カンキツウイルスの酵素結合抗体法（ELISA）による大量検定法の開発

草野　成夫*・桒原　実[1)]・朝隈　英昭

大量のサンプルのウイルス検査に対応できる簡易かつ効率的な酵素結合抗体法（EILSA）による検定法を開発した。まず，磨砕後のステップを従来の方法である5,000r.p.m.，15分間の遠心分離操作から卓上小型遠心機を利用し，かつ30秒の短時間とすることで，従来法の約半分の操作時間とすることが出来た。また，ASGV と SDV のコーティング抗体および酵素標識抗体を混合使用することで，２ウイルスを同時に検出することが可能となった。この方法は，保毒率が低ければ低いほど効果が高く，例えば，検定サンプル中に１～10％の保毒率があると仮定すると，慣行法の49～40％の検定回数の減少となった。さらに，２ウイルス同時検定法使用時に６サンプルを同時に検定する方法を開発した。この方法は，必要な検定感度を維持しながら，20 μℓ 分取用の８連のピペッターとそのピペッターに対応した96穴のサンプルラックの利用により，効率的に検定が出来るようになった。

以上のように，この ELISA の改良を行うことで全ステップの労力は半分以下となり，抗体，マイクロプレート等の試薬・機材の使用を減らすことで，人件費も含めたトータルコストは大幅に低下すると考えられた。

［キーワード：カンキツウイルス，ELISA，大量検定，簡易化，コスト低減］

Development of Efficient Enzyme-Linked Immunosorbent Assay（ELISA）for Mass Citrus Test Samples on the Diagnosis of Citrus Viruses. KUSANO Nario, Minoru KUWAHARA and Hideaki ASAKUMA（Fukuoka agricultural reseach center, Fukuoka 818-8549 Japan）*Bull. Fukuoka Agric. Res. Cent.* 28：100-105（2009）

Enzyme-Linked lmmunosorbent Assay（ELISA）is commonly used in a laboratory diagnosis to detect citrus viruses, such as Satsuma dwarf virus（SDV）and Apple stem grooving virus（ASGV）. To simplify ELISA protocol for practical diagnosis, first, the homogenates poured directly to sample tubes from mortars and a desk small centrifuge（30 second use for 1 sample）were used instead of a cooling centrifuge（5,000r.p.m., 15 minuite use for 1 sample）for the supernatants. Second, SDV and ASGV coating and conjugate antibodies on the same microplate were used for 2 viruses simultaneously（S-Method）. The number of ELISA test times decreased 49 to 40 % under the conditoin of 1 to 10% infective rate using this method. Furthermore, 6 sample poured on the microplate by 8 channel pipetter and 96 sample tube rack at the same time were tested on S-Method. No decrease in the sensitivity was observed practically on the upper methods. By the modifications, ELISA test was completed about half time shorter than when the conventional protocol was adopted and the total cost including personnel expenses largely decreased because of reducing the use of microplates and chemical reagents like antibodies.

［Keywords : citrus viruses, ELISA, mass test, simplification, cost reduction］

緒　　言

我が国の果樹産地では，輸入果実の増加や需要の減退により国産果実の価格が低迷していることから優良な品種への転換が積極的に進められている。しかしながら，品種転換を急ぐあまり穂木のウイルス汚染の有無を確認しないまま高接ぎや苗木の増殖が図られ，ウイルス病の被害が顕在化している。果樹は永年性作物であり，ウイルスに一旦感染すると果実の収量や品質，樹勢の低下など長期に亘り大きな影響を受ける（清水ら 2004）。

また，果樹苗木の生産は，一般に接ぎ木による栄養繁殖で行われるため，保毒した苗木を栽植することは初期生育の悪化と減収をもたらし，場合によっては早期枯死を招くことから，高品質果実生産を阻害する要因となっている。福岡県はカキやカンキツ等，果樹の主要な生産県であるとともに，果樹苗木の一大生産地でもあり，カンキツ苗木については，全国のカンキツ苗木（1，2年生苗木）の生産量，約600万本の内，その約７割を生産しており，無毒の苗木生産を行うことは福岡県における重要課題である。

