The Japanese Society of Fisheries Science

Nippon Suisan Gakkaishi 68(1), 46–51 (2002)

エゾバフンウニ斑点病原因菌 *Flexibacter* sp. F-2 株の低温環境における生残性

谷内喜一,[1] 田島研一,[1]* 下野　功,[2] 絵面良男[1]

(2001年3月12受付，2001年8月9日受理)

[1]北海道大学大学院水産科学研究科，[2]北海道立工業技術センター

Survival of *Flexibacter* sp. strain F-2, the Causative Bacterium of Spotting Disease of Sea Urchin *Strongylocentrotus intermedius* at Low Temperatures

Yoshikazu Taniuchi,[1] Kenichi Tajima,[1]* Isao Shimono,[2] Yoshio Ezura[1]

[1]*Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University, Hokkaido 041-8611,* [2]*Hokkaido Industrial Technology Center (HITEC), Hokkaido 041-0801, Japan*

Flexibacter sp. represented by strain F-2, the causative bacterium of spotting disease of sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*, was detected in various samples from mid July to mid August when seawater temperature reached 20℃ or more, but the bacterium was not detected in any samples from winter to early summer. From this phenomenon it is suspected that this bacterium enters into a viable but nonculturable (VBNC) state during low-temperature seasons. To obtain fundamental data of survival of this bacterium at low temperatures, we examined some factors for entering the VBNC state. Direct viable count (DVC) was also carried out. The bacterial cells in the mid-log phase quickly became nonculturable at 5℃ in artificial seawater (ASW). No decrease in total counts or DVC was observed during storage, indicating that the bacterium entered the VBNC state. During storage periods, a morphological change from long rod cells to short rods or spheroid cells was observed by scanning electron microscopy. Cells in the VBNC state lost the pathogenicity to sea urchin.

キーワード：ウニ斑点病，*Flexibacter* sp.，VBNC

1993年積丹町水産種苗センターで発生したエゾバフンウニ *Strongylocentrotus intermedius* 斑点病の原因菌として報告された *Flexibacter* sp.[1,2]は，7月下旬から8月下旬にかけての高水温期にはウニおよび環境試料から分離することができるが，低水温期や昇温期にはいずれの試料からも検出することができない。[3] 本菌は通常実験室での固型培地上での培養において，培養日数の経過とともに形態が長桿状から短桿状へと変化し，平板上では約3日間で継代培養は不可能となり，さらに正常菌体に対するウサギ抗血清との凝集能が消失することが判明している。

近年になって，VBNC (viable but nonculturable) 状態にある細胞が環境中に存在する可能性が示唆され，*Vibrio cholerae* などのヒト病原細菌が，自然環境に放出され，環境ストレスを受けた場合，寒天培地上では増殖できないが，呼吸活性や基質取り込み活性を保持した状態（VBNC状態）となることが報告されている。[4,5,6] 本菌についても，環境の変化，特に低水温や低有機物濃度の海水中では増殖速度が低下し，形態が変化してVBNC状態になることが予想される。そこで，*Flexibacter* sp. F-2株の菌懸濁液保持系における増殖能ならびに菌体細胞の形態変化に及ぼす影響を検討するため，保持温度，保持開始時の供試菌の増殖ステージ，保持系の有機物濃度について保持日数の経過に伴う供試菌の生菌数および総菌数の変化を調べるとともに，Kogureらの方法[7]を用いて生理活性を有する細胞の経時変化も調べた。また，培養不能状態へ移行する過程の細胞の病原性を検討するとともに，細胞の形態変化を走査型電子顕微鏡により観察した。

材料と方法

供試菌株　1993年8月に斑点病罹病エゾバフンウニ

* Tel：+81-138-40-5571，Fax：+81-138-40-5569，E-mail：ktajima@fish.hokudai.ac.jp

NII-Electronic Library Service

The Japanese Society of Fisheries Science

から分離され,[1] 本研究室で凍結保存されていた *Flexibacter* sp. F-2 株を実験に供試した。

保持温度が培養不能状態移行に及ぼす影響 供試菌を海水斜面培地で前培養し，その新鮮菌体を1白金耳かきとり，それぞれ3本の300 mL容三角フラスコに入れた海水液体培地100 mLに接種し，これを対数増殖期中期まで培養した後に集菌し，滅菌75% 人工海水（75% ASW）で2回洗浄（1,800×g, 5℃, 20 min）した。この菌体を滅菌75％ASW 100 mLを入れた3本の300 mL容三角フラスコに約10^8 cells/mLとなるように懸濁し，5℃，15℃および25℃に保持した。その後，定期的に試料の一部を無菌的に取り出し平板法で生菌数を，4′,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride（DAPI）染色により総菌数をそれぞれ測定した。

