

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07910

研究課題名(和文) 主要海産養殖魚のノカルディア症原因菌に対する高分子抗菌構造体の抗菌活性とその応用

研究課題名(英文) Antimicrobial activity and application of polymeric antimicrobial structures against the causative agent of nocardiosis in major marine cultured fish

研究代表者

大島 俊一郎 (Oshima, Syun-ichirou)

高知大学・教育研究部総合科学系黒潮圏科学部門・教授

研究者番号：80325406

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ブリ類に安全性と摂餌性が確認されているシアノアクリレートナノ粒子(acrNP)のブリノカルディア症に対する予防効果と治療効果について調査した。予防効果では、生残率が本ナノ粒子1,000ppm区で100%、対照区で86.4%であり、ナノ粒子区では死亡は確認されなかった。本ナノ粒子の治療効果試験では、生残率は本ナノ粒子経口投与区で93.3%、本ナノ粒子腹腔内注射投与区86.7%、対照区で66.6%となり対照区の間で有意な差異が認められた。以上の結果から、経口投与による予防効果と治療効果は認められるものの発症後の治療効果については確認することはできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国の主要海産養殖魚であるブリで非常に問題になっているノカルディア症に対する有効な予防法と治療法が強く求められるなか、本ナノ粒子は生分解性の特徴を持ちながら自然環境にやさしく抗菌活性も高い性質を持っている。本研究では、このナノ粒子をブリの餌に混ぜて一定期間経口投与することで、本症に対して予防効果ならびに治療効果があることを初めて明らかにした。今後は、このナノ粒子を現場で使用する為の各種試験を継続して実施する必要がある。

研究成果の概要(英文)：This study investigated the preventive and therapeutic effects of cyanoacrylate nanoparticles (acrNP), which have been shown to be safe and feedable in yellowtail, on brinocardiosis. In the preventive effect, the survival rate was 100% in the 1,000 ppm and 86.4% in the control, and no mortality was observed in the nanoparticles. In the therapeutic efficacy study of the nanoparticles, the survival rate was 93.3% in the oral administration of the nanoparticles, 86.7% in the intraperitoneal injection of the nanoparticles, and 66.6% in the control, showing a significant difference between the control and oral administration. These results showed that oral administration of the nanoparticles had preventive and therapeutic effects, but the therapeutic effects after the onset of the disease could not be confirmed.

研究分野：病原微生物学 魚類養殖学

キーワード：病原微生物 魚類養殖 細菌感染症 予防 治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本のブリ類の細菌感染症の発症事例は2006年ではレンサ球菌症が25.8%、ノカルディア症が25.8%、ミコプラズマ症が12.8%であることが報告されている(中西・松浦 2016)。また2014年のブリおよびカンパチに発生した疾病はレンサ球菌症、ノカルディア症、ピブリオ病、リンホシスチス症および新型レンサ球菌症(*Streptococcus dysgalactiae*)などが確認されたことが報告されている(柳・今岡 2015)。これらの細菌感染症に対して現在では治療薬として抗生物質などの化学療法剤、予防薬としてワクチンが使用されている。抗生物質はレンサ球菌症に対しては、それぞれフロルフェニコール、塩酸リンコマイシン、アルキルトリメチルアンモニウムカルシウム、オキシテトラサイクロン、塩酸ドキシサイクリン、エリスロマイシンおよびエンボン酸スピラマイシンが承認されている。さらにワクチンでは7種類について承認されている。一方、ノカルディア症は抗生物質ではスルファモノメトキシン又はそのナトリウム塩が承認されているもののワクチンの承認は認められていない(農林水産省 2018)。そのため、日本のブリ類養殖ではノカルディア症による細菌感染症の被害は拡大する傾向にあり、鹿児島県では年間約5億円以上の被害が報告されている(鹿児島県水産技術開発センター 2012)。ノカルディア症は1967年に三重県で初めて発見されてから現在まで被害が増大する傾向にあり、その対策が求められている(楠田・中川 1978)。本病の特徴的な症状は躯幹結節型と鰓結節型に大別され、躯幹結節型では躯幹部の皮下および筋肉に膿瘍や結節が形成される。さらに、脾臓や腎臓などの内臓器官にも結節が多数形成される。一方、鰓結節型は低水温期に多く、鰓表面に塊状に結節が形成されることが報告されている(小川・室賀 2012)。しかし、前述のスルファモノメトキシン又はそのナトリウム塩はノカルディア症原因菌に対して抗菌活性が認められるが、完全に除菌することができないため、本症に対して有効性の高い予防法および治療法が確立されていないのが現状である(鹿児島県水産技術開発センター 2012)。

