



Title	サケ科魚類の伝染性造血器壊死症ウイルスと水棲細菌との相互作用
Author(s)	吉水, 守
Description	〔II〕 主題II. 生物生態学—生物間相互作用の基本原理と感染症— 第67回日本細菌学会総会. 平成6年3月29日～平成6年3月31日. 東京都.
Citation	感染症と生体防御の基本原理 : 統合的視点を中心として, 112-121
Issue Date	1994-10
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39527
Type	conference paper
File Information	yoshimizu-124.pdf



サケ科魚類の伝染性造血器壊死症ウイルスと 水棲細菌との相互作用

吉 水 守

はじめに

魚介類の増養殖事業が各国で活発に行われるようになり、水産物に占める増養殖魚介類の比率は年々高くなってきている。しかし反面、効率的な増養殖事業の発展に伴い、魚介類の疾病被害、特に伝播が速く治療法のないウイルス性疾病の流行が大きな問題となっている¹⁾。人や家畜と同様あるいはそれ以上に魚類ではウイルス病の有効な予防、治療対策の確立が困難であり、養魚環境水中での病原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。

現在、私共は魚類病原ウイルスについてウイルス学的に、さらにウイルス病対策確立を目指し研究を進めている。その一環として魚類棲息環境水中でのウイルスの生存性および環境水中に存在する他の微生物との相互作用についても研究を進めてきた²⁾。病魚から放出されたウイルスはその後どうなるか。飼育用水にウイルスを混ぜ、その後の経過を観察したときに、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も不活化される現象を見いだした^{3,4)}。

本稿では、サケ科魚類の伝染性造血器壊死症ウイルス(infectious hematopoietic necrosis virus: IHNV)⁵⁾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ともに、このような抗ウイルス性生理活性物質産生細菌が水圏にど

の程度存在するか、その種類は、その作用機序は、さらにこれら細菌を魚類のウイルス病防除に有効に活用するには、などのテーマのもとに現在まで行ってきた研究成果を以下の5項目について紹介したい。

- (1)水棲細菌による伝染性造血器壊死症ウイルス(IHNV)の不活化。
- (2)抗IHNV作用を有する細菌の分布およびその種類ならびに代表株が産生する抗ウイルス物質の性状。
- (3)抗IHNV活性を有する細菌を用いたバイオリアクターによる抗ウイルス物質の生産。
- (4)抗IHNV物質を産生する魚類腸内細菌の経口投与によるIHNV制御の可能性。
- (5)海産魚種苗生産用餌料生物の細菌叢の抗ウイルス物質産生細菌への置換。

1. 水棲細菌による伝染性造血器壊死症ウイルス(IHNV)の不活化:

サケ科魚類の病原ウイルス、伝染性造血器壊死症ウイルス(IHNV)および伝染性膵臓壊死症ウイルス(infectious pancreatic necrosis virus)の磷酸緩衝液(PBS)、平衡塩類溶液(BSS)、最小必須培地(MEM)中での生存性については、いくつかの報告がある^{5,6,7,8)}ものの、魚類棲息環境水中でのウイルスの消長に関する報告は少なく、河川水や汽水、海水中における poliovirus type 1 の生存性を IPNV, IHNV と比較したもの⁹⁾ および IPNV の海水中での生存性を検討した報告¹⁰⁾が見られるにすぎない。一方 poliovirus

をはじめヒトの enterovirus については公衆衛生学的観点から河川や海に入ってから生存性が研究され、これらのウイルスの感染性に影響を与える因子として塩分や水温^{11,12)}、化学物質^{13,14)}、微細粒子や泥^{15,16,17,18,19,20)}、それに微生物^{21,22,23)}などが報告され、これらウイルスの生存が高圧滅菌あるいは濾過除菌海水中に比べ、無処理海水中で低いことから、海水中の微生物の関与が重要視されている。

本研究では Hanks'BSS、脱塩素処理水道水、再蒸留水およびサケ科魚類の飼育用水中での IHNV の消長を温度別に観察するとともに、飼育用水中に存在する微生物との相互作用について、無処理飼育用水、高圧滅菌あるいは濾過除菌した飼育用水中での IHNV の感染価の変化を観察した。次に IHNV の感染価が減少した飼育用水より分離した細菌の代表株を対象に、その培養液の IHNV に対する抗ウイルス効果を検討した。