保持開始時の増殖ステージが培養不能状態移行に及ぼす影響 前述同様に前培養した供試菌を1白金耳かきとり，それぞれ3本の300 mL容三角フラスコに入れた海水液体培地100 mLに接種し，これらを増殖ステージの誘導期，対数増殖期中期，定常期中期まで培養した後，各増殖ステージの菌体を，75％ASWで2回洗浄した。これらの菌体を，滅菌75％ASW 100 mLを入れた3本の300 mL容三角フラスコにそれぞれ約10^8 cells/mLとなるように懸濁し，5℃で保持して試料とした。この試料より定期的に一部を無菌的に取り出し，前述同様に生菌数および総菌数を測定した。

保持環境の有機物濃度が培養不能状態移行に及ぼす影響 前述同様に斜面培地で前培養した菌体を1白金耳かきとり，6本の300 mL容三角フラスコに入れた海水液体培地100 mLに接種して，対数増殖期中期まで培養した後，6本の三角フラスコの菌体を別々に集菌（1,800×g, 5℃, 20 min）した。それらを海水液体培地，海水液体培地の有機物濃度を1/2，1/10，1/100に希釈したもの，滅菌天然海水（NSW）および滅菌75％ASWの6種の培地を用いてそれぞれ2回づつ洗浄した。これらの菌体を洗浄に使用したものと同じ培地中に，それぞれ約10^8 cells/mLとなるように懸濁して5℃で保持した。その後，保持試料から定期的に一部を無菌的に取り出し，生菌数および総菌数を測定した。

成長能を有する細胞の計数 前述同様に斜面培地で前培養した菌体を1白金耳かきとり，300 mL容三角フラスコに入れた海水液体培地100 mLに接種して，対数増殖期中期まで培養した。その後，菌体を集菌し，滅菌75％ASWで2回洗浄した。これを滅菌75％ASW中に約10^7 cells/mLとなるように懸濁し，5℃に保持し，前述の方法で生菌数および総菌数の経時的に測定するとともに，Kogureらの方法[7]により生理活性を有する細胞の経時変化を調べた。

電子顕微鏡による観察 前述同様に，供試菌を対数増殖期中期まで培養した。その後，菌体を集菌し，75％ASWで2回洗浄した。これを滅菌75％ASW中に約10^7 cells/mLとなるように懸濁し，5℃に保持した。保持開始から0日目，10日目，30日目に採取し，菌数が10^4 cells/mLになるように希釈したそれぞれの試料にグルタルアルデハイドを終濃度が2.5％（vol/vol）となるように加え，室温で2時間固定した。菌体を孔径0.22 μmのNuclepore フィルター上におだやかに捕集し，50％，70％，90％，95％エタノールで各1回，100％エタノールで2回，順次，脱水処理を室温で各20分間づつ行った。エタノール脱水後，100％エタノールと第3ブチルアルコールの混合液（2：1，1：1，1：2）および100％第3ブチルアルコールで室温で各30分間づつ処理して第3ブチルアルコール置換を行い，最後に新しい100％第3ブチルアルコールに代えた。試料を冷凍庫で一晩凍結した後，真空昇華して走査型電子顕微鏡（SEM）試料とした。この試料をフィルターを濾過面が上を向くように両面テープで試料台に接着し，白金-パラジウムでコーティングし，SEM（JSM-6320F，日本電子）で観察した。

