

海苔スミノリ病の発症要因解析と防除法開発に関する研究*¹

三根崇幸*²

Studies on the Incidence Factors of Suminori Disease and the Development of the Biological Control in Laver Cultivation using Bacteriophage

Takayuki MINE

The cultivation of laver, *Porphyra* spp., is one of the major marine farming industries in Japan. However, the occurrence of suminori disease caused by pathogenic bacterial infection during the period using frozen laver thalli is a serious problem. The present study was carried out to elucidate the factors that influence the occurrence of suminori disease and to develop a biological control of suminori disease by bacteriophages that infected suminori pathogenic bacteria.

Pathogenicity was determined in four stocked bacterial strains, isolated from suminori-diseased laver thalli of *Porphyra* spp. in 1985, 2002, 2003, and 2004 when the suminori disease occurred in the Ariake Sea. Even though all isolates caused the same symptoms of the disease on infected laver thalli of *P. yezoensis*, they belonged to completely different families. Among them, in 1985 an isolate was identified as being closely related to *Arthrobacter tumbae*, whereas the other three recent isolates were related to *Gaetbulibacter saemankumensis*.

The detection of the pathogen revealed that the isolate of *Gaetbulibacter* sp. was commonly found on normal and frozen cultivated laver thalli. Furthermore, it was revealed that the physiological condition of the laver thalli deteriorated due to the freezing treatment and the deterioration was accelerated under low salinity. It was also observed that the sensitivity to bacterial infection corresponded to the deterioration in the physiological condition of the laver thalli. It was strongly suggested that several factors influence the incidence of suminori disease, since the disease is induced by a combination of the number of pathogens present and the physiological condition of laver thalli.

Three types of bacteriophages that infected suminori pathogenic bacterium, *Gaetbulibacter* sp., were isolated from seawater and tideland mud of the Ariake Sea. These bacteriophages were classified into two groups according to their morphology and restriction analysis of their genomes. Their host range, virulence, storage stability, and pH stability was investigated.

Suminori disease control was also attempted using one isolated bacteriophage selected by its virulence and the storage stability. The incidence of the disease was apparently repressed in phage-treated laver thalli immediately after bacterial infection. Furthermore, phage treatment was effective even after 24 h of bacterial infection.

The effect of phage treatment on laver thalli that were frozen after the bacterial infection was investigated and compared with that of acid treatment. The incidence of the disease was protected in both phage-treated laver and organic acid-treated laver. It was also revealed that the bacteria on phage-treated laver decreased more slowly than those of organic acid-treated laver during the experimental period. In addition, it was observed that the mean length of organic acid-treated laver was significantly shorter than

* 1 : 本論文は、鹿児島大学大学院連合農学研究科に提出した学位論文を一部改変したものである。

* 2 : 現在、水産課

that of phage-treated laver. It was suggested that phage treatment is an effective suminori disease control without a significant reduction of the growth of laver thalli.

The results obtained in this study reveal the incidence factors of suminori disease, and suggest the possibility of using bacteriophages for suminori disease control in laver cultivation.

序 論

ノリ (*Porphyra* spp.) 養殖は、ノリの殻胞子を網に付着させること (採苗) により開始される。我が国におけるノリ養殖は、1950 年頃までは主に天然採苗により行われていたため、一部の海域でのみ行われていたが、ノリの人工採苗技術が 1954 年に確立されてからは全国各地で本格的に行われるようになった。その後、多収穫性品種の開発など様々な養殖技術の改良によりノリの生産量は飛躍的に伸び、2008 年度では、その生産量および生産金額はそれぞれ年間約 90 億枚で 800 億円に達している。有明海佐賀県海域は其中で、生産枚数および生産金額ともに平成 15 年度以降全国 1 位であり、有数のノリ生産地となっている。

ノリを生産量を飛躍的に向上させた養殖技術の一つに、1966 年に開発されたノリ網の冷凍保存技術がある¹⁾。この技術は、ノリ葉体の葉長が 2~3 cm になるまで育苗したノリ網の一部を -20~-30℃ で数ヶ月間冷凍保存するものである。この技術が開発される以前では、アカグサレ病²⁾ や壺状菌病³⁾ などの発生によりノリ網が生産不能となった時点でノリ養殖は終了していた。しかしながら、この技術が開発されてからは、ノリ網が生産不能となった場合でも、冷凍保存していた網に張り替えることにより継続した養殖が可能となった。この技術が普及した現在では、ノリ養殖期は採苗したノリ網を育苗してそのまま養殖する秋芽網期と、秋芽網期に冷凍保存していた一部のノリ網を再度漁場に張り込み養殖する冷凍網期に分けられている。近年の有明海佐賀県海域では、秋芽網期養殖は、10 月中旬の採苗から始まり、11 月中旬のノリ網の冷凍保存 (冷凍入庫) を経て、漁場からノリ網が一斉撤去される 12 月中旬まで行われ、冷凍網期養殖は冷凍ノリ網が再度漁場に張り込まれる 12 月中下旬以降から行われている。冷凍網期におけるノリを生産量および生産金額は秋芽網期と比較していずれも高く、ノリ養殖にとって冷凍網期は重要な時期となっている。特に、冷凍網期初回摘みの乾ノリ製品は高品質であり、養殖期間を通じて最高値で取引される。しかしながら、有明海

佐賀県海域では 1976 年以降、この冷凍網期初回摘みのノリ葉体を中心にスミノリ病がしばしば発生し (Table 1)、被害が大きい年では 50~70 億円の損害が生じている。

Table 1 Occurrence of suminori disease in the Ariake Sea of Saga Prefecture.

Year	Damage	Year	Damage
1976	+	1993	-
1977	-	1994	-
1978	-	1995	-
1979	-	1996	-
1980	+	1997	-
1981	+	1998	-
1982	+	1999	-
1983	-	2000	-
1984	+	2001	-
1985	++	2002	++
1986	+	2003	-
1987	-	2004	+
1988	-	2005	-
1989	-	2006	-
1990	++	2007	-
1991	+	2008	-
1992	-	2009	-

- : none, + : slight, ++ : extensive.

スミノリ病とは、ノリ葉体が細菌感染することにより発症する細菌性疾病であるとされている⁴⁾。スミノリ病原細菌に感染したノリ葉体には淡い赤色を呈するなどの症状が認められるが、一般に、肉眼観察では正常なノリ葉体との区別が困難である⁵⁻⁷⁾。また、本病に罹患したノリ葉体の光学顕微鏡観察では、針状細菌と呼ばれる桿菌の葉体縁辺部付着、細胞の色素体や液胞の褐色化、細胞配列の乱れなどの症状が認められるものの、目立った死細胞は認められない⁴⁾。しかしながら、製品加工する過程において、このようなノリ葉体を淡水に浸漬すると細胞の原形質が吐出し、その製品には表面に墨を塗ったように光沢がなくなる (Fig. 1)。このような乾ノリ製品は等級付けで最低である「別」等級になり、製品価値は著しく低下する。本病は、このように製品加工する段階でその発生に初めて気付くことになるため、防除対策

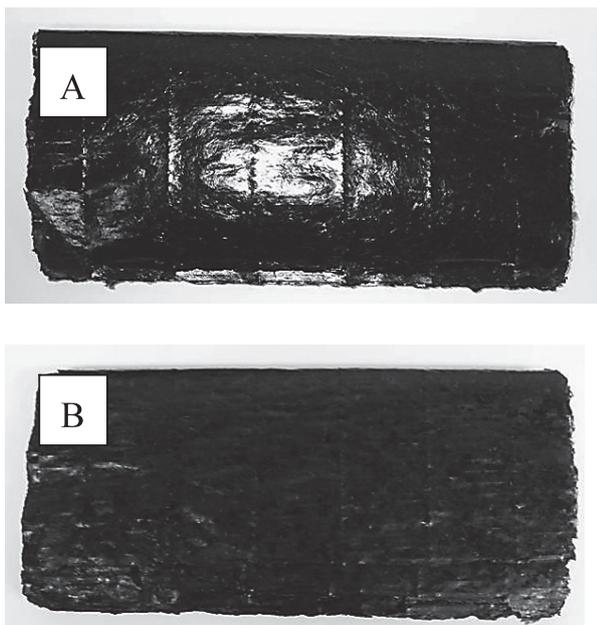


Fig. 1 Products made of suminori diseased laver thalli.
A : Normal, B : Suminori.

が遅れ被害が拡大する傾向にある⁶⁾。さらに、本病の発生にはスミノリ病原細菌が関与していると考えられているが、その発生の規模や程度はノリ葉体の養殖条件によって変動することなども認められており^{4,8)}、本病発生原因が細菌感染以外にもある可能性が否定できないことから、本病の発生機構の解明は明確にされていないのが現状である。

本病の被害を防止・軽減するためには、本病の防除法を確立することが重要となるが、そのためにはまず、本病ノリ葉体から細菌を分離して病原性の確認と細菌種の同定を行ったのち、その生育条件などの細菌微生物学的性状を明らかにすることが必須となる。しかしながら、スミノリ病原細菌として、異なる海域で様々な細菌がこれまでに報告されているが、それらは、いずれも属レベルまでの分類に止まっており、種の同定までには至っていない⁴⁾。また、スミノリ病原細菌の生育条件に関する検討は定性的に行われているにすぎない⁴⁾。

これまで実施されている本病の防除法としては、ノリ網の干出時間を長くして葉体付着細菌数を減少させる「高水位養殖」^{4,6,7,9)}やノリ網を pH 2 程度の強酸性溶液に数分間浸漬して葉体付着細菌を除去する「酸処理」¹⁰⁻¹²⁾等が挙げられる。しかしながら、「高水位養殖」はノリ葉体の生長を遅らせるため生産量の増加が期待できない、赤色を呈した乾製品ノリとなることから商品価値が低下しやすい、本病の被害が大きい年では本法によ

る被害の回避が不十分であることなどの問題が残されている⁴⁾。また、本病防除法で現在のところ最も有効とされている「酸処理」においても、処理条件によってはノリ葉体に傷害を与えてしまうことや、環境に負荷を与える可能性が指摘されており、その使用量の削減が求められている¹³⁻¹⁵⁾。以上のことから、これらの問題点を解決する効果的かつ環境負荷の少ない新たな本病防除法の開発が強く求められるようになってきている。

バクテリオファージ（以下、ファージ）は、細菌を宿主とする細菌ウイルスであり、非常に高い宿主特異性を有し、標的とする細菌のみに感染して溶菌する。ファージの感染様式は、①ファージの宿主細菌への吸着および菌体内への核酸の注入、②菌体内での子孫ファージの複製、③菌体の溶菌と子孫ファージの放出の3段階からなる。放出された子孫ファージは、次々と宿主細菌に感染し溶菌していくことから、感染単位としてのファージは感染により爆発的に増加していく。このようなファージの宿主細菌への感染・溶菌を1サイクルだけ行わせる実験は一段増殖実験と呼ばれる。この実験からは、ファージが感染してから子孫ファージが放出し始めるまでの時間（潜伏期）や1個の感染細胞から放出されるファージ粒子数の平均値（burst size）などが得られ、これらは、宿主細菌に対するファージ感染力の強さの指標となる。

Twort¹⁶⁾ および d'Herelle¹⁷⁾ によるファージの発見後、すぐにその溶菌活性が注目されるようになり、ファージを利用したヒトの細菌感染症の治療（以下、ファージ療法）が医学分野を中心に活発に試みられた¹⁸⁾。しかしながら、1940年代に抗生物質による化学療法が開発されると、この化学療法がファージ療法よりも細菌感染症に対して簡便であり効果的であったため、ファージ療法に対する関心は次第に薄れていった¹⁹⁾。ところが、近年になると、多剤耐性菌（バンコマイシン耐性腸球菌：VRE²⁰⁾やメチシリン耐性ブドウ球菌：MRSA²¹⁾など）の出現が多数報告され医療現場において問題となってきたが、ファージの治療効果がVREやMRSA感染マウスに対して報告され^{22,23)}、細菌感染症に対するファージ療法が再び注目されるようになった。現在では、ファージを利用した細菌感染症の治療や防除が医学のみならず、獣医学や農学の分野で再び試みられはじめている²⁴⁻²⁶⁾。

本研究では、スミノリ病の発生要因を明らかにするとともに、ファージのもつ高い宿主特異性と感染後の急激な複製・増殖能に着目して、ファージを利用した海苔スミノリ病防除法の開発を目的とした。第1章では、スミ

ノリ病原細菌の細菌種の同定を行うとともに、その生育条件などの細菌学的性状について検討した。第2章では、スミノリ病原細菌の養殖ノリ葉体上における分布について調べるとともに、スミノリ病の発生に及ぼすノリ葉体の生理状態の影響について検討した。第3章では、スミノリ病原細菌に感染可能なファージを分離し、分離したファージの性状解析を行うことでスミノリ病防除に最も適したファージの選抜を行った。第4章では、選抜したファージを用いて人為的にスミノリ病原細菌に感染させたノリ葉体に対するファージの感染防除効果を検討した。さらに、ノリ養殖現場でのファージを利用したスミノリ病防除法の実用化のために、ファージ処理方法について検討するとともに、そのファージ処理の効果について、酸処理との比較検討を行った。

第1章 スミノリ病原細菌の分離と性状

自然環境下で行われるノリ養殖では、当然のことながら自然災害による被害は回避できない事象と認識されている。しかしながら、その中でも風水害とは異なり、病害発生による被害に対しては治療もしくは予防などの防除法の確立を目指すことで人為的に対応可能な余地が残されている。特に、微生物感染による病害発生の防除法確立には、まず、その病原微生物を分離・同定し、その生育条件などの細菌微生物学的性状を明らかにすることが重要事項とされている。

養殖ノリで微生物感染に起因する病害のひとつとして、散発的に発生する細菌感染症であるスミノリ病がある。本病は養殖期間中の発症判定が困難で、ノリ摘採後の製品化工程時に初めて確認される事から被害は甚大なものとなり、その防除法の確立を目的とした病原細菌の分離・同定が現在も行われている。

これまで、スミノリ病原細菌として本病ノリ葉体から分離された細菌は数種類報告されており、それらは従来の同定法である形態学的性状や生物・生化学的性状を指標とした手法によりグラム陰性細菌である *Flavobacterium* spp. や *Vibrio* spp. と同定されている^{8,27,28)}。しかしながら、従来の細菌種の同定法では種名の決定は困難であり、属名においても正確さに欠くことから、これまでに病原細菌として報告されたものがそれぞれ別種であることには疑問の余地が残されてきた。

ところで、近年では、細菌の分類・同定に関して従来の手法の欠点を補うことから、16S リボソーム RNA 遺伝子 (以下、16S rDNA) の塩基配列を基準にした手法が

主流となってきている²⁹⁾。16S rDNA 塩基配列を利用する長所としては、①16S rDNA は全ての細菌が有している、②塩基配列中に共通する領域が比較的多く存在するため系統間での比較が可能である、③16S rDNA は解析する上で適当な大きさである、④ほとんど全ての細菌種の16S rDNA 塩基配列がデータベースに収録されていることが挙げられる。以上のことから、16S rDNA 塩基配列を基準にした手法を用いることで、正確な細菌種の同定を行うことが可能となっており^{30,31)}、本手法で同定した結果と細菌の形態学的性状や生物・生化学的性状を指標とした従来の手法のみで同定した結果が異なる場合も報告されている³²⁾。このことから、スミノリ病原細菌を正確に同定するためには、これまでの細菌の形態学的性状や生物・生化学的性状を指標とした手法に加えて、16S rDNA 塩基配列を基準にした手法を用いることが必要であるが、この手法によるスミノリ病原細菌の同定はこれまで報告されていなかった。

一方、スミノリ病原細菌の細菌学的性状としての生育条件に関する検討では、培養温度、食塩濃度、および pH についての報告があるものの、その試験では異なる各種培養条件に設定された液体培地中に細菌を接種し、その発育程度を定性的に肉眼観察することで検討したにすぎない⁴⁾。また、本病の発生や感染の拡大に深く関係すると考えられるスミノリ病原細菌の増殖速度については、これまでに全く検討がなされていないのが現状であった。

本章では、スミノリ病原細菌を正確に同定するため、スミノリ病ノリ葉体から分離・保存されていた菌株について、発症試験によりその病原性の確認を行ったのち、分離した細菌の16S rDNA 塩基配列に基づく細菌種の同定および系統樹解析を行った。さらに、同定されたスミノリ病原細菌の生育に及ぼす培養条件および平均増殖時間を指標とした増殖速度について検討を行った。

材料および方法

供試菌株

有明海佐賀県海域および佐賀県唐津湾のスミノリ病ノリ葉体から1985年から2004年にかけて分離され、-80℃に保存されていたDY1219-4Y, H-14LY, H-15LY, H-16LY, NS-5Y, NS-11Y, NS-17Y, およびKS-4Y株の計8菌株を用いた (Table 2)。

Table 2 Bacterial strains used in this study.

Strain	Date	Source	Location
DY1219-4Y	Dec., 19, 1985	Diseased laver thalli	Ariake Sea
NS-5Y	Dec., 13, 1991	Diseased laver thalli	Ariake Sea
NS-11Y	Dec., 13, 1991	Diseased laver thalli	Ariake Sea
NS-17Y	Dec., 13, 1991	Diseased laver thalli	Ariake Sea
KS-4Y	Jan., 13, 1992	Diseased laver thalli	Karatsu Bay
H-14LY	Dec., 2002	Diseased laver thalli	Ariake Sea
H-15LY	Dec., 2003	Diseased laver thalli	Ariake Sea
H-16LY	Dec., 2004	Diseased laver thalli	Ariake Sea

細菌学的性状検査

細菌の性状検査には、ZoBell 2216E 培地 (0.5 % ポリペプトン, 0.1 % 酵母エキス, 2.4 % 塩化ナトリウム; pH 7.6) または ZoBell 2216E 培地に終濃度が 1.5 % となるように寒天を加えた培地 (以下, ZoBell 2216E 寒天培地) を用いて 20℃ で培養した新鮮な細菌を使用した。コロニーの色調は、ZoBell 2216E 寒天培地上で 10 日間培養したのち判定した。細胞の形態は、光学顕微鏡下で常法にしたがい観察した。グラム染色は Hucker の変法で判定した。運動性は、0.2 % 寒天を含む ZoBell 2216E 寒天培地中に設置した小ガラス管内に細菌をせん刺接種し、20℃ で 14 日間培養したのち、細菌のガラス管外への拡散増殖する度合いを確認することで判定した。

供試ノリ葉体および培養条件

佐賀県白石町地先のノリ養殖試験地において、葉長約 5 cm まで生長させたスサビノリ *P. yezoensis* (品種名: S-5-0) を実験するまでの期間、-20℃ で冷凍保存していたものを使用した。これらを 5℃ で解凍したのち、切断して葉片 (10 × 2~5 mm) にし、ストレプトマイシン 300 mg/L およびペニシリン G 100 mg/L を添加した滅菌海水中で 14℃ で約 24 時間通気培養することで除菌した。抗生物質処理を行った葉片はさらに滅菌海水で 2 回洗浄したのち、改変 SWM-III³³⁾ を添加した滅菌海水 150 mL 入りのフラスコに葉片 12~15 枚を入れ、水温 14℃, 光強度 40 μmol/m²/sec, 10 時間明期: 14 時間暗期の条件下で振とう培養 (110 rpm/min) した。

分離細菌の病原性試験

ZoBell 2216E 寒天培地の斜面上で分離細菌を 20℃ で約 48 時間培養したのち、これらを滅菌海水に懸濁させた。細菌懸濁液を、除菌したノリ葉片を浮遊させたフラスコ中の滅菌海水に接種し 14℃ で 5 日間培養した。この時の各細菌終濃度は DY1219-4Y, H-14LY, H-15LY,

H-16LY, NS-5Y, NS-11Y, NS-17Y, および KS-4Y 株がそれぞれ 7.9×10^7 , 8.3×10^7 , 5.4×10^7 , 4.9×10^7 , 5.1×10^7 , 2.7×10^7 , 6.1×10^7 , および 4.3×10^7 CFU/mL とした。対照区には、菌液の代わりに滅菌海水を用いた。発症の程度は、葉体を淡水に 20 分間浸漬したのち、40 倍視野の光学顕微鏡観察により全細胞数に対する原形質吐出した細胞数の割合 (以下, 原形質吐出率) を算出し求めた。さらに、試験終了時に、各感染ノリ葉体から次の方法により細菌の分離を行った。一定量のノリ葉体を海砂とともに乳鉢中でよく摩砕し、これを滅菌海水中に懸濁させたのち、ノリ葉体摩砕液の 10 倍希釈系列を作製した。この摩砕液を、ZoBell 2216E 寒天培地を用いて 20℃ で 10 日間混釈平板培養することで細菌を分離した。

細菌 16S rDNA の調製

ZoBell 2216E 培地に分離細菌を接種し、20℃ で約 24 時間振とう培養したのち、遠心分離操作 (20,000 × g, 10 分) により菌体を回収した。ゲノム抽出キット QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて、回収した菌体よりゲノム DNA を抽出した。得られたゲノム DNA を鋳型として、細菌ユニバーサルプライマーセット 8f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') および 1510r (5'-GTGAAGCTTACGGYTACCTTGTTACGACTT-3')³⁴⁾ を用いて、16S rDNA の V1-V9 領域の約 1,500 bp を PCR によって増幅した。PCR 反応液組成は、Premix Ex Taq (Takara, Japan) 25 μL, 各プライマー 4 μL, 鋳型 DNA 2 μL, および滅菌水 15 μL の総量 50 μL とし、PCR 反応は、T グラジエントサーモサイクラー 96 (Biometra, Germany) を用いて、95℃ 5 分に続き、95℃ 30 秒, 55℃ 30 秒, 72℃ 1.5 分を 30 サイクル, 最後に 72℃ 5 分で行った。PCR 反応後、1.2% アガロース電気泳動により DNA 断片の増幅を確認した。得られた PCR 産物である DNA 断片を、PCR

