

バクテリオファージを用いた魚類細菌感染症の防除技術の開発

羽生和弘・田中真二・栗山 功

目的

本事業は、新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業の中で、広島大学、宮崎大学、愛媛県、徳島県および日本全薬工業株式会社とともに実施し、細菌の天敵ウイルスであるバクテリオファージ（以下、ファージ）を利用して、魚類細菌感染症に対する新しい治療および予防技術（ファージ療法）を開発することを目的とする。研究課題は、①主要魚類病原細菌ファージ株の選定、②ファージの有効投与技術の開発および③ファージの大量培養と保存技術の開発の3つであり、本県は、有効な対策が見つかっていないマダイのエドワジエラ症（原因細菌 *Edwardsiella tarda*）を対象に、共同研究機関が試験管内で溶菌活性を確認したファージを用いて、人為感染試験を行い、ファージの有効性を評価するとともに用法と用量を決定する。

方法

1. 高濃度ファージ液の作製

これまでマダイのエドワジエラ症に対するファージ療法に十分な有効性は認められていない。その原因の一つとして投与ファージの濃度が不十分であることが考えられる。マダイ養殖漁場の環境水から分離したファージ MSW3 株と病魚から分離した *E. tarda* MEE0309 株を用いて、ファージの培養方法を改良し、高濃度ファージ液を作製した。

2. 高濃度ファージ液によるエドワジエラ症の治療

1) 試験 1

マダイ（平均体重 7.4g）を 500L 水槽 2 槽に 110 尾ずつ収容し、25°C に水温馴致した。一方の水槽のマダイを *E. tarda* MEE0309 株の低濃度菌液（ $10^{7.2}$ CFU/mL）で、他方の水槽のマダイを高濃度菌液（ $10^{8.3}$ CFU/mL）で 1.5 時間浸漬攻撃した。その 24 時間後の生残魚のうち、各槽 67 尾を次に説明する治療試験に用いた。

67 尾のうち 30 尾にはファージ MSW3 株（ $10^{11.2}$ PFU/0.05mL/尾）を、他の 30 尾にはトリプトソイブイオン（TSB, 0.05mL/尾）を注射投与した。残りの 7 尾については、注射投与直前の腎臓における菌濃度を調べた。投与後、菌攻撃濃度別および投与物別にマダイを 100L 水槽に収容し、30 日間のマダイの累積死亡率を観察した。

2) 試験 2

25°C に水温馴致したマダイ（平均体重 15.4g）54 尾を *E. tarda* MEE0309 株（ $10^{7.7}$ CFU/mL）で 1.5 時間浸漬攻撃し、その 10 日後の生残魚 29 尾のうち、12 尾にはファージ MSW3 株（ $10^{11.1}$ PFU/0.05mL/尾）を、他の 12 尾には TSB（0.05mL/尾）を注射投与した。投与後、投与物別にマダイを 100L 水槽に収容し、30 日間のマダイの累積死亡率を観察した。残りの 5 尾については、注射投与直前の腎臓における菌濃度を調べた。また、各槽の生残魚 6 尾について、試験終了時の腎臓における菌濃度を調べた。

3. 高濃度ファージ液によるエドワジエラ症の予防

マダイ（平均体重 7.6g）を 100L 水槽 6 槽に 30 尾ずつ収容し、25°C に水温馴致した。6 槽のうち 3 槽のマダイには、ファージ MSW3 株を注射（ $10^{11.4}$ PFU/0.05mL/尾）、浸漬（ 10^9 PFU/mL, 1.5 時間）または経口（ $10^{11.4}$ PFU/0.05mL/回/尾, 30 日間毎日 1 回）により投与した。経口では、ファージ液を市販固形餌料に吸着させたものを自由摂餌により投与した。また、各投与方法の対照区として、残りの 3 槽のマダイに TSB を同様の方法で投与した。各投与（経口投与については初回投与）の 4 時間後に *E. tarda* MEE0309 株でマダイを浸漬攻撃（ $10^{7.5}$ CFU/mL, 1.5 時間）し、その後 30 日間のマダイの累積死亡率と相対生残率 [RPS: (1-ファージ区累積死亡率/対照区累積死亡率) × 100] を調べた。また、同様の予防試験を 1 回繰り返し、再現性を確認した。

