

特集：青枯病

青枯病菌の Viable-But-Nonculturable 状態に関連する研究について

中央農業総合研究センター ^{いま} 今 ^{ざき} 崎 ^い 伊 ^{おり} 織

はじめに

Viable-but-nonculturable (VBNC) 状態は、本来培養できる細菌に、温度、重金属または飢餓などの継続的なストレスを与えたときに誘導される「代謝活性があるにもかかわらず増殖できない状態」を指す。生細菌＝増殖可能という従来の考え方とは矛盾する状態であるが、現在では多数の細菌で誘導されることが知られている。

植物病原細菌では、青枯病菌 (VAN ELSAS et al., 2000; 2001; GREY and STECK, 2001; VAN OVERBEEK et al., 2004), 火傷病菌 (ORDAX et al., 2006), キャベツ黒腐病菌 (GHEZZI and STECK, 1999) および根頭がんしゅ病菌 (MANAHAN and STECK, 1997; ALEXANDER et al., 1999) において VBNC 状態への移行が報告されている。現在、植物病原細菌の分離には、選択培地を用いた培養を利用することが標準的な手法となっている (SCHAARD et al., 2001)。もし、植物病原細菌が VBNC 状態で自然界に生息しており、環境条件によっては増殖可能な状態 (アクティブ状態) に復帰するのであれば、植物防疫上の重要性から、VBNC 細胞まで分離できるような精度の高い技術の開発が求められる。

動物病原細菌の研究分野では、公衆衛生上の重要性から、1980年代より VBNC 状態からアクティブ状態への復帰性に関心が寄せられてきた。しかし、復帰を示唆する多数の報告がなされているにもかかわらず、推測の域を出ない事例も多く、いまだ明確な結論が得られていない現状である。

本稿では、主に動物病原細菌を用いて明らかにされた VBNC 状態と本状態からの復帰に関連する知見を概説するとともに、青枯病菌の VBNC 状態における研究成果について紹介する。

I VBNC 状態の発見

VBNC 状態についての研究の発展には、KOGURE et al. (1979) によって開発された Direct viable count (DVC)

Researches on the Viable-But-Nonculturable State in the Bacterial Wilt Pathogen *Ralstonia solanacearum*. By Iori IMAZAKI
(キーワード：青枯病菌, VBNC 状態, 復帰性)

法が重要な役割を果たした。DVC 法は、代謝活性に基づいて細菌の生細胞を計数するために利用される。本法では、ナリジキシン酸を添加した液体栄養培地にて細菌を培養する。ナリジキシン酸は DNA 合成を阻害するため、代謝活性がある細胞は分裂することなく長く肥大する。培養後、細胞を蛍光試薬で染色し、顕微鏡下で肥大細胞を観察することによって代謝活性のある細胞を計数することができる。

Xu et al. (1982) は、滅菌した海水中で大腸菌とコレラ菌 (*Vibrio cholerae*) を培養した後、増殖可能な細胞数 (寒天培地上でのコロニー形成数) と DVC 法によって計数した細胞数を比較した。その結果、両菌において、培養可能な細胞数に比べて生細胞数が多くなることが示された。すなわち、代謝活性はあるが増殖できない細胞が存在することが明らかになった。後に、この状態は VBNC (あるいは VNC) 状態と呼ばれるようになり、他の細菌種でも誘導されることが明らかとなった (GAUTHIER, 2000)。さらに、本状態を誘導する各種ストレス (温度, 浸透圧, 栄養欠乏, 塩濃度, 紫外線等) も明らかとなった (GAUTHIER, 2000)。

II VBNC 状態の研究における細胞の計数法

VBNC 状態の研究では、一般的に、単位容体当たりの全細胞数、培養可能な細胞数および生細胞数を計る。全細胞数は、DAPI やアクリジンオレンジなどで染色し、顕微鏡下で計る。培養可能な細胞は、標準的な寒天培地でのコロニー形成単位 (CFU) を計る。また、生細胞の計数には、DVC 法のほかにも呼吸活性や細胞膜の健全性などに基づいた方法などが考案されている。全細胞数と生細胞数の差が死細胞数、生細胞数と培養可能な細胞数の差が VBNC 細胞数となる。