精製キット QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, USA) を用いて精製した。

16S rDNA 塩基配列決定用試料の調製

ライゲーションキット TA-Blunt Ligation Kit (Nippon Gene, Japan) を用いて、精製した 16S rDNA の PCR 産物を 16℃ で 18 時間反応させ、pGEM-T Easy Vector (Promega, USA) に組込んだ。この時の反応液組成は、pGEM-T Easy Vector 1 μL, 10 × Enhancer solution 1 μL, 5 × Ligation Mix 2 μL, 精製 PCR 産物 3 μL, および滅菌水 3 μL の総量 10 μL とした。得られた組換えプラスミド溶液 2 μL をコンピートセル *Escherichia coli* JM109 (TOYOBO, Japan) 25 μL に加え、0℃ で 30 分間放置後、42℃ で 45~50 秒間の熱処理を行うことで、*E. coli* JM109 を形質転換した。

形質転換後、菌体をアンピシリン 100 mg/L, イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド 100 mg/L, 5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド 10 mg/L, および寒天 15 g を含む LB 培地 (トリプトン 1%, 酵母エキス 0.5%, 塩化ナトリウム 0.5% : pH 7.2) に塗布した。37℃ で一晚培養後、形成したコロニーの色を観察し、白色を呈したコロニーを選抜した。選抜した白色コロニーを直接鋳型として、M13 プライマーセット M13F (5'-CGCCAGGGTTTCCAGTCACGAC-3') および M13R (5'-TCACACAGGAAACAGCTATGAC-3') を用いたコロニー PCR により、16S rDNA (1,500 bp 断片) のベクタープラスミド組込みを確認した。PCR 反応液組成は、KOD Dash (TOYOBO, Japan) 0.1 μL, KOD Buffer 1 μL, dNTPs 1 μL, 各プライマー 0.1 μL, および滅菌水 7.7 μL の総量 10 μL とし、反応は T グラジエントサーモサイクラー 96 を用いて、94℃ 5 分に続き、94℃ 30 秒, 52℃ 30 秒, 74℃ 70 秒を 30 サイクル、最後に 74℃ 7 分で行った。PCR 反応後、1.2% アガロース電気泳動により目的とするバンドを検出したコロニーを 16S rDNA 組換え体とした。

得られた 16S rDNA 組換え体を、アンピシリン 100 mg/L を含む LB 培地に接種し、37℃、振とう速度 200 rpm の条件で 16 時間培養した。遠心分離操作 (13,000 × g, 5 分) して菌体を回収したのち、プラスミド抽出キット High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Diagnostics K.K., Switzerland) を用いて回収した菌体からプラスミドを抽出した。抽出したプラスミドの濃度は、微量分光光度計 NanoDrop ND-100RP (NanoDrop Technologies, USA) により測定した。

塩基配列の決定および相同性検索

16S rDNA の塩基配列の決定はジーンネット (株) (日本) に依頼して行ない、得られた塩基配列の相同性検索は National Center for Biotechnology Information (NCBI) の Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) を用いた。

系統樹解析

Ribosomal Database Project II (<http://rdp.cme.msu.edu/>) より、得られた塩基配列と比較的相同性の高い Type strain の計 20 シーケンスを収集し、ClustalW version 1.83 (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>) を用いてアライメントを作製した。Phylogenetic distance は Kimura モデル³⁵⁾ より算出し、系統樹は近隣結合法³⁶⁾ により作製した。Bootstrap 解析では 1000 回のリサンプリングを行った。

スミノリ病原細菌の生育条件および増殖速度

細菌の生育に及ぼす影響試験は、影響因子として温度、食塩濃度および pH に関して行った。細菌の生育に及ぼす温度の影響試験では ZoBell 2216E 培地を用いて 5, 10, 15, 20, 25 および 30℃ の 6 段階で行った。食塩濃度および pH の影響試験では、それぞれ食塩濃度を 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 および 3.0% を用い、pH は 2, 4, 6, 7, 8 および 8.6 の 6 段階に調整した ZoBell 2216E 培地を用いて 20℃ で行った。ZoBell 2216E 培地 10 mL に細菌を寒天培地に生育したコロニーから直接接種し、20℃ で約 40 時間振とう培養を行った (1 次培養)。1 次培養した細菌を各種 ZoBell 2216E 培地 10 mL に 1/50 量接種したのち振とう培養し (2 次培養)、可視分光光度計 SPECTRONIC 20D + (タイテック製) を用いて、培養液の濁度 (OD₆₆₀) を 1 時間毎に測定した。

増殖速度は、1 次培養した細菌を新鮮な ZoBell 2216E 培地に 1/50 量接種したのち 20℃ で振とう培養し、この培養液の一部を 2 時間毎に採取し、培養液中の細菌数を測定することで求めた。細菌数の測定は、ZoBell 2216E 寒天培地を用いて 20℃ で 10 日間混積平板培養し、出現したコロニー数を計数することで行った。細菌の比増殖率 (μ) および平均倍加時間 (g) は、対数増殖期における細菌数の変化率として、それぞれ下記の式から算出した。

$$\mu = \frac{dn}{dt} \cdot \frac{1}{n}$$

$$g = \log_2 2 \cdot \frac{1}{\mu}$$

ここで n は細菌数、 t は時間 (h) をそれぞれ示す。

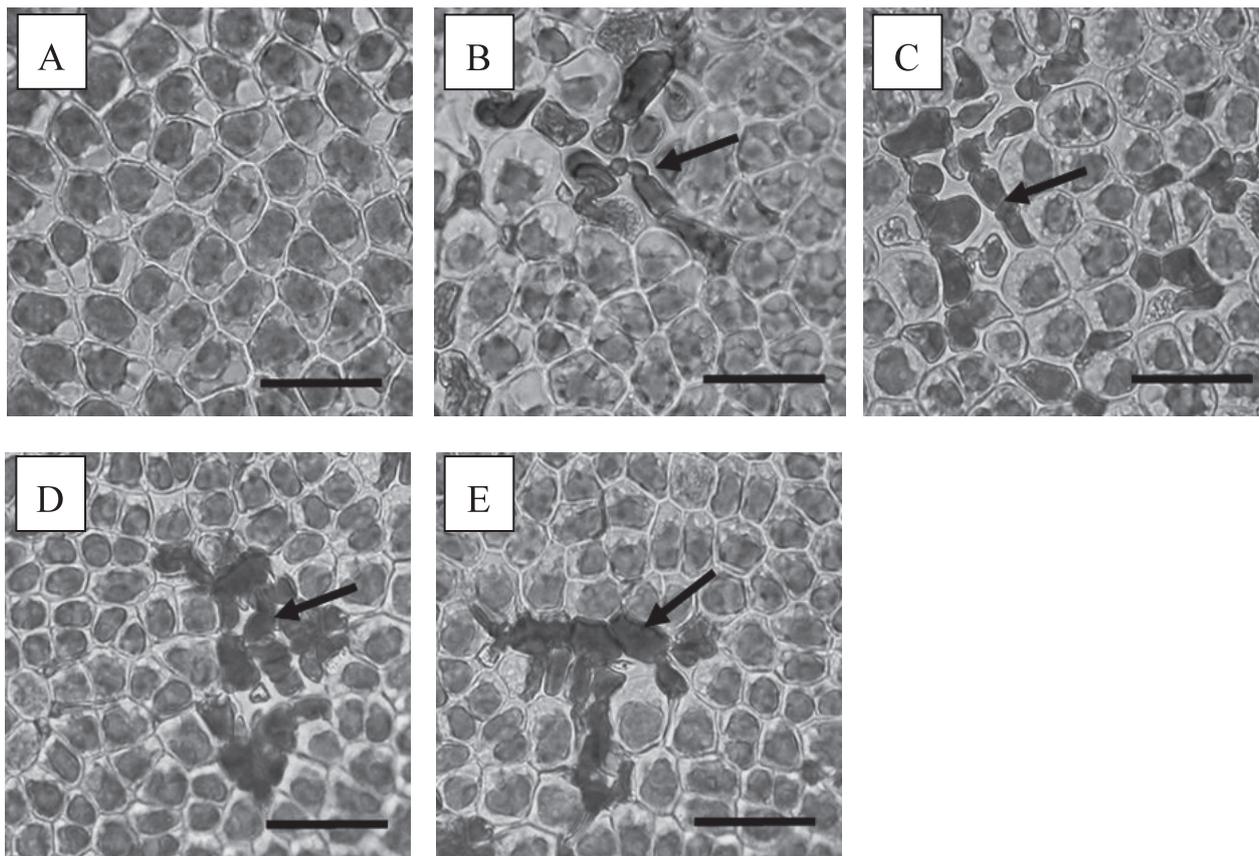


Fig. 2 Symptoms of suminori disease on laver thalli caused by the pathogenic bacteria. A : control, B : strain DY1219-4Y, C : strain H-14LY, D : strain H-15LY, E : strain H-16LY. Arrows show the plasmoptysis of laver cells. Scale bar = 30 μ m.

結 果

細菌の病原性の確認は、ノリ葉体が入ったフラスコに細菌を接種し、14℃で5日間培養したのち、ノリ葉体細胞の原形質吐出を観察することで行った。その結果、供試した8菌株中で1985年、2002年、2003年、および2004年に分離されたDY1219-4Y、H-14LY、H-15LYおよびH-16LY株の4菌株を接種したノリ葉体で、細菌感染5日目に細胞の原形質吐出が観察された (Fig. 2)。感染が認められた4菌株の吐出率では、スミノリ病の大被害が発生した年に分離されたH-14LY株が5~10%と一番高く、DY1219-4Y、H-15LYおよびH-16LY株はいずれも5%以下の比較的低い値であった。一方、1991年に分離されたNS-5Y、NS-11Y、およびNS-17Yの3菌株と1992年に分離されたKS-4Y株ではこれらが本病ノリ葉体から分離されたにもかかわらず、接種したノリ葉体に細胞の原形質吐出は観察されなかった。病原性試験終了時に各感染ノリ葉体から接種菌の再分離を行った結果、接種菌と同様な形態および色調を呈する細菌がいずれの感染ノリ葉体からも純粋に分離できた。なお、細

Table 3 Morphological characterization of suminori pathogenic bacteria.

Characterization	Strain			
	DY1219-4Y	H-14LY	H-15LY	H-16LY
Cell form	Rod	Rod	Rod	Rod
Gram stain	Positive	Negative	Negative	Negative
Motility	None	None	None	None
Color of colony	Yellow	Light yellow	Light yellow	Light yellow

菌を接種していない対照のノリ葉体では細胞の原形質吐出は認められず、その葉体からは細菌も分離できなかった。

ノリ葉体細胞の原形質吐出を引き起こしたDY1219-4Y、H-14LY、H-15LYおよびH-16LY株の4菌株の細菌学的性状についてさらに検討を行った。その結果、グラム染色以外の細菌学的性状は4菌株ともほぼ同じであり、それらは非運動性の桿菌で、ZoBell 2216E寒天培地上に黄色あるいは淡黄色のコロニーを形成した (Table 3)。ここで特記すべき事として、分離したスミノリ病原細菌のグラム染色では、2002年以降に分離されたH-14LY、H-15LYおよびH-16LY株の3菌株はグラ

ム陰性であったが、1985年に分離されたDY1219-4Y株ではグラム陽性であり、細菌が分離された時期でスミノリ病を発症させる病原細菌が全く異なることが明らかとなった。

DY1219-4Y, H-14LY, H-15LY および H-16LY 株の4菌株の正確な同定を行うために、これらの16S rDNA塩基配列解析を行った。DY1219-4Y, H-14LY, H-15LY および H-16LY 株の16S rDNA塩基配列(それぞれ1498, 1492, 1492, および1492 bp)を決定し、それらの塩基配列に基づいて既知の細菌種との相同性検索を行った結果、1985年に分離されたDY1219-4Y株では *Arthrobacter tumbae* と99.5%, 2002, 2003, および2004年に分離されたH-14LY, H-15LY および H-16LY 株では *Flavobacteriaceae* bacterium TJD738 とそれぞれ99.6%, 99.5%, および99.5%の高い相同性を示した。しかしながら、H-14LY, H-15LY および H-16LY 株と高い相同性を示した *Flavobacteriaceae* bacterium TJD738 は明確に同定された細菌ではないことから、H-14LY, H-15LY および H-16LY 株に最も近縁な細菌を検索するため、これら3菌株の塩基配列と比較的相同性の高い塩基配列を持つ基準菌株との系統樹解析を行った。その結果、H-14LY, H-15LY, および H-16LY 株は *Gaetbulibacter saemankumensis* に最も近縁であり、それぞれ94.9%, 94.8%, および94.8%の相同性を有していた (Fig. 3)。さらに、1985年に分離されたDY1219-4Y株と2002年以降に分離されたH-14LY, H-15LY および H-16LY 株の3菌株との類縁関係を調べるために系統樹解析を行った結果、これらは遺伝的に大きく異なっていることが明らかとなった。なお、本研究で決定された菌株の16S rDNA塩基配列情報は、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) に登録した。DY1219-4Y, H-14LY, H-15LY, および H-16LY 株の塩基配列情報のアクセッション番号は、それぞれAB522428, AB522425, AB522426, および AB522427である。

分離したスミノリ病原細菌の同定の結果、近年では *G. saemankumensis* 近縁種が発症原因細菌となっていることが判明した。そこで、この菌種のうち最も感染性の高い分離菌株であることが本研究で認められたH-14LY株を用いて、スミノリ病原細菌の生育に及ぼす温度、食塩濃度、およびpHの影響を検討した。本菌株の生育に及ぼす温度の影響について調べた結果、20~30℃の範囲では温度が高くなるほど本菌株はよく生育したが、10~15℃の範囲では生育がやや悪くなり、5℃ではほと

んど生育しなかった (Fig. 4)。また、生育に及ぼす食塩濃度の影響については、食塩濃度が2.0~3.0%の範囲では本菌株はよく生育したが、1.5%になると生育がやや悪くなり、1.0%以下になるとほとんど生育しなくなった (Fig. 5)。生育に及ぼすpHの影響について検討した結果、中性付近 (pH 7~8) では本菌株はよく生育したが、弱酸性 (pH 6) および弱アルカリ性 (pH 8.6) では生育がやや悪くなり、酸性 (pH 4以下) では細菌の生育が阻止されることが明らかになった (Fig. 6)。

本菌株の生育に及ぼす温度、食塩濃度、およびpHの影響試験において、本菌株を培養液に接種した後の培養液の濁度上昇が緩やかな傾向にあったことから、本菌株の増殖速度は遅いことが考えられた。そこで、培養液中の細菌数を経時的に測定することによりH-14LY株の平均倍加時間を指標とした増殖速度について検討した。その結果、20℃における本菌株の対数増殖期は培養後約4~14時間であることが明らかとなり (Fig. 7)、対数増殖期における細菌数と培養時間との関係から、本菌株の比増殖率 (μ) は $\mu = 0.24 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ と算出された。さらに、比増殖率 (μ) の値から本菌株が2分裂するための経過時間である平均倍加時間は2.8時間と算出された。

考 察

スミノリ病ノリ葉体から分離・保存されていた菌株の病原性を検討した結果、1985, 2002, 2003, および2004年に分離された4菌株では病原性が確認されたが、病原性の強さは菌株で異なった。スミノリ病の被害が近年で最も大きかった2002年に分離された菌株であるH-14LY株では病原性が最も強く、スミノリ病の被害がほとんど認められなかったか、軽微であった2003年および2004年に分離された菌株であるH-15LY および H-16LY 株では病原性が弱くなってきていた。このことは、菌株の病原性とスミノリ病の被害程度との間に相関関係があることを示唆するものと推測したが、本病の被害が大きかった1985年に分離された菌株であるDY1219-4Y株に高い病原性が認められなかったことで、スミノリ病発生による被害状況は病原細菌の質的变化よりも量的変化に影響することが推察された。また、1991年および1992年に分離され病原性が定性的に確認されていた4菌株²⁸⁾の病原性が定量的に行った本研究では確認できなかったことから、スミノリ病原細菌の病原性は、-80℃の長期保存によって失われていく可能性も否定できない。

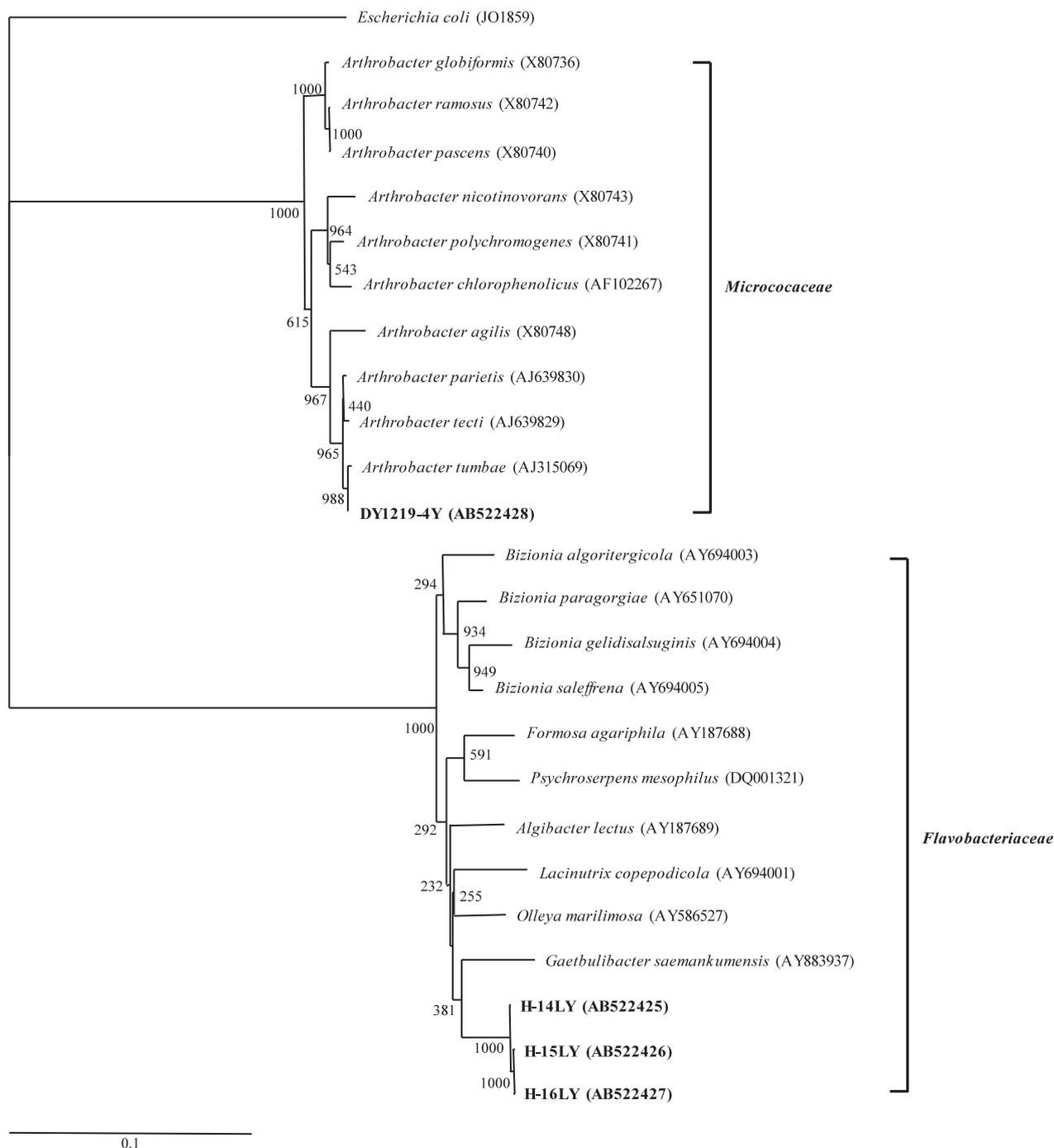


Fig. 3 Phylogenetic positions of strains DY1219-4Y, H-14LY, H-15LY, and H-16LY and other related members in the families *Flavobacteriaceae* and *Micrococaceae*. The tree is based on 16S rDNA sequences and was generated by the neighbor-joining method. *Escherichia coli* was used as an outgroup. Numbers in parentheses are GenBank nucleotide accession numbers. Numbers on the branches indicate the confidence limits estimated by a bootstrap analysis of 1000 replicates. Scale bar represents 0.1 substitutions per nucleotide position.

これまでに分離されているスミノリ病原細菌の細菌学的特徴としては、非運動性のグラム陰性桿菌で、ZoBell 2216E 寒天培地上に黄色あるいは淡黄色のコロニーを形成することが挙げられている²⁸⁾。そこで、病原性が認められた4菌株の細菌学的性状を調べたところ、2002年以

降に分離された3菌株はこれまでに分離されているスミノリ病原細菌と同様な細菌学的性状を有していたが、1985年に分離された菌株はこれまでに分離されているスミノリ病原細菌とはグラム染色性で全く異なっていることが明らかとなった。そこで、病原性が認められた4

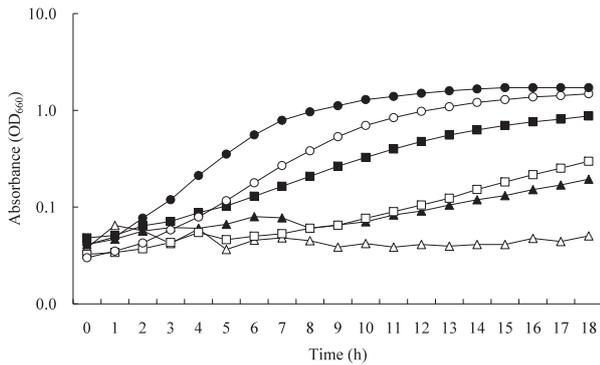


Fig. 4 Effect of temperature on the growth of *Gaetbulibacter* sp. strain H-14LY.
 ● : 30 °C, ○ : 25 °C, ■ : 20 °C, □ : 15 °C, ▲ : 10 °C, △ : 5 °C.

