



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	水産学領域におけるプロバイオティクスの応用：魚介類の腸内細菌を用いたウイルス病の予防
Author(s)	吉水，守；笠井，久会；渡邊，研一
Citation	腸内細菌学雑誌, 28(1), 7-14 https://doi.org/10.11209/jim.28.7
Issue Date	2014-02-11
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/57913
Type	journal article
File Information	557_chonai_28_7-14.pdf



水産学領域におけるプロバイオティクスの応用 —魚介類の腸内細菌を用いたウイルス病の予防—

吉水 守^{1*}, 笠井 久会¹, 渡邊 研一²

^{1*}北海道大学大学院水産科学研究院, ²東京農業大学生物生産学部

Approaches to Probiotics for Aquaculture —Prevention of Fish Viral Diseases Using Antiviral Intestinal Bacteria—

Mamoru YOSHIMIZU^{1*}, Hisae KASAI¹, and Kenichi WATANABE²

^{1*}Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University, ²Faculty of Bio-Industry, Tokyo University of Agriculture

要 旨 魚介類の腸内細菌叢に関する研究が進み、近年は分子生物学的手法を用いた解析法が導入され、多くの知見が集積され、その全容解明と働きが徐々に解明されてきている。成長促進や疾病予防に関与するプロバイオティック微生物の発見のみならず、食の安全にまでリンクした研究が展開できるようになってきた。ここでは水産分野でのプロバイオティクス研究の一つとして、種苗生産過程における仔稚魚のウイルス病予防の観点から、抗ウイルス活性を有する腸内細菌を用いた疾病予防についての研究成果を概説する。淡水生活期のサケ科魚類の腸内菌叢の主体を成す *Aeromonas* 属細菌を対象に伝染性造血器壊死症 (IHN) ウイルスに対する抗ウイルス作用を示す菌株のスクリーニングを行い、90%以上のブラーク減少を示す菌株を3株得た。分離菌は飼料ペレット成分を栄養源として抗ウイルス物質を産生し、ペレットに10%の割合で菌体培養液を混ぜ経口投与すると、腸内容物も強い抗 IHNV 活性を示した。分離菌添加ペレットを3週間ニジマスおよびサクラマスに投与後、100TCID₅₀/ml の IHNV で浸漬攻撃を行ったところ有意な差が認められた。マツカワやヒラメの腸内細菌である *Vibrio* 属細菌を対象に、抗 IHNV、サケ科魚ヘルペスウイルス (OMV) およびウイルス性神経壊死症 (VNN) 原因ノダウイルス (BF-NNV) 活性を調べ、3者に対し強い抗ウイルス効果を示す *Vibrio* sp. 2IF6 株を得た。生物餌料の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分離株を添加して培養すると、アルテミアホモジナイズ液は培養2日後に BF-NNV に対して90%の感染価減少を示し、培養液は99%を示した。このアルテミアを給餌したマツカワの腸内容物の10倍希釈は10^{5.8}TCID₅₀/ml の BF-NNV の感染価を99.99%以上減少させた。換水率0~300%で60日間飼育したマツカワ仔魚に VNN は発生せず、生存率は通常飼育区より高くなった。シオミズツボムシの複相単性生殖卵を消毒し、ヒラメの腸内から分離した抗 OMV 活性を示す *V. alginolyticus* V-23 株添加したワムシをヒラメ仔魚に給餌し、10³TCID₅₀ の OMV を不活化する最大希釈倍数で抗 OMV 活性を求めると、給餌20日以降、分離菌添加区のヒラメの腸内容物では対照区の2~5倍、飼育水では対照区の2~4倍の抗 OMV 活性が測定された。さらに、貝類ではカキの中腸腺から分離した *V. neptunis* V-176 株が *Norovirus* 代替えネコカリシウイルスを、*Vibrio* sp. V-4 株がカキヘルペスウイルス (OsHV-1 μ Var) 代替え OMV を不活化した。これらの細菌をカキの餌料である無菌化キートセロスに添加して給餌すれば、魚類と同様にウイルス病の予防あるいは不活化が期待できると考える。

