

ヒラメ養殖場における *Edwardsiella tarda* および そのバクテリオファージの動態

松岡 学^{1*}・中井敏博²

(2004年6月2日受付)

Seasonal Appearance of *Edwardsiella tarda* and its Bacteriophages in the Culture Farms of Japanese Flounder

Satoru Matsuoka^{1*} and Toshihiro Nakai²

¹Ehime Prefectural Chuyo Fisheries Experimental Station, Iyo,
Ehime 799-3125, Japan

²Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,
Higashihiroshima 739-8528, Japan

(Received June 2, 2004)

ABSTRACT—This study was conducted to investigate seasonal appearance of *Edwardsiella tarda* and *E. tarda* bacteriophages in cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* and the culture environment. The surveys were carried out twice a month at 4 commercial fish farms in Ehime Prefecture in 2002–2004. *E. tarda* was isolated from the environmental seawater and the organs (kidney and spleen) of apparently healthy fish from June to December when mortality due to edwardsiellosis was found among cultured populations. As expected, the outbreak of the disease preceded a rapid increase in the titers of serum agglutinins against *E. tarda*. In contrast, *E. tarda* phages were frequently identified in the environmental seawater at least one month before the disease outbreak and during the disease prevalence, but not detected after the outbreak terminated. The present study suggests that the appearance of *E. tarda* phages can be an indicator for existence of *E. tarda* in the culture environment.

Key words: *Edwardsiella tarda*, bacteriophage, epizootiology, *Paralichthys olivaceus*, edwardsiellosis

ヒラメ *Paralichthys olivaceus* 養殖においては、近年魚価が低迷する中で細菌感染等による魚病被害が多発し、養殖経営は厳しい状況にある。このため、的確な魚病対策をとることがヒラメ養殖業の成功の鍵を握っているといえる。特に、*Edwardsiella tarda* を原因とするエドワジエラ症は、初夏から秋にかけての高水温期を中心に高い頻度で発生し、一旦発生すると慢性化する傾向が認めら

れることから、ヒラメ養殖業における重要疾病のひとつである(金井ら, 1988; 松岡・室賀, 1993; Muroga, 2001)。他の細菌感染症と同様、本症も化学療法剤による治療に頼らざるを得ないが、ヒラメに対して使用することが認可されている化学療法剤の種類が少ないことや薬剤耐性菌の増加のために治療が困難な場合が多い(松岡・和田, 1996)。養殖場内での細菌性疾病の蔓延を防ぐためには、早期に感染魚の存在を知ることが重要であるが、一般的に言って、発病魚が存在しない群においては外見上健康な魚からの病原体の検出率は低い。ヒラメ養殖過程における *E. tarda* の生態調査を行った金井ら

* Corresponding author

E-mail: matsuoka-satoru1@pref.ehime.jp

¹ 愛媛県中予水産試験場

² 広島大学大学院生物圏科学研究科

(1988) は、本菌がヒラメの腸管内から高率に分離されることを明らかにし、その検出率および生菌数が本症の発生を予察する指標となることを示唆している。一方、ヒラメの養殖環境水からも *E. tarda* が検出されているが、病気発生との関係は明らかにされていない (Rashid *et al.*, 1994)。

本研究では、ヒラメのエドワジエラ症の発生予測につながる指標を見いだすことを目的として、瀬戸内海の愛媛県海域におけるヒラメ養殖場において、養殖環境水とヒラメ体内における *E. tarda* および *E. tarda* 溶菌バクテリオファージ (以下ファージ) の出現動向並びにヒラメの *E. tarda* に対する血中抗体価の推移と本症流行との関係を調べた。

材料および方法

サンプリング

愛媛県上浦町、中島町、長浜町および伊予市のヒラメ養殖場において、ヒラメ 0 才魚が収容されている養殖施設を試験区とした (Fig. 1)。2002年 5～12月の毎月 2 回および 2003年 1～3月の毎月 1 回、養殖環境水および飼育中のヒラメの採取を行うとともに、各試験区における魚病発生状況を養殖業者から聞き取り調査した。また、上浦町および長浜町においては、2003年 5月から 2004年 3月にかけて環境水は毎月 2 回、ヒラメは毎月 1 回のサンプリングを行った。

