

ヒラメの β 溶血性レンサ球菌症に対するファージ治療試験

松岡 学^{1*}・橋爪貴也²・神崎博幸³・岩本恵美²・
Se Chang Park⁴・吉田照豊⁵・中井敏博²

(2007年 3月26日受付)

Phage Therapy against β -hemolytic Streptococcosis of Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus*

Satoru Matsuoka^{1*}, Takaya Hashizume², Hiroyuki Kanzaki³, Emi Iwamoto²,
Se Chang Park⁴, Terutoyo Yoshida⁵ and Toshihiro Nakai²

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

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

³Saga Prefectural Genkai Fisheries Research and Development Center, Karatsu,
Saga 847-0122, Japan

⁴College of Veterinary Medicine, Seoul National University,
Seoul 151-742, Korea

⁵Faculty of Agriculture, University of Miyazaki, Miyazaki,
889-2192, Japan

(Received March 26, 2007)

ABSTRACT—We examined the therapeutic effect of *Streptococcus iniae* phages isolated from fish culture environments against experimental streptococcosis of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Phage sensitivity tests with a double agar method revealed that 31 of 35 *S. iniae* strains from the flounder have a similar sensitivity to six phage isolates. In phage therapy experiments, fish were injected intraperitoneally (IP) with *S. iniae* PSi402 and 1 h later IP-injected with a mixture of two or four phage isolates, and observed at 25°C for 2 wk. Mortalities of fish receiving phages were significantly lower than those of control fish without phage-treatment in all four trials. The effect of phage treatment was also demonstrated even at 24 h post-infection, when cell numbers of *S. iniae* were $10^{7.4}$ and $10^{4.5}$ CFU/g in the kidneys and brains of fish, respectively. However, as phage-resistant *S. iniae* were frequently isolated from dead fish in the phage-treated group, further investigations are required to establish phage therapy of the disease.

Key words: bacteriophages, phage therapy, β -hemolytic streptococcosis, *Streptococcus iniae*, *Paralichthys olivaceus*, Japanese flounder

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

³ 佐賀県玄海水産振興センター

⁴ ソウル大学獣医学部

⁵ 宮崎大学農学部

* Corresponding author

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

Streptococcus iniae を原因とする β 溶血性レンサ球菌症は、日本をはじめ世界各地で種々の海産魚および淡水魚で発生が報告されている (Kusuda and Salati, 1999)。日本ではニジマス *Oncorhynchus mykiss* やアユ *Plecoglossus altivelis* などの淡水魚 (Kitao *et al.*, 1981; 大西・城, 1981) およびヒラメ *Paralichthys olivaceus* やブリ *Seriola quinqueradiata* などの海産魚 (中津川,

1983; 酒井ら, 1986; 佐古, 1993) で発生している。特に養殖ヒラメにおいては、本症はエドワジエラ症 (*Edwardsiella tarda* 感染症) とともに重要疾病とされており、問題点は化学療法の困難さにある。すなわち、罹病したヒラメは摂餌活動が著しく低下するために薬剤の経口投与効果が低い場合が多く、また本症の治療のために使用できる化学療法剤が2成分 (塩酸オキシテトラサイクリン, アルキルトリメチルアンモニウムカルシウムオキシテトラサイクリン) に限られているうえに薬剤耐性菌が出現するためである (松岡・和田, 1996)。一方, このような医薬品の使用は養殖業者にとって経済的負担が大きいうえに, 食品の安全性の面からはできるだけ医薬品を使用しない養殖方式が求められている。これらのことから, 今後の持続的な養殖生産のためには, 従来の方法とは異なる視点から本症に対する対策を講じる必要がある。

近年, 細菌感染症の治療に, 細菌ウイルスであるバクテリオファージ (以下ファージと略する) を用いる治療法 (ファージ療法) が注目され, 獣医学や医学の分野でその基礎研究が活発に行われ始めている (Biswas *et al.*, 2002; Matsuzaki *et al.*, 2003; Kutter and Sulakvelidze, 2004)。我々は水産増養殖分野におけるファージ療法について検討を進めており, これまでにプリのラクトコッカス症 (*Lactococcus garvieae* 感染症) やアユの細菌性出血性腹水病 (*Pseudomonas plecoglossicida* 感染症) に対するファージ療法の有効性を報告してきた (Nakai *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2000; Park and Nakai, 2003)。また, 最近になって海外からもカワマス *Salvelinus fontinalis* のせつそう病に対するファージの有効性に関する報告がなされ (Imbeault *et al.*, 2006), 魚類の細菌感染症に対するファージ療法への関心が世界的に高まりつつある。

本研究では, ヒラメ養殖場の環境中から *S. iniae* に対する溶菌ファージを分離し, それらのファージに対するヒラメ病魚由来 *S. iniae* 菌の感受性を調べるとともに, *S. iniae* を人為感染させたヒラメに対するファージの治療効果について検討した。

材料および方法

海水およびヒラメからの *S. iniae* の分離

ファージの分離と平行して, ファージの出現との関連をみることを目的として, 愛媛県大洲市 (2003年5月から2006年3月) および今治市 (2003年5月から2005年3月) のヒラメ養殖場で, 養殖環境水および飼育中のヒラメ0才魚から *S. iniae* の分離を試みた。

環境水として, 陸上コンクリート水槽の排水 (大洲市) または海面小割生簀周辺の海水 (今治市) を毎月2回, 1回あたり約1L採取し, 常温で愛媛県中予水産試験場

の研究室に持ち帰った。このうち250 mLをフィルターユニット (0.45 μm : Nalge Nunc Int.) を使用して吸引ろ過し, 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秒間激しく攪拌した。この懸濁液を試験水とし, AE (アザイド・エスクリン) 寒天培地に塗抹して25°Cで7日間培養した。出現したコロニーのうち, 日本水産資源保護協会配布の抗 *S. iniae* (NIRA-2株) 家兎血清に対してスライド凝集試験陽性のものを *S. iniae* として計数した。