Abstract Generally, normal bacterial microbiota play an important role in inhibiting the growth of pathogenic bacteria in the intestine or on the skin, and stimulate the immune responses of host animals. In aquaculture, mortalities of larvae and fry of cultured fish due to viral diseases remain a major problem for regular food production. Although vaccines can be useful to control viral diseases, because of a immature immune system, they are not effective during the early stages of larval growth. Therefore alternative strategies to control viral diseases are required for sustainable aquaculture and seed production. We investigated fish pathogenic viruses in an aquatic environment in order to understand their survival and interactional relationships with bacteria for the prevention of fish viral diseases in aquaculture. In a series of studies of the microbial ecosystem, we found that many bacte-

2013年6月13日受付 2013年10月21日受理

* 〒041-8611 北海道函館市港町3丁目1-1

3-1-1 Minatocho, Hakodate, Hokkaido 041-8611, Japan

riaproducing antiviral substances could be isolated from aquatic environments, such as hatchery water supply, river mouth water, beach water, and intestinal contents of aquatic animals. 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*), barfin flounder (*Verasper moseri*) and Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aeromonas* strains produced anti-infectious hematopoietic necrosis (IHN; *Novirhabdovirus*) substances, and *Vibrio* strains showed anti-IHN, salmonid herpesvirus *Oncorhynchus masou* virus (OMV; *Salmonivirus*), hiramé rhabdovirus (HIRRV), barfin flounder nervous necrosis virus (BF-NNV; *Nodavirus*) and feline calicivirus (FCV) activities. When *A. hydrophila* 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 microbiota and anti-IHN activity was observed in homogenates of intestinal contents. These rainbow trout and masu salmon fed the *Aeromonas* spp. showed more resistance to artificial IHN challenge tests. Barfin flounder fed *Vibrio* spp. strains 2IF6 with *Attemia* sp. showed anti-IHN, OMV, HIRRV and BF-NNV activities in their intestinal contents. Larvae fed the *Vibrio* spp. showed a higher survival rate than the control fish. In the case of Japanese flounder larvae fed with *V. alginolyticus* strain V-23 manipulated rotifer showed anti-OMV (FHV; flounder herpesvirus surrogate) activities in the intestinal contents and rearing water in the tank. Furthermore, *V. neptunis* strain V-176 and *Vibrio* sp. Strain V-4 isolated from intestinal contents of Pacific oyster showed anti-feline calicivirus (FCV; *Norovirus* surrogate) and OMV (Ostreid herpesvirus-1 microvariant (OsHV-1 μ Var) surrogate) activities. *Norovirus* and OsHV-1 μ Var will hopefully be inactivated in the intestines of oysters fed *V. neptunis* V-176 or *Vibrio* sp. V-4 with *Chaetoceros gracilis*, respectively. These results show that, by manipulating diets with anti-viral substance-producing bacteria, the resistance of fish or shellfish larvae to viral disease can be improved thereby helping to ensure regular food production through aquaculture.

Key words : probiotics ; aquaculture ; viral disease ; prevention

はじめに

魚類の腸内細菌叢に関する研究が進み、近年は分子生物学的手法を用いた解析法が導入され、多くの知見が得られている (1)。ヒトと同じように魚介類の消化管、とくに腸管にも多数の細菌が存在し、胃酸と胆汁酸に耐え、かつ腸管内の酸素のない環境下でもよく増殖できる細菌が選択されて定着している。魚類は変温動物であり生息域の温度も重要な選択要因となっている (2)。腸管の長い魚では、人と同じように嫌気性細菌が多くなっているが、魚の生息環境に存在する細菌の中で、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っている (3)。

魚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た (4)。特にウイルス病の場合は被害が大きく深刻な問題である (5)。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する。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、種苗を生産して順調に経過するようになっている (6)。飼育用水の殺菌は必須であるが、現状の殺菌法では善玉菌も殺してしまう (7)。飼育環境水中での病原体の生存性を

