

養鰻池から分離した *Edwardsiella tarda* 溶菌性 ファージの宿主範囲

飯田益生*・松山 創*

ウナギ養殖に大きな被害を与えるパラコロ病の予防及び治療へのバクテリオファージ(以下ファージ)利用の可能性を探るため、原因菌である *Edwardsiella tarda* を特異的に溶菌するファージの分離を試み、調査した延べ20の養鰻池中6池から9株のファージを得た。分離したファージを用いて類別されたウナギ病魚由来の *E. tarda* 23菌株のファージ型は多様であり、血清型や病原性との関連は認められなかった。一方、本研究で分離されたファージ株には、宿主範囲の広いものが含まれており、ファージ型の多様な菌株に比較的少数のファージで対応できる可能性が示された。また、分離ファージにはマダイ及びヒラメの病魚由来の *E. tarda* に対して溶菌性を示すファージ株が含まれ、両種のエドワジエラ症防除への応用も期待できた。

キーワード：ウナギ, パラコロ病, *Edwardsiella tarda*, バクテリオファージ, 宿主範囲

ウナギ *Anguilla japonica* のパラコロ病は、腸内細菌科の *Edwardsiella tarda* を原因菌とする感染症である。露地養殖が中心であった時代には夏季を中心とした高水温期の病気があったが、ハウス養鰻が普及し、常時高水温での飼育が行われるようになって以降は周年発生するようになり¹⁾、ウイルス性血管内皮壊死症と並んで、ウナギ養殖に大きな被害を与える病気の一つとなっている。

本疾病に対しては、オキシリン酸製剤、フロルフェニコール製剤等の化学療法剤の経口投与による治療が一般的である。しかし、近年、消費者の食の安全に対する関心が高まり、無投薬で飼育された養殖魚が好まれる傾向にあることから、養殖業者は化学療法剤を使用しない本疾病の対策を求めている。化学療法剤を使用しない細菌病対策の一つとして、バクテリオファージ(以下ファージ)を利用した方法が注目されており²⁾、いくつかの細菌病ではファージの投与による治療^{3~5)}や飼育水へのファージ添加による防除⁶⁾の有効性が示されている。

細菌病をファージで防除するためには、原因菌のファージ型に適合したファージ株を用いる必要がある。アユの細菌性出血性腹水症の原因菌 *Pseudomonas plecoglossicida*⁷⁾ やウシエビのビブリオ病の原因菌 *Vibrio harveyi*⁸⁾ はファージ

型が比較的均一であり、少ないファージ株で防除できる可能性が示されている。また、ヒラメ養殖環境中の *E. tarda* も、大部分が単一のファージ型に属することが明らかにされている⁹⁾。一方で、ウナギ養殖環境中の *E. tarda* のファージ型は多様であることが知られており⁹⁾、ファージによるウナギのパラコロ病防除のためには、これら多様な菌株に対応できるファージ株の確保が求められる。利用するファージ株は、宿主範囲が広いほど汎用性が高く、実用性に優れると考えられる。

これまでウナギ病魚由来の *E. tarda* に溶菌性を示すファージの分離事例はあるが、そのうち雨宮ら¹⁰⁾と Hsu *et al.*¹¹⁾は供試菌株数が少ないため分離ファージの宿主範囲が明確でなく、山本・前川⁹⁾は宿主範囲の狭いファージ株を確認しているのみで、宿主範囲の広いファージ株が確認された事例はない。そこで本研究では、養鰻池の池水中から分離した *E. tarda* 溶菌性ファージについて、ウナギ由来の *E. tarda* 菌株に対する宿主範囲を調べ、パラコロ病の予防・治療への利用の可能性を検討した。ファージの分離にあたっては、宿主菌に用いるウナギ由来 *E. tarda* 菌株を既報^{9~11)}の1~2株から5株に増やし、より多様なファージ株の分離を試みた。併せて、マダイ *Pagrus major* やヒラ

平成23年3月1日受理

静岡県水産技術研究所浜名湖分場業績151号

* 静岡県水産技術研究所浜名湖分場

メ *Paralichthys olivaceus* などウナギ以外の魚種に由来する *E. tarda* 菌株に対する養鰻池由来のファージの溶菌性を調査し、得られたファージの宿主範囲が複数魚種の *E. tarda* 感染症に対応可能なものか否かを検討した。