毎回のサンプリングにおいて、上浦町および中島町では海面小割生簀外側の水深 2 m の海水を、長浜町および伊予市では陸上コンクリート水槽の排水を、それぞれ 1,500 mL 採取した。ヒラメは、各試験区につき毎月 10

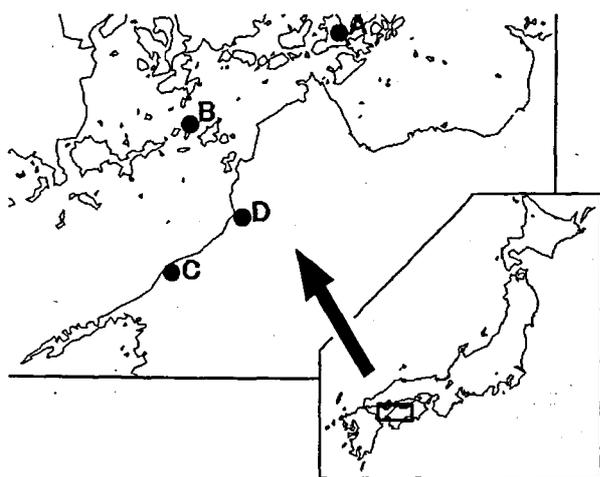


Fig. 1. Location of Japanese flounder culture farms in Ehime Prefecture. Farm A in Kamiura-cho and farm B in Nakajima-cho where fish were cultured in net pens. Farm C in Nagahama-cho and farm D in Iyo-shi where fish were cultured in concrete tanks.

尾 (2002年 5～12月は毎月 5 尾×2 回、2003年 1 月以降は毎月 10 尾×1 回) を供し、直ちにそれらの尾部血管から採血した。これらの水および魚のサンプルは、水蔵して愛媛県中予水産試験場の研究室に持ち帰った。

なお、上浦町の試験区は、約 20,000 m² の漁場内に約 150 台の小割生簀が設置されてヒラメのみ養殖されており、0 才魚の収容時に周辺には 1 才魚が存在する漁場にある。試験施設への種苗の導入時期は 2002 年 4 月下旬、2003 年は 6 月下旬であった。中島町の試験区は、前年まで魚類は全く養殖されておらず、他のヒラメ養殖生簀とは約 3 km 離れた漁場にある。そこに 2002 年の 5～12 月にかけて 1 業者が同じ由来の 0 才魚のみを 8 台の小割生簀に収容した。種苗の導入時期は 4 月中旬であった。長浜町の試験区は、約 14,000 m² の敷地内に複数の経営者が約 200 面のコンクリート水槽を設置している陸上施設のうちの 1 面である。種苗の導入時期は 2002 年、2003 年ともに 4 月下旬であった。伊予市の試験区は、1 業者が 36 面のコンパネシート張り水槽で 0 才および 1 才魚を養殖している陸上施設のうちの 1 面である。種苗の導入時期は 4 月下旬であった。

細菌の分離

水からの *E. tarda* の分離では、原海水を滅菌海水で適宜希釈したものおよび原海水 1,000 mL をフィルターユニット (0.45 μm: Nalge) を使用して吸引し、そのメンブレンフィルターを 10 mL の滅菌海水の入った試験管に入れて約 20 秒間激しく攪拌することで細菌を再懸濁させたものを試験水とした。これらの試験水をそれぞれサルモネラ・シゲラ (SS) 寒天培地 (日水製薬) 1 枚あたり 0.1 mL ずつ 2 枚に塗抹し、25°C で 48 時間培養後に出現したコロニーのうち中心部が黒色で周辺部が透明のコロニーを *E. tarda* として計数した (直接法)。なお、メンブレンフィルターから再懸濁させた試験水における検出限界は、0.05 CFU/mL となる。また、メンブレンフィルター上の細菌を再懸濁させた試験管に DSSS 培地 (Wyatt *et al.*, 1979) を 10 mL 加えて 25°C で 24 時間培養した。その 1 白金耳を SS 寒天培地に塗抹して、さらに 25°C で 48 時間培養した後に上記の基準で *E. tarda* 菌の存在を判定した (増菌法)。紛らわしいコロニーが出現した場合には、日本水産資源保護協会配布の抗 *E. tarda* (FPC-22 株) 家兔血清に対するスライド凝集試験により *E. tarda* を同定した。

