

光合成細菌抽出物による魚類ウイルス不活性化について

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者	岡本, 信明 広谷, 博史 佐野, 徳夫 小林, 達治
巻/号	54巻12号
掲載ページ	p. 2225-2225
発行年月	1988年12月

短 報

光合成細菌抽出物による魚類ウイルス
不活性化について岡本信明, 広谷博史, 佐野徳夫
小林達治Antiviral Activity of the Crude Extracts of
Phototrophic Bacteria to Fish VirusesNobuaki Okamoto,*¹ Hiroshi Hirotsani,*²
Tokuo Sano,*¹ and Michiharu Kobayashi*²

(1988年5月24日受付)

サケ科魚類の飼育用水から抗ウイルス作用を有する物質を産生する細菌が分離され、¹⁻⁹⁾ 今まで有効な手段がなかったウイルス病制御への一つの道を開くものとして期待されている。水田, 河川, 活性汚泥, 土壌中などいたるところに生息している光合成細菌には Poliovirus, Sindbis virus, T5 フェージを不活性化する物質を生産するものが知られている。^{4,5)} 本報では光合成細菌の一種, *Rhodospseudomonas capsulata* (菌株番号: 微工研菌寄第 879 号) からの抽出物の魚類ウイルスに対する不活性化について検討した。

上述した光合成細菌を Table 1 に示した培養液を用い、27°C, 嫌氣的, 3,000 lux の光照射条件下で 1 週間培養後、菌体を珪砂を加えてすりつぶし、0.1 M PBS にて抽出、洗浄後、10,000×g, 30 分間遠心、上澄液を孔径 450 nm のメンブレンフィルターにて濾過し、抽出物を得た (菌体 5 g 湿重量から粗抽出液 25 ml を得た)。この粗抽出液 0.3 ml を 2% ウン胎児血清加 minimum essential medium (MEM-2) に懸濁した infectious pancreatic necrosis virus (IPNV),⁶⁾ infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV),⁷⁾ Yamane tumor virus (YTV)⁸⁾ の各ウイルス液の 0.3 ml と混合した。対照としては、PBS と各ウイルス液を 0.3 ml ずつ混合したものを用いた。それら各液に対して、60 W の白熱灯を 35 cm の距離から照射し、ときどき攪拌しながら 1 時間反応させた。反応液の温度上昇を防ぐため冷風をあて、反応液を 12°C に保った。ウイルス力価はマイクロタイター法により、CHSE-214 細胞を用い、15°C にて 2 週間培養後、TCID₅₀ 法によってウイルス力価を求めた。

結果を Table 2 に示した。粗抽出物には IPNV に対して不活性化効果は全く認められなかったが、IHNV 及び YTV に対しては 99.99% 以上を不活性化し、効果があることが判明した。なお、粗抽出原液では弱い細胞毒性を認めたが、10⁻¹ 希釈により細胞毒性は全く認められなくなった。吉水ら¹⁾は飼育用水から分離した *Pseudomonas* sp. が IHNV 及び OMV⁹⁾ を不活性化するが、IPNV を全く不活性化しないことを報告している。著者らの結果でも IPNV は全く不活性化されず、IHNV 及び YTV のみが不活性化された。YTV は OMV と血清学的に同じウイルスと考えられているので、¹⁰⁾ 吉水らの分離した *Pseudomonas* sp. と本菌の抗ウイルス効果はよく似ている。その物質の精製及び同定が待たれるところである。本物質の作用機序は不明であるが、本研究結果ならびに同一菌株を用いて著者の一部によって確かめられた研究結果から、本物質が IHNV (Rhabdoviridae), YTV (Herpesviridae), Sindbis virus (Togaviridae)⁴⁾ のようなエンベロープを持つウイルスばかりでなく、エンベロープを持たずしかも塩素処理や紫外線処理にも抵抗性を示す Human Poliovirus (Picornaviridae)⁵⁾ を不活性化するにもかかわらず、Human Poliovirus と同じくエンベロープを持たずしかも塩素処理や紫外線処理にも抵抗性を示す IPNV (Birnaviridae) を不活性化しない点も作用機序の上から興味のあるところである。