まず飼育用水、再蒸留水及び Hanks'BSS 中での IHNV の消長を 0, 5, 15℃ の各温度条件下で 14 日間観察した。0℃ では各供試水中で 14 日間安定であったが、15℃ の飼育用水中では 7 日目に感染価の大幅な減少が観察された。この減少傾向は温度の高い方が大きく、14 日目には 5, 10℃ 共に検出限界以下となった(飼育用水中での結果のみを図 1 に示した)。このように

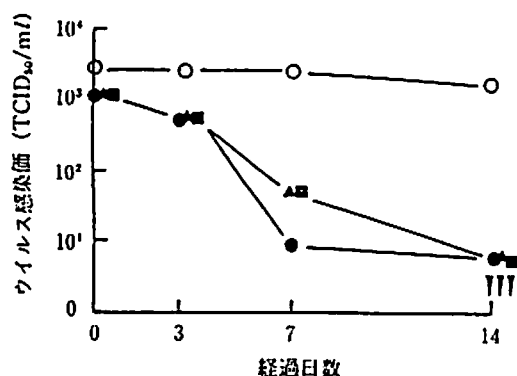


図 1 飼育用水中での IHNV の消長

○: 0℃, ■: 5℃, ▲: 10℃,
●: 15℃

IHNV は Hanks'BSS に懸濁した場合に比べ、飼育用水および一部再蒸留水中で急激な感染価の減少が観察された。これらの供試水は無菌でないため IHNV の感染価の減少に、温度の他、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 の感染価の変化を無処理飼育水中での変化と比較した。無処理飼育水中では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用水中では、比較的安定であった(図 2)。このように 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 0.20 μm の濾過膜を通過する物質による可能性が強くなった。そこでこのウイルス不活化現象に関与している微生物を特定するため、飼育用水に、魚類細胞の培養に使用している 10% FBS 加 MEM (抗生物質無添加) を 10% の割合に加え、15℃ で 7 日間培養した後、0.20 μm ヌクレオポアフィルターで濾過除菌し、濾液に IHNV を懸濁してその後の感染価の変化を観察した。IHNV の感染価は 5, 15℃ 共に 3 日目にすでに検出限界以下となっていた。この濾過除菌前の飼育用水の微生物叢は、細菌が優勢であり、原生動物等の他の微生物は見あたらなかった。生菌数は 1.8×10^6 CFU/ml、菌叢は *Achromobacter* と *Pseudomonas* 属細菌が優