知り、さらに他の微生物との相互作用を明らかにして、水中に存在する善玉菌の力を借りて病原菌の抑制ができれば環境にも優しい手法であると考える。

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、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た過程で、病気が発生している池の排水中の感染性ウイルス数は大幅に少なくなっていた (8)。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飼育水中で早く減少することが明らかになり、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明らかになった (9)。

魚類でもワクチンが開発され、市販されるようになってきたが、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らない (10)。ヒトでは、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、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きた。魚でもナマズやコイ、クサフグから乳酸菌が分離され、その投与が検討されているが (11)、私共は 1980 年代からこれら抗ウイルス物質を産生する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予防ができないか検討を行ってきた (12)。そこで、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 (IHN), マツカワ (*Verasper*

moseri) およびヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) 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作用機序、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予防への応用例を紹介する。

水棲細菌による伝染性造血器壊死症ウイルス (IHNV) 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 (IHNV) (4) 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 日間安定であったが、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った (Fig. 1) (8)。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たところ、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 (Fig. 2) (13)。

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、飼育水に細胞培養用培地 (抗生物質無添加) 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た。ウイルスの感染価は 5, 15℃ 共に 3 日目に検出限

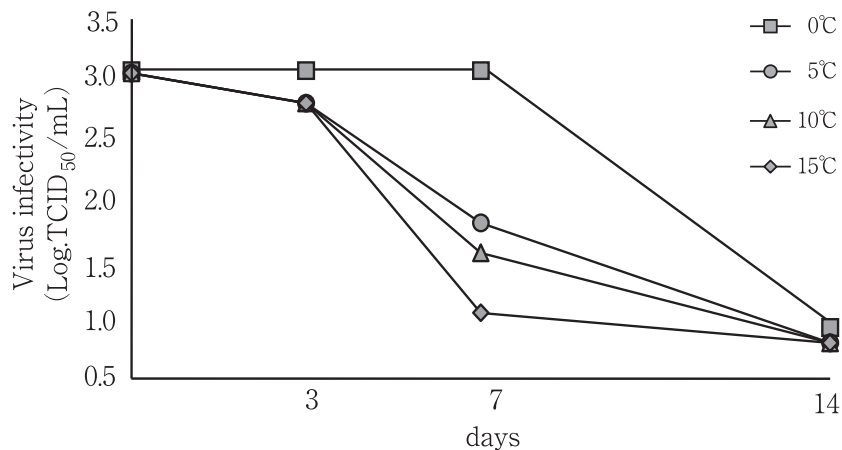


Fig. 1. Survivability of IHNV in fish rearing water

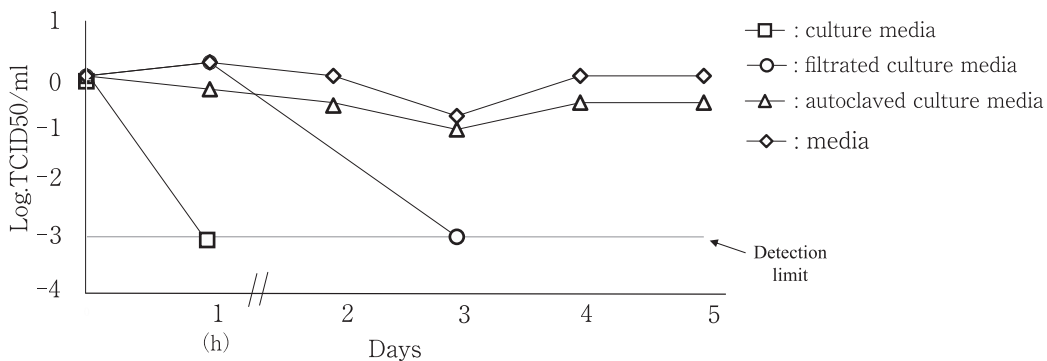


Fig. 2. Infectivities of IHNV in culture media of *Pseudomonas* sp. NW-09, filtrated culture media, autoclaved culture media and non cultured media.

