

# 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

湯浅明彦

養殖生産過程で発生する細菌感染症は、魚介類感染症全体の被害額の約70%を占める。従来、細菌感染症対策として抗生物質などの医薬品による化学療法が行われてきた。その結果、医薬品の多用を原因とする薬剤耐性菌の出現や、投薬にともなう水域環境汚染が問題になっている。本事業は、病原細菌に寄生してこれを破壊（溶菌）するウイルスであるバクテリオファージ（以下「ファージ」とする）を利用して、化学療法に替わる新しい予防および治療技術であるファージ療法の開発を目的とする。

水産研究所では広島大学と共同で、アユ養殖に被害をもたらす*Flavobacterium psychrophilum* 感染症（アユの細菌性冷水病）と*Pseudomonas plecoglossicida* 感染症（アユのシュードモナス病）のファージ療法について研究を行ってきた。昨年までに、*F. psychrophilum* に特異的なファージを5株、*P. plecoglossicida* は8株を分離し、保存している。*F. psychrophilum* に特異的なファージを用いて、アユの細菌性冷水病の予防効果について室内試験を実施したので報告する。

## 材料と方法

**試験区の設定** ファージを投与する条件が異なる4試験区を設定し、それぞれ1から4までの番号を付した。各試験区の対照区（陽性区及び陰性区）は、それぞれ末尾の数字が等しい（表1）。各試験区及び各対照区では、それぞれ20L水槽1個を使用した。試験区1と2はファージの投与を経口法（供試魚にファージを混合した配合飼料を投与する方法）で行い、試験区3と4は浸漬法（ファージを添加した飼育水中に供試魚を30分間維持する）で行った。また、試験区1と3のファージの投与は感染攻撃1時間後に行い、試験区2と4では24時間後に行った。

**供試魚** 1989年に吉野川の天然アユを初代親魚とし、徳島県栽培漁業センターで18回継代を続けた人工種苗を供試魚とした。この長期継代種苗は、冷水病に対する耐性が低下しているので人為的な感染が容易に成立する。供試魚を、1水槽あたり25から30尾ずつ収容した。

**感染攻撃法** ファージ株に感受性を有するTT030622株（*F. psychrophilum*）を攻撃試験に用いた。20%スキムミルクを保護剤にして-80℃で保存した菌株を、改変サイトファージ寒天培地に塗抹して17℃で4日間培養した。増殖したコロニーを、50mLの改変サイトファージ液体培地を入れた蓋付き三角フラスコで振とうし、17℃で24時間培養した。更に、培養した菌液15mLを、改変サイトファージ液体培地1.5Lを入れた三角フラスコ2個に入れて、ポア径0.2μmのフィルターで濾過した空気を通気しながら17℃で20時間培養した。この菌液約350mLを、水量を約8Lに調整して供試魚を収容したプラスチック製の水槽に添加し、30分間通気した。その後飼育水を約20mL注いで、冷水病菌液を水槽から強制的に排出した。

ファージの投与 攻撃菌株（TT030622）を溶菌するファージ株のPFpW-3とPFpW-7を、それぞれ1mLあたり $2.1 \times 10^9$  PFUと $2.2 \times 10^9$  PFUの濃度に調整した。経口法では両ファージ液を同量ずつ混合し、投与量が供試魚一尾あたり $3.0 \times 10^8$  PFUになるように市販の配合飼料に添加浸透したものを、攻撃後1時間と24時間にそれぞれの供試魚に食べ残しがないように少しずつ与えた。浸漬法では、両ファージ液を等量に混合したものをファージ濃度が1mLあたり $2.2 \times 10^7$  PFUになるように飼育水に添加し、その中で供試魚を30分間通気しながら飼育した。

攻撃後の魚体の菌数測定 感染攻撃実施後1, 24, 72時間に、それぞれ試験魚を5尾ずつ取り上げ、鰓弁と脾臓を摘出した。1mLのPBS緩衝液とともにホモジナイザーで磨砕し、同緩衝液で10倍希釈系列を作成し、改変サイトファージ寒天培地に希釈液0.1mLを滴下した後にコンラジ棒で塗り拡げた。17℃で3日から4日間培養し、増殖した黄色コロニーの数を計数して組織1g当たりの菌数を計算した。

攻撃後の魚体の菌数測定 感染攻撃実施後1, 24, 72時間に、それぞれ試験魚を5尾ずつ取り上げ、鰓弁と脾臓を摘出した。1mLのPBS緩衝液とともにホモジナイザーで磨砕し、同緩衝液で10倍希釈系列を作成し、改変サイトファージ寒天培地に希釈液0.1mLを滴下した後にコンラジ棒で塗り拡げた。17℃で3日から4日間培養し、増殖した黄色コロニーの数を計数して組織1g当たりの菌数を計算した。

表1. 試験区とそれぞれに対応する陽性区と陰性区の試験条件。末尾の数字の同じものが試験グループを形成する

感染攻撃の有無・ファージ投与時間	ファージ投与		ファージ非投与	
	経口	浸漬	経口	浸漬
攻撃 1時間後	試験区1	試験区3	陽性区1	陽性区3
非攻撃 1時間後			陰性区1	陰性区3
攻撃 24時間後	試験区2	試験区4	陽性区2	陽性区4
非攻撃 24時間後			陰性区2	陰性区4