ヒラメでは、外見上異常の認められない個体を供試し、トリプトソーヤ寒天培地 (日水製薬: 以下 TSA) および SS 寒天培地を用いて画線塗抹法により腎臓から細菌の分離を試みた (直接法)。また、腎臓および脾臓をそれぞれ 1 尾あたり約 0.05 g ずつ無菌的に摘出し、それらを 5 または 10 尾分まとめ、滅菌 PBS を 5 mL 加えてホモジ

ナイズした。さらに、腸管を摘出し (2003年度のみ)、内容を軽く拭き取った後、1尾あたり約 0.1 g を10尾分まとめて同様にホモジナイズした。これらの摩砕液 2 mL を DSSS 培地 5 mL に添加して25°Cで24時間培養後にその 1 白金耳をSS寒天培地に塗抹した (増菌法)。25°C, 48時間培養後に SS 寒天培地上に出現したコロニーについて、上述の方法で *E. tarda* を同定した。

ファージの分離

ファージの分離は、水およびヒラメともに合計26株の *E. tarda* を宿主菌とした集殖法でウイルス粒子の増加を図った後、このうちの16株 (2002年5月から2003年3月) または5株 (2003年5月から2004年3月) を標示菌 (indicator strain) とする寒天重層法により行った (日高, 1986; 坂田・古川, 2000)。なお、宿主菌と標示菌は同義語であるが、本報においては、ファージの集殖に使用した株を宿主菌、溶菌斑 (ブランク) の観察に使用した株を標示菌と標記した。宿主菌には、1988年に長崎県下のヒラメ病魚から分離された1株と2001年に愛媛県下で複数の養殖場のヒラメ病魚から分離された25株を使用した。なお、これらの株はすべて抗 FPC-22 血清で凝集した。

水からのファージの分離は、2002年5月から2003年3月の試験水では前述のフィルターユニット (0.45 μm) でろ過した海水 100 mL を規定量の2倍濃度の滅菌トリプトソーヤブイオン (日本製薬: 以下 TSB) 100 mL に加え、これに上述の宿主菌混合培養液 100 μL を加えて25°Cで24時間静置培養した。培養後、2,000 $\times g$ で10分間遠心分離し、その上清を 0.45 μm のメンブレンフィルターでろ過したものを環境水由来ファージ液とした。標示菌懸濁液 0.4 mL と各ファージ液 0.1 mL とを混和し、25°Cで15分間静置した後、50°Cに保温しておいた 1/3 濃度の TSA 培地 (寒天濃度0.5%) 3 mL と混合し、直ちに通常の TSA 培地に重層した。25°Cで2日間培養してブランクの有無を観察した。また、2003年5月~2004年3月の試験水 (上浦町, 長浜町) では、各試験水中のファージの大まかな定量を試みるため、ろ過海水の量を100, 10および1 mL とし、上述の集殖法および寒天重層法によるファージの分離を行った。

ヒラメからのファージの分離では、前述の脾臓・腎臓または腸管の摩砕液 3 mL を滅菌 TSB 30 mL に加えた後、環境水からのファージ分離と同様の方法でファージ液を得、寒天重層法でブランクの有無を確認した。

血中抗体価の測定

採血した血液は、4°Cで24時間静置して血清を採取し、凝集抗体価を測定するまで-80°Cで保存した。凝集抗体価の測定はマイクロタイター法により行い、25°Cで2時

間反応後、4°Cで1夜静置し判定した。抗原には2001年に長浜町のエドワジエラ症罹病ヒラメから分離された *E. tarda* PE106株の生菌を 1 mg/mL 濃度 (PBS) で使用した。

