

植物細菌病の血清学的診断に関する研究

I. 数種 *Xanthomonas* 属菌の凝集法およびゲル内拡散法における抗原抗体反応の特異性

小畑 琢志・坪井 福俊

横浜植物防疫所調査課

まえがき

植物細菌病の診断同定は病徴のみによっては正確を期しがたく、罹病組織から病原細菌を分離培養して検討しなくてはならないことが多い。これには細菌学に関する専門の知識技術が要求されるばかりでなく、一般に多くの労力と時間を必要とするため、迅速性を要求する植物検疫における検査方法としてはきわめて非能率的である。これに対して抗原抗体反応の特異性を応用する血清学的診断法は、手技も比較的にかんたんであり、診断の結果も早く得られ、個人差も少ないなどの利点を備えており、植物検疫の分野では非常に利用価値の高い方法と考えられる。

抗血清を細菌病の診断同定に応用した事例には早くから幾多の研究がある。またこれらの研究において利用された血清学的手技としては、スライド凝集法、試験管内凝集法、凝集法の変法としてのマイクロ凝集法、比較的最近になってゲル内拡散法、蛍光抗体法など各種の方法がある。著者らは植物検疫において抗血清の応用分野と使用方法の開発をはかる立場から、すでに内外において利用されている個々の血清学的手技の特徴と、それによって得られる抗原抗体反応の特異性をあらかじめ十分に把握しておく必要があると考え、まず数種の *Xanthomonas* 属菌を主体として供試し、スライド凝集法、試験管内凝集法および寒天ゲル内拡散法の3法における抗原抗体反応の特異性を比較検討した。

本稿を草するにあたり、供試菌の分譲を受けた農業技術研究所富永時任博士、脇本哲博士、土屋行夫技官の各氏に謝意を表す。

材料および方法

供試菌および抗血清の力価は第1表に示すとおりである。供試菌は当所保存の *Xanthomonas hyacinthi* を除

本論文の要旨は1971年度日本植物病理学会(昭和46年4月仙台市東北工業大学)において発表した。

き、すべて農業技術研究所から分譲を受けたものである。抗血清の作製には、各供試菌のPSA斜面2日間/25°Cの培養1本に生理食塩水5mlを加えて懸濁した菌液を免疫抗原とした。この抗原を家兎の耳静脈から、4日おきに1ml、2ml、3mlと漸増させて注射し、4回目以後は兎の健康状態と部分採血による力価の上昇具合を勘案しながら、1~3mlの範囲で注射抗原量を調節し、最終回の注射から1週間後に全採血をおこなって抗血清を採取した。注射回数は通常計4~5回である。抗血清は凍結して保存し、必要に応じて取り出して実験に使用した。

スライド凝集法 反応抗原としては前述の免疫抗原に

第1表 供試菌とその抗血清の力価

| 供 試 菌 | 菌株番号 | 力価 |
|--|---------|-------|
| <i>Xanthomonas</i> 属 8 種 | | |
| <i>X. citri</i> (HASSE) DOWSON | N6119 | 5120 |
| <i>X. oryzae</i> (UEDA et ISHIYAMA) DAWSON | H5809 | 5120 |
| <i>X. pruni</i> (SMITH) DOWSON | X1-10-1 | 5120 |
| <i>X. phaseoli</i> f. sp. <i>sojense</i> (HEDGES) SABET | X1-7-1 | 5120 |
| <i>X. campestris</i> (PAMMEL) DOWSON | X1-1-1 | 5120 |
| <i>X. hyacinthi</i> (WAKKER) DOWSON | PQ-1 | 5120 |
| <i>X. translucens</i> f. sp. <i>hordei</i> HAGBORG | X1-11-2 | 320 |
| <i>X. cucurbitae</i> (BRYAN) DOWSON | X1-3-1 | 1280 |
| <i>Erwinia</i> 属 2 種 | | |
| <i>E. aroideae</i> (TOWNSEND) HOLLAND | E1-1-7 | 640 |
| <i>E. carotovora</i> (JONES) HOLLAND | E1-2-2 | 51200 |
| <i>Pseudomonas</i> 属 2 種 | | |
| <i>P. phaseolicola</i> (BURKHOLDER) DOWSON | P1-14-2 | 1280 |
| <i>P. solanacearum</i> (SMITH) SMITH | P1-18-2 | 3200 |
| <i>Corynebacterium</i> 属 1 種 | | |
| <i>C. sepedonicum</i> (SPIECK. et KOTTH) SKAPTASON et BURKHOLDER | 17-4 | 160 |

注：力価は試験管内凝集法による。

準じて調製した各供試菌の生理食塩水懸濁液を用いた。抗血清は非動化しないまま、力価の大小にかかわらずいづれも生理食塩水で10倍に稀釈したものを使用した。抗血清と抗原は毛細ピペットを用いて各2滴づつをスライド上で混和し、3分間以内に生ずる凝集の有無、程度をもって判定した。なお抗原としては生菌のほか、これを100°Cで30分間加熱した抗原についても検討し、加熱による特異反応および非特異反応の増減を観察した。

試験管内凝集法 各供試菌の抗原は生菌、加熱菌ともに前記のスライド凝集法の場合と同一の方法により調製した。各抗血清は生理食塩水を用いて10倍から倍数稀釈をおこない、血清用小試験管内において稀釈抗血清1mlと抗原0.05mlをよく混和したのち、35°Cに2時間静置し、さらに室温に一夜放置後凝集反応を観察した。

寒天ゲル内拡散法 寒天ゲルは純水に精製粉末寒天1.5%、着色剤としてメチルオレンジ0.002%、防腐剤としてフェノール0.5%もしくは窒化ナトリウム0.1%を加え、pH7.8に修正して用いた。ゲル平板は内径6cmのペトリ皿に8mlの寒天を注入してひろげ、径8mmの井戸を中央に1個、周囲に等間隔に6個作製した。中央の井戸と周囲の井戸との間隔は予備実験の結果6mmとした。抗原としてはPSA斜面の25°C、3~7日間培養