## 結果

試験区1は感染攻撃後の発病による死亡が、陽性区1より1日遅い5日目から始まった。最終生残率は試験区1が57%、陽性区1が44%であった（図1）。

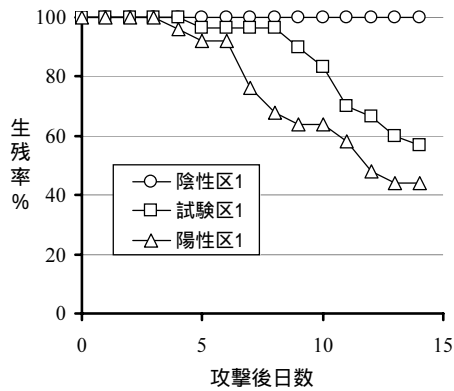


図1．試験区1（感染攻撃1時間後にファージを経口で投与），陰性区1及び陽性区1の生残率の推移

試験区2の死亡の開始は陽性区2より3日間遅れたが，その後の死亡率は陽性区2を上回り，最終生残率は試験区2が44%，陽性区2が52%であった（図2）。

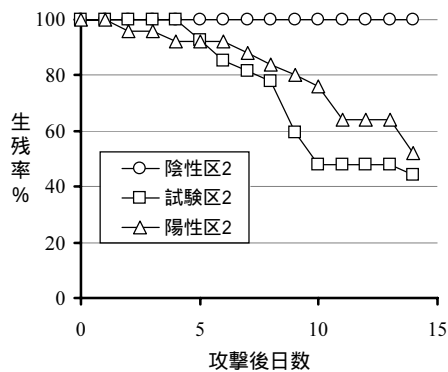


図2．試験区2（感染攻撃24時間後にファージを経口で投与），陰性区2及び陽性区2の生残率の推移

試験区3は感染攻撃後の発病による死亡が陽性区3より2日遅れるとともに，その後の死亡数は陽性区より少なく，最終生残率は試験区3が54%，陽性区3が28%であった。陰性区3でも冷水病が発病し，死亡率は約37%に達した（図3）。

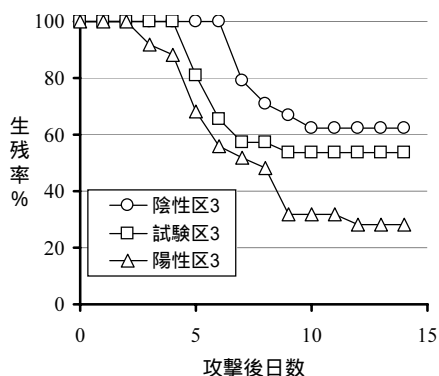


図3．試験区3（感染攻撃1時間後にファージ液に浸漬），陰性区3及び陽性区3の生残率の推移

試験区4は陽性区4と比べて死亡の開始が4日間遅れたが，その後の死亡率は高く推移した。最終生残率は試験区4が56%，陽性区4が52%であった（図4）。

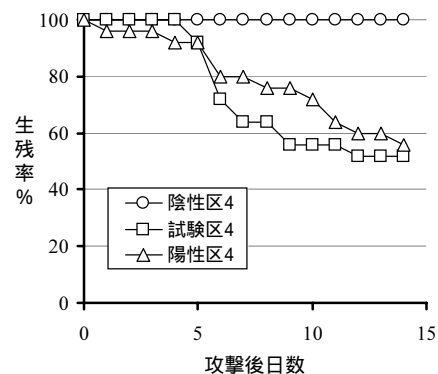


図4．試験区4（感染攻撃24時間後にファージ液に浸漬），陰性区4及び陽性区4の生残率の推移

感染攻撃後1時間から24時間の間に，脾臓内の冷水病原菌数は約9倍に増加した，鰓に付着した菌数は72時間後に約14倍に増加した（表1）。

表1．感染攻撃後の経過時間ともなう脾臓と鰓の冷水病原菌数の変化。単位は組織1gあたりの菌数（CFU）

器官	項目	感染攻撃後の経過時間		
		1	24	72
脾臓	平均	785	6,457	12,603
	標準偏差	846	3,502	11,119
鰓	平均	39,733	ND	570,560
	標準偏差	11,948	ND	517,784

ND, 未測定

攻撃後1時間以内にファージを投与した試験区は，陽性区と比較して生残率が若干向上したが統計的に有意な差は認められなかった。一方，24時間後にファージを投与した試験区の生残率は，陽性区と同等か更に低下した。24時間後のファージ投与による感染防御効果が低下したのは，魚体内外の原因菌数が増加したために投与したファージ量では原因菌の増殖と発病を防御できなかったことが原因と考えられる。従って魚体重あたりのファージ投与量を増やすことで感染防御効果が高まる可能性が考えられるが，ファージの投与量を増やすためにはファージを高濃度で培養する技術の開発が必要である。