

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・西川久代・津本欣吾

目的

本研究は、農林水産研究高度化事業の中で、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、主要魚類病原細菌ファージ株の選定、ファージの有効投与技術の開発、ファージの大量培養および保存技術の開発の3つであり、本県は、マダイのエドワジエラ症を対象に、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、人為感染試験および野外試験を行い、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. ファージ耐性 *Edwardsiella tarda* 株の病原性

in vitro で *E. tarda* とファージを混合・培養すると、ファージ耐性 *E. tarda* が確認される。この耐性菌がマダイに対して高い病原性をもつ場合、耐性菌の存在が治療の妨げとなる可能性がある。この問題を検討するため、耐性菌を *in vitro* で誘導し、その病原性を、次に示す室内試験で明らかにした。

E. tarda MEE0309 株にファージ MSW-3（マダイ養殖環境水由来）株または MFH-6 株（マダイ養殖環境水由来）を感染させ、48 時間後にそれぞれのファージに対して感受性を示さない株（ファージ耐性株）を 1 株ずつ得た。試験区は、このファージ耐性 2 株とファージ感受性親株（対照）のいずれかで攻撃する 3 試験区とし、それぞれ平均体重 9g のマダイ 30 尾を供試した。各区の供試魚を 10^7 CFU/mL の各菌液に 1.5 時間浸漬し、100L 水槽に収容して水温 25 で 30 日間飼育観察した。

2. マダイ体内でのファージの消長

ファージの経口投与の可能性と経口投与間隔を検討するため、経口投与されたファージのマダイ体内侵入性と消長を、次に示す室内試験で明らかにした。

ファージ MSW-3 株およびファージ IW-1 株（ヒラメ養殖環境水由来）を供試した。ファージを含むトリプトソイブイオン（TSB）を固形餌料（EP）粉末に吸着させ、それを平均体重 53 g のマダイ 14 尾に強制経口投与した（ 10^9 PFU/100 μ L/尾）。ファージ投与直前、投与 6 時

間後および 24 時間後に、7 尾ずつ取り上げ、各個体の血液、脳および腎臓におけるファージの濃度を測定した。

3. ファージ療法の有効性

マダイのエドワジエラ症に対するファージ療法の有効性を、経口投与と注射投与について、次に示す室内試験で検討した。

1) ファージの経口投与

ファージ投与区と対照区の 2 試験区とし、それぞれ平均体重 20 g のマダイ 25 尾を供試した（水温 25 ）。ファージ投与区では、ファージ 3 株混合液（MSW-3、MHF-6 および MSF-6）を吸着させた EP を、菌攻撃の 4 時間前と 4 時間後に投与した（ 10^9 PFU/100 μ L/尾）。対照区では、TSB（100 μ L/尾）を同様に投与した。菌攻撃には *E. tarda* MEE0301 株を使用し、 10^8 CFU/50 μ L/尾の濃度で経肛門法により攻撃した。菌攻撃後も、ファージ吸着 EP を 1 日 2 回、30 日間にわたって給餌した。

2) ファージの注射投与

試験区、供試魚および菌攻撃は、経口投与試験と同様に設定した。ファージ投与区の供試魚には、上記と同じファージ 3 株混合液を 10^9 PFU/100 μ L/尾の濃度で菌攻撃 4 時間前と 4 時間後に腹腔内接種した。対照区では、TSB（100 μ L/尾）を同様に投与した。その後は、ファージを接種せず、30 日間飼育観察した。

結果および考察

1. ファージ耐性 *Edwardsiella tarda* 株の病原性

耐性菌攻撃区のマダイの累積死亡率は 7%（MSW-3 耐性菌）と 10%（MHF-6 耐性菌）で、それらは対照区の 47% に比べ有意に低かった。従って、*in vitro* で誘導されるファージ耐性菌の病原性は低いと考えられる。

2. マダイ体内でのファージの消長

いずれのファージも、投与 6 時間後に腎臓から最も高濃度（ $10^{4.3} \sim 10^{4.9}$ PFU/g）に検出され、投与 24 時間後にはほぼ消失した。このことから、経口投与されたファージは、胃を通過して体内に侵入するものの、24 時間でほぼ消失することから、体内でのファージ量を増やすためには、より高濃度のファージ液を投与するか、今回投与したファージ液の濃度では、少なくとも 24 時間以内に連続投与する必要があると考えられる。

3. ファージ療法の有効性

1) ファージの経口投与

ファージ投与区と対照区の累積死亡率はそれぞれ36%と44%となり、ファージ投与区の方がやや低いものの、両者に有意差は認められなかった。ファージ投与区、対照区ともに死亡魚から分離された *E. tarda* はすべて、投与したファージ3株に対する感受性が認められた。

2) ファージの注射投与

ファージ投与区と対照区の累積死亡率は、それぞれ16%と32%で、ファージ投与区の方が低いものの、有意差は認められなかった。経口投与と同様、死亡魚から分離された *E. tarda* はすべてファージ感受性であった。

以上のように、経口投与と注射投与のいずれにおいても十分な治療効果は確認できなかった。その原因としては、*E. tarda* はマダイの食細胞内で抵抗性を示し、この *E. tarda* にファージが到達できないことが考えられる。