



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	馬鈴薯ウイルス病の免疫学的研究（第6報）：X及びYウイルスの補体結合反応について
Author(s)	村山, 大記; MURAYAMA, Daiki; 山田, 守英 他
Citation	北海道大學農學部邦文紀要, 2(3), 62-76
Issue Date	1955-10-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/11594
Type	departmental bulletin paper
File Information	2(3)_p62-76.pdf



馬鈴薯ウイルス病の免疫学的研究 (第6報)

X及びYウイルスの補体結合反応について

村山大記・山田守英
寒河江和子・岡田守夫

Immunological studies on the potato virus diseases.

VI. On the complement fixation reaction
of potato viruses X and Y.

By

Daiki MURAYAMA, Morihide YAMADA,
Kazuko SAGAE and Morio OKADA

I. 緒言

植物ウイルス病の血清学的研究には多くは沈降反応が用いられ、補体結合反応は前者程多く用いられていない。これは後者の手技が前者のそれに比して著しく複雑なる事がその主な原因と思われる。しかし補体結合反応は沈降反応或いはその他の方法(例えば sheep red blood cell precipitin test) に比して著しくその反応が鋭敏であつて(KOZŁOWSKA, 1950; MOORHEAD and PRICE, 1953), 微量抗原の証明に適している。(LIMASSET, 1952)

私共は補体結合反応の鋭敏度について研究を試みると同時に沈降反応に依つてはウイルスの証明の困難なる塊茎内におけるウイルスの検出, 分布状態及び濃度, その他について研究を行つたので茲にその結果を報告する次第である。本文を草するに当り種々御指導に預つた福土貞吉教授に衷心より感謝する次第である。

II. 実験材料及び方法

ウイルス汁液

X及びYウイルス汁液は前報告(村山・山田・松宮, 1949, 50, 51)と同様にして得たが, 時にXウイルス汁液は硫酸塩析法(BAWDEN and PIRIE, 1938)によつて精製したものを用いた。

馬鈴薯葉汁液は搾汁を遠心分離(3,000 rpm, 30分間)し, 上清を凍結融解後再び遠心分離(10,000 rpm,

30分間)した上清を供試した。

塊茎汁液は塊茎(芽部は削り取る)を大根卸しにて磨潰すか, あるいは安全カミソリの刃にて slice となし, 更にそれを細部に分けて乳鉢中にて磨潰し(ウイルスの分布を調査)搾汁を得, 後前同様にして清澄にした上清を用いた。

抗血清

X及びYウイルス汁液は夫々 BAWDEN and PIRIE (1938 及び 1939)の方法により精製し, Xウイルス抗血清は精製ウイルスを 2cc 宛家兎(3~4 kg)の耳静脈に4日間隔にて注射し約1カ月半乃至2カ月後1部採血し力価の十分高まつたのを確めた後最後の注射から10日目に全採血を行つた。Yウイルス抗血清はXウイルス抗血清と同様にして注射を行つたがXウイルス抗血清より少しく免疫に日数を要した。血清は非働化(56°C. 30分間加熱)し, 0~3°Cにて保存した。

沈降反応

前報告と同様である(村山・山田・松宮, 1949, 50, 51)

補体結合反応

本実験においては初め Browning 法, 後には米国陸軍々医学校法を用いた。

(1) Browning 法

抗血清: 65°C. 30分間加熱して非働性にする。

抗原: 最少抗補体量の1/2量を用いた。

補体: 数頭の健康モルモットより得た新鮮血清を

4倍に稀釈し、その2, 4, 6最少溶血量(MHD)を用いた。

溶血系：3%感作牛血球液

反応：抗原 0.5 cc, 抗血清 0.05 cc 及び補体 2, 4, 6 MHD を加え、振盪混和（この他抗原対照（抗原 0.5 cc, 生理食塩水 0.05 cc, 補体 2 MHD）及び血清対照（血清 0.05 cc, 生理食塩水 0.5 cc, 補体 2 MHD）を置いた）、37°C. の湯槽に1時間半浸漬し、後各管に一樣に0.5 cc の3%感作血球を加えて混和し、1時間15分湯槽に入れ（約15分毎に振盪し血球の沈澱凝集を防ぐ）、後取出して結果を判定した。

(2) 米国防軍々医学校法

マグネシウム食塩水：本実験にては稀釈液として生理食塩水の代りに塩化マグネシウムを20 r/cc の割に加えたマグネシウム食塩水を用いた。

赤血球：脱纖維した羊赤血球を生理食塩水にて3~4回遠心洗滌（2000~2500 rpm, 15分間）したるもの。

溶血系：3単位の溶血素稀釈液を作り、3%の羊赤血球浮游液と速かに混合振盪する。これを30分間室温において十分感作する。

補体：健康モルモット3匹以上より採血混合した血液から分離した血清。

抗原：硫酸塩析法によつて精製したX及びYウイルス汁液。

抗血清：65°C. 20分間加熱して非働化する。

予備試験にて溶血素の使用量並びに補体の使用量を測定して本試験を行う。

反応：階段稀釈した抗原 0.25 cc, 抗血清 0.25 cc 及び補体（2充単位）0.5 cc を加え、よく振盪混和し（この他抗原対照（抗原 0.25 cc, 食塩水 0.25 cc, 補体 0.5 cc）及び血清対照（血清 0.25 cc, 食塩水 0.25 cc, 補体 0.5 cc）を置く）、4~8°C. に16~18時間静置し後室温に15分間置いて、後各管に一樣に0.5 cc の3%感作血球を加えて混和し、37°C. の湯槽に30分間入れ、後取出して結果を判定した。

溶血阻止の程度は次の如くにした。

- 4 = 完全阻止 3 = 75% 溶血阻止
- 2 = 50% 溶血阻止 1 = 25% 溶血阻止
- 0 = 完全溶血

III. 実験結果

A. 沈降反応と補体結合反応との鋭敏度の比較

a. Xウイルス

実験第I

Xウイルス罹病タニコ搾汁を抗原としXウイルス抗血清を用いて補体結合反応を行つた。本実験においては Browning 法を用いた。Xウイルス原液は抗補体作用を有するが2倍以上に稀釈すると消失した。又Xウイルス抗原はそれ自身溶血作用はなかつた。抗血清は62°C. 30分間加熱し非働性にしたものを用いたが、0.05 cc で抗補体作用はなかつた。