そこで、これまでに本研究室ではブリに対して安全性が確認されているシアノアクリレートナノ粒子(acrNP)の予防効果と治療効果について調べた。まず、本ナノ粒子の予防効果では、本ナノ粒子添加飼料を30日間連続的に給餌し、1週間馴致を行ったブリに対してノカルディア症感染に対する予防効果を評価するために実験感染試験を行った。その結果、最終的な生残率が本ナノ粒子1,000ppm区で100%、対照区で86.4%となつて一定のレベルで予防効果が認められた。次に本ナノ粒子の治療効果では、実験感染魚のブリに対して本ナノ粒子1,000ppmを経口投与ならびに注射投与した。その結果、最終的な生残率は本ナノ粒子経口投与区で93.3%、本ナノ粒子腹腔内注射投与区86.7%、対照区で66.6%であり、試験開始21日後の本ナノ粒子経口投与区および本ナノ粒子腹腔内注射投与区と対照区の間で有意な差異が認められた。

しかし、本ナノ粒子の効果的な投与量や投与期間を検討した試験は実施しておらず、本ナノ粒子の実用化に向けて、投与方法の検討が必要である。

2. 研究の目的

本研究では、ナノ粒子の効果的な投与量を明らかにするために投与量別に経口投与を実施し、治療効果について調べた。また、本ナノ粒子の予防効果の再現性について調べるために、実験感染試験前の本ナノ粒子投与と全試験日程の本ナノ粒子投与を実施した。さらに、実験感染魚の発症が確認されたのちに、本ナノ粒子を投与してその治療効果について調べた。

3. 研究の方法

供試ナノ粒子 供試ナノ粒子は、acrNP(10-50nm)を用いた。ナノ粒子の調製方法は以下の通

りにした。 :約 pH2.1 の塩酸溶液を用意した。 分散剤の界面活性剤（ノニオン性界面活性剤およびアニオン性界面活性剤）を の溶液に溶解した。 :イソブチルシアノアクリレートを滴下後、2 時間攪拌して水酸化ナトリウムで中和した。その後 1 時間攪拌したものを供試 acrNP 溶液とした。

ノカルディア症原因菌 (*Nocardia seriolae*) 2007 年に高知県宿毛市の養殖ブリの腎臓から分離されたノカルディア症原因菌 *N. seriolae* N-2927 株を供試した。使用時には NaCl を終濃度 1%に調整した Trypcase Soy broth (TSB) 培地 20ml に凍結保存菌から 500 μ l を接種し、28 で 120 時間振とう (140rpm) 培養したものを前培養液とした。前培養菌液を TSB 液体培地に接種し、28 で 120 時間振とう (140rpm) 培養したものを本培養菌液として実験感染試験に供試した。実験感染前に 10 倍階段希釈した菌液を 50 μ l 取り、NaCl 終濃度 1%に調整した TSB 寒天平板に塗抹することにより生菌数を測定し、実験感染に用いた攻撃菌液中の生菌数を算出した。

、acrNP 濃度別経口投与による治療効果試験

供試魚 供試魚には、稚魚まで育成された人工種苗のブリ当歳魚を用いた。ブリ稚魚は実験感染試験開始まで、1.1t 容 FRP (fiberglass reinforced plastics) 水槽で、EP 市販飼料を給餌し、目的のサイズになるまで飼育した。試験開始前に閉鎖式循環システムのエアレーションを完備した 1.1t 容 FRP 水槽に 16 尾ずつ移動し、馴致飼育を行ったのち、感染前日に餌止めを行い実験感染に供試した。試験区は、EP 市販飼料に 1,000ppm の本ナノ粒子を添加した飼料を給餌する区および EP 市販飼料に 125ppm の本ナノ粒子を添加した飼料を給餌する区を設定した。また蒸留水を添加した市販飼料を給餌する区を対照区とした。供試魚の平均体重は 119.5 \pm 18.3g、平均体長は 19.8 \pm 0.95cm であった。試験実施期間中の水温は 24.0 であった。

実験感染 海水を 30L に調製した 100L 容 FRP 水槽に *N. seriolae* 本培養菌液を混合し、攻撃菌濃度を 1.5 \times 10⁶CFU/mL に調整した海水に、試験区ごとに供試魚を 30 分間浸漬処理したのち、それぞれ元の水槽に戻した。30 分間の浸漬感染中は適切な量のエアレーションを施した。各試験区 16 尾ずつを対象に実験感染を行い、感染開始後 21 日間の死亡魚数を計数して生残率を算出した。なお、全ての死亡魚および生残魚について、まず外部症状の観察を行ったのちに無菌的に解剖し、内部症状の観察と腎臓からの菌分離を行った。

