

第3章 土壌の生物性評価に係る技術分野の調査

I. 土壌の生物性評価に係る技術

1. 土壌の生物学的評価

土壌中に生息する小動物や微生物はその代謝機能等の生命活動を通して土壌環境を作り上げている。土壌の団粒構造の形成や養分の生成も土壌微生物の働きであり、土壌微生物の活動は作物の生育に影響を及ぼすことが明らかになっている。これまで、土壌の物理性や化学性は作物の生育へ直接的に影響を与えるとして、様々な分析方法が開発され、それらの結果から施肥を設計する土壌診断が確立されてきた。しかし近年では土壌の物理性や化学性に与える影響から、「土壌の生物性」として土壌微生物の種類やその働きが注目されている。

土壌の生物学的評価として現在提供されているサービスは、特定病原菌の定量が主である。しかし、病原菌以外にも作物の生育に関わる有用な微生物は存在するため、土壌微生物生態系の働きが作物の生育にもたらす影響を正しく評価する必要がある。土壌の生物性の分析分野では近年、病原菌の分析だけでは土壌微生物の作物への影響を評価するには不十分であるとして、病原菌菌密度以外にも様々な分析項目から土壌の生物性の特性を評価する動きがある。最近では、土壌中に存在する微生物の多様性や微生物の活性を計測し土壌の生物性を評価する技術の開発がされている。

前述したように土壌の生物性評価における土壌微生物分析方法は多岐にわたり、分析技術の発展に伴い土壌微生物を様々な視点から分析できるようになっている。現在土壌の生物性分析として評価対象となっている主な項目としては下記のようなものがある。

- ・病原菌菌密度
- ・土壌微生物群集構造
- ・多様性指数
- ・総微生物量
- ・微生物活性、代謝機能 等

従来の土壌微生物分析方法としては、分析対象微生物を単離後、培養し、そのコロニー形成状況や顕微鏡を用いた観察から微生物量等を評価していた。しかし、培養法は難培養性微生物等の単離不可能な微生物の分析ができないことや培養に時間がかかることが課題であった。近年では、DNA シークエンス技術の発展や新規分析法の開発により、難培養性微生物の微生物種の同定や活性の評価等様々な観点から分析を行うことが可能になっている。

2. 技術体系

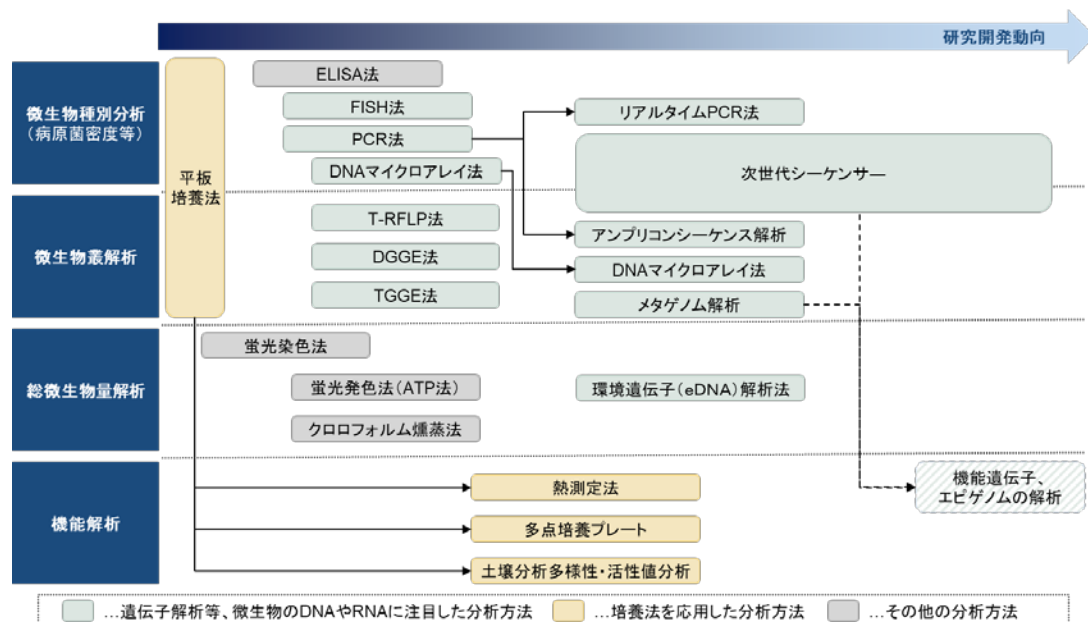
土壌微生物はその約9割以上が培養困難な難培養性微生物であると言われており、塩基配列や機能等が明らかになっていない。このことが土壌微生物分析における大きな課題となっている。

微生物学の基本的な分析方法は採取したサンプルを寒天等の培地に塗抹し、培養後のコロニー等の観察・分析を行う培養法である。形成されたコロニーから特定の菌を単離したり、コロニー形成状況から微生物叢を大まかに把握することが可能で、これまで病原菌の検出等、土壌微生物分析方法として用いられてきた。

しかし培養法では難培養性微生物の分析が困難であることや、培養に時間を要することが課題であったことから、酵素反応を利用した微生物検出方法やDNA塩基配列から微生物種を同定する方法が開発、利用されている。また、従来の培養法では難しかった総微生物量の定量法や、微生物群の持つ機能や活性を分析する方法も開発されている。

分析のハイスループット⁴⁴化も進んでおり、近年では次世代シーケンサーや次々世代DNAシーケンサー⁴⁵と言われる迅速かつ簡易にDNA解析が可能なシーケンサーの開発が進んでいる。

図表 20 土壌微生物分析に係る分析方法の技術開発動向イメージ図



(出所) 三菱UFJリサーチ&コンサルティング作成

⁴⁴ 自動化等により効率的かつ迅速に分析、評価を行うこと。コスト削減にも貢献する。(英: High throughput)

