

## シンポジウム 1-2

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<sup>1</sup>, 笠井久会<sup>1</sup>, 渡邊研一<sup>2</sup><sup>1</sup>北海道大学大学院水産科学研究院, <sup>2</sup>東京農業大学生物産業学部

魚介類の腸内フローラもその全容解明と働きが徐々に解明され, 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。本シンポジウムでは水産分野でのプロバイオティクス研究の現状と将来展望を紹介すると共に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紹介したい。

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。魚介類の培養可能な細菌群としては, 嫌気性菌に加え *Aeromonas/Vibrio* 属グループが優勢である。1980年代後半以降, 魚類病原ウイルスの生存性に関する研究を進め, 河川および沿岸海域に存在する細菌がウイルスの不活化に大きく関わっていることを明らかにしてきた。魚介類の腸管内にも抗ウイルス活性を有する細菌が広く分布していることから, これらをプロバイオティクスとして利用する手法を検討した。

サケ科魚類の伝染性造血器壊死症ウイルス (IHNV: ノビラブドウイルス属) を対象に, ウイルスの生存性を観察する過程で, ウイルスが菌体表面に吸着されたり, 細菌が産生した物質によって不活化される現象を見いだした。養魚池水や沿岸域の海水および底泥の一般細菌を対象に, 抗 IHNV 活性を有する細菌のスクリーニングを行ったところ, いずれの試料からも 90% 以上のプラーク (PFU) 減少率を示す菌株が 1~23% の割合で分離された。代表株の産生する抗ウイルス物質は, 低分子ペプチドや高分子物質等様々であった。ペプチド系の新規抗ウイルス物質は IHNV の他, *Oncorhynchus masou virus* (OMV: サケ科魚ヘルペスウイルス), 狂犬病ウイルス, 単純ヘルペスウイルス, ヒト免疫不全ウイルスに対しても抗ウイルス効果を示した。これら細菌の有効利用を図るに際し, 水産分野, 特に増養殖現場での応用としては, 腸内細菌をプロバイオティクスとして利用する方法が現実的であると考えられる。水産動物の餌料生物としては, クロレラ, ナンノクロロプシス, ワムシ, アルテミア, 珪藻等が用いられている。このうちワムシおよびアルテミア卵の消毒法が開発され, キートセロスの無菌化も実現した。餌料生物に関しては栄養素の添加が広く行われており, 給餌ペレットや消毒卵から孵化したワムシ, アルテミアに抗ウイルス活性を有する腸内細菌を添加し, これらが優勢となった餌料生物を投与すれば簡単に経口投与が可能となる。魚類に抗ウイルス性腸内細菌優性ワムシやアルテミア, 細菌添加ペレットあるいは珪藻を投与した場合, 腸内容物および糞, さらに飼育水にも抗ウイルス活性が認められる。サケマス類の腸内細菌としては *Aeromonas* 属細菌を, ヒラメやカレイ類, カキなどの腸内細菌としては *Vibrio* 属細菌を, それぞれの宿主から分離し, OMV, IHNV, ヒラメラブドウイルスおよび  $\beta$  ノダウイルスを対象にスクリーニングしたところ 99% 以上の PFU 減少を示す株が得られた。換水率の低い種苗生産水槽への給餌は, 腸管がリアクターとして働き, 産生された抗ウイルス物質は糞と共に排出され, 水槽内に蓄積することから, 飼育水を介した感染の予防が期待できる。このように, 水圏に広く分布する抗ウイルス活性を有する細菌, 特に腸内細菌をプロバイオティクスとして利用する方法は, 治療が困難なウイルス病の予防法として利用可能な有効な方法と期待される。

## Approaches to probiotics for aquaculture: Prevention of fish viral diseases using antiviral intestinal bacteria

○ Mamoru Yoshimizu<sup>1</sup>, Hisae Kasai<sup>1</sup> and Kenichi Watanabe<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University,

<sup>2</sup>Faculty of Bio-Industry, Tokyo University of Agriculture

Generally, normal bacterial floras play an important role in inhibits the growth of pathogenic bacteria in the intestine or on the skin, and stimulating the immune response of the host animals. Sometimes, bacterial flora of larvae that is cultured in the disinfected water is not normal. It is important to establish the normal bacterial flora of the fish before their release to the river or ocean. Mortalities of larvae and juveniles of cultured fish due to viral diseases remain a major problem of aquaculture for regular food production. Although vaccines can be useful to control viral disease, because of a premature immune system, they are not effective during early stages of larval growth. Therefore alternative strategies to control viral diseases are required for sustainable aquaculture and seed production.

Previously, we had 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 our studies of microbial ecosystem, we reported that many bacteria producing antiviral substance could be isolated from aquatic environments such as hatchery water supply, river mouth water, beach water, and intestinal contents of aquatic animals.

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*), barfin flounder (*Verasper moseri*) and Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aeromonas* strains produced anti-infectious hematopoietic necrosis (IHNV; Novirhabdovirus) substances and *Vibrio* strains showed anti-IHNV, salmonid herpesvirus *Oncorhynchus masou* virus (OMV; *Salmonivirus*), hirame rhabdovirus (HIRRV), barfin flounder nervous necrosis virus (BF-NNV;  $\beta$ -*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 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* spp. strains 2IF6a and BI-9715 with *Artemia* sp. showed anti-IHNV, OMV, HIRRV and BF-NNV activities in the intestinal contents. Larvae fed the *Vibrio* spp. showed a higher survival rate than the fish cultured using the virus free seawater and non-treated seawater. In case of Japanese flounder larvae, the dominant intestinal microflora was found to be *Vibrio* spp. after feeding on rotifers whose bacterial population had manipulated with *V. splendidus* strain V-15. Flounder larvae fed with *Vibrio alginolyticus* strain V-5 or V-23 manipulated rotifer showed anti-OMV activities in the intestinal contents and rearing water in the tank. These results show that, by manipulating diets with anti-viral substance-producing bacteria, resistance of fish larvae to viral disease can be improved thereby helping to ensure regular food production through aquaculture. Furthermore, *V. neptunus* strain V-176 isolated from intestinal contents of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) showed an anti-feline calicivirus (FCV) activity. FCV (*Norovirus* surrogate) will hopefully be inactivated in the intestine of oyster fed *V. neptunus* with *Chaetoceros gracilis*.