



Title	魚へのプロバイオティクス投与に期待されるもの
Author(s)	吉水, 守
Citation	育てる漁業, 461, 3-7
Issue Date	2013-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/57070
Type	journal article
File Information	555sodateru461 3-7.pdf



北海道大学大学院水産科学研究院
特任教授 吉水 守

今月の 講座

魚へのプロバイオティクス投与に期待されるもの

1. はじめに：

プロバイオティクスとは腸内フローラのバランスを改善して有益な作用をもたらす生きた微生物のことを云います。具体的には、腸内細菌叢のバランスを整え、悪玉細菌による腸内の異常状態を改善して健康に良い影響を与える生きた善玉腸内細菌を指します。プロバイオティクスの条件としては1) 安全性が保証されていること、2) もともとその宿主の腸内フローラの一員であること、3) 胃液、胆汁などに耐えて生きたまま腸内に到達できること、4) 小腸下部や大腸で増殖可能なこと、5) 宿主に対して有用効果を発揮しうること、6) 食品などの形態で有効な菌数が維持できること、7) 安価かつ容易に取り扱えること、があげられています。最近では、ヨーグルトあるいは乳酸菌飲料を指して使用されていることもあります。

魚にも腸内細菌がいるはずだ！私が研究室に入った時に申し出た研究テーマです。当時は定説がありませんでした。卒論・修論・博論研究をとおしてわかったことは、魚の生息環境にいる細菌の中で胃酸・胆汁に耐え、腸管内嫌気条件下でよく増殖する細菌として、淡水魚では *Aeromonas* 属、海産魚では

Vibrio 属細菌が腸内細菌叢の主要な構成員となることでした¹⁾。これら魚の腸内細菌の有効利用として、当時産業的に問題となっていたウイルス病の原因ウイルスに拮抗的に働く腸内細菌を選抜し、プロバイオティクスとして経口投与して病気対策に生かせないかと考えました。

2. 種苗生産における病気対策

魚介類の種苗生産事業の進展に伴い、それぞれの種が持つあるいは感受性を有する病原体による病気が問題となり、その対策に多くの労力を費やしてきました。特にウイルス病の場合は被害が大きく深刻な問題となりました²⁾。生物を増やすとその生物の持つ微生物も増え、善玉・悪玉を問わず増殖して飼育環境中の数が増加します。多くの例では、技術開発が完了し、量産体制に入ると病気が発生し、その対策に翻弄されました。現在、親から子への垂直感染を防ぐために親魚選別を行い、卵の洗浄と消毒後、殺菌した飼育用水を用いて孵化・飼育し、種苗を生産し順調に経過するようになりました。飼育用水の殺菌は必須ですが、現状の殺菌法では善玉菌も殺してしまいます。飼育環境水中での病原体の生存性を知り、さらに他の微生物

物との相互作用を明らかにして、魚が持つ善玉菌の力を借りて病原菌の抑制が出来れば、環境にも優しい手法であると考えます。

魚類のウイルス病対策確立を目指して研究を進めるなかで、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観察していました。その過程で、病気が発生している池の排水からのウイルス分離を試みると数は大幅に減少していました。飼育水にウイルスを添加し、その感染価の変化を調べると、ウイルスの感染価は微生物の存在する水で早く減少することがわかりました³⁾。しかもウイルスを不活化する物質を産生する細菌が、水圏に広く分布し、比較的容易に高率に分離されることがわかりました⁴⁾。

魚類でもワクチンが開発され、市販されるようになって来ましたが、稚仔魚が免疫応答を示すまでの期間は、従来どおりの病気対策に頼らなければなりません⁵⁾。そこで、これら抗ウイルス物質を産生する魚の腸内細菌をプロバイオティクスとして餌料あるいは餌料生物と共に経口投与してウイルス病の制御ができないかと考えました^{4,5)}。

ヒトでは機能性が期待されるヨーグルトが多く市販されるように

なっています。古来、乳酸菌飲料あるいは発酵乳製品は健康によいとされています。魚でも乳酸菌の投与が検討されていますが、まず魚の正常腸内細菌の中からウイルスを不活化する能力を有する細菌を選び出し、宿主に戻す形で、サケ科魚類の伝染性造血器壊死症ウイルス (IHNV)、マツカワ (*Veraspermoseri*)・ヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) 等の魚類ノダウイルス (NNV) とウイルス性表皮増生症原因ウイルス (FHV)、コイヘルペスウイルス (KHV) を対象に検討しました。