第1表 補体結合反応

血清稀 釈倍数	原		2		4		8		16		抗原 対照
	2	4	6	2	4	6	2	4	6	2	
4	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
8	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-
16	+	+	+	+	+	±	-	-	-	-	-
32	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-
64	+	+	+	+	+	+	+	±	±	-	-
128	+	+	+	+	+	+	+	±	±	-	-
256	+	+	-	±	-	-	-	-	-	-	-
512	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1024	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2048	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

抗原並に抗血清稀釈倍数は混合前の倍数

以上の実験より補体結合反応は著しく鋭敏であつて、抗原 1024 倍稀釈迄反応陽性にて微量抗原の証明に適する事を知つた。

実験第II

Xウイルス汁液並びに同ウイルス抗血清を用いて沈降反応及び補体結合反応を行つた。両反応に用いた抗原及び抗血清は同一であり、補体結合反応は米国防軍々医学校法によつた。

第2表 沈降反応

抗原稀 釈倍数 10 × 2 ⁿ	抗血清稀釈倍数 2 ⁿ						抗原 対照
	n=4	5	6	7	8	9	
n=0	+	+	+	+	+	-	-
1	+	+	+	±	-	-	-
2	+	+	+	-	-	-	-
3	+	+	-	-	-	-	-
4	±	±	-	-	-	-	-
5	±	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-

抗原並に抗血清稀釈倍数は混合後の倍数、以下の表同様

第3表 補体結合反応

抗原稀 釈倍数 10×2 ⁿ	抗血清稀釈倍数 2 ⁿ					対原 対照
	n=3	4	5	6	7	
n=0	1	0	0	0	0	0
1	4	4	4	1	0	0
2	4	4	4	4	0	0
3	4	4	4	4	0	0
4	4	4	4	4	0	0
5	4	4	4	4	0	0
6	4	4	4	3	0	0
7	2	2	0	1	0	0
8	0	0	0	0	0	0

(補体結合反応には抗原と抗血清とのみ考えた場合の終末稀釈倍数を表した。以下の表同様)

以上の結果より明かなる如く、補体結合反応は沈降反応に比して著しく反応が鋭敏にして微量抗原の証明に適する。

b. Y バイラス

前実験同様にして Y バイラスを用い沈降反応と補体結合反応との鋭敏度を比較した。

実験第 I

Y バイラス罹病 *N. sylvestris* 汁液を抗原とし Y バイラス抗血清と補体結合反応を行った。(米国防軍々医学学校法による)

第4表 補体結合反応

抗原稀 釈倍数 10×2 ⁿ	抗血清稀釈倍数 2 ⁿ						抗原 対照
	n=3	4	5	6	7	8	
n=0	4	4	4	3	0	0	0
1	4	4	4	4	3	0	0
2	4	4	4	4	3	0	0
3	4	4	4	4	4	1	0
4	4	4	4	4	4	1	0
5	4	4	4	4	2	0	0
6	1	3	3	2	1	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0

以上より明かなる如く Y バイラスにおいても補体結合反応は著しく反応が鋭敏であつた。

実験第 II

次に同一の Y バイラス抗原並びに抗血清を用いて沈降反応及び補体結合反応を行った。(第5及び6表)

即ち Y バイラスにおいても X バイラス同様補体結

第5表 沈降反応

抗原稀 釈倍数 10×2 ⁿ	抗血清稀釈倍数 2 ⁿ								抗原 対照
	n=3	4	5	6	7	8	9		
n=0	+	+	+	+	+	-	-	-	
1	+	+	+	+	-	-	-	-	
2	+	+	+	+	-	-	-	-	
3	+	+	+	±	-	-	-	-	
4	±	-	-	-	-	-	-	-	
5	-	-	-	-	-	-	-	-	

第6表 補体結合反応

抗原稀 釈倍数 10×2 ⁿ	抗血清稀釈倍数 2 ⁿ				抗原 対照
	n=3	4	5	6	
n=0	4	4	4	0	0
1	4	4	4	0	0
2	4	4	4	0	0
3	4	4	4	0	0
4	4	4	4	0	0
5	4	4	3	0	0
6	4	4	0	0	0
7	0	0	0	0	0

合反応は沈降反応に比して反応が鋭敏で微量抗原の証明に適する事を認めた。

B. 馬鈴薯塊茎並びに葉における X 及び Y バイラスの検出

前実験において補体結合反応は著しく反応が鋭敏にて且微量抗原の証明に適することが明かとなつたので、一般にバイラス含量の少いとされている塊茎中のバイラスの検出に補体結合反応を適用した。即ち罹病株の塊茎中におけるバイラスの有無について検討を行った。又罹病葉についても同様にしてバイラスの検出を行った。

実験第 I

漣葉モザイク罹病男爵薯の葉及び塊茎を供試した。葉は搾汁に Na₂HPO₄ を加え、暫時静置後遠心分離 (3000 rpm, 30 分間) を行いその上清を用いた。塊茎は大根卸にて磨り汁液をガーゼにて搾つて Na₂HPO₄ を加え遠心分離後、上清を用いた (反応は Browning 法によつた)。

抗原抗補体作用を見るに、塊茎より葉において特に著しかつた。本試験においてはそれがため塊茎には 50 倍、葉においては 200 倍に稀釈した汁液を用いた。

第7表 抗原抗補体作用

抗原	抗原 稀 釈 倍 数									
	5	10	15	20	25	30	35	40	50	100
塊茎	卅	卅	卅	+	-	-	-	-	-	-
葉	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	±	-

補体 2 単位使用 塊茎 45 gr

第8表 補体結合反応

抗 原 (稀釈倍数)	Xウイルス 抗 血 清			Yウイルス 抗 血 清			抗 原 対 照
	補 体			補 体			
	2	4	6	2	4	6	
塊茎 (50 倍)	+	-	-	±	-	-	-
葉 (200 倍)	卅	-	-	±	-	-	-

第8表に示す如く、Xウイルスは塊茎並びに葉において検出されたが、Yウイルスは塊茎、葉共に明瞭な反応が現われなかった。

実験第II

連葉モザイク罹病男爵薯の葉及び塊茎を用いて前同様にして実験を行った。抗原抗補体作用を調べて後、抗原の稀釈倍数を定めて本試験を行った。

第9表 抗原抗補体作用(塊茎)

