

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 11 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450262

研究課題名(和文) 甚大な被害を出す魚病原因細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) Antibacterial activity of various nanoparticles against main fish disease bacteria causal severe damage.

研究代表者

大島 俊一郎(Oshima, Syunichirou)

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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：抗菌ナノ粒子の主要海産養殖魚で問題になっている主要な細菌感染症に対する抗菌活性を調べ、魚を用いた感染実験を行い、その感染防御効果についても調べた。その結果、類結節症菌、型溶血性連鎖球菌症菌、型溶血性連鎖球菌症菌、ピブリオ病菌に対して抗菌活性が確認された。また、ナノ粒子を一定期間ニジマスに経口投与後に型溶血性連鎖球菌症原因菌を用いて実験感染を行った結果、感染防御効果が確認された。

研究成果の概要(英文)：Antibacterial activity of various nanoparticles against main fish disease bacteria were investigated using in vitro(plate methods) and in vivo(experimental infections) system. These nanoparticles showed enough level of antibacterial activity against Photobacterium damsela subsp. piscicida, Lactococcus garvieae, Streptococcus iniae and Vibrio alginolyticus, respectively. And, challenge tests were done by the immersion infection method using Streptococcus iniae after various administrations of nanoparticle for a fixed period of time. The results show the effectiveness of various administrations of nanoparticles against Streptococcus iniae in rainbow trout.

研究分野：水産学

キーワード：魚病 細菌 増殖抑制 感染防御 ナノ粒子

1. 研究開始当初の背景

各種病原性細菌は、これまでに多種多様な抗生物質の使用に対して耐性を獲得していることが報告されており、これまでに耐性菌に対しては新規の抗生物質を開発して使用することを繰り返してきたが、現在あらゆる薬剤に耐性を示す病原性細菌の出現が報告されるまでに至っている。このような現状のもと城武氏は、アクリル系ナノカプセルのナノ粒子単体を細菌に適応したところ、ナノ粒子と細菌の細胞壁との接合に次ぐ溶菌現象を確認した。

本抗菌ナノ粒子の水産分野での応用は、これまでに全く検討されていない。

養殖魚に発生する細菌性疾病の対策としてワクチンなどの開発も行われているが、現在もその軸は抗生物質によるところが大きく、抗生物質を継続的に使用してきた結果、現在、耐性菌(多剤耐性菌)の出現が大きな問題となっている。

2. 研究の目的

本研究では我が国の水産養殖業を支えている主要な養殖魚で大きな問題になっている主な細菌感染症を対象疾病とし、抗菌ナノ粒子の抗菌活性を調べるとともに、その応用の可能性を見いだすことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究で対象とした魚病細菌

エドワジェラ症原因菌

2016年に鹿児島県由来のヒラメ腎臓から分離された *E. tarda* を用いた。Brain-Heart Infusion 液体培地(BHI)20ml に凍結保存菌から1白金耳量を接種28で24時間振とう培養したものを前培養菌液とした。前培養菌液500 μ lをBHI液体培地150mlに接種し28で12時間振とう培養してMIC法に供試した。

ブリ類結節症原因菌

1998年に大分県米水津村の養殖ブリの腎臓から分離されたブリ類結節症原因菌を供試菌株とし凍結保存したものを供試した。

使用時にはNaClを終濃度2%に調整したTryptcase Soy broth (TSB) 培地20mlに凍結保存菌から1白金耳量を接種し、28で24時間振とう培養したものを前培養菌液とした。前培養菌液500 μ lをTSB培地150mlに接種し、28で12時間振とう培養したものを本培養菌液としてMIC法に供試した。

滑走細菌症原因菌

2005年に高知県の養殖ヒラメの体表から分離された *T. maritimum* 050603株を供試菌株としエドワジェラ症原因菌と同様の方法で凍結保存したものを使用した。使用時にはm-ZoBell液体培地20mlに凍結保存菌から1白金耳量を接種し、28で24時間振とうしたものを前培養菌液とした。前培養菌液500 μ lをm-ZoBell液体培地150mlに接種し、28で時間振とう培養してMIC法に供試した。

冷水病原因菌

(*Flavobacterium psychrophilum*)

F. psychrophilum についてもエドワジェラ症原因菌と同様の方法で凍結保存したものを使用した。

型溶血性連鎖球菌症原因菌

(*Lactococcus garvieae*)