結 果

エドワジエラ症の発生状況

2002年5月から2003年3月の各試験区におけるエドワジエラ症発生期間を Fig. 2 に示した。収容尾数と死亡尾数から算出した各試験区における生残率は、上浦町59%, 中島町70%, 長浜町74%, 伊予市80%であった。エドワジエラ症罹病魚 (腹水貯溜, 脱腸といった外観症状から判断) が認められた時期は以下のとおりであるが、いずれの試験区においても本症による日間死亡率は0.5%以下で、大きな流行はみられなかった。上浦町における本症の発生期間は7~12月であったが、周辺の1才魚において6月中旬からエドワジエラ症の発生がみられていた (Fig. 2A)。周辺にヒラメ養殖場がない中島町においても、10~1月に発生がみられた (Fig. 2B)。長浜町では、死亡魚の外観症状においてもまた死亡魚の増加時に行った細菌検査でも本症罹病魚は認められなかったが、12月頃に周辺水槽の0才魚で本症がみられた (Fig. 2C)。ここでの8~9月の死亡率は17%に達したが、主な死亡原因は *Streptococcus iniae* によるレンサ球菌症であった。伊予市での発生期間は6~10月であった (Fig. 2D)。

2003年5月から2004年3月の上浦町および長浜町における調査結果を Fig. 3 に示した。両試験区における生残率は、上浦町が65%, 長浜町が84%であった。エドワジエラ症による死亡魚は、上浦町では9~12月 (Fig. 3A) に、長浜町では8~12月 (Fig. 3C) にみられたが、いずれも日間死亡率は0.5%以下であった。

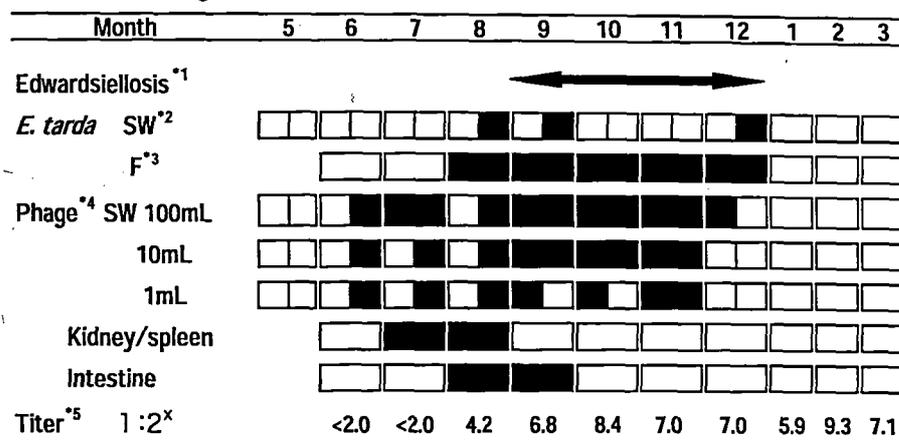
細菌の分離

海水およびヒラメからの *E. tarda* の分離結果を Fig. 2 (2002年度) と Fig. 3 (2003年度) に示す。なお、各図では SS 寒天培地への直接法と DSSS 培地を用いた増菌培養法での結果を区別せず、どちらかの方法で検出された場合を「検出」と表示した。

海水サンプルを直接塗抹した SS 寒天培地には0.05~6.2 $\times 10^3$ CFU/mL の細菌の発育がみられた。このうち *E. tarda* は、2002年には伊予市で6, 7, 9 および10月に (Fig. 2D), また、2003年には上浦町 (Fig. 3A) で8, 9, 12月, 長浜町 (Fig. 3B) で8, 12月に確認され、その菌数は0.2~50 CFU/mL であった。なお、増菌法によって *E. tarda* が検出されたのは2003年12月の上浦町および長浜町のみであった。

外見上健康なヒラメの腎臓からは、2002年度には上浦

A (Kamiura-cyo)



C (Nagahama-cho)