III VBNC 状態からの復帰性

VBNC 状態からアクティブな状態への復帰は、VBNC 化の原因となったストレスからの解放によって引き起こされることが示唆されている。ROSZAK et al. (1984) は、貧栄養ストレスによって誘導された VBNC 細胞が、培

地に栄養を添加されることによって復帰することを示唆した。サルモネラ菌を滅菌した川水（貧栄養培地）中でアクティブ細胞が検出されなくなるまで培養した後、栄養を添加し、さらに4日間培養した。その結果、VBNC細胞が復帰し、最初に接種した細胞とほぼ同数のアクティブ細胞が検出された。NILSSON et al. (1991) は、低温ストレスによって誘導された VBNC 細胞が常温への移行によって復帰することを示唆した。滅菌塩液中に懸濁した *V. vulnificus* の細胞をアクティブ細胞が検出できなくなるまで低温下で培養した後、常温下に移し、さらに3日間培養した。その結果、VBNC細胞が復帰し、最初に接種した細胞とほぼ同数のアクティブ細胞が検出された。

ROSZAK et al. (1984) と NILSSON et al. (1991) の研究上の重要な問題点は、栄養添加や常温移行によって、わずかに生き残っていたアクティブ細胞が増殖した可能性を否定できないことである。さらに、これらの報告とともに、VBNC細胞は復帰しないという報告もされていることから、現在、復帰性についての統一的な見解は得られていない。

わずかに残ったアクティブ細胞の増殖が VBNC 細胞の復帰に見えるのではないかという問題については、しばらく解決されなかったが、WAI et al. (1996) の研究が一石を投じるようになった。コレラ菌を M9 塩液（貧栄養培地）中でアクティブ細胞が検出されなくなるまで培養した後、培養液の一部を 45℃ 下に1分間置いたところ、 10^3 CFU/ml 以上のアクティブ細胞が検出されるようになった。仮に、培養液中にわずかにアクティブ細胞が残っていたとしても、1分間に 10^3 CFU/ml 以上にまで急激に増殖したとは考えにくい。したがって、VBNC細胞は、熱ショックによってアクティブ細胞に復帰することが強く示唆された。同様な結果は、ネズミチフス菌 (*Salmonella enterica* serovar Typhimurium) でも報告されている (GUPTA et al., 2003)。

VBNC細胞に実験的に熱ショックを与えることは可能であるが、自然環境中で同様な刺激が与えられることはまれである。もし、動植物の病原細菌が自然界中に VBNC 状態で生存しているのであれば、それらが最も遭遇しやすい復帰条件はストレスからの解放であろう。例えば、冬季の低温ストレスからは季節の変化によって、土壤中での貧栄養ストレスからは植物根の接近などによって解放されると考えられる。したがって、公衆衛生および植物防疫上、ストレスからの解放が VBNC 細胞に与える影響について評価することは大変重要である。

IV VBNC 状態研究分野と物理・化学的ストレス研究分野の合流

VBNC 状態の研究は、主に微生物生態学者らによって実施されてきた。一方、微生物生理学者からも細菌細胞への物理・化学的ストレスについての研究を実施してきたが、VBNC 状態の研究と相交わることはなかった。後者の研究では、物理・化学的ストレスが細菌細胞に及ぼす影響に関する以下の知見が得られている：

- ①細菌細胞に物理・化学的ストレスが加わると細胞膜や核酸などが損傷を受け、過酸化水素 (H_2O_2) などの毒性物質に高い感受性を示すようになる (ANDREW and RUSSELL, 1984)
- ②培地をオートクレーブ滅菌した際に H_2O_2 発生が発生する (BARRY et al., 1956)
- ③カタラーゼやピルビン酸などの過酸化物質を培地に添加すると、損傷細胞が増殖できるようになる (BAIRD-PARKER and DAVENPORT, 1965)