L. garvieae は凍結保存したものをNaClを終濃度2%に調整したBHI液体培地20mlに凍結保存菌から1白金耳量を接種し、28で24時間振とうしたものを前培養菌液とした。前培養菌液500 μ lをBHI液体培地150mlに接種し、28で12時間振とう培養した菌液をMIC法に供試した。

型溶血性連鎖球菌症原因菌

S. iniae はNaClを終濃度2%に調整したBHI液体培地20mlに凍結保存菌から1白金耳量を接種し、2848時間振とうしたものを前培養菌液とした。前培養菌液500 μ lをBHI液体培地150mlに接種し、28で15時間振とう培養してMIC法に供試した。

ビブリオ病原菌

(*Vibrio alginolyticus*)

V. alginolyticus についてもエドワジェラ症原因菌と同様の方法で凍結保存したものを使用した。使用時には NaCl を終濃度 0.8% に調整した BHI 液体培地 20ml に凍結保存菌から 1 白金耳量を接種し、28 で 24 時間振とうしたものを前培養菌液とした。前培養菌液 500 μ l を BHI 液体培地 150ml に接種し、28 で 24 時間振とう培養したものを本培養菌液として MIC 法に供試した。

ナノ粒子

抗菌剤は、D-Alanine、ASP-1、D60 (デキストラン含有)、Gly および CNP を用いた。

MIC 法

ナノ粒子 5 種類を 10 段階階段希釈を行い、96 穴プレートに 100 μ l ずつ添加した。その後、各供試菌を 1.0×10^3 CFU/ml に調整し、96 穴プレートに 100 μ l ずつ添加した。また、コントロール区として、各供試菌のみを添加した区を用いた。吸光度 630nm に調整し、12 時間おきに吸光値を測定し、各供試菌 120 時間まで測定した。

型溶血性連鎖球菌症原因菌 *S. iniae* を対象とする抗菌ナノ粒子の予防と治療効果

【予防効果の確認】

(滅菌淡水および滅菌海水中の菌数の測定)

型溶血性連鎖球菌症原因菌

S. iniae は NaCl を終濃度 2% に調整した BHI 液体培地 20ml に凍結保存菌から 1 白金耳量を接種し、28 で 48 時間振とうしたものを前培養菌液とした。前培養菌液 500 μ l を BHI 液体培地 150ml に接種し、28 で 15 時間振とう培養したものを本培養菌液として滅菌淡水および滅菌海水実験に供試した。

(滅菌淡水および海水中の生存性)

海水 1L と淡水飼育棟の淡水 1L を採水し、

200ml 三角フラスコに 100ml ずつ分注し、滅菌した。試験区は、非ナノ粒子添加区、低濃度区 (0.1ml のナノ粒子+9.9ml の滅菌淡水および滅菌海水)、中濃度区 (1 ml のナノ粒子+9ml の滅菌淡水および滅菌海水)、高濃度区 (10ml のナノ粒子) の計 4 区とした。各試験区の三角フラスコに 1 ml の菌液を添加し、 1.0×10^4 CFU/ml の菌濃度になるように設定した。ナノ粒子を 10 倍階段希釈を行い、生菌数を測定した。その後、28、100rpm で攪拌培養を行い、0 時間後、6、12、24、48 および 72 時間後に同様に生菌数を測定した。

抗菌ナノ粒子による実験感染試験

供試菌

型溶血性連鎖球菌症原因菌 (*Streptococcus iniae*)

S. iniae は性状を一定に保つために、Brain-Heart Infusion 液体培地 (BHI, Difco) で振とう培養した菌液と 40% グリセロールを等量混合し、小分けして -80 で凍結保存した。使用時には NaCl を終濃度 2% に調整した BHI 液体培地 20ml に凍結保存菌から 1 白金耳量を接種し、28 で 48 時間振とう (100rpm) したものを前培養菌液とした。前培養菌液 500 μ l を BHI 液体培地 150ml に接種し、28 で 15 時間振とう (100rpm) 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。

供試魚

2016 年に愛媛県の養殖種苗用ニジマス当歳魚 (平均体重 6.5g) を種苗センターより購入し、10t コンクリート水槽に収容し、1 日当たり全個体総重量の 1.5% 量相当の EP 飼料 (まず用配合飼料 スーパー育 4) を給餌して、実験開始まで馴致飼育した。実験開始時の供試魚の平均魚体重は 20.3g であった。

経口投与

EP 飼料 3.5g に対して抗菌ナノ粒子 (CNP) 350 μ l を添加した後、ビニール袋内で空気を入れて膨らませた状態で振り混ぜてから、経口投与を行った。