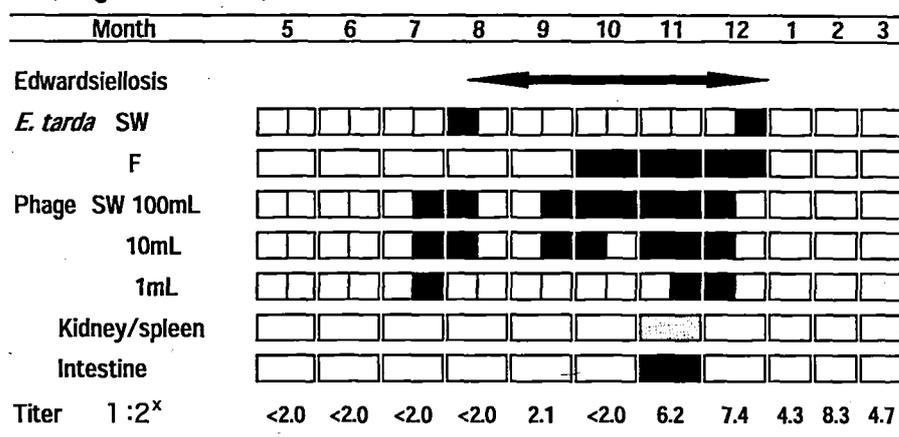


Fig. 3. Detection of *Edwardsiella tarda*, *E. tarda* bacteriophages and serum agglutinins in 2 farms of Japanese flounder in Ehime Prefecture in 2003–2004. Rearing seawater and apparently healthy fish were sampled twice a month from May to December or once a month from January to March at farm A (Kamiura-cho) and farm C (Nagahama-cho).

*1 Period of edwardsiellosis outbreak in the fish farms.

*2 Isolation of *E. tarda* from seawater by either direct plating or enrichment method. □: negative, ■: positive

*3 Isolation of *E. tarda* from fish (kidney/spleen or intestine) by either direct plating or enrichment method. □: negative, ■: positive

*4 Isolation of *E. tarda* phages from seawater (100, 10, 1 mL) and fish (kidney/spleen or intestine) by enrichment method. □: negative, ■: positive (Phages isolated were lytic to all 16 *E. tarda* strains used in the plaque assay), ▨: positive (Phages isolated were lytic only to some of 16 *E. tarda* strains used in the plaque assay)

*5 Mean agglutinin titers (n = 10) against *E. tarda* in the serum of Japanese flounder.

町で8, 9, 12月, 中島町で8, 10月, 長浜町で8, 9, 10月, 伊予市で7, 8, 10月に (Fig. 2), 2003年5月以降は, 上浦町では8~12月に, 長浜町では10~12月に *E. tarda* が検出された (Fig. 3)。また, 2003年度のみ行った腸管からは, 上浦町では8, 9, 11および12月に, 長浜町では11および12月に *E. tarda* が検出された (Fig. 3)。なお, 上述の海水サンプルとは異なり, 魚からの分離では DSSS 培地で増菌培養することにより, SS 寒天培地に直接塗抹するよりも高率に *E. tarda* が検出された。

ファージの分離

E. tarda ファージの検出結果を Fig. 2 (2002年度) と Fig. 3 (2003年度) に示した。環境水からは, すべての試験区において *E. tarda* を溶菌するファージが検出され, 8~10月にその検出頻度が高かった。中島町における2002年5月と11月 (Fig. 2) を除き, 分離されたファージは供試した *E. tarda* 標示菌16株すべてに溶菌性を示した。また, 2003年度の結果をみると, ファージは試験水 1 mL から高率に検出された (Fig. 3)。一方, ヒラメの脾臓・腎臓摩砕液からは, 2002年10月の伊予市 (Fig. 2D), 2003年7~9月の上浦町 (Fig. 3A) および

11月の長浜町 (Fig. 3B) で標示菌16株すべてに感染性を有するファージが検出されたほかは、標示菌1~2株のみ感受性を示すファージが散発的に検出された。腸管からも、脾臓・腎臓と同時期にファージが分離された (Fig. 3)。

これらのファージにより形成されるプラークの大きさは、環境水および魚体由来ともにほとんどのものが直径1 mm 以下であったが、ごくまれに3 mm 程度のものもみられた。ファージが検出された時期は、エドワジエラ症による死亡魚や一見健康なヒラメ魚体内から *E. tarda* が分離されるよりも1~2か月早かった。また、エドワジエラ症がほぼ終息する時期に環境中のファージもみられなくなり、1~3月の低水温期にはいずれの試験区においてもファージは検出されなかった。