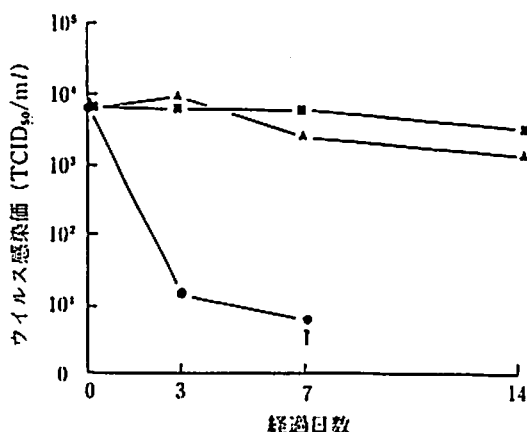


図 2 高圧滅菌、濾過除菌および無処理飼育水中に懸濁した IHNV の消長

■: 高圧滅菌, ▲: 濾過除菌, ●: 無処理

勢で両者の比率は7:3であった²⁾。

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、両属の代表分離株各2株を対象に検討した。各菌株を3種のアミノ酸、酵母エキス、グルコースを主体としたAYG培地²⁾で、25℃2日間培養した後、高圧滅菌、濾過除菌および無処理の培養液を調製し、IHNVに対する作用を観察した。*Pseudomonas* 属の代表2株の培養液の場合、IHNVの感染価は高圧滅菌したものでは変化なく安定であった。しかし濾過除菌液では1株の培養液で3日目に、もう1株では7日目にIHNVは検出できなくなり、両菌株は菌対外に抗IHNV作用を有する物質を産生していることが明らかとなった(図3に1株の例を示した)。さらに菌体を含む無処理培養液中ではIHNVは1時間後に検出できなくなった。このことは菌体外産生物質の作用の他に、感染価測定時の濾過除菌により菌体と共にウイルスが除去されたことによると考えられる。*Achromobacter* 属の2株の濾過除菌培養液には抗ウイルス作用は観察されなかったが、無処理の菌体を含む培養液では *Pseudomonas* の場合と同様1時間後には検出できなくなっていた²⁾。ウイルスの泥など微細粒子への吸着に関してはいくつかの報告があり^{15,16,17,18,19,20,21,22,23)}、この点に関しては今後さらに詳しく検討する必要があると考える。

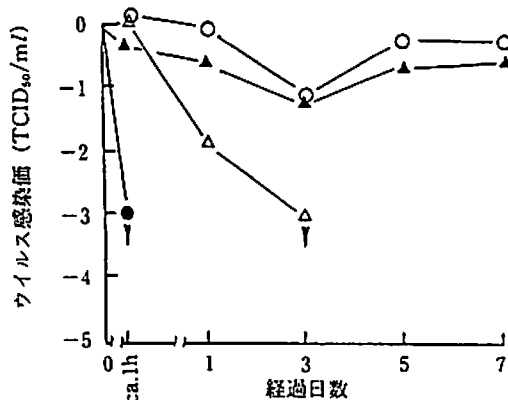


図3 *Pseudomonas* sp. NW-09培養液のIHNVに対する作用
△：濾過除菌，▲：高圧滅菌，●：無処理，○：対照（培地のみ）

このようにIHNVをHanks'BSS中や高圧滅菌した飼育用水中に懸濁した場合は安定であったにもかかわらず、飼育用水中に懸濁した場合に急速な不活化が観察される現象は、飼育用水中に存在する細菌が菌体外へ産生した物質およびウイルスの菌体への吸着による可能性が示唆された。

II. 水圏に存在する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する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た。分離菌について前述の伝染性造血器壊死症ウイルス(IHNV)を用いて抗ウイルス作用のスクリーニングを行った^{24,25,26)}。すなわち分離菌をCYG培地²⁵⁾で15℃3日間培養後、培養液を濾過除菌し、約100 PFU/0.1 mlに調製したIHNVと等量混合し、3時間反応させた後、マスノスケ胚体由来細胞CHSE-214細胞²⁷⁾に接種してプラーク(PFU)を測定した。CYG培地を混合した場合のPFU数と比較し、PFU数が90%以上減少したものを抗ウイルス作用有りと判定した。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で、魚類棲息環境の一般的な菌数と細菌叢を示していた^{3,4)}。それぞれの地点の水試料および底泥試料から分離した総計1453株の細菌について、細菌培養濾液の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。表1に見られるように、試料採取場所、季節にかかわらず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(50%以上のプラーク減少を示したものは18~83%)、これら抗ウイルス活性を示した細菌の多くは *Pseudomonas* 属の細菌であった^{25,26)}。

表1 抗IHNV活性を示した魚類棲息環境由来分離菌の割合

採取場所	試料	分離菌株数	陽性菌株数	
			50%ブランク減少	90%ブランク減少
森 野 化 場	飼育用水	170	31 (18%)	1 (1%)
	底泥	156	66 (42%)	28 (18%)
七飯養魚場	飼育用水	194	48 (25%)	8 (4%)
	底泥	190	45 (24%)	7 (4%)
茂 辺 地 川	河口水	199	126 (63%)	46 (23%)
	底泥	176	103 (59%)	13 (8%)
七重浜海岸	海水	172	77 (45%)	18 (11%)
	底泥	196	43 (22%)	5 (3%)
合 計		1453	539 (37%)	126 (9%)