福岡県では，果樹のウイルス検出に最適な方法である酵素結合抗体法（Enzyme-Linked lmmunosorbent Assay：以下 ELISA，Clark and Adams 1977，Barjoseph et. al. 1979，久原 1980）を利用し，主要なカンキツウイルスである温州萎縮ウイルス（SDV）を昭和58年から，リンゴステムグルービングウイルス（ASGV：旧カンキツタターリーフウイルス，Wallence and Drake 1962，川合・西尾 1990，島津ら 1990，川合・塚本 1992，Yoshikawa et. al. 1993，Yoshikawa et. al. 1996）については平成４年から検査を実施しており，検査点数は年間約2,400から10,000となっている。現在までの単年度のウイルス保毒率は SDV で0.2％～14.2％，ASGV で0.8％～22.9％で推移しており，最近10年間では SDV で0.2％～6.4％，平均2.3％，ASGV で0.8％～3.9％，平均2.1％と検査事業の継続による効果で，保毒率は低下の傾向にある。

これまで，SDV，ASGV の ELISA による検定法に

＊連絡責任者
（果樹苗木分場：nkusano@farc.pref.fukuoka.jp）
１）現南筑後地域農業改良普及センター

ついては，抗体固相化（コーティング）済みマイクロプレートの超低温による長期保存法やサンプルと標識抗体の同時分注法等の各種の改良が行われている（岩崎ら 1987，平島ら1988，平島・野口1989，草野・下村1995，草野ら 2006）。今回，10％未満のウイルス保毒率を前提に，大量のサンプルのウイルス検査に対応できる簡易かつ効率的な EILSA による検定法を開発したので報告する。

試験方法

1　供試材料および抗血清

無加温網室ハウスに保存中の ASGV（名称：BD44）保毒のウンシュウミカン「興津早生」（農林水産省門司植物防疫所より導入）および SDV 保毒の「林温州」（（独）果樹研カンキツ研究口之津拠点，旧農林水産省果樹試口之津支場より分譲）の新梢を随時に採取し，供試材料として利用した。また，ネガティブコントロールとしてのサンプルは，無加温網室ハウスに保存中のウイルスフリー「土佐文旦」の新梢を利用した。

使用する抗体については，日本植物防疫協会研究所（日植防）より購入した ELISA 用（コーティング用 IgG とアルカリフォスファターゼ（ALP）標識 IgG のセット）抗 ASGV 抗体および抗 SDV 抗体を用いた。なお，抗 ASGV 抗体のコーティング用 IgG はポリクローナル抗体（Pab），ALP 標識 IgG はモノクローナル抗体（Mab）で，抗 SDV 抗体はコーティング用 IgG，ALP 標識 IgG 共に Pab であり，指定濃度は共に500倍であった。

2　検定方法

ELISA には，サーモフィッシャーサイエンティフィック社（東京）のヌンク96穴マイクロプレート（マキシソープ）を使用した。マイクロプレートリーダー（ラボシステムズ，マルチスキャン MS）により，１または２時間後に吸光度（A　405nm）を測定した。工程は，第１図のとおりである。なお，各ステップの間には，PBS－T（0.15M　NaCl 加用0.02M・pH7.2 リン酸緩衝液）による３回の洗浄を行なった。