血中凝集抗体価

Fig. 2 (2002年度) と Fig. 3 (2003年度) に、*E. tarda* に対する凝集抗体価を各月10尾分の平均値で示した。抗体価は、いずれの漁場においても試験区またはその周辺の施設でエドワジエラ症罹病魚または *E. tarda* の保菌魚が最初にみられた約1か月後に急上昇し、同症がみられなくなった1~2か月後に低下する傾向が認められた。特に、周辺施設にヒラメ1才魚が養殖されており、これらに7月上旬からエドワジエラ症病魚がみられた上浦町では、他の養殖場よりも早くから抗体価の急激な上昇が認められ、長期間高い抗体価が維持された (Figs. 2A, 3A)。また、魚体から *E. tarda* が分離された個体における抗体価は、各区におけるエドワジエラ症流行の初期には1:2³ と低かったが、流行盛期には1:2¹¹~1:2¹⁴ ときわめて高い値を示した。

考 察

2002年から2004年に愛媛県下のヒラメ養殖場で行った今回の調査では、試験区を設定した養殖場のいずれにおいてもエドワジエラ症の大きな流行は認められなかったものの、長浜町を除く試験区でエドワジエラ症による死亡がみられた。このうち、陸域や周辺のヒラメ養殖場からの影響を受けにくい環境にある中島町においても、初めて発生が確認された時期は他の試験区よりも若干遅いものの、エドワジエラ症が発生した。本事例ではこれらの魚が種苗時から *E. tarda* を保菌していたか、あるいは養殖業者による漁場間の移動、また餌等への原因菌の混入などがエドワジエラ症の発生の原因と考えられ、より厳密な防疫対策の必要性があらためて認識された。

Rashid *et al.* (1994) は、4~12月に広島県下のヒラメ養殖場において *E. tarda* の出現動向を調査し、SS 培地への直接塗抹では分離されなかったものの、DSSS 培地を用いた増菌法により6~12月に環境水における *E.*

tarda の存在を確認した。また、金井ら (1988) は、長崎県下のヒラメ養殖場周辺海水を調査し、調査地点でエドワジエラ症が発生していた8月にのみ *E. tarda* が分離できたとしている。愛媛県下のヒラメ養殖場において行った今回の著者らの調査においても、検出率は低かったが6~12月に環境水から *E. tarda* が分離された。本来海洋細菌ではない *E. tarda* は清澄な海水中では生存能は低いとされているが (Rashid *et al.*, 1994), エドワジエラ症発症魚や死亡魚からは大量の *E. tarda* が体外に排出されることが実験的に明らかにされていることから (松岡, 2004), 金井ら (1988) も示唆しているように海水中の *E. tarda* は病魚からの排出菌が一時的に生残している状態と考えられる。なお、今回の環境水からの分離では、予想に反して直接法に比べて増菌法での検出率はさほど高くなかった。この原因としては、今回の調査では1000 mL の海水をろ過したフィルターを再懸濁したものにDSSSを加えるという方法で *E. tarda* の増菌を試みたが、この方法ではDSSSに発育可能な他の細菌が多数含まれていたために、培養の過程で *E. tarda* 以外の細菌が優占し、*E. tarda* が検出できなかったと考えられる。

ヒラメの体内 (腎臓・脾臓) からは、7~12月に散発的に *E. tarda* が分離された。金井ら (1988) は、養殖ヒラメの腸管および腎臓から *E. tarda* の分離を試み、腸管内容物中には高水温期を中心に高い頻度で *E. tarda* が存在すること、腸管内の生菌数が高い個体ほど腎臓から *E. tarda* が検出される割合が高いことを報告している。また、Rashid *et al.* (1994) も腸管、肝臓、脾臓および腎臓から *E. tarda* の分離を試み、直接法で8~12月に、増菌法で7~12月に *E. tarda* を検出するとともに、腸管からは他の臓器よりも高率に *E. tarda* を分離している。今回の試験では、腎臓・脾臓および腸管ともにそれぞれ5~10尾分をまとめて摩砕した液について比較したが、両者での差はみられなかった。腸管からの検出率の低さは腸管内容物を大部分取り除いたことによるのかも知れない。