表2 46NW-04A の理化学的性状

外 観		白色粉末
融 点		232~235°C
比旋光度 ($[\alpha]_D^{25}$)		-47.5° (2.0%, MeOH)
紫外線吸収スペクトル nm(ϵ)		204 (18,200)
赤外線吸収スペクトル (KBr) cm^{-1}		3,300, 2,950, 2,920, 2,850, 1,730, 1,650, 1,520, 1,460, 1,370, 1,270, 1,060
安 定 性		pH 3から pH 10まで安定
溶 解 性	可溶	メタノール, エタノール, 酢酸エチル, アセトン, ベンゼン, クロロホルム, ジエチルエーテル, ジメチルスルフォキシド, ピリジン
呈色反応	不溶	n-ヘキサン, 石油エーテル, 水
	陽性	アニスアルデヒド, プロモクレゾールグリーン, ジニトロフェニールヒドラジン, Dragendorff, 8-ヒドロキシキノリン
	陰性	過マンガン酸カリウム, アンスロン, Barton, 酢酸銅, Legal, Molish, ニンヒドリン, ロードミン
分 子 量		1,125
元素分析		C 54.27%, H 7.94%, N 10.37%
分 子 式		$\text{C}_{54}\text{H}_{95}\text{N}_9\text{O}_{16}$
構成成分	アミノ酸	トレオニン(1), セリン(2), バリン(1), グルタミン酸(1), イソロイシン(1), ロイシン(3)
	その他	3-hydroxydecanoic acid(1)

次に分離した多数の抗ウイルス物質産生細菌の中から代表株として七飯養魚場の飼育用水から分離した *Pseudomonas* sp. 46 NW-04 株を選出し、本菌の産生する抗ウイルス物質の性状を検討した。本菌株は低分子で耐熱性の抗ウイルス物質(46 NW-04 A と仮称)を産生し、30 L の培養上澄液から酢酸エチルによる抽出、シリカゲルカラムクロマトグラフィー及び薄層クロマトグラフィーによる精製で 709 mg の精製抗ウイ

ルス物質を得ることができた。この物質は各種機器分析の結果、分子量が 1126 のペプチド系物質で、セリン 2, トレオニン 1, グルタミン酸 1, バリン 1, イソロイシン 1, ロイシン 3 個の計 9 個のアミノ酸と 3-hydroxydecanoic acid から構成され、pH 及び温度に対して比較的安定な物質であった(表 2)²⁸⁾。そして既知物質との照合の結果これまで報告例のない新しい抗ウイルス物質であることが明らかと

なった。

本物質は魚類病原ヘルペスウイルス (*Onco-rhynchus masoni virus*; OMV)¹⁾を IHNV の 1/2 の濃度すなわち 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で完全に不活化した。しかしバーナウイルスに属す IPNV に対しては 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でもウイルス不活化効果を示さず、エンベロープを有するウイルスに効果的であった。さらに本物質はニジマスに対して 200 mg/Kg 以上でも急性毒性を示さず、またグラム陽性菌 5 属 7 菌種とグラム陰性菌 6 属 12 菌種に対し 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でも抗菌性を示さなかった。一方本物質の IHNV に対する抗ウイルス作用は IHNV 粒子に対する直接作用、すなわち IHNV の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た²⁹⁾。なおこの抗ウイルス物質産生 *Pseudomonas* sp. 46NW-04 株は Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol.1 の記載性状から *P. fluorescens* biovar 1 と同定された³⁰⁾。

III. 抗ウイルス活性を有する細菌を用いたバイオリアクターによる抗ウイルス物質の生産：

これら細菌の産生する抗ウイルス物質を大量に安定的に生産する技術の開発を目的に、細菌を固定化したビーズを作成し、このビーズを充填したバイオリアクターでの抗ウイルス物質産生性を検討した。まず供試菌の液体培地での抗ウイルス物質産生条件の検討を行ったが、細菌のスクリーニングに使用してきた培地 (CYG) のカザミノ酸濃度を 2 倍にし、グルコースと CaCl_2 を除いた培地 (C_2Y) で培養することにより、高い抗ウイルス物質産生性が得られた。そこで菌体を C_2Y 培地成分を含むアルギン酸ビーズに固定化し、本ビーズを充填したバイオリアクターを試作して、稼働条件の検討を行った。15 $^{\circ}\text{C}$ という低温下でも C_2Y 培地を流したカラムから多量の抗ウイルス物質が産生されることが確認され、通気と培地交換により産生量はさらに増大した。得られた収量を C_2Y 培地を用いた振盪培養法と比較するとバイオリアクターでは活性化の期間が必要であったが、活性化後は振盪培養よりも