に3~5mlの生理食塩水を加えて懸濁した濃厚生菌液および加熱の影響を調べるため、これを100°C、30分間煮沸したものを用いた。抗血清はすべて稀釈しない原液を用い、これを中央の井戸に、抗原を周囲の井戸に充填した。反応は30~35°Cの湿室内でおこない、7~10日間にわたり発現する沈降反応を観察した。

結果および考察

A スライド凝集法

各抗血清に対し供試菌の生菌抗原の示した交互凝集試験の結果は第2表のとおりである。すべての抗血清とその対応抗原菌種 (Homologous antigen species) との間にはつねに最も強い凝集反応が観察された。しかし一方 *X. oryzae*, *E. aroideae*, *P. phaseolicola*, *C. sepedonicum* の各抗血清を除く、他の抗血清では対応抗原以外の菌種との間にも交叉凝集がかなりの頻度で発現した。このような非特異凝集は [*X. campestris* 抗血清 × *E. carotovora*], [*X. hyacinthi* 抗血清 × *P. phaseolicola*], [*X. cucurbitae* 抗血清 × *P. phaseolicola*] の場合のように特異凝集と区別つかない凝集の見られるものがあるが、一般には凝集反応は弱く、凝集物の粒子もこまかい

第2表 スライド法による交互凝集反応 (生菌抗原)

| 抗原菌種 | <i>X. citri</i> | <i>X. oryzae</i> | <i>X. pruni</i> | <i>X. phaseoli</i> f. sp. <i>sojense</i> | <i>X. campestris</i> | <i>X. hyacinthi</i> | <i>X. translucens</i> f. sp. <i>hordei</i> | <i>X. cucurbitae</i> | <i>E. aroideae</i> | <i>E. carotovora</i> | <i>P. phaseolicola</i> | <i>P. solanacearum</i> | <i>C. sepedonicum</i> |
|--|-----------------|------------------|-----------------|--|----------------------|---------------------|--|----------------------|--------------------|----------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|
| <i>X. citri</i> | ● | | ◎ | ◎ | ◎ | | ◎ | | | | | | ◎ |
| <i>X. oryzae</i> | | ● | | | | | | | | | | | |
| <i>X. pruni</i> | | | ● | | | | | | | | | | |
| <i>X. phaseoli</i> f. sp. <i>sojense</i> | | | | ● | ◎ | | | | | | | | |
| <i>X. campestris</i> | | | | | ◎ | ● | | | | | | | |
| <i>X. hyacinthi</i> | | | | | ◎ | ● | | ◎ | | ◎ | | | |
| <i>X. translucens</i> f. sp. <i>hordei</i> | ◎ | | ◎ | ◎ | | | ● | | | | | ◎ | |
| <i>X. cucurbitae</i> | | | | | ◎ | ◎ | ◎ | ● | | | | | |
| <i>E. aroideae</i> | | | | | | | | | ● | | | | |
| <i>E. carotovora</i> | | | | | | | | | | ● | | | |
| <i>P. phaseolicola</i> | | | | | | ● | | ● | | | ● | | |
| <i>P. solanacearum</i> | ◎ | | ◎ | | | | | | | | | ● | |
| <i>C. sepedonicum</i> | | | | | | | | | | | | | ● |

注：● 反応強、◎ 反応中位、○ 反応弱、空白は反応陰性
 正常血清に対する各抗原菌種の反応はいずれも陰性

ものが多かった。交叉凝集には大別してふたつの場合がある。ひとつは抗原と抗体を逆にしても同様に起こる場合で、本実験では [*X. translucens hordei* × *X. citri*], [*X. campestris* × *X. phaseoli sojense*], [*X. cucurbitae* × *X. hyacinthi*], [*P. solanacearum* × *X. citri*], [*E. aroideae* × *X. campestris*] の計 5 例が観察された。他のひとつは抗原と抗体の組合せのどちらか一方にのみ起こる場合で、本実験では計 12 例が数えられた。交叉反応が抗原と抗体との間で相互に生ずる前者の場合は、一方にしか生じない後者の場合に比して菌種間の血清学的類属性が高いとすることができる。交叉凝集には相互的 (Reciprocal) なものよりも、非相互的なものが非常に多いことから、抗原抗体反応の特異性は抗体の側から眺めた場合と抗原の側から眺めた場合とで著しく様相を異にする。たとえば *X. pruni* 抗血清は *X. translucens hordei*, *X. citri*, *P. solanacearum* の各菌を非特異的に凝集させるのに対し、*X. pruni* 菌そのものは本菌の抗血清以外とは反応しないこと、逆に *P. phaseolicola* 抗血清は対応抗原菌以外には反応しないのに、本菌は *X. hyacinthi* 抗血清および *X. cucurbitae* 抗血清によって非特異的に凝集されることなどはこの顕著な例である。このような現象が本来各菌種に固有の生体内あるいは生体

外抗原性の差異を示しているものか、抗血清の作製に用いた兎の抗体産生能の個体差によるものか、あるいはさらに他の原因が関与しているかどうかは、本実験の限りでは明らかでない。本実験の範囲では生菌抗原の場合、*X. oryzae*, *E. aroideae*, *C. sepedonicum* の 3 種およびその抗血清には交叉凝集が検出されず、抗原および抗体の特異性の高いことが認められた。

加熱抗原によるスライド凝集法の結果は第 3 表に示す。加熱によって交叉反応の発現頻度が特に増加する傾向は認められないが、個々の抗原菌種についてみると *X. pruni*, *P. phaseolicola* のように加熱の影響をまったく受けないもの、*P. solanacearum* のように交叉凝集の消失するもの、*X. phaseoli*, *X. hyacinthi*, *E. aroideae* のように特異凝集自体も反応が弱まるものなどが認められた。加熱によって熱に不安定な抗原 (Thermolabile antigen) は大部分不活化されているとすれば、本実験の結果は細菌の抗原抗体反応が菌種により耐熱性の抗原と易熱性の抗原が種々の程度に関与していることを示すものである。