ここでは、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からの分離、種類および代表株の産生する物質、ならびに抗ウイルス活性を有する魚類の腸内細菌をプロバイオティクスとして経口投与した場合の腸内容物および飼育水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と思います。

3. 水棲細菌による IHNV ウイルス不活化現象：

1980 年頃は、魚類ウイルスが宿主である魚を離れ、環境水中に出たのち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した。そこで、まずサケ科魚類の代表的な病原ウイルスである 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

いて観察しました。IHNV の感染価を 0、5、10、15℃ の各温度条件下で 14 日間観察したところ、0℃ では 14 日間安定でしたが、15℃ では 14 日間安定でしたが、15℃ では飼育水中で 7 日目に感染価の大幅な減少が観察されました。この傾向は温度が高い方が顕著で、14 日目には 5、10℃ でも検出限界以下となりました (図 1)³⁾。飼育水中には微生物が存在し、IHNV の感染価の減少は温度に加え共存する微生物が関与している可能性が示されました。そこで高圧滅菌あるいは濾過除菌した飼育水中での感染価の変化を比較しました。無処理飼育水中では急速な感染価の減少が観察されましたが、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ました (図 2)⁶⁾。

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、飼育水に培地を加えて 15℃ で 7 日間培養し、0.22 μm 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ました。ウイルスの感染価は 5、15℃

表 1. 魚類飼育環境からの抗ウイルス物質産生細菌の分離

場 所	試料	供試菌数	50%以上のプラーク減少率を示した菌株数 (%)
森野化場	水	170	1 (0.6%)
	底泥	156	28 (17.9%)
七飯養魚場	水	194	8 (4.1%)
	底泥	190	7 (3.7%)
渡辺地川河口	水	199	48 (23.1%)
	底泥	177	13 (7.3%)
七重浜海岸	水	176	18 (10.2%)
	底泥	195	5 (2.6%)
合 計		1458	126 (8.6%)

共に 3 日目に検出限界以下となり、培養液の微生物叢は細菌が優勢で、真菌類や原生動物等は見られず、細菌数は 1.8×10^8 CFU/ml、細菌叢は *Achromobacter* および *Pseudomonas* 属細菌が優勢でした³⁾。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はずであり、両属の代表分離株を対象に調べました。*Pseudomonas* 属代表株の培養液に IHNV を加えた場合 4～8 日後にウイルスの感染性はなくなりました⁶⁾。さらに菌体を含む培養液にウイルスを加えて 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りました。このことは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ました。

同様の試験をコイヘルペスウイルスを対象に行ったところ、霞ヶ浦の湖水と泥、神奈川県の鶴見川の河川水、函館近郊の 3 河川および五稜郭公園の堀の水とともに、15℃ では最長 3 日でウイルスは不活化し、温度が高くなるとより速やかに不活化しました。この不活化を実験室で確かめるため、五稜郭公園の堀の水を実験室に運び、KHV を懸濁後直ちにコイを飼育したところ、コイは全数死亡しました。しかし 3 日後にコイを入れて飼育した場合、発症・死亡は見られませんでした。霞ヶ浦の湖水および函館近郊の河川水から KHV を不活化する細菌が分

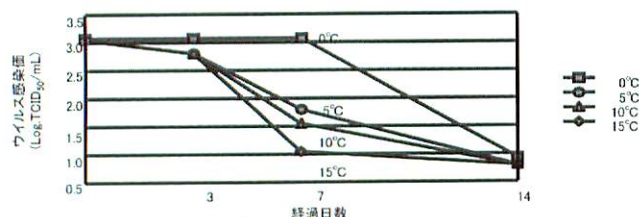


図 1. 魚類飼育水中での IHNV ウイルスの生存性。

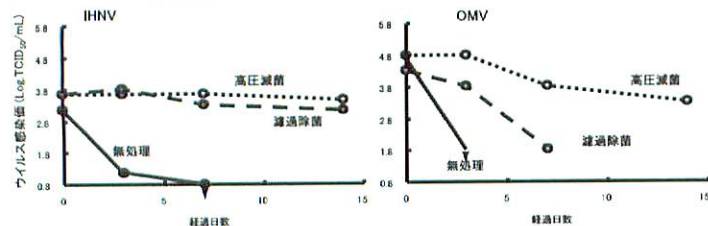


図 2. 魚類飼育水中における IHNV および OMV の生存性 (15℃)。

●○● 高圧滅菌 ●○● ろ過除菌 (0.22 μm) ● 無処理 ▼ 検出限界

離されています⁷⁾。

4. 抗ウイルス作用を有する細菌の分布・種類ならびに代表株が産生した抗ウイルス物質の性状:

こ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知るために、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、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生菌数と菌叢を調査し、分離菌について IHNV を対象に抗ウイルス作用のスクリーニングを行いました^{6,8,9)}。各種試料の生菌数とその細菌叢はこれまでの研究結果とほぼ同じであり、魚類棲息環境の一般的な菌数と細菌叢を示していました⁶⁾。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抗ウイルス作用を観察しました。表 1 に見られるように、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% と予想外に多く見つかりました^{8,9)}。

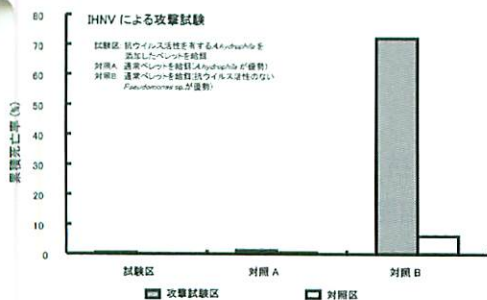


図3. 抗 IHNV 活性を有する腸内細菌 *Aeromonas hydrophila* M-36 株を添加したペレットを給餌したサクラマスの死亡率。

抗ウイルス活性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、ペプチド系の物質で計 9 個のアミノ酸と 3-hydroxydecanonic acid から構成される新しい物質でした¹⁰⁾。本物質は魚類ヘルペスウイルス (*Oncorhynchus masou virus*; OMV) の他、狂犬病ウイルスやヒトの単純ヘルペスウイルス (HSV)、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) に対しても抗ウイルス効果を示しました。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がレセプターをコーティングあるいは崩壊するものと推察されています。他の 5 株の検討結果では、同様のペプチ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ました¹¹⁾。

5. 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病制御に応用するにあたり、まず、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を対象に抗ウイルス物質を産生する細菌の検索を行いました。サケ科魚類の腸内細菌叢¹²⁾のうち、淡水棲息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いました。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、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% の割合で菌体培養液を混ぜ、経口的に投与すると、腸管内の菌叢の主体を成して腸管内に定

着しました。そして腸内容物も強い抗ウイルス活性を示しました。この細菌の培養液を 10% 添加したペレットを 3 週間ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) に給餌した後、100TCID₅₀/ml の IHNV で浸漬攻撃したところ、試験群の累積死亡率が約 10%、対照群は約 30% と有意の差が見られました。ただ、この場合、対照に用いた魚の腸内細菌叢も *Aeromonas* 属細菌が優勢で腸内容物に抗ウイルス活性が認められました。そこで、サクラマス (*O. masou*) を用い抗ウイルス物質を産生しない *Pseudomonas* 属が優勢で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作出し、再度抗ウイルス細菌投与群と共に IHNV による攻撃を行いました。対照群の累積死亡率は 70% となり、抗ウイルス物質産生菌投与群との差が大きく開きました (図 3)^{4,13)}。しかし、養魚場のニジマスに対し同様の経口投与した場合には効果が認められませんでした。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、および養魚場では流量が大きいために飼育水中の抗ウイルス物質が流されてしまったためと考えました。そこで、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腸内細菌を投与し、ウイルス病の防除が可能かどうかを検討することにしました。

6. 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:

ヒラメやマツカワのウイルス病として魚類ノダウイルスによるウイルス性神経壊死症 (NNV) やヒラメラブドウイルス (HIRRV) の感染

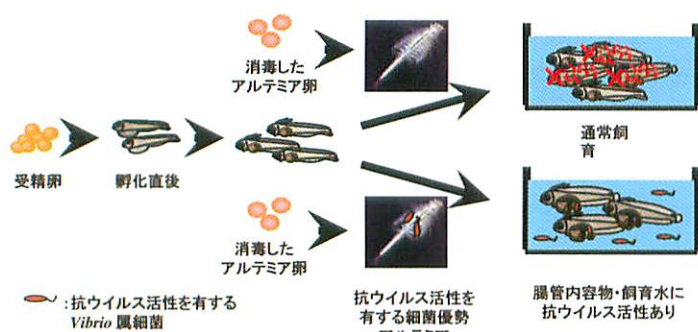


図4. 抗ウイルス活性を有する細菌を用いたマツカワのウイルス性神経壊死症制御の試み。

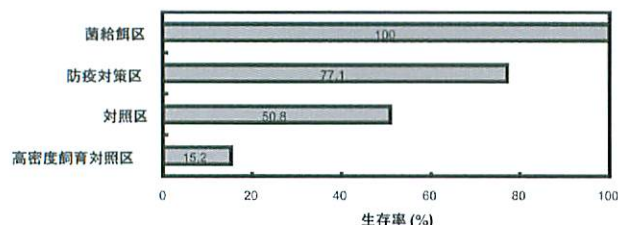


図5. 抗 BF-NNV 活性を有する腸内細菌 *Vibrio* sp. 9715 株を添加したアルテミアを給餌したマツカワの生存率。

症、ヘルペスウイルス (FHV) によるウイルス性表皮増生症、リンホシスチス病ウイルスによるリンホシスチス病が知られています²⁾。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* spp.) および飼育仔稚魚の細菌叢を調査した結果、仔稚魚の消化管内の菌叢の主体は *Vibrio* 属細菌でした¹⁴⁾。これら *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ました。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 (FHV) 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 BF-NNV (barfin flounder nervous necrosis virus) 活性を調べ、IHNV、HIRRV、OMV および BF-NNV に対し強い抗ウイルス効果を示す 2IF6a 株を得ることが出来ました^{4,5)}。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す。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、滅菌海水で孵化させ、*Vibrio* sp. 2IF6a 株を添加して培養しました。細菌を添加したアルテミアは、培養開始時に抗ウイルス活性は認められませんでした。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、BF-NNV に対しては 90% の感染価減少を示しました。さらに、アルテミア培養液ではそれぞれ 100% と 99% を示しました。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ませんでした。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 *Vibrio* 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菌に置き換えられると考えました (図 4)。

7. 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：

上記 *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ました。このアルテミアおよびマツカワ腸内容物の 10 倍希釈濾液に $10^{5.8}$ TCID₅₀/ml に調製した BF-NNV を混合し、3 時間接触させるとウイルス感染価は共に 99.99% 以上減少しました。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ました。マツカワ仔魚を換水率 0 ~ 300% で 6 日間飼育した後の生存率は、防疫対策実施区で 77.1%、通常飼育区で 50.8%、高密度飼育区で 15.2% でしたが、抗ウイルス物質産生菌給餌区では全く死亡は見られませんでした (図 5)。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りました¹⁵⁾。3 年間同様の給餌飼育を行いました。稚魚の成長の遅れもなく、従来散見された FHV によるウイルス性表皮増生症も見られなくなりました。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仔のウイルス防除対策として有効に活用できると考えます。

8. 抗ウイルス物質産生 *Vibrio* 属細菌添加ワムシの経口投与によるヒラメのウイルス性表皮増生症の防除：

2005 年にシオミズツボワムシ複相単性生殖卵の消毒が可能になりましたので¹⁶⁾、アルテミアの前に給餌する初期餌料のワムシに抗ウイルス活性を持たせることができれば、稚仔魚期の早期からウイルス病の防除対策に用いることが期待できます。まず、ヒラメ腸管内容

物から抗ヘルペスウイルス活性を有する細菌の探索を行い、33.3%の割合で分離することができました。消毒したワムシ卵を殺菌海水で孵化させた後に、抗BF-NNV, IHN, OMV活性を有するシヨ糖分解能陰性の *Vibrio* sp. V-15 株を添加したところ、ワムシの細菌叢は *Vibrio* 属細菌が優勢となりました。対照のワムシの細菌叢が *Flavobacterium* 属優勢であったことから、ワムシの細菌叢は制御可能であると判断しました¹⁶⁾。次いで、*Vibrio* sp. V-15 株が優勢となったワムシをヒラメに給餌し、14日後のヒラメ腸管内容物の細菌叢をシヨ糖分解能を指標に調べたところ、ヒラメ腸管内の細菌叢も添加した *Vibrio* が優勢となりました。このとき、ヒラメの生残率および成長率に対照区と差はなく、細菌を給餌することによるヒラメへの悪影響はないと判断しました。また、抗ヘルペスウイルス活性を有する *V. alginolyticus* V-23 株を添加したワムシをヒラメ稚仔魚に給餌したときの、ヒラメ腸管内および飼育水への抗ヘルペスウイルス活性の賦与について調べ、 10^3 TCID₅₀ のウイルスを不活化する最大希釈倍数で求めた抗ヘルペスウイルス活性は、給餌10日では差が見られなかったものの、給餌20日以降、細菌添加区のヒラメでは対照区の2～5倍、細菌添加区の飼育水では

対照区の2～4倍の抗ヘルペスウイルス活性が測定されました(図6)¹⁷⁾。このように、抗ウイルス物質産生腸内細菌を添加したワムシを給餌することにより、飼育水中に侵入したウイルスを不活化でき、より早期のウイルス病対策が期待できると考えます。