塊茎番号 抗原 稀釈倍数	1	2	3	4	5	6
	10	-	+	卅	-	+
20	-	-	-	-	-	-
使 用 稀釈倍数	30	40	40	30	40	30

塊茎重量 No. 1:13 gr, No. 2:19 gr, No. 3:18 gr
No. 4:42 gr, No. 5:35 gr, No. 6:81 gr

補体 2 単位使用

第10表 抗原抗補体作用(葉)

葉番号 抗原 稀釈倍数	1*	2	3	4	5	6
	40	卅	卅	卅	卅	卅
80	卅	?	卅	卅	卅	-
160	卅	-	-	-	-	-
400	-	-	-	-	-	-
使 用 稀釈倍数	500	200	250	250	250	200

補体 2 単位使用

* 葉 No.1 の抗原稀釈倍数は 50, 100, 200, 400 倍である。

第11表 補体結合反応

		塊 茎						
抗血清	補体	番号	1	2	3	4	5	6
		X	2 MHD	卅	+	卅	卅	卅
	4 MHD	?	-	-	-	?	?	
Y	2 MHD	-	?	?	-	-	-	

		葉					
X	Y	2 MHD	4 MHD	2 MHD	4 MHD	2 MHD	4 MHD
		X	卅	-	卅	-	卅
Y	2 MHD	-	-	-	-	-	-

以上の結果より補体結合反応により連葉モザイク罹病男爵薯の葉及び塊茎における X ウイルスは検出されたが Y ウイルスは検出されなかった。殊に葉において Y ウイルスの検出されなかったのは葉における抗原抗補体作用が強く、抗原を著しく稀釈したためと思われる。

次に簡単にスライド法(村山・山田, 1951C)を用いて葉及び塊茎内の X 及び Y ウイルスの検出を行った結果は次表の如くである。

第12表 スライド法

部位	番号 抗血清*	1	2	3	4	5	6
		塊茎	X Y	± -	± -	- -	- -
葉	X Y	卅 -	卅 -	卅 -	卅 -	卅 -	卅 -

* Xウイルス抗血清:5倍液, Yウイルス抗血清:2倍液

以上よりスライド法によつては塊茎中のウイルスを検出するのはかなり困難であつた。又 Y ウイルスはスライド法にては(搾汁原液使用)検出は極めて困難の如くに思われる(本実験にて用いた Y ウイルス抗血清は Y ウイルス罹病 *N. sylvestris* 汁液と血清終末稀釈倍数 64 倍迄沈降反応陽性であつた)。

実験第III

本実験においてはスライド法、沈降反応及び補体結合反応を用いて連葉モザイク罹病並びに外観健全なる馬鈴薯(男爵薯並びに紅丸)の葉及び塊茎中における X 及び Y ウイルスの検出を行った。供試材料は次表の如くである。

第23表 沈降反応

抗原 終末稀 釈倍数 10×2^n	No. 28									No. 66															
	抗血清終末 稀釈倍数 2^{2n}								抗原 対照	抗血清終末 稀釈倍数 2^{2n}								抗原 対照							
	n=4	5	6	7	8	9	対照	n=4		5	6	7	8	9	対照										
$n=0$	-	-	-	-	-	-	-	-	+	±	-	-	-	-	-	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	±	-	-	-	-	-	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	±	-	-	-	-	-	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

以上の結果より明かなる如く補体結合反応は沈降反応に比し鋭敏にして、且微量抗原の検出に適する。殊に塊茎の如くウイルス量の少ない場合には特に有効である。なおスライド法によつては両塊茎共 X 及び Y バイラスは検出されなかつた。

実験第 VII

更に漣葉モザイク罹病農林1号塊茎を用いて前実験同様にして実験を行つた。なお塊茎汁液を用いセンニチソウ 20 葉に接種を行つた。

第24表 補体結合反応

抗血清終末 稀釈倍数 2^{2n}	No. 10								斑点 数	
	抗原稀釈倍数 5×2^n							対照		
	n=0	1	2	3	4	5	6			7
X	$n=3$	4	4	4	4	4	4	4	0	30
	4	4	4	4	4	4	4	2	0	
	5	4	4	4	4	2	0	0	0	
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	
Y	4	1	4	4	4	4	2	0	0	
	5	0	0	0	0	0	0	0		

塊茎重量 212 gr

斑点数はセンニチソウ 20 葉上の総数

第25表 補体結合反応

抗血清終末 稀釈倍数 2^{2n}	No. 68								斑点 数	
	抗原稀釈倍数 5×2^n							対照		
	n=0	1	2	3	4	5	6			7
X	$n=3$	4	4	4	4	4	4	1	0	18
	4	4	4	4	4	4	2	0	0	
	5	4	4	4	4	1	0	0	0	
	6	4	4	2	0	0	0	0	0	
	7	4	2	0	0	0	0	0	0	
Y	4	4	4	4	4	4	0	0		
	5	0	0	0	0	0	0			

塊茎重量 166 gr

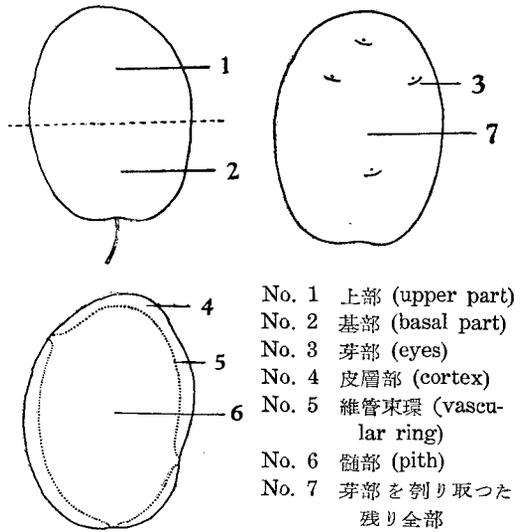
斑点数はセンニチソウ 20 葉上の総数

以上の結果より補体結合反応により塊茎中の X 及び Y バイラスの検出が可能であり、補体結合反応は微量抗原の検出に最も鋭敏なる反応であることが認められた。なお X バイラスは Y バイラスに比し反応終末点がかかなり高かつた。

