

《「通信」愛読者のひろがり》

今年の6月で「通信」もまる2年になりました。初期の号のうすぎたない……しかし、それだけに苦勞のあとの見える……「通信」を取り出して、よくもまあ、これで読者が出来たものだと思心する仕末。「通信」を愛する読者がまん強さもあってか、年毎に新しい読者が増し、現在日本国内では、沖縄の1名を加えて214名となり、更に朝鮮の東国大学校、及び春川農科大学（2名）からも積極的な希望があり、編集部では、「通信」のはたす役割を一層慎重に考え、みなさんの期待にそのようなものにしたいとはり切っています。北京科学院にも送付して意見交換をしてみたら？という試みも考えています。科学交流の少ないアジア地域で、この「通信」が、役立つ日も遠くないでしょう。

土壌中の微生物を直接的に検出するために — 蛍光抗体法の適用の可能性 —

— はじめに —

いかにしたら、微生物の小さな小さな世界をのぞきみる事が出来るだろうか？

土壌微生物をやっている者なら誰れもが持っている同題であるが、筆者もまたその例外ではないので、最近、一般微生物界で脚光をあびている蛍光抗体法の土壌への適用の可能性という同題について「通信」の話題にしたりと思い、扇元氏にかねてから原稿を依頼していた。扇元氏は前載のごとく、力作を送って下さったが、土壌微生物は専門でないので、表題の様な駄文を補足することになった。筆者自身、実際に（扇元氏の概に）蛍光抗体法を用いて実験を組んでいるわけではないので、インス

タントな文献紹介程度のことしか書けないのは残念である。日本ではまだ、土壌微生物学分野で実際の適用を行なって研究している人は見当たらないので、これも止むを得ないこととして、これからの意欲的研究を期待しよう。

土の中に住む微生物には、どの位の数と種類とがあり、それらがどんな場所にどのように住みついているのか？ということは、土壌微生物学の基本命題である。しかし、いまだにまた、部分的解明の域を脱せず全貌が明らかにされていない現状である。と云うのも土壌という複雑な構成体の中のおまりにも微細な存在物を検出する方法に適切なものが開発されていなりことによると思われ

る。その中でも、稀釈平板法は、間接的な方法ではあるが有力な研究方法として一般化されて研究成果を上げて来ている。しかし、実際の土壌中での姿を調べるにはどうしても直接的方法が開発されなければならない。今までにも、土壌を直接適当な染料で染めて検鏡する方法、インジゴ粒子のような物質を土壌に浸せて比較的に菌を計数する方法、土壌を樹脂やゼラチンで固めて土壌切片を作り存在様式をそのまま観察しようという試み^{21, 23)}、また、Rassi-Chaloduyのスライト法(1928)等の各種の試みが行なわれ、それぞれに成果を積み重ねて来ているが、前者の平板法程一般化されていない。

これから紹介する蛍光抗体法を土壌へ適用するという向題は、自然のままの微生物の存在状態……コロニー形成とか、菌糸の分布等……を見ると共に、特異的な抗原-抗体反応を利用して、ある種の菌の同定を行なうという方向を開こうとするものである。

Coons が蛍光抗体法を創始したのが1954年、その後、微生物界では主に、医学領域で広く応用されて来ているが農業微生物学にこれを利用するという研究はようやく最近始められたばかりで、文献もごくわずかである。筆者が手に入れた次の文献を紹介することによって、この方面に興味を持たれる方の今後の研

究の実機になれば幸いと思い、その概略をお伝えしたい。

尚、農業微生物学への適用の可能性ということについては先の藤元氏も触れられているが⁴⁾、⁴⁾ 藤元等もこの点に着目して、この方法の開発を期待しよくまとめた小論文を書いておられるので一読をおすすめする。

一本 論

- 使用文献: "The Use of Fluorescent Antibody with the Buried Slide Technique" *Soil Organisms* (1963)
 "Detection of *Aspergillus flavus* in Soil by Immuno fluorescent Staining" *Science* 136: 776-777 (1962)

以上二つ

by E. L. Schmidt and R. O. Baukale.

Schmidt 等は Chaloduy の提案した buried slide technique にこの蛍光抗体法を適用した。彼等は、このスライト法では出来なかった菌種の同定を可能にすれば、直接検出法として一増有効な方法となるであろうことを期待して彼等は、まず *Aspergillus flavus* にスポットをあてた。……もったも、このスライト法で見い出される微生物の存在形態がそのまま自然の正確な反映であるか否かは⁵⁾ Chester や Dabbs & Hinson⁶⁾ 等が論じているがそれは今、ここで向わたりことにして……この *As. flavus* は heterotrophic で nitrate formation を行なうので、生態学的にも重要な菌であることから取り上げた。

一級的な蛍光抗体法の原理については、扇元氏が詳しく述べているので、それを受けついで話を進めたい。
Schmitt 等は、三つの方法の中次の様な直接法を用いたのである。

① 抗原として ---- *As. flavus* -----

培養基 (glucose dicalcium caseinate, inorganic salts PH 7.3) 4日間振るとる
培養 → 菌体を洗い、フレンダーで切り刻み、Salin 中に懸濁させる (0.1 mg. dry w/ml)

② 抗血清を得るために ----- ウサギを用いる ----- ①の懸濁液を Table 1 に従ってウサギの中に注入する → 凝集価 1:250 にする

Table 1.