⁴⁵ 遺伝子の塩基配列を1分子ずつ識別できるシーケンサー

3. 個別技術

土壌微生物の分析方法としては、病原菌菌密度等特定の微生物を測定する微生物種別分析、土壌微生物群集構造の解析や多様性指数の算出を行う微生物叢解析、種に関わらず存在する微生物の量を測定する総微生物量解析、微生物の活性等を評価する機能解析が存在する。それぞれの分析方法について、個別技術を整理する。

図表 21 土壌微生物分析方法

分析方法		分析できる項目(例)
微生物種別分析 (病原菌密度等)	土壌中に存在する特定の微生物を定量的に分析する方法。 顕微鏡を用いて目視で計測する方法やサンプル中に存在する対象微生物のDNA量から微生物量を測定する方法が存在する。	● 病原菌密度
微生物叢解析	土壌中に存在する微生物の種類を分析する方法。微生物の種類数のみ分析する方法とメタゲノム解析のように各種微生物の割合も明らかにする分析方法等が存在する。 従来の手法では培養法によりコロニーを観察し、微生物の大まかな種類や存在量・比を計測していた。	● 土壌微生物群集構造 ● 多様性指数
総微生物量解析	土壌中に存在する微生物の総量を定量的に分析する方法。土壌中に存在する微生物のDNA量から微生物量を測定する手法や染色して観察する方法などがある。 土壌中のDNAを分析する方法では、培養できない微生物の測定も可能である。	● 総微生物量
機能解析	土壌中に存在する微生物による資化活性や硝化/脱窒反応の活性、植物ホルモン生成能等を分析する方法。	● 微生物活性 ・資化活性 ・植物ホルモン生成能等

(出所) 三菱UFJリサーチ&コンサルティング作成

3.1 微生物種別分析

3.1.1 蛍光 in situ ハイブリダイゼーション法 (FISH 法)

FISH (Fluorescence in situ hybridization) 法は特定微生物種の検出方法の 1 つである。蛍光標識したプローブ⁴⁶を標的遺伝子に結合させ、その蛍光を観察することで目的の微生物等を可視化することができる。サンプル中の原位置における観察が可能であり、蛍光染色された微生物をカウントすることで菌密度を算出することも可能である。

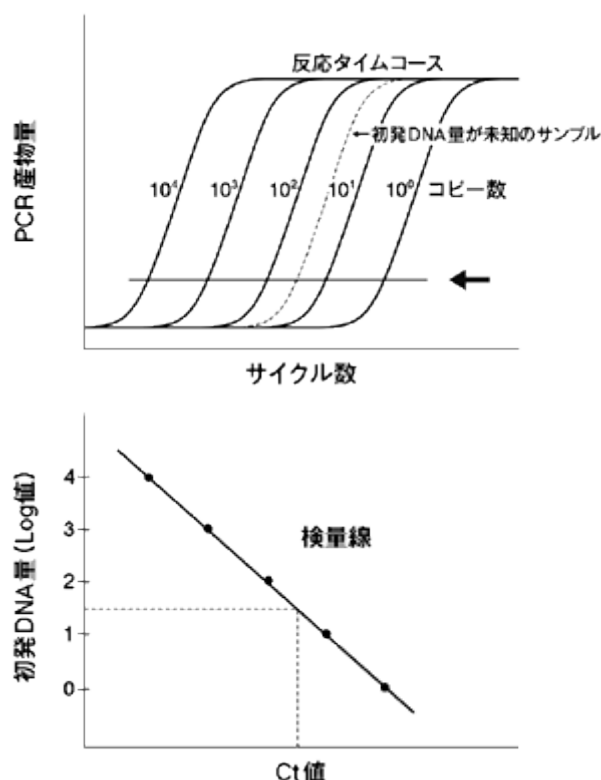
⁴⁶ 特定の塩基配列を持った遺伝子を検出するための一本鎖 DNA 断片のこと。

3.1.1.2 リアルタイム PCR 法⁴⁷

定量 PCR 法の 1 つである。増幅する遺伝子量をリアルタイムでモニタリングし、サンプル中の DNA や RNA 量を測定できる。従来の PCR 法と比較して迅速に結果を得ることができ、土壌の生物性診断では病原菌菌密度の測定等、特定菌種の定量に用いられている。

リアルタイム PCR 法による定量方法では、まず濃度既知のサンプルをスタンダードとして用い、それを段階希釈したもので PCR を行って濃度別に一定の増幅産物量になるサイクル数（図表 22 Ct (Threshold Cycle) 値）を求め、検量線を作成する。目的遺伝子の DNA 量が未知のサンプルについても同様に一定の増幅産物量になるサイクル数（Ct 値）を求め、サンプル中の遺伝子量を定量する。リアルタイム PCR のモニターには蛍光試薬が用いられる。⁴⁸

図表 22 リアルタイム PCR 法における検量線作成方法



(出所) タカラバイオ社ホームページ「リアルタイム PCR の原理」(2019.11.13 閲覧)
(http://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic_info.php?unitid=U100009037)

⁴⁷ 関係者ヒアリングより

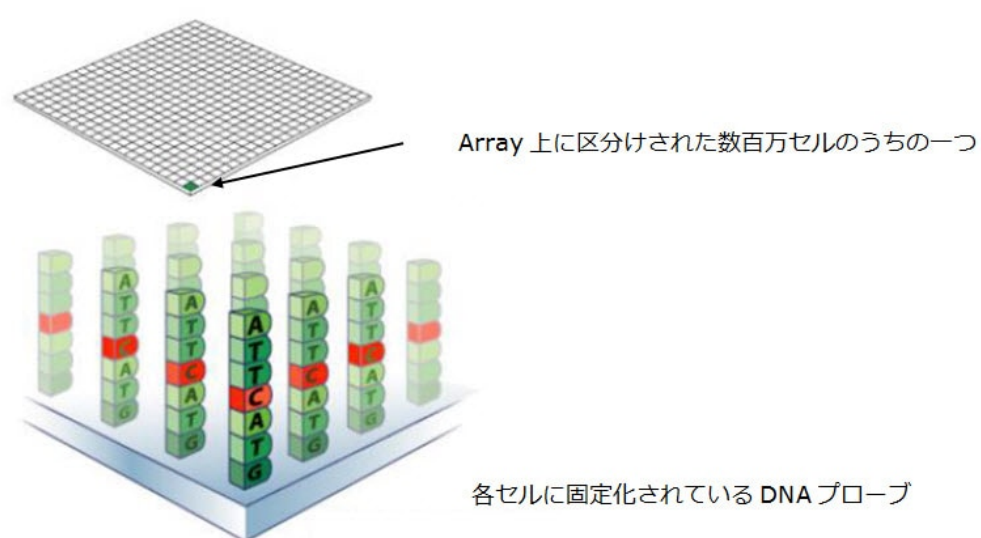
⁴⁸ タカラバイオ社ホームページ「リアルタイム PCR の原理」(2019.11.13 閲覧)
(http://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic_info.php?unitid=U100009037)