報告に先立ち、養魚場における調査に協力いただいた浜名湖養魚漁業協同組合の組合員の皆様、*E. tarda* 菌株を提供いただいた静岡うなぎ漁業協同組合の見崎禎久氏、熊本県水産研究センターの中根基行博士、静岡県水産技術研究所富士養鰻場の鈴木基生氏に感謝の意を表す。

材料及び方法

使用菌株

本研究には、表1に示したウナギ病魚由来23株、マダイ病魚由来5株、ヒラメ病魚由来2株の合計30株の *E. tarda* を用いた。なお、ウナギ由来菌株のうち、SH0901～SH0902、SH0903～SH0905、SH0906～SH0908、SH0909～SH0910はそれぞれ同じ日に同一の養鰻池の複数の病魚から分離されたものである。これらの菌株は、農林水産省農林技術会議事務局・農林水産省水産庁養殖研究所¹²⁾に従って性状試験を実施して、*E. tarda* であることを確認した。併せて、日本水産資源保護協会配付の抗 *E. tarda*(FPC-22株)家兔血清に対する凝集性を調べ、SH0805株以外の29株が同一の血清型であることを確認した(表1)。

なお本報では、松岡・中井⁸⁾に従い、ファージの集殖に用いた菌株を宿主菌、プラークの観察に用いた菌株を標示菌と標記した。

養鰻池からのファージの分離

2008年11月～2009年3月に、静岡県浜松市内8か所の養魚場の延べ20の養鰻池の池水を各100mL採取し、ファージの分離に供した。1,000×g、5℃で5分間遠心分離後に上清を0.45μmメンブレンフィルターでろ過した池水80mLを、規定の2倍濃度のトリプトソーヤブイヨン80mLと混合し、ウナギ由来の5株の *E. tarda*(表1)を宿主菌として加え、25℃で24時間培養した。培養後、2,000×g、室温で10分間遠心分離し、その上清を0.45μmメンブレンフィルターでろ過したものをファージ液とした。得られたファージ液を用い、上記5株を標示菌とした二重寒天法¹³⁾により *E. tarda* 溶菌性ファージの形成するプラークの検出を行った。得られたプラークを採取し、1mLのSM緩衝液(50mmol/L Tris-HCl(pH7.5), 8mmol/L MgSO₄, 0.01%ゼラチン)中で30分間ファージを拡散させた後、20μLのクロロホルムを加えて5℃で保存した。同一の養鰻池から検出されたプラークのうち、プラーク径が明確に異なるものは別のファージによるものとして扱い、それぞれ1つのプ

表1 本研究で用いた *E. tarda* 菌株

E. tarda 菌株	分離場所		分離年月	抗血清凝集性 ^{※6)}
	施設	所在地		
ウナギ由来株				
SH0603 ^{※1)}	A養魚場	静岡県浜松市	2006年6月	+
SH0701 ^{※1)}	B養魚場	静岡県浜松市	2007年1月	++
SH0704 ^{※1)}	C養魚場	静岡県浜松市	2007年3月	+
SH0802 ^{※1)}	D養魚場	静岡県湖西市	2008年2月	+
SH0805 ^{※1)}	E養魚場	静岡県浜松市	2008年3月	—
SH0801 ^{※1)}	F養魚場	静岡県吉田町	2008年10月	++
SH0814	E養魚場	静岡県浜松市	2008年11月	+
SH0802 ^{※2)}	G養魚場	静岡県中部地区	2008年11月	++
SH0803 ^{※2)}	H養魚場	静岡県吉田町	2008年11月	+
SH0804 ^{※2)}	I養魚場	静岡県吉田町	2008年11月	+
SH0901	J養魚場	静岡県浜松市	2009年1月	+
SH0902	E養魚場	静岡県浜松市	2009年1月	++
SH0903	J養魚場	静岡県浜松市	2009年6月	+
SH0904	J養魚場	静岡県浜松市	2009年6月	+
SH0905	J養魚場	静岡県浜松市	2009年6月	+
SH0906	K養魚場	静岡県浜松市	2009年7月	+
SH0907	K養魚場	静岡県浜松市	2009年7月	+
SH0908	K養魚場	静岡県浜松市	2009年7月	+
SH0909	J養魚場	静岡県浜松市	2009年8月	++
SH0910	J養魚場	静岡県浜松市	2009年8月	+
SH0911	K養魚場	静岡県浜松市	2009年10月	+
SH1001	L養魚場	静岡県湖西市	2010年1月	++
SH1002	E養魚場	静岡県浜松市	2010年3月	++
マダイ由来株				
SO301005 ^{※3)}	民間養殖生簀	静岡県沼津市	2001年11月	+
SO301006 ^{※3)}	静岡県栽培漁業センター(当時)	静岡県沼津市	2001年12月	+
SO304014 ^{※3)}	民間養殖生簀	静岡県沼津市	2004年10月	++
SO305004 ^{※3)}	静岡県水産技術研究所沼津分室(当時) ^{※3)}	静岡県沼津市	2005年5月	+
SO305005 ^{※3)}	静岡県水産技術研究所沼津分室(当時) ^{※3)}	静岡県沼津市	2005年6月	++
ヒラメ由来株				
熊本A ^{※4)}	民間養魚場	熊本県	2007年6月	+
熊本B ^{※4)}	民間養魚場	熊本県	2007年6月	++