C. 塊茎内におけるウイルスの分布並びに濃度

実験第 I

漣葉モザイク罹病男爵薯塊茎を次の如くに分けて各部分におけるウイルスの検出を補体結合反応(Browning法)によつて試みた(図版参照)。



即ち罹病塊茎を双物にて上図の如くに分けた。芽部は芽部のみ剝り集めて汁液を作り、皮層部、維管束環及び髓部は塊茎を slice となし、滅菌せる双物で夫々3部分に分けた。各部分は搾汁を取り、遠心分離を行つて清澄な汁液として使用した。実験結果は次表の如くである。

第26表 補体結合反応

抗原	X バイラス抗血清				Y バイラス抗血清				使用 抗原 稀釈 倍数
	補体		抗原 対照	補体		抗原 対照			
	2	4		2	4		6		
1	卅	±	-	-	卅	±	-	-	15
2	+	-	-	-	+	-	-	-	40
3	卅	-	-	-	卅	-	-	-	40
4	卅	-	-	-	卅	-	-	-	40
5	卅	卅	-	-	卅	-	-	-	20
6	卅	-	-	-	卅	-	-	-	15
7	卅	-	-	-	卅	-	-	-	40

以上の結果より供試した殆ど全ての部分（塊茎基部（No. 2）のYウイルス検出は明かならず）にX及びYウイルスが検出された。

実験第II

漣葉モザイク罹病男爵薯塊茎を用いて前実験同様にして実験を行つた。

ただし No. 1 及び 2 は前同様であるが、No. 3 は皮層部、No. 4 は維管束環、No. 5 は髓部である。

第27表 補体結合反応

抗原	Xウイルス抗血清				Yウイルス抗血清				使用抗原稀釈倍数
	補体			抗原 対照	補体			抗原 対照	
	2	4	6		2	4	6		
No. 1	卅	-	-	-	+	-	-	-	20
2	卅	-	-	-	卅	-	-	-	20
3	卅	-	-	-	卅	-	-	-	20
4	卅	-	-	-	+	-	-	-	20
5	-	-	-	-	-	-	-	-	20

実験第III

前実験同様にして更に実験を行つた。

No. 1 皮層部、No. 2 維管束環、No. 3 髓部である。

第28表 補体結合反応

抗原	Xウイルス抗血清				Yウイルス抗血清				使用抗原稀釈倍数
	補体			抗原 対照	補体			抗原 対照	
	2	4	6		2	4	6		
No. 1	卅	±	-	-	±	-	-	-	20
2	+	±	-	-	±	-	-	-	15
3	+	±	-	-	-	-	-	-	10

以上の2実験より一般に髓部はウイルス量が他に比べて少い様に考えられる。実験第IIIではYウイルスが全ての部分に殆ど検出されなかつた。

実験第IV

前同様にして実験を行つたが本実験にては沈降反応も同時に行い補体結合反応と比較した。

No. 1, 4: 皮層部、No. 2, 5: 維管束環、No. 3, 6: 髓部。

第29表 補体結合反応

抗原	Xウイルス抗血清			Yウイルス抗血清			抗原 対照
	補体			補体			
	2	4	6	2	4	6	
No. 1	卅	+	±	卅	+	-	-
2	卅	+	±	卅	-	-	-
3	卅	卅	+	±	-	-	-
4	卅	±	-	卅	±	-	-
5	卅	卅	+	+	±	-	-
6	卅	卅	±	+	±	-	-

第30表 沈降反応

抗原	Xウイルス抗血清					Yウイルス抗血清					抗原 対照	
	終末稀釈倍数 2 ⁿ											
	n=4	5	6	7	8	n=4	5	6	7	8		
No. 1	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

以上の結果より補体結合反応にては全ての部（ただし髓部にてYウイルスの検出が不明瞭の事があつた）にX及びYウイルスが検出された。

沈降反応にてはXウイルスは髓部にて検出されぬことがあつたが他部にては全て検出された。ただしYウイルスは全ての部分に検出されず、沈降反応は補体結合反応より精度が低下したが殊にYウイルスにおいて顕著であつた。

実験第V

本実験以降は補体結合反応は米国陸軍々医学校法を用いた。又各部におけるウイルスの濃度を知るために抗原並びに抗血清の階段稀釈液を用いた。

なお、本実験に用いたYウイルス抗血清は馬鈴薯汁液に対する反応が著しく高かつたので（非特異的の反応と思われる。なおその理由については明かでない）、Xウイルス抗血清のみを用いた。

供試塊茎は漣葉モザイク罹病男爵薯及び紅丸である。

供試Xウイルス抗血清の力価は1024倍であり、Xウイルス罹病トマト汁液は2560倍迄反応陽性（完全不溶血）であつた。

(1) 男爵薯

第 31 表 補 体 結 合 反 応

部位 抗原 抗血清 稀釈倍数 2^n	皮 層 部				維 管 束 環			髓 部			血清 対 照
	稀 釈 倍 数 5×2^n				稀 釈 倍 数 5×2^n			稀 釈 倍 数 5×2^n			
	$n=0$	1	2	3	0	1	2	0	1	2	
$n=4$	4	3	±	0	0	0	0	±	0	0	0
5	2	±	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
抗原対照	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

塊茎重量 143 gr.

以上の結果より皮層部に X バイラス (抗原稀釈 10 倍迄) が検出されたが他の部分には X バイラスは認め

られなかつた。本血清並びに各抗原を用いて沈降反応を行つた結果は全て陰性であつた。

(2) 紅 丸

第 32 表 補 体 結 合 反 応

部位 抗原 抗血清 稀釈倍数 2^n	皮 層 部				維 管 束 環			髓 部			血清 対 照
	稀 釈 倍 数 5×2^n				稀 釈 倍 数 5×2^n			稀 釈 倍 数 5×2^n			
	$n=0$	1	2	3	0	1	2	0	1	2	
$n=9$	4	4	3	0	4	0	0	4	0	0	0
10	4	4	0	0	4	0	0	4	0	0	0
抗原対照	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

塊茎重量 37 gr.