至適攻撃菌濃度決定試験

本培養菌液の 10^5 希釈、 10^6 希釈ならびに 10^7 希釈をそれぞれ行った菌液を用いて浸漬処理法によって実験感染を行った。実験感染実施期間中の水温は 18 に設定し、EP 飼料を給餌 (魚体重の 1.5% 程度) した。実験感染開始 10 日間後まで死亡魚を計数し、また実験感染魚の外部ならびに内部症状についても全て観察し、生残率を算出した。死亡魚については全て腎臓から菌分離を行った。

実験感染試験

実験感染には各試験区 10 尾を用いた。実験感染開始時の 6 時間前に抗菌ナノ粒子 (CNP) をニジマスの腹腔内に 0.05ml 注射した。この試験区を前注射区とした。また、実験感染直後に同様に抗菌ナノ粒子 (CNP) を注射した区を後注射区とした。また、安全性試験同様に抗菌ナノ粒子 (CNP) を経口投与した区を経口投与区とし、抗菌ナノ粒子 (CNP) を添加しない対照区を含めて計 4 区に分け実験感染を行った。実験感染に用いた供試菌を 1.0×10^7 CFU/ml の菌濃度になるように、10L の淡水に懸濁し、この菌懸濁液を用いて供試魚を 30 分浸漬処理した。実験感染を施した供試魚は、水温 18.0 のかけ流し水槽で飼育し、経口投与区では前述同様の飼料量を 1 日 1 回給餌した。また、他の 3 区は、供試魚を飼育する際に用いた飼料を同様に給餌した。実験感染魚は、実験感染開始 2 週間後まで観察し、観察期間終了後に全ての魚を取上げて解剖し、無菌的に腎

臓から BHI 寒天培地を用いて菌分離を行った。生残魚の尾数と菌分離の結果から、生残魚の保菌率を調べた。

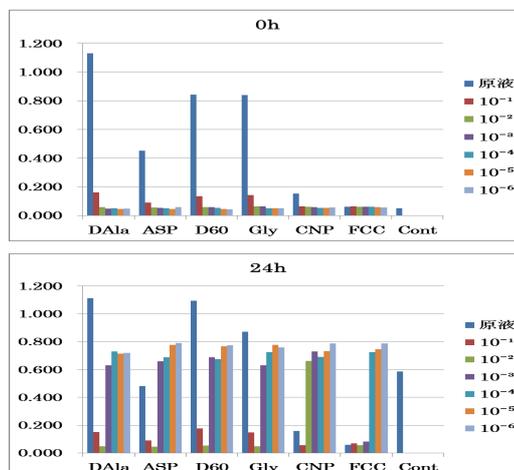
4. 研究成果

抗菌ナノ粒子を培養系に添加して、増殖抑制効果が認められた魚病細菌は、類結節症原因菌 *P. damsela subsp. piscicida*、 α 型溶血性連鎖球菌症原因菌 *L. garvieae*、 β 型溶血性連鎖球菌症原因菌 *S. iniae* およびブリオ病原菌 *V. alginolyticus* であった。

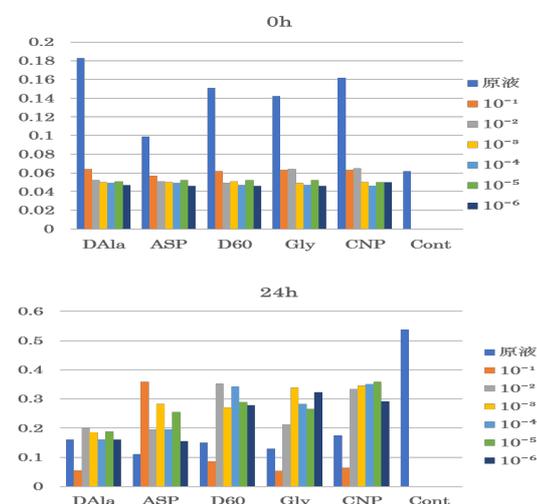
一方、抗菌ナノ粒子に対して増殖抑制が確認されなかった供試菌は、エドワジェラ症原因菌 *E. tarda*、滑走細菌症原因菌