優れた抗ウイルス物質の産生性が実証された³¹⁾。

一方魚類ウイルス病の防疫対策への利用の可能性を検討するため、ウイルス汚染水を直接上記ビーズ充填カラム内に通した場合、3 日間増菌活性化したカラムでは、30 分の滞留時間で IHNV のプラーク数は約 1/10 に減少し明瞭なウイルス不活化が観察された³²⁾。しかし実際の養魚現場に導入するには大規模な装置が必要となり、また産生抗ウイルス物質は薬剤としての使用となるため製造承認を得る必要があり、さらに薬価と魚価の経済的バランスが保てないと考えられた。

IV. 抗ウイルス物質産生細菌投与によるウイルス病の生物制御の可能性：

これら抗ウイルス物質産生細菌を魚類のウイルス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、大腸菌等組換え体を作成し、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 (Winton, 私信)、この場合も前項同様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 (成功したとしても)、現状の規制下では自然界での利用は難しい。そこで、まず魚類の正常細菌叢を構成する細菌で、性状の把握が容易な腸内細菌³³⁾を対象に抗ウイルス物質を産生する細菌の検索を行い、抗ウイルス物質を産生する細菌を選出し、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^{34,35,36,37,38,39,40)}のうち、淡水生活期の菌叢の主体を成す *Aeromonas* 属および *Enterobacteriaceae*^{34,35,40)}のうち、*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た。さらに飼料ペレットに 10 % の割合に菌体培養液を混ぜ、経口的に投与した場合に腸管内の菌叢の主体を成し、腸管内に定着することが確認された。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* 属が優勢で抗ウイルス活性が認められた。抗 IHNV 物質産生 *Aeromonas* 属菌株を添加した餌料を3週間にわたって給餌した後、IHNV の攻撃試験を行なったところ、抗ウイルス細菌を経口投与した群の累積死亡率が約 10 %、他方対照群は約 30 %と有意の差が観察された(表 3)^{41,42)}。この場合対照群の腸内細菌叢も *Aeromonas* 属が優勢で、腸内容物にも抗ウイルス活性が見られた。そこで対照魚とし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抗ウイルス活性のない対照群を選抜し、再度抗ウイルス細菌経口投与群と共に IHNV による攻撃試験を行った。この場合は、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抗ウイルス活性のない群の累積死亡率は 70 %以上となり、抗ウイルス物質産生菌投与群との差が大きくなった(表 4)^{41,42)}。ただしウイルス攻撃量を 100 倍にした

場合および養魚場の現場で実施した場合には効果は認められなかった(データ未発表)。この原因として IHNV の感染侵入門戸が鰓および体表であることが考えられる。今回の試験は容量 3 l の小型水槽を使用したため、腸内で多量に産生された抗ウイルス物質が糞と共に排泄され(生産効率は前記バイオリアクターを上回る)、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る。

V. 海産魚種苗生産用餌料生物の細菌叢の抗ウイルス物質産生細菌への置換について：

現在ヒラメのウイルス病としては、前述の IHNV と近縁のラブドウイルス；ヒラメラブドウイルス (HRV；*Rhabdovirus olivaceus*) 感染症、ヘルペスウイルスの感染による表皮増生症、

表 3 抗 IHNV 物質産生 *Aeromonas* 属菌株を経口投与した魚に対する IHNV 攻撃試験^{*)}の結果

実験	魚種	投与菌	飼育水温 (°C)	供試尾数	累積死亡率 (%)
I	ニジマス	M-26	15	30	9.6
		対照群 ^{*)2}		30	29.2
		非攻撃対照		30	3.3
II	サクラマス	M-38	5	200	0.5
		対照群 ^{*)2}		200	1.0
		対照群 ^{*)3}		100	72.0
		非攻撃対照		200	0.0~6.0

^{*)1}: 100 TCID₅₀/ml, 60分浸漬法

^{*)2}: *Aeromonas* が優勢、腸内容物の抗ウイルス活性 (90%以上の PFU 減少を示す最大希釈倍数) 10~20

^{*)3}: *Pseudomonas* が優勢、腸内容物の抗ウイルス活性 5 以下

表 4 ヒラメ飼育用ワムシ、ヒラメの体表および消化管内容物から分離された *Vibrio* 属菌株の抗ヘルペスウイルス、抗ラブドウイルス活性

年	由 来	菌株番号	抗ウイルス活性 (PFU 減少)		
			OMV COT 株	IHNV ChAb 株	HRV 8401H 株
1989	ワムシ	1F 9	92	90	96
1989	体表	1FB26	96	94	88
1989	腸管	2F1 6	100	94	94
1989	腸管	2F110	91	91	92