今回の試験項目は以下の通りである。

試験１：磨砕サンプル調整法

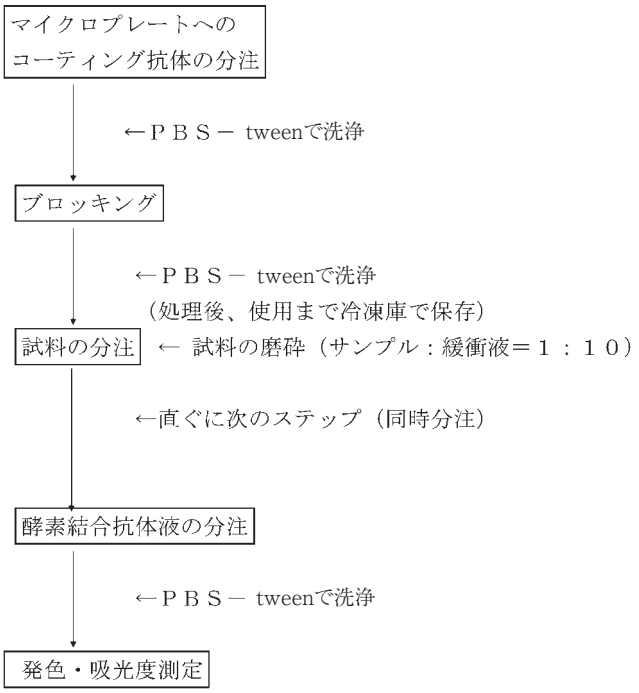
採取した新梢を10倍容の磨砕用バッファー中で乳鉢を用いて磨砕後，そのままサンプルチューブ（1mℓ）に入れて ELISA に利用する区（磨砕粗汁液区），サンプルチューブに入れた後，卓上小型遠心機（日本ミリポア社，チビタン－R）で30秒遠心分離し上清を利用する区（簡易遠心区），一度遠心管（12mℓ）に入れて冷却遠心機で5000r.p.m.，15分遠心分離後に上清をサンプルチューブに入れて使用する区（慣行区）と３種類の調整法を検討した。また，サンプルを磨砕する緩衝液としては，0.1％チオグリコール酸加用0.1M クエン酸緩衝液を使用した。

試験２：リンゴステムグルービングウイルス（ASGV）および温州萎縮ウイルス（SDV）の同時検定法

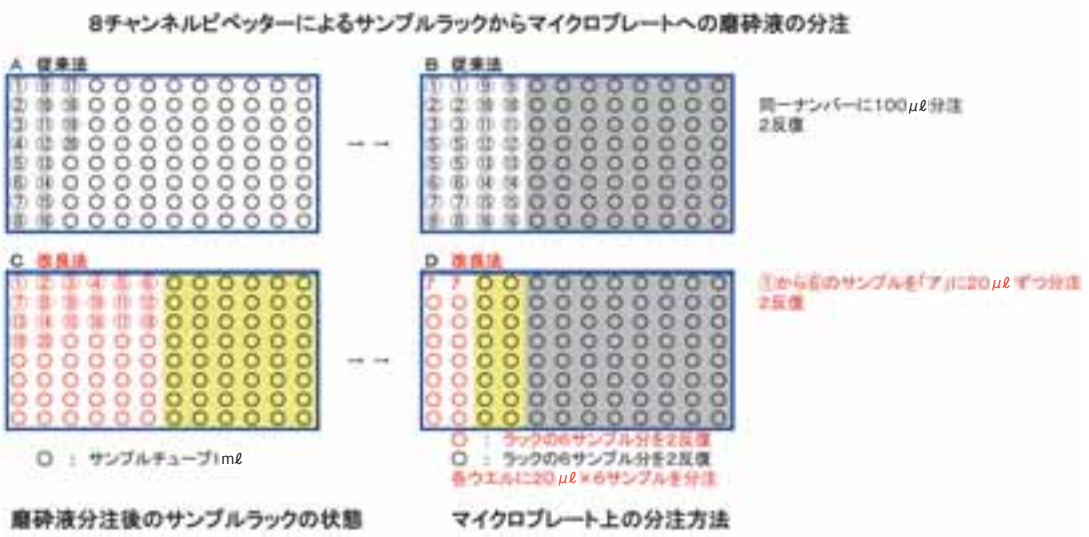
ASGV および SDV のコーティング用抗体を200～600倍の濃度にカーボネイト緩衝液（0.05M，pH9.6）で同時に混合希釈し，マイクロプレートに100μℓ／ウエルで分注後4℃，一夜静置してコーティング済みマイクロプレートを作製した。その後，磨砕済みサンプルを分注し，酵素結合抗体液（ALP 標識抗体）も ASGV および SDV を PBS で400倍に同時に混合希釈し，100μℓ／ウエルで分注した。従来の ASGV，SDV 単独のウイルス検定法を対照として比較した。なお，磨砕サンプルの調整は，慣行区の方法を用いた。