感染実験 感染実験は浸漬法[1]により行った。前述同様に，供試菌を対数増殖期中期まで培養した。その後，集菌し，75％ASWで2回洗浄した。これを滅菌75％ASW中に約10^7 cells/mLとなるように懸濁し，5℃で保持した。保持開始直後，保持開始から3日目，7日目，および15日目にその一部を採取した。各採取日の試料の温度を22℃に調整し，飼育用人工海水（マリンテック）で洗浄した殻径約20 mmの健全なエゾバフンウニ（各試料6個体ずつ）の体表に消毒した歯科用のエキスプローラーで5 mmの傷をつけた個体を1時間浸漬した。浸漬後，飼育用人工海水で洗浄し，1L容水槽に移し，同人工海水でエアレーションを行いながら飼育した。飼育水は1日おきに換水した。実験水温は22℃とし，観察期間は72時間とした。対照区として，各菌液を含まない飼育用人工海水用いて同様の処理を行った個体を用いた。斑点症状を伴って死亡した個体について，Polymyxin Bを35 μg/mL加えた海水平板培地に体表と体腔液を培養し，25℃で4日間培養した後，攻撃菌と同じ色調のコロニーについて攻撃菌株で作製した抗血清との凝集試験を行い，凝集反応陽性をもって攻撃菌と簡易同定した。

結果および考察

保持温度の影響 保持温度が *Flexibacter* sp. F-2株の培養不能状態移行に与える影響を検討するため，対数増殖期中期の本菌を75％ASW中で，5℃（冬期の水温），15℃（昇温期の水温），および25℃（夏季の水温）に保持したときの生菌数および総菌数の経時変化をFig. 1

NII-Electronic Library Service

The Japanese Society of Fisheries Science

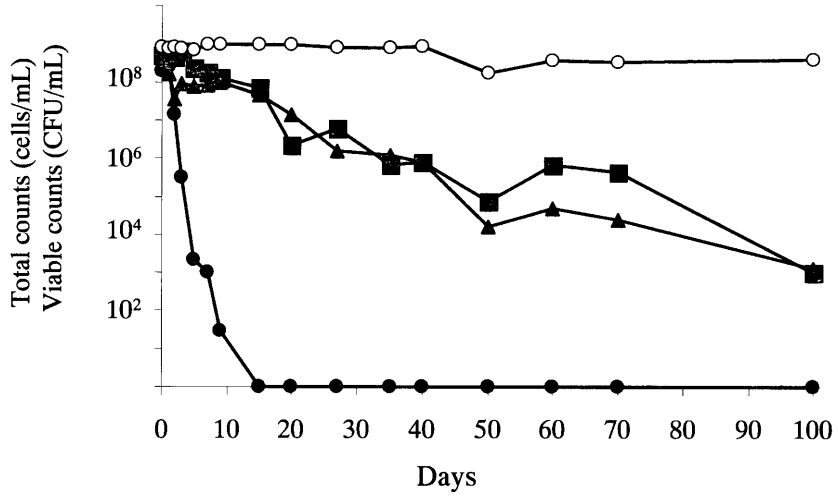


Fig. 1. Survival of *Flexibacter* sp. strain F-2 stored at different temperatures in 75% ASW. ■, Viable counts at 25℃. ▲, Viable counts at 15℃. ●, Viable counts at 5℃. ○, Total counts at 5℃.

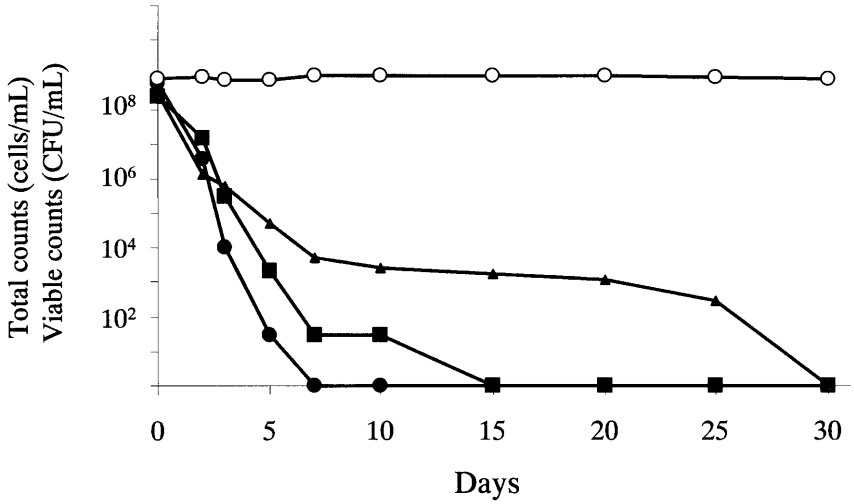


Fig. 2. Survival at 5℃ of *Flexibacter* sp. strain F-2 using cells at different growth stages in 75% ASW. ▲, Lag phase. ■, Mid-log phase. ●, Stationary phase. ○, Total counts in mid-log phase.