、acrNP 経口投与による予防効果試験

供試魚 供試魚には、人工種苗のブリ当歳魚を用いた。ブリ稚魚は実験感染試験開始まで、1.1t 容 FRP (fiberglass reinforced plastics) 水槽で、EP 市販飼料を給餌し、目的のサイズになるまで飼育した。試験区は、各種試験飼料給餌開始 1 週間前に、供試魚を 3 つの 1.1t 容水槽に無作為に収容した。試験区は 1,000ppm の本ナノ粒子を添加した飼料を感染前日まで給餌する区および全日程給餌する区を設定した。また市販飼料を全日程で給餌する区を対照区とした。1 週間の馴致飼育後、各種試験飼料の給餌を開始した。30 日間の各種試験飼料給餌終了後、閉鎖式循環システムのエアレーションを完備した 1.1t 容 FRP 水槽に供試魚を 1 試験区 15 尾として 3 水槽に移送し、感染前日まで各種試験飼料の給餌を行った。供試魚の平均体重は 105.6 \pm 10.4g、平均体長は 19.3 \pm 0.55cm であった。実験感染試験実施期間中の水温は 24.5 であった。

実験感染 海水を 20L に調製した 100L 容 FRP 水槽に *N. seriolae* 本培養菌液を混合し、攻撃菌濃度を 1.7 \times 10⁶CFU/mL に調整した海水に、試験区ごとに供試魚を 30 分間浸漬処理したのち、それぞれ元の水槽に戻した。30 分間の浸漬感染中は適切な量のエアレーションを施した。各試験区 15 尾ずつを対象に実験感染を行い、感染開始後 32 日間の死亡魚数を計数して生残率を算出した。なお、全ての死亡魚および生残魚について、まず外部症状の観察を行ったのちに無菌的に解剖し、内部症状の観察と腎臓からの菌分離を行った。

、AcrNP ノカルディア症発症後の治療効果試験

供試魚 供試魚には、人工種苗のブリ当歳魚を用いた。ブリ稚魚は実験感染試験開始まで、1.1t 容 FRP (fiberglass reinforced plastics) 水槽で、EP 市販飼料を給餌し、目的のサイズになるまで飼育した。試験開始前に閉鎖式循環システムのエアレーションを完備した 1.1t 容 FRP 水槽に 16 尾ずつ移動し、馴致飼育を行ったのち、感染前日に餌止めを行い実験感染に供試した。感染翌日から全試験区に市販飼料を給餌し、最初の死亡が確認された当日から、試験飼料の給餌を開始した。試験区は、EP 市販飼料に 1,000ppm の本ナノ粒子を添加した飼料を給餌する区および EP 市販飼料に 125ppm の本ナノ粒子を添加した飼料を給餌する区を設定した。対照区には、蒸留水を添加した市販飼料を給餌した。供試魚の平均体重は $119.0 \pm 31.6\text{g}$ 、平均体長は $21.1 \pm 1.93\text{cm}$ であった。試験実施期間中の水温は 24.0 であった。

実験感染 海水を 20L に調製した 100L 容 FRP 水槽に *N. seriolae* 本培養菌液を混合し、攻撃菌濃度を $3.6 \times 10^6\text{CFU/mL}$ に調整した海水に、試験区ごとに供試魚を 60 分間浸漬処理したのち、それぞれ元の水槽に戻した。60 分間の浸漬感染中は適切な量のエアレーションを施した。各試験区 16 尾ずつを対象に実験感染を行い、最初の死魚が確認された日から、13 日間の死亡魚数を計数して生残率を算出した。なお、全ての死亡魚および生残魚について、まず外部症状の観察を行ったのちに無菌的に解剖し、内部症状の観察と腎臓からの菌分離を行った。

4. 研究成果

、acrNP 濃度別経口投与による治療効果試験 1,000ppm 区では、死亡魚は確認されず最終的な生残率は 100%であった。125ppm 区では、感染開始から 6 日後に 1 尾死亡魚が認められ、最終的な生残率は 93.8%であった。対照区では、感染開始から 1、6 および 12 日後に 1 尾ずつ死亡魚が認められ、最終的な生残率は、81.3%であった。1,000ppm 区および 125ppm 区ともに、対照区と比較して生残率が高まり、ノカルディア症に対する本ナノ粒子の治療効果が示唆された。