ヒラメ病魚由来 *E. tarda* 26株を宿主菌として集殖法および寒天重層法によりファージの分離を試みた本研究において、エドワジエラ症の流行期を中心にヒラメ養殖場の環境水中に *E. tarda* 溶菌ファージが高頻度かつ高濃度に存在することが明らかになった。これまで、*E. tarda* ファージは台湾のウナギ養殖場の飼育水から分離されているが (Hsu *et al.*, 2000), 海水およびヒラメからの分離例はない。また、ここには示さないが、愛媛県下以外のヒラメ養殖場の環境水あるいは魚から分離されたファージを用いておこなった *E. tarda* ファージの型別 (phage typing) では、ヒラメ由来 *E. tarda* の大部分はひとつのファージ型に属した。さらには従来の研究において、ウナギ養殖環境 (淡水) 由来の *E. tarda* には複数の

血清型が存在するが(朴ら1983), ヒラメ養殖環境(海水)由来のそれは均一であるとされている(Rashid *et al.*, 1994; 金井ら, 1988)。これらのことは, ヒラメ養殖環境中に存在する *E. tarda* の生物型の均一性を示すものと考えられる。

本研究結果から, ヒラメのエドワジエラ症の発生予察の指標として原因細菌 *E. tarda* および *E. tarda* ファージの分離あるいは血中凝集素価の測定を比較した場合, SS 寒天培地という選択鑑別培地があるとはいえず外見上健康な魚あるいは飼育環境水における *E. tarda* のモニタリングはその検出頻度と時期の点で予察的価値は低い。また, 凝集素抗体価に明瞭な上昇が認められるのは, 発病魚もしくは保菌魚が出現した1~2月後であったことから, これも予察のための指標としては不適格である。一方 *E. tarda* ファージの場合は, エドワジエラ症病魚の出現あるいは環境中から *E. tarda* が検出される1か月以上前から飼育水に高頻度に検出され, かつ病気の終息とともに検出されなくなった。さらに, 飼育水1 mL 中からも検出されたことから, その濃度は高い。これらのことから, ファージの分離は, *E. tarda* の存在を検知する方法として培地を用いて本菌を分離するよりも簡単に感度の高い方法といえる。また, 養殖場の環境水におけるファージの出現をモニタリングすることは, エドワジエラ症の流行予測につながる可能性がある。

ファージ型別は感染源の特定のための有力な手段として *Staphylococcus aureus* など医学細菌の疫学調査に応用されている(Sherris and Plorde, 1990)。魚類病原細菌のファージについては幾つかの報告があるが(Anacker and Ordal, 1955; Paterson *et al.*, 1969; Merino *et al.*, 1990; Stevenson and Airdrie, 1984; Wu *et al.*, 1981; Wu and Chao, 1982; 日高・河口, 1986; Park *et al.*, 1997; Park *et al.* 2000), *Aeromonas salmonicida* の感染源の特定とその伝搬にファージを用いた Ahne *et al.* (2000) の報告以外にはこのような疫学的観点からの研究はない。ファージを主体とするウイルスが表層海水中で時に 10^{10} 粒子/mL も存在し(Fuhrman, 1999), 細菌の死の大部分がファージに起因すること(Proctor and Fuhrman, 1990), またファージの宿主特異性の厳格さを考えると, 特定の病原体あるいは病原株の存在量を知る上でそのファージの存在量を見ることは理にかなっている。ファージという自然での増幅産物を利用して魚類の細菌性疾病流行のメカニズムを探ることは意義深いと考えられる。