3.1.3 DNA マイクロアレイ法

DNA プローブをガラス板等の上に高密度にスポットしたものが DNA マイクロアレイである。DNA マイクロアレイ法では、サンプル中の目的遺伝子を蛍光標識し、ガラス板上のプローブと結合すると発光する蛍光の強度を分析することで目的の遺伝子量を測定可能である。

ガラス板上に複数のプローブをスポットするため、多数の遺伝子を同時に検出可能であり、発光パターンを見ることで簡易、迅速に病原菌等の検出・同定が可能になる。

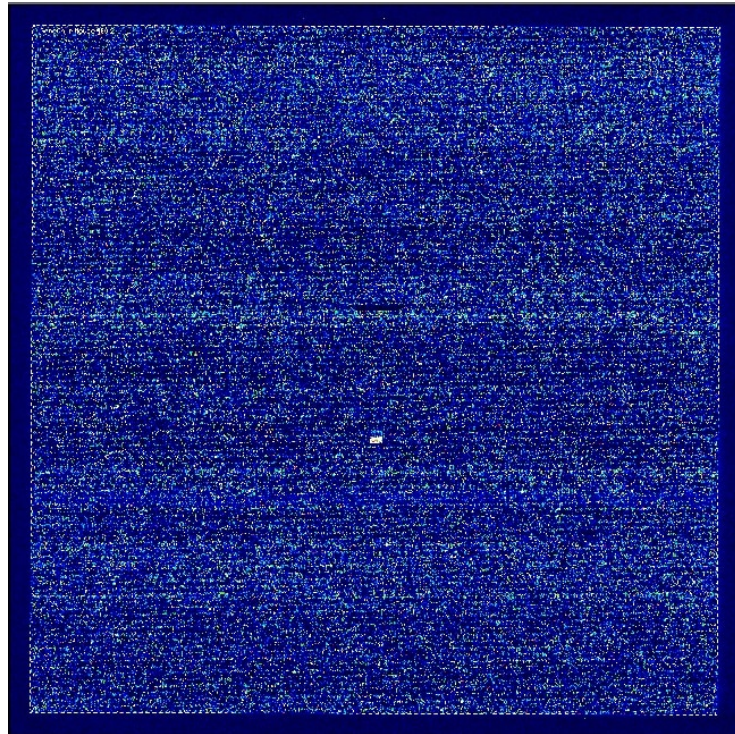
図表 23 マイクロアレイの拡大図



(出所) Thermo Fisher Scientific 社ホームページ「マイクロアレイとは? | マイクロアレイを用いた発現解析の原理と解析方法」(2019.11.13 閲覧)

(<https://www.thermofisher.com/blog/learning-at-the-bench/start-microarray/>)

図表 24 マイクロアレイを読み取った際の画像例



(出所) Thermo Fisher Scientific 社ホームページ「マイクロアレイとは？ | マイクロアレイを用いた発現解析の原理と解析方法」(2019.11.13 閲覧)
(<https://www.thermofisher.com/blog/learning-at-the-bench/start-microarray/>)

3.1.4 ナノポア/マイクロポアセンサ⁴⁹

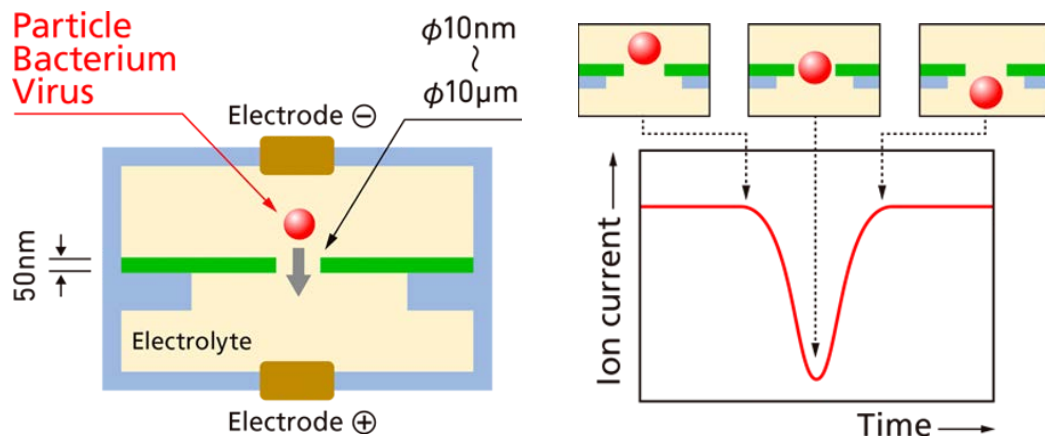
ナノポア/マイクロポア⁵⁰センサは、孔を微生物が通過する際のイオン電流の変化を見ることで微生物の種類を特定することが可能である。このナノポア/マイクロポアによる分析技術は微生物の遺伝子配列を読むことなく微生物種の同定ができることが特徴である。