T. maritimum、冷水病原菌 *F. psychrophilum* であった。

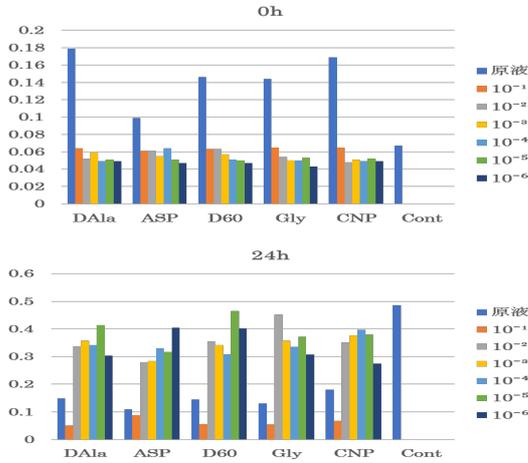
類結節症原因菌



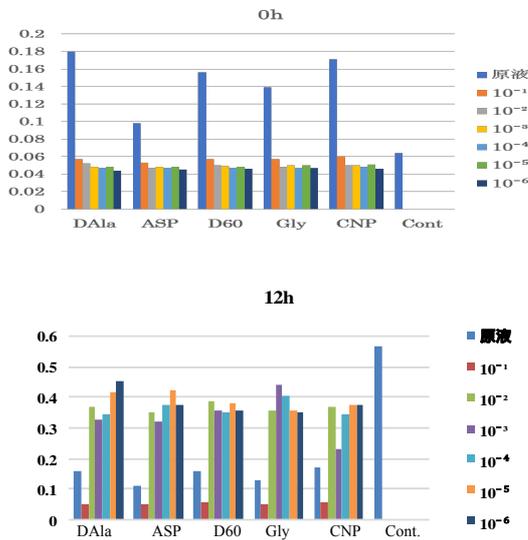
型溶血性連鎖球菌症原因菌



型溶血性連鎖球菌原因菌



ピブリオ病原原因菌



型溶血性連鎖球菌原因菌 *S. iniae* を対象とした抗菌ナノ粒子の増殖抑制効果

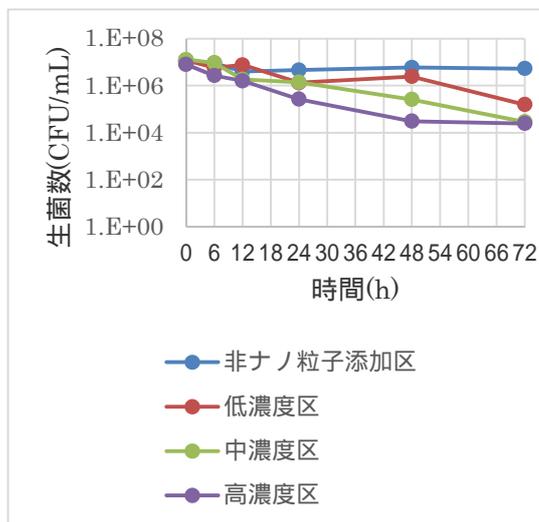


図1. 滅菌淡水による *S. iniae* に対する抗

菌ナノ粒子 (CNP 170nm) の予防効果

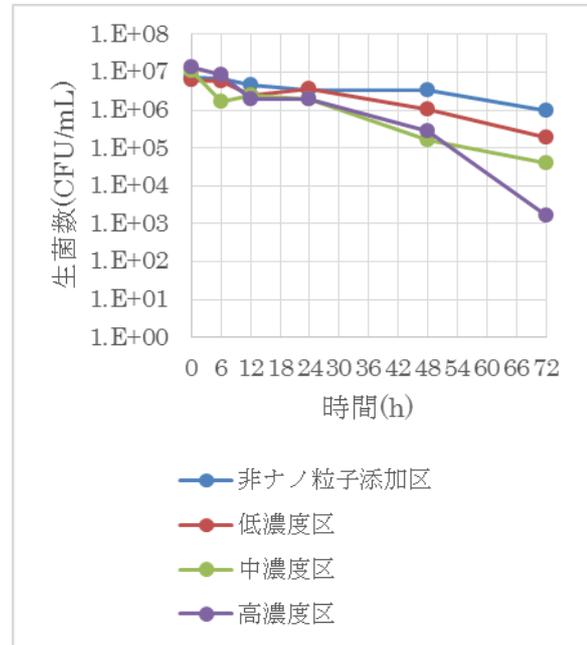


図2. 滅菌海水による *S. iniae* に対する抗菌ナノ粒子 (CNP 170nm) の予防効果

抗菌ナノ粒子の淡水中ならびに海水における増殖抑制効果を調べた結果(図1、2) どちらにも増殖抑制効果が確認され、また高濃度区でその抑制効果は高いことが明らかになった。