に示した。但し，いずれの保持温度においても総菌数には大きな変化が見られなかったので，Fig. 1 では 5 ℃に保持した試料の総菌数の経時変化のみを示した。生菌数は，5 ℃で保持した時，保持開始の翌日から減少が見られ，その後，毎日約 1 オーダーずつ減少し，保持開始から約 15 日で平板上にコロニーが形成されなくなった。しかし，15℃ および 25℃ で保持した試料は，実験開始から 20 日目までに 10^7 CFU / mL から 10^5 CFU / mL へと漸減したが，110 日経過した時点でも生菌数は約 10^3 CFU/mL あり，ここでは示していないが，保持開始から 1 年経過後も生菌数は約 10^2 CFU/mL を維持した。これらの結果と，本菌が水温が 5～6℃ の冬期に検出されていないことを考え合わせると，保持温度が本菌の平板培地上でのコロニー形成能に影響を及ぼす大きな要因となっていることが示唆された。

保持開始時の増殖ステージの影響　保持開始時の増殖ステージが *Flexibacter* sp. F-2 株の培養不能状態移行に与える影響を検討するため，保持開始時の保持系の菌体に，本菌の誘導期，対数増殖期中期，定常期中期の細胞を用いて 75%ASW 中で，5 ℃ で保持したときの生菌数および総菌数の経時変化を Fig. 2 に示した。但し，実験期間中，どの増殖ステージの試料も総菌数に大きな変化が見られなかったので，Fig. 2 では対数増殖期中期の試料の総菌数の経時変化のみを示した。生菌数は誘導期，対数増殖期中期および定常期の細胞すべてで減少が見られ，定常期中期の細胞がもっとも早く約 7 日で，

NII-Electronic Library Service

The Japanese Society of Fisheries Science

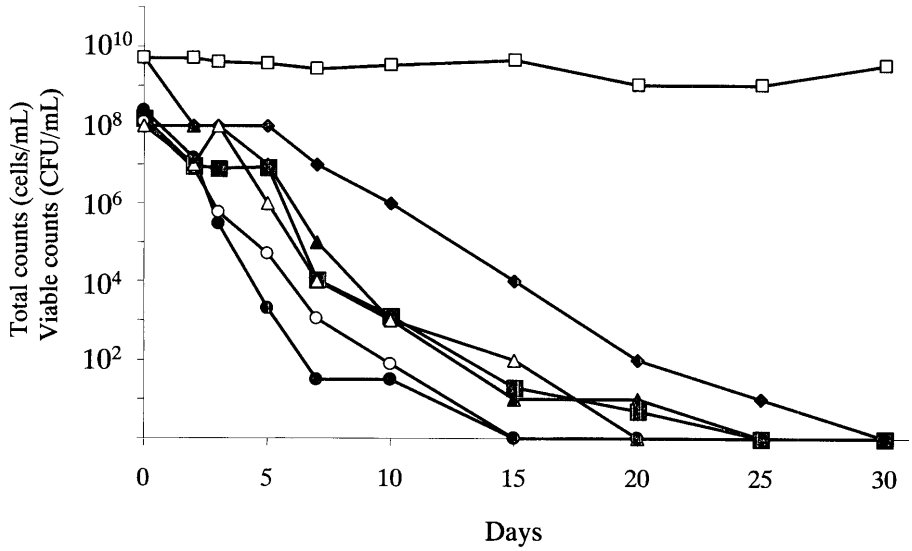


Fig. 3. Survival of *Flexibacter* sp. strain F-2 in different concentrations of nutrients of SA broth, 75% ASW and NSW at 5℃. ◆, SA broth. ■, 1/2 SA broth. ▲, 1/10 SA broth. ○, 1/100 SA broth. △, NSW. ●, 75% ASW. □, Total counts in SA broth.