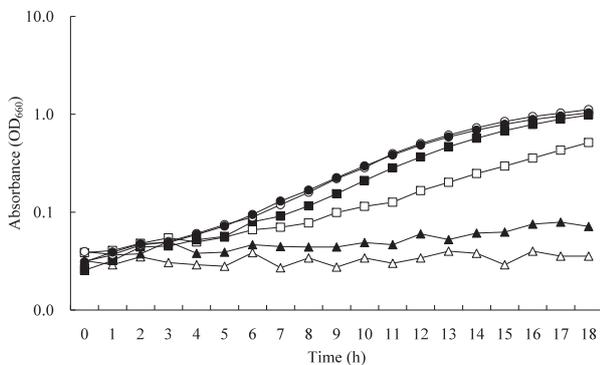


Fig. 5 Effect of NaCl concentration on the growth of *Gaetbulibacter* sp. strain H-14LY.
 ● : 3.0 %, ○ : 2.5 %, ■ : 2.0 %, □ : 1.5 %, ▲ : 1.0 %, △ : 0.5 %.

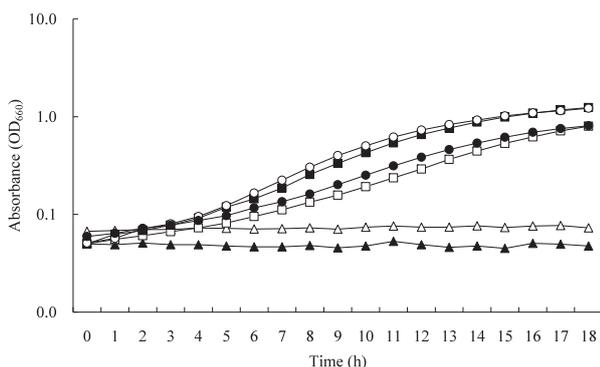


Fig. 6 Effect of pH on the growth of *Gaetbulibacter* sp. strain H-14LY.
 ● : pH 8.6, ○ : pH 8.0, ■ : pH 7.0, □ : pH 6.0, ▲ : pH 4.0, △ : pH 2.0.

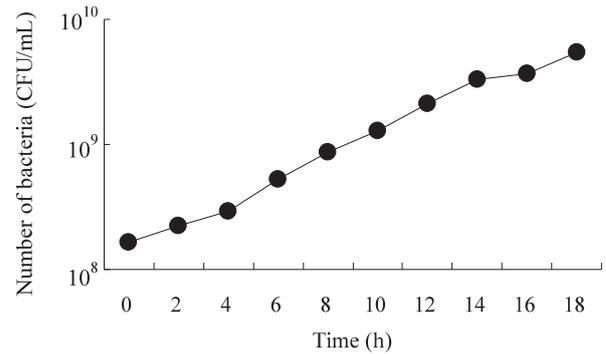


Fig. 7 Growth curve of *Gaetbulibacter* sp. strain H-14LY in the ZoBell 2216E medium at 20 °C.

菌株の細菌種を同定するために、16S rDNA 塩基配列に基づく既知種との相同性検索および系統樹解析を行った結果、4 菌株とも同様にスミノリ病の症状を引き起こしたものの、1985 年に分離された菌株と 2002 以降に分離された 3 菌株は系統樹間で大きくかけ離れた 2 つのグループに属することが明らかとなった。16S rDNA 塩基配列に基づく細菌の分類・同定手法では、既知種との 16S rDNA 塩基配列の相同性が 97 % 以下であれば別種とみなすと考えられていることから³⁷⁾、1985 年に分離された DY1219-4Y 株は *A. tumbae*³⁸⁾ と同一種、2002 年以降に分離された H-14LY、H-15LY および H-16LY 株は *Gaetbulibacter* 属³⁹⁾ の新種である可能性が高いことから、それぞれ *Arthrobacter tumbae* DY1219-4Y、*Gaetbulibacter* sp. H-14LY、*Gaetbulibacter* sp. H-15LY、および *Gaetbulibacter* sp. H-16LY と同定した。スミノリ病原細菌としては、これまでに有明海佐賀県海域や愛知県三河湾および伊勢湾で *Flavobacterium* spp.^{27,28,40)}、佐賀県唐津湾では *Flavobacterium* spp. や *Vibrio* spp.²⁸⁾ などが報告されているが、本研究で同定した細菌はこれらとは全く異なる細菌であった。このように、これまでスミノリ病原細菌として様々な種類の細菌が同定されたことから、スミノリ病原細菌として分離された細菌にはノリ葉体細胞の原形質吐出を引き起こす共通した病原因子が存在し⁴¹⁾、この病原因子は細菌間に伝達されている可能性が推測される。

スミノリ病の発生要因を解明するためには、スミノリ病原細菌の生育温度および生育食塩濃度条件を明らかにすることが重要である。そこで、近年分離されたスミノリ病原細菌の中で最も病原性が強かった 2002 年分離菌株の生育に及ぼす温度および食塩濃度の影響について調べた結果、本菌株の至適生育温度および至適生育食塩濃度は、それぞれ 20~30 °C および 2.0~3.0 % であること

が明らかとなった。有明海佐賀県海域のノリ養殖漁場における食塩濃度は通常3%前後であることから、本菌株の至適増殖条件を考慮した場合、水温が30℃近くなる夏季に本菌株は最も増殖しやすいと考えられる。しかしながら、本菌株を含めてこれまでに分離されたスミノリ病原細菌は、水温約10~14℃台と低い水温時に本病ノリ葉体から分離されている。このことから、スミノリ病原細菌の増殖には、増殖基質としてのノリ葉体の存在も大きく関係している可能性が示唆された。また、ノリ養殖では現在、スミノリ病対策として、pH2程度の強酸溶液に浸漬してノリ葉体に付着するスミノリ病原細菌を除去するノリ網の酸処理が活発に行われている。しかしながら、本菌株に対しても酸処理による除去効果が認められるかどうかは不明であった。本研究における本菌株の生育に及ぼすpHの影響についての検討結果は、現在行われている酸処理が本菌株に対しても有効であることを支持するものと考察された。

2002年に分離した菌株H-14LY株の生育に及ぼす温度、食塩濃度、およびpHの影響を検討した結果から、本菌株は増殖が遅い細菌であることが推察された。そこで、本菌株の平均倍加時間について調べた結果、2.8時間であることが明らかとなった。ウナギ *Anguilla japonica* などの淡水養殖魚やヒラメ *Paralichthys olivaceus* などの海水養殖魚の病原細菌である *Edwardsiella tarda* の平均倍加時間は約1.4時間と報告されていることから⁴²⁾、本菌株は海洋性細菌の中でも比較的増殖が遅い細菌であることが明らかとなった。

以上、これまで細菌の形態学的性状や生物・生化学的性状を指標とした手法で複数種のスミノリ病原細菌が同定されていたが、16S rDNA塩基配列に基づく細菌の分類・同定手法を用いた本研究においても、スミノリ病原細菌は1種類ではなく、複数種存在することが明らかとなった。

第2章 スミノリ病発症要因の解析

有明海佐賀県海域におけるノリ養殖では、10月中旬から12月中旬までの期間に行われる採苗したノリ網を育苗してそのまま養殖する「秋芽網期」と、12月下旬から4月上旬までに行われる秋芽網期に一部冷凍保存していたノリ網を再度養殖する「冷凍網期」の2つの期間に分けて実施されている。この養殖期間中の海水温度は、秋芽網期では開始時の約23℃が終了時には約15℃に低下し、冷凍網期では開始時の約15℃が養殖期半ばの1月

から2月にかけて約10℃にまで低下し、その後上昇して終了時の4月上旬には約15℃に変化する。一方、海水の塩分濃度は、晩秋から初春にかけての全ノリ養殖期間中で著しい変化はほとんど認められず、2.8~3.0%と比較的安定している。これらノリ養殖環境と第1章で明らかにしたスミノリ病原細菌の生育条件を基にしてスミノリ病の発生状況を推測すると、本病は海水温度が比較的高い養殖期前半の秋芽網期初期もしくは後半の冷凍網期後期に発生が認められるはずである。ところが、有明海佐賀県海域におけるスミノリ病の発生は、海水温度の比較的高い秋芽網期初期や冷凍網期後期には全く認められず、冷凍網養殖期初期に集中して発生することが報告されている⁴³⁾。特に、冷凍保存網を解冻して施網育成した最初の摘採ノリ（1番ノリ）に本病が発生している場合が最も多いことが知られているが、このことは冷凍（もしくは解冻）処理がノリ葉体に負の影響を与えていることを示唆するものと予想された。さらに、第1章において、分離された年代は異なっているものの、本病ノリ葉体からスミノリ病原細菌として属の全く異なる複数種の細菌が同定されたことや、同属の細菌でも病原性に差があることから、本病の発生には病原細菌の感染は必須条件ではあるものの、ノリ葉体の生育期における生理状態も大きく関係している、いわゆる日和見感染症であることが推察される。

本病の発生とノリ葉体の生理状態との関係については、これまで明確さには欠けるものの言及されてきていた⁴⁾。有明海佐賀県海域においては、ノリ葉体を冷凍保存する前の育苗期および冷凍網養殖期に全日日射量が少ない年には本病が発生する傾向にあることが経験的に知られている。このことから、日射量が少ない条件で養殖されたノリ葉体では光合成活性が低下することで生理状態が悪化し、そのために、本病に対する感受性が高くなっていることが推察されている⁴⁴⁾。また、冷凍処理がノリ葉体に及ぼす影響では、冷凍保存温度が異なるノリ葉体を用いて本病の発症試験を定性的に行った結果、冷凍保存条件として適正でない温度に保存したノリ葉体では本病の症状が重症化することも報告されている⁴⁾。この報告では、冷凍処理はノリ葉体の生理状態に何らかの影響を及ぼし、生理状態が悪化したノリ葉体では本病に罹患する可能性が高くなることが推測されている。しかしながら、ノリ葉体の生理状態を実際に調べ、その葉体を用いて本病の発生程度を定量的に検討した研究が行われていないため、現在まで本病の発生とノリ葉体の生理状態との関係についての明確な指摘はなされていないの

が現状であった。

本章では、スミノリ病の発生要因を明らかにするため、細菌を正確かつ迅速に定量検出できると考えられている Real-time PCR^{45,46)} や簡便法としての抗原抗体による検出法を用いてスミノリ病原細菌の養殖ノリ葉体上における分布について調べるとともに、スミノリ病の発生に及ぼすノリ葉体の生理状態の影響については、ノリ葉体の光合成量をその生理状態の指標としてスミノリ病原細菌感受性を調べることで検討した。

材料および方法

供試菌株

試験には、1985, 2002, 2003, および2004年にスミノリ病ノリ葉体から分離された *A. tumbae* DY1219-4Y 株, *Gaetbulibacter* sp. H-14LY 株, *Gaetbulibacter* sp. H-15LY 株, および *Gaetbulibacter* sp. H-16LY 株を用いた。

ノリ葉体に付着する細菌の検出

ノリ葉体上の細菌数は厳密な定量測定としては Real-timePCR 法を用い、半定量的な検出には抗 *Gaetbulibacter* sp. H-14LY 株ウサギ血清による抗原抗体反応を利用した凝集反応法を用いた。

Real-timePCR 法による細菌数の定量測定では、有明海佐賀県海域のノリ養殖漁場から2006年11月に採取した秋芽網養殖期の正常な養殖ササビノリ *P. yezoensis* を試料として用いた。DNA 抽出キット ISOIL for Beads Beating (Nippon Gene, Japan) を用いて、ノリ葉体約 1g から全 DNA を抽出し、Real-time PCR の鋳型 DNA として用いた。Real-time PCR では、全細菌種、スミノリ病原細菌 *Gaetbulibacter* sp. H グループ株 (*Gaetbulibacter* sp. H-14LY 株, *Gaetbulibacter* sp. H-15LY 株, および *Gaetbulibacter* sp. H-16LY 株), および *A. tumbae* DY1219-4Y 株を標的とした。各細菌グ

ループの 16S rDNA の定量には Table 4 に示すプライマーセットを用いた。スタンダードには、*Gaetbulibacter* sp. H-14LY 株および *A. tumbae* DY1219-4Y 株の 16S rDNA 全長をもつプラスミドを用いた。プラスミドの濃度は、微量分光光度計 NanoDrop ND-100RP を用いて測定した。測定して得られたプラスミドの濃度および塩基配列よりプラスミドのコピー数を算出し、10 倍段階希釈することで Real-time PCR の DNA スタンダードとした。

Real-time PCR は Mx3000P QPCR System (Stratagene, La Jolla, CA) を用いて、95℃ 2分につき、95℃ 30秒、60℃ 15秒、72℃ 15秒を40サイクルの反応条件で行った。各反応は、FullVelocityTM SYBR Green QPCR master mix (Stratagene, La Jolla, CA) 10 μL, 各プライマーセット 0.15 μM, Reference dye 2 μM, template DNA 2 μL を含む reaction mixture 20 μL の反応系で行った。ネガティブコントロールには、鋳型 DNA の代わりに 2 μL の Milli-Q water を反応液に添加した。反応終了後、55℃ から 95℃ に徐々に加熱し SYBR Green I の蛍光強度を測定することで解離曲線を作成し、PCR 増幅産物の特異性を確認した。

冷凍保存養殖ノリ葉体からのスミノリ病原細菌の検索では *Gaetbulibacter* sp. H-14LY 株のウサギ抗血清を用いた凝集試験により行った。2006~2008 年度の秋芽網養殖期に育苗して -26℃ で冷凍保存していた養殖ノリ葉体を解凍後、調製したノリ葉体の摩砕液から ZoBell 2216E 寒天培地を用いた混釈平板培養法により細菌を分離し、抗体との反応で陽性を示したものを *Gaetbulibacter* sp. H-14LY 株として計数した。

ノリ葉体の生理状態の測定

本研究では、ノリ葉体の生理状態の指標として純光合成量を用い、その測定は藻類生理生態研究法⁴⁸⁾ に従い次のように行った。ノリ葉体を葉片 (10 × 5 mm) に切断し、この葉片 5 枚を DO 瓶に入れ、水温 18℃, 光強度 90

Table 4 Primers used for quantitative real-time PCR in this study.

Target	Primer name	Primer sequence (5'-3')	Product size (bp)	Reference
Total bacteria	HDA1	ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT	200	47)
	HDA2	GTATTACCGCGGCTGCTGGCAC		
H group strains	183F	TATTGCGACATCGCATGGTG	103	Present study
	267R	CTATCGTTGCCATGGGGTG		
<i>A. tumbae</i> DY1219-4Y	DYF20	CAAGTCGAACGATGATCTCC	142	Present study
	DYR19	AACCACCATGCGATGGAAG		

$\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ の条件下で1時間静置した。静置後、葉片を静かに取り出し、DO 瓶に試薬を加えて酸素を固定した。DO 瓶中の溶存酸素量は Winkler 法⁴⁹⁾により求め、ノリ葉体の純光合成量 (Pn) は次式によって算出した。

$$Pn (\text{mgO}_2/\text{cm}^2/\text{h}) = (D_b - D_a)/a \times t$$

ここで、

D_a : 開始時における溶存酸素量

D_b : インキュベート後における溶存酸素量

a : 葉片の面積

t : インキュベーションの時間

である。

冷凍処理ノリ葉体の調製

室内採苗したスサビノリ *P. yezoensis* (品種名:S-5-0) を、改変 SWM-III を添加した塩分 31.9 の海水中で水温 18℃、光強度 90 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ 、12 時間明期:12 時間暗期の条件下で通気培養し、葉長 5 cm 前後まで生長させたものを正常ノリ葉体とした。この正常ノリ葉体に対し、塩分 31.9 (正常塩分) または 10.5 (低塩分) の海水中で次のように冷凍処理を行った。それぞれの塩分を含む海水中で正常ノリ葉体を同条件で 3 日間通気培養したのち、これらを気温 20℃、湿度 70% に設定した人工気象室 (日本医化器械製作所製, LPH-1-L) 内で水分含量 (WC) 40% まで乾燥させた。水分含量 (WC) は次式によって求めた。

$$WC (\%) = \{(Aw - Dw)/(Ww - Dw)\} \times 100$$

ここで、

Aw : 各時点におけるノリ葉体の風乾重量

Dw : 85℃ で 4 時間乾燥させたノリ葉体の乾重量

Ww : 乾燥前におけるノリ葉体の湿重量

である。

乾燥後、これらを -20℃ で 1 週間冷凍保存し、冷凍処理ノリ葉体の試料とした。なお、本研究では、冷凍保存前の前培養期間における海水塩分の違いにより、冷凍処理ノリ葉体をそれぞれ正常塩分冷凍ノリ葉体および低塩分冷凍ノリ葉体と称した。

スミノリ病原細菌感染に対するノリ葉体の感受性試験

スミノリ病原細菌は分離菌株中で最も病原性の高い *Gaetbulibacter* sp. H-14LY 株を使用した。

正常ノリ葉体、正常塩分冷凍ノリ葉体、および低塩分冷凍ノリ葉体を葉片 (10 × 5 mm) に切断し、切断した葉片に対し第 1 章と同様な方法で抗生物質処理を行い、葉

体上の付着細菌を除菌した。抗生物質処理を行った葉片は滅菌海水で 2 回洗浄したのち、改変 SWM-III を添加した滅菌海水 150 mL を分注したフラスコに葉片 15 枚を入れ、水温 14℃、光強度 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ 、10 時間明期:14 時間暗期の条件下で振とう培養した。

Gaetbulibacter sp. H-14LY 株を ZoBell 2216E 寒天培地の斜面上で 20℃ で約 48 時間培養したのち、滅菌海水に懸濁させた。抗生物質処理を行った正常ノリ葉体、正常塩分冷凍ノリ葉体、および低塩分冷凍ノリ葉片が入ったフラスコに、終濃度がそれぞれ $4.9 \times 10^1 \sim 10^7$ CFU/mL、 $6.0 \times 10^1 \sim 10^7$ CFU/mL、および $4.0 \times 10^1 \sim 10^7$ CFU/mL となるようにスミノリ病原細菌を接種したのち、上記の培養条件下で各ノリ葉片を 7 日間培養した。対照には、病原細菌の代わりに滅菌海水を接種した。

発症の程度は、第 1 章で述べたとおり原形質吐出率を算出して求めた。試験終了時に、ZoBell 2216E 寒天培地を用いた混釈平板培養法により各感染ノリ葉体から細菌の分離を行い、抗 *Gaetbulibacter* sp. H-14LY ウサギ血清を用いた凝集試験⁵⁰⁾により陽性を示した細菌を *Gaetbulibacter* sp. H-14LY として計数した。

結 果

菌株の 16S rDNA 塩基配列を基にしてスミノリ病原細菌 *Gaetbulibacter* sp. H グループ株および *A. tumbae* DY1219-4Y 株に特異的なプライマーを設計した。設計した各プライマーを用いた Real-time PCR により、2006 年度秋芽網養殖期に採取した正常な養殖ノリ葉体からスミノリ病原細菌を定量的に検出した。なお、この実験では、鋳型 DNA 溶液中の各細菌グループの 16S rDNA のコピー数は、スタンダード DNA の測定結果より作製した検量線を用いて算出した。その結果、すべての Real-time PCR において検量線は、少なくとも DNA 濃度の 5 対数値にわたって直線を示し、相関係数 R^2 が 0.99 以上であった。また、検出限界は Real-time PCR において 10 copies であり、ノリ 1 g 中に $10^3 \sim 10^4$ copies であった。以上の検出限界の値に基づいて定量実験を行った結果、正常ノリ葉体には全細菌数 7.1×10^7 copies/g に対して 2002 年以降に分離されたスミノリ病原細菌 *Gaetbulibacter* sp. H グループ株の菌数が 1.6×10^6 copies/g 検出され、一般のノリ養殖漁場で生育した正常ノリ葉体においてもスミノリ病原細菌 *Gaetbulibacter* sp. H グループ株の細菌数は全細菌数の 2.3

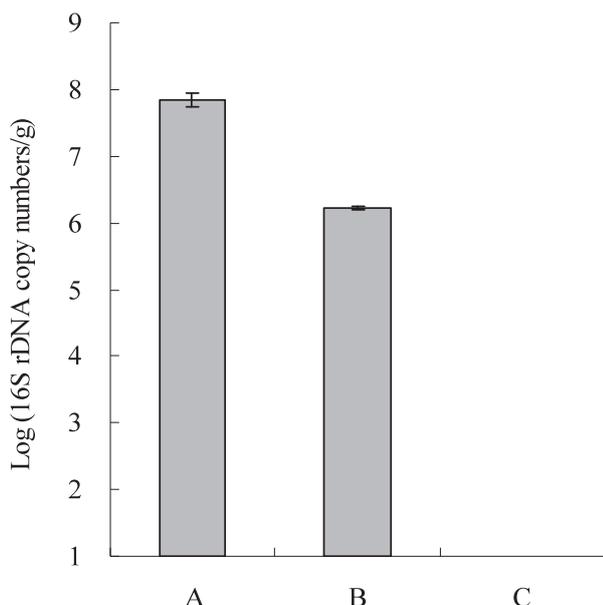


Fig. 8 Quantitative detection of bacteria on normal cultivated laver thalli.

A : total bacteria, B : H group strains, C : *A. tumbae* DY1219-4Y. Vertical bars show standard deviations (n=2). The number of 16S rDNAs was enumerated by quantitative real-time PCR.