ヒラメは, 各養殖場で追跡調査する魚群を定めて毎月1回外見上異常のみられない生魚10尾を採取し, 氷藏して研究室に持ち帰った。それらの腎臓からトリプトソーヤ寒天培地 (TSA: 日水) を用いた画線塗抹法により細菌の分離を行ない, 25°Cで48時間培養後に出現したコロニーについて, 上述の方法で *S. iniae* の同定を行なった。分離された株の一部は, 愛媛県および香川県の養殖ヒラメ病魚由来株とともに, ファージ分離のための宿主菌, プラーク検出のための標示菌, およびファージ感受性試験株として使用した (Table 1)。

なお, 本研究で分離したものを含め供試した *S. iniae* 株について, Mata *et al.* (2004) の方法による乳酸酸化酵素を標的としたPCR試験を実施したところ, いずれの株でも目的とするサイズの増幅産物 (870 bp) が得られた。

ファージの分離

既報の方法 (松岡・中井, 2004) を用いて, 集殖法により環境水から *S. iniae* ファージの分離を試みた。すなわち, 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2倍濃度に調整した滅菌トリプトソーヤブイヨン (TSB: 日水) 100 mLに添加し, これに2002年以前に分離された10株の *S. iniae* を宿主菌として加えて25°Cで24時間培養した。3,500 rpmで10分間遠心分離した上清を0.45 μm でろ過し, そのろ液におけるファージの有無を10株 (2003年) または5株 (2004および2005年) の *S. iniae* を標示菌 (Table 1) として二重寒天法 (日高, 1986; 坂田・古川, 2000) により調べた。

ファージの形態観察

単一プラークからの単離・培養を繰り返してクローン化したファージ株について, 透過型電子顕微鏡 (日立H-600A) によりファージ粒子の観察を行なった。

魚病細菌のファージ感受性試験

S. iniae (39株) に加えて, 比較のためレンサ球菌 *L. garvieae* (6株) と *S. parauberis* (10株), またその他の魚病細菌として *Vibrio anguillarum* (2株), *V. ordalii*

Table 1. Bacterial strains used in this study and their sensitivities against *Streptococcus iniae* phages

Strain	Isolation			Sensitivity to phages					
	Source	Location	Year	PSiJ 31	PSiJ 32	PSiJ 41	PSiJ 42	PSiJ 51	PSiJ 52
<i>Streptococcus iniae</i>									
IS-19	Japanese flounder	Ehime, Japan	2001	+	+	+	+	+	+
IS-21 ^a	Japanese flounder	Ehime, Japan	2001	+	+	+	+	+	+
IS-22 ^{ab}	Japanese flounder	Ehime, Japan	2001	+	+	+	+	+	+
KRS-02-035	Japanese flounder	Kagawa, Japan	2002	+	+	+	+	+	+
KRS-02-036 ^{ab}	Japanese flounder	Kagawa, Japan	2002	+	+	+	+	+	+
KRS-02-042 ^a	Japanese flounder	Kagawa, Japan	2002	+	+	+	+	+	+
KRS-02-092 ^{ab}	Japanese flounder	Kagawa, Japan	2002	+	+	+	+	+	+
KRS-02-108	Japanese flounder	Kagawa, Japan	2002	+	+	+	+	+	+
KRS-02-111 ^a	Japanese flounder	Kagawa, Japan	2002	+	+	+	+	+	+
KRS-02-118	Japanese flounder	Kagawa, Japan	2002	+	+	+	+	-	-
PSi-301 ^a	Japanese flounder	Ehime, Japan	2003	+	+	+	+	+	+
PSi-302 ^a	Japanese flounder	Ehime, Japan	2003	+	+	+	+	+	+
PSi-303 ^{ab}	Japanese flounder	Ehime, Japan	2003	+	+	+	+	+	+
PSi-304	Japanese flounder	Ehime, Japan	2003	+	+	+	+	+	+
PSi-305 ^a	Japanese flounder	Ehime, Japan	2003	+	+	+	+	+	+
PSi-306	Japanese flounder	Ehime, Japan	2003	+	+	+	+	+	+
PSi-402	Japanese flounder	Ehime, Japan	2004	+	+	+	+	+	+
PSi-403 ^d	Japanese flounder	Ehime, Japan	2004	+	+	+	+	+	+
SIE-06	Japanese flounder	Ehime, Japan	2004	+	+	+	+	+	+
SIE-07	Japanese flounder	Ehime, Japan	2004	+	+	+	+	+	+
SIE-08	Japanese flounder	Ehime, Japan	2004	+	+	+	+	+	+
SIE-09	Japanese flounder	Ehime, Japan	2004	+	+	+	+	+	+
SIE-10	Japanese flounder	Ehime, Japan	2004	+	+	+	+	+	+
SNUSI-05J2	Japanese flounder	Cheju, Korea	2005	+	+	+	+	+	+
SNUSI-05J3	Japanese flounder	Cheju, Korea	2005	+	+	+	+	+	+
SNUSI-05J4	Japanese flounder	Cheju, Korea	2005	+	+	+	+	+	+
SNUSI-05J5	Japanese flounder	Cheju, Korea	2005	+	+	+	+	+	+
SNUSI-05J7	Japanese flounder	Cheju, Korea	2005	+	+	+	+	+	+
SNUSI-05J8	Japanese flounder	Cheju, Korea	2005	+	+	+	+	+	+
SNUSI-05J9	Japanese flounder	Cheju, Korea	2005	+	+	+	+	+	+
SNUSI-05J10	Japanese flounder	Cheju, Korea	2005	+	+	+	+	+	+
SNUSI-05I15	Japanese flounder	Cheju, Korea	2005	+	+	+	+	+	+
SNUSI-05I16	Japanese flounder	Cheju, Korea	2005	-	-	-	-	-	-
SNUSI-05I17	Japanese flounder	Cheju, Korea	2005	-	-	-	-	-	-
SNUSI-05I18	Japanese flounder	Cheju, Korea	2005	-	-	-	-	-	-
YT-8504	Yellowtail	Mie, Japan	1985	+	+	+	+	+	+
β -23	Rainbow trout	Miyazaki, Japan	1992	+	+	+	+	+	+
ATCC 29177				-	-	-	-	-	-
ATCC 29178				-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus garvieae</i>									
ATCC 43921				-	-	-	-	-	-
ATCC 49156				-	-	-	-	-	-
PSi 401	Japanese flounder	Ehime, Japan	2004	-	-	-	-	-	-
EU 206	Yellowtail	Ehime, Japan	1995	-	-	-	-	-	-
KS 9601	Yellowtail	Kagoshima, Japan	1996	-	-	-	-	-	-
MI 93005	Striped jack	Mie, Japan	1993	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus parauberis</i>									
PSP 501	Japanese flounder	Ehime, Japan	2005	-	-	-	-	-	-
PSP 502	Japanese flounder	Ehime, Japan	2005	-	-	-	-	-	-
PSP 503	Japanese flounder	Ehime, Japan	2005	-	-	-	-	-	-
PSP 504	Japanese flounder	Ehime, Japan	2005	-	-	-	-	-	-
PSP 505	Japanese flounder	Ehime, Japan	2005	-	-	-	-	-	-
PSP 506	Japanese flounder	Ehime, Japan	2005	-	-	-	-	-	-
PSP 507	Japanese flounder	Ehime, Japan	2005	-	-	-	-	-	-
PSP 508	Japanese flounder	Ehime, Japan	2005	-	-	-	-	-	-
PSP 509	Japanese flounder	Ehime, Japan	2005	-	-	-	-	-	-
PSP 510	Japanese flounder	Ehime, Japan	2005	-	-	-	-	-	-