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

Source of isolates			50% plaque	90% plaque
Place	Sample	Tested	reduction	reduction
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 (42%)	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.

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、生菌数は 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はずであり、両属の代表分離株を対象に検討した。*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、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った。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られる。

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、神奈川県下の鶴見川の河川水、函館近郊の 3 河川および五稜郭公園の堀の水ともに、15℃で最長 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た。この不活化を実験室で確かめるために、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・死亡は見られなかった。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離されている (14)。

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った (15) (16)。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た。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た。Table 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った。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あった (17)。本物質は魚類ヘルペスウイルス (*Oncorhynchus masou* virus; OMV) (4) 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ら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る。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た (18)。

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、その代表株をプロバイオティクスとして用い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 (2) 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、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。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た。そして腸内容物にも強い抗ウイルス活性が認められた。抗ウイルス性細菌の培養液を 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 で浸漬攻撃試験を行ったところ、試験群の累積死亡率が約 10%、対照群は約 30% と有意の差が観察された。ただし、この場合対照に用いた魚の腸内細菌叢も *Aeromonas* 属細菌が優勢であり、腸内容物に抗ウイルス活性が認められた。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* 属が優勢かつ腸内容物に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 による攻撃試験を行った。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なった (Fig. 3) (19)。しかし、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 の感染侵入門戸が鰓および体表であること、養魚場では流水量が大きいため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られる。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した。

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 (4) や IHNV と近縁のヒラメラブドウイルス (HIRRV) (4) の感染症、ヘルペスウイルスによるウイルス性表皮増生症

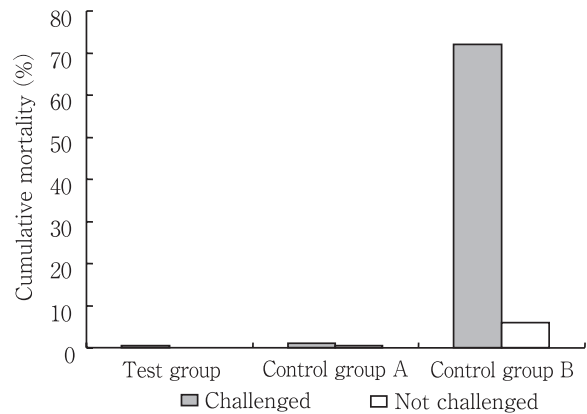


Fig. 3. IHNV challenge test for masu salmon fed *Aeromonas* sp. strain M-38 in their diet. IHNV strain ChAb was used. Challenge dose was 100 TCID₅₀/ml for 60 min. Test group: Fed *A. hydrophila* with diet, Control group B: Fed commercial pellet (*A. hydrophila* was dominant), Control group C: Fed commercial pellet (*Pseudomonas* sp. was dominant).

(4)、イリドウイルスの一種リンホシスチスウイルス (4) によるリンホシスチス病が知られている。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* 属細菌であった (20)。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*) 由来株 OMV 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 2IF6 株を得た (9)。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り、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、抗ウイルス物質産生 *Vibrio* sp. 2IF6 株を添加して培養した。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、BF-NNV に対しては 90% の感染価減少を示した。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。マツ

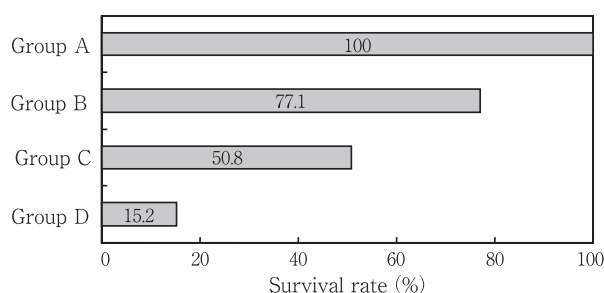


Fig. 4. Survival rate of barfin flounder fed *Vibrio* sp. 2IF6 with *Artemia* sp. During 60 days. Group A: Fish fed with *Vibrio* sp. 2IF6, Group B: Fish cultured using virus free sea water, Group C: Fish cultured under the standard condition, Group D: Fish cultured high density of *Nannochloropsis* sp.

