

高知大学学位授与記録

本学は、次の者に博士（学術）の学位を授与したので、学位規則（昭和28年文部省令第9号）第8条の規定に基づき、その論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

目次

学位記番号	氏名	学位論文の題目	ページ
甲総黒博第50号	Ahiable Gabriel Mawuko	Isobutyl Cyanoacrylate Nanoparticles: Promising Novel Antibacterial Agents for Bacterial Disease Management in Aquaculture. (シアノアクリレートイソブチルナノ粒子：水産養殖における魚の細菌性疾病の管理に有望な新規抗菌剤)	1
乙総黒博第14号	宝金 実央	養殖魚の生体信号に基づく至適飼育環境の構築 Establishment of optimum breeding environment based on biological signals in cultured fish	5

ふりがな 氏名（本籍） 学位の種類 学位記番号 学位授与の要件 学位授与年月日 学位論文題目	アヒアブルガブリエル マウコ Ahiable Gabriel Mawuko (ガーナ共和国) 博士（学術） 甲総黒博第50号 学位規則第4条第1項該当 令和6年3月22日 Isobutyl Cyanoacrylate Nanoparticles: Promising Novel Antibacterial Agents for Bacterial Disease Management in Aquaculture. (シアノアクリレートイソブチルナノ粒子：水産養殖における魚の細菌性疾病の管理に有望な新規抗菌剤)
発表誌名	(1) <u>Mawuko G. Ahiable, Kouki Matsunaga, Mao Hokin, Kazuhiro Iida, Fumiaki Befu, and Syun-Ichirou Oshima</u> In vitro Efficacy of Isobuty-Cyanoacrylate Nanoparticles Against Fish Bacterial Pathogens and Selection Preference by Rainbow Trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>). microorganisms 誌 2023 , 11, 2877. https://doi.org/10.3390/microorganisms11122877
	審査委員 主査 教授 大島 俊一郎 副査 教授 久保田 賢 副査 教授 中村 洋平

論文の内容の要旨

人口増加は、食糧問題、水問題ならびに衛生問題など、さまざまな問題を引き起こしており、貧困と飢餓、汚染と地球温暖化、生物多様性の損失などの問題は年々深刻さを増している。

国連や欧州連合（EU）などの国際機関も、食料安全保障の問題は非常に深刻であると認識しており、現在、水産増養殖に注目が集まっている。水産増養殖は、急速な人口増加と著しく減少傾向にある海洋生物資源の問題に対応するため、長年に渡る研究開発により発展し、現在の水産増養殖による生産量は捕獲漁業の水揚げ量を上回るまでになっている。このような背景のもと、現在、水産増養殖で問題になる各種細菌感染症に対して、養殖現場では多様な化学療法剤が長年に渡って多用され続けてきた結果、多剤耐性菌の出現が深刻な問題となっている。

そこで、本研究では、新しい作用機序で抗菌効果を示すイソブチルシアノアクリレートナノ粒子（iBCA-NP）に着目し、この物質の水産増養殖で問題になる細菌感染症に対する治療薬としての可能性について検証した。

第2章では、2つの異なるサイズの iBCA-NPs である D60（170～200 nm）と NP30（10～50 nm）について、8つの異なる属（*Aeromonas* 属、*Edwardsiella* 属、*Ternacibaculum* 属、*Nocardia* 属、*Lactococcus* 属、*Photobacterium* 属、*Streptococcus* 属ならびに *Vibrio* 属）の主要な細菌性魚類感染症の原因となる病

