

**Mini Review****抗ウイルス物質産生細菌による魚類ウイルス病の制御**  
**Biological Control of Fish Viral Diseases by Anti-Viral Substance Producing Bacteria**吉水 守\*, 絵面 良男  
MAMORU YOSHIMIZU and YOSHIO EZURA北海道大学水産学部微生物研究室 〒041-8611 函館市港町3丁目1-1  
*Laboratory of Microbiology, Faculty of Fisheries, Hokkaido University Minato 3-1-1, Hakodate, Hokkaido 041-8611, Japan*

(受付 1999年6月30日—受理 1999年8月16日)

Many bacteria producing anti-viral substances were isolated from the aquatic environment. Fish intestinal bacteria such as *Aeromonas* spp. and *Vibrio* spp. producing anti-viral substances were isolated from intestinal contents of masu salmon (*Oncorhynchus masou*), Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) and barfin flounder (*Verasper moseri*). These *Aeromonas* strains produced anti-infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) substances and *Vibrio* strains showed anti-IHNV, *Oncorhynchus masou* virus (OMV) and barfin flounder nervous necrosis virus (BF-NNV) activities. When *Aeromonas* spp. strains M-26 and M-38 were mixed with food pellets and fed to rainbow trout (*O. mykiss*) and masu salmon, both bacteria became dominant in the intestinal microflora and anti-IHNV activity was observed in homogenates of intestinal contents. These rainbow trout and masu salmon fed the *Aeromonas* spp. showed more resistance to the artificial IHNV challenge test. Barfin flounder fed *Vibrio* sp. strain 2IF6a with *Artemia salina* showed the anti-OMV and BF-NNV activities in the intestinal contents. Larvae fed the *Vibrio* sp. showed a higher survival rate than the fish cultured using the virus free sea water.

**Key words:** fish viral disease, biological control, anti-viral substance**1. はじめに**

魚介類の増養殖事業の進展に伴い、疾病、特にウイルス病の被害が大きな問題となっている<sup>8)</sup>。人や家畜と同様あるいはそれ以上に水棲生物のウイルス病は予防・治療が困難であり、環境水中でのウイルスの生存性を知り、さらに水圏の他の微生物との相

互作用を明らかにすることは、ウイルス病の防疫対策を確立する上で重要である。私共は魚類のウイルス病対策確立を目指して研究を進め、その一環として病魚から水中に放出されたウイルスの挙動、特にその感染性の変化を検討してきた。飼育水にウイルスを混ぜて観察したとき、ウイルスが細菌の菌体表面に吸着されると共に菌体外に産生される物質によって不活化される現象を見出した<sup>1,2,21,25)</sup>。しかもこのような抗ウイルス物質産生細菌は水圏環境に広く分布し高率に分離される<sup>3,4)</sup>。魚類のウイルス病ワクチンが開発され、実用段階に達してきたが、稚

\* Corresponding author; E-mail: yosimizu@pop.fish.hokudai.ac.jp

仔魚が免疫応答を示すまでの期間あるいはワクチン投与が可能なサイズに達するまでは、従来どおりのウイルス病対策に頼らなければならない<sup>24)</sup>。そこで、これら抗ウイルス物質を産生する細菌を有効に利用できないかと、経口投与によるウイルス病の制御を検討してきた。ここではサケ科魚類の伝染性造血器壊死症ウイルスおよびマツカワ (*Veraspermoseri*)・ヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) 等異体類の魚類ノダウイルスを対象に、水棲細菌によるウイルス不活化現象を紹介すると共に、このような抗ウイルス物質産生細菌の水圏における存在量、種類および作用機序について調べた結果ならびに、これら細菌を魚類に経口投与した場合の腸内容物の抗ウイルス活性とウイルス病制御への応用例を紹介したい。