ナノポア/マイクロポアセンサでは、ナノポア/マイクロポアが作製された基盤の上下に電極を設置し、電極間のイオン電流を計測している。ウイルスや細菌等の微生物が侵入するとイオンの流れが遮られ、計測されるイオン電流が減少する。イオン電流変化には微生物の体積、表面構造、表面電荷の情報が含まれていることが理論的な検証及びこれまでのシミュレーションから明らかになっており、機械学習を用いて個々の微生物に特有な電流変化を検出することで微生物種の特定を高精度で行うことが可能である。

⁴⁹ 関係者ヒアリングより

⁵⁰ 絶縁膜に直径数 μm ～ 数十 nm の直径の貫通孔をマイクロポア、ナノポアという。

図表 25 ナノポア/マイクロポアセンサの原理イメージ図



(出所) アイポア株式会社ホームページ (2019.11.13 閲覧)
(<https://aipore.com/>)

3.1.5 ナノギャップナノポアシーケンサー（研究開発段階）⁵¹

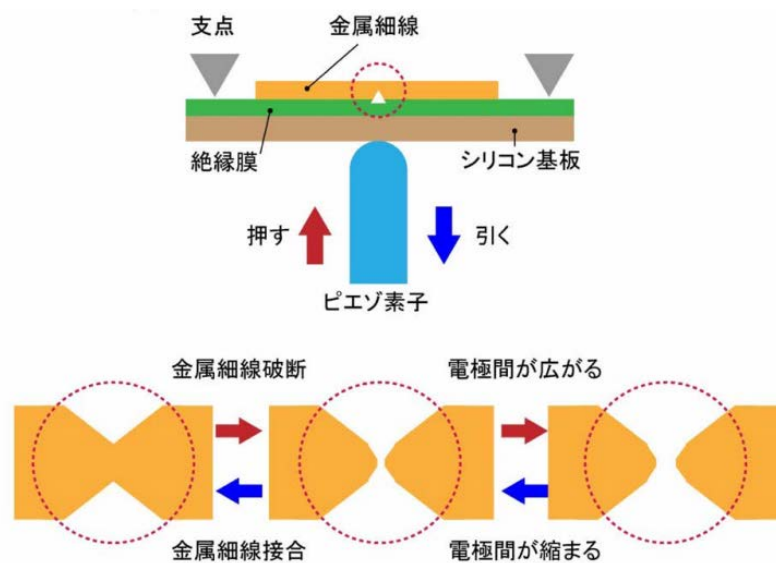
ナノポアシーケンサーは電流を用いて遺伝子の分子情報を直接読み取る分析方法である。ナノギャップナノポアシーケンサーは 1nm の穴にトンネル電流⁵²を流し、そこを遺伝子塩基が通過するときの電気抵抗を測定している。塩基分子ごとに電気抵抗が異なることを利用して塩基を識別し、塩基配列を決定することが可能である。

ナノギャップナノポアシーケンサーでは塩基を 1 つずつ計測するため、標準サンプルなしで定量解析を行うことが可能になる。また、DNA、RNA 等の塩基分子だけでなく、アミノ酸分子や修飾塩基分子を測定することができる点が特徴である。

⁵¹ 関係者ヒアリングより

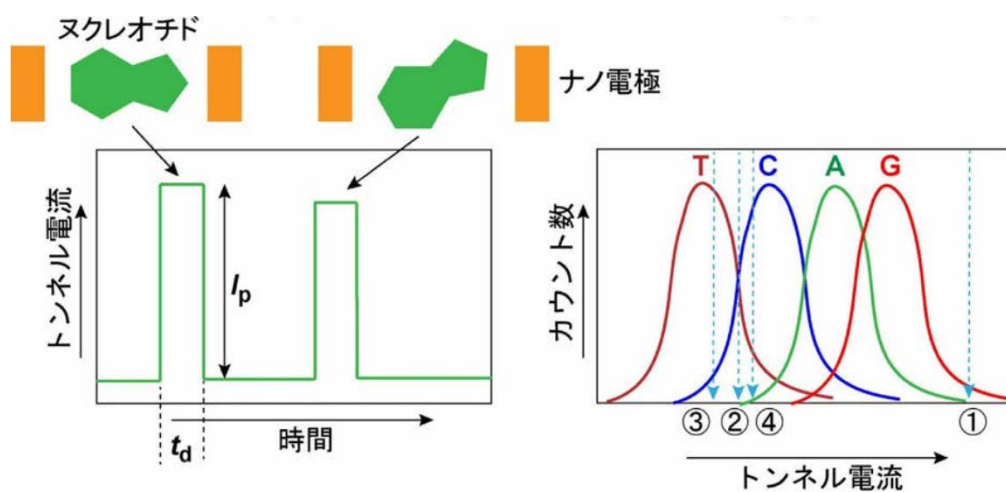
⁵² 「真空中に置かれた 2 つの金属の間隔を 1nm ほどに狭めると金属中の電子は励起エネルギーを受け取らなくても金属間の真空障壁を通り抜けて両者の間を容易に行き来できるようになる。これが量子力学的トンネル効果であり、量子である電子が金属固体という容器からわずかにしみだしているために発現する現象である。2 つの金属を接近させた状態でその間に電圧を印加すればトンネルする電子の流れが正味として一方向になり、その流れは電流として計測できる（これをトンネル電流とよぶ）。」（引用）富取正彦「走査型トンネル分光法の基礎」（http://microscopy.or.jp/jsm/wp-content/uploads/publication/kenbikyo/43_1/pdf/43-1-46.pdf）

図表 26 ナノギャップ作製方法



(出所) 谷口正輝「1 分子シーケンサーの現状と可能性」日本農芸化学会化学と生物 Vol.54, No.6, p396-402 (2016)

図表 27 1 塩基分子の計測



(出所) 谷口正輝「1 分子シーケンサーの現状と可能性」日本農芸化学会化学と生物 Vol.54, No.6, p396-402 (2016)

