

# 抗ウイルス活性を有する魚類腸内細菌を用いた ヒラメのウイルス性表皮増生症の制御に関する研究

## 学位論文内容の要旨

ヒラメはわが国において産業上重要な魚種の一つであるが、その種苗生産過程および養殖段階において疾病による被害が大きな問題となっている。特に仔稚魚期に感染症が発生すると、その減耗は大きく、有効な対策の確立が求められている。仔魚期に発生する疾病の一つにウイルス性表皮増生症があり、本病の原因ウイルスはヘルペスウイルス科に属することが明らかとなっている。しかし、未だ病原体の培養ができず、有効な対処法もないことから、従来の防疫対策に頼るしかない。近年、魚類ウイルス病対策としてワクチン開発が進められているが、本病の発症時期には免疫応答が成立していないため、ワクチンでの防除は難しい。これまでに、水圏環境中には抗ウイルス活性を有する細菌が存在することが報告されており、抗ウイルス活性を有する宿主の腸内細菌を有効に用いることにより、薬剤を使わない、自然に優しい疾病の予防ができると考える。

本研究では、抗ウイルス活性を有する腸内細菌を用いた防疫対策の確立を目的に、まず、抗ウイルス活性を有する細菌の探索を行い、分離菌株である *Vibrio* sp. V-5 株および V-23 株の同定および *Vibrio* sp. V-23 株培養濾液の温血動物への安全性を評価した。次いで、抗ウイルス活性を有し、シヨ糖分解能のないマツカワ腸管内容物由来菌 *Vibrio splendidus* V-15 株を指標に、ワムシおよびヒラメ腸内細菌叢の制御について検討し、ヒラメ由来の *Vibrio alginolyticus* V-23 株を用いてヒラメの腸管内容物および飼育水への抗ウイルス活性の賦与について検討した。

まず、第 1 章では、ワムシ、アルテミア、生物餌料の培養に用いる濾過海水、ヒラメの腸管内容物およびその飼育水から分離した計 251 株を対象に、培養が可能な海産ギンザケ由来のヘルペスウイルス OMV (*Oncorhynchus masou virus*) を対象に抗ヘルペスウイ

ルス活性を有する細菌の検索を行った。供試した 251 株の 11 % から OMV に対して抗ウイルス活性を有する *Vibrio* 属細菌が分離された。本検索法は、供試菌培養濾液とウイルスを直接反応させていることから、これらの細菌は菌体外に抗ウイルス物質を産生しウイルスを不活化させているものと考えられる。

次いで、ヒラメの腸管内容物から分離した抗ヘルペスウイルス活性を有する細菌の中から *Vibrio* sp. V-23 株について、*gapA* 遺伝子の塩基配列に基づく同定を行ったところ、供試菌は *Vibrio alginolyticus* と分類された。*V. alginolyticus* V-23 株培養上清を 1-BuOH で抽出し、Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーを行ったところ、最終的に 1 L の培養液から 1.3 mg の活性画分を得ることができた。さらに、*V. alginolyticus* V-23 株培養濾液をマウスに腹腔内接種し、10 日後および 20 日後に体重測定を行ったところ、*V. alginolyticus* V-23 株培養濾液投与区と対照区に有意な差は認められず、試験終了時の剖検においても主要臓器に異常は認められず、臓器重量の測定でも対照区と有意差は認められなかった。

第 2 章では、マツカワ腸管内容物由来の抗ウイルス活性を有し、ショ糖分解能のない *V. splendidus* V-15 株を用い、ワムシおよびヒラメ腸内細菌叢の制御について検討した。ワムシ卵の生菌数は、消毒により  $10^{8.3}$  CFU/g から  $10^{3.5}$  CFU/g に減少し、さらに消毒した卵に *V. splendidus* V-15 株を添加すると、孵化ワムシの生菌数は  $10^{7.2}$  CFU/g となり、その細菌叢も制御可能であることが示された。また、*V. splendidus* V-15 株添加ワムシをヒラメに給餌したときのヒラメ腸管内における *Vibrio* 属細菌のうち、ショ糖非分解菌の割合は対照区で 62 %、消毒区で 59 %、菌添加区で 100 % であった。通常、海産魚の腸管内に存在する *Vibrio* 属細菌はショ糖分解能を有するものが多いことから、ヒラメ腸管内には添加細菌が定着したと考えられた。

