

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：35313

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05766

研究課題名（和文）滑走細菌症のファージ療法の開発－世界初の魚類ファージ療法の実用化に挑戦－

研究課題名（英文）Development of phage therapy for tenacibaculosis

研究代表者

楠本 晃子（Kusumoto, Akiko）

中国学園大学・私立大学の部局等・准教授（移行）

研究者番号：60535326

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：滑走細菌症は*Tenacibaculum maritimum*の感染による海水魚の細菌感染症である。本疾病は世界中の主要な養殖魚で発生し、問題となっている。日本では、治療に使用できる水産用医薬品もなく、水産用ワクチンもない。本研究は抗菌薬に頼らない新規治療法として、滑走細菌症のファージ療法の実用化を目指した。*T. maritimum*を溶菌するファージを用いて、実験感染魚に対するファージ投与の治療効果を評価した。マダイ稚魚およびヒラメ稚魚で、ファージの浸漬投与により、生存率は有意に改善した。本研究は滑走細菌症のファージ療法の実用化の可能性を示すものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年は国際的にも持続的な水産養殖が求められている。持続的な水産業には、不適切な薬剤の使用による薬剤耐性菌の出現やまん延の防止も含まれ、抗菌薬の使用は厳しく制限される。欧米では持続的な水産養殖をおこなうことは企業として当たり前となりつつある。養殖産業では抗菌薬に頼らない魚病対策の一つとしてファージ療法に注目が集まっている。滑走細菌症のファージ療法は実用化の可能性が高く、持続可能な水産養殖の実現に貢献しうるものである。

これまでに国内外で様々な魚類細菌感染症でファージ療法の治療効果を示す研究報告はあるが、実用化に至ったものはない。本研究は世界初の魚類のファージ療法の実用化に挑戦するものである。

研究成果の概要（英文）：Tenacibaculosis is a bacterial disease of marine fish caused by *Tenacibaculum maritimum*. This disease is a problem as it occurs in major farmed fish species worldwide. In Japan, there are no drugs or vaccines available for tenacibaculosis in farmed fish. Our aim was to develop a phage therapy for tenacibaculosis as an alternative to antibiotics. We evaluated the therapeutic effect of phage administration to experimentally infected fish. Immersion administration of phage significantly improved the survival rate of juvenile red sea bream or flounder. This study demonstrates the potential for the practical application of phage therapy for tenacibaculosis.

研究分野：細菌学

キーワード：魚病 水産養殖 感染症 ファージ療法 抗菌薬 薬剤耐性菌

## 1. 研究開始当初の背景

ファージ療法はバクテリオファージ(以下ファージ)を用いた細菌感染症の治療法である(図1)。ファージは宿主細菌に特異的に感染し、殺菌する。ファージの宿主域は一般的に極めて狭く、宿主以外の細菌には感染せず、影響を与えない。したがって、ファージ療法では、抗菌薬の使用で問題となる常在菌や環境細菌への影響もなく、薬剤耐性菌出現のリスクもない。多剤耐性を獲得した菌に対してもファージ療法は有効である。ファージ療法は近年、増加している多剤耐性菌対策の切り札として、医学、農学、獣医学の分野で再注目され、実用化を目指した研究が盛んに行われている。

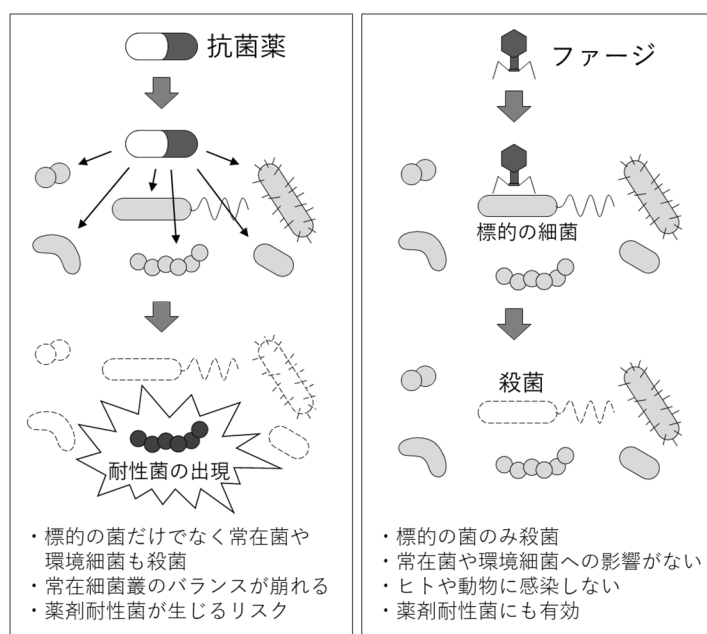
近年、世界的な人口増加によって食糧需要が増し、水産養殖生産量も年々増加している。水産養殖の増大に伴い、養殖魚の感染症の発生が増加している。かつて養殖魚の感染症対策は薬剤による治療が中心であった。しかし、1990年代後半以降、薬剤耐性菌の出現、魚体への薬剤の残留、環境への影響等の理由から養殖魚への抗菌性物質、消毒剤、駆虫剤等の使用は制限され、養殖魚の治療に使用できる水産用医薬品の数は年々減ってきている。