B 試験管内凝集法

交互凝集の結果を反応終末点に相当する抗血清の稀釈段階数で示すと、生菌抗原の場合は第 4 表のとおりであ

第 3 表 スライド法による交互凝集反応 (加熱抗原)

| 抗原菌種 | 抗血清 | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------------------------|----------------------|---------------------|-------------------------------------|----------------------|--------------------|----------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|
| | <i>X. citri</i> | <i>X. oryzae</i> | <i>X. pruni</i> | <i>X. phaseoli f. sp. sojense</i> | <i>X. campestris</i> | <i>X. hyacinthi</i> | <i>X. translucens f. sp. hordei</i> | <i>X. cucurbitae</i> | <i>E. aroideae</i> | <i>E. carotovora</i> | <i>P. phaseolicola</i> | <i>P. solanacearum</i> | <i>C. sepedonicum</i> |
| <i>X. citri</i> | ● | ○ | | ○ | | | ○ | | | | | ○ | |
| <i>X. oryzae</i> | | ● | | | ○ | | | | | ○ | | ○ | |
| <i>X. pruni</i> | | | ● | | | | | | | | | | |
| <i>X. phaseoli f. sp. sojense</i> | | | | ○ | | | | ○ | | | | | |
| <i>X. campestris</i> | | | | | ● | | | | | ○ | | | |
| <i>X. hyacinthi</i> | | | | | | ○ | | ○ | | | ○ | | |
| <i>X. translucens f. sp. hordei</i> | ○ | ○ | | | | | ● | | | | | ○ | |
| <i>X. cucurbitae</i> | | | | ○ | ○ | ○ | | ● | | | | | |
| <i>E. aroideae</i> | | | | | | | | | ○ | | | | |
| <i>E. carotovora</i> | ○ | ○ | | | | | | | | | ● | | |
| <i>P. phaseolicola</i> | | | | | | ● | | ● | | | | ● | |
| <i>P. solanacearum</i> | | | | | | | | | | | | ● | |
| <i>C. sepedonicum</i> | | | | | | | | | | | | ○ | ● |

注：●反応強，○反応中位，○反応弱，空白は反応陰性
 正常血清に対する各抗原菌種の反応はいずれも陰性

第4表 試験管内凝集法による交互凝集反応 (生菌抗原)

| 抗原菌種 | 抗血清 | | | | | | | | | |
|--|-----------------|------------------|-----------------|--|----------------------|---------------------|--|----------------------|--------------------|------------------------|
| | <i>X. citri</i> | <i>X. oryzae</i> | <i>X. pruni</i> | <i>X. phaseoli</i> f. sp. <i>sojense</i> | <i>X. campestris</i> | <i>X. hyacinthi</i> | <i>X. translucens</i> f. sp. <i>hordei</i> | <i>X. cucurbitae</i> | <i>E. aroideae</i> | <i>P. phaseolicola</i> |
| <i>X. citri</i> | 10 | 6 | 4 | 4 | 1 | 4 | 3 | | | |
| <i>X. oryzae</i> | | 10 | 6 | 5 | 3 | | 2 | | | |
| <i>X. pruni</i> | 3 | 10 | 4 | 4 | | 2 | | | | |
| <i>X. phaseoli</i> f. sp. <i>sojense</i> | 3 | 3 | 10 | 5 | | 4 | 6 | | | |
| <i>X. campestris</i> | 4 | 3 | 4 | 5 | 10 | 1 | 5 | 2 | 1 | |
| <i>X. hyacinthi</i> | | | | 4 | 2 | 10 | 6 | 3 | 3 | |
| <i>X. translucens</i> f. sp. <i>hordei</i> | 4 | 4 | 6 | 3 | 4 | | 6 | | | |
| <i>X. cucurbitae</i> | 3 | 6 | 5 | 5 | 6 | | 8 | 2 | 2 | |
| <i>E. aroideae</i> | | | | | 1 | | | 7 | | |
| <i>P. phaseolicola</i> | | | | 2 | | 9 | 3 | 6 | | 8 |

注：数字は反応終末点の希釈段階数 (1=10倍, 2=20倍, 3=40倍, 4=80倍, 5=160倍, 6=320倍, 7=640倍, 8=1280倍, 9=2560倍, 10=5120倍), 空白は反応陰性

る。抗血清と対応抗原菌種との間で見られる特異凝集はいずれも反応終末点が高い。またスライド法において交叉凝集を生じた抗血清と菌種との組合せは、本法においても高い反応終末点を示したが、このほかにも稀釈の比較的高い160倍以上において生ずる交叉凝集が、[*X. cucurbitae* 抗血清×*X. campestris*], [*X. cucurbitae* 抗血清×*X. phaseoli sojense*], [*X. pruni* 抗血清×*X. cucurbitae*], [*X. pruni* 抗血清×*X. oryzae*], [*X. phaseoli sojense* 抗血清×*X. oryzae*] の5例観察され、このうち前三者の場合は抗原抗体の関係を逆にしても同様に発現する相互的の反応であった。交叉凝集は抗体稀釈段階のさらに低い80倍以下ではさらに多く発現した。交叉凝集の発現頻度はこのようにスライド凝集法の場合よりも非常に高いが、そのほとんどは特異凝集よりも反応終末点の低いことから、抗血清を一定以上に稀釈することによってかなり除去できることを示している。

加熱抗原の示す試験管内凝集法の結果は第5表に示す。対応抗原菌による特異凝集の反応終末点は、生菌の場合と同様につねに高いが、*X. phaseoli sojense*, *X. campestris*, *X. hyacinthi*, *X. cucurbitae*, *E. aroideae* では生菌に比して反応終末点が若干低下した。一方で