## 2. 水棲細菌による伝染性造血器壊死症ウイルスの不活化現象

魚類ウイルスの環境水中での消長に関する知見は乏しく、病魚から排出されたウイルスがどのような挙動をとるかも不明であった。そこで、まずサケ科魚類の代表的な病原ウイルスである伝染性造血器壊死症ウイルス (infectious hematopoietic necrosis virus: IHNV) を対象に、本ウイルスが病魚から離れ環境水中に放出された後の生存性について、サケ科魚類の飼育水、Hanks' BSS, 脱塩素処理水道水, 再蒸留水中での消長を温度別に観察した。IHNV の感染価を 0, 5, 15°C の各温度条件下で14日間観

察したところ、0°C ではいずれの供試水中でも14日間安定であったが、15°Cでは飼育水中で3日目に感染価の大幅な減少が観察された。この傾向は温度が高い方が顕著で、14日目には5, 10°Cでも検出限界以下となった(飼育水中での結果を Fig. 1 に示した)。これらの供試水は無菌でないために、IHNV の感染価の減少に温度に加え共存する微生物が関与している可能性が示唆された。そこで高圧滅菌あるいは濾過除菌した飼育水中での IHNV の感染価の変化を比較した。無処理飼育水中では同様に急速な感染価の減少が観察されたが、高圧滅菌あるいは濾過除菌した飼育水中では比較的安定であり、IHNV の不活化現象は飼育水中に存在する微生物あるいは微生物の産生した細菌濾過膜を通過する物質による可能性が示された<sup>21)</sup>。

この IHNV 不活化現象に関与している微生物を特定するために、飼育水に魚類細胞培養用培地(抗生物質無添加)を加えて15°Cで7日間培養し、0.22  $\mu\text{m}$  の濾過膜で除菌後、濾液に IHNV を懸濁して感染価の変化を観察した。この場合、IHNV の感染価は5, 15°C共に3日目に検出限界以下となった。培養液の微生物叢は細菌が優勢であり、他に真菌類や原生動物等は見られず、生菌数は  $1.8 \times 10^8$  CFU/ml, 菌叢は *Achromobacter* と *Pseudomonas* 属細菌が優勢であった。この細菌の中に IHNV に対する抗ウイルス作用を有する物質を産生する細菌が存在するか否かを、両属の代表分離株を対象に観察した。*Pseudomonas* 属代表株の培養液を高圧滅

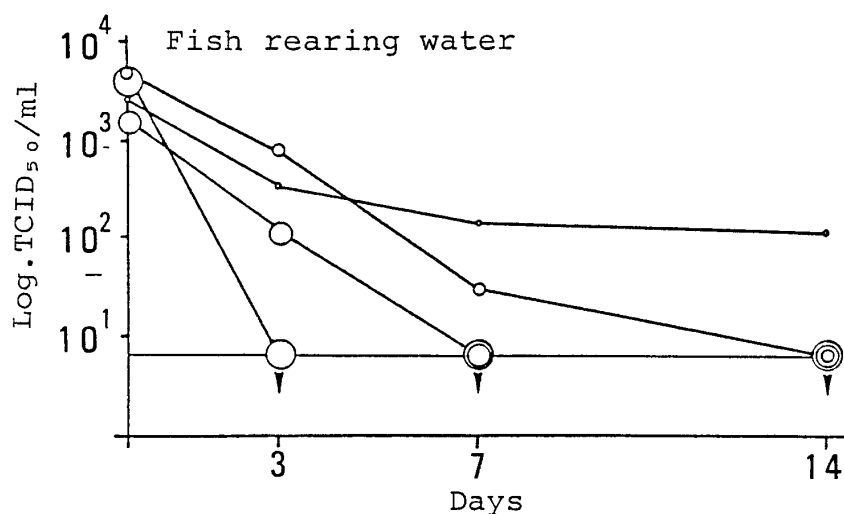


Fig. 1. Changes of IHNV infectivity in fish rearing water at various temperatures.  
●: 0°C, ○: 5°C, ○: 10°C, ○: 15°C.

