

# マツノザイセンチュウの遺伝子情報を利用した

## 簡易なマツ材線虫病診断法

○森林総合研究所東北支所・相川拓也  
森林総合研究所・菊地泰生

### はじめに

マツ材線虫病はアカマツやクロマツなどのマツ類を劇的に枯死させる日本最大の森林病害である。その病原体はマツノザイセンチュウと呼ばれる体長 1mm ほどの生物（線虫の一種）で、マツノマダラカミキリという媒介昆虫を利用して被害木から健全木へ次々と感染する。1905 年に長崎で初めてマツの集団枯損が確認されて以降、マツ材線虫病の被害は東進北上し、現在、残された未被害地域は北海道と青森県のみとなっている。また、被害量（材積）を見ると、日本全体の約 1/4 が東北に集中していることから、被害域・被害量どちらの面から見ても、東北地方はマツ材線虫病の最先端地域であると言える。

マツ材線虫病における防除の基本は、①的確かつ迅速に感染木を発見すること、そして②その被害木を確実に駆除することの 2 点である。とくに、未被害地でマツノザイセンチュウ感染木が新たに発見された場合、さらなる被害拡大を防ぐためには早急な防除対策を講じる必要がある。したがって、被害木を見落とすことなく確実に発見することが防除の上で最も重要となる。マツ材線虫病の診断では、枯れたマツからマツノザイセンチュウを検出しなくてはならない。一般的な検出法は、枯死木から材片を採集し、材片の中にいる線虫類をベールマン法により分離した後、顕微鏡下でマツノザイセンチュウの存在を確認するという方法である。この方法は、日本だけでなく中国、韓国、ポルトガル、米国などマツノザイセンチュウが生息している他の国々でも普遍的に用いられている検出法である。しかし、この検出法にはいくつかの問題点がある。たとえば、実体顕微鏡・光学顕微鏡など的高額な機器が必要であること、また線虫の形態に関する専門的な知識が不可欠であることなどが挙げられる。さらに材片中の線虫を分離するのに時間がかかり（2-3 日間）、マツノザイセンチュウの成虫でしか診断できない（幼虫や卵では同定できない）などの制約もある。これらの理由から、これまでマツ材線虫病の診断は、顕微鏡など的高額検査機器を備え、かつ線虫の専門家が所属する一部の研究機関でしか行えなかった。

もし、本病の診断がより現場に近い組織（例えば、県の林業関係機関、森林管理署、また森林組合など）で行えるようになれば、現在よりもよりスムーズに防除対策を展開できると考えられる。そのためには、現在よりも安価でかつ誰でも容易に操作できる診断法が必要である。そこで我々は、低コストでかつ簡便にマツ材片からマツノザイセンチュウの遺伝子を検出するという新しい診断法の開発に取り組んだ。

## 研究方法

本診断法は、次の3つのステップを経て完結する。すなわち、①マツ材片からの DNA の抽出、②マツノザイセンチュウの遺伝子の検出、そして③目視によるマツノザイセンチュウの遺伝子の有無（陰性・陽性）の確認の3つである。下記に詳しく解説する。

### 1. マツ材片からの DNA の抽出

枯死木から採集した材片の一部を、DNA 抽出液の入ったチューブに入れ、約 55℃の温度条件下で 20 分保温し、次いで 94℃以上で 10 分保温する。この操作により、枯死木材片内に存在する生物の DNA（マツノザイセンチュウだけでなく、他の線虫、バクテリア、カビなど様々な生物由来の DNA）が抽出液中に溶け出す。



### 2. マツノザイセンチュウの遺伝子の検出

1 で得た DNA 抽出液の一部を、マツノザイセンチュウの遺伝子検出液が入ったチューブに加え、約 63℃の温度条件下で 60 分保温する。この遺伝子検出液は、マツノザイセンチュウの遺伝子に特異的に反応するよう調整された液体である。この操作により、様々な生物由来の DNA の中から、マツノザイセンチュウの遺伝子だけを検出する。



### 3. 目視によるマツノザイセンチュウの遺伝子の有無の確認

2 の処理を終えた反応液の色で診断する。すなわち、液体が蛍光色を発していれば陽性（抽出された DNA の中にマツノザイセンチュウの遺伝子が存在した）、液体の色が反応前と全く変わらず無色であれば陰性（抽出された DNA の中にマツノザイセンチュウの遺伝子は存在しなかった）を意味する。

## 結果

本診断法では、国内外の産地を問わずマツノザイセンチュウであれば確実に陽性反応を示すこと、そして他の線虫では全く反応が起こらないことが確認された。また、人為的にマツノザイセンチュウを接種し枯死させたマツと、他の要因で枯死したマツを用いて比較した実験では、マツノザイセンチュウ接種木だけで陽性反応を示した。さらに、これと同様にマツノザイセンチュウを接種したが枯死しなかったマツについても調査した。このマツ材片をベールマン法で調べたところ、マツノザイセンチュウは全く検出されなかったが、本診断法では検出率は低下するものの、検体数を増やすことで検出が可能であった。

## 考察

本診断法の特徴として次の点が挙げられる。

### 1. 90分で診断できる

既知の方法では診断を下すまでに 2-3 日を要していたが、本診断法では DNA の抽出に 30 分、マツノザイセンチュウの遺伝子の増幅に 60 分、合計約 90 分で診断が完了する。

## 2. 反応液の色で診断できる

液体の色で陽性・陰性の判断ができるので、誰でも診断が可能である。これまでのように線虫の形態に精通している必要がない。

## 3. 高価な装置を必要としない

既知の診断法で不可欠であった顕微鏡等の高額機器は不要である。温度を一定に保つ機器（恒温器）が必要であるが、エアインキュベーター、ブロックインキュベーター、またウォーターバスなど様々な種類があり、顕微鏡と比較してもかなり安価に購入することができる。手に入らない場合は、水を張った鍋に診断用チューブを浮かせ、それをコンロ上に置いて温度を測りながら保温する方法でも問題なく診断することができる。

## 4. 材片中に生きたマツノザイセンチュウがいなくても検出できる

既知のベールマン法では、材片中の生きた線虫しか分離できなかった。しかも、成虫の形態でしか診断できないため、幼虫しか分離されない場合はたとえそれがマツノザイセンチュウであったとしても他の線虫と区別がつかず、診断することができなかった。しかし、本診断法で利用する遺伝子情報は線虫の発育段階によって変化しないことから（成虫でも幼虫でも同じ）、どの発育段階であってもマツノザイセンチュウであれば陽性反応を示す。また、材片の中にマツノザイセンチュウの遺伝子が残されていれば検出できるので、生きたマツノザイセンチュウが存在しない場合でも、例えば死骸や卵しか残っていないような場合でも検出が可能である。

このように、本診断法は診断にかかるコスト、時間、そして操作性などの面から見ても従来の方法より優れていると考えられる。この診断技術を用いれば、マツ林を管理する各組織（現場）での診断が可能になることから、今後マツ材線虫病防除技術における新たなツールとして活用が期待される。