1990年代末になると、VBNC 状態の研究に、これら知見が取り入れられ始めた。MIZUNOE et al. (1999) は、 H_2O_2 消去活性のあるカタラーゼ、ピルビン酸ナトリウム (SP)、 α -ケトグルタル酸または 3,3'-チオジプロピオン酸を培地に添加したところ、低温下で誘導された大腸菌 VBNC 細胞の一部が増殖できるようになることを示した。すなわち、 H_2O_2 消去物質を培地に添加することによって増殖できるようになる細胞とそうでない細胞が存在することが明らかになった。それら研究の結果から、細菌細胞は、(a)アクティブ状態、(b) H_2O_2 消去物質を培地に添加することで増殖できるようになる状態、(c) H_2O_2 消去物質を添加しても増殖できない状態、(d)死状態の順に遷移することが示唆された (図-1)。しかし、 H_2O_2 消去物質によって増殖できるようになる状態が現れなかったという報告もあるため、今後さらに検証が必要である。

V H_2O_2 消去物質の培地添加によって可培養化される VBNC 細胞の重要性

BOGOSIAN et al. (2000) は、VBNC 細胞を SP 添加培地で増殖できる細胞と増殖できない細胞に区別し、それぞれの復帰性の有無を検定した。人工海水に *V. vulnificus* を懸濁し、低温下で培養した。アクティブ細胞が検出できなくなった後、SP 添加培地で増殖できる細胞が存在している期間では、培養液の一部を常温下に移すとアクティブ細胞が検出された。一方、SP 添加培地で増殖できる細胞が検出されなくなるまで培養した後、培養液の

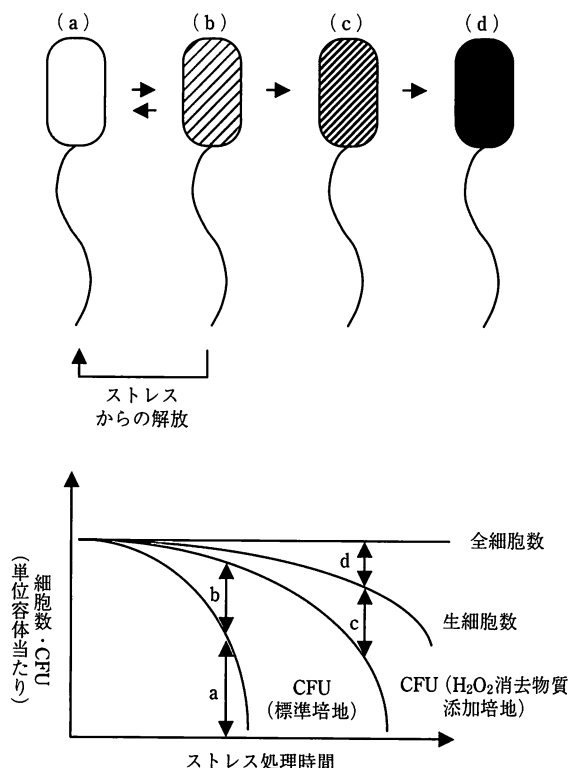


図-1 細菌細胞で推定される状態の遷移

- (a) 標準的な培地で増殖できるアクティブな細胞。
 (b) H₂O₂ 消去物質を培地に添加することで増殖できるようになる VBNC 細胞。
 (c) H₂O₂ 消去物質を添加しても増殖できるようにならない VBNC 細胞。
 (d) 死細胞。

一部を常温に移してもアクティブ細胞は検出されなかった。この結果から、VBNC 細胞の中で復帰することができるのは、SP 添加培地で増殖できる細胞のみであることが示唆された。