原体に対する *in vitro* での抗菌効果を、紫外可視分光光度計を用いて最小発育阻止濃度 (MIC) ならびに最小殺菌濃度 (MBC) で評価した。

その結果、D60 と NP30 は、供試した細菌分離株に対して濃度依存的に、また菌種特異的な抗菌性を示すことを明らかにした。このうち NP30 はすべての細菌分離株に対して殺菌性を示したが、D60 は 25% の菌株に対してのみ殺菌性を示した。さらに *Streptococcus iniae*、*Tenacibaculum maritimum* および *Photobacterium damsela subsp. Piscicida* は、両 iBCA-NP に対して特に感受性が高いことが明らかになったが、一方で *Vibrio* 属では耐性を示した。この結果は、これまでに医療分野で確認されているグラム陰性菌はグラム陽性菌よりもシアノアクリレートナノ粒子に対して耐性の傾向が認められることと一致している。ここでは、D60 と NP30 が水産養殖における抗生物質や化学療法剤の使用量削減に貢献する可能性を示唆した。

第 3 章では、iBCA-NPs を経口投与したニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) の選択的嗜好性、成長成績ならびに健康への影響について調べるために、各種試験を実施した。

その結果、iBCA-NPs 群はコントロールと同等の体重増加率と生存性を示した ($p > 0.05$)。また、魚類の肝機能指数、内臓機能指数についても調べた結果、iBCA-NP 群とコントロールの間で有意な差異は認められなかった ($P > 0.05$)。さらに iBCA-NP の投与は、ストレス、酸化ストレス (スーパーオキシドジスムターゼ、SOD)、血漿補体価ならびにリゾチーム活性にも影響しないことを確認した。

第 4 章では、ニジマスにおける β 溶血性レンサ球菌の感染症原因菌に対する 2 種類の iBCA-NPs の感染制御効果について調べた。感染制御試験は、実験感染前後にニジマスの餌に iBCA-NPs を添加した試験区を設定し、iBCA-NPs 群で病理学的損傷は少ないことが確認され、死亡率も有意に低い ($p < 0.05$) 結果となった。これらの結果から、本症原因菌の実験感染前後に iBCA-NP を添加した飼料を連続給餌すると、D60 と NP30 ではニジマスの病理学的損傷の程度と死亡率を最小限に抑えることが確認された。

一方、iBCA-NP は、予防薬としてのみ投与した場合、さらに短期間で使用する治療薬として投与を実施した場合のどちらにおいても死亡率を有意に減少させることはできなかった。従って、予防薬として使用した場合、その効力は十分に得られないことが予測された。

本研究で観察されたニジマスにおける治療効果は、どのような作用機序で生じるのかは現状、不明である。本研究の結果から予測されることとして、我々は回腸から血液およびエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、その後、食物の栄養吸収と同様の経路を経て、魚類の血液や組織中の細菌にアクセスするのではないかと予測しているが、今後さらなる研究を行って iBCA-NP の作用機序については明らかにする必要があると考えている。

この研究成果“*In vitro* Efficacy of Isobutyl-Cyanoacrylate Nanoparticles Against Fish Bacterial Pathogens and Selection Preference by Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)”. は、*microorganisms* 誌 **2023**, 11, 2877. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11122877> に掲載された。

第 5 章では、世界的に最も養殖されている魚種の一つである熱帯養殖魚ナイルティラピアを研究対象とし、iBCA-NPs の選択的嗜好性とティラピアの連鎖球菌症に対する感染制御効果について調べた。その結果、ナイルティラピアでは、iBCA-NP に対して良好な選択的嗜好性を示し、試験期間中に健康を害するような作用は認められなかった。ティラピア養殖においても、iBCA-NP を各種細菌感染症に対する制御に利用できる可能性が示唆された。

本研究で得られた結果は興味深く、食料安全保障にとって非常に重要な意味を持つと考えられる。約 70 年前、シアノアクリレートは第二次世界大戦の弾薬に使用する目的で発見され、やがてシアノアクリレートは、創傷部位の処置、皮膚移植の固定、消化管出血の止血、気管支胆道のような複雑な医療問題のための重要な外科用接着剤として使用されてきた。更に、1970 年代、シアノアクリレートナノ粒子は、生分解性の性質をもつ特徴が初めて確認された。