^{a,b} : used as indicator cells to isolate phages after enrichment culture (a: 2003, b: 2004 and 2005)

(1株), *E. tarda* (2株), *Aeromonas hydrophila* (1株), *A. salmonicida* (1株), *Pseudomonas fluorescens* (1株) について, 分離 *S. iniae* ファージ 6 株 (PSiJ31, PSiJ32, PSiJ41, PSiJ42, PSiJ51, PSiJ52) に対する感受性をスポット法 (坂田・古川, 2000) により調べた。すなわち, TSB で 25°C, 24 時間培養した 10^7 CFU/mL 濃度の菌液 0.4 mL を 3 mL の 1/3 濃度の TSA (50°C で保温) と混合後, TSA 平板上に重層した。この二重寒天平板上に 10^5 PFU/mL のファージ液を 1 滴 (約 10 μ L) 滴下し, 25°C で 24 時間培養してプラークの有無を観察した。ファージ液滴下部分に菌が発育しなかった場合をファージ感受性と判定した。なお, 供試した *S. parauberis* 株については, 長崎大学より分与された抗 *S. parauberis* (NUF934 株) 家兎血清に対するスライド凝集試験により同定した。

ファージの *in vitro* 増殖抑制効果試験

S. iniae ファージ株 (PSiJ31, PSiJ32, PSiJ41, PSiJ42) について, 試験管内での *S. iniae* 増殖抑制効果を調べた。10 mL の TSB に, ブレインハートインフュージョン寒天培地 (BHIA: 日水) で 25°C, 24 時間培養した *S. iniae* PSi402 株を終濃度 10^5 CFU/mL となるように添加した。そこに MOI (multiplicity of infection) が 10^0 , 10^{-2} , 10^{-4} となるように上述のファージ 4 株の単独または 4 株等量混合ファージ液をそれぞれ 10 μ L 添加した。対照区では, ファージ液の代わりに PBS を 10 μ L 添加した。25°C で振とう培養し, 1, 6, 12, 18 および 24 時間後の吸光度 (波長 600 nm) を測定した。

ファージによる治療試験

愛媛県中予水産試験場の隔離飼育施設において, *S. iniae* を人為感染させたヒラメに対するファージ治療試験を 5 回行った。各試験には, 魚体通過 (1 回) させた *S. iniae* PSi402 株の再分離菌を用いた。ファージ液は, 各ファージを二重寒天培地で *S. iniae* IS22 株を宿主菌として培養し, 0.45 μ m のフィルターでろ過した後, 10^8 PFU/mL に調整した。試験 1 および 2 では PSiJ31 と PSiJ32 の 2 株のファージ混合液を, 試験 3 ~ 5 では PSiJ31, PSiJ32, PSiJ41 および PSiJ42 の 4 株のファージ混合液を使用した。

試験 1 ~ 4 のうち試験 1 および 2 では, ファージ接種区および対照区それぞれ 1 水槽 (100 L 容ポリアクリル製円形水槽) に, 試験 3 および 4 ではそれぞれ 2 水槽に, 平均体重 7.0 ~ 41.9 g のヒラメを 20 ~ 30 尾ずつ収容した。TSA で 25°C, 24 時間培養した PSi402 株を, 供試魚の腹腔内に 0.1 mL/尾 ($10^{5.4} \sim 10^{7.7}$ CFU/尾) 注射し, その 1 時間後にファージ液 0.1 mL を腹腔内注射した ($10^{8.0} \sim 10^{8.4}$ PFU/尾)。対照区では供試魚に滅菌 TSB を同様に注