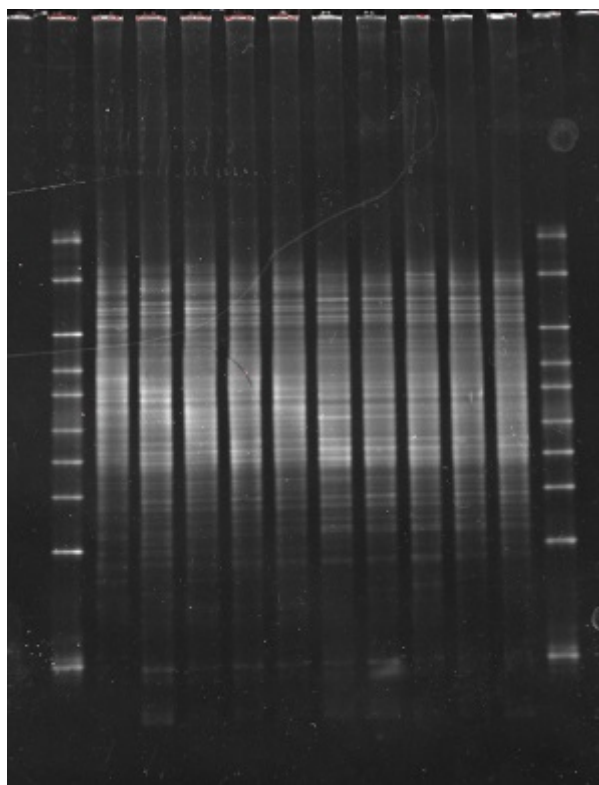
3.2 微生物叢解析

3.2.1 DGGE 法 (Denaturing gradient gel electrophoresis, 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法) ⁵³

DGGE 法は二本鎖 DNA を塩基配列の違いにより分離する電気泳動法である。DGGE 法では変性剤の濃度により二本鎖 DNA の分離位置が異なることを利用し、変性剤の濃度勾配があるゲルを用いて異なる遺伝子配列をバンドとして分離することができる。

PCR 法を組み合わせた PCR-DGGE 法では、16SrRNA 遺伝子等を増幅後解析することで菌叢解析が可能である。PCR-DGGE 法だけでは微生物種の同定はできないが、ゲルからバンドを切り取って回収し、シーケンス解析を行うことにより直接的に同定することは可能である。

図表 28 土壌細菌相の解析例



(注) 図中のバンドごとに遺伝子配列が異なり、バンドの数はサンプル中の細菌数に相当する。微生物種ごとに詳細な分析を行う場合にはゲルから該当するバンドを切り出し、シーケンス解析等を行う。

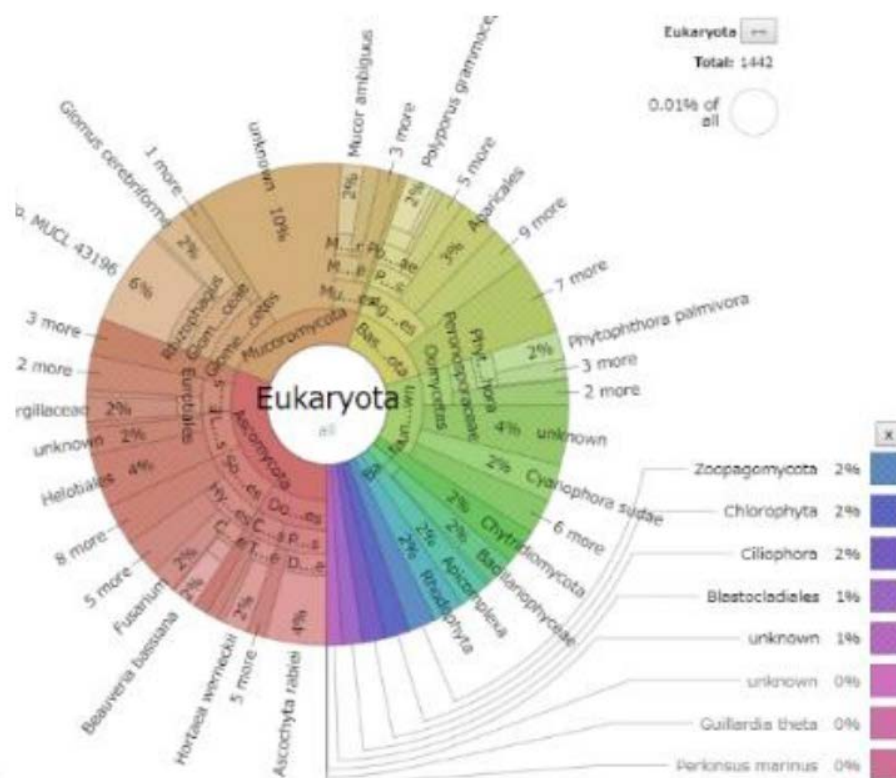
(出所) 株式会社リーゾ「土壌 DNA 検査サービス (PCR-DGGE 法) 株式会社リーゾ」
(2019.11.13 閲覧) (<http://rizo.co.jp/dojoukensa.html>)

⁵³ 関係者ヒアリングより

3.2.2 メタゲノム解析

メタゲノム解析は、サンプル中の全ゲノム配列を網羅的に分析する方法である。微生物の分離や培養をせずに直接ゲノム配列を分析するため、従来の方法では困難であった難培養性微生物のゲノム情報の取得を期待できるほか、菌叢の遺伝子組成や機能解析が可能である。

図表 29 メタゲノム解析による系統分類結果例



(出所) タカラバイオ株式会社ホームページ「メタゲノム解析」(2019.11.13)
(http://catalog.takara-bio.co.jp/jutaku/basic_info.php?unitid=U100007017)