試験３：多検体の同時検定法

多検体を検定するための方法として，試験１の慣行区の方法で調整した ASGV または SDV の単独磨砕液とウイルスフリー磨砕液の割合を６：０から０：６の７段階（20μℓ／１分注，トータル120μℓ／ウエル）に設定するとともに（第２表），ASGV と SDV の混合磨砕液についても設定を行った（第３表，一部省略）。ASGV および SDV 抗体を混合して作製したコーティング済みプレートに上記の磨砕液を分注し，その後，ASGV および SDV 酵素標識抗体混合液120μℓ／ウエルを同時分注した。なお，実用化場面では，サンプルチューブに分注後に ELISA を行う際，96穴サンプルラックから20μℓ／サンプルを８連ピペッターを用いてコーティング済みマイクロプレートへ分注する方法を従来法と比較した（第２図）。



第１図　酵素結合抗体法（ELISA）のステップ



第２図　サンプル磨砕後のサンプルラックへの保存方法とマイクロプレートへの分注法

結果および考察

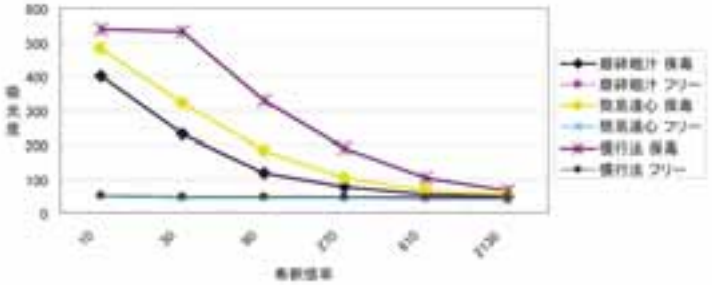
１　磨砕サンプル調整法

３種類の磨砕サンプル調整法による検定結果は，第3，4図のようになった。磨砕粗汁液区では，ASGV および SDV 共に乳鉢で磨砕後のサンプル液を直ちに ELISA に利用するため，分注操作時のピペッターに付けるチップ先端に大型の植物破砕物が詰まる原因となった。また，磨砕粗汁液区は，SDV ではサンプル希釈倍率10～30倍で，また，ASGV ではサンプル希釈倍率10～90倍で簡易遠心区，慣行区と比較して吸光度が低下することが明らかとなった。この原因としては，植物組織の磨砕残渣がマイクロプレートに分注されるため，ウイルスのコーティング抗体への吸着反応を阻害していると考えられた。チビタン－R 利用の簡易遠心区では，慣行区と比較して吸光度は低下する傾向にあるが，実際の ELISA 検定で行うサンプル希釈倍率10倍で比較すると，磨砕のみの磨砕粗汁液区よりも優れていた。これは植物組織の磨砕残渣の大部分が遠心分離により除去されたことによると考えられた。磨砕後の作業時間としては，通常行う遠心分離処理（5,000r.p.m.,15分間）からチビタン－R の30秒処理を行う簡易遠心区へ変更することで，慣行区の磨砕液の乳鉢から遠心管へ，また，遠心管からサンプルチューブへのピペッティング操作もなくなることから実働時間は約１／２と少なくなった。