%を占めていることが判明した (Fig. 8)。一方, 1985年に分離されたスミノリ病原細菌 *A. tumbae* DY1219-4Y株は2006年の正常な養殖ノリ葉体からは全く検出されず, 有明海佐賀県海域では20年足らずの間に菌相の大きな変化が生じていることが明らかにされた。また, 正常な養殖ノリ葉体から現在のスミノリ病原細菌 *Gaetbulibacter* sp. Hグループ株が検出されたことから, この細菌は有明海常在細菌でありスミノリ病の発生には感染宿主側であるノリ葉体の生理状態も深く関係していることが示唆された。

一方, スミノリ病の発生が冷凍網養殖開始直後に集中することから, 冷凍網養殖初期のノリ葉体はスミノリ病原細菌にすでに感染していることが推察された。そこで, 秋芽網養殖期に育苗し, その一部を冷凍保存していた2006~2008年度の養殖ノリ葉体から, *Gaetbulibacter* sp. H-14LY株の抗血清を使用して半定量的にスミノリ病原細菌の存在を検索した。その結果, Real-timePCR法で明らかにされた正常な秋芽網養殖期のノリ葉体の細菌数からも推察されたように, 2006, 2007, および2008年の冷凍養殖ノリ葉体からそれぞれ 1.1×10^7 CFU/g, 1.1×10^7 CFU/g, および 1.8×10^6 CFU/gの本菌株が検出され, 冷凍処理期間を経ても冷凍網養殖開始時にはすでにノリ葉体に多数のスミノリ病

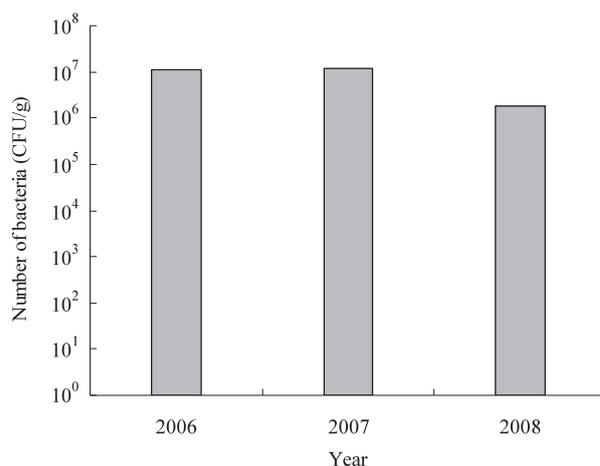


Fig. 9 Detection of suminori pathogenic bacterium, *Gaetbulibacter* sp. strain H-14LY on the frozen cultivated laver thalli.

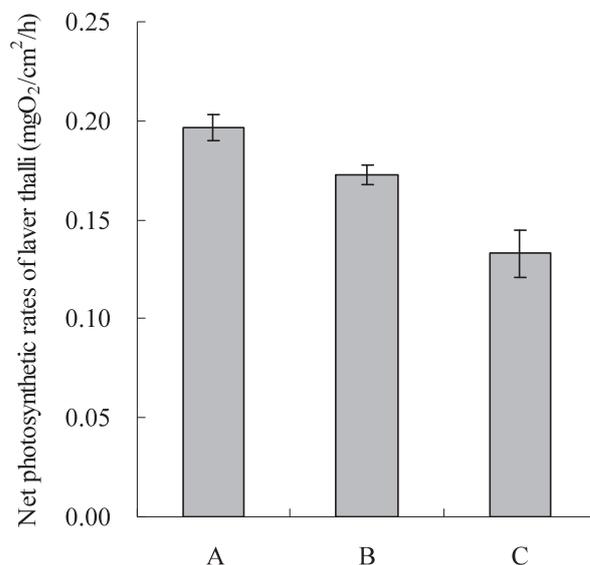


Fig. 10 Effect of freezing treatment on net photosynthetic rates of laver thalli.

A : fresh thalli, B : normal-salinity frozen thalli, C : low-salinity frozen thalli. Vertical bars show standard deviations (n=2).

原細菌が付着して生存していることが確認された (Fig. 9)。

次に, 冷凍処理ノリ葉体の生理状態とスミノリ病原細菌に対する感受性について検討した。冷凍処理がノリ葉体の生理状態に及ぼす影響に関しては, 正常塩分あるいは低塩分海水でノリ葉体を培養後に冷凍保存したものを試料とし, これらのノリ葉体の生理状態をその純光合成量を測定することで検討した (Fig. 10)。その結果, 冷凍処理を行っていない正常ノリ葉体ではその純光合成量が $0.20 \text{ mgO}_2/\text{cm}^2/\text{h}$ であったが, 正常塩分条件下で培養

しても、冷凍処理を行った場合には、ノリ葉体の純光合成量は $0.17 \text{ mgO}_2/\text{cm}^2/\text{h}$ と低下することが判明した。さらに、生育条件の悪い低塩分条件下で培養後に冷凍処理を行ったノリ葉体の純光合成量は $0.13 \text{ mgO}_2/\text{cm}^2/\text{h}$ となり、その生理状態は正常塩分条件培養で無処理のノリ葉体のそれと比較して約 60% 程度に低下することが明らかになった。

冷凍処理がノリ葉体の生理状態に負の影響を及ぼすことが判明したことから、生理状態の異なるこれらの冷凍処理ノリ葉体を用いて、スミノリ病原細菌感染に対するノリ葉体の感受性試験を行った (Table 5)。その結果、冷凍処理を行っていない正常ノリ葉体では、供試した最大細菌濃度である $4.9 \times 10^7 \text{ CFU/mL}$ 接種区で、試験最終日の 7 日目に一部のノリ葉体細胞に 5% 以下の原形質吐出が観察された。一方、生理状態が正常ノリ葉体の 80% 程度に減少した正常塩分条件下で冷凍処理を行ったノリ葉体では、7 日目に正常ノリ葉体が罹患した濃度の約 10^{-4} の細菌濃度でも 5% 以下ではあるが原形質吐出が認められた。また、供試したノリ葉体中で生理状態が正常のその 60% まで減少した最も悪い状態の低塩分条件下で冷凍処理を行ったノリ葉体では、冷凍処理を行っていない正常ノリ葉体よりも極めて低い $4.0 \times 10^1 \text{ CFU/mL}$ の細菌接種濃度でも 7 日目には原形質吐出が認められ、感染が成立することが判った。さらに、正常塩分条件下で冷凍処理したノリ葉体と比較すると、低塩分条件下で冷凍処理したノリ葉体では、ノリ葉体細胞の

原形質吐出が観察される時期が $4.0 \times 10^5 \sim 10^7 \text{ CFU/mL}$ の細菌濃度で接種 5 日目からと早く、また、その吐出率が $4.0 \times 10^3 \sim 10^7 \text{ CFU/mL}$ の細菌濃度で接種 7 日目に 5~10% と高かった。なお、生理状態が悪化した冷凍処理したノリ葉体でも細菌を接種していない試験区では、ノリ葉体細胞の原形質吐出は観察されなかったことから、スミノリ病の発症に宿主の生理状態が大きく影響するが、細菌感染は必須であることが明らかになった。また、感受性試験終了後、各感染ノリ葉体から *Gaetbulibacter* sp. H-14LY 株の再分離を行った結果、本菌株を接種した全てのノリ葉体からは本菌株を分離することができたが、本菌株を接種していない対照のノリ葉体からは本菌株を分離することができなかった。

考 察

第 1 章において、スミノリ病原細菌は水温が高いほどよく生育することが明らかとなったことから、冷凍網養殖期よりも水温が高い秋芽網養殖期のノリ葉体にスミノリ病原細菌が感染している可能性が考えられた。そこで、2006 年度秋芽網養殖期に摘採した正常な養殖ノリ葉体からスミノリ病原細菌の定量検出を試みた結果、2002 年から 2004 年にかけて分離されたスミノリ病原細菌 *Gaetbulibacter* sp. が感染成立には至らないまでもノリ葉体中の全細菌数に対して高い割合で検出され、本菌は現在のところ有明海に常在している可能性が考察され

Table 5 Sensitivity of treated laver thalli to bacterial infection.

Laver thalli	Dose (CFU/ml)	Days after infection			
		1	3	5	7
Fresh thalli	0	- [†]	-	-	-
	4.9×10^1	-	-	-	-
	4.9×10^3	-	-	-	-
	4.9×10^5	-	-	-	-
	4.9×10^7	-	-	-	+
Normal-salinity frozen thalli	0	-	-	-	-
	6.0×10^1	-	-	-	-
	6.0×10^3	-	-	-	+
	6.0×10^5	-	-	-	+
	6.0×10^7	-	-	-	+
Low-salinity frozen thalli	0	-	-	-	-
	4.0×10^1	-	-	-	+
	4.0×10^3	-	-	-	++
	4.0×10^5	-	-	+	++
	4.0×10^7	-	-	+	++

[†] Plasmolysis rate (%) of laver cells. - : none, + : < 5%, ++ : 5-10%.

た。一方、1985年に分離された *A. tumbae* は全く検出されなかったことから、複数種の細菌がスミノリ病の原因細菌となりうるが、本病を引き起こす細菌は、海洋の環境要因などにより時代とともに変化している可能性が推察された。

また、スミノリ病原細菌 *Gaetbulibacter* sp.が正常なノリ葉体に認められたことから、本病の発生には、スミノリ病原細菌感染だけでなくノリ葉体の生理状態も大きく関与し、ノリ葉体の生理状態が悪化した時に初めて発病することが示唆された。そこで、ノリ葉体の生理状態を悪化させる要因について検討を試みた。

有明海佐賀県海域における本病は、一般的に冷凍保存したノリ葉体を用いた冷凍網養殖期に発生しやすく、冷凍保存していない正常なノリ葉体を用いた秋芽網養殖期にはほとんど発生しないことが知られている⁴³⁾。さらに、冷凍網養殖期開始時のノリ葉体には、スミノリ病原細菌が冷凍処理期間中も死滅することなく、秋芽網養殖期と同様に付着して生存していることが認められた。このことから、冷凍網養殖期を行うための冷凍処理がノリ葉体に影響を及ぼし、その生理状態を悪化させていることが考えられた。

冷凍処理が生体に及ぼす影響について紅藻の *Chondrus crispus* では、冷凍処理によりその原形質膜が著しい障害を受け、その結果として光合成活性が低下することが報告されている⁵¹⁾。しかしながら、ノリ養殖に使用されるスサビノリ葉体に及ぼす冷凍処理の影響については、これまでも研究され報告されているものの、その研究では冷凍処理のノリ葉体の生存率に及ぼす影響についてのみが検討され、冷凍処理のノリ葉体の生理状態に及ぼす影響については考察に留まり直接的には検討されていなかった¹⁾。そこで、本研究では純光合成量を指標として、冷凍処理がノリ葉体の生理状態に与える影響について検討した結果、冷凍処理を施すことによりノリ葉体の純光合成量が減少し、生理状態が顕著に悪化することが明らかとなった。

一方、有明海佐賀県海域では、ノリ葉体を冷凍保存する前の育苗期の平均塩分が低い年ほど本病の被害が大きい傾向にあることも知られている⁴⁾。さらに、ナラワスサビノリ *P. yezoensis* f. *narawaensis* Miura の幼芽は低塩分海水に浸漬されたのち乾燥させられると、傷害を受けることも報告されている⁵²⁾。これらの報告から、ノリ葉体を冷凍処理の実施前に低塩分海水で培養することで、ノリ葉体が生理的な傷害を受けている可能性も推察された。そこで、正常塩分または低塩分海水で培養した

のちに冷凍処理を行ったノリ葉体の生理状態について調べた結果、ノリ葉体の生理状態は冷凍処理により悪化するが、その悪化の程度は、低塩分条件下で冷凍処理したノリ葉体で著しいことが明らかとなった。

生理状態が悪化したノリ葉体が細菌感染に対して感受性が高くなるであろうことは容易に推察された。そこで、冷凍処理葉体のスミノリ病原細菌感染に対する感受性を調べた結果、冷凍処理を行ったノリ葉体では、冷凍処理を行っていない正常ノリ葉体が発病しないような極めて低い細菌濃度でも発病した。さらに、通常の冷凍網期に使用するような正常塩分条件下で冷凍処理したノリ葉体よりもさらに生理状態が悪化する低塩分条件下で冷凍処理したノリ葉体では、本病の発病時期が早く、その罹患程度も拡大することが判明し、スミノリ病原細菌感染に対するノリ葉体の感受性はノリ葉体の生理状態の悪化に伴い上昇することが明らかとなった。

スミノリ病の発生には、スミノリ病原細菌感染数だけでなく、ノリ葉体の生理状態も大きく関係することが明らかになったが、ノリ葉体の生理状態に影響を及ぼす要因としては、本研究で明らかとなったように、ノリ葉体の冷凍処理や培養海水の塩分濃度が挙げられ、スミノリ病の発生機構については多様性があることが強く示唆された。

ノリ養殖において、ノリ葉体の冷凍保存技術の導入が乾海苔の生産量を飛躍的に伸ばすことに寄与したことは否定できない事実である。しかしながら、本研究で判明した結果から、従来の冷凍保存法はノリ葉体の生理状態悪化を引き起こし、スミノリ病発生による大被害の危険性を併せ持つようになった事も事実として受け止めなければならないと考察された。

以上のことから、養殖ノリのスミノリ病の被害を防ぐためには、スミノリ病原細菌数を減らす技術を開発することはいうまでもなく、ノリ葉体の生理状態を良好に保つことも重要であり、ノリ葉体の冷凍保存方法の改良など養殖方法の改善が必要であると考えられる。

第3章

スミノリ病原細菌感染ファージの分離と性状

第2章のスミノリ病原細菌感染に対するノリ葉体の感受性試験結果からも明らかとなったように、細菌感染症とされるスミノリ病の被害を防ぐためには、ノリ養殖環境からスミノリ病原細菌数を減少させることが最重要課題となってくる。ノリ養殖では現在、ノリ葉体に付着しているスミノリ病原細菌を殺菌・滅菌する方法として、

有機酸を主成分とする pH 2 程度の強酸溶液にノリ網を浸漬することでノリ葉体上のスミノリ病原細菌を除去する化学的防除法である、いわゆる酸処理が 1993 年から実施され、これまでのところ本病の発生を効果的に抑制することに成功している。しかしながら、現在最も効果的なスミノリ病対策法である酸処理は、その使用方法を誤るとノリ葉体に傷害を与えることが知られており^{13,14)}、また、酸処理剤の使用は海洋環境や魚介類などの水生生物に影響を与える可能性が以前から指摘されてきていた¹⁵⁾。さらに、酸処理の多用は、ノリ養殖業者の肉体的負担だけでなく経済的負担も大きい。以上のことから、酸処理と同様な効果を持ちながらも環境に対する負荷の少ないスミノリ病防除法の新たな開発が急務となっている。

ところで、自然界にはウイルスと呼ばれる宿主細胞に感染してのみ増殖することができる絶対寄生性の微生物が存在し、感染後ウイルス粒子の増殖に伴い宿主細胞は破壊されていく。ウイルスは、その寄生する宿主細胞の違いにより、真核細胞である動物細胞に感染する動物ウイルス、植物細胞に感染する植物ウイルス、真菌に感染する真菌ウイルス、および原核細胞である細菌に感染する細菌ウイルスに分類されており、特に、細菌に感染するウイルスはバクテリオファージもしくは単にファージとよばれている。ファージは真核細胞の動植物細胞や真菌には感染不可能であることは当然のことであるが、原核細胞である同種の細菌でさえ菌株が異なれば感染しない場合もあり、非常に高い宿主特異性を有していることが知られている。さらに、ファージは、宿主細菌に感染後、その細菌内で複製してファージ粒子数を増幅させていき、最終的には宿主細菌を破壊（溶菌）して複製したファージ粒子を細胞外へと放出させる。このようにして放出されたファージ粒子は、再び残存する宿主細菌に感染して溶菌させていくことから、感染単位としてのファージ粒子数は細菌感染により爆発的に増加する特徴も有する。また、ファージ感染による宿主細菌数の減少は、自己増殖不能で宿主に絶対依存性のファージにとって自然消滅を促すことになる。このようなファージの性質は、その発見が赤痢菌やブドウ球菌などの病原細菌の溶菌現象であったことも一因となり、細菌感染症の予防および治療の道具として、一時期は関心が薄れたにも関わらず今日では再び注目されてきている。ファージによる細菌感染の防除法は「ファージ療法：phage therapy」とよばれ、医学分野のみならず農学分野においても世界的規模で開発が進められている。

ファージ療法の開発でまず問題となることは、ファージの持つ非常に高い宿主特異性である。この特性のため、同種の細菌でも病原細菌として複数の菌株が存在する場合には、細菌感染症防除に利用するファージがそれらに感染できるかどうか明らかにしておく必要がある。また、ファージを利用して細菌感染症の防除を行う場合、利用するファージの宿主細菌に対する感染力が問題となるが、このファージの感染力はファージの一段増殖実験などから検討が可能である。さらに、細菌感染症の防除にファージを利用するためには、ファージの保存方法を確立することも必要であり、利用するファージの温度安定性について明らかにしておくことも重要である。ファージは一般的に酸に弱いとされていることから、細菌感染症の防除にファージを利用する際に酸の影響を受けることが想定される場合には、利用するファージの pH 安定性について検討しておく必要もある。

そこで本章では、スミノリ病原細菌感染ファージを利用した海苔スミノリ病の防除法開発を目的として、スミノリ病原細菌に感染可能なファージを有明海的环境中から分離することを試みた。さらに、分離したファージの中からスミノリ病の防除に最も適したファージを選抜するために、分離したファージの宿主特異性、一段増殖実験を指標とした感染力、温度安定性、および pH 安定性について解析した。

材料および方法

スミノリ病原細菌および培養条件

ファージの検索と分離には宿主細菌として、近年分離されたスミノリ病の原因細菌のうち最も病原性の高い菌株である *Gaetbulibacter* sp. H-14LY 株を用いた。本菌株は 1 次培養した後、新鮮な ZoBell 2216E 培地 10 mL に 1/50 量接種し、20℃で約 6 時間振とう培養して対数増殖期に達したものをファージの指示菌液として使用した。

ファージの分離源

2004 年から 2005 年にかけて、Fig. 11 に示す佐賀県白石町地先の六角川自動観測塔 (St. 1) から採集した海水および六角川河口域の干潟 (St. 2) から採集した泥土をファージの分離源として用いた。泥土は、その 1 g を 9 mL の滅菌海水によく攪拌して懸濁させたのち、遠心分離 (1,300 × g, 10 分, 15℃) した上清を使用した。海水および泥土上清は孔径 0.22 μm の PVDF メンブレン



Fig. 11 Sampling stations in the Ariake Sea of Saga Prefecture. Closed areas show laver farms.

フィルター (Millipore, USA : 以下, フィルター) で濾過除菌してファージ検索の試料とした。

ファージの純粋分離

ファージの分離は, Adams の寒天重層法⁵³⁾ に準じて次のように行った。終濃度が 0.5 % となるように寒天を加えた ZoBell 2216E 培地 (以下, ZoBell 2216E 軟寒天培地) に *Gaetbulibacter* sp. H-14LY 株の指示菌液 0.3 mL とファージ検索試料液 0.5 mL を混和したのち, 直ちに ZoBell 2216E 寒天培地に重層した。20℃ で 1~2 日間培養し, 形成された溶菌斑 (プラーク) を観察することで試料中のファージの存在を検索した。

溶菌斑が形成された場合には, 次の方法によりファージを純粋に分離した。溶菌斑の部分を白金耳でかき取り, 指示菌液に接種し 20℃ で約 24 時間振とう培養したのち, 遠心分離 (20,000 × g, 10 分, 15℃) して上清を回収した。得られた上清をフィルターで濾過除菌したものを試料として, 再び寒天重層法を用いて溶菌斑を形成させ, この溶菌斑分離操作を 3 回繰り返すことでファージを純粋分離した。

純粋分離したファージはさらに指示菌液に接種し, 20

℃ で約 24 時間振とう培養したのち, 遠心分離 (20,000 × g, 10 分, 15℃) して上清を回収した。得られた上清をフィルターで濾過したものを再び本菌株の指示菌液に接種・培養した。この操作を繰り返し行ってファージ数を増加させたのち, これをフィルターで濾過したものを感染実験および安定性試験のファージ試料として実験に使用するまで 5℃ で保存した。

ファージ粒子の精製

1 次培養した *Gaetbulibacter* sp. H-14LY 株を ZoBell 2216E 培地 100 mL に接種し, 20℃ で約 6 時間振とう培養したのち, ファージ液 (約 10⁹ PFU/mL) 1 mL を接種し, 20℃ で約 24 時間振とう培養した。この培養液を遠心分離 (13,000 × g, 30 分, 4℃) し, 得られた上清に終濃度が 1 μg/mL となるように DNaseI および RNaseI を添加して 37℃ で 2 時間静置培養したのち, 遠心分離 (13,000 × g, 30 分, 4℃) することで宿主細菌の染色体 DNA を除去した。得られた上清に終濃度が 20 % となるように polyethylene glycol 6,000 を添加して 4℃ で約 24 時間静置したのち, 遠心分離 (20,000 × g, 30 分, 4℃) することでファージ粒子を回収した。得られたファージ粒子の沈殿物を SM buffer (50 mM Tris-HCl buffer, 8.1 mM Mg₂SO₄ · 7H₂O, 100 mM NaCl ; pH 7.5) に懸濁させ, 精製ファージ粒子懸濁液とした。

ファージ DNA の調製

精製ファージ粒子懸濁液に, EDTA を終濃度 20 mM, Proteinase K を終濃度 50 μg/mL, および 10 % SDS を終濃度 0.5 % となるようにそれぞれ添加し, 42℃ で 2 時間静置した。静置後, このファージ懸濁液に等量の TE [10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 1 mM EDTA] 飽和フェノールを添加しファージ DNA を抽出したのち, 遠心分離 (13,000 × g, 10 分, 室温) してファージ DNA を含む水層を回収した。得られた水層に等量のクロロホルム : イソアミルアルコール混合液 (体積比 24 : 1) を添加してファージ DNA を精製したのち, 遠心分離 (13,000 × g, 10 分, 室温) して水層を回収した。得られた水層に酢酸ナトリウム 14.85 μL, etachinmate 3 μL, および 95 % エタノール 500 μL を添加し, 室温で 2 分間静置したのち遠心分離 (20,000 × g, 10 分, 4℃) することでファージ DNA を沈殿させた。ファージ DNA の沈殿物に 70 % エタノール 600 μL を添加し洗浄したのち, 遠心分離 (20,000 × g, 10 分, 4℃) した。洗浄したファージ DNA の沈殿物を減圧乾燥させたのち, TE buffer に懸

濁させてファージ DNA 抽出液とした。

ファージ DNA の制限酵素解析

ファージ DNA 抽出液に制限酵素 *Hind*III (ニッポンジーン) を添加し、37℃で2時間加温することでファージ DNA を切断したのち、その切断パターンを電気泳動により解析した。電気泳動は、0.7%アガロースゲル (ニッポンジーン) を用いて 50 V 定電圧、45 分間、室温の条件で行った。

