒下にて 15 分間静置した。その後、反応停止液に浸し

1) 現 退職

て反応を止め、水洗後、風乾したものをイメージスキャナで読み取った。

基質・発色剤の処理時間については、抗体液と 30 分間反応させた複数枚の NCM シートを用いて一斉に基質・発色剤処理を開始し、1 分、2 分、5 分、10 分及び 15 分経過後にそれぞれ 3 枚のシートを取り出して反応停止させたのち、風乾後、イメージスキャナで読み取った。

2) サトイモ 疫病菌

Agdia 社製の *Phytophthora Reagent Set* (DAS ELISA) のコンジュゲート液を、TBSTPB で 200 倍に希釈して抗体液とした。抗原としてサトイモ疫病の罹病葉及び健全葉から、0.2 g の葉片を採取し、TBST 5 ml で摩砕してサンプル原液（抗原濃度：25 倍）とした。サンプル原液、10 倍希釈液（250 倍）及び 100 倍希釈液（2,500 倍）をそれぞれスポットした NCM シートを複数枚作成し、以降は MYSV の場合と同様の手順で抗体液の処理時間の基質及び発色剤の処理時間の検討を行った。

3) 遮光条件の検討

DIBA 法の標準プロトコル²⁾では、基質・発色剤添加後は、遮光条件下で静置することとされている。しかしながら、現場で実施する際に適当な被覆資材がない場合があることから、明条件及び暗黒条件の違いが基質・発色剤の反応にどの程度影響するか明らかにするために試験を実施した。すなわち、所定の方法で抗体液処理を行った NCM シートを用いて、慣行（暗黒条件）及び遮光なし条件（明条件）で基質・発色処理（15 分）を行い、発色程度の違いを評価した。

NCM シート上の発色スポットの定量は以下の手順で行った。EPSON 社製インクジェット複合プリンター (PM-A890) を用いて、NCM シートをスキャン (24 bit color, 300 dpi) し、得られた画像データを Tiff image として保存した。画像解析は、フリーソフト ImageJ ver. 1.50i (オープンソース NIH) を用いて、8 bit 画像に変換したのち、反転、スポットエリアの画素総密度 (Integrated Density: ID) を計測した^{1) 5) 10)}。

II 結 果

MYSV の場合、いずれの抗原濃度においても処理時間に比例して ID の増加が認められたが、400 倍希釈の場合、目視で陽性と判断するには 20 分間の処理が必要で、その際の ID は 10,000 程度であった (図 1, 2)。

一方、サトイモ疫病菌の場合、抗原濃度 25 倍、及び 250 倍希釈では抗体処理時間が 5 分でも十分に陽性と判断できる発色であったが、2,500 倍希釈では 10 分以上の抗体液処理時間が必要と考えられた (図 3, 4)。

サトイモ疫病菌検出時における基質・発色剤の処理時間と ID の関係では、処理時間の増大に応じて徐々に ID が強まる傾向であったが、5 分経過後の ID は最終判定時（15 分後）の 50 % 以上に達し、十分に判定可能と考えられた (図 5)。MYSV でも同様の傾向であった。

MYSV 検出時における基質・発色剤処理時の遮光の有無は、ID には影響が見られなかった (図 6)。サトイモ疫病菌でも同様の傾向であった。

III 考 察

DIBA 法は、DAS-ELISA 法に比較して極めて短時間で、また特別な機器類も必要とせず簡単な作業でできることから、これまで多くの植物病害の診断に適用^{3) 4) 9)}されており、本県でもキュウリ黄化えそ病の現場診断に有効に活用されている。

しかしながら、抗体液や基質・発色剤の各処理時間等については、いずれも日比²⁾による当初のプロトコルに則っており、最適な条件等については検証されていない。そこで、DIBA 法の呈色反応を、イメージスキャナによる読み取りとフリーソフトによる画像解析によって数値化することで、各処理時間等が結果に及ぼす影響を評価し、処理（検定）時間短縮について明らかにした。

その結果、MYSV 及び疫病菌のいずれも、DIBA 法の呈色反応の濃淡を定量することが可能であった。抗体液処理時間の検討では MYSV の場合、抗体液との反応時間に比例して発色強度が強くなる傾向が見られたが、サトイモ疫病菌の場合は 2,500 倍希釈で同様の傾向が見られたものの、25 倍、250 倍希釈では明瞭な関係は見られなかった。MYSV の抗原決定基は極微小なウイルス粒子の外被タンパク質であるのに対し、サトイモ疫病菌の場合、抗原決定基は菌体細胞表面に多数存在し、その潜在的な抗原濃度が高かったためと考えられる。実際に検定するにあたっては、サンプル磨砕時の希釈倍率によって反応経過がやや異なる可能性があるが、MYSV 及びサトイモ疫病菌いずれの場合も抗体液処理時間は約 10 分程度で十分に判定できると思われる。