以上のことから，簡易遠心区では，サンプルの磨砕液調整に必要な時間短縮および作業の省略化に極めて有効であった。

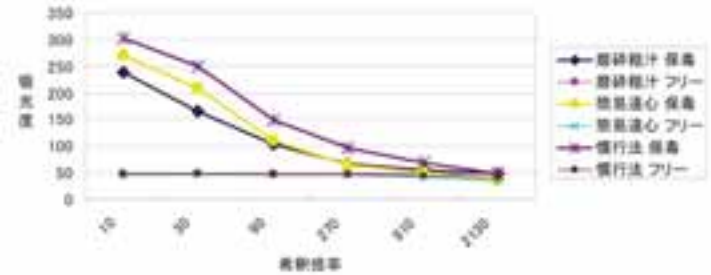
２　リンゴステムグルービングウイルス（ASGV）および温州萎縮ウイルス（SDV）の同時検定法

ASGV および SDV のコーティング抗体を同時に混合使用し，ASGV および SDV の酵素標識抗体も同時に混合使用をした場合の検出程度を検討した結果を第１表に示した。



第３図　磨砕サンプル調整法とリンゴステムグルービングウイルス（ASGV）の検出程度

1)吸光度の値は1,000を乗した値
2)ASGV 抗体はコーティング抗体，ALP 標識抗体共に500倍
3)発色は基質投入２時間後



第４図　磨砕サンプル調整法と温州萎縮ウイルス（SDV）の検出程度

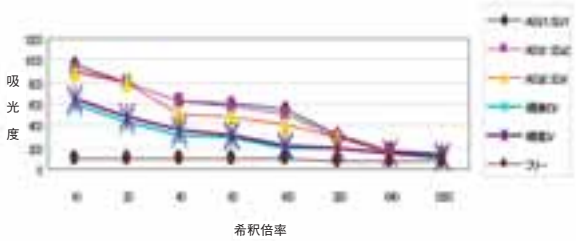
1)吸光度の値は1,000を乗した値
2)SDV 抗体はコーティング抗体，ALP 標識抗体共に500倍
3)発色は基質投入２時間後

ASGV および SDV の固相抗体濃度を200倍から600倍にして，磨砕サンプルでの ASGV と SDV の割合を１：１とした場合，ASGV の抗体濃度は600倍，SDV の抗体濃度は200倍が吸光度倍率からやや優れていると考えられた。同様に ASGV と SDV の磨砕サンプルでの割合を１：2，2：１にした場合も全ての処理区で吸光度倍率4.5倍以上あった。また，サンプルが ASGV または SDV を単独保毒していた場合，両ウイルス抗体（ASGV 抗体400倍 SDV 抗体400倍）を利用した検定法と比較して，単独ウイルスの ASGV では吸光度倍率が５倍から3.5倍程度に低下する傾向にあった。SDV については，単独のウイルスの場合の4.3倍から大きな低下は認められなかった。通常，陽性とする基準は吸光度倍率で２倍以上であることを前提にすると，両抗体の濃度は日植防の指定濃度の500倍で十分であると推察された。なお，第５図は，ASGV および SDV の混合，単独磨砕サンプルを希釈して ELISA を行った結果であるが，２ウイルスの混合サンプルで320倍以上，単独ウイルスで希釈倍率320倍まで検出が可能であったことから，２ウイルスの同時検定が十分可能であると考えられた。この方法では，保毒率が低ければ低いほど効果が高く，例えば，検定サンプル中に１～10％の保毒率があると仮定すると，慣行法の49～40％の検定回数の減少となった（データ省略）。