射した。その後, 通気しながら流水で 15 日間飼育し, 1 日に 2 回観察して死亡魚を取り上げるとともに, 死亡魚および試験終了時の生残魚の腎臓から BHIA を用いて細菌の分離を試みた。飼育期間中の平均水温は 24.2 ~ 25.0°C であった。

試験 5 では, 平均体重 56.4 g のヒラメに, PSi402 株を 0.1 mL/尾 ($10^{5.4}$ CFU/0.1 mL) 腹腔内注射し, その 12 時間または 24 時間後にファージ液を腹腔内に注射した ($10^{8.7}$ PFU/0.1 mL/尾)。対照区では供試魚に滅菌 TSB を同量腹腔内注射して 15 日間観察した。各区 2 水槽を用い, 1 水槽あたり 20 尾を供試した。飼育条件は試験 1 ~ 4 と同様で, 飼育期間中の平均水温は 25.2°C であった。

上記試験 5 と平行して, ファージ接種時における感染状態を知るため, 菌接種後のヒラメ体内における *S. iniae* の消長をみた。ヒラメ (平均体重 54.1 g) に *S. iniae* PSi402 株を腹腔内注射し ($10^{5.4}$ CFU/尾), 1, 12, 24 および 48 時間後の生魚と, 菌液注射後 2 日目から 3 日目の死亡魚各 5 尾についてそれらの脳および腎臓を無菌的に摘出した。滅菌 PBS を加えて磨碎し, 適宜希釈して BHIA 2 枚ずつに塗抹した。25°C で 48 時間培養し, *S. iniae* コロニーを計数した。

統計処理

試験結果の統計学的処理には, χ^2 検定を用い, $p < 0.05$ を有意と判定した。

結 果

S. iniae の分離

調査した養殖場においては, 2003 年の 9 ~ 12 月に大洲市で *S. iniae* によるレンサ球菌症が発生し, その時の累積死亡率は約 15% であった。この期間中の外見上異常が認められない魚 (開腹すると, 腎臓または脾臓が肥大している個体もみられた) の腎臓における *S. iniae* 保菌率は, 60% (9 月), 20% (10 月), 40% (11 月), および 20% (12 月) であった。これ以外に定期調査サンプルから *S. iniae* が分離されたのは, 大洲市における 2004 年 11 月 (保菌率 20%), 2005 年 1 月 (10%) および 12 月 (10%) のみであった。一方, 海水からは大洲市で 2004 年 7 月および 11 月に *S. iniae* が検出されたが ($100 \sim 200$ CFU/250 mL), 本症流行時には本菌は検出されなかった。

ファージの分離

大洲市の養殖場の海水から 2003 年 10 月と 11 月, 2004 年 12 月および 2005 年 10 月に, また今治市の養殖場の海水から 2004 年 12 月に *S. iniae* の溶菌ファージが分離された。このうち, 代表的なプラークをクローニングして得た 6 株のファージ (PSiJ31, PSiJ32, PSiJ41, PSiJ42,

Table 2. Source of *Streptococcus iniae* phages used in this study

Strain	Location	Isolation date
PSiJ 31	Ozu, Ehime Prefecture	2003. 10. 6
PSiJ 32	Ozu, Ehime Prefecture	2003. 11. 4
PSiJ 41	Ozu, Ehime Prefecture	2004. 12. 8
PSiJ 42	Imabari, Ehime Prefecture	2004. 12. 20
PSiJ 51	Ozu, Ehime Prefecture	2005. 10. 6
PSiJ 52	Ozu, Ehime Prefecture	2005. 10. 6

PSiJ51, PSiJ52) を以下の実験に使用した (Table 2)。

分離ファージの形態

分離されたファージの形成するプラークはいずれも円形で、ほとんどのものが直径1~2 mmであった (Fig. 1)。また、電子顕微鏡で観察したファージ粒子は、いずれも約 60 nm の正二十面体の頭部と、約 160~180 nm のしなやかな尾部を有していた。これらの形態的特徴と核酸として DNA を有することから、分離ファージは *Siphoviridae* 科 (Hendrix and Casjens, 2005) に分類された。

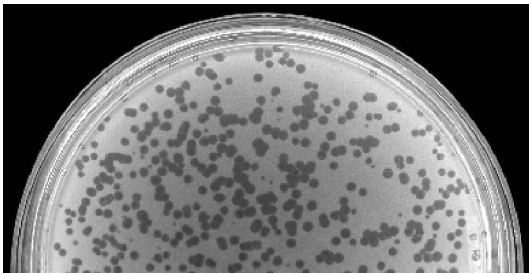


Fig. 1. Plaques of *S. iniae* phage PSiJ41 in a double agar plate.

魚病細菌のファージ感受性

分離したファージ6株に対する *S. iniae*, *S. parauberis* および *L. garvieae* の感受性を Table 1 に示した。*S. iniae* では、供試したヒラメ由来の35株中31株は、いずれのファージに対しても感受性を示した。残るヒラメ由来 *S. iniae* 株のうち、香川県由来の1株はファージ6株中2株に対して、韓国済州島由来12株中の3株はすべてのファージ株に対して感受性がなかった。また、他魚種由来の *S. iniae* 株として供試したブリおよびニジマス由来の *S. iniae* (いずれも1株) はすべてのファージ株に対して感受性を示したが、*S. iniae* の type strain (ATCC29177 および ATCC29178: いずれもイルカ由来) は、いずれのファージに対しても感受性が認められなかった。一方、*S. parauberis* および *L. garvieae* を含め、供試した *S. iniae* 以外の魚病細菌8種24株は、いずれのファージにも

感受性を示さなかった。

ファージの *in vitro* 増殖抑制効果

ファージを添加していない対照区の濁度は、*S. iniae* の増殖により12時間後には OD = 0.7 に達した (Fig. 2)。ファージ添加区では、MOI = 1 から MOI = 10^{-4} のいずれのファージ株単独添加区およびファージ4株の混合添加区とも12時間後まで濁度の上昇はほとんどみられず、顕著な *S. iniae* 増殖抑制効果が認められた。しかし、18時間以降はどのファージ添加区でも菌の増殖が認められた。