菌したものに IHNV を加えた場合にはウイルス感染価に変化なく安定であったが、培養液の濾過除菌液に加えた場合には4～8日後に IHNV は検出できなくなった<sup>2)</sup>。さらに菌体を含む培養液に IHNV を加えて1時間後に濾過した場合、濾液からウイルスは検出できなくなった。このことは本ウイルスが泥など微細粒子への吸着と共に菌体にも吸着する現象が知られていることから<sup>2)</sup>、菌体に吸着したウイルスが濾過除菌の際に菌体と共に除去されたことによると考えられた。

### 3. 抗ウイルス作用を有する細菌の分布とその種類ならびに代表株が産生した抗ウイルス物質の性状

上記のような抗ウイルス作用を有する細菌が、魚類棲息環境水中にどの程度存在するかを把握するため、まず北海道大学水産学部七飯養魚場の飼育用水、北海道立水産孵化場森支場の飼育用水、函館市近郊茂辺地川河口域の汽水および水産学部前浜の海水を対象に採水地点の底泥を含め季節ごとに細菌数と菌叢を調査し、分離菌について前述の IHNV を用いて抗ウイルス作用のスクリーニングを行った<sup>3,4)</sup>。供試した各種試料の生菌数およびその細菌叢はこれまでの研究結果とほぼ同様に魚類棲息環境の一般的な菌数と細菌叢を示していた<sup>1,2)</sup>。それぞれの地点の水試料および底泥試料から分離した計1458株の細菌の培養濾液について IHNV に対する抗ウイルス作用を観察した。この際プロテアーゼや

細胞毒性物質を含む培養液は除外した。Table 1 に見られるように、試料採取場所にかかわらず90%以上のプラーク減少を示したものが分離菌の1～23%と予想外に多く検出された<sup>3,4)</sup>。これら抗ウイルス活性を示した細菌のうち淡水由来株では53～60%、海水由来株では23～33%が *Pseudomonas* 属の細菌であった。

抗ウイルス効果を示した分離株の中から数株を選択して抗ウイルス物質の検討を行ったところ、*Pseudomonas* 属の1株 46NW-04 株は、低分子で耐熱性の抗ウイルス物質を産生し、その分子量は1126、ペプタイド系の物質で計9個のアミノ酸と3-hydroxydecanonic acid から構成される新規抗ウイルス物質であった<sup>6)</sup>。本物質は魚類ヘルペスウイルス (*Oncorhynchus masou virus*; OMV)<sup>8)</sup> の他、狂犬病ウイルスやヒトの HSV, HIV に対しても抗ウイルス効果を示した。本物質の抗ウイルス作用はウイルス粒子に対する直接作用、すなわちエンベロープ全体かスパイク部分をコーティングあるいは崩壊するものと推察されている<sup>9)</sup>。他の5株の検討結果では、同様のペプタイド系低分子物質や酵素作用を有する高分子物質、未同定の低分子物質など、細菌の産生する抗ウイルス物質の種類は多岐にわたっていた<sup>10)</sup>。

### 4. 抗ウイルス物質産生腸内細菌の経口投与による IHNV の制御

これら抗ウイルス物質産生細菌を魚類のウイルス

Table 1. Number of bacterial strains showing anti-IHNV activities among 1458 isolates from the Mori Branch of Hokkaido Fish Hatchery, Nanae Fish Farm of Hokkaido University, estuary of the Moheji River and Nanaehama coast.

Place	Source of isolates		Tested	50% plaque reduction	90% plaque reduction
	Sample				
Mori	Water		170	31 (18%)*	1 (1%)*
	Sediment		156	66 (42%)	28 (18%)
Nanae	Water		194	48 (25%)	8 (4%)
	Sediment		190	45 (24%)	7 (4%)
Moheji	Water		199	166 (83%)	46 (23%)
	Sediment		177	101 (57%)	13 (7%)
Nanaehama	Water		176	77 (44%)	18 (10%)
	Sediment		196	43 (22%)	5 (3%)
Total			1458	577 (39%)	126 (9%)

\*: rate of positive strains to tested strains.