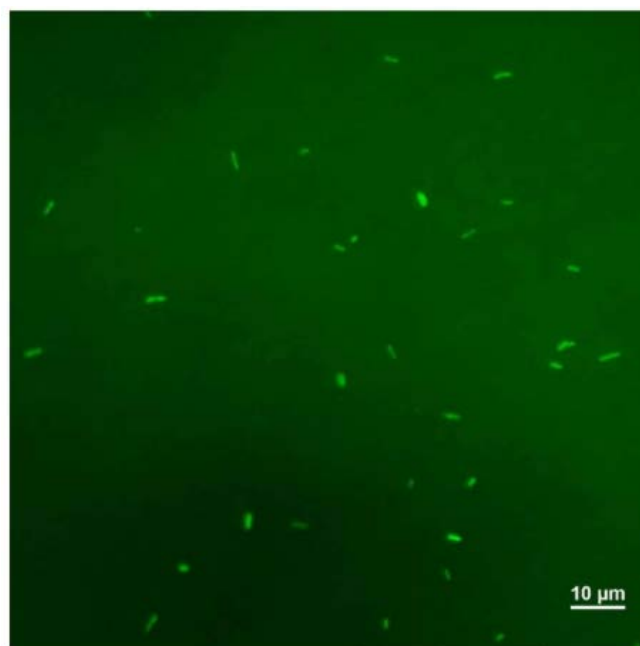
3.3 総微生物量分析

3.3.1 蛍光染色法による菌数測定

サンプル中微生物を、蛍光染色試薬を用いて染色し、菌数を測定する方法である。核酸やたんぱく質等の細胞内の成分を蛍光染色し、蛍光顕微鏡を用いて検出、菌数の計測を行う。

核酸を染色する方法では死菌も含めた全菌が染色されるため、全菌数の計測が可能である。呼吸活性や酵素活性を検出可能な蛍光染色試薬を使用することで、生菌のみの染色及び計測も可能である。

図表 30 蛍光染色試薬 SYBR Green I による微生物染色例



(出所) 株式会社テクノスルガ・ラボホームページ「菌数測定(蛍光染色法)」(2019.11.25 閲覧)
(<https://www.tecsrg.co.jp/services/microbiological/other/cell-count-fluorescent/>)

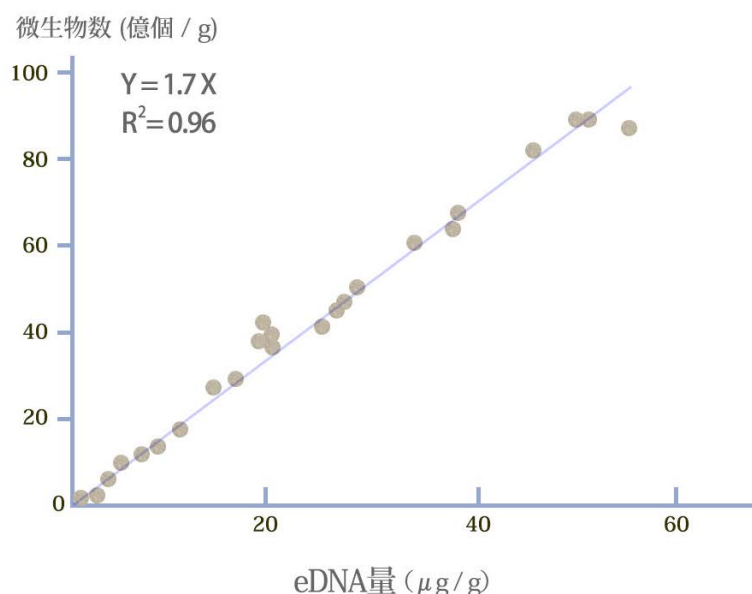
3.3.2 環境遺伝子 (eDNA) 解析法

土壌中の eDNA 量を計測することにより、土壌中の微生物量を定量する方法である。eDNA 量は、DAPI 染色⁵⁴し直接顕微鏡を用いて観察・計測した微生物数と強い相関があることが明らかになっており、この相関関係を利用し eDNA 量から微生物数を算出することが可能である。

eDNA 解析法では、従来の平板培養法や染色した微生物を観察する顕微鏡観察法等と比較して、簡便かつ迅速に微生物量を測定することができる。また、培養等を行わず、土壌中の DNA 量から微生物量を測定するため、難培養性微生物を含めた微生物量の測定が可能である。

⁵⁴ 青色蛍光を発する蛍光染色試薬 (DAPI) を用いて核を染色する方法。

図表 31 DAPI 染色法によって検鏡された土壌細菌数と eDNA 量の関係



(出所) SOFIX 農業推進機構ホームページ「SOFIX とは」(2019.11.13 閲覧)
(<https://sofixagri.com/sofix/>)

3.4 機能解析

3.4.1 土壌分析多様性・活性値分析

有機物分解能のある微生物群の解析が可能な分析方法である。土壌微生物多様性・活性値とは、土壌中に生息する微生物群集の有機物分解能力の多様性と高さを数値としてあらわしたもので、2010年に有限会社ディージェーシー総合研究所で実用化された⁵⁵。現在は株式会社 DGC テクノロジー社が本手法を用いた分析サービスを提供している。

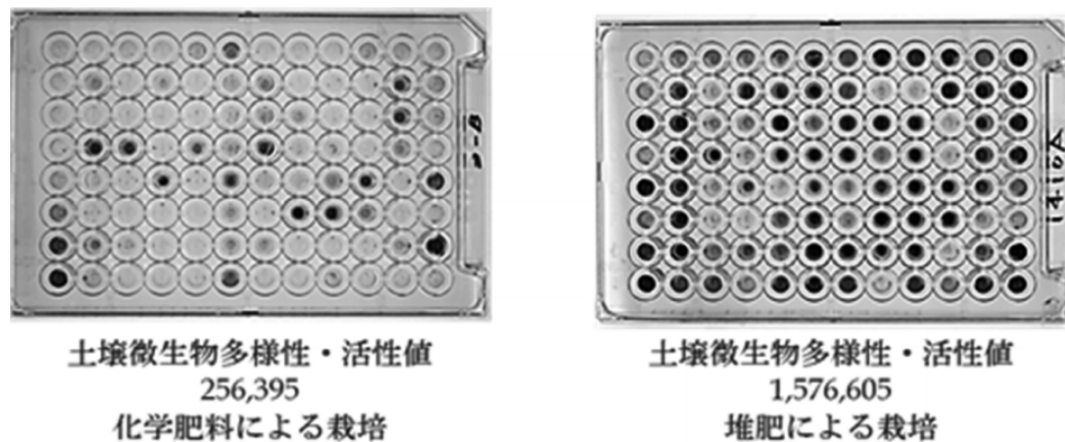
本手法では、有機物と CO₂ に反応して着色する試薬がウェル⁵⁶に入ったプレートを用いる。各ウェルに微生物を含むサンプルを滴下後、微生物により有機物が分解されて CO₂ が生成されると着色し、有機物分解能が可視化されるようになっている。