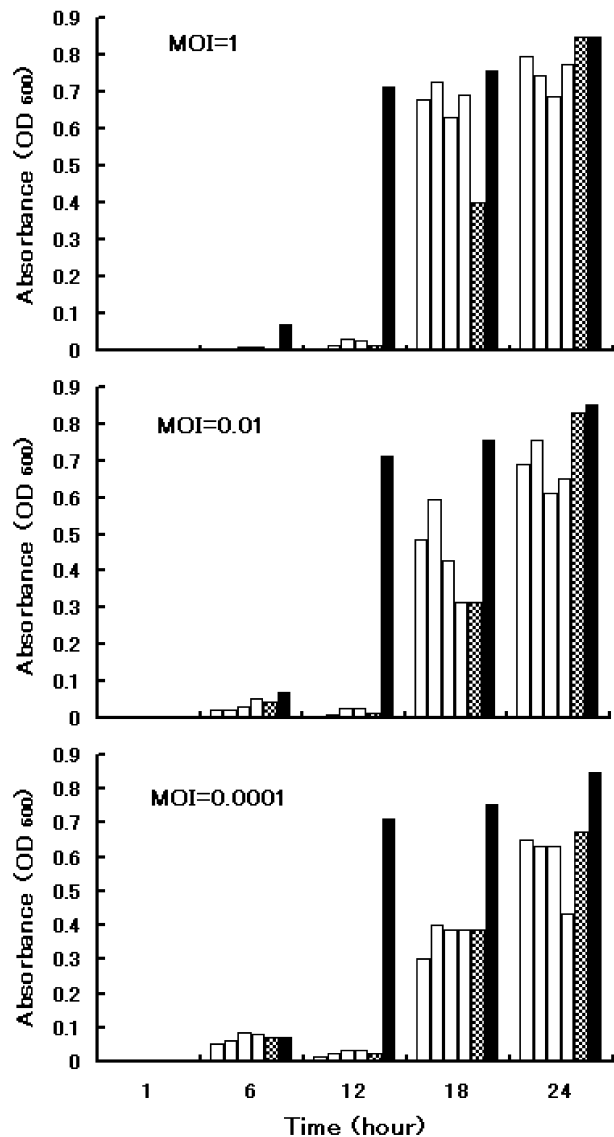


Fig. 2. *In vitro* growth inhibition of *Streptococcus iniae* by phages. *S. iniae* strain PSi402 and *S. iniae* phages were inoculated at MOI = 1, 10^{-2} , or 10^{-4} , and shake-cultured at 25°C for 24 h. The bacterial growth was monitored optically. (Initial bacterial concentration: 10^5 CFU/mL) □: individual phage strain (PSiJ31, PSiJ32, PSiJ41, PSiJ42 from left); ▨: mixed four phage strains; ■: control (no phage)

培養24時間後にファージ添加区から菌を分離し、それらのファージ感受性を調べた結果、いずれもそれぞれのファージに対して感受性を示さなかった。

ファージの感染防御効果

計5回(試験1~5)の感染防御効果試験の結果をTable 3, Fig. 3 および Fig. 4 に示す。なお、試験3~5における各区の死亡尾数の推移は2水槽でほとんど同じであったため、生残率の推移を示したFig. 3 および Fig. 4 ではそれら2水槽の平均値としてプロットした。

試験1~4では、全ての対照区で菌攻撃後1~2日目から死亡が認められ、5~9日目に生残率は0%となった。一方、菌攻撃後1時間目にファージを注射した試験区では、最初の死亡魚がみられたのは攻撃後2~4日目とやや遅れ、11~13日目以降には死亡魚はみられなかった。15日間の観察期間中のファージ区の生残率は、試験1が28.0%、試験2が33.3%、試験3が48.0% (2水槽の平均)、試験4が80.0% (2水槽の平均) で、いずれの試験においても対照区に比べて有意に高かった (Table 3, Fig. 3)。試験終了時におけるファージ区生残魚の *S. iniae* 保菌率(腎臓)は、試験1~4でそれぞれ42.9%、40.0%、41.7%および6.3%であった (Table 3)。死亡魚から分離された菌についてファージ感受性を調べたところ、対照区の分離菌はいずれのファージにも感受性が認

められたが、ファージ区の分離菌ではすべて感受性が認められなかった。また、ファージ区生残魚からの分離菌も、そのほとんどがファージ非感受性であった。

試験5の生残率の推移をFig. 4に示した。対照区では、攻撃後2日目から死亡がみられ、3日後には85.0%が死亡し、15日後の生残率は5.0%となった。一方、ファージ接種区では、いずれも攻撃3日目から緩やかな死亡が続き、それらの生残率は12時間後ファージ接種区が45.0%、24時間後ファージ接種区が32.5%と、いずれも対照区に比べて有意に高かった。生残魚の保菌率は、12時間後ファージ接種区が27.8%、24時間後ファージ接種区が30.8%であった。死亡魚および生残魚由来菌のファージ感受性は上述の試験1~4のそれと同じ傾向が認められた (Table 3)。

試験5と平行して行なったヒラメの腎臓および脳における *S. iniae* 菌数の測定結果をFig. 5に示す。腎臓の菌数は1時間後に $10^{3.6}$ CFU/尾であったが、その後急激に増加して12時間後に $10^{5.8}$ CFU/尾、24時間後に $10^{7.4}$ CFU/尾、さらに48時間後には $10^{8.1}$ CFU/尾にまで達した。一方、脳では12時間後でも $10^{2.0}$ CFU/尾と少なかったが、24時間後に $10^{4.5}$ CFU/尾となり、48時間後には腎臓の菌数とほぼ同数の $10^{7.7}$ CFU/尾が検出された。死亡直後の魚体では、さらに1オーダー程度増加し、腎臓が $10^{9.3}$ CFU/尾、脳が $10^{9.6}$ CFU/尾であった。