病制御に応用するにあたり、抗ウイルス物質産生遺伝子を特定し、大腸菌を用いた組換え体を作成し、抗ウイルス物質を大量に産生しようという試みがなされているが、この場合は薬剤としての利用になる。また魚類の正常細菌叢を構成する細菌に遺伝子を導入した場合には、たとえ成功したとしても、現状では自然界での利用は難しい。そこで、魚類の正常細菌叢を構成する細菌、特に魚類で細菌叢がよく調べられ、把握が容易な腸内細菌<sup>20)</sup>を対象に抗ウイルス物質を産生する細菌の検索を行い、抗ウイルス物質産生細菌を選出し、その代表株を用いて腸管内での抗ウイルス物質産生能を観察した。

サケ科魚類の腸内細菌叢<sup>13-19)</sup>のうち、淡水生活期の菌叢の主体を成す *Aeromonas* 属を対象に抗 IHNV 作用を示す菌株のスクリーニングを行なった。108株のスクリーニングで90%以上のプラーク減少を示す菌株が3株分離された。これらの菌株は飼料成分を栄養源として抗ウイルス物質を産生することが確認され、餌料ペレットに10%の割合に菌体培養液を混ぜ、経口的に投与したところ、腸管内の菌叢の主体を成し腸管内に定着した。そして腸内容物も強い抗ウイルス活性を示した。ただし、この場合対照に用いた供試魚の腸内細菌叢も同様に *Aeromonas* 属細菌が優勢であった。抗ウイルス性の

*Aeromonas* 属細菌を添加した餌料を3週間に渡ってニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) に給餌した後、100TCID<sub>50</sub>/ml の IHNV で浸漬法による攻撃試験を行ったところ、抗ウイルス細菌を投与した群の累積死亡率が約10%、対照群は約30%と有意の差が観察された (Table 2)<sup>22)</sup>。この場合、対照群の腸内細菌叢も *Aeromonas* 属細菌が優勢で腸内容物に抗ウイルス活性が見られた。

そこでサクラマス (*O. masou*) を用いて抗ウイルス物質を産生しない *Pseudomonas* 属が優勢でかつ腸内容物にも抗ウイルス活性のないことを確認した対照群を選抜し、再度抗ウイルス細菌投与群と共に IHNV による攻撃試験を行った。抗ウイルス物質を産生しない *Pseudomonas* 属が優勢でかつ腸内容物にも抗ウイルス活性のない群の累積死亡率は72%となり、抗ウイルス物質産生菌投与群との差が大きくなった (Table 2)<sup>23)</sup>。ただし、ウイルス攻撃量を100倍にした場合あるいは養魚場のニジマスに対し同様の経口投与試験を実施した場合には効果が認められなかった。この原因として IHNV の感染入門戸が鰓および体表であることおよび養魚場では流水量が大きいために飼育水中の抗ウイルス物質が有効濃度に達しなかったものと考えられる。今回の試験は容量 31 の小型水槽を使用したため、腸内で多

Table 2. Results of IHNV challenge test<sup>\*1</sup> for rainbow trout and masu salmon fed *Aeromonas* spp. strain M-26 or M-38 in their diet.

Species	Group	Treatment	Water temp. (°C)	Number of fish	Cumulative mortality (%)
Rainbow trout	Test (M-26)	Challenged <sup>*2</sup>	15	30	9.6
		Challenged <sup>*3</sup>		30	29.2
		Not challenged <sup>*4</sup>		30	3.3
Masu salmon	Test (M-38)	Challenged <sup>*2</sup>	5	200	0.5
		Not challenged		200	0.0
	Control-A <sup>*5</sup>	Challenged	5	200	1.0
		Not challenged		200	0.5
	Control-B <sup>*6</sup>	Challenged	5	100	72.0
		Not challenged		100	6.0

\*1: IHNV strain ChAb was used; challenge dose was 100 TCID<sub>50</sub>/ml, 60 min.

\*2: Fish fed *Aeromonas* sp. M-26 or M-38 then challenged with IHNV.

\*3: Fish not fed *Aeromonas* and challenged with IHNV.

\*4: Fish not fed *Aeromonas* and not challenged with IHNV.

\*5: Fish not fed *Aeromonas* sp. M-38, but *Aeromonas* spp. were dominant in their intestinal contents. Anti-IHNV activity of intestinal contents showed 100% plaque reduction.