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た。

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防除

抗ウイルス物質産生 *Vibrio* sp. 2IF6 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* 属細菌が優勢であった。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 時間接触させた場合、ウイルス感染価は共に 99.99% 以上減少した。このような抗ウイルス活性は IHN 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、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% であったが、抗ウイルス物質産生菌給餌区では全く死亡は見られなかった (Fig. 4)。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 (21)。3 年間同様の給餌飼育を行ったが、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。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予防策として有効に活用できると推察された。

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った (22)。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る。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を目的に、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た。消毒したワムシ卵を殺菌海水で孵化させた後に、抗ノドウイルス、ラブドウイルス、ヘルペスウイルス活性を有するショ糖分解能陰性の *Vibrio* sp.V-15 株を添加したところ、ワムシの細菌叢は *Vibrio* 属細菌が優勢となった。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た (23)。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ョ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制御可能であることが示された。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ものと考えた。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た (Fig. 5)。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、早い時期からウイルス病の予防が期待できると考える。

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あるが、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た (24)。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るが、NV は培養できないために成果を示すことができない。さらに、カキヘルペスウイルス変異株 (*Ostreid herpesvirus-1 microvariant*; OsHV-1 μ Var) によるカキ種苗の大量死が諸外国で問題になっている。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上記同様の飼育技術は、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る (25)。前述の細菌の中にはウイルスが

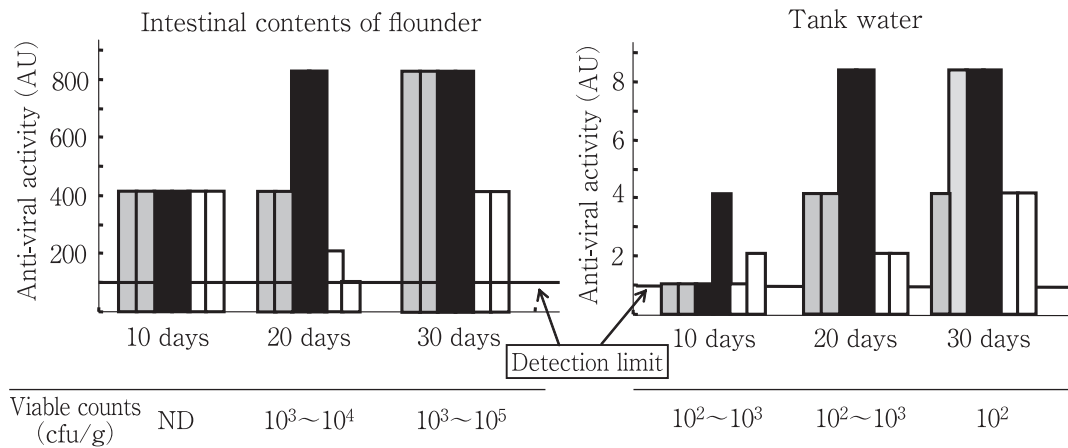


Fig. 5. Anti-viral of intestinal contents of Japanese flounder and tank water fed *V. alginolyticus* strains V-5 and V-23.

■ *Fed V. alginolyticus* V-5
□ *Fed Vibrio* sp. V-13
■ *Fed V. alginolyticus* V-23
ND: Not determined

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、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、探せば必ず目的とする微生物が見つかる現状にある。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る。