第 33 表 補 体 結 合 反 応

部位 抗原 抗血清 稀釈倍数 2^n	皮 層 部					維 管 束 環			髓 部			血清 対 照
	稀 釈 倍 数 5×2^n					稀 釈 倍 数 5×2^n			稀 釈 倍 数 5×2^n			
	$n=0$	1	2	3	4	0	1	2	0	1	2	
$n=9$	4	4	2	1	0	4	1	0	3	1	0	0
10	4	4	0	0	0	3	0	0	1	0	0	0
抗原対照	1	0	0			0	0	0				

塊茎重量 59.5 gr.

以上の結果を通覧するに皮層部において最も X バイラスの濃度高く、維管束環及び髓部はバイラス濃度殆ど等しきかあるいは前者が僅に高い様に認められる。

実験第 VI

外観健全 (潜在モザイク病) なる男爵薯塊茎について前実験同様にして実験を行つた (第 34 表)。

即ち潜在モザイク罹病男爵薯塊茎にても皮層部に最もバイラス濃度が高い様であつた。ただし本実験にて

第 34 表 補 体 結 合 反 応

部 位	抗血清稀釈 倍数 2^n	抗原稀釈倍数 5×2^n			
		$n=1$	2	3	4
皮 層 部	9	4	0	0	0
	10	3	0	0	0
維管束環	9	0	0	0	0
	10	0	0	0	0
髓 部	9	0	0	0	0
	10	0	0	0	0

塊茎重量 170 gr.

は維管束環及び髓部にウイルスが認められなかつた。

D. 罹病株に形成された新塊茎における X バイラスの検出

潜在モザイク罹病男爵株に形成された新塊茎を供試した(米国陸軍々医学校法による, X バイラス抗血清の力価は 2048 倍であつた)。

実験第 I

5月1日に播種した罹病株につき6月25日新生の小塊茎を取り実験を行つた。(播種日より56日目)

No. 1 株	塊茎 2 個供試	大 3.2 gr ... 径 1.8 cm 小 1.6 "
No. 2 株	塊茎 3 個 "	大 1.6 " ... 径 1.5 cm " 1.6 " 小 1.2 "
No. 3 株	同上	大 1.6 " ... 径 1.3 cm 中 1.0 " 小 0.4 "

以上1株毎に塊茎を磨り潰し、汁液を搾り供試した。

第 35 表 補体結合反応 (56 日目)

株番号 抗血清 稀釈倍数 2 ⁿ	1				2				3					血清 対照
	稀釈倍数 5×2 ⁿ				稀釈倍数 5×2 ⁿ				稀釈倍数 5×2 ⁿ					
	n=2	3	4	5	1	2	3	4	1	2	3	4	5	
n=7	4	4	3	0	4	4	4	0	4	4	4	1	0	0
8	4	4	3	0	4	4	3	0	4	4	4	0	0	0
9	4	4	2	0	4	4	2	0	4	4	4	0	0	0
抗原対照	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

補体 2 単位使用

以上の結果より播種後 56 日目に採取した塊茎に既に X バイラスが検出された。

前同様 5 月 1 日に播種した男爵株の新塊茎を 7 月 5 日 (66 日目) 及び 7 月 10 日 (71 日目) に採取し X バイラスの検出並びにその濃度について実験を行つた。

実験第 II

第 36 表 補体結合反応 (66 日目)

塊茎 抗血清 稀釈倍数 2 ⁿ	大						小							
	稀釈倍数 5×2 ⁿ						稀釈倍数 5×2 ⁿ							
	n=2	3	4	5	6	7	2	3	4	5	6	7	8	
n=8	4	4	3	1	0	0	4	4	4	4	4	3	0	
9	4	4	0	0	0	0	4	4	4	4	2	0	0	
10	4	4	0	0	0	0								
11	4	4	0	0	0	0								
抗原対照	0	0					0	0						

塊茎大 : 17.1 gr, 径 3.2 cm, 小 : 2.7 gr, 径 1.2 cm

補体 2 単位使用

第 37 表 補体結合反応 (71 日目)

塊茎 抗血清 稀釈倍数 2 ⁿ	大				小			
	稀釈倍数 5×2 ⁿ				稀釈倍数 5×2 ⁿ			
	n=1	2	3	4	1	2	3	4
n=10	0	0	0	0	4	1	0	0
抗原対照	0	0	0	0	0	0	0	0

塊茎大 : 48 gr, 径 4.5 cm, 小 : 4.2 gr, 径 1.8 cm

補体 2 単位使用

以上の結果より播種後 56 日目以後に形成された塊茎に X バイラスが検出された。ただし 71 日目の塊茎 (大) に X バイラスが検出されなかつたが、血清稀釈度の高かつたためかと思われる。而して 66 日目の塊茎 (小) において最も濃度が高い様であつた。(但し血清 1024 及び 2048 倍にての実験は行わなかつた)

実験第 III

4 月 8 日温室にて個別検定用木箱 (2.8 × 1.35 × 0.6 尺) 内に播種せる男爵薯塊茎 1 芽より生ぜる約 20

cm の株 (潜在モザイク病) に形成された塊茎中極めて小形の新塊茎 (軟く、乳白色を呈す) を選んで5月14日 (播種後36日目) 採取し、これを磨潰して汁液を搾り、凍結融解、遠心分離によつて清澄にした液にて補体結合反応を行った。

なお試料の塊茎 (28 個) は2分して、A は塊茎の

第38表 補体結合反応

試料	抗原 稀釈倍数 5×2^n					血清 対照
	n=2	3	4	5	6	
A	0	1	4	0	0	0
抗原対照	0	0				
B	4	4	0	0	0	0
抗原対照	0	0				

抗血清 (力価 2560 倍) 1280 倍稀釈液
補体2単位使用

大形なるものを選び径 0.7~0.8 cm, 重量 0.2~0.23 gr のもの14個, B は小形なるものにて径 0.4~0.6 cm, 重量 0.1 gr 以下のもの14個を磨潰して汁液 (A液は約 1.5 cc, B液は約 1 cc) を得た。

実験結果は第38表の如くである。

以上の実験より播種後36日目に形成された塊茎 (男爵薯, 潜在モザイク病) 中極めて小形なる塊茎 (径 0.8 cm, 重量 0.23 g 以下) 中の X バイラスの有無を検したが、既に X バイラスの存在が認められた。