基質・発色剤の処理についても、MYSV 及びサトイモ疫病菌いずれも処理時間の経過とともに発色強度の増加が認められたが、5 分後には陽

性の診断は可能と考えられた。また、遮光処理も不要と考えられた。

DIBA 法は、特別な器具等を必要とせず、簡単な操作でかつ比較的短時間に、ウイルス病や疫病を診断できる、現場向けの診断ツールである。公設試や大学などの研究機関では、再現性のある科学的なデータを取り、先行研究等と比較検証するために、文献等に則った手順で作業を行

う必要がある。しかしながら、現場で診断を行うにあたっては、正確な時間や手順を担保することは困難である。本試験では、抗体液処理や基質・発色剤の処理時間等が、呈色反応に及ぼす影響について検討したが、抗体液処理時間は10分、基質・発色剤の処理時間は5分、概ね15分程度で判定できると考えられ、検定時間の短縮化が可能である。

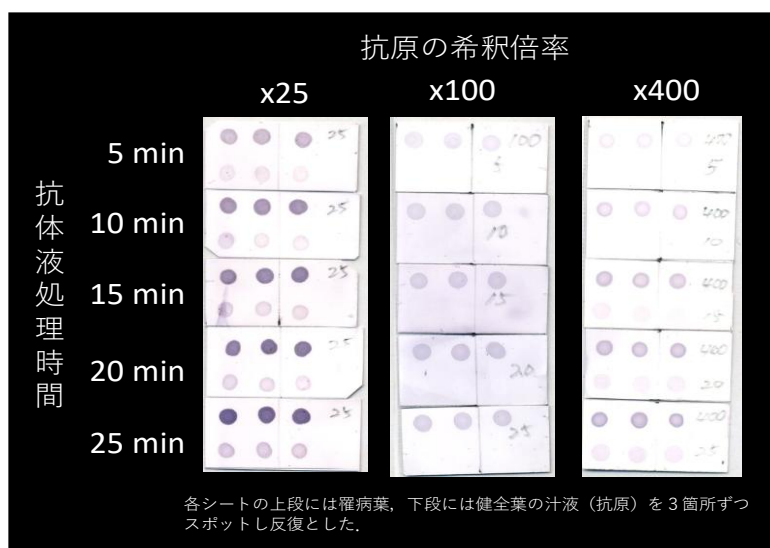


図 1 改良 DIBA 法の呈色状況 (MYSV)

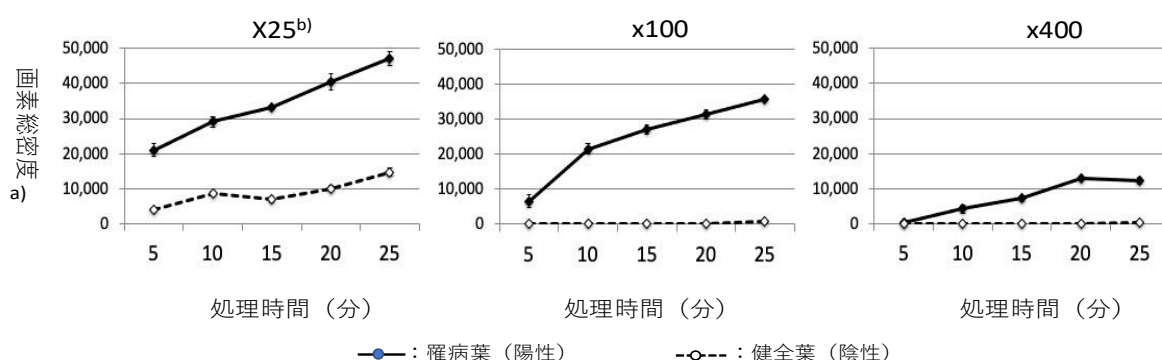


図 2 MYSV の各抗原希釈倍率における抗体処理時間と画素総密度

- a) 図 1 に示す各シートのスプレットの呈色状況を数値化したもの。
 b) グラフは左から抗原の希釈倍率 25 倍, 100 倍, 400 倍を示す。
 c) エラーバーは標準偏差を示す。