\*6: Fish not fed *Aeromonas* sp. M-38, and *Pseudomonas* spp. were dominant in their intestinal contents. Anti-IHNV activity of intestinal contents showed 66 and 85% plaque reduction, respectively.

量に産生された抗ウイルス物質が糞と共に排泄され、鰓や体表面を覆っていた可能性が考えられる。今後は腸管感染系のウイルスを用いて試験を実施するか、海産魚介類の種苗生産水槽のように換水率の低い水槽を対象に抗ウイルス物質産生細菌を増殖させ、ウイルス病の防除が可能かどうかを検討する等の工夫が必要と考えられた。

## 5. 海産魚種苗生産用餌料生物の細菌叢を抗ウイルス物質産生細菌に置き換える試み

異体類のマツカワやヒラメのウイルス病としては、魚類ノダウイルスによるウイルス性神経壊死症や IHNV と近縁のウイルスによるヒラメラブドウイルス (HIRRV) 病、ヘルペスウイルスによるウイルス性表皮増生症、イリドウイルスの一種リンホスチスウイルスによるリンホスチス病が知られている<sup>8)</sup>。マツカワやヒラメの種苗生産施設における飼育用水、餌料生物のワムシ (*Brachionus plicatilis*)、アルテミア (*Artemia salina*) および飼育仔稚魚の細菌叢の調査結果では、ワムシ、アルテミアおよび仔稚魚の消化管内の菌叢の主体は *Vibrio* 属細菌が優勢であった<sup>7,9)</sup>。これら *Vibrio* 属細菌の中に抗ウイルス活性を有する細菌がどの程度存在するか、*Vibrio* 属細菌155株を対象に、まず IHNV に対する抗ウイルス効果をスクリーニングしたところ、25菌株が90%以上のプラーク減少率を示した。さらにこれら25菌株の中から高い抗 IHNV 活性を示した5株について、抗ヘルペスウイルス (ウイルス性表皮増成症原因ウイルスは培養できないため海産ギンザケ (*O. kisutch*) 由来 OMV 株を使用)、抗 HIRRV

および抗 BFNNV (barfin flounder nervous necrosis virus) 活性を調べ、IHNV, HIRRV, OMV および BFNNV に対し強い抗ウイルス効果を示す菌株を得た (Table 3)。

稚仔魚の生物餌料の中で、最も細菌叢のコントロールが容易と考えられるのは乾燥卵を用いるアルテミアである。そこで、まずアルテミア卵を次亜塩素酸ナトリウムで消毒後、無菌海水で孵化させたアルテミアに、抗ウイルス物質産生細菌 *Vibrio* sp. 2IF6a 株を添加して培養した。*Vibrio* sp. 2IF6a 株を添加したアルテミアは、培養開始時に抗 IHNV および BFNNV 活性は認められなかったものの、培養2日後のアルテミアは IHNV に対し56%のプラーク減少を、BFNNV に対しては90%の感染価減少を示し、アルテミア培養液ではそれぞれ100%と99%を示した。対照の無菌培養アルテミアには抗ウイルス効果は認められなかった<sup>9)</sup>。マツカワあるいはヒラメの餌料がワムシからアルテミアに置き換わる時に、抗ウイルス活性を有する細菌を添加したアルテミアに切り替えて給餌すれば腸内細菌叢を抗ウイルス物質産生 *Vibrio* に置換えられるものと考えられた。

## 6. 抗ウイルス物質産生 *Vibrio* 属細菌添加アルテミアの経口投与によるマツカワのウイルス性神経壊死症の制御

抗ウイルス物質産生 *Vibrio* sp. 2IF6a 株を添加したアルテミアおよびこのアルテミアを給餌したマツカワの腸内容物の細菌叢は *Vibrio* 属細菌が優勢となり、このアルテミアおよびマツカワ腸内容物の10

Table 3. Anti-viral activity of *Vibrio* spp. isolated from rotifer (*Brachionus plicatilis*), skin and intestinal contents of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) and barfin flounder (*Verasper moseri*).