一方で、水産用ワクチンの開発も進められているが、現在、日本で認可された水産用ワクチンは細菌性疾病で8種類、ウイルス性疾病で2種のみで、その適用魚種が限られており、依然として感染症対策に苦慮している。

滑走細菌症も水産用ワクチンがなく、増養殖業で問題となっている細菌性疾病の一つである。本疾病は *Tenacibaculum maritimum* が海産魚類に感染し、ヒレの壊死崩壊、口唇のびらん、体表のびらんや潰瘍といった症状を引き起こす。特に、稚魚における発生が多く、時として種苗生産施設で稚魚の大量斃死を招いている。滑走細菌症はいったん発生すると被害が長引く傾向にあり、経済的被害は甚大である。本疾病は、日本では、ブリ、マダイ、ヒラメ、トラフグなど主要な養殖海産魚類の多くに発生し、海外では、スコットランド、フランス、ギリシャ、オーストラリア、アメリカの海産養殖魚やサケ科魚類での滑走細菌症の発生が報告され、日本のみならず世界的に重要視されている魚病である。

日本では滑走細菌症に対する水産用医薬品も水産用ワクチンもない。このため、種苗生産施設や養殖施設では滑走細菌症の対策に苦慮している。薬剤耐性菌の蔓延防止のため、年々、抗菌薬の使用は厳しく制限され、水産用医薬品の抗菌薬の種類も段階的に減っている。したがって、抗菌薬に頼らない滑走細菌症の治療法の開発が求められている。

図1. 抗菌薬の代替として注目されるファージ療法



## 2. 研究の目的

滑走細菌症は、現状、治療に用いることのできる水産用医薬品もなく、水産用ワクチンもないために、増養殖施設では対策に苦慮している。一方で、薬剤耐性菌対策から、抗菌薬の使用は今後も厳しく制限される。この状況を打破すべく、抗菌薬に頼らない滑走細菌症の新規治療法として、我々は滑走細菌症のファージ療法の実用化を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) ファージの分離と解析

滑走細菌症のファージ療法の実用化には、宿主域の異なる多種多様なファージが必要である。ファージライブラリーを構築するために、滑走細菌症が発生した養殖施設でのファージの分離を試みた。養殖施設の海水で培地を調整し、そこに宿主細菌を接種し、ファージを増やした後に、二重寒天法により、プラークとしてファージを分離する方法を実施した。また、過去に分離し、未分類であったファージについて解析をおこなった。

ファージ療法には、宿主域が広く、溶菌効率が高いファージが適している。分離したファージ株について、スポットテストおよびEfficiency of Plating (EOP)により、宿主域と溶菌効率を評価した。

## (2) ファージ投与による治療効果の検討

これまでに分離した *T. maritimum* を溶菌するファージの中でも宿主域が広く、かつ、殺菌効率が高いファージ株 PTm16 とその宿主菌株 Shirahama-3 株を用いて、実験感染魚に対するファージ投与の治療効果を検証した。実験には、マダイ稚魚およびヒラメ稚魚を用いた。投与法は、稚魚をファージ液に浸漬する方法と、飼料にファージ液を染み込ませ、給餌時に投与する方法を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) ファージの分離と解析