以来、シアノアクリレートナノ粒子は、多くの医学的問題を克服することにおいて重要な医療用薬剤となり、ポリアルキルシアノアクリレートナノ粒子（PACA-NPs）の使用における医学研究の進歩は、薬物ナノカプセル化に関連するいくつかの大きな欠点を克服する薬物スクアレノイル化技術の発明により、最先端技術を超えてスケールアップしている。今日、シアノアクリレートとその PACA-NP 誘導体は広範な薬理学的用途の可能性を持ち、ナノメディシン開発に関する多様な分野に大きな影響を与えている。ごく最近では、ナノ粒子は薬物キャリアである以上に、いくつかの重要なグラム陽性の多剤耐性菌に対する抗菌活性を有し、効果的な殺菌剤であることが確認されている。しかし、これまでにグラム陰性菌に対する PACA-NP の抗菌活性を報告した先行研究はなく、水産増養殖での使用の可能性などについても検討されていない。

本研究は、シアノアクリレートナノ粒子が水産増養殖業における感染症制御に有用である可能性について初めて調べたものである。各種実験の結果、水産増養殖において問題になる各種細菌感染症原因菌に対して抗菌効果を示すことを明らかにした。また、iBCA-NP をニジマスやナイルティラピアなどの主要養殖魚に経口投与したところ、良好な結果が得られた。

食料安全保障の観点から、抗生物質の過剰使用は抑止していくことが強く求められているが、現実問題として、効果的な代替物質なしにはこれを実現することは難しい。この代替物質の候補に、iBCA-NP が成り得ることが本研究により示された。

本研究は、国連の持続可能な開発目標（SDGs）のいくつかとも関連している。例えば、抗菌剤に対する耐性や耐性菌出現の問題負荷を減らすことは、健康と福祉（目標 3）、清潔な水と衛生（目標 6）を向上させ海洋と淡水における生物多様性の健全性（目標 14）に貢献する。

また、魚類の生産量が増えれば、世界の社会的弱者が食料にアクセスできるようになり、飢餓が減る（目標 2）ことが期待される。

さらに水産増養殖における損失を減らすことは、貧困の緩和（目標 1）と経済成長（目標 8）にも貢献することが期待される。

魚の病気による経済的損失を減らすことは、生産コストの削減につながり、多くの人々に水産増養殖事業に係わってもらえる機会の創出にも繋がることを期待される。特に世界の貧困地域における失業率の低下は、貧困削減にとっても重要である。

そのうえ先進国では、就業機会や就業意欲の向上が出生率の低下に寄与していることが知られている。つまり、雇用創出は貧困問題を解決するだけでなく、世界の人口増加率を下げる効果的な貢献に繋がると考えられる。

本研究では、世界的に各種感染症の問題が深刻化するなかで、生分解性の性質をもつ iBCA-NP の感染制御の可能性を水産増養殖の観点から初めて検証し、各種魚病の原因病原微生物の感染制御に関する新しい知見を示したことに留まらず、食の安全保障の問題など各種社会問題の解決にも繋がる研究成果であり、黒潮圏科学の理念に適合した学位研究であると評価できる。

審査の結果の要旨

「黒潮圏総合科学専攻学位論文審査等に関する実施要項」第10条に定められた「公開審査会」が令和6年1月24日に開催され、Ahiable Gabriel Mawuko 氏により学位研究内容が発表された。内容の説明ならびに質疑応答が適切に行われた。

「黒潮圏総合科学専攻学位論文審査等に関する実施要項」第11条に定められた「最終試験」を令和6年1月30日にオンラインで実施した。口頭試問において、Ahiable Gabriel Mawuko 氏はそれぞれの質問に対して適切に回答した。

学位論文審査委員会で「公開審査会」および「最終試験」の説明や回答等に基づき Ahiable Gabriel Mawuko 氏の学位論文に関する知識や研究遂行能力について総合的に検討し、博士（学術）の学位を授与に相当するものと判断し、全員一致で合格と判定した。