第5表 試験管内凝集法による交互凝集反応 (加熱抗原)

| 抗原菌種 | 抗血清 | | | | | | | | | |
|--|-----------------|------------------|-----------------|--|----------------------|---------------------|--|----------------------|--------------------|------------------------|
| | <i>X. citri</i> | <i>X. oryzae</i> | <i>X. pruni</i> | <i>X. phaseoli</i> f. sp. <i>sojense</i> | <i>X. campestris</i> | <i>X. hyacinthi</i> | <i>X. translucens</i> f. sp. <i>hordei</i> | <i>X. cucurbitae</i> | <i>E. aroideae</i> | <i>P. phaseolicola</i> |
| <i>X. citri</i> | 10 | 4 | 3 | 4 | 1 | 4 | | | | |
| <i>X. oryzae</i> | | 10 | 1 | 1 | 4 | 1 | 4 | | | |
| <i>X. pruni</i> | 2 | 1 | 10 | 3 | 4 | | 3 | 3 | | |
| <i>X. phaseoli</i> f. sp. <i>sojense</i> | 2 | 1 | 1 | 9 | 4 | 3 | 2 | 3 | | |
| <i>X. campestris</i> | | 1 | 1 | 6 | 9 | | 3 | | | |
| <i>X. hyacinthi</i> | | | | | 3 | 9 | 5 | 3 | | |
| <i>X. translucens</i> f. sp. <i>hordei</i> | 6 | 4 | 4 | 3 | | 9 | | | | |
| <i>X. cucurbitae</i> | | | | 8 | 4 | 8 | 6 | | | |
| <i>E. aroideae</i> | | | 2 | 2 | 3 | 4 | | 6 | | |
| <i>P. phaseolicola</i> | | | | | | 10 | 5 | 9 | | |

注：数字は反応終末点の希釈段階数 (1=10倍, 2=20倍, 3=40倍, 4=80倍, 5=160倍, 6=320倍, 7=640倍, 8=1280倍, 9=2560倍, 10=5120倍), 空白は反応陰性

は、*X. translucens hordei*, *P. phaseolicola* のように加熱により反応終末点が高まる傾向を示す例も観察された。交叉凝集の頻度は生菌の場合の49例から43例と若干減少し、またこれらの反応強度も終末点の稀釈段階数の平均をとると、生菌の場合の3.8から加熱によって3.3に低下した。しかしながら個々についてみると、[*X. citri* 抗血清×*X. translucens hordei*], [*X. phaseoli sojense* 抗血清×*X. cucurbitae*], [*X. hyacinthi* 抗血清×*X. cucurbitae*] の場合のように加熱によって逆に非特異凝集の強くなる例も観察された。特異、非特異を問わず、加熱により反応が弱まる場合は、H抗原などの易熱性の抗原が破壊され、反応抗原量が減少したためと考えられる。また逆に反応が強まる場合は、加熱によりなんらかの反応障害が除かれたか、新たな抗原の顕在化が起ったものとも推定されるが、加熱と抗原抗体反応の特異性の関係を究明するには、個々の抗原菌種についてさらにくわしく検討しなければならない。

C 寒天ゲル内拡散法

生菌および加熱菌と各抗血清との交互沈降反応のパターンは一括して図版I・IIに示すとおりである。大部分の抗原菌はそれによる免疫抗血清との間に、抗原に近接

して外側（抗原側）に湾曲する太い鮮明なバンドを発現した。このバンドは抗原を加熱すると部分的に変形したり、沈降位置が抗血清側に若干片寄ったり、沈降密度が低下して、ややぼける傾向を示すことが認められるが、消失することなく、主として熱に安定（Heat-stable）なゲル拡散性の抗原物質によるものと考えられる。このバンドは通常最も発現が早く、1～2日間には発現し、再現性もきわめてすぐれた特異抗原によるものと考えられるので、便宜上これを1次バンドと称し、これ以外の比較的発現の遅いバンドを一括して2次バンドと呼ぶことにすると、2次バンドはすべて1次バンドよりも抗血清側に寄って生じ、菌種によってまったく生じないものから、1～4本生ずるものなどがあるが、1次バンドにくらべて再現性は不良であり、がいして熱に対しても不安定で消失するものが多いように見受けられる。一方本法においても免疫抗原菌以外の菌種との間の交叉沈降がかなりの頻度で検出された。これらのなかには前述の2次バンドと同様に、異菌種との間の共通抗原によるものも少なからず検出されたが、これらの交叉沈降は抗原の加熱によって多くは消失する傾向がある。ただし、例外的には *X. citri*, *X. oryzae*, *X. hyacinthi*, *X. translucens hordei*, *X. cucurbitae* の各菌と *X. campestris* 抗血清との間に見られるように、明らかに共通抗原によるものと考えられる熱に安定で太いシャープな交叉沈降帯も観察された。このことは *Xanthomonas* 属菌のゲル拡散性の耐熱性抗原が必ずしもすべて種特異的なものばかりではないことを示すものであり、本法における特異抗原抗体系の検索にあたってはつねに留意すべきところである。

総 括

植物病原細菌の分類あるいは類縁関係の究明に血清学的方法を応用した研究は非常に多い。このうち *Xanthomonas* 属菌については ELROD ら (1947, 1948) の包括的な研究があり、*Erwinia* 属に関しては ELROD (1941, 1942) のほか、後藤ら (1956, 1957) の一連の研究がある。これらの研究を通じて血清学的方法の価値が示される一方、植物病原細菌の抗原構成はきわめて複雑であり、とくに病原性と血清学的特異性の間の相関が乏しいことから、病原性をひとつの重要な指標としている現在の分類体系において、種の分類基準として血清学的性質を導入することには大きな疑問が提起されている。一方個々の細菌病について血清学的手法を病植物の診断あるいはそこから検出される病原菌の同定に應用しようとした研

究はさらに多数に上っており、これらはおおむね血清学的方法の有用性を報告している (GOLDSWORTHY, 1926; 松本, 1929; ISRAILSKY ら, 1938, 1939, 1941, 1967; TIPOGRAF, 1941; KATSNELSON ら, 1956; 松壽ら, 1963; DUNIN ら, 1958, 1964; GRAHAM, 1963; GUTHRIE ら, 1965; Morton ら, 1965; 小畑ら, 1967; 小畑, 1968; 谷井ら, 1967, 1968; 土屋ら, 1966; 小野, 1969)。