抗菌ナノ粒子による実験感染試験

至適攻撃菌濃度決定試験

実験感染の至適菌濃度を決定するための予備試験の結果は、図3に示した。浸漬感染時の攻撃菌濃度 1.0×10^7 CFU/ml では、感染10日間で3尾、浸漬感染の攻撃菌濃度 1.0×10^6 CFU/ml で1尾の死亡が確認された。浸漬感染の攻撃菌濃度 1.0×10^5 CFU/ml では10日が経過した時点では死亡が確認されなかった。

浸漬感染時の攻撃菌濃度 1.0×10^5 CFU/ml は、淘汰圧が低すぎるため、実験感染の条件としては適当ではないと判断した。一方、浸漬感染の攻撃菌濃度 1×10^6 CFU/ml および 1.0×10^7 CFU/ml は、感染

10 日後に生残率は 70%および 90%となった。なお、全ての死亡魚から菌分離を行い、供試菌による死亡であることを確認した。以上の結果から、以後の実験感染試験には、 1.0×10^6 CFU/ml から 1.0×10^7 CFU/ml での濃度の供試菌液を用いて感染実験をした。

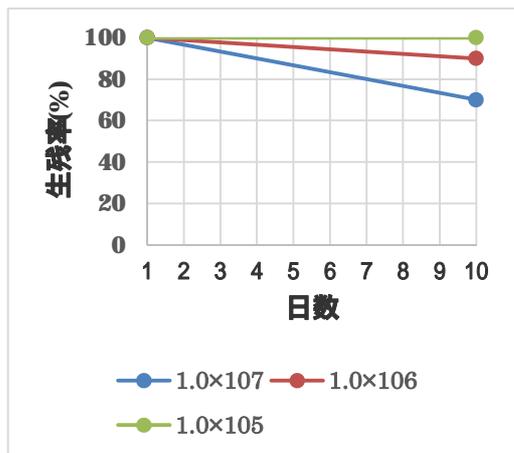


図 3 .各濃度の *S. iniae* を用いた実験感染予備試験の生残率

実験感染

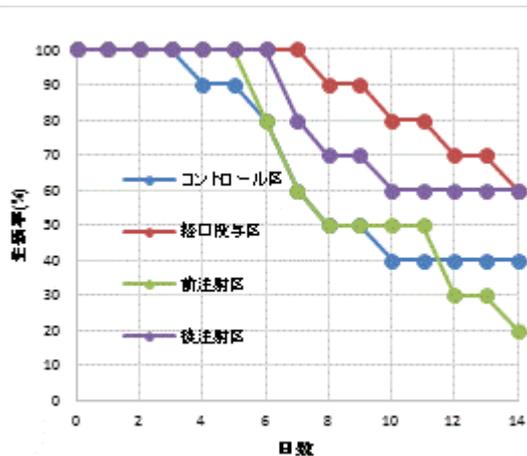


図 4 .*S. iniae* を用いた浸漬法による実験感染後のニジマスの生残率

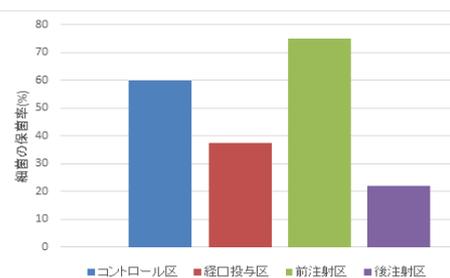


図 5 .*S. iniae* を用いたニジマス実験感染生残魚の保菌率

S. iniae を用いてニジマスに実験感染を行った後の死亡率の推移結果を 図 4 に示した。死亡した全ての供試魚について、鰓蓋の出血および尾鰭の損傷などの共通の外部症状が認められた。また、腎臓から菌分離を行った結果、 α 型溶血性連鎖球菌症の原因菌に認められる特徴的なコロニーが確認された。生残魚の腎臓から菌分離を行うと、コントロール区の保菌率は 60.0%、経口投与区の保菌率は 37.5%、前注射区の保菌率は 75.0%および後注射区の保菌率は 22.2%であった。以上の結果から抗菌ナノ粒子の経口投与区では、対照区よりも高い生残率が認められた。また、保菌率においても、実験感染後に注射した区では保菌率は最も低く、また経口投与区においても対照区よりも保菌率は低い値を示した。

結論として、本ナノ粒子により、類結節症菌、 α 型溶血性連鎖球菌症菌、 β 型溶血性連鎖球菌症菌、ピブリオ病菌に対しては抗菌性が認められ、また、ニジマスを用いた実験感染試験においても、 β 型溶血性連鎖球菌症に対しては感染防御効果が認められた。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 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