ふりがな	ほうきん まお
氏名（本籍）	宝金 実央 (北海道)
学位の種類	博士（学術）
学位記番号	乙総黒博第14号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	令和6年2月8日
学位論文題目	養殖魚の生体信号に基づく至適飼育環境の構築 Establishment of optimum breeding environment based on biological signals in cultured fish
発表誌名	(1) <u>Mao Hokin</u> , Tsuyoshi Miyata, Kosei Kumon, Syun-ichirou Oshima . Noninvasive health monitoring of Fish using optical ventilation signals Remote sensing applications:Society and Environment 誌 Volume33, 2024, 101105. https://doi.org/10.1016/j.rsase.2023.101105
	審査委員 主査 教授 大島 俊一郎 副査 教授 久保田 賢 副査 教授 中村 洋平

論文の内容の要旨

現在、毎年約 8,300 万人の人口増により 2017 年では 76 億人の人口が 2100 年には 112 億人に達すると予測されており、食糧問題は、近年顕在化する深刻な問題になることが予測されている。食料種の中でも畜産動物や魚類などの産業動物由来のタンパク源は、中国やインドなど新興国の食生活の向上により需要が顕著に増大しており、2050 年には 2010 年の 1.8 倍になると予測されている。

このような背景のもと、我が国の漁船漁業による漁獲量は、1984 年から 2016 年にかけて気候変動などによる海洋環境の変化や海洋生物の乱獲によって海洋生物資源量の著しい減少を原因として約 34%減となっており、今後さらに減少することが予測されている。水産物の安定供給は、何よりも漁業就業者の確保を図りながら生産性の向上を目指すことにかかっている。同時に、消費者に魚や漁業について正しく理解してもらうことは、持続的に就業者の確保を実現するための重要な要素でもあり、長期的視点に立った教育の取組みも見逃すことはできない。

養殖漁業には、海面養殖と陸上養殖があり、海面養殖は海の中に生簀を設置し、養殖魚を生産する手法である。しかし、近年、海洋汚染や海水温上昇の問題から今後、持続性に問題があることが指摘されている。そのため水槽を陸上に設置して、養殖魚を効率的に生産する陸上養殖への転換が急速に進んでいる。陸上養殖のメリットは、海面養殖と比較して自然の影響を直接受けにくく、水を安定的に確保できる環境下であれば、場所を選ばずに魚類を生産することが可能である。しかし陸上養殖の中でも代表的な閉鎖循環式陸上養殖では、水処理システムの改良が進んではいるが、魚類への各種ストレス付与による魚病発生のリスクや肉質に与える影響などの問題が常に共存している。

そこで、我々は魚類のヘルスマニタリングに注目した。水産業における魚類のヘルスマニタリングは、主にストレス反応に関連する指標を評価している。魚類の生理学的なストレス応答は、1次、2次ならびに3次に分類される。1次反応は、内分泌系ではコルチゾール、自律神経系ではカテコールアミン（ドーパミン、ノルアドレナリン、アドレナリンなど）などのストレス関連ホルモンが分泌される。2次反応は、コルチゾールの上昇によって代謝や免疫を活性化させることによりストレスに対する防御反応として、血漿中のグルコース濃度が上昇する。また、アドレナリンの上昇は、心拍数や呼吸数の上昇を促し、これらもストレスに対する防御反応となる。これらの反応は、生理的な急性ストレス反応の指標で、ヘルスマニタリングにおける指標となり得る。また、慢性ストレス反応の3次反応では、生殖機能や成長性に障害が起こる。水産増養殖における魚類のヘルスマニタリングシステムは、実験レベルで現在様々な手法が試行されている。例えば、ナイルティラピアにバイオセンサを埋め込み、ストレス指標の一つであるグルコース濃度を測定するシステムが構築されている。また、ベニザケ体内に心拍数ロガーを埋め込み、水温変化に伴う心拍変動をモニタリングしている。しかし、これらの手法は、生体に装置を挿入する手法（侵襲性）であり、この手法では魚類本来の健康状態を把握することは困難である。そこで本研究では、魚類のストレスを評価するシステムの構築を目的とし、ヒラメを対象動物に鰓蓋運動に関する光学的換気信号に着目し、連続的かつ長時間のモニタリングを実現するために機械学習の一種である決定木と組み合わせた。