Table 3. Phage treatment of Japanese flounder infected with *Streptococcus iniae*

No. of experiment	Average water temperature (°C)	Average body weight (g)	Injection dose of <i>S. iniae</i> (CFU/fish)	Injection dose (PFU/fish) of phages (time after <i>S. iniae</i> injection)	Survival rate (%) of fish (no. of fish alive/examined)	Reisolation % of <i>S. iniae</i> from survivors (no. of fish positive/examined)
1	24.2	16.5	$10^{7.7}$	$10^{8.2}$ (1 h) 0	28 (7/25)* 0 (0/25)	43 (3/7) -
2	24.3	7.0	$10^{6.3}$	$10^{8.2}$ (1 h) 0	33 (10/30)* 0 (0/30)	40 (4/10) -
3	24.9	14.1	$10^{6.4}$	$10^{8.0}$ (1 h) $10^{8.0}$ (1 h) 0 0	48 (12/25)* 48 (12/25)* 0 (0/25) 0 (0/25)	33 (4/12) 50 (6/12) - -
4	25.0	41.9	$10^{5.4}$	$10^{8.4}$ (1 h) $10^{8.4}$ (1 h) 0 0	70 (14/20)* 90 (18/20)* 0 (0/20) 0 (0/20)	0 (0/14) 11 (2/18) - -
5	25.2	56.4	$10^{5.4}$	$10^{8.7}$ (12 h) $10^{8.7}$ (12 h) $10^{8.7}$ (24 h) $10^{8.7}$ (24 h) 0 0	50 (10/20)* 40 (8/20)* 35 (7/20)* 30 (6/20)* 5 (1/20) 5 (1/20)	30 (3/10) 25 (2/8) 29 (2/7) 33 (2/6) ND ND

*, $p < 0.05$; ND, not done

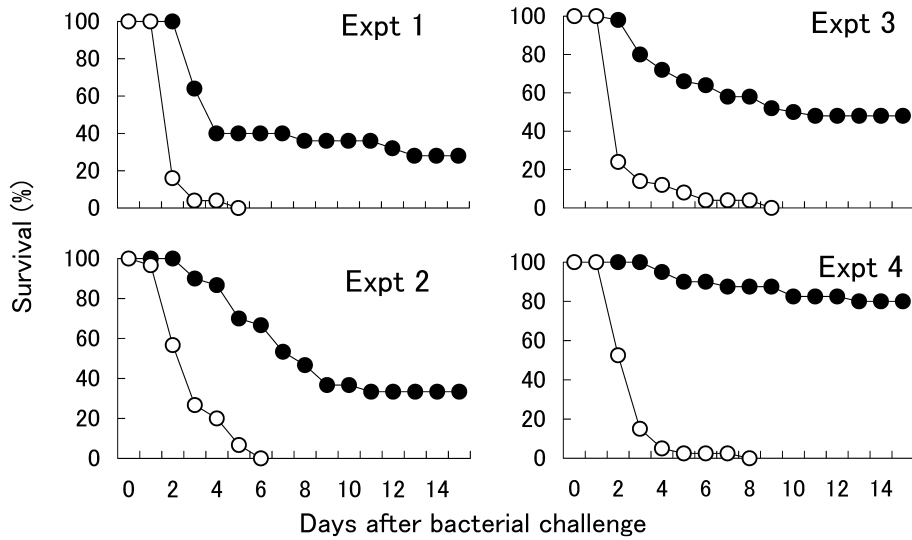


Fig. 3. Phage treatment of Japanese flounder infected with *Streptococcus iniae* (Experiments 1–4). Fish were intraperitoneally (IP) injected with phage mixture (Expt. 1, 2: PSiJ31, PSiJ32; Expt. 3, 4: PSiJ31, PSiJ32, PSiJ41, PSiJ42) 1 h after IP-injection with *S. iniae* strain PSi402 (See Table 3). ○: control (no phage treatment); ●: phage-treated

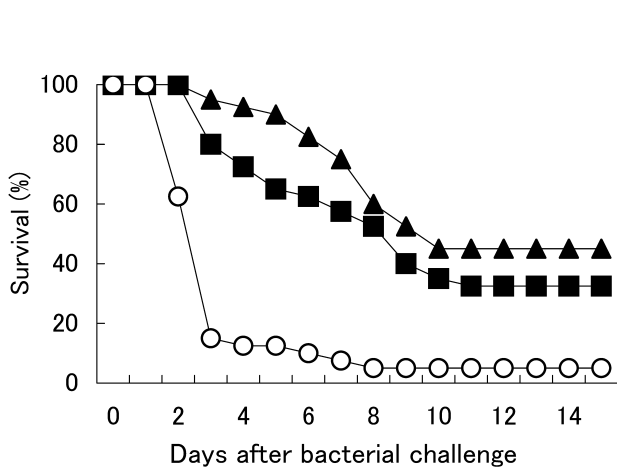


Fig. 4. Phage treatment of Japanese flounder infected with *Streptococcus iniae* (Experiment 5). Fish were intraperitoneally (IP) injected with phage mixture (PSiJ31, PSiJ32, PSiJ41, PSiJ42) 12 h or 24 h after IP-injection with *S. iniae* strain PSi402 (See Table 3). ○: control (no phage treatment); ■: 24 h; ▲: 12 h