E. 萌芽における X バイラス濃度

澁葉モザイク罹病紅丸塊茎を2区に分ち、一部は浴光催芽せしめ、芽条が1.5~2cm に伸びしもの、他は箱の中 (暗所) にて催芽せしめ、芽条が3~5cm に伸びしものの汁液を供試した。しかして芽条15本宛より汁液を得た。(米国陸軍々医学校法による。X バイラス抗血清の力価は512 (時に256) 倍であつた)。

第39表 補体結合反応

番号 抗原 抗血清 稀釈倍数 2^n	1					2					
	稀釈倍数 10×2^n					稀釈倍数 10×2^n					
	n=6	7	8	9	10	6	7	8	9	10	11
n=5	/	/	4	4	0	/	/	4	3	2	0
6	4	1	0	0	0	4	4	4	0	0	0
7	4	1	0	0	0	4	4	4	0	0	0
8	4	0	0	0	0	4	4	/	0	0	0

1: 浴光催芽, 2: 暗箱貯造

第40表 補体結合反応

番号 抗原 抗血清 稀釈倍数 2^n	1									2										
	稀釈倍数 5×2^n									稀釈倍数 5×2^n										
	n=0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	n=0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
n=3	1	4	4	4	4	4	1	0	0	0	4	4	4	4	4	4	4	4	1	0
4	1	2	4	4	4	4	4	4	1	0	4	4	4	4	4	4	4	4	1	0
5	0	0	1	4	4	4	4	4	0	0	3	4	4	4	4	4	4	4	1	0
6	0	0	0	1	4	4	4	3	0	0	0	0	0	1	4	4	4	4	1	0
7	0	0	0	0	0	2	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

1: 浴光催芽, 2: 暗箱貯造

以上の結果より明かなる如く萌芽中における X バイラスの濃度は著しく高い。これは前報告 (村山・山田・松宮, 1952) においても認められたが、沈降反応

より補体結合反応により更に明かに認められた。

なお浴光催芽区と暗所保存区のもの間のバイラス濃度は暗所保存区において稍高い様に認められたが、

殆ど差異が認められなかつた。

F. 罹病葉における X 及び Y バイラスの濃度

漣葉モザイク罹病農林1号の葉の搾汁（嫩葉を主として採取）を供試した。（米国陸軍々医学校法による、X 及び Y バイラス抗血清の力価は夫々 256（時に 128）及び 128（時に 64）倍であつた）。

No. 1：漣葉モザイク病，軽症

葉におけるモザイク斑紋並びに皺縮の著しくな
いもの。

No. 2：漣葉モザイク病，重症（縮葉型）

葉の皺縮著しく，葉脈に壞疽の見られるもの。

No. 3：漣葉モザイク病，老株

全株少しく黄化し初めた罹病株。

第 41 表 補 体 結 合 反 応

番 号	抗 血 清 稀 釈 倍 数 2^n	抗 原 稀 釈 倍 数 10×2^n					抗 血 清 稀 釈 倍 数	抗 原 稀 釈 倍 数 10×2^n						
		$n=5$	6	7	8	9		$n=5$	6	7	8	9		
1	X	$n=5$	4	4	4	2	0	Y	$n=5$	2	3	4	1	0
		6	3	4	4	3	0		6	0	1	0	0	0
		7	0	4	4	3	0		7	0	0	0	0	0
		8	0	0	0	0	0		8	0	0	0	0	0
2	X	5	4	4	4	0	Y	5	4	4	4	0	0	
		6	4	4	4	0		6	2	2	0	0	0	
		7	0	3	/	0		0	7	0	0	0	0	0
3	X	5	4	4	0	0	Y	5	4	4	2	0	0	
		6	0	0	0	0		6	0	0	0	0	0	

以上の結果より罹病葉におけるウイルス濃度は極めて高いことが認められ、しかして X バイラス濃度は Y バイラスのそれに比して少しく高かつた。病徴の軽重によつてウイルス濃度にはあまり差異が認められなかつたが、株が老化し、黄緑化して来るとウイルス濃度は低くなる様である。ウイルス濃度は病徴の軽重よりもむしろ葉齢あるいは感染してからの日数がより関係が深いものの如く思惟された。

IV. 論議及び結論

ウイルス罹病（漣葉、X並びに潜在モザイク病）馬鈴薯の全ての部分に（沈降反応にて）XあるいはYウイルスが検出されるが、塊茎に於ては検出がかなり困難である（BAWDEN, KASSANIS 及び ROBERTS, 1948; 村山・山田・松宮, 1952）。これは恐らく塊茎内部におけるウイルス量の少いことが主原因であろう。

ウイルスの検出に血清学的方法がしばしば用いられるが、HRUŠKA (1940) は馬鈴薯ウイルス病の診断には、接種試験より血清学的方法がより正確であると述べ、SLOGTEREN (1946) も馬鈴薯 X バイラスの検出に血清学的方法の優れていることを報告した。

X 及び Y バイラス抗血清を用いて homologous

antigen との間に沈降反応及び補体結合反応を行つて見るに後者は遙かに反応が鋭敏であつて抗原稀釈における反応終末点 (antigen dilution end point) から見て特に微量抗原の証明に適することが分つた。この結果よりウイルス量の少いと思惟される罹病塊茎を主としその他罹病葉中のウイルスの検出に補体結合反応を用いた。しかし馬鈴薯汁液の抗補体作用の強いために抗原を稀釈する（葉においては特に著しい）が故に、時にウイルスの検出が困難なる場合があつたが（Browning 法にて）、沈降反応に比較すれば遙にウイルスの検出率は高かつた。

沈降反応より補体結合反応の鋭敏なることは KOZŁOWSKA (1950) 並びに MOORHEAD 及び PRICE (1952, 53) により認められているが、KOZŁOWSKA は馬鈴薯の萌芽においては補体結合反応は沈降反応の約 8 倍の鋭敏度を示し、補体結合反応により starch meristem 中のウイルスの検出が出来たと報告した。また LIMASSET (1952) は補体結合反応 (Kolmer 法) は微量抗原の検出に適すると述べている。補体結合反応の鋭敏性は上述の他、ウイルス並びにウイルス系統間の分類あるいはウイルス濃度の測定等にも用いられている (CHESTER, 1935 a,b; TALL, PRICE 及び WERT-