VI 青枯病菌の VBNC 状態に関連する研究

動物病原細菌で VBNC 状態が発見されてから 10 年以上経た 1990 年代の後半になり、植物病原細菌の VBNC 状態が研究されるようになった。青枯病菌の VBNC 状態については、主にオランダとアメリカで研究されている。VAN ELSAS et al. (2000; 2001) は、非滅菌土中や滅菌蒸留水中で低温培養した青枯病菌が VBNC 状態に移行することを示した。GREY and STECK (2001) は、硫酸銅水溶液中や滅菌土壌中で培養した青枯病菌が VBNC 状態に移行することを示した。次に、彼らは滅菌土中で青枯病菌を培養し、アクティブ細胞が検出されなくなった後、宿主であるトマトを播種した。一部の植物に発病が認められた時期に、根周辺土から青枯病菌の分離を試みたところ、根圏に近いほど高頻度に本菌が分離された。したがって、植物根の接近によって VBNC 細胞はアクティブ状態に復帰したことが示唆された。さらに、彼らは、トマトの根頭に青枯病菌を接種し、植物組織中での本菌細胞の状態をモニタリングした。その結果、病徴の進行に従って VBNC 状態の細胞の割合が増加することを示した。これらの結果から、青枯病菌が植物中や土壌中で VBNC 状態に移行すること、さらに、土壌中で VBNC 状態の細胞は宿主根の接近によってアクティブ状態に復帰することが示唆された (図-2)。

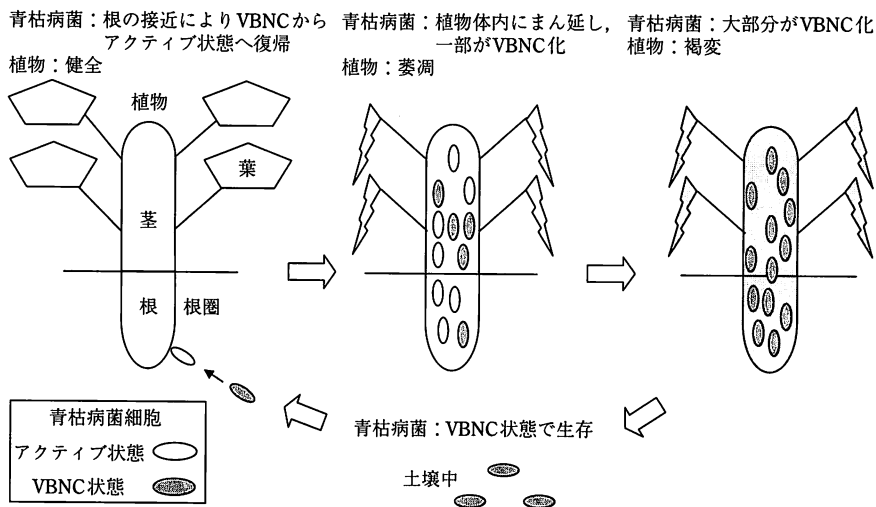


図-2 青枯病菌の推定伝染環 (GREY and STECK, 2001 に基づき作成)

VAN OVERBEEK et al. (2004) は、滅菌蒸留水中に懸濁した青枯病菌を低温下で培養し、培養液を経時的にトマトに処理して発病程度を調べた。その結果、アクティブ細胞が検出できなくなった後でも、カタラーゼ添加培地で増殖できる細胞が存在する培養液を処理したトマトは発病した。一方、カタラーゼ添加培地で増殖できる細胞が検出できなくなった培養液を処理したトマトは発病しなかった。以上の結果から、カタラーゼ添加によって増殖できるようになる VBNC 細胞の少なくとも一部は病気を引き起こすことが示唆された。

以上の研究成果は、青枯病菌の VBNC 状態に関する重要な情報を提供しているが、植物防疫上問題となる復帰性についてはいまだ十分に調査されていない。そこで筆者は、これまでの青枯病菌の VBNC 状態に関する研究結果に基づいて、「青枯病菌の VBNC 細胞のうち、 H_2O_2 消去物質添加培地で増殖できる細胞は、ストレスからの解放によってアクティブ状態に復帰する」という仮説を導いた。本仮説を検証するため、滅菌蒸留水中に懸濁した青枯病菌細胞を低温下で培養した。アクティブ細胞が検出できなくなるまで培養した後、 H_2O_2 消去物質を培地に添加することによって増殖できる VBNC 細胞と増殖できない VBNC 細胞の復帰性の有無を検証した。その結果、前者の細胞の一部は、常温移行によってアクティブ細胞に復帰することが強く示唆された。一方、後者の細胞は、アクティブ細胞に復帰しなかった。これらの結果は先の仮説を支持しており、現在、再現性などについて調査中である。