、acrNP 経口投与による予防効果試験 本ナノ粒子の添加飼料を全日程で給餌した区では、感染開始から 6 日後に 1 尾死亡魚が認められ、最終的な生残率は 93.3%であった。本ナノ粒子の添加飼料を感染前日まで給餌した区では、感染開始から 28 日後に 1 尾死亡魚が認められ、最終的な生残率は 93.3%であった。対照区では、感染開始から 28 日後に 1 尾が認められ、最終的な生残率は、73.3%であった。本ナノ粒子の添加飼料を全日程で給餌した区では、対照区と比較して、生残率に有意な差異が認められた。また、本ナノ粒子の添加飼料を感染前日まで給餌した区でも同様に、対照区と比較して有意に高い生残率を示した。本研究室で以前行われた研究では、本ナノ粒子の添加飼料を感染 1 週間前まで給餌した場合に、ノカルディア症に対する予防効果は認められないことが報告されている (宝金 2018)。しかし、本試験では、本ナノ粒子の添加飼料を感染前日まで給餌したところ、生残率が有意に高くなった。本ナノ粒子は、土壌中において 1 週間は抗菌性を維持することが報告されている (ナノカムのテクノロジー)。土壌中と生体・海水中では条件が異なるものの、本試験においては、感染前日までにプリに投与した本ナノ粒子がプリ体内に残留し、*N. seriolae* に対して抗菌性を発揮した結果、ノカルディア症の発生を抑制したものと推察される。ただし、本ナノ粒子の魚体内への残留性については、未だ調査されていない。本ナノ粒子の経口投与はプリの生体防御能へ影響を与えないことが明らかとなっており、今後、本ナノ粒子の予防を目的とした使用方法を検討するためには、魚体中への残留性を明らかとする必要がある。

、AcrNP ノカルディア症発症後の治療効果試験 感染開始から 17 日後に最初の死亡魚が確

認められ、試験飼料の給餌を開始した。1000ppm 区では、試験飼料給餌開始から、5 日後に 2 尾の死亡魚が認められ、最終的な生残率は 13.3%だった。125ppm 区では、試験飼料給餌開始から、5 日後に 1 尾の死亡魚が認められた。また、7 日後に 2 尾、8 日後に 4 尾の死亡魚が認められ、最終的な生残率は 13.3%であった。対照区では、試験飼料給餌開始から 6 日目に 3 尾死亡魚が認められ、最終的な生残率は 6.67%であった。試験区間で、生残率に大きな差異は認められなかった。以上の結果より、ノカルディア症発症後に本ナノ粒子を投与することによる治療効果は認められなかった。

本試験では、経口投与によって本ナノ粒子の投与を行った。本試験では、試験飼料の給餌を開始する前後で、ブリの摂餌行動が不活発になる様子が確認された。摂餌量の減少により、有効な量の本ナノ粒子を吸収できなかったことが推察される。また、ノカルディア症は、症状が進んだ感染中期以降の病魚には化学療法剤による治療が困難であることが報告されている（板野公一 2006）。本試験では、感染中期以降に該当すると考えられる感染から 17 日後に本ナノ粒子の投与を開始したため、十分な治療効果が得られなかったものと推察される。ノカルディア症は、鰓・皮下・臓器に潰瘍・結節を形成するが、その内部には菌が生存した状態で包囊されることが報告されている（窪田 1968）。今後は、それらの菌に直接作用させることが可能で、魚類の摂餌による摂取に頼らない薬浴法での除菌などを検討する必要がある。

以上の結果から、本ナノ粒子の経口投与はノカルディア症に対して予防ならびに治療効果が一定のレベルで確認された。

参考文献

- ・ 中西照幸・松浦雄太 (2016) 魚類疾病の現状と課題. 日獣会誌, 69 27-35.
- ・ 柳宗悦・今岡慶明 (2015) 魚病総合対策事業 (養殖衛生管理体制整備事業). 鹿児島県水産技術開発センター事業報告書, 1-9.
- ・ 鹿児島県水産技術開発センター (2012) ノカルジア症の近年の発生傾向について. うしお, 第 333 号, 1-7.
- ・ 楠田利一・中川敦史 (1978) ブリのノカルディア病. 魚病研究, 13 (1), 25-31.
- ・ 農林水産省 (2018) 水産用医薬品の使用について. 第 31 報, 消費・安全局 地区水産安全管理課.
- ・ 小川和夫・室賀清邦 (2012) : 改訂・魚病学概論. 恒星社厚生
- ・ 青木宙 (2013) : 魚介類の微生物感染症の治療と予防. 恒星社厚生
- ・ 株式会社ナノカム : ナノカムのテクノロジー <http://www.nanocame.jp/technology/>
2021 年 4 月 28 日閲覧
- ・ 宝金実央 (2018) : シアノアクリレートナノ粒子による各種魚病細菌に対する抗菌活性
- ・ 板野公一 (2006) : ブリノカルジア症の防疫に関する研究
- ・ 窪田三朗・狩谷貞二・中村恵江・吉良桂子 (1968) : 養殖ハマチ・カンパチにおけるノカルジア症についてー 病理組織学的研究

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 大島俊一郎	4. 巻 4-11
2. 論文標題 シアノアクリレートナノ粒子の魚病細菌に対する抗菌活性とその応用	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 72-76
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宝金実央（高知大農）・大嶋俊一郎（高知大院黒潮） ・飯田大介・千頭邦夫（チカミミルテック株）
2. 発表標題 シアノアクリレートナノ粒子の各種魚病細菌に対する抗菌活性
3. 学会等名 日本水産学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------