イリドウイルスの一種リンホシスチスウイルスの感染によるリンホシスチス病が知られている¹⁾。ところで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、アルテミア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* 属が優勢であった^{13,14)}。これら *Vibrio* 属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 157 株について、まず IHNV を対象にスクリーニングを行い、90 % 以上のブラーク減少率を示す菌株を 24 株得ることができた。次にこの中で高い抗 IHNV 活性を示した 4 株について抗ヘルペスウイルスおよび抗 HRV 活性を調べた(ヒラメの表皮増生症原因ウイルスは分離不可能のためサケ科魚類のヘルペスウイルス OMV を代用)ところ、供試した 4 株ともに OMV, IHNV, および HRV に対し高いブラーク減少率を示した(表 4)。

ヒラメ飼育過程の適当な時期に、これら抗ウイルス活性を有する細菌を添加して細菌叢をコントロールし、抗ウイルス物質を産生させることができれば、ウイルス病の制御が可能になると考えられる。現在の種苗生産システム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り、塩素による卵消毒も可能である。

そこで、卵消毒後、無菌海水で孵化させたアルテミア培養槽に、抗ウイルス物質産生細菌 *Vibrio* sp. 2 F 16 株を添加してアルテミアを培養し、アルテミア培養液に抗ウイルス活性が観察されるか否かを検討した。本菌株をアルテミアの培養槽に添加した場合、培養開始時には抗ウ

イルス活性は認められなかったが、培養 1 日目におけるブラーク減少率は、混菌培養アルテミアで 65 %, 混菌培養アルテミアの培養液では 72 % となった。さらに培養 2 日目には、混菌培養アルテミアで 56 %, アルテミア培養液では 100 % に達した。対照の無菌培養アルテミアのブラーク減少率は 0 %, その培養液で 7 % であった(表 5)。現在、海産種苗の餌料の多くは、海産クロレラ、ワムシ、アルテミア、養成アルテミアと順次使用され、用水の換水率も比較的低い。今回はアルテミアでの試験であったが、将来実用規模でのワムシあるいはアルテミアの菌叢制御が可能となり、餌料生物が常時抗ウイルス物質を産生するような飼育形体が実現すれば、ウイルス病の生物制御への応用の可能性が開けるものと期待される。

以上(1)~(5)に紹介した結果は、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。

いずれにしても、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。現在、抗ウイルス性生理活性物質¹⁵⁾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の検索が精力的に行なわれている¹⁶⁾。今後より多くの分野で有用微生物が発見され、私たちの生活に

表 5 ヒラメ消化管内容物から分離された *Vibrio* sp. 2F16 株をアルテミア培養槽に添加した場合のアルテミアおよびアルテミア培養液の抗ヘルペスウイルス活性

	ブラーク減少率		
	開始時	1 日目	2 日目
無菌培養アルテミア	0	0	0
無菌培養アルテミアの培養液	0	0	7
混菌培養アルテミア	0	65	56
混菌培養アルテミアの培養液	0	72	100