おわりに

VBNC 状態の研究が微生物生態分野で注目されるようになった背景には、VBNC 細胞は孢子を形成しない細菌の耐久体として機能しており、細菌は能動的に VBNC 状態に移行しているとする仮説が立てられたからである。しかし、VBNC 状態に移行した細胞がストレスを受け続けると、いずれは代謝活性を失った死細胞となることから、VBNC 状態は死へ向かう過程で一時的に現れる状態としてとらえることもできる。筆者は、VBNC 状態への移行はストレスによって引き起こされる細胞の損傷に起因しており、受動的に本状態へ移行していると考えている。しかし、数種の細菌では、VBNC 細胞に病原性や復帰性があることが強く示唆されていることから、植物防疫上、これら細胞を無視できない。

VBNC 状態の研究において、 H_2O_2 消去物質の培地への添加によって増殖できるようになる細胞を区別している報告はあまり多くない。今後、VBNC 細胞の復帰性や病原性などを検証する場合には、 H_2O_2 消去物質添加培地での増殖性を明確にしたうえで、実施することが重要と考えている。また、熱ショックによって復帰する細胞と H_2O_2 消去物質の添加によって増殖が可能となる細胞の関連性を検証することも今後の課題である。

青枯病菌でも他の細菌と同様に、ストレスによって VBNC 状態が誘導されること、少なくとも一部の VBNC 細胞は病原性や復帰性をもつことが強く示唆された。罹病植物や汚染土壌などから、原・小野培地や SMSA 培地などを用いて本菌を分離する際には、カタラーゼやピルビン酸などの H_2O_2 消去物質を添加することが望ましいと考えている。

本稿の執筆に当たり、有益なご助言をいただきました中保一浩博士に心よりお礼申し上げます。また、筆者の研究は、文科省科研費 (No. 19780243) の助成を受けて実施している。

引用文献

- ALEXANDER, E. D. et al. (1999): *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3754 ~ 3756.
- ANDREW, M. H. E. and A. D. RUSSELL (1984): *The revival of injured microbes*, Academic Press, Orlando, FL, USA, 394 pp.
- BAIRD - PARKER, A. C. and E. DAVENPORT (1965): *J. Appl. Bacteriol.* **28**: 390 ~ 402.
- BARRY, V. C. et al. (1956): *Nature* **178**: 596 ~ 597.
- BOGOSIAN, G. et al. (2000): *J. Bacteriol.* **182**: 5070 ~ 5075.
- GAUTHIER, M. J. (2000): *Nonculturable microorganisms in the environment*, ASM Press, Washington, DC, USA, p. 87 ~ 112.
- GHEZZI, J. I. and T. R. STECK (1999): *FEMS Microbiol. Ecol.* **30**: 203 ~ 208.
- GREY, B. and T. R. STECK (2001): *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 3866 ~ 3872.
- GUPTA, A. R. et al. (2003): *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 6669 ~ 6675.
- KOGURE, K. et al. (1979): *Can. J. Microbiol.* **25**: 415 ~ 420.
- MANAHAN, S. H. and T. R. STECK (1997): *FEMS Microbiol. Ecol.* **22**: 29 ~ 37.
- MIZUNOE, Y. et al. (1999): *Arch. Microbiol.* **172**: 63 ~ 67.
- NILSSON, L. et al. (1991): *J. Bacteriol.* **173**: 5054 ~ 5059.
- ORDAX, M. et al. (2006): *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 3482 ~ 3488.
- ROZSAK, D. B. et al. (1984): *Can. J. Microbiol.* **30**: 334 ~ 338.
- SCHAARD, N. W. et al. (2001): *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*, 3rd ed., ASM Press, Washington, DC, USA, 373 pp.
- VAN ELSAS, J. D. et al. (2000): *Can. J. Microbiol.* **47**: 842 ~ 854.
- et al. (2001): *Phytopathology* **90**: 1358 ~ 1366.
- VAN OVERBEEK, L. S. et al. (2004): *ibid.* **94**: 463 ~ 469.
- WAI, S. N. et al. (1996): *FEMS Microbiol. Lett.* **136**: 187 ~ 191.
- XU, H. et al. (1982): *Microb. Ecol.* **8**: 313 ~ 323.