Species	Origin	Strain No.	Anti-viral activity (reduction rate)				
			PFU*1			Infectivity*2	
			OMV COT	IHNV ChAb	HRV 8401H		BFNNV 9301
Rotifer	Whole	1F09	92	90	96	NT*3	
Japanese flounder	Skin	1FB26	96	94	88	NT	
		Intestine	2FI6a	100	94	94	>99.99
		Intestine	2FI10	91	91	92	NT
Barfin flounder	Intestine	BI9715	100	88	NT	>99.99	

\*1: vs 100 PFU/ml, \*2: vs 10<sup>5.8</sup> TCID<sub>50</sub>/ml, \*3: not tested.

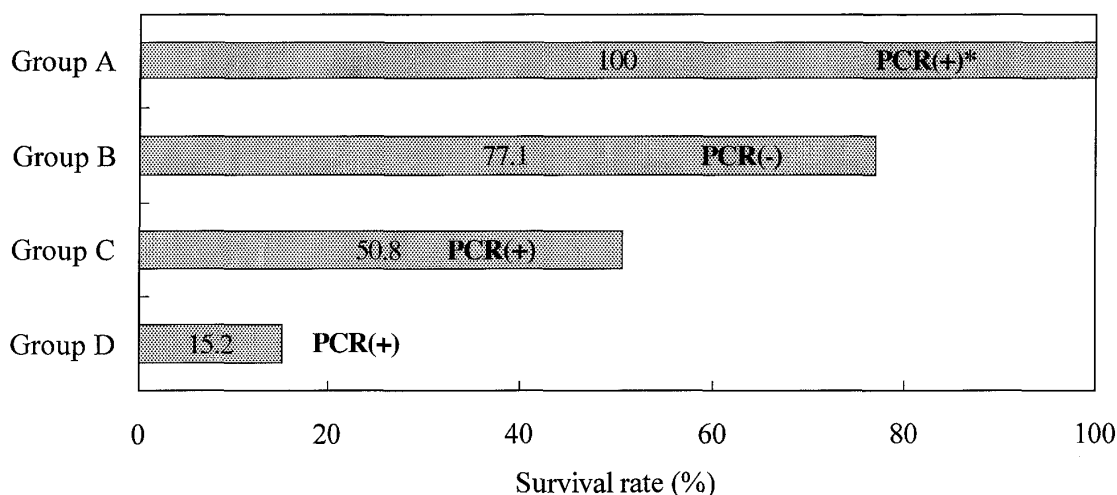


Fig. 2. Survival rate of barfin flounder (*Verasper moseri*) fed with *Vibrio* sp. 2IF6a which showed anti-barfin flounder nervous necrosis virus (BFNNV) activity. Group A: Fish fed with *Vibrio* sp. 2IF6a. Group B: Fish cultured using virus free sea water<sup>12)</sup>. Group C: Fish cultured under the standard conditions. Group D: Fish cultured with high density of *Nannochloropsis* sp. \*: Result of RT-PCR to detect striped jack-NNV specific gene sequences in the brain tissue of larvae<sup>12)</sup>.

倍希積濾液に  $10^{5.8}$  TCID<sub>50</sub>/ml に調製した BFNNV を混合して 3 時間接触させた場合、共にウイルス感染価は 99.99% 以上減少した。このような抗ウイルス活性は IHNV および OMV に対しても認められた。マツカワ仔魚を換水率 0~300% で 60 日間飼育した後の生存率は、試験的防疫対策<sup>12)</sup>実施区で 77.1%、通常飼育区で 50.8%、高密度飼育区で 15.2% であった。これに対し抗ウイルス物質産生 *Vibrio* 給餌区では全く死亡は見られず 100% となった (Fig. 2)。ただ BFNNV 特異遺伝子を検出する RT-PCR 法による検査の結果では防疫対策実施区以外ではウイルス遺伝子が検出された。その後、ウイルス性神経壊死症の防疫対策が確立され本症の発症は見られなくなったが<sup>12)</sup>、3 年間同様の給餌飼育を行ったところ、稚魚の成長の遅れもなく、従来散見されたヘルペスウイルスによるウイルス性表皮増生症も見られなくなった。一昨年からは、マツカワにはマツカワの腸管由来の抗ウイルス物質産生 *Vibrio* 属細菌を選抜して投与している。なお、この置換には、強い抗 BFNNV および OMV 活性を有し、病原性がなく、かつアルテミアおよびマツカワ仔魚の成長に影響が認められない *Vibrio* sp. BI-9715 株を選抜した (Table 3)。なお平行して行った *Alteromonas* sp. 2IF6b 株の給餌試験において、本来、腸管内に定着しない *Alteromonas* 属細菌が給餌魚の腸内細菌叢に占める割合が高くなったことから、*Vibrio* sp. BI-9715 株もマツカワの腸管内に定