役立てられることを願ってやまない。

文 献

- 1) Kimura, T., and Yoshimizu, M. (1991): Viral diseases of fish in Japan. *Annual Rev. Fish Dis.*, 1: 67-82.
- 2) 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.
- 3) Kamei, Y., Yoshimizu, M., Ezura, Y., and Kimura, T. (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.
- 4) Kamei, Y., Yoshimizu, M., Ezura, Y., and Kimura, T. (1987): Effect of environmental water on the infectivities of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) and infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *J. Appl. Ichthyology*, 4: 37-47.
- 5) Amend, D. F. (1970): Control of infectious hematopoietic necrosis virus disease by elevating the water temperature. *J. Fish. Res. Board. Can.*, 27: 265-270.
- 6) Desautels, D., and Mackelvie, R. M. (1975): Practical aspects of survival and destruction of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Fish. Res. Board. Can.*, 32: 523-531.
- 7) Mackelvie, R. M., and Desautels, D. (1975): Fish viruses: Survival and inactivation of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Fish. Res. Board. Can.*, 32: 1267-1273.
- 8) Gosting, L. H., and Gould, R. W. (1981): Thermal inactivation of infectious hematopoietic necrosis and infectious pancreatic necrosis viruses. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41: 1081-1082.
- 9) Toranzo, A. E., and Hetrick, F. M. (1982): Comparative stability of two salmonid viruses and poliovirus in fresh, estuarine and marine waters. *J. Fish Disease*, 5: 223-231.
- 10) Toranzo, A. E., Barja, J. L., Lemos, M. L., and Hetrick, F. M. (1983): Stability of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in untreated, filtered and autoclaved estuarine water. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 3: 51-53.
- 11) Magnusson, S., Gundersen, K., Brandberg, A., and Lycke, E. (1967): Marine bacteria and their possible relation to the virus inactivation capacity of sea water. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 71: 274-280.
- 12) Lo, S., Gilbert, J., and Hetrick, F. (1976): Stability of human enteroviruses in estuarine and marine waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 32: 245-249.
- 13) Ward, R., and Ashley, C. S. (1977): Identification of the virucidal agent in wastewater sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33: 860-864.
- 14) Salo, R. J., and Cliver, D. O. (1978): Inactivation of enteroviruses by ascorbic acid and sodium bisulfite. *Appl. Environ. Microbiol.*, 36: 68-75.
- 15) Gerba, C. P., and Schaiberger, G. E. (1975): Effect of particulates on virus survival in seawater. *J. Water Poll. Cont. Fed.*, 47: 93-103.
- 16) Goyal, S. M., and Gerba, C. P. (1979): Comparative adsorption of human enteroviruses, simian rotavirus, and selected bacteriophages to soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 38: 241-247.
- 17) Labelle, R. L., and Gerba, C. P. (1979): Influence of pH, salinity, and organic matter on the adsorption of enteric viruses to estuarine sediment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 38: 93-101.
- 18) Labelle, R. L., Gerba, C. P., Goyal, S. M., Melnic, J. L., Cech, I., and Bogdan, G. F. (1980): Relationships between environmental factors, bacterial indicators, and the occurrence of enteric viruses in estuarine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 39: 588-596.
- 19) Labelle, R. L., and Gerba, C. P. (1980): Influence of estuarine sediment on virus survival under field conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 39: 749-755.
- 20) Smith, E. M., Gerba, C. P., and Melnick, J. L. (1978): Role of sediment in the persistence of