第1章1節では、水槽外から魚に影響を与えることなく非侵襲的に光を用いて容易に健康状態を把握できる脈波に注目し、魚に傷をつけることなくリアルタイムでストレスを推定するシステムの構築を目的とした。脈波は、心臓が拍動することによる血液の容積変化を表す生体情報であるため、本システムで得られた波形は心臓由来である可能性は高いが、本システムで得られた波形には、体動由来のノイズやエアレーション由来の振動が含まれている可能性が考えられた。そこで、本システムで得られた波形がヒラメ心臓由来の脈波を捉えているかを検証した。ヒラメの心臓から直接脈波を測定した結果、本システムで得られている波形は、心臓由来の脈波であることが確認された。よって、本システムはヒラメの心臓付近から脈波を計測することを可能とした。また、この脈波の周期的な動きと鰓蓋拍動数が連動している可能性が示唆された。

そこで、第1章第2節では、これを検証するために、本システムで得られた波形を用いて機械学習に注目した。機械学習モデルには、決定木、ナイーブベイズ (Naïve Bayes)、サポートベクターマシン (SVM)、人工ニューラルネットワークおよび深層学習などがある。その中でも決定木は、波形を分類して選択することに適した機械学習の一種であり、他の手法よりも計算量が少なく、容易に出力できることがメリットとして挙げられている。決定木は、生体のモニタリングや地震予知で採用されており、波形で示されるパラメータを分類して、選択することが可能である。

よって本システムで得られた波形を決定木でヒラメの鰓蓋拍動を選択し、心臓由来の脈波との連動性について確認した結果、非侵襲的に得られたヒラメの光学的換気信号は、鰓蓋の開閉運動と同期していることを画像解析によって明らかにした。よって、本システムは、従来の侵襲性のある生体信号の測定とは異なり、非侵襲かつリアルタイムで生体信号の測定が可能であることが示された。この研究成果“Noninvasive health monitoring of fish using optical ventilation signals”は、Remote sensing applications:Society and Environment 誌 2024,Volume33,101105.<https://doi.org/10.1016/j.rsase.2023.101105> に掲載された。

第2章では、このシステムの実用性の可能性を検証するために、実験感染試験と呈味試験を実施した。実験感染試験では、ヒラメの感染症で問題になるエドワジェラ症の原因菌である *Edwardsiella tarda* を用いた。常法に従ってヒラメに実験感染を施し、実験感染試験終了後に1尾ずつ取上げて、本システムによって3分間の鰓蓋運動数を測定した。一方、対照区は実験感染区同様の操作を施したのちに1尾ずつ取上げ、本システムによって3分間の鰓蓋運動数を測定した。鰓蓋拍動数の測定は、感染直後、感染3日後、

感染 7 日後の計 3 回行い、実験感染試験における経時的な鰓蓋拍動数の変動を求めた。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。