第 3 章では、ヒラメ腸管内容物由来の抗ウイルス活性を有する *V. alginolyticus* V-23 株優勢ワムシを作出し、これを給餌したときのヒラメ腸管内および飼育水中の細菌叢を調べるとともに抗ヘルペスウイルス活性を測定した。試験期間中、ヒラメ腸管内生菌数はワムシへの菌添加の有無に依らず、 $10^4 \sim 10^6$  CFU/g の範囲で測定された。しかし、ヒラメの腸内細菌叢は、細菌非添加区に比べて *V. alginolyticus* V-23 株添加ワムシを給餌した区の方が早期に *Vibrio* 属細菌が菌叢の主体を成したことから、ヒラメ腸内細菌叢の形成に生

物餌料の細菌叢が影響していることが示唆された。

最後に、卵消毒後に抗ウイルス活性を有する細菌を添加したワムシあるいはアルテミア給餌によるヒラメの腸管内容物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検討した。抗ヘルペスウイルス活性を有する *V. alginolyticus* V-23 株添加ワムシを給餌した区のヒラメ腸管内容物は、給餌 20 日後から高い抗ウイルス活性を示し、ヒラメ飼育水にも、給餌 20 日後から抗ヘルペスウイルス活性が認められた。本試験では、給餌 19 日以降、ワムシからアルテミアへ生物餌料を切り替えたため、給餌 20 日目以降にヒラメ仔魚の腸管内容物および飼育水の *Vibrio* 属細菌の割合が増加し、抗ウイルス活性も上昇したのはワムシよりも大型のアルテミア給餌による影響が大きいものと推察された。また、菌非添加区のヒラメ腸管内容物および飼育水でも抗ウイルス活性が認められたことから、対照区のヒラメ腸管内容物にも抗ヘルペスウイルス活性を有する細菌が存在していたことが示唆された。

以上、本研究では、魚類棲息環境中に抗ウイルス活性を有する細菌が多数存在することを明らかにし、さらにプロバイオティクス的手法を用いることにより、魚類腸管内容物および飼育水に抗ウイルス活性を賦与することが可能であることを示した。本手法はヒラメ以外の他の海産魚種においても実施が可能であると考えられる。ワクチンが有効になるまでの仔魚期の感染症対策の実現に向け、生物餌料の有効活用が可能になれば防疫対策は一步前進する。特に、閉鎖循環式陸上養殖や換水率の低い仔魚期の水槽において有効と考えられ、このプロバイオティクスを用いた魚類腸内細菌叢の安定化による仔稚魚の健康管理手法が広く普及することを期待したい。

## 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 水 守  
副 査 教 授 川 合 祐 史  
副 査 教 授 澤 辺 智 雄  
副 査 助 教 笠 井 久 会

学位論文題名

### 抗ウイルス活性を有する魚類腸内細菌を用いた ヒラメのウイルス性表皮増生症の制御に関する研究

ヒラメはわが国において産業上重要な魚種の一つであるが、その種苗生産過程において疾病による被害が問題となっている。仔稚魚期に発生する疾病の一つにウイルス性表皮増生症があり、本病の原因ウイルスは、未だ培養ができず、有効な対処法もないことから、従来の防疫対策に頼るしかない。近年、魚類ウイルス病対策としてワクチン開発が進められているが、本病の発症時期には免疫応答が成立していないため、ワクチンでの防除は難しい。これまでに、水圏環境中には抗ウイルス活性を有する細菌が存在することが報告されており、抗ウイルス活性を有する腸内細菌を有効に用いることにより、薬剤を使わない、自然に優しい疾病の予防ができると考える。そこで、本研究では、抗ウイルス活性を有する腸内細菌を用いたウイルス病の制御を目的に、まず、抗ウイルス活性を有する細菌の探索を行い、ワムシおよびヒラメ腸内細菌叢の制御について検討するとともに、ヒラメ腸管内容物由来の *Vibrio alginolyticus* V-23 株を用いて、ヒラメの腸管内容物および飼育水への抗ウイルス活性の賦与について検討した。