土壌中に存在する病原菌等の働きは明らかになっているが、その他土壌微生物の機能の多くは解明されていない。遺伝子解析手法のみでは、微生物種の同定はできても微生物の機能を明らかにすることが難しいが、この分析方法では土壌微生物の機能を測定することが可能である。

⁵⁵ (引用) 櫻本直美「土壌の生物性評価法「土壌微生物多様性・活性値」について」
(https://www.jstage.jst.go.jp/article/sicejl/52/8/52_679/_pdf)

⁵⁶ 試薬やサンプルを入れるくぼみや穴のこと。

図表 32 分析後の GN2 プレート ⁵⁷ (Biolog 社製)



(出所) 櫻本直美「土壌の生物性評価法「土壌微生物多様性・活性値」について」計測と制御第52巻, 第8号, p679-683 (2013)

3.4.2 熱測定法（研究開発段階）⁵⁸

微生物熱測定法とは、微生物が炭素源資化（炭素源を栄養源として利用すること）の際に発する熱の熱量を測定し、発熱過程を連続したデータとして得る方法である。

微生物が栄養源を消費する活性を測定できるため、食品の腐敗過程等の解析に用いられることもある。本手法では複数の炭素源を用意し、土壌微生物の資化性や炭素源の資化過程を測定する。DNA 抽出等の操作が必要なく、採取した土壌をそのまま用いて活性や機能を分析することができる。微生物の発熱過程をデータとして取得することができるため、サンプル中の微生物活性を数値的に解析、評価することが可能である。

⁵⁷ グラム陰性菌用マイクロプレート。（グラム陰性菌とは、紫色色素を用いて染色（グラム染色）後脱色すると赤色に見える菌である。グラム陽性菌は脱色しても色が抜けず、紫色に見える。これは細胞壁構造の違いに起因する。）

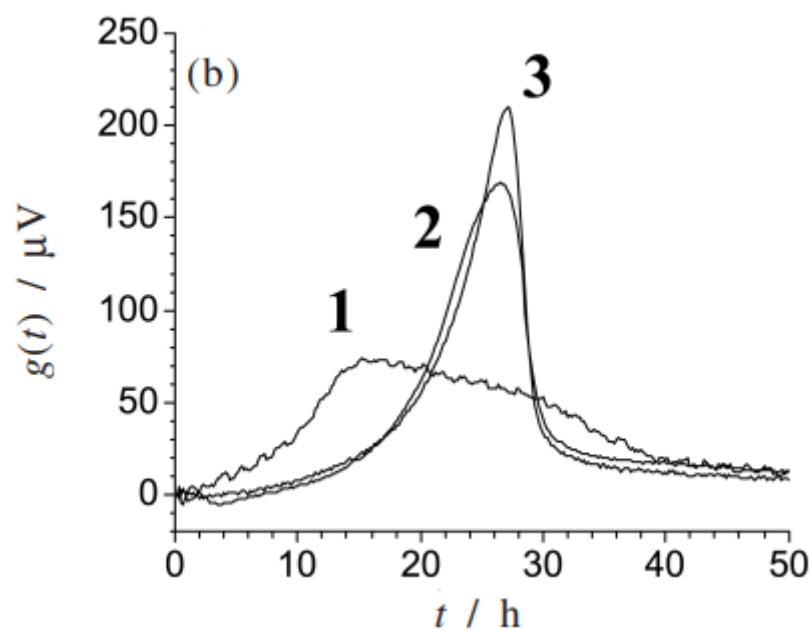
⁵⁸ 関係者ヒアリングより

図表 33 熱測定装置と土壌試料



(出所) 三重大学産学マッチングナビ「微生物の増殖過程を熱測定で経時的に自動計測」
(2019.11.14 閲覧)
(<http://www.crc.mie-u.ac.jp/matching-navi/html/detail.php?no=20170511124747#>)

図表 34 グルコースを加えたサンプルの発熱過程



(注) グルコース 0.10 mmol を加え、25℃で計測を行った。

1) 水田土壌サンプル、2) 高地土壌サンプル、3) 果樹園土壌サンプル

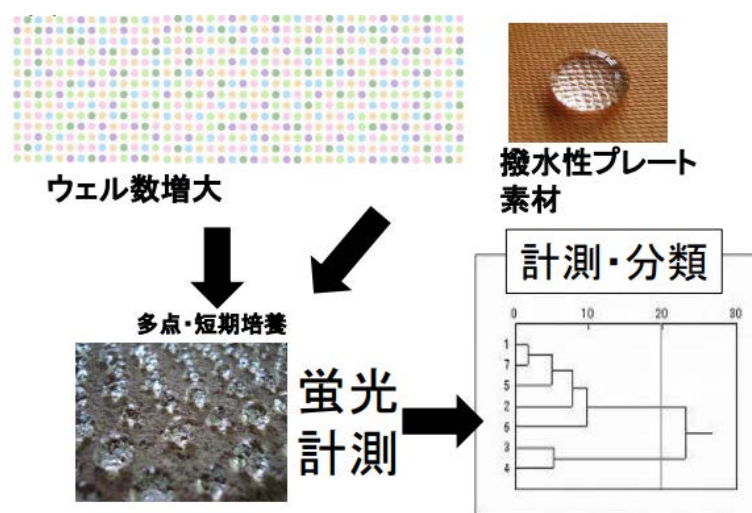
(出所) 坂宮章世ら「熱測定法による、土壌微生物活性への土壌ストレス物質の影響の解析－塩化ナトリウムによるグルコース資化抑制効果－」(2008)