ファージの電子顕微鏡観察

1%酢酸ウラニルでファージをネガティブ染色したのち、透過型電子顕微鏡 JEM-1210 (JEOL 社製) を用い、加速電圧 80 kV の条件下で観察した。

ファージの交差感染試験

スミノリ病ノリ葉体から分離され病原性が認められた 4 菌株 (*Arthrobacter tumbae* DY1219-4Y 株, *Gaetbulibacter* sp. H-14LY 株, *Gaetbulibacter* sp. H-15LY 株, および *Gaetbulibacter* sp. H-16LY 株) および本病ノリ葉体から分離され病原性が認められなかった 4 菌株 (NS-5Y 株, NS-11Y 株, NS-17Y 株, および KS-4Y 株), さらに、正常ノリ葉体から分離され病原性が認められていない 2 菌株 (EX-S5Y 株および H-18OR 株) の計 10 菌株を分離したファージの交差感染試験用指示菌として用いた。

1 次培養した供試菌株を新鮮な ZoBell 2216E 培地に接種し、20℃で OD₆₆₀ = 0.25~0.3 まで培養したものを指示菌液とした。ZoBell 2216E 寒天培地上に滅菌した綿棒でファージ液を縦に引き、よく乾燥させたのち、指示菌液を滅菌綿棒でファージと直交に引いた。20℃で 48 時間培養後、交差部分の溶菌の有無を検討した。

ファージの一段増殖実験

ファージの一段増殖実験は、Ellis and Delbruck の方法⁵⁴⁾を一部改変して次のとおり行った。*Gaetbulibacter* sp. H-14LY 株の指示菌液に細菌あたりのファージ感染度 (多重感染度: MOI) が 0.1 となるようにファージ液を接種し、20℃で 10 分間静置してファージを宿主細菌に吸着・感染させた。宿主細菌に未感染のファージを除去するため、この感染液を遠心分離 (13,000 × g, 5 分, 20℃) してファージ感染細菌を集菌し、得られた細菌を PBS (100 mM リン酸緩衝液; pH 7.0) に懸濁させたのち同条件で再度遠心分離して集菌した。この PBS での

洗浄操作を 2 回繰り返して得られたファージ感染細菌を ZoBell 2216E 培地 10 mL に接種し、さらに同培地で 10⁴ 倍に希釈したのち、20℃で静置培養した。この培養液から 10~30 分毎に試料を採取し、寒天重層法により試料中のファージ数 (PFU) を測定した。

ファージの温度安定性試験

ファージ液を 5℃および 20℃に 24 週間保存し、サンプル中の生存ファージ数を 1~4 週間毎に測定した。ファージ数の測定は寒天重層法で行い、結果は、開始時のファージ数を 100%とした比率で示した。

ファージの pH 安定性試験

pH を 2, 3, 4, 6, 8, 8.5 の 6 段階に調整した ZoBell 2216E 培地 0.9 mL にファージ液 0.1 mL を添加し、20℃で 10 分間静置したのち、サンプル中の生存ファージ数を寒天重層法で測定した。結果は、処理前のファージ数を 100%とした比率で示した。

結 果

スミノリ病原細菌 *Gaetbulibacter* sp. H-14LY 株を宿主細菌とした寒天重層法により、有明海の海水中および干潟泥土中から本菌株に感染するファージの検索を行った。その結果、本菌株が生育した ZoBell 2216E 寒天培地上に形態が異なる 3 種類のプラークが形成された。それぞれのプラークからファージを純粋分離するために、プラーク部分を白金耳でかきとり、これを本菌株の指示菌液に接種し培養したものを試料としたプラーク分離を繰り返すことで、ファージを純粋に分離した (Table 6)。分離した 3 種類のファージはそのプラーク形態から 2 つのグループに分けられ、直径約 0.5 mm のピンホール状のプラークを形成するファージを U1 とし、周囲が濁った大型のプラークを形成するファージをそれぞれ U2 および U3 とした。なお、ファージ U2 および U3 のプラーク形態は類似していたが、それぞれの直径は約 3 mm および 2.5 mm であり、海水から分離されたファージ U2 の方が干潟泥土から分離されたファージ U3 よりも大きかつ

Table 6 Phages isolated in this study.

Phage	Date	Source	Location
U1	Dec., 2004	Seawater	Ariake Sea
U2	Nov., 24, 2005	Seawater	Ariake Sea
U3	Nov., 24, 2005	Tideland mud	Rokkaku River

た (Fig. 12)。

ファージ U2 および U3 は、類似した大型のプラークを形成することから近縁な種であり、小型のプラークを形成するファージ U1 はこれらのファージとは異なる種であることが考えられた。そこで、分離ファージから DNA を抽出したのち、制限酵素 *Hind*III によるファージ DNA の制限酵素切断パターンを比較した (Fig. 13)。その結果、小型のプラークを形成するファージ U1 の DNA 制限酵素切断パターンは、大型の類似したプラークを形成するファージ U2 および U3 とは明らかに異

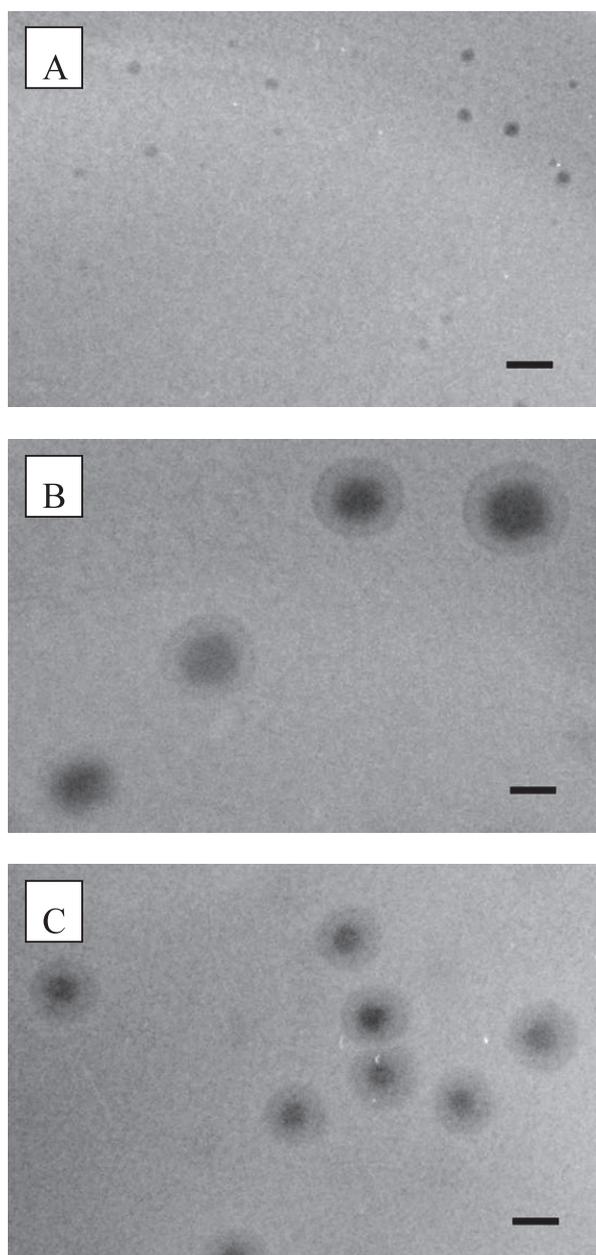


Fig. 12 Plaque morphology of phages.
A : U1, B : U2, C : U3. Scale bars = 1.5 mm.

なっていることが判明した。一方、大型の類似したプラークを形成するが、その分離源が海水および干潟泥土とそれぞれ異なるファージ U2 および U3 では、類似した制限酵素切断パターンを示したが、両者の間にはそれぞれ特異的な DNA 断片も認められ、互いに類縁種であることが明らかとなった。

さらに、分離した3種類のファージを形態学的に分類するために、電子顕微鏡を用いてファージの粒子形状を観察した (Fig. 14)。その結果、小型のプラークを形成するファージ U1 は、直径約 70 nm の正六角形の頭部と長さ約 145 nm の幅広く長い尾部を有していた。一方、大型の類似したプラークを形成するファージ U2 および U3 は類似した形態をしており、いずれも径約 65 × 50 nm の六角形の頭部と長さ約 130 nm の細長い尾部を有していた。

分離したスミノリ病原細菌に感染する3種類のファージの中から、スミノリ病の防除に最も適したファージを選抜するために、分離したファージの宿主特異性、増殖特性、温度安定性および pH 安定性について検討を行った。

分離したファージの宿主特異性の検討では、病原性が認められたスミノリ病原細菌 4 菌株と病原性が認められなかった 6 菌株の計 10 菌株を指示菌として、分離した3種類のファージを交差感染させて行った (Table 7)。その結果、分離した3種類のファージの宿主域は同一であり、これらのファージは、近年のスミノリ病の原因細菌

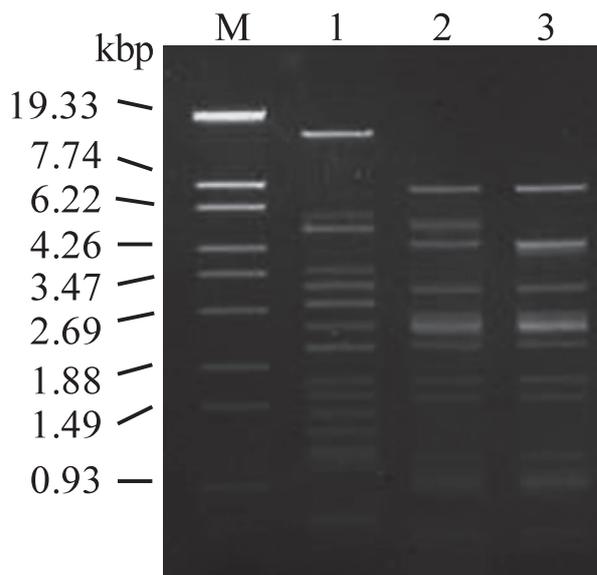


Fig. 13 Agarose gel electrophoresis of *Hind*III-digested phage genomes. Lane M : molecular size marker, Lane 1 : U1, Lane 2 : U2, lane 3 : U3.

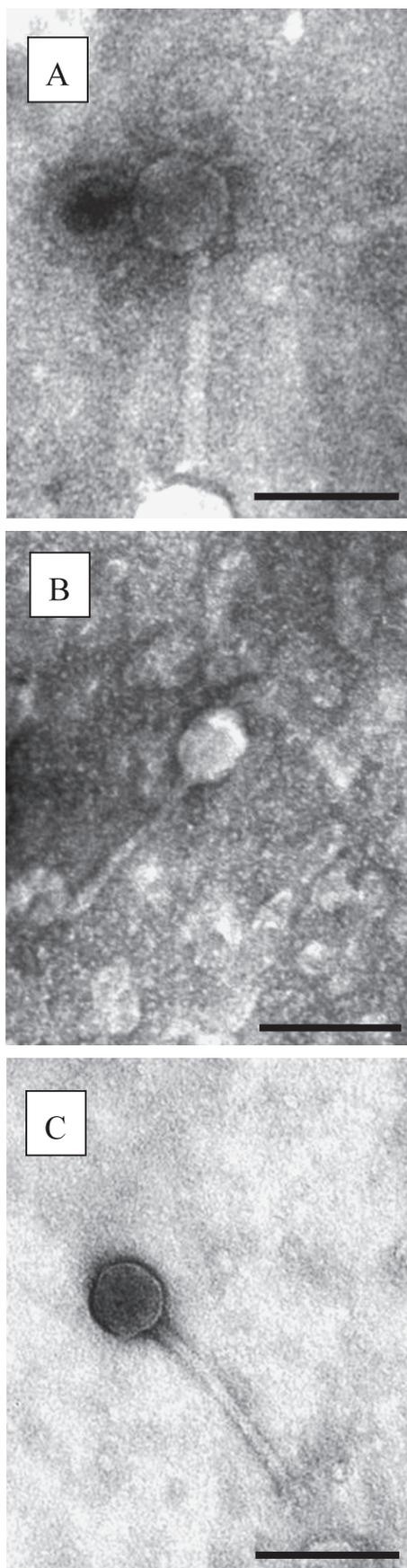


Fig. 14 Electron micrographs of phages. A : U1, B : U2, C : U3. Scale bars = 100 nm.

Table 7 Host specificity of isolated phages.

Strain	Sensitivity to phages		
	U1	U2	U3
DY1219-4Y	-	-	-
NS-5Y	-	-	-
NS-11Y	-	-	-
NS-17Y	-	-	-
KS-4Y	-	-	-
H-14LY	+	+	+
H-15LY	+	+	+
H-16LY	+	+	+
EX-S5Y	-	-	-
H-18OR	-	-	-

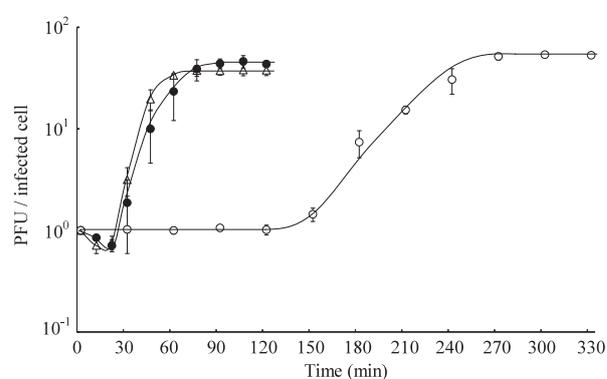


Fig. 15 One-step growth curve of phages.

○ : U1, ● : U2, △ : U3.

Vertical bars show standard deviations (n=3).

である *Gaetbulibacter* sp. H-14LY 株, *Gaetbulibacter* sp. H-15LY 株および *Gaetbulibacter* sp. H-16LY 株の 3 菌株には感染したが, 1985 年に分離されたスミノリ病原細菌である *A. tumbae* DY1219-4Y 株や病原性が認められなかった NS-5Y 株, NS-11Y 株, NS-17Y 株, KS-4Y 株, EX-S5Y 株および H-18OR 株に対する感染は認められなかった。

ファージの感染力は増殖特異性として, 分離した 3 種類のファージの感染細菌あたりのファージ放出量 (burst size) および宿主細菌に感染してから子孫ファージが放出されるまでの時間 (潜伏期) について, 一段増殖実験を行って検討した (Fig. 15)。その結果, ファージ U1, U2, および U3 の感染細胞あたりのファージ放出量はほぼ同じであり, それぞれ 53, 44, および 38 PFU/infected cell であった。しかしながら, ファージが感染してから子孫ファージが放出されるまでの時間である潜伏期では, 小型のプラークを形成するファージ U1 と大型の類似したプラークを形成するファージ U2 および U3

で潜伏期の時間は大きく異なっていた。小型のプラークを形成するファージ U1 では、子孫ファージの放出は細菌感染 120 分後から始まり、その後ファージ放出量は緩やかに上昇して最大となったのに対し、大型の類似したプラークを形成するファージ U2 および U3 では、細菌感染後わずか 30 分で子孫ファージの放出が始まり、その後ファージ放出量は速やかに上昇して最大となった。

分離した 3 種類のファージの温度安定性については、5℃ および 20℃ で保存中のファージ生存率を経時的に測定することで検討した。ファージを 5℃ で保存した場合、3 種類のファージの生存率は 20 週目までは日数の経過とともに緩やかに減少していき、20 週目には開始時の約 30~50% の生存率に低下した。しかしながら、24 週目では、ファージ U1 および U2 の生存率は 20 週目とほぼ同じであったのに対し、ファージ U3 の生存率は開始時の 6% まで急激に減少した (Fig. 16A)。一方、20℃ に

保存した場合には (Fig. 16B)、ファージ U1 および U3 の生存率は日数の経過とともに緩やかに減少していったが、24 週目でも開始時の 20~40% の生存率を維持していた。ところが、分離した 3 種類のファージの中で最も大きいプラークを形成したファージ U2 では、最初の 6 週間までは開始時の 25% の生存率を維持していたものの、その後、生存率はさらに減少していき 24 週目では開始時の 2.7% まで低下することが判明した。

分離した 3 種類のファージの pH 安定性は、所定の pH に調整した ZoBell 2216E 培地にファージを 10 分間浸漬し、浸漬後のファージ生存率を測定することで検討した (Fig. 17)。その結果、弱酸性 (pH 4) ~弱アルカリ性 (pH 8.5) の範囲では、全てのファージの生存率は処理前の 80% 以上と高く維持されることが明らかとなった。しかしながら、強酸性 (pH 3) 状態では、ファージ U1 の生存率は 80% 以上と高かったものの、ファージ

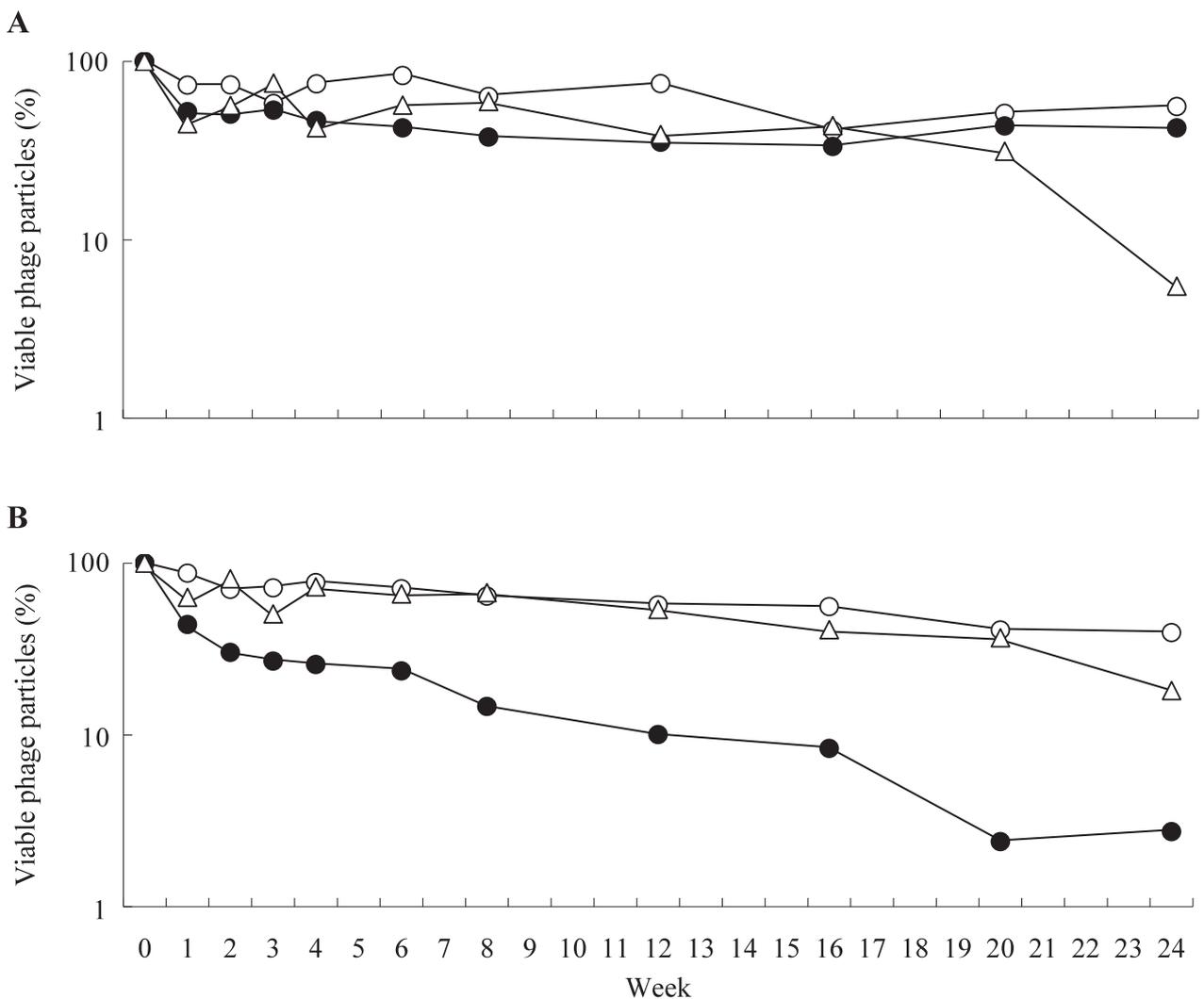


Fig. 16 Stability of phages during storage at 5 °C (A) and 20 °C (B). ○ : U1, ● : U2, △ : U3.

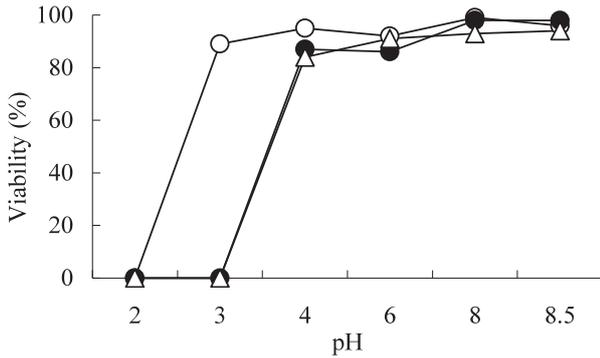


Fig. 17 Effect of pH on viability of phages.
○ : U1, ● : U2, △ : U3.