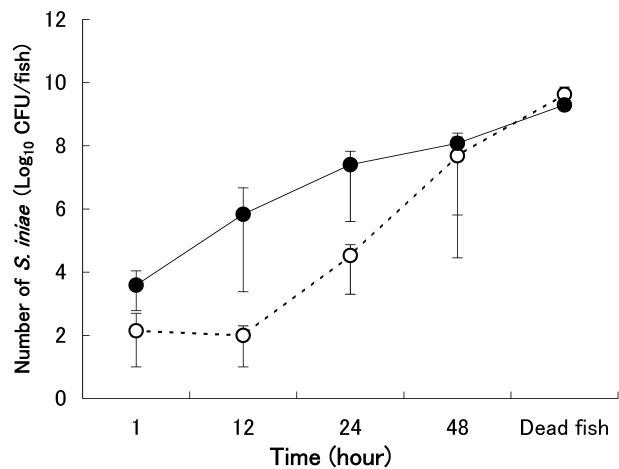


Fig. 5. Kinetics of *S. iniae* in the Japanese flounder. Fish were intraperitoneally injected with *S. iniae* strain PSi402 at a dose of $10^{5.4}$ CFU/fish and viable cell counts of *S. iniae* in the brains and kidneys were carried out using TSA plates. ○: brain; ●: kidney

考 察

我々は前報で、愛媛県下のヒラメ養殖場における *E. tarda* およびそのファージの周年変動を調べ、エドワジエラ症の発生の有無にかかわらず高水温期を中心にヒラメの *E. tarda* 保菌率は高く、また *E. tarda* ファージが養殖環境水から高率に検出されることを示した (松岡・中井, 2004)。同じく愛媛県下のヒラメ養殖場で行った今回の調査では、レンサ球菌症流行時には *S. iniae* 保菌率は高かったものの、環境水中からの *S. iniae* と *S. iniae* ファージの検出率はともに低かった。我々がこれまでに

行なったアユ養殖環境からの病原細菌に対するファージの検出においても、*P. plecoglossicida* ファージは高頻度に分離されたのに (Park *et al.*, 2000), *Flavobacterium psychrophilum* ファージの分離率は低かった (未発表)。このような養殖環境からのファージ分離率の違いは、自然界における細菌の天敵としてのファージの存在意義を考えると、興味深いところである。富栄養化し細菌数が増加している沿岸域では、そこに存在するファージ数は $10^{10}/L$ にも達する (Fuhrman, 1999)。ファージが細菌数の調整者として重要な役割を担っているとすれば (Bergh *et al.*, 1989; Proctor and Fuhrman, 1990), 病気

が発生した養殖場周辺における病原体の存在はファージの出現（存在）に依存していると考えられる。環境に放出された病原体が効率的にファージにより殺菌されるとしたら（Imbeault *et al.*, 2006），それは水平感染による病気の伝播に影響すると考えられるので，養殖場での病気の消長にファージが関わっている可能性がある。

愛媛県下のヒラメ養殖場の環境水に由来するファージ株を使った *S. iniae* のファージ感受性試験では，供試したヒラメ病魚由来株の多くがほぼ同じファージ型に属し，またブリやニジマス由来の菌株でもこれらのファージに感受性を有したことから，魚類病原性 *S. iniae* のファージ型の均質性が示唆された。しかし，今回供試したファージ株が6株と少ないことから，本菌のファージ型に関しては，さらに多くのファージ株を用いてまた外国あるいは陸上動物由来の *S. iniae* 株も含め詳細に検討する必要がある。

本研究の主眼は，ヒラメの *S. iniae* 感染症に対するファージ療法の可能性を探ることにあつた。ヒラメを用いた感染防御試験に先立って行なった *in vitro* 増殖抑制試験では，供試ファージは $MOI = 10^{-4}$ においても *S. iniae* の増殖を一時的にはあるが抑制した。なお，培養18時間以降における増殖はファージ非感受性細胞による。また，感染防御試験では，供試したヒラメのサイズ，攻撃菌濃度，ファージの株数が異なるものの，ファージ投与区でいずれも有意な生残率の向上が確認された。ファージ投与区での試験区間の生残率に28.0%から80.0%と開きがみられたのは，*S. iniae* の攻撃菌濃度の違いによると思われる。さらに，魚体内の *S. iniae* 菌濃度が 10^7 CFU/尾にもなる菌攻撃24時間後にファージを接種しても生残率が向上した。これらのことは，本菌感染症の治療にファージ投与が有効であることを示唆している。ファージ治療試験において，感染がかなり進行したステージでファージを投与しても治療効果が期待できることは，アユの *P. plecoglossicida* 感染に対するファージ治療実験や（Park *et al.*, 2000），また魚類以外でも，重篤な状態にある VRE（バンコマイシン耐性腸球菌）感染マウスに対するファージの投与実験において報告されている（Biswas *et al.*, 2002）。

しかしながら，本研究でのヒラメのレンサ球菌症に対するファージ治療においては，ファージ投与区で死亡した魚から，投与したファージに対して感受性がない *S. iniae* 株が分離された。このことは，*S. iniae* では比較的容易に *in vivo* で増殖可能なファージ非感受性菌，換言すれば，病原性を有するファージ耐性菌が出現することを示唆し，この点は *S. iniae* 感染症に対するファージ療法の成否に関わる重要な問題である。病原性大腸菌の感染に対するファージ投与の有効性がマウスあるいは産業動物を用いた実験で報告されて以来（Smith and Huggins,