本菌は抗ウイルス物質を菌体外にも排出し、粗抽出液と同程度の抗ウイルス作用が培養液中にも認められること⁴⁾ および有機性廃水処理にも利用されるほどの強力な有機物分解作用を有すること¹¹⁾ が知られている。一般に、感染症では感染時の病原体量がその後の発病やへい死に影響を与えるので、本菌を用いた濾過槽等を使用することにより、水中ウイルス量を減少させ得れば、ある種のウイルス病ではその被害の軽減が期待できる。

Table 1. Culture medium composition of photosynthetic bacteria

KH ₂ PO ₄	0.8 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2
NaCl	0.5
CaCl ₂ ·6H ₂ O	0.05
NH ₄ Cl	0.5
Na-propionate	5.0
NaHCO ₃	0.5
Yeast extract	0.1
Distilled water to make	1000.0 ml
pH	7.0

Table 2. Antiviral activity of the crude extracts from phototrophic bacteria, *Rhodospseudomonas capsulata* (Bikoken No. 879) to three fish viruses

Virus* ¹	Virus titer (TCID ₅₀)* ²		Inhibition (%)
	PBS-treatment	Extracts-treatment	
IPNV	10 ^{8.1}	10 ^{8.1}	0
IHNV	10 ^{6.3}	10 ^{2.3}	99.99
YTV	10 ^{5.3}	≤ 10 ^{1.0}	≥ 99.99

*¹ IPNV: infectious pancreatic necrosis virus, IHNV: infectious hematopoietic necrosis virus, YTV: Yamane tumor virus.

*² The bacterial cells cultured for 1 week under anaerobic light (3,000 lux) conditions were ground with siliceous sand. Then they were extracted and washed with 0.1 M PBS several times, centrifuged at 10,000×g for 30 min and the supernatant was passed through a Millipore filter (450 nm). The 25 ml of crude extracts were obtained from the 5 g (wet weight) of the bacteria. The 0.3 ml of the crude extracts was mixed with 0.3 ml of IPNV, IHNV or YTV contained in MEM-2, respectively. Each of them was reacted at 12°C under light condition (A 60 W incandescent lamp was illuminated in a distance of 35 cm) for 1 h and then virus titer was measured after incubation of 2 weeks on CHSE-214 cells at 15°C.

文 献

- 1) 吉水 守, 瀧澤宏子, 亀井勇統, 木村喬久: 魚病研究, **21**, 223-231 (1986).
- 2) Y. Kamei, M. Yoshimizu, Y. Ezura, and T. Kimura: *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, **39**, 124-132 (1988).
- 3) Y. Kamei, M. Yoshimizu, Y. Ezura, and T. Kimura: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **53**, 2179-2185 (1987).
- 4) 小林達治, 広谷博史: 土と微生物, **30**, 43-48 (1987).
- 5) 広谷博史, 小林達治, 高橋英一, 山田 尚, 小阪拓男: 土と微生物, **30**, 49-53 (1987).
- 6) T. Sano: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **37**, 495-498 (1971).
- 7) T. Sano, T. Nishimura, N. Okamoto, T. Yamazaki, H. Hanada, and Y. Watanabe: *J. Tokyo Univ. Fish.*, **63**, 81-85 (1977).
- 8) T. Sano, H. Fukuda, N. Okamoto, and F. Kaneko: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **49**, 1159-1163 (1983).
- 9) T. Kimura, M. Yoshimizu, M. Tanaka, and H. Sannohe: *Fish Pathology*, **15**, 143-147 (1981).
- 10) R. P. Hedrick, T. Mc Dowell, W. D. Eaton, T. Kimura, and T. Sano: *J. Appl. Ichthyol.*, **3**, 87-92 (1987).
- 11) 北村 博, 黒沢慶二, 小林正泰: 光合成細菌 (北村 博, 森田茂廣, 山下仁平編), 学会出版センター, 東京, 1984, pp. 112-121.

*¹ 東京水産大学 (Department of Aquaculture, Tokyo University of Fisheries, Konan, Minato, Tokyo 108, Japan).

*² 京都大学 (Department of Agricultural Chemistry, Kyoto University, Kyoto 606, Japan).