Time	Dosage, mg	Route
starts	0.5	Intravenous
Day 2	1.0	"
4	1.0	"
8	1.5	"
10	2.0	"
12	2.0	"
16	2.0	subcutaneous
18	2.0	"
25	blood sampled and titered	

③ 蛍光色素の標識

②の血清をエタノールで分画して γ-グロブリン区分を得る →
fluorescein isothiocyanate と結合
(凍結して貯蔵する)

④ buried slide の準備

- 径 25~30 mm の遠心管に風乾した loam soil を半分づつて接種する。

る。(接種した 0.1% glucose 3~5 ml でしめらせておく)。

- 接種したスライドをこの土の中に挿入する。
- その土の表面に *As. flavus* 等の実験目的の菌の spore suspension を数滴落し、培養する (2~4日間)
- とり出したスライドの一面は、水で洗い落とし、もう一面は大きな土壌粒子のみを注意深く洗い流す → 風乾した後、ゆっくりと熱で固定する。

以上の様に準備した後、

③の標識した抗血清
 を 30分感作させる

④のスライド (moist chamber 中で)

30分に注意深く蒸留水で洗い、室温で風乾して顕鏡に供する。

(顕鏡方法)

初めは、大まかに普通の光学顕微鏡で菌糸の分布を見ておく。

蛍光顕微鏡

光源: HBO-200 mercury vapor bulb

(American Optical illuminator)

一次フィルター: 5840又は5860 (コニングサンバー)

二次フィルター: 黄色の Wratten 2B

観察は X10, X20, 又は X40 で行なう。(乾燥)

(結果)

- 抗血清で染めない *As. flavus* を顕鏡しても field は black ~ dark blue で何も見えない。
- 土壌粒子は普通 bright blue 又は red の蛍光を発する。時々小さな円

に鉱物質のものが黄色に見える（後述する標識した菌体のものに似ている）

- ・ *As. flavus* はく他の *fungi* も同様 *ultra violet* と *near ultra violet light* とで弱い青白色の自家蛍光 (*auto-fluorescence*) を出すのが上述の一次フィルターでこれを防ぐことが出来る。

- ・ 抗血清で染めて顕鏡した結果は以下の様である。

× *fungus* は *yellow-green fluorescence* で光る。しかし全体が同じ強さではない。

× 最も強く光る部分は: *conidiophore stalk* & *vesicle* の集合体 *hyphae* の中の *cross wall hyphae segment* などである。

× *conidia spore* はよく光る。

× *hyphae* の *segment* は大部分はくぶんか弱光である。

× *mycelium* の *age* が染色反応の強さと関係するように思われる。

以上の様に検出出来ることを確かめたので、同一の抗血清を用いて、他の *fungi* との反応性について検討してみた。その結果が Table 2 である。

Table 2.

culture	No. test	Fluorescence intensity*				auto-fluorescent
		+4	+3	+2	+1	
Isolate of <i>As. flavus</i> *	14	5	9	-	-	-
<i>Aspergilli</i> other than <i>As. flavus</i>	22	-	4	9	-	-
Genera other than <i>Aspergilli</i>	28	-	2	2	2	3

* *As. flavus* strain CS でない他の strain

** { +4, +3 = 抗原の *fungus* の反応と同じ、又はごく近い強さ。
+2 = 弱光
+1 = ごく弱光か全く光らない。

この結果より *As. flavus* は、株同定で区別つかず、更に種間でもやはり区別つかないことが分る。ただし、その種は弱光であるが-----。色が異なると *As. flavus* とは比較的区別出来る。ただし、2つのものは例外（交差反応の可能性がある）。

— さいごに —

彼等も、さいごに論じているように、蛍光抗体法の適用の実験としては、まだ初期の段階のものであり、使用した土も出来るだけ単純化した

条件のものを用い、しかも、得られた結果は *As. flavus* CS strain の特異性は高くなり。しかし、長間での区別の可能性はある。また、土壌粒子を区別して微生物のみを観察することも可能である。

これらの成果は、今後の方向として次の可能性を導くのである。

・ 混合培養系で、ある種の菌を検出する試み（これは Schmidt 等が現在検討中であるという）。

・ カビばかりでなく、バクテリアや

アクチにも適用する方向。

- ・つまり、抗原抗体反応の出来るだけ特異性の高いものを見い出すことによって、ある種の微生物を検出出来るようにし、その微生物の生活する場をつかむことが可能となる。
- ・特に、土壌の生態学上重要な役割を持つ微生物をメルクマール出来れば、非常に有効であろう。例えば、窒素固定、抗生物質生産、アミノ酸生成、根圏微生物、病原菌及び土壌動物との関連等々で。(彼等は、この意図から *heterotrophic* な *nitrification* をする *As. flavus* を送ったのである)。
- ・しかし、特異的な抗原抗体反応を持つものを見い出して行くこれか

らの仕事はかなり多くの努力を要するであろう。

この方法とは少し目的も異なるが、最近比較的用いられる方式で、蛍光色素を使い、土壌を染め、蛍光顕微鏡で直接観察する仕事がある。これは抗体を作らせないので、土壌中の微生物全般を染色するのである。これによれば土壌粒子と区別つけられるよう技法を高めておけば、菌数の計測、特に微生物のコロニー形成の様子が、容易に観察出来るわけである²⁾。この方面のことは、いつかの機会にまとめてみたいと思っている。

東北大学研

山 岸 宣 美

— 引用文献 —

- 1) Thorntau, H. G., and Gray, P. H. H. (1934)
Proc. roy. soc. B. 115 522
- 2) Alexander, F. E. S., and Jackson, R. M. (1954)
Nature, Lond., 174 750
- 3) Minderman, G. (1956)
Plant and Soil, A 42
- 4) 須藤恒二, 鈴木直治 (1963)
農業技術 18 No. 6 269
- 5) Chesters, C. G. C. (1949)
Trans. Brit. mycol. Soc. 32 197
- 6) Dalbs, C. G., and Hinson, W. H. (1953)
Nature, Lond 172 197
- 7) Zviagintsev D. G. (196)
Soviet Soil Science — 140