4. ファージを投与して 24 時間後のマダイ体内におけるファージの消長

マダイ（平均体重 100g）を 100L 水槽 3 槽に 7 尾ずつ収容し、25°C に水温馴致した。各槽のマダイには、ファージ MSW3 株を注射（ 10^{11} PFU/0.05mL/尾）、浸漬（ 10^9 PFU/mL, 1.5 時間）または経口（ 10^{11} PFU/0.25mL/尾）により投与した。経口では、ファージ液を市販固形餌料の磨砕粉末に吸着させたものを 1mL シリンジで強制投与した。投与の 24 時間後に、マダイの腎臓におけるファージ濃度を調べた。

5. 高濃度ファージ液によるエドワジエラ症の予防効果の持続期間

マダイ (平均体重 14.3g) を 100L 水槽 4 槽に 28 尾ずつ収容し、25°C に水温馴致した。4 槽のうち 2 槽のマダイには、ファージ MSW3 株を注射投与した ($10^{11.3}$ PFU/0.05mL/尾)。また、対照区として、残りの 2 槽のマダイに TSB を投与した。ファージを投与した 2 槽のうち 1 槽のマダイおよび TSB を投与した 2 槽のうち 1 槽のマダイを、ファージを投与して 4 時間後に *E. tarda* MEE0309 株で浸漬攻撃 ($10^{7.5}$ CFU/mL, 1.5 時間) し、その後 30 日間のマダイの累積死亡率と相対生残率 (RPS) を調べた。また、残りの 2 槽については、ファージまたは TSB を投与して 15 日後に *E. tarda* MEE0309 株で浸漬攻撃 ($10^{7.5}$ CFU/mL, 1.5 時間) し、その後 30 日間のマダイの累積死亡率と RPS を調べた。また、試験終了時生残魚の保菌率と、分離菌のファージ MSW3 株に対する感受性を調べた。

6. ファージを投与して 0, 15, 30, 45 日後のマダイ体内におけるファージの消長

マダイ (平均体重 14.3g) を 100L 水槽に 28 尾収容し、25°C に水温馴致した。全てのマダイにファージ MSW3 株を注射投与し ($10^{11.3}$ PFU/0.05mL/尾)、ファージを投与して 0 日 (4 時間)、15 日、30 日および 45 日後に 5-6 尾ずつ取り上げ、腎臓におけるファージ濃度を測定した。

7. 増殖性の高いファージ株の探索

広島大学と三重県で保存されている 96 株のファージ株 (種々の環境水や魚から分離された株) のうち、溶菌活性が互いに異なる 45 株について、*E. tarda* MEE0309 株を宿主菌として高濃度ファージ液 (10^{12} PFU/mL 以上) を作製できるか否かを検討した。作製方法は前述の方法に準じ、その方法では高濃度に培養できなかった一部のファージ株については、培養条件を変更して、再度、高濃度ファージ液の作製を試みた。

結果

1. 高濃度ファージ液の作製

10^{10} CFU/mL の *E. tarda* MEE0309 株菌液 0.4mL, 10^5 PFU/mL のファージ MSW3 株ファージ液 0.1mL および TSB3.0mL の混合液をトリプトソイ寒天平板 (直径 9cm) に重層し、25°C で 24 時間培養することで、これまでの 100 倍濃度のファージ液 ($10^{12.4}$ - $10^{12.6}$ PFU/mL) を寒天平板当たり 2.5mL 前後回収できることが明らかになった。

2. 高濃度ファージ液によるエドワジエラ症の治療

1) 試験 1

ファージ投与直前のマダイの腎臓における菌濃度は、

低濃度菌液で攻撃したマダイで $10^{4.9}$ CFU/g, 高濃度菌液で攻撃したマダイで $10^{7.1}$ CFU/g であった。低濃度菌液で攻撃した対照区以外では、投与後 4 日以内にマダイの累積死亡率が 50% 以上となった。30 日間の累積死亡率は、低濃度菌液で攻撃したファージ投与区で 90%, 対照区で 67%, 高濃度菌液で攻撃したファージ投与区で 77%, 対照区で 83% であり、高濃度ファージ液に治療効果は認められなかった。