※1) ファージ分離の宿主菌として用いた菌株
 ※2) 静岡うなぎ漁業協同組合分庁
 ※3) 静岡県水産技術研究所富士養鰻場分庁
 ※4) 熊本県水産研究センター分庁
 ※5) 静岡県栽培漁業センターの一部が組織改編により改称
 ※6) + : 凝集性あり、— : 凝集性なし

ラークを選んで採取した。保存したファージは、標示菌株を用いた二重寒天法によるプラーク検出とSM緩衝液への保存を2回繰り返して純化し、ファージ株として保存した。

ファージの宿主範囲

分離されたファージの各菌株に対する溶菌性をスポットテスト法¹³⁾により確認した。すなわち、菌液(10⁸CFU/mL)80μLと規定の1/3濃度に調整したトリプトソーヤ寒天培地(TSA)3mLとの混合液を重層したTSA平板上に、標示菌株に対するプラーク形成数が10⁵PFU/mLとなるように調整したファージ液を10μL滴下し、25℃で24時間培養してプラーク形成の有無を確認した。

また、宿主範囲の広い2株のファージを選び、菌株によるファージのプラーク形成能の違いを検討した。すなわち、ファージの宿主菌5株に対するプラーク形成能(PFU/mL)を二重寒天法(25℃、24時間培養)により求め、SH0603株に対するプラーク形成能を1としたときのプラーク形成能の比をプレート効率(efficiency of plating)として計算し^{7,10)}、各菌株に対するファージの感染効率の指標とした。

結 果

養鰻池からのファージの分離

調査を行った8か所中5か所の養魚場、延べ20池中6池の養鰻池から合計9株の *E. tarda* 溶菌性ファージが分離された(表2)。ファージが分離された5か所の養魚場のうち、2か所からは複数のファージが分離され、このうちN養魚場から分離されたPSH0802～PSH0804株とJ養魚場から分離されたPSH0808、PSH0809株は同一の池から分離されたものである。

ファージの宿主範囲

分離したファージの *E. tarda* 菌株に対する溶菌性を図1及び図2に示した。マダイ及びヒラメ由来菌株を含む試験に用いた全ての菌株が、いずれかのファージ株に感受性を示した。ウナギ由来の23菌株は13のファージ型に類別されたが、各ファージ型に含まれる菌株数は1～3株であ

り、特定のファージ型が多くみられることはなかった。また、同じ日に同一の養鰻池の病魚から分離された菌株であってもファージ型が異なる場合があった(SH0901株とSH0902株；SH0903株、SH0905株とSH0904株；SH0906株とSH0907株とSH0908株)。一方、マダイ由来菌株は5株のうち同一施設の病魚から分離された3株は、分離年が異なるにも関わらず全て同じファージ型であった。同一施設の病魚から分離されたヒラメ由来の2菌株も同じファージ型であった。なお、供試した30菌株の血清型が1株を除いて均一であるにも関わらず、ファージ型は多様であり、ファージ感受性と血清型の間に関連は見出せなかった。

分離したファージは、ウナギ由来の全菌株に溶菌性を示すPSH0802株や16菌株に溶菌性を示すPSH0803株など宿主範囲の広い株が認められた一方で、1菌株のみに溶菌性を示す宿主範囲の狭い株(PSH0809株)も確認された。また、ファージの宿主範囲は、PSH0807株とPSH0808株を除き全て異っており、多様であった(図1)。なお、PSH0807株とPSH0808株は分離された池は異なるが同一の養魚場から得られたファージ株であった。ファージ収集以後に分離された菌株(SH0903株以降の菌株)についても、いずれかのファージ株が溶菌性を示し、ファージ非感受性株は確認されなかった。