先行研究 (Kawato et al. 2019) に準じて、近畿大学水産研究所のマダイ稚魚養殖環境水からファージ分離を試みた結果、Kawato et al. (2019) と同一と考えられる頭部に繊維状の構造物を持ちミオウイルス科の形態を有するファージが 12 株 (PTm9~PTm20) 分離された (図 2A)。これらのファージ株の宿主特異性を調べた結果、PTm16 株がその溶菌性と宿主範囲の広さにおいて最も優れていると判断されたため、この株を後述する治療試験に使用した (図 3)。また、このミオウイルスに加えて、ヒラメ稚魚養殖施設の海水から約 70 nm の多面体のカプシドと、約 150 nm の繊維状で非伸縮性の尾部を持つシホウイルス科のファージが分離された (図 2B)。*T. maritimum* に感染するシホウイルス科のファージはこれまでに報告がないので、今後、その感染性、遺伝子解析等により詳細な性状を明らかにする予定である。

図2. 新規分離ファージの電子顕微鏡像

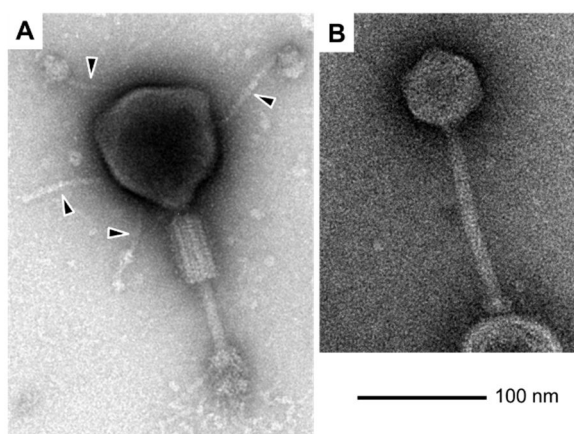


図3. ファージの宿主域

Phage	<i>T. maritimum</i> strain																																	
	R2	TC133	FPC453	A3	A1	A2	F4	F3	Shirahama-1	Shirahama-3	Uragami-3	Uragami-5	Amami-2	Amami-4	OM2203	OM3510	SM2202s	SM2325	SM3322c	SUT3523	TC134	B2	A6	B4	GF0609	F6	A4	A5	B5					
PTm1	N	T	(C)	(C)	(M)	T	(C)	(C)	N	N	N	(H)	(H)	(R)	(L)	N	N	N	(C)	(L)	N	N	T	N	N	N	N	N	N	N	N			
PTm5	N	T	N	T	C	T	C	C	N	N	C	C	C	C	C	N	N	N	C	(L)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N			
PTm9	(R)	(H)	(H)	(L)	(H)	T	T	(H)	N	N	N	N	(L)	(L)	(H)	N	N	N	(H)	(L)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
PTm10	C	C	C	N	T	C	T	C	N	N	N	N	N	N	C	N	N	N	C	(L)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
PTm11	C	C	C	N	T	T	N	C	N	N	N	N	N	N	C	N	N	N	C	(L)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
PTm12	(R)	(H)	T	T	(H)	(M)	T	(H)	N	N	(H)	N	(L)	(L)	(M)	N	N	(H)	(L)	(H)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
PTm13	C	C	T	N	C	T	N	C	N	N	N	N	N	N	C	N	N	C	(L)	(L)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
PTm14	C	T	N	N	C	C	T	N	N	N	C	N	N	N	C	N	N	N	(L)	(L)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
PTm15	C	C	T	N	C	T	T	C	N	N	C	N	C	C	C	N	N	C	(L)	(L)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
PTm16	(R)	(H)	(H)	(C)	T	T	T	(M)	(H)	(H)	N	(L)	(M)	(M)	(M)	N	N	(M)	(L)	(L)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
PTm17	C	C	N	N	T	N	N	C	N	N	C	N	N	N	C	N	N	C	(L)	(L)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
PTm18	C	C	C	N	C	T	N	C	N	N	C	N	N	N	C	N	N	C	(L)	(L)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
PTm19	C	C	C	N	C	T	T	C	N	N	C	N	N	C	C	N	N	C	(L)	(L)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
PTm20	C	C	C	N	C	T	N	C	N	N	N	N	C	N	C	N	N	C	(L)	(L)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