着しているものと推測された。

このように、抗ウイルス物質産生腸内細菌を経口投与する方法は、換水率の低い海産稚魚のウイルス防除対策として、方法を工夫すれば有効に活用できるであろうと考えられた。

## 7. おわりに

以上紹介した結果は、魚類のウイルス病対策への応用を目的とした研究結果であったが、前述の細菌の中にはウイルスが細胞へ感染した後のウイルス複製過程を阻害する物質を産生する株もあり、これらは今後の研究次第によっては医薬品としての利用の道が開けるものと考えられる。今まで未知の世界としてあまり調査研究対象とされてこなかった水の中の微生物、特に地球の 2/3 以上を占める海洋の微生物の中にはまだまだ未知の有用遺伝子源を持ったものが多数存在すると考えられる。今回紹介した抗ウイルス性生理活性物質をはじめ、抗菌、抗腫瘍、酵素阻害等の生理活性物質産生細菌等の検索が精力的に行なわれている<sup>11)</sup>。今後より多くの分野で有用微生物が、私たちの生活に役立てられることを願ってやまない。

## 文 献

- 1) Kamei, Y., M. Yoshimizu, Y. Ezura and T. Kimura.

1987. Effect of environmental water on the infectivities of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) and infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *J. Appl. Ichthyol.* **4**: 37-47.
- 2) Kamei, Y., M. Yoshimizu, Y. Ezura and T. Kimura. 1987. Effect of estuarine and marine waters on the infectivities of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) and infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.* **38**: 271-285.
  - 3) Kamei, Y., M. Yoshimizu, Y. Ezura and T. Kimura. 1987. Screening of bacteria with antiviral activity against infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) from estuarine and marine environments. *Nippon Suisan Gakkaishi* **53**: 2179-2185.
  - 4) Kamei, Y., M. Yoshimizu, Y. Ezura and T. Kimura. 1988. Screening of bacteria with antiviral activity from the freshwater salmonid hatcheries. *Microbiol. Immunol.* **32**: 67-73.
  - 5) Kamei, Y., M. Yoshimizu, Y. Ezura and T. Kimura. Isolation and characterization of antiviral substance against salmonid viruses, 46NW-04A produced by an aquatic bacterium, *Pseudomonas fluorescens* 46NW-04, in "Salmonid Diseases", ed by T. Kimura. Hokkaido University Press, Sapporo, 1992, pp.293-300.
  - 6) Kimura, T., M. Yoshimizu, Y. Ezura and Y. Kamei. 1990. An antiviral agent (46NW-04A) produced by *Pseudomonas* sp. and its activity against fish viruses. *J. Aquat. Anim. Health* **2**: 12-20.
  - 7) 木村喬久, 絵面良男, 田島研一, 吉水 守. ヒラメ飼育水槽の微生物叢の研究, "平成元年度健苗育成技術開発研究結果の報告", 東京, 水産庁研究部研究課. 1990, pp.1-13.
  - 8) Kimura, T. and M. Yoshimizu. 1991. Viral diseases of fish in Japan. *Annual Rev. Fish Dis.* **1**: 67-82.
  - 9) 木村喬久, 吉水 守. ヒラメ飼育水槽の微生物叢の把握および有害微生物防除法の検討, "平成2年度健苗育成技術開発研究結果報告", 水産庁研究部研究課. 1991, pp.1-18.