U2およびU3の生存率は著しく低下し、処理前の0.1%以下となった。さらにpHが下がりpH2の強酸溶液中では、全てのファージは完全に不活化されることが判明した。

考 察

第1章において、スミノリ病原細菌として属が異なる複数種の細菌が存在することが明らかとなったことから、ファージを利用して本病の防除を行うためにはファージの宿主となるスミノリ病原細菌を選択する必要がある。しかしながら、現在のところ有明海佐賀県海域で近年発生している本病は毎年行う発病調査の結果で、全て*Gaetbulibacter*属細菌によって引き起こされていることが明らかにされている（佐賀県有明水産振興センター：未発表）。そこで本研究では、分離された*Gaetbulibacter*属細菌のうちで最も高い病原性が認められたスミノリ病原細菌*Gaetbulibacter* sp. H-14LY株をファージの宿主細菌として選択し、本菌株に感染するファージの検索を行った。

その結果、有明海の海水および干潟泥土から本菌株に感染する3種類のファージ（U1, U2, およびU3）を分離することができた。さらに、それらの形成するプラークの形態から、大型のプラークを形成するファージU2およびU3は近縁な種であり、小型のプラークを形成するファージU1はこれらのファージとは別種であることが推察された。そこで、分離したファージのDNAを抽出してその制限酵素消化パターンを比較することで遺伝学的な性状を検討した。その結果、大型のプラークを形成したファージU2およびU3では、消化パターン内に互いに特異的なDNAの酵素消化断片が数箇所認められるものの、極めて類似したパターンを示したことから両

者は遺伝的に近縁関係にあるが、小型のプラークを形成したファージU1は前者とは明らかに異なる種であることが判明し、半閉鎖系の有明海において、同一のスミノリ病原細菌に感染可能なファージが複数種存在することが強く示唆された。さらに、分離した3種類のファージが制限酵素で消化可能であることから、すべて2本鎖DNAを持つことが強く示唆されたことで、これらを国際ウイルス分類命名委員会の分類基準⁵⁵⁾に従い、電子顕微鏡による形態観察を行うことで分類を試みた。その結果、分離した全てのファージは尾部つきファージであることから*Caudovirales*目に属し、さらに、小型のプラークを形成するファージU1では尾部が幅広いことから*Myoviridae*科、大型のプラークを形成するファージU2およびU3では尾部が細長いことから*Siphoviridae*科にそれぞれ分類されることが推察された。

ファージは宿主細菌を厳密に認識して感染するため、その感染は菌種特異的というよりも菌株特異的であるといわれている⁵⁶⁾。ところで、近年のスミノリ病の原因細菌である*Gaetbulibacter*属細菌は、本研究でファージ宿主細菌として用いた*Gaetbulibacter* sp. H-14LY株以外にも2株分離されている。そこで、これらの*Gaetbulibacter*属細菌2株に対しても今回分離したファージが感染可能かどうかを明らかにしておく必要があった。そこで、スミノリ病原細菌としてこれまでに分離されている*Gaetbulibacter*属細菌3株に対する分離ファージの感染性について調べた結果、分離した3種類のファージは近年のスミノリ病原細菌である*Gaetbulibacter*属細菌3株の全てに感染可能であることが明らかとなった。

ところで、海洋性細菌を宿主とするファージの中には宿主特異性が低く、異なる種の細菌にさえ感染するものも存在することが報告されている^{57,58)}。本病の防除にファージを利用する場合、海洋の生態系維持を考慮すると、利用するファージが目的とするスミノリ病原細菌種以外の細菌に感染しないことが要求される。そこで、分離したファージの*Gaetbulibacter*属細菌以外のスミノリ病原細菌種や病原性が認められなかった細菌の計7菌株に対する感染性について検討したところ、分離した3種類のファージは、近年のスミノリ病原細菌である*Gaetbulibacter*属細菌以外の細菌には感染しないことが明らかとなり、比較的高い宿主特異性を有することが推察された。

スミノリ病原細菌に対するファージの感染力の強さは、ファージを利用したスミノリ病防除法の成否に関わる最も重要な因子の1つと考えられる。そこで、ファー

ジの一段増殖実験および形成するプラークの形態から分離した3種類のファージの感染力について検討した結果、ファージU2は短い潜伏期および大きいバーストサイズを有し、かつ、形成するプラークも大きいことから、分離した3種類のファージのうち、ファージU2がスミノリ病原細菌に対して最も強い感染力を有することが推察された。さらに、ファージU2の潜伏期は約30分であり、これまでに一段増殖実験が報告されたニジマス *Oncorhynchus mykiss* の病原細菌 *Flavobacterium psychrophilum* に感染するファージの潜伏期(4~6時間)と比較すると⁵⁹⁾、ファージU2の潜伏期はかなり短いことが明らかとなった。

本病の防除に利用するファージを安定的に保存するためには、その保存温度が重要になる。そこで、分離した3種類のファージの温度安定性について検討した結果、分離した全てのファージは5℃で約半年間は十分な感染力を維持できることが明らかとなり、このことから、これらのファージが利用時まで低温下であればノリ養殖期間を通じて長期間保存可能であることが強く示唆された。しかしながら、ファージが環境に与える影響を考慮した場合、利用するファージが環境中に長期間残存することは、特に半閉鎖的である有明海では、好ましくない事態の予期せぬ発生も考えられる。今回分離した3種類のファージのうち、ノリ養殖期間の水温に近い20℃では、スミノリ病原細菌に感染性の比較的高いファージU2のみが限られた期間しか活性を維持できないことから、分離したファージの中で、ファージU2が最も環境中に残存せずスミノリ病の防除に適しているものと推察された。

スミノリ病原細菌は強酸溶液中では生育できないことから、ノリ養殖では現在、スミノリ病対策としてpH2程度の強酸溶液でノリ葉体に感染しているスミノリ病原細菌を除去するノリ網の酸処理が行われている。しかしながら、一般的に、ファージは酸に弱いことが知られているため⁶⁰⁻⁶³⁾、ノリ網の酸処理はスミノリ病原細菌に感染するファージにも影響を及ぼす可能性が考えられた。そこで、分離した3種類のファージのpH安定性について調べた結果、本病の防除対策として行われているノリ網の酸処理はスミノリ病原細菌に感染するファージを完全に不活化することが推測され、スミノリ病防除にファージを用いる場合は、その実施に際し新たな方法を考案すべきものと考察された。

以上の結果から、本研究で分離したスミノリ病原細菌に感染する3種類のファージのうち、スミノリ病の防除

に最も適したファージは、宿主であるスミノリ病原細菌に対して高い感染力を持ちながら環境中に長期間残留しないファージU2であることが示唆された。

第4章 病原細菌感染性ファージを用いた海苔スミノリ病防除法の開発

ノリ養殖では、ノリ葉体に細菌が感染することにより発病するとされるスミノリ病がしばしば発生しており、その生産に多大な被害を及ぼしている。本病に対する防除対策としては、「高水位養殖」^{6,7,9)}や「養殖ノリ網の酸処理」¹⁰⁻¹²⁾などの方法が挙げられる。高水位養殖はノリ網を空中に干しあげ、乾燥や紫外線の効果によりノリ葉体に付着する細菌を除去する方法であるが、本法では本病が一度発生してしまうと被害の拡大を防ぐことが困難であることから⁴⁾、今日では、強酸性の有機酸溶液にノリ網を漬けこむことでノリ葉体に付着する細菌を除去する酸処理が優先的に行われているのが現状である。

また、本病の被害を防ぐためには本病の発生予察が重要となるが、未だに本病の正確な発生予察方法は確立されていない状況である。このため、有明海佐賀県海域では、本病が冷凍網養殖期の開始直後に発生しやすいことが経験的に知られていることから、スミノリ病原細菌の存在の有無にかかわらず、本病の被害を防ぐために冷凍保存ノリ網を漁場に張り込んだ直後に予防的にノリ網の酸処理を行っているのが現状であり、このため酸処理剤の使用量が年々増加傾向にある。一方、酸処理剤は環境に負荷を与える可能性が指摘されており¹⁵⁾、近年では酸処理剤の再利用など、その使用量削減の要請が各方面から強くなされるようになってきた。また、酸処理を繰り返し行くと、酸耐性のスミノリ病原細菌が出現してくることが室内試験において確認されていることから⁴⁾、化学的防除法としての酸処理に代わる効果的で環境にやさしい新たなスミノリ病防除方法の開発が強く求められてきている。

ところで、水産増養殖分野では近年、細菌ウイルスであるバクテリオファージを利用して、病原細菌数を減少させることで細菌感染症を防除する、いわゆるファージ療法に対する関心が高まってきている。この理由として、これまで防除の主流であった抗生物質処理などの化学的防除法において、薬剤耐性菌の出現や環境汚染などの問題発生が懸念されるようになってきたことが挙げられ、ファージ療法がこれまでの化学的防除法に代わる新たな細菌感染防除法として注目されている⁶⁴⁻⁶⁶⁾。特に魚介類養殖では、ファージを利用した細菌感染症防除を

目的として、養殖環境中から病原細菌に感染するファージの分離が活発に試みられてきており、これまでにアユ *Plecoglossus altivelis*⁶⁷⁾、ウシエビ *Penaeus monodon*⁶⁸⁾、ウナギ *A. japonica*⁶⁹⁾、エゾアワビ *Haliotis discus hannai*⁷⁰⁾、カワマス *Salvelinus fontinalis*⁷¹⁾、ヒラメ *P. olivaceus*^{72,73)}、およびブリ *Seriola quinqueradiata*^{74,75)}などの産業上重要な魚介類の病原細菌に感染するファージが分離されている。

また、分離された魚類の病原細菌に感染するファージを利用して、実際に、魚類の細菌感染症に対するファージの感染防除実験が多く試みられるようになってきており、一部の魚種では、実験的ではあるものの、ファージの感染防除効果が認められている。アユの細菌性出血性腹水病では、病原細菌を含んだ餌をアユに与えた直後にファージを含んだ餌を与えたところ、ファージを与えたアユでは死亡率の低下が認められ、その死亡率低下は、細菌を与えた24時間後にファージを与えた場合でも認められている⁷⁶⁾。また、ブリの連鎖球菌症では、病原細菌を注射したブリに0, 1, および24時間後にファージを注射した場合、ファージを注射していないブリではその90%が死亡したのに対し、ファージを注射したブリの死亡率は、感染0時間後のファージ液注射で0%, 1時間後のファージ液注射で20%, および24時間後のファージ液注射で50%となり、ファージ処理により明らかに死亡率が低下したことが報告されている⁶¹⁾。さらに、ヒラメのβ溶血性連鎖球菌症では、病原細菌をヒラメに注射した12および24時間後にファージを注射したところ、ファージを注射していない対照区のヒラメの生存率が5%であったのに対し、感染12および24時間後にファージを注射した区のヒラメの生存率はそれぞれ45%および33%と、いずれも対照区のそれよりも有意に高くなるとの報告もなされている⁷³⁾。

このように、実験室レベルではファージによる魚類の細菌感染症の防除効果が確認されてはいるが、これまでのところファージを利用した魚類の細菌感染症防除が実用化された例はない。一方、ファージを利用した細菌感染症防除に関して、水産増殖分野よりも研究が進んでいる農業分野においても、ファージを利用した細菌感染症の防除が実用化された例はほとんどなく、トマト斑点細菌病に対してファージによる防除が米国で実用化されているのみである⁷⁷⁾。このようなファージ利用による細菌感染症防除が実用化されていない原因としては、ファージを投与しても宿主細菌に感染する以前に、様々な環境要因によりファージが不活化することが考えられ

ており、現在では、ファージ処理の実用化に向けた効率的な保存および実施方法が検討されている。

本章では、スミノリ病原細菌感染ファージを利用した海苔スミノリ病防除法確立のために、第3章で選抜したスミノリ病の防除に最も適したファージを用いて、スミノリ病原細菌に人為的に感染させたノリ葉体に対してファージ処理による感染防除効果について検討した。さらに、ノリ養殖現場でのファージを利用したスミノリ病防除法の実用化を目的として、ノリ養殖現場でのファージ処理方法について検討するとともに、そのファージ処理の効果について、スミノリ病防除法として現在最も有効とされている酸処理と比較検討を行った。

材料および方法

供試菌株

近年分離されたスミノリ病の原因細菌のうち、最も病原性の高い菌株であるスミノリ病原細菌 *Gaetbulibacter* sp. H-14LY 株を試験に用いた。

供試ファージ株

スミノリ病原細菌 *Gaetbulibacter* sp. H-14LY 株に対して最も強い感染力を有し、第3章で述べたように環境保全にも有効とされるファージU2を使用した。ファージ液の調製は第3章と同様の方法を用いて行った。

供試ノリ葉体株

スサビノリ *P. yezoensis* の養殖品種 S-5-0 を使用した。

ファージによるスミノリ病原細菌の溶菌試験

ZoBell 2216E 培地 10 mL に1次培養したスミノリ病原細菌を濁度 (OD₆₆₀) が約 0.1 となるように接種し、20℃で振とう培養した。可視分光光度計 SPECTRONIC 20D+を用いて培養液の濁度 (OD₆₆₀) を1時間毎に測定し、培養液の濁度 (OD₆₆₀) が約 0.3 に達した培養6時間後にファージ液を接種した。ファージ液の接種濃度は、細菌あたりのファージ感染度 (MOI) で 0.01, 0.1, および 1 とした。対照には、ファージ液の代わりに ZoBell 2216E 培地を加えた。接種後、同条件で継続して培養し、培養液の濁度 (OD₆₆₀) を測定した。

ファージによるスミノリ病の感染防除試験

-20℃で冷凍保存していたノリ葉体を解凍したのち、

切断して葉片 (10 × 4 mm) にし、切断した葉片に対し第 1 章と同様の方法で抗生物質処理することで葉体上の付着細菌を除菌した。抗生物質処理した葉片は滅菌海水で 2 回洗浄したのち、改変 SWM-III を添加した滅菌海水 200 mL を分注したフラスコに葉片 24 枚を入れ、水温 14 °C、光強度 40 μmol/m²/sec、10 時間明期：14 時間暗期の条件下で振とう培養した。

スミノリ病原細菌は ZoBell 2216E 寒天培地の斜面上で 20 °C、約 48 時間培養したのち、滅菌海水に懸濁させた。抗生物質処理を行ったノリ葉片が入ったフラスコに、スミノリ病原細菌を終濃度が 1.6 × 10⁷ CFU/mL となるように接種し、接種直後または 24 時間後にファージ液を終濃度が 2.0 × 10⁷ PFU/mL となるように接種した。対照には、ファージ液の代わりに ZoBell 2216E 培地を添加した。スミノリ病原細菌接種後、上記の培養条件下でノリ葉片を 7 日間培養し、発症の程度を第 1 章で述べたとおり原形質吐出率を算出することで求めた。

スミノリ病原細菌が感染した冷凍ノリ葉体の調製

室内採苗したノリ幼芽を、改変 SWM-III を添加した塩分 31.9 の海水中で水温 18 °C、光強度 90 μmol/m²/sec、12 時間明期：12 時間暗期の条件下で通気培養し、葉長 5 cm 前後まで生長させた。このノリ葉体に対し第 1 章と同様な方法で抗生物質処理を行ったのち、これらを改変 SWM-III を添加した滅菌海水 350 mL を分注したフラスコに入れた。次に、スミノリ病原細菌を終濃度が 4.6 × 10⁷ CFU/mL となるようにノリ葉体が入ったフラスコに接種し、水温 14 °C、光強度 40 μmol/m²/sec、10 時間明期：14 時間暗期の条件下で約 24 時間培養することで、ノリ葉体をスミノリ病原細菌に感染させた。感染後、実用されている冷凍網期用のノリ葉体の調製法に準じて、このスミノリ病原細菌感染ノリ葉体を水分含量 40 % まで乾燥させたのち、供試するまで -20 °C で冷凍保存した。

スミノリ病原細菌感染冷凍ノリ葉体に対するファージ処理および酸処理試験

冷凍保存していたスミノリ病原細菌感染ノリ葉体を解凍したのち、切断して葉片 (10 × 5 mm) にした。ファージ処理ではこの切断ノリ葉片に対して、4.4 × 10⁹ PFU/mL のファージ液に 10 分間浸漬した。また、酸処理では pH 2.2 に調整した酸処理剤 (グローゲン、第一製網) に 3 分間浸漬して行った。対照のノリ葉片は、ファージ液および酸処理剤の代わりに滅菌海水に 10 分

間浸漬した。各処理を行ったノリ葉片を改変 SWM-III を添加した滅菌海水 150 mL を分注したフラスコにそれぞれ 30 枚入れ、水温 14 °C、光強度 40 μmol/m²/sec、10 時間明期：14 時間暗期の条件下で 7 日間振とう培養した。発症の程度は第 1 章で述べたとおり原形質吐出率を算出して求めた。ノリ葉体からのスミノリ病原細菌の検索は第 2 章で述べたように *Gaetbulibacter* sp. H-14LY 株の抗血清を使用した凝集反応試験を用いて行った。ノリ葉体からのファージの検索は以下の方法で行った。ノリ葉体からのスミノリ病原細菌の検索に使用したノリ葉体摩砕液の一部を遠心分離 (20,000 × g, 10 分, 15 °C) し、その上清をフィルターで濾過したものを試料とした。寒天重層法によりプラークを形成させ、試料中のファージ数を計数した。ノリ葉体の生長は葉長で表し、葉長はノギス (CD-15PSX, ミットヨ) を用いて測定した。

結 果

ファージ U2 によるスミノリ病原細菌 *Gaetbulibacter* sp. H-14LY 株に対する増殖抑制効果を培養細菌あたりのファージ感染度 (MOI) が 0.01, 0.1, および 1 となるようにファージ U2 を接種し、接種後の培養液の濁度 (OD₆₆₀) を測定することで検討した (Fig. 18)。その結果、ファージを接種していない対照区の培養液の濁度 (OD₆₆₀) は時間の経過とともに上昇していき、培養 30 時間後の培養液の濁度 (OD₆₆₀) は 1.565 となった。一方、ファージを接種した区では、ファージ接種後に培養液の顕著な濁度 (OD₆₆₀) 低下が観察された。細菌あたりのファージ感染度 (MOI) が 0.01, 0.1, および 1 の濃度でファージを接種した区では、それぞれ接種後 3, 2,

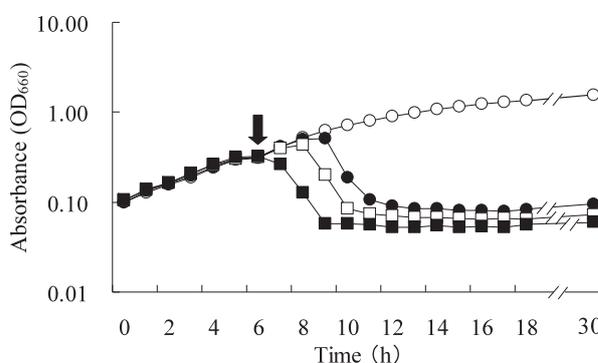


Fig. 18 Growth inhibition of *Gaetbulibacter* sp. strain H-14LY by phage U2 at different MOI. ○ : control (no phages), ● : MOI = 0.01, □ : MOI = 0.1, ■ : MOI = 1. Arrow indicates the time of phage inoculation.

および0時間から培養液の濁度 (OD₆₆₀) 低下が認められた。さらに、ファージ接種24時間後にあたる培養30時間後の菌体培養液の濁度 (OD₆₆₀) はファージを接種していない対照区よりも明らかに低下し、それぞれの感染度区で0.095, 0.073, および0.060とほぼ同様な値を示した。

本菌株の培養液中にファージを接種することで培養液の濁度 (OD₆₆₀) が低下したことから、ファージによるスミノリ病原細菌の感染防除効果が期待された。また、細菌あたりのファージ感染度 (MOI) が1となるようにファージを接種した区では、接種直後から培養液の濁度 (OD₆₆₀) が低下し始めたことから、ファージによるスミノリ病原細菌の感染防除を効果的に行うためには、細菌あたりのファージ感染度 (MOI) が1以上となるようにファージを接種すればよいことが考えられた。

そこで、ノリ葉体を培養しているフラスコにスミノリ病原細菌 *Gaetbulibacter* sp. H-14LY 株を接種した直後に、細菌あたりのファージ感染度 (MOI) が約1となるようにファージU2を接種し、ノリ葉体の原形質吐出率 (Fig. 19) を観察することで、ファージによるスミノリ病原細菌の感染予防効果について検討した。その結果、スミノリ病原細菌接種直後にファージ処理を行ったノリ葉体細胞では、培養7日目にノリ葉体細胞で0.4%の原形質吐出が観察されたに過ぎなかったが、ファージ処理を行っていないノリ葉体では、培養3日目からノリ葉体細胞の原形質吐出が観察され始め、培養7日目にはノリ葉体細胞の激しい原形質吐出が観察され、その吐出率は12.2%に達した (Fig. 20A)。

さらに、ファージによるスミノリ病原細菌の感染予防効果が認められたことから、ファージによるスミノリ病の発病抑制効果についても検討を行った。ノリ葉体を培養しているフラスコに、スミノリ病原細菌 *Gaetbulibacter* sp. H-14LY 株を接種して24時間後にファージU2を接種し、ノリ葉体の発症の程度を観察した結果、スミノリ病原細菌接種24時間後にファージ処理を行ったノリ葉体細胞では、スミノリ病原細菌接種直後にファージ処理した場合と同様に本病の発病抑制効果が認められ、培養7日目のノリ葉体細胞の原形質吐出率は1%とファージ処理を行っていないノリ葉体細胞のそれと比較して明らかに低下していた (Fig. 20B)。以上のように、スミノリ病原細菌の正常ノリ葉体感染実験に対するファージ添加による本病の感染予防と発病抑制試験では、明らかに本病の発症が抑制されたことから、ファージ処理によるスミノリ病防除効果が期待され、ノリ養殖

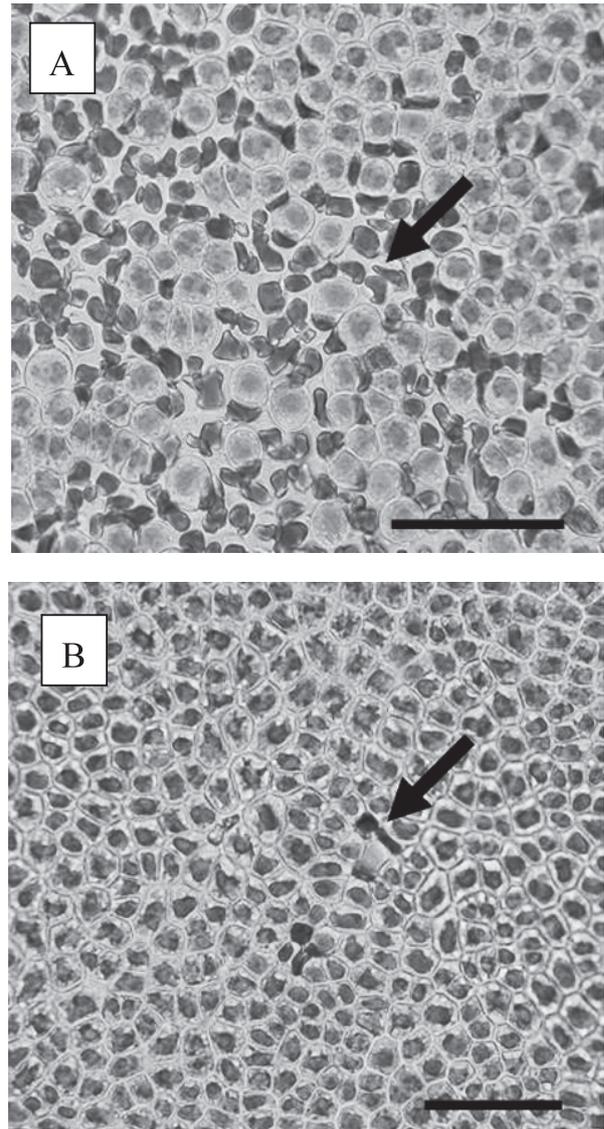


Fig. 19 Effect of phage U2 treatment on the suminori-diseased laver thalli caused by *Gaetbulibacter* sp. strain H-14LY. A : control thalli, B : phage-treated thalli. Arrows show the plasmolysis of laver thalli cells. Scale bars = 60 μ m.