対数増殖期中期の細胞は約15日でコロニー形成が見られなくなった。誘導期の生菌数は徐々に減少し，30日目でコロニー形成が見られなくなった。一般的に定常期の細胞は環境ストレスに強いことが知られており，[8] コロニー形成能消失に要する期間が最も長いものと予測されたが，本実験では逆の結果となった。このため，以後の実験では，対数増殖期中期の菌体細胞を用いることにした。

保持系の有機物濃度の影響　保持系の有機物濃度が *Flexibacter* sp. F-2株の培養不能状態移行に及ぼす影響を検討するため，保持系の有機物として，海水液体培地(SA)，SAの有機物濃度を1/2，1/10，1/100に希釈したもの，およびNSW，75%ASW中に供試菌を懸濁して，5℃で保持したときの生菌数および総菌数の経時変化をFig. 3に示した。但し，実験期間中，各有機物濃度の試料の総菌数に大きな変化が見られなかったので，ここではSAの総菌数の経時変化にみを示した。いずれの有機物濃度の保持系においても，保持期間の経過と共に生菌数は減少し，コロニー形成能が消失した。また，保持系の有機物濃度が高いものほど平板培地上での培養可能期間が長くなった。SAの場合，約30日でコロニー形成能が消失したが，有機物濃度をSAの1/2，1/10とした系では約25日でコロニー形成能が消失した。NSW中に保持した系では，約20日でコロニー形成能が消失した。有機物濃度をSAの1/100とした系と75%ASW中に保持した系では約15日でコロニー形成能が消失し，コロニー形成能消失までに要する時間が最も短かった。NSW中に保持した系は有機物濃度をSAの1/100にした系よりコロニー形成能消失に要する時期が長かった。これはNSW中に含まれる有機物や微量成分などが本菌のコロニー形成能維持により適したものであったことによるものではないかと思われる。

成長能を有する細胞の計数　これまでの一連の実験を通して，保持温度，保持開始時の増殖ステージ，保持系の有機物濃度等の条件に関わらず，供試菌の総菌数が実験期間中常に一定数を維持していたことは，本菌はコロニー形成能を失っても溶菌せず，DAPI染色で染色される2本鎖DNAを保持した状態で各試料中に存在し，死滅していないことを示唆するものと思われる。これをさらに確認するために，生菌数および総菌数と共に，Kogureらの方法[7] を用いて溶菌せずに生理活性を保持した細胞を計数し，その経時変化を調べた。その結果をFig. 4に示した。前述のように75%ASW中，5℃に保持した場合，約15日目でコロニー形成能が消失したが，保持期間中総菌数に変化は見られなかった。また，生理活性を保持した細胞数にも大きな変化はほとんど見られず，活性を保持した細胞の減少は，保持開始から35日経過した時点でわずか1オーダー減少したに過ぎなかった。従って，本菌が平板培地上でコロニー形成能を消失した後も死滅することなくVBNC状態へ移行していることを示すと考えられた。

以上の結果から，本菌が低水温期に検出することのできないのはVBNC状態へ移行しており，平板法では検出ができなくなるが環境中に生存していると結論された。それゆえ本菌はVBNC状態へ移行することによって，低水温期を乗り越え，水温の上昇にともない蘇生し，斑点病を引き起こす潜在的要因となっているのではないかと考えられる。

SEMによる形態変化　VBNC状態へ移行する桿状細菌は，その形態を短縮する形態変化が報告されている。

NII-Electronic Library Service

The Japanese Society of Fisheries Science

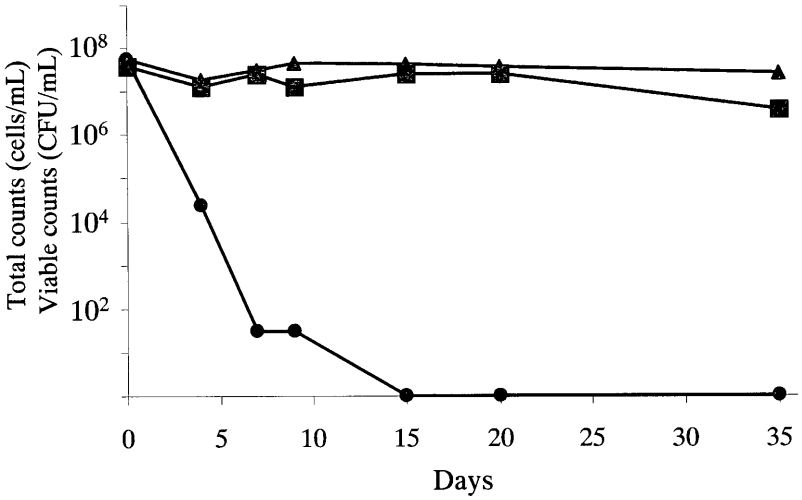


Fig. 4. Direct viable counts (DVC) of *Flexibacter* sp. strain F-2 stored at 5℃ in 75% ASW. ●, Viable counts. ▲, Total counts. ■, DVC.