  - 10) Myouga, H., M. Yoshimizu, Y. Ezura and T. Kimura. 1993. Anti-infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) substances produced by bacteria from aquatic environments. *Fish Pathol.* **28**: 9-13.
  - 11) 奥谷康一. 微生物の生理活性物質, 安元 健・神谷久夫編, "海産有用生理活性物質", 水産学シリーズ65, 恒星社厚生閣, 東京. 1989, pp.46-57,
  - 12) Watanabe, K., S. Suzuki, T. Nishizawa, K. Suzuki, M. Yoshimizu and Y. Ezura. 1998. Control strategy of viral nervous necrosis of barfin flounder. *Fish Pathol.* **33**: 445-446.
  - 13) Yoshimizu, M. and T. Kimura. 1976. Study on the intestinal microflora of salmonids. *Fish Pathol.* **10**: 243-259.
  - 14) 吉水 守, 木村喬久, 坂井 稔. 1976. サケ科魚類の腸内細菌叢に関する研究—I. 飼育魚の腸内細菌数と細菌叢, *日水誌*, **42**: 91-99.
  - 15) 吉水 守, 木村喬久, 坂井 稔. 1976. サケ科魚類の腸内細菌叢に関する研究-II. 人為的海水移行および餌止め飼育の腸内細菌叢におよぼす影響, *日水誌*, **42**: 863-873.
  - 16) 吉水 守, 木村喬久, 坂井 稔. 1976. サケ科魚類の腸内細菌叢に関する研究-III. 海洋棲息魚の腸内細菌叢, *日水誌*, **42**: 875-884.
  - 17) 吉水 守, 木村喬久, 坂井 稔. 1976. サケ科魚類の腸内細菌叢に関する研究-IV. 河川及び湖沼棲息魚の腸内細菌叢, *日水誌*, **42**: 1281-1290.
  - 18) 吉水 守, 木村喬久, 坂井 稔. 1976. サケ科魚類の腸内細菌叢に関する研究-V. 遡河魚の腸内細菌叢, *日水誌*, **42**: 1291-1298.
  - 19) 吉水 守, 木村喬久, 坂井 稔. 1980. サケ科魚類の稚仔魚期における腸内細菌叢の形成時期について, *日水誌*, **46**: 967-975.
  - 20) 吉水 守. 魚類の消化管内細菌(好気性細菌), "水産増養殖と微生物", 水産学シリーズ61, 河合章編, 恒星社恒星閣, 東京, 1986, pp.9-24.
  - 21) 吉水 守, 瀧澤宏子, 亀井勇統, 木村喬久. 1986. 魚類病原ウイルスと環境由来微生物との相互作用: 飼育用水中での生存性, *魚病研究*, **21**: 223-231.
  - 22) Yoshimizu, M., Y. Fushimi, K. Kouno, C. Shinada, Y. Ezura and T. Kimura. Biological control of infectious hematopoietic necrosis by antiviral substance producing bacteria, in "Salmonid Diseases", ed by T. Kimura. Hokkaido University Press, Sapporo, 1992, pp.301-307.
  - 23) Yoshimizu, M. and T. Kimura. Production of anti-infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) substances by intestinal bacteria, in "The Third Asian Fisheries Forum", eds by Chou, L.M., A.D. Munro, T.J. Lam, T.W. Chen, L.K.K. Cheong, J.K. Ding, K.K. Hooi, H.W. Khoo, V.P.E. Phang, K.F. Shim and C.H. Tan. Asian Fisheries Forum, Manila, 1994, pp.310-314.
  - 24) 吉水 守. 1999. ワクチン投与までの防疫対策, *アクアネット*, **2**: 26-29.
  - 25) Yoshinaka, T., M. Yoshimizu and Y. Ezura. 1999. Adsorption and infectivity of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) with various solids. *J. Aquat. Anim. Health* **11**: in press.