また、マダイ及びヒラメ由来菌株については、3株のファージが全菌株に溶菌性を示すなど、今回分離されたファージはウナギ以外の魚種由来の菌株に対しても広く溶菌性を示した(図2)。PSH0802株は、ウナギ由来株を含む今回供試した全ての菌株に対して溶菌性を示した。

宿主範囲の広いPSH0802株とPSH0803株の菌株ごとのプラーク形成能を表3に示した。いずれのファージ株も菌株によりプラーク形成能は異なり、SH0603株、SH0701株、

表2 本研究で分離された *E. tarda* 溶菌性ファージ

ファージ株	分離場所	分離年月	標示菌株
PSH0801	M養魚場	2008年10月	SH0701
PSH0802	N養魚場	2008年10月	SH0701
PSH0803	N養魚場	2008年10月	SH0704
PSH0804	N養魚場	2008年10月	SH0802
PSH0805	E養魚場	2009年2月	SH0701
PSH0806	K養魚場	2009年2月	SH0704
PSH0807	J養魚場	2009年3月	SH0704
PSH0808	J養魚場	2009年3月	SH0704
PSH0809	J養魚場	2009年3月	SH0805

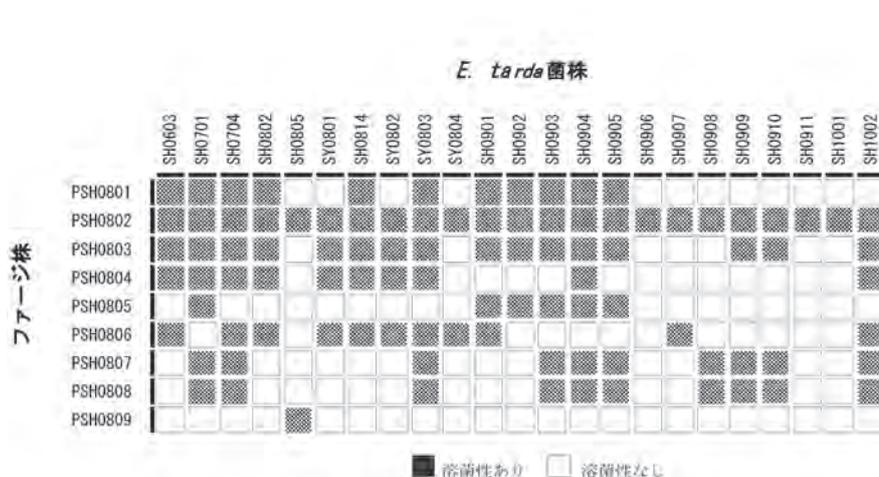


図1 ウナギ病魚由来 *E. tarda* 菌株に対する分離したファージ株の溶菌性

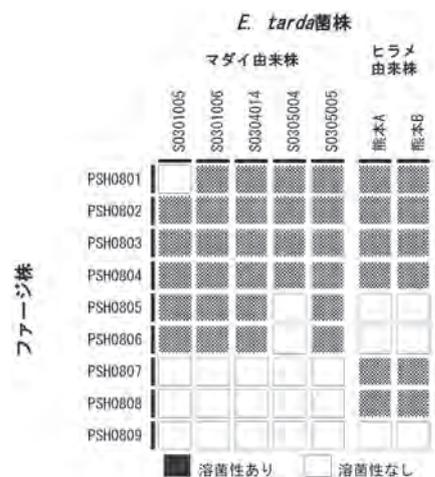


図2 分離したファージ株のマダイ及びヒラメ病魚由来 *E. tarda* 菌株に対する溶菌性

表3 PSH0802株とPSH0803株の*E. tarda*菌株に対するプラーク形成能

<i>E. tarda</i> 菌株	プラーク形成能	
	PSH0802	PSH0803
SH0603	1.0	1.0
SH0701	1.3	1.0
SH0704	1.2	1.2
SH0802	1.7×10^{-3}	4.2×10^{-1}
SH0805	3.0×10^{-2}	$< 1.5 \times 10^{-6}$