著者らは本報告において8種の *Xanthomonas* 属菌を主体とし、これに *Pseudomonas* 属菌2種、*Erwinia* 属菌2種、*Corynebacterium* 属菌1種を加え、それぞれの抗血清を作製し、最も一般的な凝集反応の手法であるスライド凝集法および試験管内凝集法と、沈降反応の1手法である寒天ゲル内拡散法による交互反応をおこない、各方法において発現する反応の特異性を検討した。その結果スライド凝集法において各抗血清とその対応抗原菌 (Homologous antigen species) との間にはつねに最も強い凝集が見られるが、他の抗原菌種 Heterologous antigen species) との間にも種々の反応強度をもってかなりの交叉凝集が発現することが判明した。また試験管内凝集法においても、対応抗原菌の示す特異凝集はつねに反応終末点が最も高いが、スライド法の場合よりもはるかに多くの交叉凝集の存在が検出された。交叉凝集の反応終末点は1～2の例外を除き、特異凝集のそれよりもかなり低い血清稀釈段階にとどまっている。したがって、一般に抗体濃度の比較的高い抗血清が用いられるスライド法の場合は非特異凝集を特異凝集と誤認しやすいことを示している。この欠点は抗血清を適当に稀釈して用いることによりかなり消失することができるが、これでもなお除き得ない非特異凝集に対しては、非特異抗体の吸収などを検討する必要がある。いずれにせよ本実験の結果は、簡便迅速を長所とするスライド凝集法においては、とくに特異性の高い抗血清を使用することが重要であり、このような特異抗血清は、個々の対象菌種ごとに特異・非特異反応の限界を見きわめた上で決定されねばならないことを物語るものである。

抗原を加熱した場合の特異凝集反応は全体として生菌の場合と大差は見られないが、個々についてみると、*X. phaseoli sojense*, *X. hyacinthi*, *X. campestris*, *X. cucurbitae* および *E. aroideae* などでは凝集終末点がやや低くなり、*X. translucens hordei*, *P. phaseolicola* では逆に反応の強まる傾向を示した。これらの現象がそれぞれの菌種に固有の性質であるかどうかは、本試験の範囲で考察できないが、細菌の特異凝集反応に関与する抗原には菌種によって耐熱性抗原、易熱性抗原が複雑にかかわりあいをもち、また場合によっては加熱により抗

原性を高める抗原も存在する可能性を示すものである。

特異凝集には抗原加熱の影響が少ないに対し、交叉凝集は、その発現頻度には著しい減少は見られないが、反応強度は全体として弱まる傾向がより顕著である。このことは非特異凝集に易熱性抗原がより多く関与していることを示すものとも考えられるが、個々の菌種についてみると、たとえば *E. aroideae* のように加熱によって非特異凝集が増加するものもある。したがって凝集反応を診断同定に利用しようとする場合は、個々の菌種について抗原の特異性を十分に解明する必要がある。

寒天ゲル内拡散法においては、各抗原菌種はその抗血清との間に、抗原の周縁に接近して外側（抗原側）に湾曲する太いシャープな沈降帯を生じた。この沈降帯は発現も早く、抗原加熱により部分的に変形したり、沈降位置が若干血清側に移動したり、密度が薄くなることはあるが、消失することはなく、ほとんどは熱に安定な抗原による特異的沈降帯である。これらの沈降帯は LUCAS ら (1969) が *Pseudomonas lachrymans* ほかに 3 種の *Pseudomonas* 属菌について、また OTTA ら (1971) が *P. syringae* について観察した特異沈降帯に相当するものと思われるが、くわしくは今後の検討を要する。対応抗原菌 (Homologous antigen species) の生ずる沈降帯には、このほか菌種によって前記の特異沈降帯よりも内側（抗血清側）に寄って 1～数本見られる場合があるが、がいして再現性の劣るものが多く、他の菌種と共通の抗原によるものと思われるものも含まれている。これらはまた多くは熱に対しても不安定であって、大部分は易熱性 (Thermolabile) の抗原によるものと考えられる。

本試験の結果から推定すると、供試菌以外の植物病原細菌種にも特異性のきわめて高いゲル拡散性抗原の存在が期待される。したがって複雑な抗原構造を有する植物病原細菌の同定およびそれによる病害の診断にとって、ゲル内拡散法はきわめて有力な血清学的手段を提供するものと考えられる。本法の利用をはかるためにも今後は個々の菌種について特異的抗原抗体系を検索する必要がある。

摘 要

植物細菌病の診断同定に血清学的方法を応用するにあたっては、病原細菌およびその抗血清がそれぞれの血清学的手法において示す抗原抗体反応の性質を十分に把握しておく必要がある。そこで *Xanthomonas* 属 8 種、*Pseudomonas* 属 2 種、*Erwinia* 属 2 種、*Corynebacterium* 属 1 種、計 4 属 13 種の細菌について抗血清を作

製し、各菌種間の交互凝集反応および交互ゲル内沈降反応をおこない、反応の特異性を検討した。

スライド凝集法および試験管凝集法においては、各抗血清はその対応抗原菌との間で、つねに最も強い凝集をあらわすが、他の菌種との間でもかなりの頻度で交叉凝集を示す。交叉凝集の反応終末点は特異凝集よりもがいて低いので、通常一定稀釈の抗血清が用いられるスライド法による診断にあつては、交叉凝集を除去できる稀釈段階を用いることが大切である。抗原を加熱した場合の特異凝集の程度は、全体としては生菌の場合と大差はないが、個々の菌種については、まったく影響のないもの、やや弱くなるもの、逆に若干強まるものなどにわかれる。これに対して交叉凝集は加熱により弱まる傾向が著しい。