3.4.3 多点培養プレート（研究開発段階）⁵⁹

現在微生物の資化性分析で用いられている Biolog 法⁶⁰は、プレートに配置された 96 の穴にそれぞれ炭素源を配置し、分析対象とする微生物群を調整液に懸濁させた土壌懸濁液を培養して発色させ、その増殖パターンから微生物の資化性を分析することができる。しかしアメリカの Biolog 社の製品である Biolog プレートは菌種ごとにプレートが異なり、目的ごとに購入するには価格が高く、また各ウェルに滴下する手間がかかるといった課題があった。信州大学井上直人教授の開発している多点培養プレートでは Biolog プレートに比べ高密度に培養スポットを配置しており、低コストかつ短期間の培養で微生物の活性が測定可能である。

多点培養プレートは、プレパラートサイズ程度のプレート 1 枚の上に 100～1,000 のスポットを作成することができ、そこに様々な栄養源を配置可能である。また、培養プレートのウェル間は撥水コーティング処理がされており、Biolog 法のように個々のスポットに滴下する作業が必要ない。1～2 日培養後、発色試薬等は使用せず自家蛍光を測定し、そのパターンからサンプル土壌中微生物の有機物分解能等を分析可能である。プレート上のウェルは自由に設計できるため、土壌微生物評価に対応させ、植物ホルモン前駆体⁶¹を用いて植物ホルモン生成能を評価することも可能である。

図表 35 撥水コーティング処理がされた多点培養プレート



（出所）JST ホームページ「2019 年 1 月 29 日 計測 新技術説明会 1）農地の健康を守る！土壌微生物培養プレート」（2019.11.14 閲覧）

（https://shingi.jst.go.jp/list/chizaigun/2018_chizaigun.html）

⁵⁹ 関係者ヒアリングより

⁶⁰ Biolog 社の Biolog プレートを用いて微生物を分析する方法

⁶¹ 植物ホルモンになる前段階の物質。トリプトファン（Tryptophan）やメチオニン（Methionine）等。微生物の働きにより植物ホルモンになる。（トリプトファンからオーキシン、メチオニンからエチレンが生成される。）

3.5 その他土壌微生物分析に関わる技術

3.5.1 バイオインフォマティクス

バイオインフォマティクスはバイオ（生命科学分野）とインフォマティクス（情報科学分野）が融合した学術分野を指す。近年農学分野でも分析技術の発展により膨大かつ多様なデータが取得可能になったため、データ解析を行うインフォマティクス技術への関心が高まっている。

バイオインフォマティクスは主にゲノム情報の解析、タンパク質の構造・機能の解析、オミクス解析の領域に大きく分けられる⁶²。農地土壌分野では、多様な土壌微生物から得られる膨大なデータを解析して微生物を同定するため、ゲノム情報の解析が注目されてきた。しかし近年では土壌微生物のデータだけでは微生物が作物の生育に与える影響やその因果関係が不明であるとして、作物の生育状況のデータも含めたオミクス解析が注目されている。

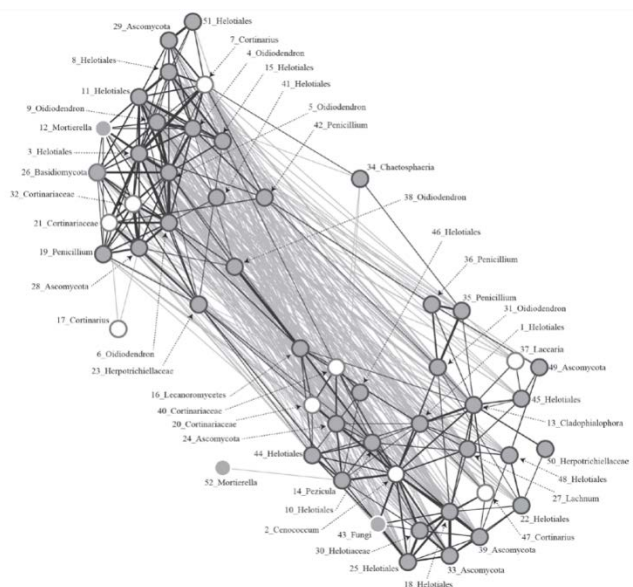
ゲノム情報の解析は現在、シーケンサーの発達とともに塩基配列の決定及び微生物の同定に必要不可欠な技術となっている。今後次世代シーケンサー等の発達によりさらに多くのデータ取得が見込まれ、ゲノム情報の解析技術の重要性は増すと考えられる。

オミクス解析は様々な情報を用いて生命現象や反応機構の解析を行うデータ解析方法である。農業分野では近年作物の生育に影響を与える要因を明らかにする方法として関心が高まっており、微生物叢や菌種の情報だけでなく、土壌の化学性や物理性、作物生育状況等の情報をもとにしたオミクス解析が進められている⁶³。

⁶² （参考）特定非営利活動法人日本バイオインフォマティクス学会 ホームページ（2019.11.20 閲覧）
（<https://www.jsbi.org/nintei/shutsudai/>）、清水謙多郎「バイオインフォマティクスの現状と動向」
（<https://www.chart.co.jp/subject/joho/inet/inet09/inet09-1.pdf>）

⁶³ 関係者ヒアリングより

図表 36 微生物－微生物ネットワーク



(注) 黒い線で結ばれた真菌 OTU ⁶⁴ oughしは、同じ宿主個体内で頻繁に共存している。

灰色の線で結ばれた OTU oughしは、同じ宿主から検出されることがほとんどない。

(出所) 東樹宏和「総説 - 微生物が織りなす複雑ネットワーク」日本微生物生態学会誌 32 巻 2 号, p51-57(2017)

⁶⁴Operational taxonomic unit の略称。塩基配列の類似性から分類したときの単位のこと、OTU ごとに菌種を決定する。