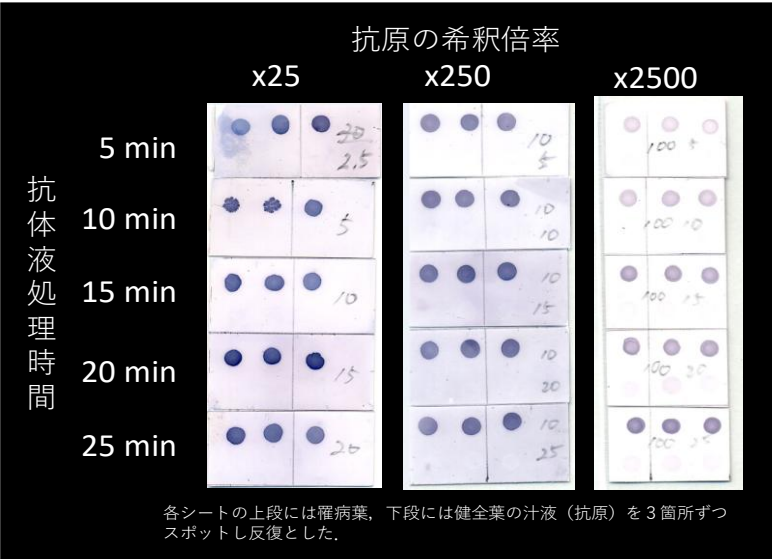


図 3 改良 DIBA 法の呈色状況（サトイモ疫病）

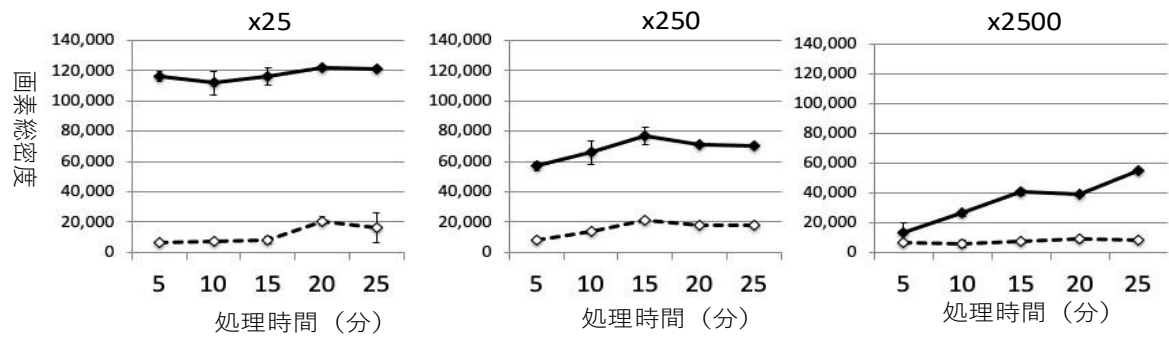


図 3 に示す濃紫色を数値化．グラフは左から抗原の希釈倍率25倍，250倍及び2500倍．

●—●：罹病葉（陽性） -○-○-：健全葉（陰性） エラーバーは標準偏差

図 4 サトイモ疫病菌の各抗原希釈倍率における抗体液処理時間と画素総密度

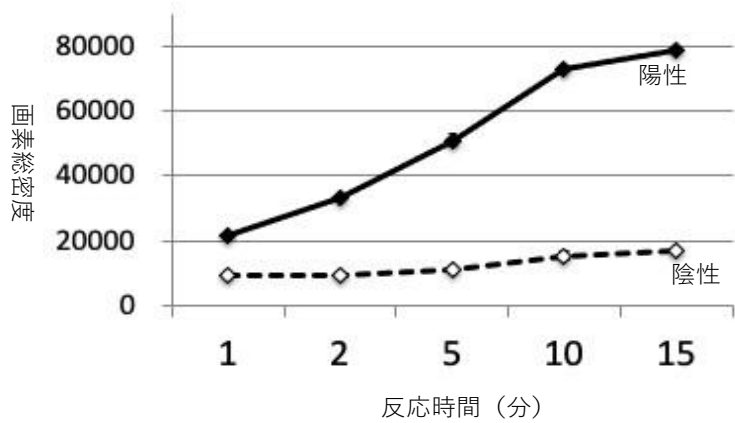


図 5 サトイモ疫病菌検出における基質・発色剤処理時間と画素総密度

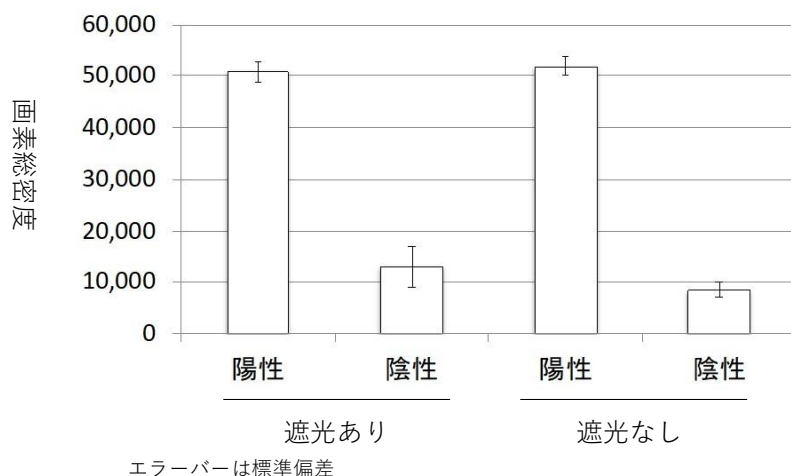


図 6 MYSV における基質・発色剤処理時の被覆の有無と画素総密度

IV 摘 要

改良 DIBA 法の反応シートをイメージスキャナおよび画像解析ソフト ImageJ を用いて解析・数値化し、抗体処理時間および基質・発色処理時間の短縮化について検討した。