引用文献

- (1) Sugita H, Kurosaki M, Okamura T, Yamamoto S, Tsuchiya C. 2005. The culturability of intestinal bacteria of Japanese coastal fish. *Fish Sci* 71: 956-958.
- (2) 吉水守. 1986. 魚類の消化管内細菌 (好気性細菌). 河合章編, 水産増養殖と微生物, 水産学シリーズ 61, p.9-24, 恒星社恒星閣, 東京.
- (3) Yoshimizu M, Kimura T. 1976. Study on the intestinal microflora of salmonids. *Fish Pathol*, 10: 243-259.
- (4) Kimura T, Yoshimizu M. 1991. Viral diseases of fish in Japan. *Annual Rev Fish Dis* 1: 67-82.
- (5) 吉水守, 笠井久会. 2005. 魚類ウイルス病の最前線—その現状と防疫対策. *化学と生物* 43: 48-58.
- (6) 吉水守. 2012. 魚類ウイルス病とその防疫・防除に関する研究. *日水誌* 78: 358-367.
- (7) 吉水守, 笠井久会. 2002. 種苗生産施設における用水および排水の殺菌. *工業用水* 523: 13-26.
- (8) 吉水守, 瀧澤宏子, 亀井勇統, 木村喬久. 1986. 魚類病原ウイルスの紫外線感受性. *魚病研究* 21: 223-231.
- (9) 吉水守, 絵面良男. 1999. 抗ウイルス物質産生細菌による魚類ウイルス病の制御. *Microbes Environ* 14: 269-275.
- (10) 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.
- (11) Itoi S, Abe T, Washio S, Ikuno E, Kanomata Y, Sugita H. 2008. Isolation of halotolerant *Lactococcus lactice* subsp. *lactice* from intestinal tract of coastal fish. *Int J Food Microbiol*, 121: 116-121.
- (12) 吉水守. 1999. 有用細菌による細菌叢の安定化. *アクアネット* 2: 32-37.
- (13) Kamei Y, Yoshimizu M, Ezura Y, 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.
- (14) Shimizu T, Yoshida N, Kasai H, Yoshimizu M. 2006. Survival of koi herpesvirus (KHV) in environmental water. *Fish Pathol* 41: 153-157.
- (15) Kamei Y, Yoshimizu M, Ezura Y, 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.
- (16) Kamei Y, Yoshimizu M, Ezura Y, Kimura T. 1988. Screening of bacteria with antiviral activity from the fresh-water salmonid hatcheries. *Microbiol Immunol* 32: 67-73.
- (17) Kimura T, Yoshimizu M, Ezura Y, Kamei Y. 1990. An antiviral agent (46NW-04A) produced by *Pseudomonas* sp. and its activity against fish viruses. *J Aquat Animal Health* 2: 12-20.
- (18) Myouga H, Yoshimizu M, Ezura Y, Kimura T. 1993. Anti-infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) substances produced by bacteria from aquatic environments. *Fish Pathol* 28: 9-13.
- (19) Yoshimizu M, Fushimi Y, Kouno K, Shinada C, Ezura Y, Kimura T. 1992. Biological control of infectious

- hematopoietic necrosis by antiviral substance producing bacteria. Kimura T, Salmonid Diseases, p.301-307, Hokkaido University Press, Sapporo.
- (20) 吉水守, 石川香織, 河野和子, 岩山奈央, 木村喬久. 1999. 種苗生産施設におけるヒラメ稚魚の細菌叢. 北大水産彙報 **50**: 193-200.
- (21) Watanabe K, Nishizawa T, Yoshimizu M. 2000. Selection of brood stock candidates of barfin flounder using an ELISA system with recombinant protein of barfin flounder nervous necrosis virus. Dis aquat Org **41**: 219-223.
- (22) 渡辺研一, 篠崎大祐, 小磯雅彦, 桑田博, 吉水守. 2005. シオミズツボウムシ複相単性生殖卵の消毒. 日水誌 **71**: 294-298.
- (23) 清水智子, 篠崎大祐, 笠井久会, 澤辺智雄, 渡辺研一, 吉水守. 2005. 細菌叢を制御したシオミズツボウムシを投与したヒラメの腸内細菌叢. 水産増殖 **53**: 275-278.
- (24) 笠井久会, 稲垣奈都子, 吉水守. 2006. ネコカリシウイルス (FCV) を代替えとしたカキのノロウイルス浄化法に関する研究. Top Food Techno Focus **10**: 1-10.
- (25) 笠井久会, 吉水守. 2013. カキヘルペスウイルス 1 型変異株 (OsHV-1 μ Var) について. カキ研究所ニュース **28**: 5-8.