第１表　ASGV および SDV の同時検定とその検出感度

サンプル割合		固相抗体濃度										
	ASGV抗体	200			400			600			400	0
	SDV抗体	200	400	600	200	400	600	200	400	600	0	400
ASGV1：SDV1	保毒	636	551	598	596	570	510	680	665	631	386	513
	フリー	112	114	91	87	94	89	87	91	92	86	95
	吸光度倍率	5.7	4.8	6.6	6.9	6.1	5.7	7.8	7.3	6.9	4.5	5.4
ASGV1：SDV2	保毒	579	579	558	536	453	454	575	586	618	174	577
	フリー	112	114	91	87	94	89	87	91	92	86	95
	吸光度倍率	5.2	5.1	6.1	6.2	4.8	5.1	6.6	6.4	6.7	2.0	6.1
ASGV2：SDV1	保毒	640	577	573	553	504	489	542	482	504	400	321
	フリー	112	114	91	87	94	89	87	91	92	95	86
	吸光度倍率	5.7	5.1	6.3	6.4	5.4	5.5	6.2	5.3	5.5	4.2	3.7
単独ASGV		407	397	415	331	326	297	306	293	318	431	83
	フリー	112	114	91	87	94	89	87	91	92	86	95
	吸光度倍率	3.6	3.5	4.6	3.8	3.5	3.3	3.5	3.2	3.5	5.0	0.9
単独SDV		376	365	356	409	378	335	474	389	369	86	409
	フリー	112	114	91	87	94	89	87	91	92	86	95
	吸光度倍率	3.4	3.2	3.9	4.7	4.0	3.8	5.4	4.3	4.0	1.0	4.3

1）ALP 標識抗体：ASGV, SDV 濃度とも400倍
2）吸光度倍率：保毒／フリー
3）サンプル濃度：SDV（50倍），ASGV（50倍），フリー（50倍）
4）発色時間：２時間
5）吸光度：測定値 ×1,000



第５図　サンプル希釈による吸光度の変化

1）吸光度の値は1,000を乗した値
2）ASGV，SDV 抗体はコーティング抗体，ALP 標識抗体共に500倍
3）発色は基質投入２時間後

3　多検体の同時検定法

第2，3表は６サンプルを一度に検定することを前提に検出感度について検討した結果である。即ち，6サンプル（各20μℓ／１サンプル）の内，ASGV または SDV 単独磨砕液とウイルスフリー磨砕液の割合を６：０から１：５とした場合，ELISA での吸光度は検出に十分な吸光度が得られる。また，それを更に９倍（第２表の90倍に該当）にまで希釈した場合は，ASGV で６サンプル中に１サンプル保毒のケースで検出が困難となったが，実際の検定場面では10倍希釈磨砕液を用いるので問題はないと考えられた。なお，ASGV と SDV の６サンプル中の保毒割合の実験も行ったが，さらに９倍希釈（第３表の90倍に該当）したものでも全て検出された（第３表，一部省略）。従来法では，保毒（フリー：ウイルス＝０：1，100μℓ／ウエル）またはフリー（フリー：ウイルス＝１：0，100μℓ／ウエル）のどちらかであるため，6サンプル同時検定法では保毒が６サンプル中１サンプルである場合に当然，吸光度が低下するが，検定手法としては実用化が可能と考えられた。

第２図は，サンプル磨砕液のサンプルチューブラック（96穴サンプルラック）での保存方法と８連ピペッターでのマイクロプレートへの分注方法を図示したものである。従来法では，8連ピペッターを用いてサン

第２表　６サンプル中のウイルス保毒割合と吸光度

ウイルス：フリーのサンプル割合	SDV サンプル希釈倍率			ASGV サンプル希釈倍率		
	10	30	30	10	30	90
６：０	791	522	393	388	305	209
５：１	796	492	386	440	268	199
４：２	965	408	415	339	254	184
３：３	654	364	287	256	218	151
２：４	592	347	224	214	173	136
１：５	426	216	174	142	115	103
０：６（フリー）	57	58	57	57	58	57

1）吸光度の値は1000を乗した値
2）SDV，ASGV 抗体はコーティング抗体，ALP 標識抗体共に500倍
3）発色は基質投入１時間後

第３表　保毒サンプルの割合と吸光度

F：S：A	SDVとASGVおよびフリーのサンプル希釈率		
	10	30	90
４：１：１	426	278	212
３：２：１	465	345	268
２：３：１	523	362	312
１：４：１	557	366	278
１：３：２	572	510	351
０：５：１	714	425	278
０：４：２	568	581	388
６：０：０（フリー）	57	58	57