C Clear plaque T Turbid plaque N No plaque

スポットテストにより感染宿主域を評価した。10 株以上の菌株に対し、クリアなブランク (C) を生じるファージ株については、EOP により、溶菌効率を評価した。EOP の結果は ( ) 内に示している。0.1 以上は H、0.01 以上 0.1 未満は M、0.01 未満は L と示す。

## (2) ファージ投与による治療効果の検討

### ① マダイ稚魚に対する効果

*T. maritimum*に実験感染させたマダイ稚魚に対して、ファージを浸漬投与し、治療効果を評価した。実験1(図4)では、感染後に滑走細菌症の発症を確認してから、さまざまな濃度のファージ液に稚魚を30秒間浸漬した。ファージ投与後は、海水に戻し、飼育を継続し、経過を観察した。未処置の群では、Day 2ですべての稚魚が死亡した。一方、ファージ投与群(1.5×10<sup>2</sup> pfu/ml, 1.5×10<sup>5</sup> pfu/ml, 1.5×10<sup>6</sup> pfu/ml)では、有意な生存率の改善が見られた。特に、高濃度(1.5×10<sup>5</sup> pfu/ml, 1.5×10<sup>6</sup> pfu/ml)のファージ投与は、治療効果は顕著で、Day 4における生存率は80%以上であった。また、実験終了時(Day 4)における生存魚では、体表のびらんやヒレの欠損の回復が確認できた。

図4. ファージ投与によるマダイ稚魚に対する治療効果の検討(実験1)

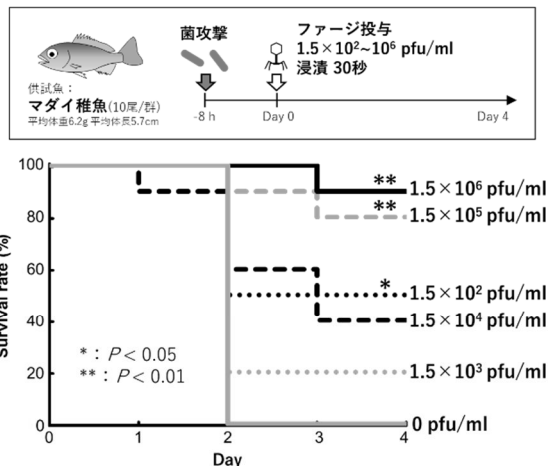
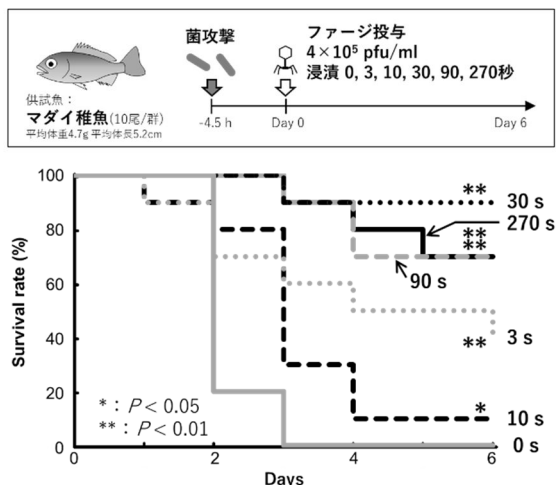


図5. ファージ投与によるマダイ稚魚に対する治療効果の検討(実験2)



実験2(図5)では、実験1で顕著な治療効果が確認できたファージ濃度(4×10<sup>5</sup> pfu/ml)で、さまざまな投与時間を検討した。すべての投与時間において、有意な生存率の改善が見られたが、30秒以上の投与は生存率の改善が顕著で、Day 6の生存率は70%以上であった。

実験1, 2から、実験感染させたマダイ稚魚に対し、ファージ浸漬投与は治療法として有効であることが示された。しかし、マダイ稚魚に対する浸漬投与は増養殖施設で実施可能ではあるが、滑走細菌症が発生するのは海上生簀であり、治療のために病魚を取り上げる必要があり、作業は煩雑である。したがって、より実用的な投与方法での治療効果を検証した。