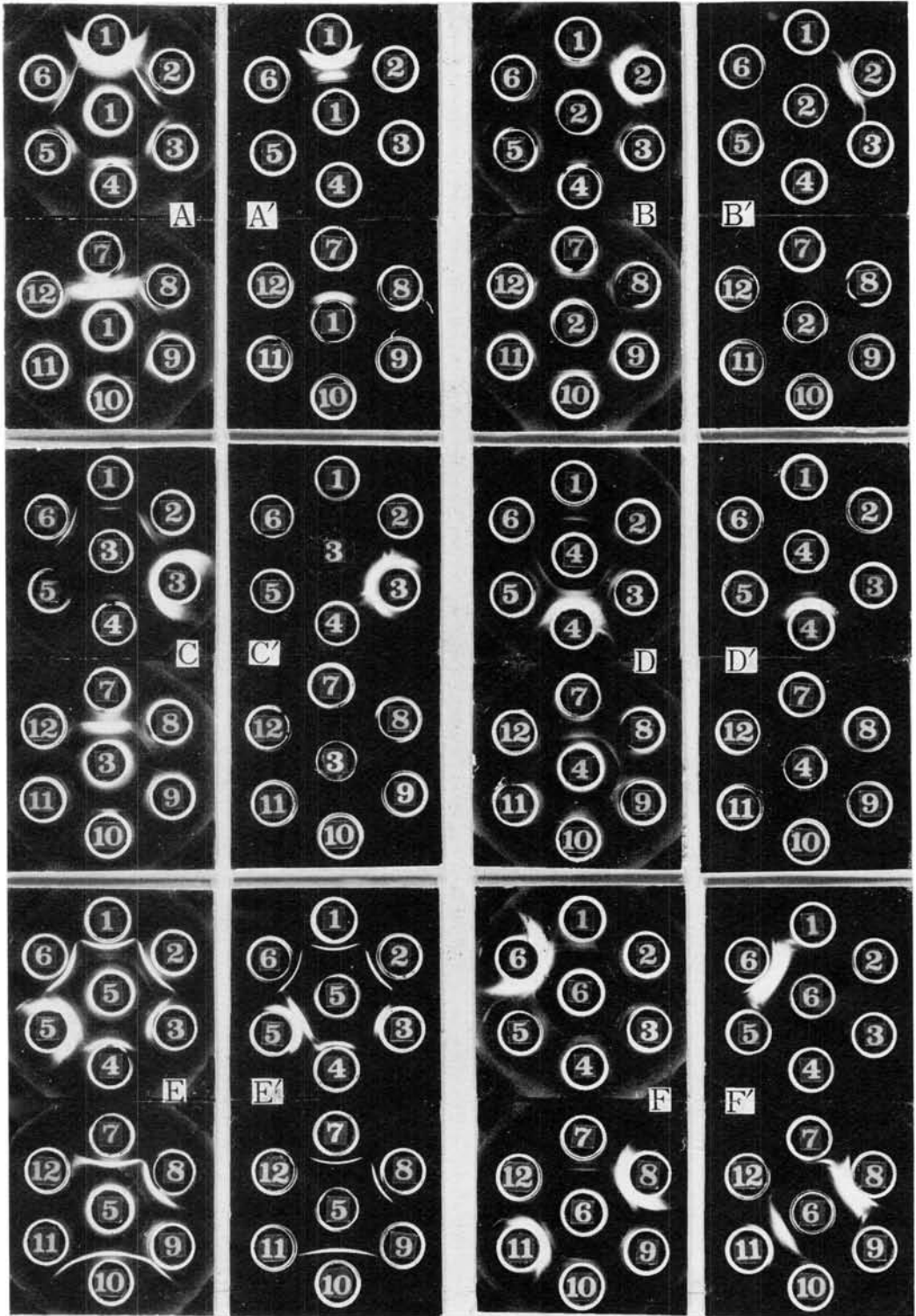
寒天ゲル内拡散法においては、各抗原菌種はそれぞれ対応する抗血清との間に、抗原側に近接して外側に曲るべく密度の高い沈降帯を生じる。この沈降帯は発現も早く、再現性もきわめて高い。抗原の 100°C/30 分間加熱によって部分的な変形、密度低下、血清側への移動などが見られるが、消失することはなく、主として熱に安定な抗原物質による特異的沈降帯である。この沈降帯のほか菌種により内側に寄って 1～数本の沈降帯を認めるものがあるが、これらの沈降帯は再現性も不良であり、抗原加熱によって消失するものが多い。ゲル内沈降法の場合にも、かなりの頻度の交叉沈降がみられるが、少数の例外を除き、熱に不安定な抗原によるものが多いと見受けられる。本試験の結果、植物病原細菌の抗原構成はきわめて複雑であり、病原性をまったく異にする菌種間にも明らかに共通抗原の存在を示す例も観察された。したがって抗原抗体反応の特異性については、凝集反応および沈降反応ともに、個々の菌種についてさらにくわしく検討する必要がある。