現場へのファージ処理の応用実施の可能性が強く示唆された。

さらに、第2章で明らかにしたように、実用されている冷凍網期のノリ葉体にはかなりの濃度でスミノリ病原細菌が付着し、感染している可能性もある。そこで、ファージ利用によるスミノリ病発生防除の実現を目的として、スミノリ病罹患ノリ葉体を調製してファージ処理を行い、その発病防止効果をスミノリ病対策として現在最も有効とされる酸処理のそれと比較検討した。その結果、無処理のスミノリ病罹患ノリ葉体ではノリ葉体細胞の原形質吐出が培養5日目から観察され始め、培養7日

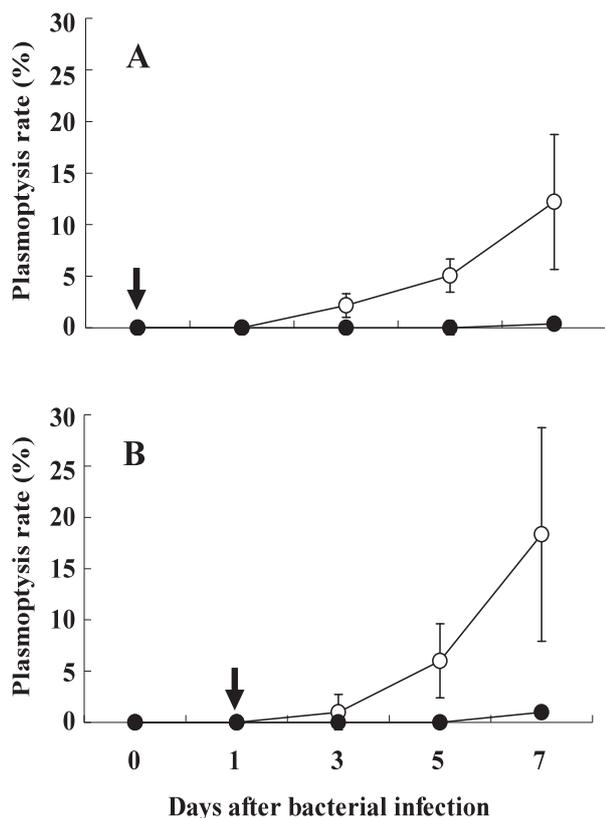


Fig. 20 Effect of phage U2 treatment against bacterial infection with the suminori pathogenic bacterium, *Gaetbulibacter* sp. strain H-14LY in the laver thalli. Laver thalli were treated with the phage (A) immediately and (B) 24 h after bacterial infection. ○ : control thalli, ● : phage-treated thalli. Arrows indicate the time of phage treatment. Vertical bars show standard deviations (n=3).

目のノリ葉体細胞の原形質吐出率は約3%となったが、ファージ処理および酸処理を行ったノリ葉体では試験期間を通してノリ葉体細胞の原形質吐出が全く観察されず、ファージ処理は現行の酸処理と同様にスミノリ病の発生防止効果を有することが判明した (Fig. 21)。一方、酸処理を行ったノリ葉体ではノリ葉体細胞の原形質吐出は認められなかったものの、ファージ処理では認められなかった傷害を受けた細胞が一部観察された (Fig. 22)。

さらに、各処理を行ったノリ葉体上の本菌株の生育について調べた結果、ファージ処理および酸処理を行ったノリ葉体上の本菌株の菌数はいずれも培養日数の経過とともに減少していくことが明らかとなった (Fig. 23)。しかしながら、ノリ葉体上から本菌株が検出不能となった時期は、ファージ処理を行ったノリ葉体では培養7日目となったのに対して、酸処理を行ったノリ葉体では培養1日目にすでに検出不能の状態となることが判明し、

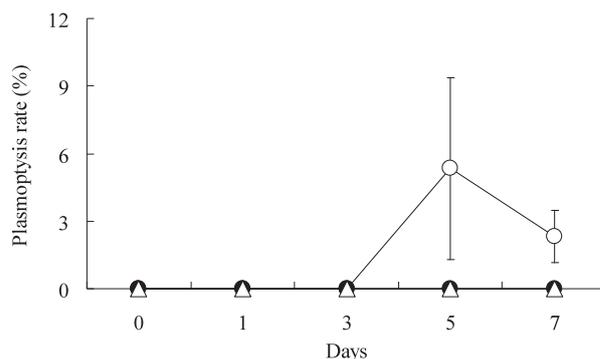


Fig. 21 Effect of two kinds of treatment against bacterial infection with the suminori pathogenic bacterium, *Gaetbulibacter* sp. strain H-14LY in the laver thalli. ○ : no treatment, ● : acid treatment, △ : phage treatment. Vertical bars show standard deviations (n=3-5).

ファージ処理ではスミノリ病原細菌は酸処理の場合とは異なり、比較的穏やかに死滅・減少してゆくことが明らかとなった。なお、対照区である無処理のノリ葉体上での本菌株の菌数は試験期間を通して $10^8 \sim 10^9$ CFU/g の範囲を推移した。また、培養7日目のファージ処理ノリ葉体から残存する本菌株感染ファージの検索を行った結果、ノリ葉体から 2.0×10^6 PFU/g の本菌株感染ファージが検出された。さらに、各処理を行ったノリ葉体の生長について調べた結果、全ての処理ノリ葉体の葉長は培養3日目までは同程度であったが、培養3日目以降のファージ処理したノリ葉体の葉長は、酸処理を行ったノリ葉体および無処理のものと比較して、より大きくなる傾向が認められた (Fig. 24)。培養7日目におけるファージ処理を行ったノリ葉体、酸処理を行ったノリ葉体および無処理のノリ葉体の葉長はそれぞれ 17.7, 14.8, および 15.7 mm であり、ファージ処理を行ったノリ葉体では酸処理を行ったノリ葉体および無処理のノリ葉体よりも有意に生長することが判明した (Tukey-Kramer test, $P < 0.05$)。

考 察

ファージを利用したスミノリ病の防除を効果的に行うためには、スミノリ病原細菌に対するファージの感染度 (MOI) は重要となる。そこで、ファージ感染度 (MOI) の違いによるスミノリ病原細菌の溶菌効果について検討した。その結果、ファージ U2 をファージ感染度 (MOI) が 1 となるようにスミノリ病原細菌に感染させた場合、スミノリ病原細菌は増殖することなく、ファージ感染により直ちに溶菌されていくことが明らかとなった。この

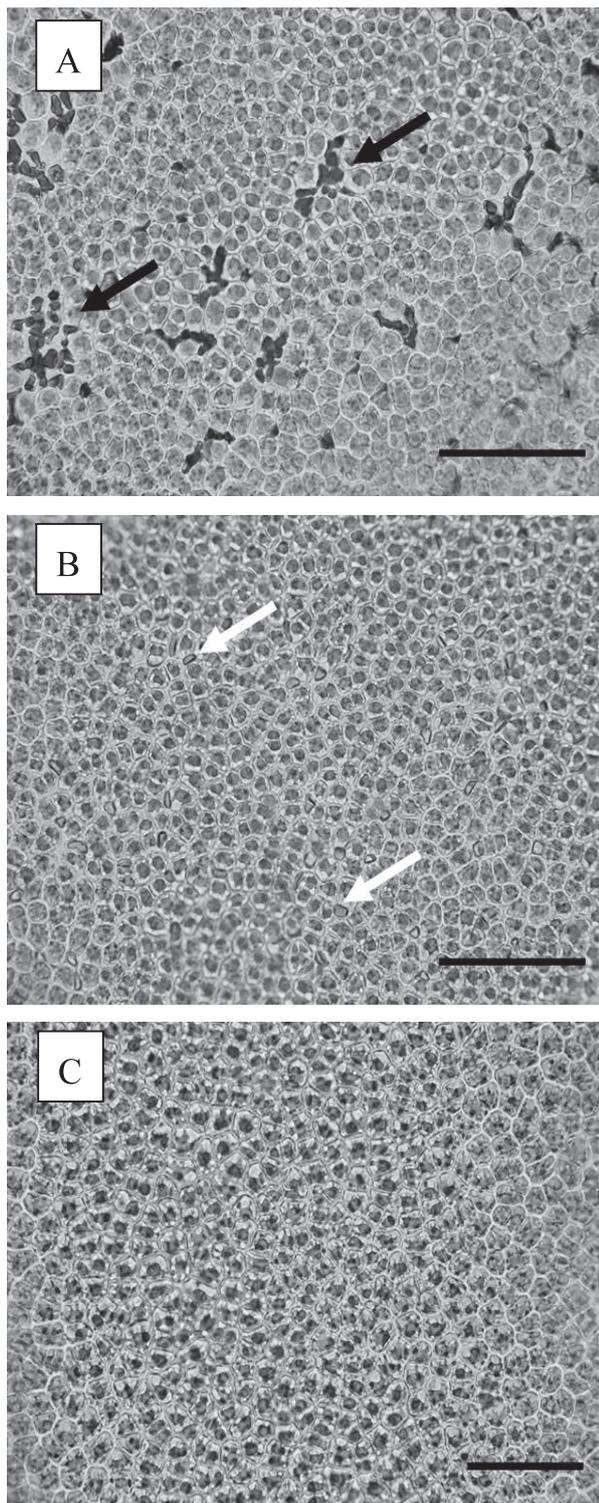


Fig. 22 Effect of two kinds of treatment on the suminori-diseased laver thalli caused by *Gaetbulibacter* sp. strain H-14LY. A : no treatment, B : acid treatment, C : phage treatment. Black and white arrows show the plasmoptysis and injury of laver thalli cells, respectively. Scale bars = 100 μ m.

ことから、ファージを利用したスミノリ病防除を効果的に行うためには、ファージ感染度 (MOI) が1以上とな

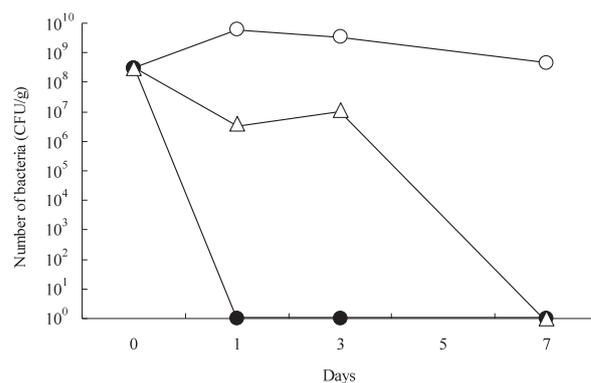


Fig. 23 Effect of two kinds of treatment on the growth of *Gaetbulibacter* sp. strain H-14LY on the laver thalli. ○ : no treatment, ● : acid treatment, △ : phage treatment.

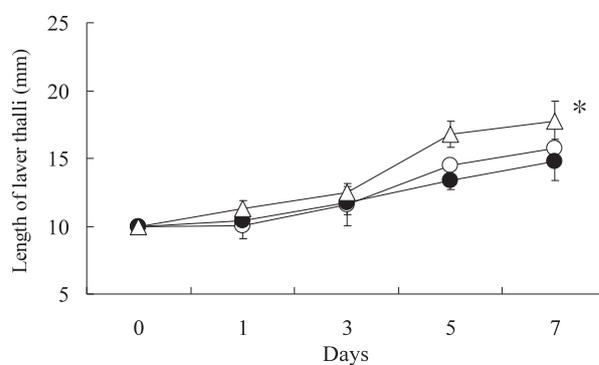


Fig. 24 Effect of two kinds of treatment on the growth of the laver thalli infected with *Gaetbulibacter* sp. strain H-14LY. ○ : no treatment, ● : acid treatment, △ : phage treatment. Vertical bars show standard deviations (n=3-5). The asterisk indicates a statistically significant difference between phage treatment and the other treatments (Tukey-Kramer test, $P < 0.05$).

るようにスミノリ病原細菌に対してファージ U2 を感染させれば効果的であることが推察された。さらに、ファージ感染度 (MOI) が 0.01 と極めて低い濃度でもファージ接種 24 時間後には、ファージ U2 によるスミノリ病原細菌の溶菌効果がファージ感染度 (MOI) が 1 の場合と同様に認められた。このことは、ファージ耐性菌が容易に出現しにくいことを示唆しており、ファージを利用したスミノリ病の防除を実施するにあたり重要な点になると考えられる。以上の結果から、ファージによるスミノリ病の微生物学的防除の可能性が強く示唆された。

さらに、正常ノリ葉体を用いて人為的にスミノリ病原細菌に感染させ、ファージによる本病の感染防除効果について検討した。その結果、スミノリ病原細菌接種直後

にファージ処理を行った場合、ファージ処理を行ったノリ葉体では本病の発生が明らかに抑制された。このことは、スミノリ病原細菌がノリ養殖環境中にすでに存在していたとしても、ファージ処理を行うことによりスミノリ病原細菌のノリ葉体への感染を防止できることを示唆している。また、正常ノリ葉体にスミノリ病原細菌を24時間感染させた後にファージ処理を行った場合でもスミノリ病の発生が抑制されたことから、ノリ養殖漁場においてスミノリ病原細菌感染がある程度進んだ段階のノリ葉体でも、ファージ処理を行うことによりスミノリ病の発病が抑制されることが期待された。

ファージ処理には、スミノリ病原細菌感染を防止するだけでなく、スミノリ病の発病を抑制する効果も認められたことから、ファージ処理は、養殖ノリのスミノリ病の新たな防除方法として有望視された。しかしながら、養殖ノリのスミノリ病の新たな防除対策として、ファージ処理をノリ養殖現場に応用するためには、効果的なファージ処理方法について検討しておく必要がある。

現在、強酸性の酸処理剤が入った容器にノリ網を浸漬してノリ葉体に付着するスミノリ病原細菌を除去する酸処理が行われているが、ノリ養殖現場でのファージ処理方法としては、酸処理剤の代わりにファージ液を入れて、この中にノリ網を浸漬する方法が最も簡便に実施できるものと考えられる。一方、ファージ処理法では、その効果をあげるためにファージの宿主となるスミノリ病原細菌がノリ葉体に感染している必要がある。ノリ葉体にあらかじめスミノリ病原細菌が付着していなければ、ファージ感染によるファージ粒子の増幅が起こらず、長期的な防除効果が期待できないことが懸念された。しかしながら、第2章で明らかにしたように、冷凍網期に使用するノリ葉体では、その調製時期である秋芽網期にすでに比較的高濃度のスミノリ病原細菌の付着が認められ、付着したスミノリ病原細菌はノリ葉体の冷凍期間中も死滅せず生存することから、冷凍網期の養殖開始直後のノリ葉体にファージ処理を実施した場合、ファージは葉体に付着したスミノリ病原細菌に感染することで増殖し、防除効果が加速されてゆくことが推察された。

そこで、このような状態におけるファージ処理方法の有効性を検討するために、まず、冷凍網期のノリ葉体に近い状態のノリ葉体を人為的にスミノリ病原細菌に感染させ冷凍することで調製した。この処理ノリ葉体を解凍し、ファージ液に浸漬したのちに培養した結果、ファージ処理を行うことによってノリ葉体上のスミノリ病原細菌数が減少し、発病が阻止されることが明らかとなった。

また、ファージ処理を行ったノリ葉体では、ノリ葉体からスミノリ病原細菌が検出できなくなった後でも、ノリ葉体上にファージが比較的高い濃度で存在していた。このことから、スミノリ病原細菌がノリ葉体に新たに感染した場合でも、ノリ葉体上のファージによりスミノリ病原細菌の増殖は抑制され、ファージ処理による本病の発病阻止効果は一定期間維持されることが強く示唆された。

ファージを利用した本病の防除を実用化するためには、ノリ葉体に対するファージの安全性について確認しておく必要がある。ファージ処理を行ってもノリ葉体細胞が枯死しないことはファージによる本病の感染防除実験から明らかであったが、ノリ葉体の生長に及ぼすファージの影響については不明であった。そこで、ノリ葉体の生長に及ぼすファージ処理の効果について調べた結果、ファージ処理を行ったノリ葉体では、ファージ処理を行っていないノリ葉体よりも高い生長を示すことが明らかとなった。この結果から、ファージ処理を行っていないノリ葉体と比較する限りでは、ファージ処理はノリ葉体の生長に悪影響を及ぼさないことが推察された。

さらに、有明海佐賀県海域では本病が冷凍網養殖期の初期に発生しやすいことから、冷凍養殖ノリ網を漁場に張り出した直後から酸処理が実施され、このことで現在のところ本病の被害を防ぐことに成功している。そこで、現在行われている酸処理の本病防除効果とファージ処理の防除効果について比較を行った。その結果、ノリ葉体上のスミノリ病原細菌数を減少させ、発病を阻止する効果はファージ処理および酸処理にも同様に認められたが、ファージ処理よりも酸処理の方がノリ葉体上のスミノリ病原細菌数をより速やかに減少させることが明らかとなった。しかしながら、酸処理したノリ葉体の生長はファージ処理したノリ葉体と比較して劣ることも判明した。この原因としては、酸処理によるノリ葉体細胞の傷害が関係していることが推察された。

以上の結果から、ファージを利用した海苔スミノリ病の防除法確立の可能性が強く示唆された。また、スミノリ病の防除法として現在最も有効であるとされる酸処理と比較しても、スミノリ病の防除にファージを利用することの欠点は認められず、むしろ、ノリ葉体の生長に関しては酸処理よりもファージ処理の方が好ましいことが強く示唆された。このため、スミノリ病の発生を防ぐと同時に、ノリ養殖期間を通して最も高品質で高価な冷凍網養殖初期の乾ノリ製品の生産量を増加させるためには、酸処理よりもファージ処理を行うことが適している

と考えられ、ノリ養殖現場でのファージ処理の早期実用化が期待される。

総 括

近年、ノリ養殖では、細菌感染症であるスミノリ病が冷凍養殖網期にしばしば発生し、その生産に多大な被害を及ぼしている。本病の発生にはスミノリ病原細菌の感染が主に関与していると考えられているが、スミノリ病原細菌感染以外の要因も関与していることが経験的に知られている。このことから、本病の被害を防ぐためには、スミノリ病原細菌以外の発生要因について明らかにしておくことが必要である。また、スミノリ病の防除対策として、pH 2 程度の強酸溶液にノリ網を浸漬する酸処理が現在最も行われているが、近年、酸処理が環境や生物に及ぼす影響が懸念されており、酸処理に代わる効果的で環境負荷の少ないスミノリ病防除方法の新たな開発が強く求められている。本研究では、スミノリ病の発生要因を解析するとともに、効果的かつ環境にやさしいスミノリ病防除法として、バクテリオファージを用いた海苔スミノリ病防除法の開発を目的とした。

本病ノリ葉体から、1985年から2004年にかけて分離・保存されていた8菌株について、病原性試験によりその病原性の確認を行った結果、1985、2002、2003、および2004年に分離した4菌株では病原性が確認され、4菌株のうちで2002年に分離された菌株が最も高い病原性を有していた。病原性が確認された4菌株の細菌学的性状について検討した結果、1985年に分離された菌株はグラム陽性細菌、2002年以降に分離された3菌株はグラム陰性細菌と細菌が分離された時期で全く異なっていた。そこで、病原性が確認された4菌株の正確な同定を行うために、16S rDNA塩基配列に基づく既知種との同定性検索および系統樹解析を行った結果、4菌株とも同様に本病の症状を引き起こしたものの、1985年に分離された菌株は *Arthrobacter tumbae*、2002年以降に分離された3菌株は *Gaetbulibacter saemankumensis* にそれぞれ最も近縁な種であり、全く異なる2つのグループに属することが明らかとなった。

スミノリ病の発生要因を明らかにするために、2002年に分離されたスミノリ病原細菌 *Gaetbulibacter* sp. H-14LY 株の生育に及ぼす温度および食塩濃度の影響について調べた結果、本菌株の至適生育温度は20~30℃であり、至適生育食塩濃度は2.0~3.0%であることが明らかとなった。また、本菌株の生育に及ぼすpHの影響

について調べた結果、pH 4以下の酸性状態では本菌株は生育不能であることが明らかになった。さらに、本菌株の平均倍加時間について調べた結果、2.8時間であり、本菌株はこれまで平均倍加時間が調べられた海洋性細菌の中でも比較的増殖の遅い細菌であることが明らかとなった。

スミノリ病原細菌として属の異なる複数種の細菌が同定されたことや、本菌株の生育条件と本病の発生状況に相違があることから、本病の発生にはスミノリ病原細菌感染だけではなく、それ以外の発生要因も大きく関係していることが推察された。そこで、本病の発生要因を明らかにするため、Real-time PCR および抗体法による検出法を用いてスミノリ病原細菌の養殖ノリ葉体上における分布について調べた。Real-time PCR を用いて2006年度秋芽網期の正常な養殖ノリ葉体からスミノリ病原細菌の定量検出を行った結果、正常な養殖ノリ葉体から2002年以降に分離されたスミノリ病原細菌 *Gaetbulibacter* sp.が検出され、その数は全細菌数の2.3%を占めていた。正常な養殖ノリ葉体からスミノリ病原細菌が分離されたことから、本病の発生にはスミノリ病原細菌感染のみならず、ノリ葉体の生理状態も大きく関与していることが示唆された。