まず、ヒラメ飼育環境水から分離した *Vibrio* 属細菌計 251 株を対象に、抗ヘルペスウイルス活性を有する細菌の検索を行った。供試した 251 株の 11% から抗ヘルペスウイルス活性を有する *Vibrio* 属細菌が分離された。本検索法は、供試菌培養濾液とウイルスを直接反応させていることから、これらの細菌は菌体外に抗ウイルス物質を産生し、ウイルスを不活化させているものと考えられる。

また、ヒラメの腸管内容物から分離した抗ヘルペスウイルス活性を有する細菌のうち *Vibrio* sp. V-23 株は、*gapA* 遺伝子の塩基配列に基づき、*Vibrio alginolyticus* と同定された。*V. alginolyticus* V-23 株培養上清を 1-BuOH で抽出し、Sephadex LH-20 カラム

クロマトグラフィーを行ったところ、最終的に 1 L の培養液から 1.3 mg の活性画分を得ることができた。さらに、*V. alginolyticus* V-23 株培養濾液をマウスに腹腔内接種し、体重測定を行ったところ、培養濾液投与区と対照区に有意な差は認められず、試験終了時の剖検においても主要臓器に異常は認められず、臓器重量の測定でも対照区と有意差は認められなかった。

次いで、マツカワ腸管内容物由来の抗ウイルス活性を有し、シヨ糖分解能のない *V. splendidus* V-15 株を用い、ワムシおよびヒラメ腸内細菌叢の制御について検討した。ワムシ卵の生菌数は、消毒により  $10^{8.3}$  から  $10^{3.5}$  CFU/g に減少し、さらに消毒した卵に *V. splendidus* V-15 株を添加すると、孵化ワムシの細菌叢は *Vibrio* 属細菌が優勢となり、その細菌叢も制御可能であることが示された。また、*V. splendidus* V-15 株添加ワムシを給餌したときのヒラメ腸管内における *Vibrio* 属細菌のうち、シヨ糖非分解菌の割合は対照区で 62 %、消毒区で 59 %、菌添加区で 100 % であった。通常、海産魚の腸管内に存在する *Vibrio* 属細菌はシヨ糖分解能を有するものが多いことから、ヒラメ腸管内には添加細菌が定着したと考えられた。

ヒラメ腸管内容物由来の抗ウイルス活性を有する *V. alginolyticus* V-23 株優勢ワムシを給餌したときのヒラメ腸管内および飼育水中の細菌叢を調べるとともに、抗ヘルペスウイルス活性を測定した。試験期間中、ヒラメ腸管内生菌数は、ワムシへの菌添加の有無に依らず、 $10^4 \sim 10^6$  CFU/g の範囲で測定された。しかし、ヒラメの腸内細菌叢は、細菌非添加区に比べて *V. alginolyticus* V-23 株添加ワムシを給餌した区の方が早期に *Vibrio* 属細菌が菌叢の主体を成したことから、ヒラメ腸内細菌叢の形成に生物餌料の細菌叢が影響していることが示唆された。また、ヒラメ腸管内容物および飼育水には、給餌 20 日後から高い抗ウイルス活性が認められた。

以上、本研究は、魚類棲息環境中に抗ウイルス活性を有する細菌が多数存在することを明らかにし、さらに魚類腸内細菌をプロバイオティクスとして用いることにより、魚類腸管内容物および飼育水に抗ウイルス活性を賦与することが可能であることを示した。本手法はヒラメ以外の他の海産魚種においても応用が可能であると考えられる。ワクチンが有効になるまでの仔魚期の感染症対策として、生物餌料の有効活用が可能になれば、本手法は防疫対策は一步前進する。特に、閉鎖循環式陸上養殖や換水率の低い仔魚期の水槽において有効と考えられる。