引用文献

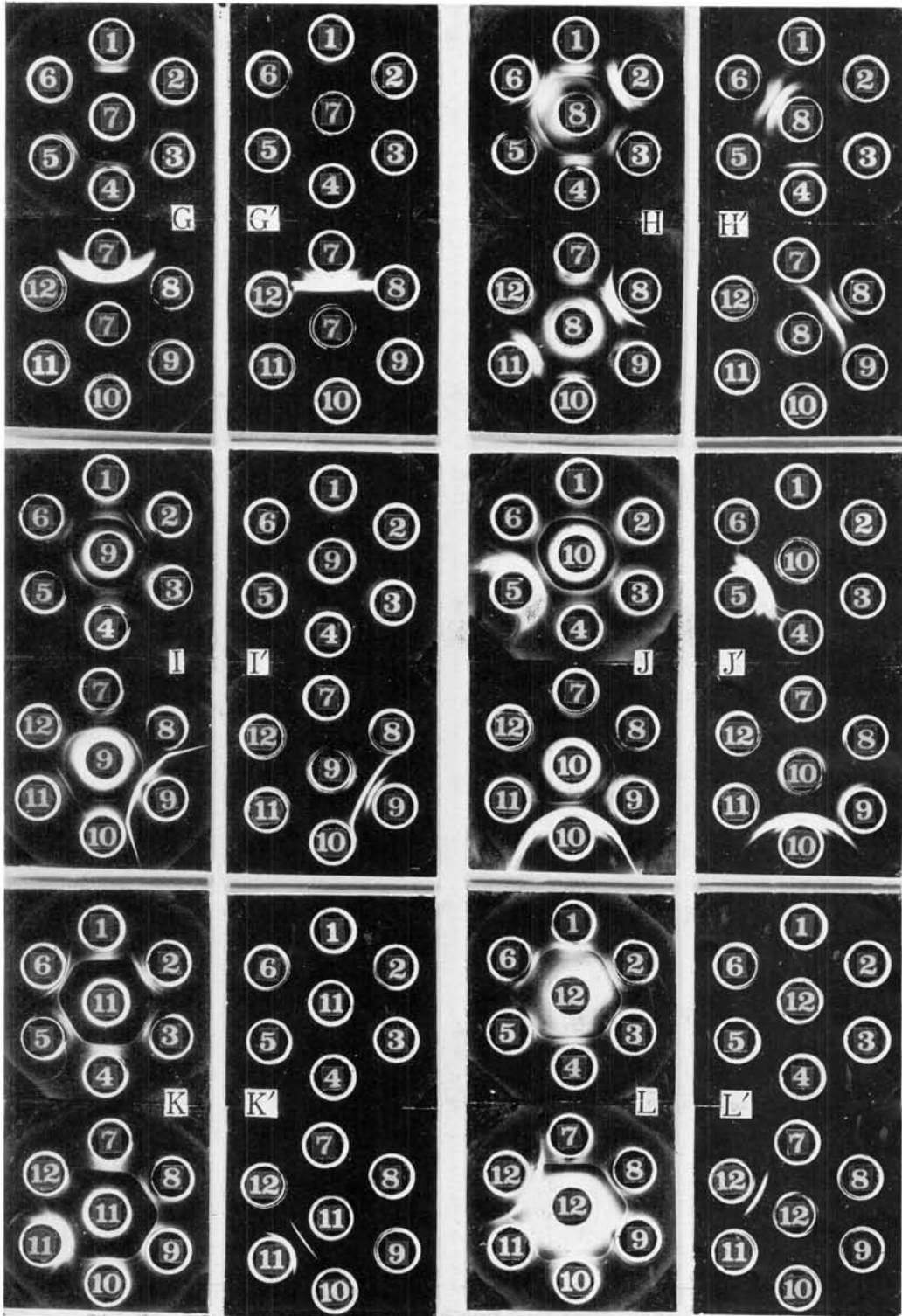
- DUNIN, M. S. and E. V. KUVSHINOVA (1958) The drop method for serodiagnosis of bacterial and virus diseases of plants (2nd Ed.), 27 pp, Moscow.
- DUNIN, M. S. and A. D. VOLODARSKII (1964) Luminescence-serological method for the diagnosis of causal agents of virus and bacterial diseases of plants. *Izv. Timiryazev Sel'-khoz. Akad.*, **3**: 163~173.
- ELROD, R. P. (1941) Serological studies of *Erwiniae*. I. *Erwinia amylovora*. *Bot. Gaz.* **103**: 123~131.
- ELROD, R. P. (1942) Serological studies of *Erwiniae*

- II. Soft rot group, with some biochemical considerations. Bot. Gaz. **103**: 266~279.
- ELROD, R. P. and A. C. BRAUN (1947) Serological studies of the genus *Xanthomonas*. I. Cross-agglutination relationships. II. *Xanthomonas translucens* group. Jour. Bact. **53**: 509~524.
- ELROD, R. P. and A. C. BRAUN (1948) Serological studies of the genus *Xanthomonas*. III. The *Xanthomonas vascularum* and *Xanthomonas phaseoli* groups; the intermediate position of *Xanthomonas campestris*. Jour. Bact. **54**: 349~557.
- GOLDSWORTHY (1926) Studies on the spot disease cauliflowerer; a use of serum diagnosis. Phytopath. **16**: 877~884.
- 後藤正夫・岡部徳夫 (1957) 軟腐病菌 (*Erwinia carotovora*) の系統に関する研究 II. 鞭毛抗原および菌体抗原の熱による不活化について. 日植病報 **22**: 268~273.
- 後藤正夫・岡部徳夫 (1957) 軟腐病菌 (*Erwinia carotovora*) の系統に関する研究 IV. 抗原変異について. 静岡大学農学部研究報告 第67号: 11~20.
- GRAHAM, D. C. (1963) Serological diagnosis of potato black leg and tuber soft rot. Plant Pathology **12** (4): 142~144.
- GUTHRIE, J. W., D. M. HUBER and H. S. FENWICK (1965) Serological detection of halo blight. Plant Dis. Repr. **49**: 297~299.
- ISRAILSKY, W. P. and G. V. CHISTOSERDOVA (1938) Serological diagnosis of some fluorescent phytopathogenic bacteria. Microbiologia. **7**: 809~828.
- ISRAILSKY, W. P. and G. V. CHISTOSERDOVA (1939) Serological examination of plants affected with bacterial diseases. Microbiologia. **8**: 101~115.
- ISRAILSKY, W. P. and E. V. STRUMINSKAYA (1941) Serological examination of plants affected with bacteriosis. III. Examination of legumes for *B. medicaginis*. v. *phaseolicola*, *B. flaccumfasciens*, *B. phaseoli* v. *fuscans* and others. Microbiologia. **10**: 480~487.
- ISRAILSKY, W. P. and S. S. ARTEMIEVA (1941) Serological studies on plants affected by bacteriosis. III. Examination of tomatoes for *Aplanobacter michiganense*. Microbiologia. **10**: 74~80.
- ISRAILSKY, W. P., S. N. SHKLYAR and G. I. ORLOVA (1967) Use of the serological method of diagnosing *E. amylovora* without isolating the culture from the diseased plants. Microbiologia **36**: 497~502.
- KATZNELSON, H. and M. D. SUTTON (1956) Laboratory detection of *Corynebacterium sepedonicum*, causal agent of ring rot of potatoes. Can. Jour. Bot., **34**(1): 48~53.
- LUCAS, L. T. and R. G. GROGAN (1969) Serological variation and identification of *Pseudomonas lachrymans* and other phytopathogenic *Pseudomonas* nomenclatures. Phytopath. **59**: 1908~1912.
- 松本 巍 (1929) 血清反応による植物病害の診断について. 熱帯農学会誌 **1**: 14~22.
- MATSUMOTO, T. (1929) Studies on some phytopathogenic bacteria with special reference to agglutination and complement fixation. Jour. Trop. Agr. **1**: 155~171.
- 松濤美文・佐々木邦雄 (1963) 圃場検査におけるジャガイモ輪腐病の血清による診断方法. 植防研報 **2**: 33~40.
- MORTON, D. J. (1965) Comparison of three serological procedures for identifying *Xanthomonas vesicatoria* in pepper leaves. Phytopath. **55**: 421~424.
- 岡部徳夫・後藤正夫 (1956) 軟腐病菌 (*Erwinia carotovora*) の系統に関する研究. I. 鞭毛の抗原構造並びにそれらの病原性及び麦芽糖分解能に対する関係. 静岡大学農学部研究報告 第6号: 16~32.
- 小畑琢志・山本洋祐 (1967) トマト潰瘍病の抗血清による診断について. 関東病虫研報 14集: 68.
- 小畑琢志 (1968) ヒヤシンス黄腐病とその抗血清による診断. 植防研報 **5**: 7~16.
- 小野邦明 (1969) タバコ野火病菌の発生生態に関する研究 (第2報) 螢光標識抗体による検出 (講要). 日植病報 **35**: 111.
- OTTA, J. D. and H. ENGLISH (1971) Serology and pathology of *Pseudomonas syringae*. Phytopath. **61**: 443~452.
- TIPOGRAF, D. Y. (1941) A rapid method of diagnosing ring rot of potato. C. R. Pan-Sov. V. I. LENIN Acad. Agric. Sci., Moscow, 1941, **5**: 35~38.
- 谷井昭夫・高桑 亮 (1967) インゲンかき枯病に関する研究 第1報 インゲンかき枯病菌の抗血清について (予報) (講要). 日植病報 **33**: 348.
- 谷井昭夫・高桑 亮 (1968) インゲンかき枯病に関する研究 第2報 螢光抗体によるインゲンかき枯病菌の検出. (講要) 日植病報 **34**: 185.