2) 試験 2

30 日間の累積死亡率は、ファージ投与区が 42%, 対照区が 33% であった。腎臓における菌濃度は、ファージ投与直前が $10^{8.4}$ CFU/g, 対照区の試験終了時生残魚が $10^{8.5}$ CFU/g, ファージ投与区の試験終了時生残魚が $10^{8.7}$ CFU/g であり、高濃度ファージ液に治療効果は認められなかった。

3. 高濃度ファージ液によるエドワジエラ症の予防

ファージ投与区と対照区の 30 日間の累積死亡率は、それぞれ、注射投与が 10% と 53% (RPS=81%), 浸漬投与が 50% と 70% (RPS=29%), 経口投与が 40% と 50% (RPS=20%) であった。再現性確認試験の累積死亡率は、注射投与が 20% と 63% (RPS=68%), 浸漬投与が 40% と 60% (RPS=33%), 経口投与が 87% と 57% (RPS=53%) であった。すなわち、2 回の試験のいずれにおいても、注射投与に高い予防効果が認められた。

4. マダイ体内でのファージの消長

ファージを投与して 24 時間後のマダイの腎臓におけるファージ濃度は、注射投与が $10^{10.4}$ PFU/g, 浸漬投与が 10^6 PFU/g, 経口投与が 10^4 PFU/g であり、腎臓におけるファージ濃度と前述の予防試験の RPS との間には正の相関が認められた。

5. 高濃度ファージ液によるエドワジエラ症の予防効果の持続期間

ファージを投与して 4 時間後に菌攻撃したマダイの累積死亡率に有意な低下は認められなかったが (ファージ投与区で 25%, 対照区で 46%, RPS=46%), 菌攻撃して 30 日後の生残魚の保菌率は対照区より明らかに低かった (ファージ投与区で 10%, 対照区で 100%)。一方、ファージを投与して 15 日後に菌攻撃したマダイについては、累積死亡率に有意な低下は認められず (ファージ投与区で 39%, 対照区で 46%, RPS=17%), 菌攻撃して 30 日後の生残魚の保菌率も対照区と差がなかった (ファージ投与区で 100%, 対照区で 100%)。生残魚から分離された *E. tarda* のファージ感受性は、ファージを投与し

て4時間後に菌攻撃したファージ投与区の生残魚から分離された *E. tarda* 2検体で全て陰性、それ以外の試験区の生残魚から分離された *E. tarda* 45検体で全て陽性であった。すなわち、予防効果の持続期間は15日未満と考えられた。

6. ファージを投与して0, 15, 30, 45日後のマダイ体内におけるファージの消長

ファージを投与して0日, 15日, 30日および45日後のマダイの腎臓におけるファージ濃度は、それぞれ 10^{102} , 10^{72} , 10^{55} および 10^{46} PFU/g であった。前述の予防効果の持続期間の試験より、顕著な予防効果を得るには、 10^{102} PFU/g 程度の体内濃度が必要と考えられた。

7. 増殖性の高いファージ株の探索

45株のうち11株については、高濃度ファージ液の作製が可能であった。11株の内訳は、マダイ養殖漁場環境

水由来が3株、ヒラメ養殖漁場環境水由来が3株、マダイ臓器由来が2株、クロダイ臓器由来が3株であった。

考察

高濃度ファージ液にエドワジエラ症の治療効果は認められなかった。一方、高濃度ファージ液の注射投与には高い予防効果が認められた。しかし、予防効果の持続期間は15日未満と短く、現場での使用には十分ではない。ファージの体内濃度と予防効果には正の相関が認められたことから、今後は、ファージの体内滞留性を高める方法の開発が必要である。

共同研究機関とともに3年間本事業に取り組み、本県は高濃度ファージ液の作製方法を開発し、高濃度ファージ液に高い予防効果があることを明らかにした。ファージ療法の実用化には、予防効果の持続期間の延長、安全性の検討、高濃度ファージ液の大量培養といった課題が残されている。今後の技術開発に期待したい。