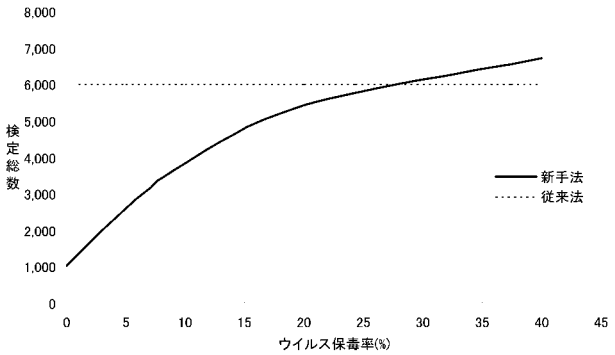
1）吸光度の値は1000を乗した値
2）SDV，ASGV 抗体はコーティング抗体，ALP 標識抗体共に500倍
3）発色は基質投入１時間後
4）F はフリー，S は SDV，A は ASGV

プルラック１列分をマイクロプレートの２列（２反復）に各100μℓずつ分注後，100μℓの酵素結合抗体液を分注していた（同時分注法）。改良法では，サンプルラックの６列までの各サンプルを20μℓずつ採取してマイクロプレートの同一ウエルに分注することで計120μℓ／ウエルが分注される（２反復）。その後，酵素結合抗体液を120μℓ／ウエル重ねることで一連の抗原抗体反応が終了する。この方法では，1枚のマイクロプレートで2.5箱分，240サンプルを同時に検定することが可能となる。なお，この改良法では，マイクロプレート上で陽性と判定された場合，6サンプル分をSDV，ASGVについて個別に従来法による再検定を行う必要がある。第６図は6,000検体を前提に１ウイルスを対象に６サンプルまとめて検定し，保毒していた場合の再検定数も含めた検定総数と保毒率の関係を示している。２ウイルスでも同様の結果となり，保毒サンプルが少なければ少ないほど省力化の効果は圧倒的に大きいことが明らかとなった。

まとめ

カンキツのウイルス検定については，近年，地域や県域レベルでの新品種苗木の栽植や高接ぎ等に対応した大量のウイルス検定の要請がある。

本研究は，ELISAの各ステップを見直し，時間とコストを低下させるため，主として３点について改良した。１点目は磨砕後のステップをELISA結果に影響が少ない卓上小型遠心機を利用し，かつ30秒の短時間とすることで，従来法の約半分の時間で処理することが出来た。２点目はASGVとSDVの２ウイルスをマイクロプレート上で同時に検出することとした。この方法では，1～10％の保毒率があると仮定すると，従来法の49～40％に検定回数の減少が見込まれる。３点目は，6サンプルを同時に検定する方法である。従来法の１サンプルずつ検定する方法を改良し，20μℓ／１サンプルで６サンプルを混合してもウイルス検定が可能であり，また，20μℓを正確に分取出来る８連のピペッターとそのピペッターに対応した96穴のサンプルラックの利用を行うことで省力・低コスト化ができた。なお，2，3点目については，簡易遠心で調整したサンプルを用いても検出が可能であった。



第６図　ウイルス保毒率と６サンプル同時検定法における再検定を含めた検定総数

1)検査点数：6,000サンプル
2)関係式：$y = n/6 + (1-(1-x)^{6} \times (n/6) \times 6$
3)y：検査総数，x：ほ場におけるウイルス保毒率，n：サンプル点数

以上のように，ELISAの各ステップの改良を行うことで労力的には半分以下となり，抗体，マイクロプレート等の試薬・機材の使用を減らすことで，人件費も含めたトータルコストは大幅に低下すると考えられた。

なお，本論文の一部については，農林水産高度化事業「難防除ウイルス病から柑橘農家を救う画期的な診断法と台木の開発」（平成16年－18年）の研究成果である。

引用文献

Bar-Joseph, M., Garnsey, S. M., Gonsalves, D., Moscovitz, M., Purcifull, D. E., Clark, M. F.（1979）The use of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of citrus tristeza virus. Phytopathology 69 : 190－194

Clark, M. F. and Adams, A. N.（1977）Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34 : 475－483.