一方、秋芽網養殖期のノリ葉体からスミノリ病原細菌 *Gaetbulibacter* sp.が検出されたことから、秋芽網養殖期に育苗し冷凍保存する冷凍網養殖期開始時の養殖ノリ葉体にもスミノリ病原細菌 *Gaetbulibacter* sp.が付着していることが考えられた。そこで、*Gaetbulibacter* sp. H-14LY 株のウサギ抗血清を用いて冷凍保存養殖ノリ葉体から本菌株の検索を半定量的に行った結果、2006~2008年の冷凍保存養殖ノリ葉体から 1.8×10^6 ~ 1.1×10^7 CFU/gの本菌株が検出されたことから、冷凍網養殖開始時のノリ葉体にはすでに多数のスミノリ病原細菌が付着して生存していることが確認された。

ノリ葉体の生理状態に影響を及ぼす要因としては、本病の発生が冷凍網期開始直後に集中することから、ノリ葉体の冷凍処理が考えられた。そこで、ノリ葉体の生理状態に及ぼす冷凍処理の影響について明らかにするため、正常塩分あるいは低塩分海水でノリ葉体を培養後に冷凍保存したノリ葉体の生理状態をその純光合成量を測定することで検討した。その結果、冷凍処理によりノリ葉体の生理状態は明らかに悪化し、その悪化の程度は、特に低塩分条件下で冷凍処理したノリ葉体で顕著であることが判明した。さらに、生理状態の異なるこれらの冷凍処理ノリ葉体を用いて、スミノリ病原細菌感染に対す

るノリ葉体の感受性試験を行った。その結果、冷凍処理を行ったノリ葉体では、冷凍処理を行っていない正常ノリ葉体では発病しないような極めて低い細菌濃度でも発病することが明らかとなった。さらに、正常塩分条件下で冷凍処理したノリ葉体と比較して、生理状態がさらに悪化する低塩分条件下で冷凍処理したノリ葉体では、本病の発病時期が早くその罹患程度も拡大することが判明し、スミノリ病原細菌感染に対するノリ葉体の感受性は生理状態の悪化に伴い上昇することが明らかとなった。以上の結果から、本病の発生には、スミノリ病原細菌感染数だけでなく、ノリ葉体の生理状態も大きく関係することが明らかとなり、本病の発生要因は多様性を有することが強く示唆された。

ファージを利用したスミノリ病防除法の開発のために、有明海の海水および泥土からスミノリ病原細菌 *Gaetbulibacter* sp. H-14LY 株に感染するファージの分離を行った結果、プラーク形態の異なる3種類のファージ (U1, U2, および U3) が分離できた。制限酵素 *Hind*III による分離ファージ DNA の制限酵素切断パターンを比較した結果、ファージ U2 と U3 は近縁な種であり、ファージ U1 はそれらとは明らかに異なる種であることが明らかとなった。さらに、電子顕微鏡観察によるファージ粒子の形態的特徴から、ファージ U1 は *Myoviridae* 科、ファージ U2 および U3 は *Siphoviridae* 科にそれぞれ分類されることが推察された。

分離した3種類のファージの中から本病の防除に最も適したファージを選抜するために、分離ファージの性状について解析した。宿主特異性について検討した結果、分離した全てのファージは近年のスミノリ病原細菌である *Gaetbulibacter* 属細菌にのみ感染したことから、比較的高い宿主特異性を有することが示唆された。ファージの一段増殖実験および形成するプラークの形態から分離したファージの感染力について検討した結果、ファージ U2 は短い潜伏期で高いファージ放出率 (バーストサイズ) を有することから、分離した3種類のファージのうち、ファージ U2 がスミノリ病原細菌 *Gaetbulibacter* sp. H-14LY 株に対して最も強い感染力を有することが推察された。分離したファージの温度安定性を検討した結果、今回分離した全てのファージは5℃で約半年間は十分な活性を維持できることが明らかとなった。しかしながら、20℃で保存した場合には、分離した3種類のファージのうちファージ U2 のみが長期間活性を維持できないことが判明した。また、pH 安定性では、分離した全てのファージは pH 2 の強酸溶液中では完全に失活

することが明らかとなった。以上の結果から、分離した3種類のファージの中で本病の防除に最も適したファージは、本菌株に対して最も強い感染力を持ちながら、環境中に長期間残留しないファージ U2 であることが示唆された。

ファージ U2 のスミノリ病原細菌 *Gaetbulibacter* sp. H-14LY 株に対する増殖抑制効果について検討した結果、ファージ U2 を MOI が1となるように本菌株に感染させた場合、本菌株は増殖することなく直ちにファージ感染によって溶菌されていくことが明らかとなった。さらに、MOI が0.01 と低い感染濃度でも、ファージ接種24時間後にはファージ U2 による本菌株に対する増殖抑制効果が認められた。以上の結果から、ファージによる本病防除の可能性が強く示唆された。

そこで、ファージ U2 による本病の感染防除効果を人為的にスミノリ病原細菌 *Gaetbulibacter* sp. H-14LY 株を感染させたノリ葉体を用いて検討した。その結果、スミノリ病原細菌接種直後にファージ処理を行ったノリ葉体では本菌株に対する明らかな感染防止効果が認められた。さらに、細菌感染24時間後にファージ処理を行った場合でも、本病の発病抑制効果が認められた。以上の結果から、ファージ処理は本病の新たな防除方法として見出され、ノリ養殖現場への応用が期待された。

冷凍網期に使用するノリ葉体には比較的高濃度のスミノリ病原細菌がすでに付着していることから、冷凍網養殖直後のノリ葉体にファージ処理を行った場合、ファージは葉体に付着したスミノリ病原細菌に感染することで増殖し、その防除効果は加速されてゆくことが推察された。

そこで、このような状態におけるファージ処理の効果を酸処理と比較検討するため、*Gaetbulibacter* sp. H-14LY 株を人為的に感染させて調製した冷凍ノリ葉体を解凍後、ファージ液または酸処理剤に浸漬したのちに培養した。その結果、ファージ処理および酸処理を行ったノリ葉体では、いずれも本病の発病阻止効果が認められた。しかしながら、酸処理を行ったノリ葉体では本病の発病が認められなかったものの、ファージ処理では認められなかった傷害を受けた細胞が一部観察された。各処理を行ったノリ葉体上の本菌株の増殖について調べた結果、ファージ処理および酸処理を行ったノリ葉体上の本菌株の菌数はいずれも培養日数の経過とともに減少していったが、ファージ処理を行ったノリ葉体上の本菌株の菌数は、酸処理を行った葉体よりも比較的穏やかに減少してゆくことが明らかとなった。また、ファージ処理を行ったノリ葉体では、ノリ葉体から本菌株が検出でき

なくなった後でも、ノリ葉体上にファージが比較的高い濃度で存在していたことから、ファージ処理による本病の発病阻止効果は一定期間維持されることが強く示唆された。さらに、各処理を行ったノリ葉体の生長について調べた結果、ファージ処理したノリ葉体では酸処理したノリ葉体よりも高い生長を示すことも明らかとなった。以上のことから、酸処理と比較しても、スミノリ病の防除にファージを利用することの欠点は認められず、むしろ、ノリ葉体の生長に対しては酸処理よりもファージ処理の方が好ましいことが強く示唆された。

以上の研究により、スミノリ病の発生要因が明らかとなり、また、バクテリオファージを用いた海苔スミノリ病の防除法確立の可能性が示唆された。本研究で得られた知見が活用されることにより、今後、スミノリ病被害の軽減ならびにノリ養殖業の活性化が図られることが期待される。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始懇切なご指導とご鞭撻を賜り、かつ本論文のご校閲をいただいた佐賀大学農学部 神田康三 教授に深甚なる誠意を表します。また、論文のとりまとめに際して貴重なご助言をいただきました鹿児島大学水産学部 山本淳 教授、吉川毅 准教授、ならびに佐賀大学農学部 小林元太 准教授、濱洋一郎 准教授に深く感謝いたします。

一部の実験に協力していただくとともに貴重なご助言をいただきました佐賀大学農学部 田中重光 博士に深い感謝の意を表します。また、研究を遂行するにあたり何かとお手を煩わした佐賀大学農学部応用微生物学研究室の皆様にご心から感謝申し上げます。

本研究の実施と本論文のとりまとめに種々のご配慮とご鞭撻をいただきました佐賀県有明水産振興センター 野口敏春 前所長および川村嘉応 博士に厚くお礼を申し上げます。また、本研究を遂行するにあたり、様々な点でご理解とご配慮をいただきました佐賀県有明水産振興センター職員の方々に深く感謝いたします。

なお、本研究の一部は、文部科学省の都市エリア産学官連携促進事業「有明海における環境調和型ノリ養殖体系の確立とゼロエミッション型ノリ産業の創出」、ならびに佐賀県博士号取得促進事業の一環として行われた。記してお礼を申し上げます。

文 献

- 1) 倉掛武雄・堀 淳 (1966) : ノリ網低温保蔵. 冷凍, **41**, 15-29.
- 2) 新崎盛敏 (1947) : アサクサノリの腐敗病に関する研究. 日水誌, **13**, 74-90.
- 3) 新崎盛敏 (1960) : アマノリ類に寄生する壺状菌について. 日水誌, **26**, 543-548.
- 4) 川村嘉応 (1994) : 養殖ノリのスミノリ病に関する研究. 佐有水研報, **16**, 29-98.
- 5) 片山勝介・杉山瑛之・篠原基之・三宅与志雄 (1973) : ノリ養殖品種の特性と生育環境について. 昭和47年度指定調査研究総合助成事業結果報告書, 岡山県水産試験場, 19-23.
- 6) 鬼頭 鈞 (1981) : “すみのり”に関するアンケート調査の結果について. 海苔研究, **7**, 1-9.
- 7) 山下輝昌 (1983) : 近年有明海奥部漁場で多発する細菌付着症とその対策について. 昭和56年度福岡有明水試研報, 1-12.
- 8) 藤田雄二・楠淳一郎 (1986) : 有明海漁場で発生した“スミノリ”症ノリ葉体の観察とそれから分離された細菌について. 昭和61年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, pp. 66.
- 9) 半田亮司 (1992) : 筑後川河口口養殖場の環境とスミノリ症について. 西海ブロック資源増殖部会藻類・介類研究会報, **8**, 25-29.
- 10) 伏屋 満・高尾允英・日比野光 (1980) : クエン酸等によるノリ赤腐病防除試験. 愛知県水産試験場業務報告, 47-49.
- 11) 川村嘉応 (1998) : 支柱式養殖のノリ生産基本マニュアル. 佐有水研報, **18**, 37-52.
- 12) 坂口研一・C. S. Park・柿沼 誠・天野秀臣 (2001) : 高塩分処理を利用したアマノリ赤ぐされ病抑制手法の検討. 水産増殖, **49**, 77-83.
- 13) 川村嘉応・馬場浴文・山下康夫・楠田理一 (1992) : ノリ葉体付着細菌に及ぼす酸処理の影響. 水産増殖, **40**, 105-110.
- 14) 秋月 晃・田端正明・川村嘉応 (2007) : 酸処理剤としての乳酸のアカグサレ菌に対する致死効果. 水産増殖, **55**, 325-330.
- 15) 藤武史行・久野勝利 (2009) : 有明海 (佐賀県) における養殖ノリの病害の発生. 海洋と生物, **185**, 637-638.
- 16) Twort, F. W (1915) : An investigation on the nature of ultramicroscopic viruses. *Lancet*, **2**, 1241-1243.
- 17) d'Herelle, F (1917) : Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *C. R. Acad. Sci.*, **165**, 373-375.
- 18) Thomas Häusler (長野敬・太田英彦訳) (2008) : ファージ療法とは何か. 青土社, 東京, 278 pp.

- 19) Sulakvelidze, A., Z. Alavidze and J. G. Morris (2001) : Bacteriophage therapy. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **45**, 649-659.
- 20) Bhorade, S. M., J. Christenson, A. S. Pohlman, P. M. Arnow and J. B. Hall (1999) : The incidence of and clinical variables associated with vancomycin-resistant enterococcal colonization in mechanically ventilated patients. *Chest*, **115**, 1085-1091.
- 21) Hashimoto, H. (1994) : Drug resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Japan until 1993. *Jpn. J. Antibiot.*, **47**, 575-584.
- 22) 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.
- 23) 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.
- 24) Atterbury, R. J., P. L. Connerton, C. E. R. Dodd, C. E. D. Rees and I. F. Connerton (2003) : Application of host-specific bacteriophages to the surface of chicken skin leads to a reduction in recovery of *Campylobacter jejuni*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 6302-6306.
- 25) Goode, D., V. M. Allen and P. A. Barrow (2003) : Reduction of experimental *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 5032-5036.
- 26) O'Flynn, G., R. P. Ross, G. F. Fitzgerald and A. Coffey (2004) : Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of *Escherichia coli* O157 : H7. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 3417-3424.
- 27) Kusuda, R., K. Kawai, F. Salati, Y. Kawamura and Y. Yamashita (1992) : Characteristics of *Flavobacterium* sp. causing "Suminori" disease in cultivated *Porphyra*. *SUISANZOSHOKU*, **40**, 457-461.
- 28) 川村嘉応・楠田理一 (1993) : スミノリ病ノリ葉体から分離した細菌による実験的発症. 水産増殖, **41**, 227-234.
- 29) Yarza, P., M. Richter, J. Peplies, J. Euzéby, R. Amann, K.-H. Schleifer, W. Ludwig, F. O. Glöckner and R. Rosselló-Móra (2008) : The all-species living tree project : A 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains. *Syst. Appl. Microbiol.*, **31**, 241-250.
- 30) Tang, Y.-W., N. M. Ellis, M. K. Hopkins, D. H. Smith, D. E. Dodge and D. H. Persing (1998) : Comparison of phenotypic and genotypic techniques for identification of unusual aerobic pathogenic gram-negative bacilli. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 3674-3679.
- 31) Drancourt, M. and D. Raoult (2005) : Sequence-based identification of new bacteria : a proposition for creation of an orphan bacterium repository. *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 4311-4315.
- 32) 平山和宏 (2008) : 「Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 第1版」に記載された分類とその後の分類の異同 - グラム陰性菌. 腸内細菌学雑誌, **22**, 163-169.
- 33) 尾形英二 (1970) : 新しい海藻培養液 SWM-III について. 藻類, **18**, 171-173.
- 34) Nakayama, J., H. Hoshiko, M. Fukuda, H. Tanaka, S. Naoshige, S. Tanaka, K. Ohue, K. Sakai and K. Sonomoto (2007) : Molecular monitoring of bacterial community structure in long-aged nukadoko : pickling bed of fermented rice bran dominated by slow-growing lactobacilli. *J. Biosci. Bioeng.*, **104**, 481-489.
- 35) Kimura, M. (1980) : A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, **16**, 111-120.
- 36) Saitoh, N. and M. Nei (1987) : The neighbor-joining method : a new method for reconstruction phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, **4**, 406-425.
- 37) Stackebrandt E. and B. M. Goebel (1994) : Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **44**, 846-849.
- 38) Heyrman J., J. Verbeeren, P. Schumann, J. Swings and P. D. Vos (2005) : Six novel *Arthrobacter* species isolated from deteriorated mural paintings. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **55**, 1457-1464.
- 39) Jung S.-Y., S.-J. Kang, M.-H. Lee, S.-Y. Lee, T.-K. Oh and J.-H. Yoon (2005) : *Gaetbulibacter saemankumensis* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family *Flavobacteriaceae* isolated from a tidal flat sediment in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **55**, 1845-1849.
- 40) 三宅佳亮・植村宗彦・伏屋 満 (2005) : 愛知県内ノリ養殖漁場から分離されたスミノリ症原因菌のPCRによる検出. 愛知水試研報, **11**, 17-24.
- 41) 川村嘉応・三根崇幸 (2009) : スミノリ病の病徴と発生機序. 海洋と生物, **185**, 621-626.
- 42) Amandi, A., S. F. Hiu, J. S. Rohovec and J. L. Fryer (1982) : Isolation and characterization of *Edwardsiella tarda* from fall chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**, 1380-1384.

- 43) 川村嘉応・山下康夫 (1993) : 有明海湾奥部の佐賀県ノリ養殖場におけるスミノリ病の発生. 水産増殖, **41**, 243-250.
- 44) 川村嘉応 (1992) : スミノリ症に関する研究-II スミノリ症の発生に及ぼす 2, 3 の環境要因. 佐有水研報, **14**, 49-56.
- 45) Matsuki, T., K. Watanabe, J. Fujimoto, Y. Kado, T. Takada, K. Matsumoto and R. Tanaka (2004) : Quantitative PCR with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers for analysis of human intestinal bifidobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 167-173.
- 46) Matsuki, T., K. Watanabe, J. Fujimoto, T. Takada and R. Tanaka (2004) : Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 7220-7228.
- 47) Tannock, G. W., K. Munro, H. J. M. Harmsen, G. W. Welling, J. Smart and P. K. Gopal (2000) : Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 2578-2588.
- 48) 有賀祐勝・横浜康継 (1979) : 藻類生理生態研究法. 藻類研究法 (西澤一俊・千原光雄編), 共立出版, 東京, pp 427-429.
- 49) 気象庁 (1999) : 海洋観測指針 (第1部). 財団法人気象業務支援センター, 東京, pp 48-63.
- 50) 東京大学医科学研究所学友会 (1988) : 微生物学実習提要. 丸善, 東京, pp 278-279.
- 51) Dudgeon, S. R., I. R. Davison and R. L. Vadas (1989) : Effect of freezing on photosynthesis of intertidal macroalgae : relative tolerance of *Chondrus crispus* and *Mastocarpus stellatus* (Rhodophyta). *Marine Biol.*, **101**, 107-114.
- 52) 切田正憲・松井敏夫 (1993) : ノリ幼芽の生育に及ぼす乾燥と浸漬海水の比重の影響. 水産増殖, **41**, 281-286.
- 53) Adams, M. H (1959) : Bacteriophages. Interscience Publishers, New York, 592 pp.
- 54) Ellis, E. L. and M. Delbruck (1939) : The growth of bacteriophage. *J. Gen. Physiol.*, **22**, 365-384.
- 55) Ackermann, H.-W (2005) : Bacteriophage classification. In "Bacteriophages : biology and applications" (ed. by E. Kutter and A. Sulakvelidze), CRC Press, Boca Raton, pp. 67-90.
- 56) 中井敏博 (2007) : ヒトと動物の細菌感染症に対するバクテリオファージ療法. 化学療法の領域, **23**, 28-34.
- 57) Wichels, A., G. Gerdtts and C. Schütt (2002) : *Pseudoalteromonas* spp. phages, a significant group of marine bacteriophages in the North Sea. *Aquat. Microb. Ecol.*, **27**, 233-239.
- 58) Comeau, A. M., E. Buenaventura and C. A. Suttle (2005) : A persistent, productive, and seasonally dynamic vibriophage population within pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 5324-5331.
- 59) Stenholm, A. R., I. Dalsgaard and M. Middelboe (2008) : Isolation and characterization of bacteriophages infecting the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 4070-4078.
- 60) Smith, H. W., M. B. Huggins and K. M. Shaw (1987) : Factors influencing the survival and multiplication of bacteriophages in calves and in their environment. *J. Gen. Microbiol.*, **133**, 1127-1135.
- 61) 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.
- 62) Capra, M. L., A. Quiberoni and J. Reinheimer (2006) : Phages of *Lactobacillus casei/paracasei* : response to environmental factors and interaction with collection and commercial strains. *J. Appl. Microbiol.*, **100**, 334-342.
- 63) Capra, M. L., A. del L. Quiberoni, H.-W. Ackermann, S. Moineau and J. A. Reinheimer (2006) : Characterization of a new virulent phage (MLC-A) of *Lactobacillus paracasei*. *J. Dairy Sci.*, **89**, 2414-2423.
- 64) Inal, J. M. (2003) : Phage therapy : a reappraisal of bacteriophages as antibiotics. *Arch. Immunol. Ther. Expl.*, **51**, 237-244.
- 65) Huff, W. E., G. R. Huff, N. C. Rath, J. M. Balog and A. M. Donoghue (2005) : Alternatives to antibiotics : utilization of bacteriophage to treat colibacillosis and prevent foodborne pathogens. *Poultry Science*, **84**, 655-659.
- 66) 中井敏博 (2007) : バクテリオファージで魚の感染症を防ぐ. 日水試, **73**, 795-798.
- 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.
- 68) Okano, S., T. Yoshikawa, A. A. de la Cruz and T. Sakata (2007) : Characterization of *vibrio harveyi* bacteriophages isolated from aquaculture tanks. *Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ.*, **56**, 55-62.
- 69) 山本 淳・前川貴則 (2008) : 養鰻池およびウナギ病魚から分離した *Edwardsiella tarada* のファージ型. 水産増殖, **56**, 611-612.
- 70) Li, T., J. Xiang, R. Liu, M. Ding, P. Shi and S. Wang (1999) : Studies on bacteriophage control pustule disease of abalone *Haliotis discus hannai*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, **30**, 374-380.
- 71) Imbeault, S., S. Parent, M. Lagace, C. F. Uhlund 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.
- 72) 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.
- 73) 松岡 学・橋爪貴也・神崎博幸・岩本恵美・S. C. Park・吉田照豊・中井敏博 (2007) : 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. 魚病研究, **42**, 181-189.
- 74) 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.
- 75) Park, K.-H., H. Kato, T. Nakai and K. Muroga (1998) : Phage typing of *Lactococcus garvieae* (formerly *Enterococcus seriolicida*) a pathogen of cultured yellowtail. *Fisheries Science*, **64**, 62-64.
- 76) Park, S. C. and T. Nakai (2003) : Bacteriophage control of *Pseudomonas plecoglossicida* infection in ayu *Plecoglossus altivelis*. *Dis. Aquat. Org.*, **53**, 33-39.
- 77) Flaherty, J. E., J. B. Jones, B. K. Harbaugh, G. C. Somodil and L. E. Jackson (2000) : Control of bacterial spot on tomato in the greenhouse and field with H-mutant bacteriophages. *HortScience*, **35**, 882-884.