MAN, 1949; PRICE 及び WEAVER, 1952; WEAVER 及び PRICE, 1952)。

なお STAPP 及び BERCKS (1941) 並びに ROLAND (1945) は塊茎中のバイラスの検出に血清学的方法を用いたが、ROBERTS (1952) は若い塊茎では X バイラスの濃度が著しく低いことを報じている。

塊茎の内部を皮層部、維管束環及び髓部に分けて X バイラスの分布及び濃度を見るに、X バイラスは殆ど全ての部分に見出されるが、一般に皮層部に最も濃度高く、次いで維管束環、髓部の順であつたが、後 2 者においては差異の認められぬ事或は時にバイラスが検出されない場合もあつた。

GRATIA 及び MANIL (1934) は塊茎中のバイラスは沈降反応によつて中心部 (central pulp) より皮層部 (outer layer) に多いことを認め、MAMONTOVA (1941) は休眠中の葉捲病罹病塊茎において該バイラス抗血清を用いて研究の結果、該バイラスは中心部 (塊茎の最も若い部分) に多く、発芽時にはバイラスが一樣に分布すると報告した。

X バイラス罹病株に形成された新塊茎にては播種後 36 日目のものに既に X バイラスが補体結合反応により認められた。

塊茎中における Y バイラスは X バイラスに比して検出はかなり困難であるが、これは Y バイラス抗血清の力価の低いこと及び塊茎中の Y バイラスの含量の少いことが原因していることと思われる。

Y バイラスは X バイラスに比して濃度が低く (STAPP 及び MARCUS, 1943), 補体結合反応にて塊茎中の Y バイラスの検出が認められなかつたと HAUSBRANDT (1948) が述べている。GRATIA 及び MANIL (1934) もまた Y バイラス抗血清が Y バイラスと反応しなかつたと報告しているが、LIMASSET 及び DE MONTGREMIER (1947) は十分濃縮した抗血清を用い、診断の時期が適当であると Y バイラスの検出が出来ると述べている。

なお萌芽におけるバイラス濃度は著しく高く、時に葉におけるそれと同様であつた。これは前報告 (村山・山田・松宮, 1952) の結果と同様であつた。STAPP (1943), STAPP 及び BARTELS (1950) も塊茎中のバイラス量が少いために、萌芽を用い血清学的方法によりバイラスの検出を行い、BAWDEN, KASSANIS 及び ROBERTS (1948) は萌芽中のバイラス濃度は葉におけるそれと同程度であると述べている。

連葉モザイク罹病葉中の X 及び Y バイラスの濃度

は病徴の軽重とあまり関連がなく、葉齢あるいは感染後の日数が深い関連性を持つている様である。村山等 (1952) も黄変あるいは枯死した下葉にてバイラス濃度の低下するのを見ている。

V. 摘 要

- (1) 本文にては馬鈴薯 X 及び Y バイラスの血清学的研究、特にそれ等バイラスの補体結合反応による実験結果について報告した。
- (2) X 及び Y バイラス抗血清と X バイラス (給源: X バイラス罹病タバコ) 及び Y バイラス (給源: Y バイラス罹病 *N. sylvestris*) とを用い沈降反応並びに補体結合反応を行つたが、後者が遙かに反応が鋭敏にて且微量抗原の証明に適することを知つた。
- (3) 連葉モザイク罹病塊茎 (時に葉も供試) を用いて補体結合反応を行つたが塊茎中の X 及び Y バイラスの検出が出来た (Browning 法より米国陸軍々医学校法が結果良好)。而して X バイラスは抗原稀釈の著しく高い点迄陽性反応を示した。又補体結合反応と平行して沈降反応を行つたが前者の方が遙に鋭敏度が高かつた。Y バイラスは X バイラスに比すると検出率も低く且反応も弱かつた。
- (4) 連葉モザイク罹病塊茎を皮層部、維管束環及び髓部の 3 部分に分けて X 及び Y バイラスの分布及び濃度について実験を行つたが、各部位に殆どバイラスが認められた (ただし個々の材料については時にバイラスの検出されぬものもあつた)。一般に皮層部においてバイラス濃度が最も高く、次に維管束環、髓部の順であつた。
- (5) 潜在モザイク罹病男爵株に形成された新塊茎についてバイラスの検出を行つたが、播種後 36 日目に採取した小塊茎に既に X バイラスが認められた。
- (6) 連葉モザイク罹病塊茎の萌芽においては X バイラスの濃度は極めて高かつたが、浴光催芽のものと暗所保存の萌芽との間にはバイラス濃度に殆ど差がなかつた。
- (7) 連葉モザイク罹病馬鈴薯葉の X バイラスの濃度は極めて高かつた。而してバイラス濃度は病徴の軽重よりむしろ葉齢に関連がある様であつた。又 X バイラスの濃度は Y バイラスのそれよりも高かつた。