1982; 1983），医学分野も含めファージ療法の有効性を示す研究報告がなされているが（Sulakvelidze *et al.*, 2001; Merrill *et al.*, 2003; Kutter and Sulakvelidze, 2004），ファージ療法の大きな問題点として，*in vivo* でのファージ耐性菌の出現の可能性がまず指摘されてきた。しかし，上述の大腸菌感染症に対するファージ治療では，ファージ投与後に *in vivo* で病原性 *E. coli* (K⁺ 株) が出現することは極めてまれであると報告されており（Smith and Huggins, 1982; 1983），またアユの細菌性出血性腹水症でもファージ治療後に死亡したアユからファージ耐性 *P. plecoglossicida* 菌は分離されていない（Park and Nakai, 2003）。これらのことは，ファージ耐性菌（ファージ非感受性変異株）は *in vivo* では増殖し難いか，あるいはそれらは主要な病原因子を欠いている可能性を示唆する。今後は，まず *in vivo* で出現したファージ非感受性 *S. iniae* の性状およびヒラメに対する病原性について詳細な検討を行なうとともに，*S. iniae* のファージ非感受性化・耐性化機構について検討する必要がある。

謝 辞

本研究に供試した *S. iniae* 菌株を分与していただいた香川県水産試験場および抗 *S. parauberis* 家兔血清を供与していただいた長崎大学金井欣也教授に深謝いたします。本研究は，ヒラメ養殖技術高度化研究（愛媛県単独事業）および先端技術を活用した農林水産研究高度化事業（課題番号18075）によって行われた。

引用文献

- Bergh, Ø., K. Y. Borsheim, G. Bratbak and M. Heldal (1989): High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature*, **340**, 467–468.
- Biswas, B., S. Adhya, P. Washart, B. Paul, A. N. Trostel, B. Powell, R. Carlton and C. R. Merrill (2002): Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect. Immun.*, **70**, 204–210.
- Fuhrman, J. A. (1999): Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature*, **399**, 541–548.
- Hendrix, R. W. and S. R. Casjens (2005): Family Siphoviridae, The double stranded DNA viruses. In: "Virus taxonomy classification and nomenclature of viruses Eighth report of the international committee on the taxonomy of viruses" (ed. by Fauquet, C. M., M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger and L. A. Ball). Elsevier Academic Press, London, pp. 57–70.
- 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.
- Imbeault, S., S. Parent, M. Lagace, C. F. Uhland and J.-F. Blais (2006): Using bacteriophages to prevent furunculosis caused by *Aeromonas salmonicida* in farmed brook trout. *J. Aquat. Anim. Health*, **18**, 203–214.
- Kitao, T., T. Aoki and R. Sakoh (1981): Epizootic caused by β-

- haemolytic *Streptococcus* species in cultured freshwater fish. *Fish Pathol.*, **15**, 301–307.
- Kusuda, R. and F. Salati (1999): *Enterococcus seriolicida* and *Streptococcus iniae*. In: "Fish diseases and disorders, vol. 3 viral, bacterial and fungal infections" (ed. P. T. K. Wo and D. W. Bruno). CABI Publishing, London, pp. 303–317.
- Kutter, E. and A. Sulakvelidze (2004): Bacteriophages biology and applications. CRC Press, New York, 510 p.
- Mata, A. I., M. M. Blanco, L. Dominguez, J. F. Fernandez-Garayzabal and A. Gibello (2004): Development of a PCR assay for *Streptococcus iniae* based on the lactate oxidase (*lctO*) gene with potential diagnostic value. *Vet. Microbiol.*, **101**, 109–116.
- 松岡 学・中井敏博 (2004): 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. 魚病研究, **39**, 145–152.
- 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.
- Matsuzaki, S., M. Yasuda, H. Nishikawa, M. Kuroda, T. Ujihara, T. Shuin, Y. Shen, Z. Jin, S. Fujimoto, M. D. Nasimuzzaman, H. Wakiguchi, S. Sugihara, T. Sugiura, S. Koda, A. Muraoka and S. Imai (2003): Experimental protection of mice against lethal *Staphylococcus aureus* infection by novel bacteriophage ϕ MR11. *J. Infect. Dis.*, **187**, 613–624.
- Merrill, C. R., D. Scholl and S. L. Adhya (2003): The prospect for bacteriophage therapy in Western medicine. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2**, 489–497.
- Nakai, T., R. Sugimoto, K. H. Park, S. Matsuoka, K. Mori, T. Nishioka and K. Maruyama (1999): Protective effects of bacteriophage on experimental *Lactococcus garvieae* infection in yellowtail. *Dis. Aquat. Org.*, **37**, 33–41.
- 中津川俊雄 (1983): 養殖ヒラメの連鎖球菌症について. 魚病研究, **17**, 281–285.
- 大西圭二・城 泰彦 (1981): 淡水養殖魚の連鎖球菌症に関する研究-I. 1977年および1978年に養殖アユおよびアマゴから分離された β 溶血連鎖球菌の性状. 魚病研究, **16**, 63–67.
- 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.
- Park, S. C. and T. Nakai (2003): Bacteriophage control of *Pseudomonas plecoglossicida* infection in ayu *Plecoglossus altivelis*. *Dis. Aquat. Org.*, **53**, 33–39.
- Proctor, L. M. and J. A. Fuhrman (1990): Viral mortality of marine bacteria and cyanobacteria. *Nature*, **343**, 60–62.
- 酒井正博・厚田静男・小林正典 (1986): クロノイの連鎖球菌症について. 水産増殖, **34**, 171–177.
- 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.
- 佐古 浩 (1993): 海水魚および淡水魚から分離された β 溶血性連鎖球菌の性状ならびに病原性, 水産増殖, **41**, 387–395.
- Smith, H. W. and M. B. Huggins (1982): Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phage: its general superiority over antibiotics. *J. Gen. Microbiol.*, **128**, 307–318.
- Smith, H. W. and M. B. Huggins (1983): Effectiveness of phages in treating experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves, piglets and lambs. *J. Gen. Microbiol.*, **129**, 2659–2675.
- Sulakvelidze, A., Z. Alavidze and J. G. Morris (2001): Bacteriophage therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **45**, 649–659.