- enteroviruses in the estuarine environment. Appl. Environ. Microbiol., 35: 685-689.
- 21) Fujioka, R. S., Loh, P. C., and Lau, L. S. (1980): Survival of human enteroviruses in the Hawaiian ocean environment: evidence for virus inactivating microorganisms. Appl. Environ. Microbiol., 39: 1105-1110.
 - 22) Herrman, J. E., Kostenbader, K. D., and Cliver, D. O. (1974): Persistence of enteroviruses in lake water. Appl. Microbiol., 28: 895-896.
 - 23) O'Brien, R. T., and Newman, J. S. (1977): Inactivation of polioviruses and coxsackieviruses in surface water. Appl. Environ. Microbiol., 33: 334-340.
 - 24) Kamei, Y., Yoshimizu, M., and Kimura, T. (1987): Plaque assay of *Oncorhynchus masou* virus (OMV). Fish Pathology, 22: 147-152.
 - 25) Kamei, Y., Yoshimizu, M., Ezura, Y., and Kimura, T. (1987): Screening of bacteria with antiviral activity against infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) from estuarine and marine environments. Nippon Suisan Gakkaishi, 53: 2179-2185.
 - 26) Kamei, Y., Yoshimizu, M., Ezura, Y., and Kimura, T. (1988): Screening of bacteria with antiviral activity from the fresh-water salmonid hatcheries. Microbiol. Immunol., 32: 67-73.
 - 27) 吉水 守(1991): バイオテクノロジー素材としての培養細胞, 哺乳類以外の有用細胞, SE & WF-1 細胞, 蛋白質核酸酵素, 36: 2444-2448.
 - 28) Kimura, T., Yoshimizu, M., Ezura, Y., and Kamei, Y. (1990): An antiviral agent (46 NW-04 A) produced by *Pseudomonas* sp. and its activity against fish viruses. J. Aquat. Animal Health, 2: 12-20.
 - 29) Kamei, Y., Yoshimizu, M., Ezura, Y., and Kimura, T. (1992): Isolation and characterization of antiviral substance against salmonid viruses, 46 NW-04 A produced by an aquatic bacterium, *Pseudomonas fluorescens* 46 NW-04. 293-300. In Kimura, T. (ed.), Salmonid Diseases. Sapporo, Hokkaido University Press.
 - 30) Kamei, Y., Yoshimizu, M., Ezura, Y., and Kimura, T. (1988): Identification of *Pseudomonas* sp. 46 NW-04 which produces antiviral agents against fish viruses. Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ., 39: 124-132.
 - 31) Yoshimizu, M., Myouga, H., Kamei, Y., Ezura, Y., and Kimura, T. (1989): Production of antiviral substances by bacterial cells immobilized alginate beads. In Miyachi, S., Karube, I., and Ishida, Y. (eds.), Current Topics in Marine Biotechnology. 77-80. Tokyo, The Japanese Society for Marine Biotechnology.
 - 32) 木村喬久・吉水 守(1988): 魚類棲息環境水から分離された細菌の産生する抗ウイルス物質の IHNV 防疫対策への利用の可能性について II. 魚類棲息 環境由来抗 IHNV 物質産生細菌 *Pseudomonas* 46 NW-04 株を用いたバイオリアクター(固形化菌体)の水中心ウイルス不活化効果について(予報), 147-150. 昭和 62 年度魚病対策技術開発研究結果報告書, 防疫技術開発研究, 増殖対象 サケ科魚類の防疫技術に関する研究, 東京, 日本水産資源保護協会.
 - 33) 吉水 守(1986): 魚類の消化管内細菌(好気性細菌), 9-24. 河合 章編, 水産増殖と微生物, 水産学シリーズ 61, 東京, 恒星社恒星閣.
 - 34) Yoshimizu, M. and Kimura, T. (1976): Study on the intestinal microflora of salmonids. Fish Pathology, 10: 243-259.
 - 35) 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, 日本誌, 42: 91-99.
 - 36) 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, 日本誌, 42: 863-873.
 - 37) 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, 日本誌, 42: 875-884.
 - 38) 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, 日本誌, 42: 1281-1290.
 - 39) 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 遼河魚の腸内細菌叢, 日本誌, 42: 1291-1298.
 - 40) 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.

- 41) Yoshimizu, M., Kimura, T., and Ezura, Y. (1991): Control of infectious hematopoietic necrosis in salmonid fish by feeding live bacteria producing antiviral substances. 227-233. *In* Fryer, J. L. (ed.), *Proceedings of Second International Symposium on Viruses of Lower Vertebrates*. Corvallis, Oregon State University Printing Department.
- 42) Yoshimizu, M., Fushimi, Y., Kouno, K., Shinada, C., Ezura, Y., and Kimura, T. (1992): Biological control of infectious hematopoietic necrosis by antiviral substance producing bacteria. 301-307. *In* Kimura, T. (ed.), *Salmonid Diseases*. Sapporo, Hokkaido University Press.
- 43) 木村喬久・絵面良男・田島研一・吉水 守 (1990): ヒラメ飼育水槽の微生物叢の研究, 1-13, 平成元年度健苗育成技術開発研究結果の概要, 東京, 水産庁研究部研究課.
- 44) 木村喬久・吉水 守 (1991): 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, 1-18, 平成2年度健苗育成技術開発研究結果報告書, 東京, 水産庁研究部研究課.
- 45) 絵面良男 (1990): 細菌由来の抗ウイルス作用物質, 9-20. 安元 健編, 海洋微生物の生理活性物質, 水産学シリーズ 79, 東京, 恒星社恒星閣.
- 46) 奥谷康一 (1987): 微生物の生理活性物質, 46-57. 安元 健・神谷久男編, 海産有用生理活性物質, 水産学シリーズ 65, 東京, 恒星社恒星閣.