引用文献

- 1) BAWDEN, F. C. and N. W. PIRIE: Liquid

- crystalline preparations of potato virus 'X'.
Brit. Jour. Exp. Path. 19: 66-82, 1938.
- 2) ———— and ————: The purification of insect-transmitted plant viruses. *Ibid.* 20: 322-329, 1939.
 - 3) BAWDEN, F. C., B. KASSANIS and F. M. ROBERTS: Studies on the importance and control of potato virus X. *Ann. Appl. Biol.* 35(2): 250-265, 1948.
 - 4) CHESTER, K. S.: Serological evidence in the study of the relationships of certain plant viruses. *Phytop.* 25: 10, 1935.
 - 5) ————: Serological evidence in plant-virus classification. *Ibid.* 25: 686-701, 1935.
 - 6) GRATIA, A. and P. MANIL: Différenciation sérologique des virus X et Y de la Pomme de terre chez les plantes infectées ou porteuses de ces virus. *Comptes rendus Soc. de Biol.*, 117(31): 490-492, 1934.
 - 7) HAUSBRANDT, L.: Próby oceny zdrowotności ziemniaka na podstawie badania białka bulw metodami: optyczna i serologiczna. *Acta Soc. Bot. Polon.* 19: 84-100, 1948.
 - 8) HRUŠKA, L.: Zkušnosti s methodeu serologickou při určování virových chorob bramboru. *Bramborářství a Průmysl* 4 (11/12): 184-187, 1940.
 - 9) KOZŁOWSKA, A.: Investigation of masked virus X in potatoes by complement fixation test. *Bull. Int. Acad. Polon. (Cracovie), Sér. BI*, 1950(1-3): 65-84, 1950.
 - 10) LIMASSET, P. and DE MONTGREMIER, H. A.: La microméthode sérologique pour l'étude des viroses végétales. *Ann. Épiphyt., N.S.*, 13: 173-185, 1947.
 - 11) ————: Quelques remarques sur l'utilisation de la réaction de fixation du complément pour l'étude des maladies à virus des plantes. *Ann. Inst. Nat. Rech. Agron. Sér. C*, 3: 83-101, 1952.
 - 12) MAMONTOVA, A. N.: in Plant virus diseases and their control. Transactions of the conference on plant virus diseases, Moscow, 340 pp., 1940, Moscow-Leningrad, Acad. Sci. U.S.S.R., 1941.
 - 13) MOORHEAD, E. L. and W. C. PRICE: A new serological test for tobacco mosaic virus. *Phytop.* 42: 471, 1952; 43: 73-77, 1953.
 - 14) 村山大記・山田守英・松宮英視: 馬鈴薯ウイルス病の免疫学的研究 第1報, X及びYウイルス抗原の抵抗性. 北海道馬鈴薯採種組合連合会資料, No. 8, 13頁, 1949; 京大植物病害研究, 第4集: 71-80, 1951 a.
 - 15) ————: 同第2報, 所謂健全馬鈴薯におけるXウイルスの検出. 北海道馬鈴薯採種組合連合会資料, No. 12, 29頁, 1950; 日・植・病・報, 15:55-60, 1951 b.
 - 16) 村山大記・山田守英: Xウイルス罹病馬鈴薯の簡易診断法—スライド法による沈降反応について. 農業及園芸, 26(7): 775-778, 1951 c.
 - 17) 村山大記・山田守英・松宮英視: 馬鈴薯ウイルス病の免疫学的研究 第3報, 連葉モザイク罹病馬鈴薯におけるXウイルスの分布及び濃度. 北大農学部邦文紀要, 1(3): 227-239, 1952.
 - 18) PRICE, W. C. and E. P. WEAVER: Complement fixation as a method of differentiating mutant strains of tobacco mosaic virus. *Phytop.* 42: 16, 1952.
 - 19) ROBERTS, D. A.: Independent translocation of sap-transmissible viruses. *Phytop.* 42: 381-386, 1952.
 - 20) ROLAND, G.: Étude de la transmission du virus X (*Solanum virus I*, ORTON) à la descendance végétative chez la Pomme de terre. *Parasitica* 5(4): 105-109, 1945.
 - 21) SLOGTEREN, E. van: Serologische diagnostiek van virusziekten van landen tuinbouwgewassen. *Landbouwk. Tijdschr.* 1946(701/702): 546-555, 1946.
 - 22) STAPP, C. and R. BERCKS: Untersuchungen über den serologischen Nachweis der verschiedenen bei kartoffeln auftretenden Viren und ihre Differenzierung. *Landw. Jahrb.* 90: 271, 1941.
 - 23) ————: Bedeutung und Wert der serologischen Virusdiagnose für die Kartoffelzüchtung. *Züchter* 15: 184-187, 1943.
 - 24) ———— and O. MARCUS: Serologische Untersuchungen am Tabak über Ausbreitung

- und Verteilung der 3 Kartoffelviren X, Y and A. *Zbl. Bakt., Abt. 2*, 105(20-22): 369-405, 1943.
- 25) STAPP, C. and R. BARTELS: Der serologische Nachweis des X-Virus in Dunkelkeime der Kartoffelknolle. *Züchter* 20: 42-47, 1950.
- 26) TALL, M.G., W.C. PRICE and K. WERTMAN: Differentiation of tobacco and tomato ring-spot viruses by cross immunization and complement fixation. *Phytop.* 39: 288-299, 1949.
- 27) WEAVER, E.P. and W.C. PRICE: Differentiation of tobacco mosaic virus strains by complement fixation. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 79: 125-127, 1952.

Résumé

In this paper there are reported experiments concerning the serological reactions, especially on the complement fixation reactions of the potato viruses X and Y. It was found that in serological activity the complement fixation reaction was more sensitive than the precipitin reaction and that it was suitable for detection of the viruses, even in small quantities, in the extracted juices of infected tubers. For its sensitivity to detect the viruses in the tubers infected with X and Y viruses, which were difficult to be detected probably owing to their small quantities in the tubers, the complement fixation reaction was used in the present studies to detect whether the viruses were present in the tubers, sprouts and leaves or not, and also to ascertain the distribution and concentration of X virus both in the infected tubers and in others.

The viruses in the juices of the leaves and tubers were highly detectable by means of

Browning's method, but the anti-complementary activity was so strong, especially in the juices of leaves, that the complement fixation reaction was not as useful as expected, because of the high dilution of antigenic solutions. The method of the American Army Medical School was found to be more suitable for detection of the viruses in the infected tubers than Browning's method in the present studies.

The tubers having crinkle and latent mosaic diseases were divided into three parts, viz., cortex, vascular ring and pith. They were then tested in order to know the distribution and concentration of X virus by means of the complement fixation reaction. From the results of the experiments, X virus was found in all three parts and generally speaking, it was in highest concentration in the cortex and then less in vascular ring and pith in order.

X virus was found in newly-formed small tubers in the infected plants, collected on 36th day after the sowing in the greenhouse and on 56th day in the farm.

X virus was highly detectable in the sprouts from the infected tubers as also in the leaves, and detected to occur in almost equal quantities in the sprouts germinated in the light and darkness.

The concentration of X virus in the juices of infected leaves was higher in the young green leaves than in the yellowish old ones. It seemed that the higher concentrations of the viruses depended upon the leaf-age of infected leaves or upon the length of time from the infection in the leaves rather than upon the differences between the severity of the symptoms of the infected plants.

The concentration of X virus was higher than that of Y virus in the juices of potato leaves infected with crinkle mosaic.