SH0704株に対するプラーク形成能と比較して、SH0802株とSH0805株に対するプラーク形成能は低かった。

考 察

本研究では、延べ20の養鰻池から9株のファージの分離に成功した。これは、Hsu *et al.*¹¹⁾が240か所の養鰻池と河川から12株のファージ、山本・前川⁹⁾が延べ48の養鰻池から8株のファージを分離したのと比較すると高い分離率である。Hsu *et al.*¹¹⁾と山本・前川⁹⁾が宿主菌としてウナギ病魚由来株を1～2株しか用いなかったのに対し、本研究では5株の病魚由来株を宿主菌として用いたことで多様なファージが検出され、その結果分離率を高めた可能性がある。また、多くの養鰻場でファージが検出されたことは、*E. tarda* 溶菌性ファージが広く分布していることを示唆している。ハウス式の養鰻池では*E. tarda*が周年分布しており^{14,15)}、宿主の分布がファージの広範な分布を支えていると考えられる。

山本・前川⁹⁾は、養鰻池の池水及び底泥中の*E. tarda*のファージ型が多様であることを明らかにしているが、本研究ではウナギ病魚由来の23菌株に対して13のファージ型が認められ、ウナギに感染した*E. tarda*についてもファージ型が多様であることが確認された。また、供試菌株の血清型が比較的均一であるにも関わらずファージ型に多様性が認められる傾向も既報⁹⁾と同じであり、アユの細菌性出血性腹水症の原因菌*P. plecoglossicida*が血清型、ファージ型ともに均一であること⁷⁾と比べると大きな相違点である。供試菌株のうち、SH0603、SH0701、SH0704株は同一実験系での感染試験では病原性が異なっていた¹⁶⁾にも関わらず、4株の共通したファージに感受性を示すことから、*E. tarda*のファージ感受性が病原性とは直接関連していないことが示唆される。これらの結果は、山本・前川⁹⁾が指摘したように、ウナギ養鰻場の*E. tarda*の生物型が多様であることを示しており、*E. tarda* 溶菌性ファージを用いたパラコロボの予防や治療には、この多様な*E. tarda* 菌株への対応が求められることを意味する。また、同日に同一養鰻池

で得られた菌株間にファージ感受性の違いが認められることは、個々の養鰻池のパラコロボ防除も限定的な宿主範囲を持つファージでは困難であることを示している。

一方で、本研究では、比較的宿主範囲の広いファージ株が得られ、ウナギ養殖環境中の多様な*E. tarda* 菌株に少数のファージ株で対応できる可能性が示された。特に、PSH0802株が今回用いたすべての菌株に溶菌性を示したことは、少なくとも菌株収集を行った3年7か月、静岡県内という範囲内での*E. tarda*の変異に、PSH0802株が対応できたことを示している。すなわち、PSH0802株はパラコロボの予防や治療に必要な宿主範囲を満たしており、汎用性の高い有用なファージ株とみなすことができる。

しかし、PSH0802株やPSH0803株などの宿主範囲の広いファージに、菌株によって最大で2桁の感染効率の違いが見られたことは、対象とする菌株により制御効果の違いが生じることを示す。つまり、パラコロボの防除にこれらのファージ株を用いる際には、対象菌株ごとに使用するファージの量の調整を要する可能性がある点に留意する必要がある。また、予防など対象菌株が特定できない状況で用いる場合には、異なった感染特性を持つファージ株を組み合わせて用いることで、パラコロボの防除効果をより高めることができるかもしれない。本研究でファージの分離を試みた養鰻池は延べ20池のみであり、調査を進めることで、有用なファージ株をさらに集積できる可能性がある。

本研究で分離したファージの多くは、ウナギ由来株のみならずマダイ及びヒラメの病魚由来株に対しても溶菌性を示した。マダイ由来の*E. tarda*は、運動性や遺伝的な特性がウナギ及びヒラメ由来の*E. tarda*と異なることが知られているが¹⁷⁾、ウナギ由来菌株とマダイ由来菌株の双方に溶菌性を示すファージが高い頻度で得られたことは、これらの性状の違いがファージ感受性に関与していないことを示す。マダイとヒラメのエドワジエラ症に対しては承認された化学療法剤がないことから、何らかの対策技術の開発が求められている。今回得られたファージは、両種への応用が期待できるものであり、ウナギを含めた3魚種共通のエドワジエラ症防除技術が確立できれば、単一魚種を対象とした場合と比較して市場を広く設定できることから、商品開発に繋がり易くなることが期待できる。