謝 辞

本研究は, ヒラメ養殖技術高度化研究(愛媛県単独事業)および科学研究費補助金(基盤研究 14206024 および萌芽研究 16658083)によって行われた。

引用文献

- Ahne, W., A. Capousek and W. Popp (2000): Bacteriophage typing locates source and spread of *Aeromonas salmonicida*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **20**, 28-30.
- Anacker, R. L. and E. J. Ordal (1955): Study of a bacteriophage infecting the myxobacterium *Chondrococcus columnaris*. *J. Bacteriol.*, **70**, 738-741.
- Fuhrman, J. A., (1999): Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature*, **399**, 541-548.
- 日高富男(1986): 海洋バクテリオファージ, 「海洋学講座11 海洋微生物学, 多賀信夫編」東京大学出版会, 東京, pp.81-89.
- 日高富男・河口貴史(1986): 本邦で分離された *Aeromonas salmonicida*-ウイルス・ファージの特性. 鹿児島大学水産学部紀要 **35**, 39-52.
- Hsu, C. H., C. Yilo, J. K. Liu and C. S. Lin. (2000): Control of the Eel (*Anguilla japonica*) Pathogens, *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella tarda*, by bacteriophages. *J. Fish. Soc. Taiwan*, **27**, 21-31.
- 金井欣也・田脇誠一・内田洋祐(1988): ヒラメ養殖場における *Edwardsiella tarda* の分布. 魚病研究, **23**, 41-47.
- 松岡 学(2004): 実験感染ヒラメにおける *Edwardsiella tarda* の排菌. 魚病研究, **39**, 9-13.
- 松岡 学・室賀清邦(1993): 愛媛県下の養殖海産魚における細菌性疾病発生の歴史(1966-1992年). 広大生物生産学部紀要, **32**, 109-118.
- 松岡 学・和田有二(1996): 1986年から1995年にヒラメ病魚から分離された *Edwardsiella tarda* および *Streptococcus iniae* の薬剤感受性. 水産増殖, **44**, 445-449.
- Merino, S., S. Camprubi, J. M. Tomas (1990): Isolation and characterization of bacteriophage PM2 from *Aeromonas hydrophila*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **68**, 239-244.
- Muroga K. (2001): Viral and bacterial diseases of marine fish and shellfish in Japanese hatcheries. *Aquaculture*, **202**, 23-44.
- Paterson, W. D., R. J. Douglas, I. Grinyer, L. A. McDermott (1969): Isolation and preliminary characterization of some *Aeromonas salmonicida* bacteriophages. *J. Fish. Res. Board Can.*, **26**, 629-632.
- Park, K. H., S. Matsuoka, T. Nakai and K. Muroga (1997): A virulent bacteriophage of *Lactococcus garvieae* (formerly *Enterococcus seriolicida*) isolated from yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Dis. Aquat. Org.*, **29**, 145-149.
- Park, S. C., I. Shimamura, M. Fukunaga, K. Mori and T. Nakai (2000): Isolation of bacteriophages specific to a fish pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida*, as a candidate for disease control. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 1416-1422.
- 朴 守一・若林久嗣・渡辺佳一郎(1983): 養鰻池に分布する *Edwardsiella tarda* の血清型と病原性. 魚病研究, **18**, 85-89.
- Proctor L. M. and J. A. Fuhrman (1990): Viral mortality of marine bacteria and cyanobacteria. *Nature* **343**, 60-62.
- Rashid, M. M., K. Honda, T. Nakai and K. Muroga (1994): An ecological study on *Edwardsiella tarda* in flounder farms. *Fish Pathol.*, **29**, 221-227.
- 坂田泰造・古川 毅(2000): バクテリオファージ, 「海洋環境アセスメントのための微生物実験法, 石田祐三郎・杉田治男編」恒星社厚生閣, 東京, pp. 114-117.
- Sherris, J. C. and J. J. Plorde (1990): Staphylococci, In "Medi-

- cal Microbiology, An Introduction to Infectious Diseases 2nd ed." (ed. by J. C. Sherris). Elsevier Science Publication, New York, pp. 275-289.
- Stevenson, R. M. W and D. W. Airdrie (1984) : Isolation of *Yersinia ruckeri* bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 1201-1205.
- Wu, J. L. and W. L. Chao (1982) : Isolation and application of a new bacteriophage, ET-1, which infect *Edwardsiella tarda*, the pathogen of edwardsiellosis. CAPD Fisheries Series No. 8, Reports on Fish Disease Research (Taiwan) **4**, 8-17.
- Wu, J. L., H. M. Lin, L. Jan, Y. L. Hsu and L. H. Chang (1981) : Biological control of fish bacterial pathogen, *Aeromonas hydrophila*, by bacteriophage AH1. *Fish Pathol.*, **15**, 271-276.
- Wyatt, L. E., R. Nickelson and C. Vanderzant (1979) : *Edwardsiella tarda* in freshwater catfish and their environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**, 710-714.