実用的な投与方法として、養殖魚の飼料にファージを添加し、飼料と共にファージを投与方法を検討した。滑走細菌症では、*T. maritimum*の感染は魚の体表に限局しており、経口投与は効果がない。この投与法は経口投与を目的としたものではなく、給餌された飼料が魚によってつつかれたり、口の中で砕けた飼料がエラから出てくる時に、飼料中のファージが海水に拡散し、体表に達することを期待するものである。

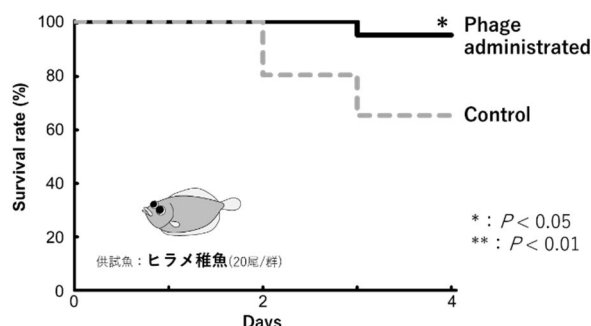
実験1, 2から、実験感染させたマダイ稚魚に対し、ファージ浸漬投与は治療法として有効であることが示された。しかし、マダイ稚魚に対する浸漬投与は増養殖施設で実施可能ではあるが、滑走細菌症が発生するのは海上生簀であり、治療のために病魚を取り上げる必要があり、作業は煩雑である。したがって、より実用的な投与方法での治療効果を検証した。

菌による攻撃後にファージを添加した飼料を投与方法をおこなった。感染当日は3回のファージ投与をおこない、その後は1日2回の給餌のタイミングで投与した。しかし、この実験では生存率の改善は見られなかった。次に予防的投与についても検討した。稚魚に対して菌による攻撃をおこなう前に、1回のファージ投与をおこない、攻撃後は2回投与し、Day 2以降は1日2回の投与をおこなった。この実験でも生存率の改善は見られなかった。この結果を受け、マダイ稚魚に対する実用的な投与方法についてはさらなる検討を進めている。

### ② ヒラメ稚魚に対する効果

ヒラメ稚魚についても治療効果を評価した(実験3, 図6)。ファージの投与法は浸漬を用いた。ヒラメ稚魚は陸上養殖施設での飼育中に滑走細菌症が発生する。飼育水槽にファージを投入することで浸漬投与が可能である。

図6. ファージ投与によるヒラメ稚魚に対する治療効果の検討(実験3)



実験3では、ヒラメ稚魚を菌で攻撃し、発症を確認した後に、ファージを水槽に投入した。その後、新鮮海水を注入し、飼育を続け、経過を観察した。実験終了時(Day 4)における生存率は、未処理群が65%に対し、

ファージ投与群は 95%であった。これは統計的に有意で、ファージ投与による治療効果が確認できた。本実験は予備的実験ではあるが、ヒラメ稚魚の滑走細菌症に対するファージ療法の有効性と、ヒラメ養殖施設における実用化の可能性を示すものである。

本研究は、実験感染したマダイ稚魚およびヒラメ稚魚の滑走細菌症に対するファージの浸漬投与の治療効果を明らかにした。今後は、ファージ療法の実用化に向けて、野外試験の予定場である近大養殖環境における *T. maritimum* とそのファージの生態調査、自然感染魚に対するファージ療法の評価をおこなう予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 楠本晃子、石丸克也、秀島悠、中井敏博、近藤裕介
2. 発表標題 マダイの滑走細菌症に対するファージの治療効果
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石丸克也、楠本晃子、中井敏博
2. 発表標題 ヒラメ稚魚の滑走細菌症に対するファージ浸漬の治療効果
3. 学会等名 令和6年度日本魚病学会春季大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 楠本晃子、石丸克也、秀島悠、中井敏博、近藤裕介
2. 発表標題 マダイの滑走細菌症に対するファージの治療効果
3. 学会等名 日本ファージセラピー研究会第3回研究集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 楠本晃子、石丸克也、秀島悠、中井敏博、近藤裕介
2. 発表標題 マダイの滑走細菌症に対するファージの治療効果
3. 学会等名 第10回ファージ研究会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	石丸 克也  (Ishimaru Katsuya)  (00330241)	近畿大学・水産研究所・講師   (34419)	
研究 分担者	中井 敏博  (Nakai Toshihiro)  (60164117)	広島大学・統合生命科学研究科(生)・名誉教授   (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------