图版 I



图版 II



土屋行夫・水上武幸（1966）螢光抗体利用による青枯病菌の検出（講要）. 日植病報 32: 95.

図 版 説 明

寒天ゲル内拡散法における交互沈降反応（図版 I, II）
 写真 A~L は生菌抗原, A'~L' は加熱抗原の結果を示す。各ゲル平板共中央の井戸は抗血清, 周囲の井戸にそれぞれ異なる抗原を配置した。抗原菌種および抗血清の種類はそれぞれ下記の共通数字で示す。

① *X. citri*

② *X. oryzae*

③ *X. pruni*

④ *X. phaseoli* f. sp. *sojense*

⑤ *X. campestris*

⑥ *X. hyacinthi*

⑦ *X. translucens* f. sp. *hordei*

⑧ *X. cucurbitae*

⑨ *E. aroideae*

⑩ *E. carotovora*

⑪ *P. phaseolicola*

⑫ *C. sepedonicum*

Summary

Studies on the Serological Diagnosis of Bacterial Plant Diseases

I. Cross-Agglutination and Gel-Diffusion Tests with Some *Xanthomonas* Nomenclatures

By

Takushi OBATA and Fukutoshi TSUBOI

Research Division, Yokohama Plant Protection Station

In an approach to the studies on the serological diagnosis and identification of plant pathogenic bacteria, the authors prepared antisera with living immunoantigens of eight species of *Xanthomonas*, two species of *Pseudomonas*, two species of *Erwinia* and one species of *Corynebacterium*. Extent of specific and aspecific antigen-antibody reactions was examined by cross-agglutination and gel-diffusion tests between the antisera and the species employed.

In both slide agglutination and quantitative agglutination tests, each serum consistently showed a full-titre reaction with its homologous antigen species. In addition, however, frequent occurrences of non-specific agglutination at lower serum dilutions were detected among various combinations of antiserum and heterologous antigen species. For the use of slide test where a given dilution of antiserum is normally used for convenience, care seems to be critical to eliminate positive non-specific agglutination by choosing the most suitable dilution of each particular antiserum. Intensity of specific agglutination as a whole was not appreciably affected by heating antigens for 30 min. at 100°C. However, slight inactivation of thermolabile antigens was observed with *X. phaseoli* f. sp. *sojense*, *X. hyacinthi*, *X. campestris* and *X. cucurbitae*, whereas a tendency for enhanced antigenicity was recognized in *X. translucens* f. sp. *hordei* and *P. phaseolicola*. Heating had more pronounced effect on the decrease in intensity of aspecific cross reactions.

In gel-diffusion test with whole cell antigens, each homologous species produced a marked line of precipitate very close to the antigen wells. This precipitation is invariably first to appear in one to two days of incubation, well defined and consistently reproducible. It also survives heating of the antigen for 30 min. at 100°C, though, with some species, partial breakdown of the contributing antigen was indicated by the deformation, indistinct separation into plural bands or the tendency to move toward

the center serum wells. This specific antigen may in all probabilities be serologically similar with the heat-stable species specific antigen of *Pseudomonas lachrymans* and other nomenspecies as was described by LUCAS et al. (1969). With some species tested, homologous antigen species produced one to several lines of precipitate usually closer to the serum wells. These secondary bands are not always reproducible, either thin but sharp or broad and vaguely defined. Many of the contributing antigens are heatlabile and some are apparently common among several species tested.

These results amply indicate an extreme multiplicity of antigenic components of plant pathogenic bacteria. Further investigations are needed to demonstrate the serological specificity of the antigens detected with each nomenspecies in the present work.