1. キュウリ黄化えそウイルス (MYSV) では抗体液処理時間に応じて発色が徐々に強くなる傾向が見られたが、抗原の希釈倍率が 100 倍程度あれば 10 分程度で判定が可能であった。

2. サトイモ疫病菌 (*Phytophthora colocasiae*) では抗体液処理後 5 分間で強い発色が見られ、その後の顕著な変化は見られなかった。

3. 両病原体の基質発色剤の反応は露光条件下、処理時間 5 分でも強い発色が認められた。

4. 両病害とも抗体液処理時間 10 分間、基質・発色処理時間 5 分間で十分に判定することが可能と考えられる。

謝 辞

本研究を実施するにあたり協力いただいた生物環境部および病害虫防除・肥料検査課の연구원, 会計年度任用職員の方々に深く感謝の意を表す。

引用文献

1) Gilles Carpentier Research Web Site (<http://image.bio.methods.free.fr/ij/ijmacro/dotblot/text/dotblotdoc.html>) Dot Blot

Analyzer for ImageJ

2) 日比忠明 (1984) : DIBA 法による植物ウイルスの検出法. 植物防疫. 38(8). 380-384

3) 石井貴明ら (2003) : 福岡県のパプリカ (*Capsicum annuum*) におけるトマト黄化えそウイルス (*Tomato spotted wilt virus*: TSWV) の発生および Dot Immuno-Binding Assay (DIBA) 法による検出. 福岡農総試研報. 22. 56-60

4) 小宮友紀子ら (2002) : Dot Immuno-Binding Assay および Tissue Printing Immunoassay によるスイカ果実汚斑細菌病の血清学的診断法. 日植病報. 68. 291-296

5) 小島清嗣ら (2006) : 画像解析テキスト 改訂 3 版 (羊土社)

6) 櫛間義幸ら (2014) : 改良 DIBA (Dot Immuno-binding Assay) 法を用いたキュウリ黄化えそ病診断キット. 日植病報. 80(4). 336(講要)

7) 櫛間義幸 (2018) : 改良 DIBA 法における抗体処理時間及び基質・発色反応時間の短縮. 日植病報. 84(1). 70(講要)

8) 櫛間義幸 (2017) : 改良 DIBA (Dot Immuno-Binding Assay) 法を用いたキュウリウイルス病の簡便かつ低コスト診断法. 九病虫研会報. 63. 1-7

9) 忠英一ら (1992) : DIBA 法によるニンニクモザイクウイルス検定の現場への適用. 東北農業研究. 45. 297-298

10) 山本修司 (2014) : ImageJ 日本語版ガイドブック (入門編) (WOODY)

Evaluation of results of DIBA method using image analysis software ImageJ and reduction of inspection time for the improved DIBA method

Yoshiyuki KUSHIMA

Summary

The reaction sheet of the improved DIBA method was analyzed and quantified using an image scanner and image analysis software ImageJ, and shortening of the time for antibody treatment and substrate/color development treatment was examined.

1. In the case of cucumber spotted wilt disease (MYSV), the color development tended to gradually become stronger depending on the antibody solution treatment time. When the antigen dilution rate was about 100 times, it was possible to make a judgment in about 10 minutes.
2. In taro leaf blight (*Phytophthora colocasiae*), strong color development was observed after 5 minutes of treatment with the antibody solution, and no significant change was observed thereafter.
3. The reaction of the substrate coloring agent showed strong color development even under exposure conditions and for 5 minutes.
4. It is considered that both diseases can be sufficiently determined with antibody solution treatment time of 10 minutes and substrate/color development treatment time of 5 minutes.

Keyword : DIBA, ImageJ, diagnosis, MYSV, *Phytophthora colocasiae*

編集委員

委員長 木佐貫 守

委員 中原 亜理江 松浦 明 佐藤 邦彦 中村 正和

編集事務局 金丸 俊徳 日高 正智 古川 晴菜

宮崎県総合農業試験場研究報告 第55号

令和7年9月発行

編集及び発行 宮崎県総合農業試験場
宮崎県宮崎市佐土原町大字下那珂5805
TEL : 0985-73-2121
FAX : 0985-73-2127

ホームページ <http://www.pref.miyazaki.lg.jp/sogonogyoshikenjo/>