9. おわりに:

以上は、魚類のウイルス病対策への応用を目的としたものですが、貝類ではカキの消化管内からカリシウイルスやヘルペスウイルスを不活化する細菌が見つかっていません。カキの浄化の際に無菌化したキートセロスに添加して給餌すればノロウイルス(NV)を不活化できると考えますが、NVは培養できないために成果を示すことができません。カキヘルペスウイルスによるカキ種苗の大量死が外国で問題になっています。抗ヘルペスウイルス活性を有するカキ腸内細菌をプロバイオティクスとする飼育技術は、万が一このウイルスが国内に侵入したときに備え検討しておく価値はあると考えます。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ます。今まで、あまり調査対象とされてこなかった

水中の微生物、特に地球の2/3以上を占める海洋の微生物の中には、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ます。探せば必ず目的とする微生物は見つかります。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います。

10. 文献:

- 1) 吉水 守(分担)(1986)『水産増養殖と微生物』水産学シリーズ61, 河合 章編, 恒星社恒望閣, 東京, pp. 9-24.
- 2) 吉水 守・笠井久会(2005) 化学と生物, **43**: 48-58.
- 3) 吉水 守・瀧澤宏子・亀井勇統・木村喬久(1986) 魚病研究, **21**: 223-231.
- 4) 吉水 守・絵面良男(1999) *Microbes Environ.*, **14**: 269-275.
- 5) 吉水 守 1999 アクアネット, **2**: 32-37.
- 6) Kamei, Y., M.Yoshimizu, Y.Ezura and T.Kimura (1987) *Bull.Fac.Fish. Hokkaido Univ.*, **38**: 271-285.
- 7) Shimizu T., Yoshida N., Kasai H. and M. Yoshimizu (2006) *Fish 200 Pathol.*, **41**, 153-157.
- 8) Kamei, Y., M.Yoshimizu, Y.Ezura and T.Kimura (1987) *Nippon Suisan Gakkaishi*, **53**: 2179-2185.
- 9) Kamei, Y., M.Yoshimizu, Y.Ezura and T.Kimura (1988) *Microbiol.Immunol.*, **32**: 67-73.
- 10) Kimura, T., M.Yoshimizu, Y.Ezura and Y.Kamei (1990) *J.Aquat.Anim. Health*, **2**: 12-20.
- 11) Myouga, H., M.Yoshimizu, Y. Ezura and T. Kimura (1993) *Fish Pathology*, **28**: 9-13.
- 12) Yoshimizu, M. and T.Kimura (1976) *Fish Pathol.*, **10**: 243-259.
- 13) Yoshimizu, M., Y.Fushimi, K.Kouno, C.Shinada, Y.Ezura and T.Kimura (1992) In 『Salmonid Diseases』ed by T.Kimura. Hokkaido University Press, Sapporo, pp. 301-307.
- 14) 吉水 守・石川香織・河野和子・岩山奈央・木村喬久(1999) 北大研究彙報, **50**:193-200.
- 15) Watanabe, K., T. Nishizawa and M. Yoshimizu (2000) *Dis. Aquat. Org.*, **41**: 219-223.
- 16) 渡邊研一・篠崎大祐・小磯雅彦・桑田 博・吉水 守(2005) 日水誌, **71**:294-298.
- 17) 清水智子・篠崎大祐・笠井久会・澤辺智雄・渡邊研一・吉水 守(2005) 水産増殖, **53**: 275-278.
- 18) Shimizu T., Yoshida N., Kasai H. and M. Yoshimizu (2006) *Fish Pathol.*, **41**, 153-157.

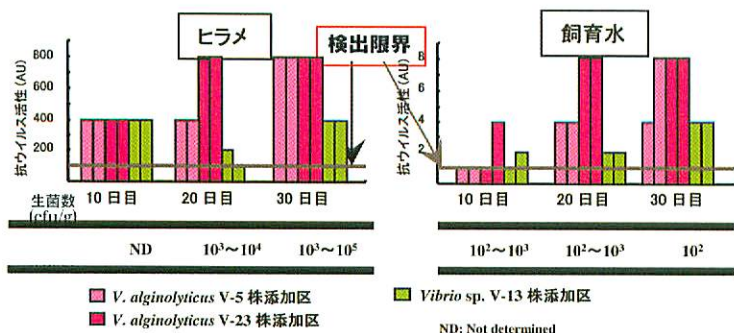


図6. 抗ヘルペスウイルス活性を有する *V. alginolyticus* V-5 株, V-23 株投与時のヒラメ腸内容物および飼育水の抗ウイルス活性。