実験感染試験の結果、感染 7 日後に 1 尾死亡し、その後、感染 8 日後、感染 10 日後に 1 尾ずつ死亡した。14 日間の実験感染試験の結果、感染区の生残率は、40.0%、一方対照区の生残率は 100%となり、感染区は対照区と比較して有意に低い生残率を示した (T test, $P < 0.05$)。死亡魚は、外部症状から口の発赤やヒレの欠損が確認され、内部症状から腹水の貯留や腎臓の肥大といったエドワジェラ症発症魚に認められる典型的な症状が確認された。次に、実験感染試験の本システムによる鰓蓋拍動数の結果、感染区では感染直後に鰓蓋拍動数が 76.6bpm まで上昇した。一方で対照区は 61.6bpm であり、感染区は対照区と比較して有意に高い値を示した。また、感染 4 日後の鰓蓋拍動数は、感染区では 70.8bpm まで減少し、対照区の 67.1bpm と同等の鰓蓋拍動数を示した。感染 7 日後の鰓蓋拍動数は、1 尾だけ外部症状が深刻であったため、その個体を測定したところ、56.8bpm まで衰退していた。

そこで、この個体については、死亡が確認されるまで本システムを用いて鰓蓋拍動数をモニタリングした。その結果、測定開始 2 分 30 秒後に鰓蓋の動きが約 10 秒間停止した。停止後、鰓蓋の動きが再開し、測定開始 3 分 15 秒後に再度鰓蓋の動きが停止した。その後、鰓蓋の動きの再開と停止が繰り返行われ、鰓蓋の動きが停止する頻度が経時的に増加した。測定開始 15 分後には、鰓蓋の動きが完全に停止し死亡が確認された。なお、本個体については病理検査の結果、エドワジェラ症が原因で死亡していることが確認された。次に、感染区の感染 7 日後の鰓蓋拍動数は、58.5bpm であった。これは前述のとおり死亡個体も含まれているが、対照区の感染 7 日後の鰓蓋拍動数である 63.9bpm よりも低い値を示した。よって、細菌感染症が進行していくにつれて、鰓蓋拍動数は減少していく傾向にあることが確認された。このことから本システムによる細菌感染症の早期発見の可能性が示唆された。さらに、本システムは死亡個体の早期発見にも繋がる可能性が示唆され、今後、細菌感染症の感染拡大を抑制する 1 つのツールになり得ることが期待される。

次に第 2 章 2 節では、魚の肉質はストレスの影響を受けることが、いくつかの魚種で報告されていることから、本システムにより魚のストレス応答をモニタリングすることで、肉質の評価ができるのではないかと仮説を立てた。そこで、ヒラメを高水温に曝露させることによりストレスを付与した後に、本システムによる鰓蓋拍動数の変動と肉質の変化については官能検査により調べた。官能評価の総合点では、高水温曝露区は対照区と比較して有意に低い結果となり、ヒラメは高水温曝露によって肉質が低下することが確認された。今後、本システムは肉質の評価にも使える可能性が示唆された。

以上の実用化に向けた各種試験結果から、本システムは、非侵襲的かつリアルタイムでヒラメの健康状態の把握、感染個体の早期発見ならびに一定のレベルで肉質の評価を可能することが確認された。

本研究で得られた研究成果から構築されたセンシングシステムは、学術的知見（魚類生理学や感染症学ならびに感染制御学など）の蓄積に貢献するばかりでなく、現在、社会問題となっている食糧問題の解決に向けて注目されている陸上養殖の普及にも大きく貢献する可能性のある研究成果であり、黒潮圏科学の理念に適合した学位研究であると評価できる。

審査の結果の要旨

「黒潮圏総合科学専攻学位論文審査等に関する実施要項」第22条に従って、令和6年1月30日（火）に学力の確認のための最終試験を口頭試験の形で実施した。

この試験では、研究成果の内容を確認した上で、今後この成果をいかに発展すべきかについての質問がなされた。

具体的には、食糧問題の解決の一手段として陸上養殖に注目が集まっているなかで、陸上養殖の重要性とその課題について根拠を示しながら的確に回答した。

また、陸上養殖が抱える課題を解決する上で、今回の研究成果が大きく貢献するであろうことについても、学術的ならびに専門的な知見を根拠にしながら的確に回答され、宝金氏は、提出論文に関連のある基礎及び専門科目の学識などを十分に備え、学位授与に相当する能力を有していると全員一致で判定した。