平島敬太・堀江裕一郎・鶴丈和（1988）：カンキツウイルス検定におけるELISA法の簡易化．第１報　福岡農総試研報Ｂ－8：85－88.

平島敬太・野口保弘（1989）カンキツウイルス検定：サンプル点数におけるELISA法の簡易化．第２報　福岡県農総試報Ｂ－9：57－60.

Iwanami, T. and Koizumi, M.（2000）*Satsuma dwarf virus* group. In: Timmer, L. V., Gansey S. M., Graham, J. H.（eds）Compendium of citrus diseases, 2nd ed. The American Phytopathological Society St. Paul, p59

岩崎真人・山本孝稀・勝部利弘・稲葉忠興（1987）簡易化した酵素結合抗体法（ELISA）によるキュウリモザイク病の診断．四国植防 22：57－62.

川合　昭・西尾　健(1990)酵素結合抗体法(ELISA)によるカンキツタターリーフウイルスの検出．日植病報 56：342－345.

川合　昭・塚本貴敬（1992）モノクローナル抗体を用いたカンキツタターリーフウイルスのELISA法による検出方法．植物防疫 46:348－352.

久原重松（1980）酵素結合抗体法（ELISA）による植物ウイルス病の診断．植物防疫 34(3), 129－135.

草野成夫・下村克己（1995）カンキツタターリーフウイルス検出のためのELISAの改良．福岡農総試研報 14:163－166.

Kusano, N., Hirashima, K., Kuwahara, M., Nakahara, K., Imamura, T., Mimori, T., Nakahira, K. and Torii, K.(2006)Evaluation of a immunochromatographic assay for simple and rapid diagnosis of *Satsuma dwarf virus* and related viruses by using monoclonal antibodies. J. Gen. Plant. Pathol. 73：66－71.

前田孚憲・佐古宣道・井上成信（1988）モノクローナル抗体を用いたELISAによるCMVの高感度検出ならびに迅速・簡易検出．日植病報 54:403.

Miyakawa, T. and Matsui, C.（1976）A bud-union abnormality of satsuma mandarin on *Poncirus trifoliata* rootstock in Japan. In. Proc. 7th Conf. IOCV. IOCV, Reverside：125－131.

Miyakawa, T. and Tsuji, M.（1988）The association of tatter leaf virus with budunion crease of trees on trifoliate orange rootstock. In. Proc. 10th Cof. IOCV: 360－363.

島津　康・宇杉富雄・柏崎　哲・土崎富雄・山本省三・小川正毅（1990）酵素結合抗体法（ELISA）によるカンキツタターリーフウイルスのウンシュウミカンからの検出．関西病虫研報 32：45－46.

清水伸一・藤原文孝・三堂博昭・井上久雄・西山富久・三好孝典・橘泰宣（2004）温州萎縮ウイルスを保毒した温州ミカンにおける果実形質および品質の変化．　四国植物防疫研究. 39：27－33.

高橋義行（1988）植物ウイルス病の血清学的診断法（2）．植物防疫 42:22－26.

Wallace, J. M. and Drake, R. J.（1962）Tatter leaf, a previously undescribed virus effect on citrus. Plant Dis. Reptr. 46：211－212.

Yoshikawa, N., Imaizumi, M., Takahashi, T. and Inouye, N.（1993）Striking similarities between the nucleotide sequence and genome organization of citrus tatter leaf and apple stem grooving capilloviruses. J. Gen. Virol. 74: 2743－2747.

Yoshikawa, N., Sasamoto, K., Sakurada, M., Takahashi, T. and Yanase, H.（1996）Apple stem grooving and citrus tatter leaf capilloviruses obtained from a single shoot of Japanese pear（*Pyrus serotina*）. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 62：119－124.