文 献

- 1) 若林久嗣 (2004): エドワジエラ症, 魚介類の感染症・寄生虫病 (若林久嗣・室賀清邦編), 恒星社厚生閣, 東京, 188 ~ 196.
- 2) Nakai T, Park SC (2002): Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture, *Research in Microbiology*, 153, 13 ~ 18.
- 3) Nakai T, Sugimoto R, Park KH, Matsuoka S, Mori K, Nishioka T, Maruyama K (1999): Protective effects of bacteriophage on experimental *Lactococcus garvieae* infection in yellowtail, *Diseases of Aquatic Organisms*, 37, 33 ~ 41.
- 4) Park SC, Nakai T (2003): Bacteriophage control of *Pseudomonas plecoglossicida* infection in ayu *Plecoglossus altivelis*, *Diseases of Aquatic Organisms*, 53, 33 ~ 39.
- 5) 松岡 学・橋爪貴也・神崎博幸・岩本恵美・Park SC・吉田照豊・中井敏博 (2007): ヒラメの β 溶血性連鎖球菌症に対するファージ治療試験, 魚病研究, 42, 181 ~ 189.
- 6) Vinod MG, Shivu MM, Umesha KR, Rajeeva BC, Krohne G, Karunasagar I, Karunasagar I (2006): Isolation of *Vibrio harveyi* bacteriophage with a potential for biocontrol of luminous vibriosis in hatchery environments, *Aquaculture*, 255, 117 ~ 124.
- 7) Park SC, Shimamura I, Fukunaga M, Mori K, Nakai T (2000): Isolation of bacteriophages specific to a fish pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida*, as a candidate for disease control, *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1416 ~ 1422.
- 8) 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.
- 9) 山本 敦・前川貴則 (2008): 養鰻池およびウナギ病魚から分離した *Edwardsiella tarda* のファージ型, 水産増殖, 56, 611 ~ 612.
- 10) 雨村明倫・服部 博・沖増栄治・松本正樹・小畑晶博 (1991): 養鰻場で分離した *Edwardsiella tarda* ファージの性質, 福山大学内海生物資源研究所報告, 2, 11 ~ 22.
- 11) Hsu CH, Lo CY, Liu JK, Lin CS (2000): Control of the eel (*Anguilla japonica*) pathogens, *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella tarda* by bacteriophages, *Journal of the Fisheries Society of Taiwan*, 27, 21 ~ 31.
- 12) 農林水産技術会議事務局・水産庁養殖研究所 (1994): 細菌性魚病迅速診断マニュアル, 農林水産技術会議事務局・水産庁養殖研究所, 東京, 276pp.
- 13) 坂田泰造・吉川 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, 114 ~ 117.
- 14) 皆川武夫・中井敏博・室賀清邦 (1983): 養鰻池における *Edwardsiella tarda*, 魚病研究, 17, 243 ~ 250.
- 15) 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.
- 16) 田中 眞・松山 創 (2009): 飼育環境制御によるウナギ重要性疾病研究, 平成 19 年度静岡県水産技術研究所事業報告, 93 ~ 94.
- 17) Yamada Y, Wakabayashi H (1998): Enzyme electrophoresis, catalase test and PCR-RFLP analysis for the typing of *Edwardsiella tarda*, *Fish Pathology*, 33, 1 ~ 5.

Host ranges of *Edwardsiella tarda* bacteriophages isolated from eel farms

Masuo Iida and Hajime Matsuyama

Abstract We tried to isolate bacteriophages specific to *Edwardsiella tarda*, a causative agent of paracolo disease (edwardsiellosis) in cultured eels, to examine the potential for phage control of the disease. A total of nine bacteriophages were isolated from 6 of the 20 examined water samples from eel farms. The susceptibilities of the tested *E. tarda* strains from diseased eels to the isolated phages showed large variation and were independent of serotype or pathogenicity. Two of the phages isolated in this study had a relatively broad host range and were able to lyse 16 to 23 of the tested 23 strains, suggesting that it may be possible to use these phages to control the disease caused by various strains of *E. tarda*. Phages infecting *E. tarda* strains from diseased red sea bream and Japanese flounder were found among the isolates, providing a basis for future exploration of the potential of phages in the treatment of edwardsiellosis.

Keywords: *Anguilla japonica*, paracolo disease (edwardsiellosis), *Edwardsiella tarda*, bacteriophage, host range