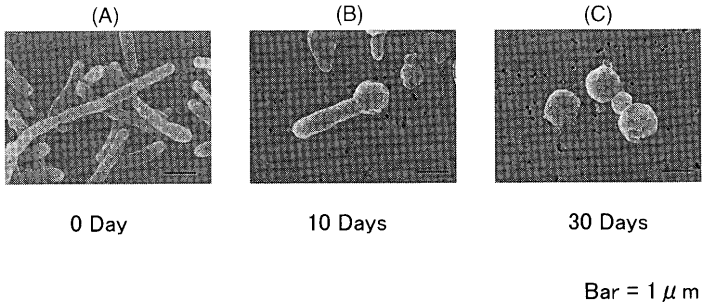


Fig. 5. Morphological change of *Flexibacter* sp. strain F-2 observed by SEM during survival periods. (A), Mid-log phase cells of *Flexibacter* sp. strain F-2. (B), Cells starved for 10 days. (C), Cells starved for 30 days. Bars = 1 μm.

本菌についても，VBNC 状態へ移行することが判明したことから，その形態変化を SEM で観察した。実験開始直後（T_0），開始から 10 日目（T_{10}），開始から 30 日目（T_{30}）の細胞の SEM 写真を Fig. 5-(A)～-(C)に示した。VBNC 状態に移行していくに従って，10 μm 以上の長桿状から 2 μm以下の短桿状，または球状に近い形態へと形態変化が観察された。T_0 時（生菌数は約 10^7 CFU/mL）では，Fig. 5-(A)にみられるように，長桿状を示し，細胞表面に細かな凹凸が見られた。T_{10} 時（生菌数は 10^2 CFU/mL）では，Fig. 5-(B)にみられるように，先端が球状をした細胞が多く観察された。VBNC 状態へ移行した T_{30} 時（生菌数は 0 CFU/mL）では Fig. 5-(C)にみられるように球状に近い細胞が多く存在し，T_0 時と比較して細胞表面の凹凸が増した。しかし，VBNC 状態へ移行した細胞が細胞外物質を分泌して互いに近接し，[6] また，小胞体を形成したり，[9] 細胞が伸張，もしくはらせん状に変形したり，[10] 細胞サイズが 0.5 μm 以下にまで極端に縮小化したりといった現象[11]は観察されなかった。

Table 1. Pathogenicity of *Flexibacter* sp. strain F-2 during different VBNC stages to sea urchins

Days*1	Dose (CFU/mL)	Hours after challenge					
		12	24	36	48	60	72
	Control	6/6*2	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
0	1.9×10^6	6/6	0/6	—	—	—	—
3	3.0×10^4	6/6	4/6	0/6	—	—	—
7	1.0×10^2	6/6	6/6	3/6	0/6	—	—
15	0	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6

*1 Days after storage at 5℃ in 75% ASW.
*2 number survived/number tested.

SEM の観察結果から，本菌は VBNC 状態へ移行するに伴い球状に近い形態へ変化するが細胞構造は壊れることなく維持されているものと思われた。

VBNC 細胞の病原性　VBNC 状態への移行過程の試料を用いて人工感染実験を行なった結果を Table 1 に示した。各感染実験開始時の総菌数はいずれの試料とも 10^6 cells/mL であった。保持開始時の生菌数は 1.9×10^6

NII-Electronic Library Service

The Japanese Society of Fisheries Science

CFU/mL，3日目は3.0×10^4 CFU/mL，7日目は1.0×10^2 CFU/mLで，15日目には生菌数は計数されなかった。本菌のウニに対する病原性は，75%ASW中，5℃で保持開始直後の菌液（生菌数1.9×10^6 CFU/mL）を用いて攻撃した場合，24時間後に全個体が黒紫色の斑点を伴って死亡した。保持開始から3日経過した菌液（生菌数3.0×10^4 CFU/mL）で攻撃した場合，24時間後に2個体，36時間後に残りの4個体全てが黒紫色の斑点を伴って死亡した。保持開始から7日経過した菌液（生菌数1.0×10^2 CFU/mL）で攻撃した場合，36時間後に3個体，48時間後に残りの3個体全てが黒紫色の斑点を伴って死亡した。保持開始から15日経過し，VBNC状態へ移行した菌液（生菌数0 CFU/mL）を用いて攻撃した結果，72時間経過しても死亡も，脱棘，黒紫色の斑点症状も見られず個体は生残し，VBNC状態へ移行した本菌には病原性が認められなかった。なお，全ての死亡個体からは攻撃菌と同じ色調のコロニーを形成する菌が分離され，それらは本菌の正常菌体で作製した抗血清と陽性の凝集反応を示した。生菌数が1.0×10^2 CFU/mL存在する保持開始から7日目の試料までは，死亡に到る時間は長くなるものの，ウニ個体は斑点症状を呈し死亡した。しかし，生菌数を計数することができなくなりVBNC状態となった細胞は，ウニに対する病原性を失った。この点については，前述のようにKogureらの方法[7]により処理した菌体細胞が成長能を示したことから，VBNC状態の本菌細胞は，細胞の代謝活性の低下により病原体として有している種々の病原因子を機能的に発現できなくなったと推察される。

以上の結果から，エゾバフンウニ斑点病原因菌*Flexibacter* sp. F-2株の低水温期における生残性の可能性が明らかとなった。今後，本菌のVBNC状態からの蘇生のメカニズムを研究し，本菌の環境中での生態を明らかにすることで，種苗生産過程で発生する斑点病に対する効果的な防除法が確立されるものと考える。

謝　辞

感染実験に供試したウニ個体の提供を頂いた北海道栽培漁業振興公社鹿部支所の職員各位に謝意を表する。

文　献

1) Tajima K, Hirano T, Shimizu M, Ezura Y. Isolation and pathogenicity of the causative bacterium of spotting disease of sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *Fisheries Sci.* 1997; **63**: 249–252.
2) Tajima K, Hirano T, Nakano K, Ezura Y. Taxonomical study on the causative bacterium of spotting disease of sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *Fisheries Sci.* 1997; **63**: 897–900.
3) Tajima K, Shimizu M, Miura K, Ohsaki S, Nishihara Y, Ezura Y. Seasonal fluctuations of *Flexibacter* sp. the causative bacterium of spotting disease of sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* in the culturing facilities and coastal area. *Fisheries Sci.* 1998; **64**: 6–9.
4) Colwell RR, Brayton PR, Grimes DJ, Roszak DB, Huq SA, Palmer LM. Viable but non-culturable *Vibrio Cholerae* and related pathogens in the environment: Implications for release of genetically engineered microorganisms. *Bio/Technology* 1985; **3**: 817–820.
5) Nilsson L, Oliver JD, Kjelleberg S. Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state. *J. Bacteriol.* 1991; **173**: 5054–5059.
6) Xiuping J, Chai TJ. Survival of *Vibrio parahaemolyticus* at low temperatures under starvation conditions and subsequent resuscitation of viable, nonculturable cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996; **62**: 1300–1305.
7) Kogure K, Simidu U, Taga N. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can. J. Microbiol.* 1979; **25**: 415–420.
8) Stanier RY, Ingraham JL, Wheelis ML, Painter PR.「微生物学」（高橋　甫，斎藤日向，手塚泰彦，水島昭二，山口英世訳）培風館，東京，1996，168–179.
9) Marden P, Tunlid A, Malmcrona-Friberg K, Odham G, Kjelleberg S. Physiological and morphological changes during short term starvation of marine bacterial isolates. *Arch. Microbiol.* 1985; **142**: 326–332.
10) Nelson DR, Sadlowski Y, Eguchi M, Kjellberg S. The starvation–stress response of *Vibrio* (*Listonella*) *anguillarum*. *Microbiology* 1997; **143**: 2305–2312.
11) Fouz B, Toranzo AE, Marco-Noales E, Amaro C. Survival of fish-virulent strains of *Photobacterium damselae* subsp. *damselae* in seawater under starvation conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* 1998; **168**: 181–186.

NII-Electronic Library Service