

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6980226号  
(P6980226)

(45) 発行日 令和3年12月15日(2021.12.15)

(24) 登録日 令和3年11月19日(2021.11.19)

(51) Int.Cl.

AO1K 61/13 (2017.01)  
AO1K 63/04 (2006.01)

F 1

AO1K 61/13  
AO1K 63/04

F

請求項の数 5 (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願2017-235300 (P2017-235300)  
 (22) 出願日 平成29年12月7日 (2017.12.7)  
 (65) 公開番号 特開2019-97530 (P2019-97530A)  
 (43) 公開日 令和1年6月24日 (2019.6.24)  
 審査請求日 令和2年10月9日 (2020.10.9)

微生物の受託番号 NITE P-02548

(73) 特許権者 594158150  
 学校法人君が淵学園  
 熊本県熊本市西区池田4丁目22番1号  
 (73) 特許権者 000156938  
 関西電力株式会社  
 大阪府大阪市北区中之島三丁目6番16号  
 (73) 特許権者 592008767  
 株式会社松本微生物研究所  
 長野県松本市大字新村2904番地  
 (73) 特許権者 503351397  
 株式会社拓水  
 福岡県福岡市中央区舞鶴三丁目6番23-  
 708号  
 (74) 代理人 110001069  
 特許業務法人京都国際特許事務所  
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】新規微生物及びそれを用いた水生動物用病害防除資材

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

ロドプラム・エスピ一 (Rhodovulum sp.) K K M I 0 1 菌株 (N I T E P - 0 2 5 4 8 )。

## 【請求項2】

ロドプラム・エスピ一 (Rhodovulum sp.) K K M I 0 1 菌株 (N I T E P - 0 2 5 4 8 ) を有効成分として含有することを特徴とする水生動物用病害防除資材。

## 【請求項3】

ロドプラム・エスピ一 (Rhodovulum sp.) K K M I 0 1 菌株 (N I T E P - 0 2 5 4 8 ) を乾燥菌体の状態で含有することを特徴とする請求項2に記載の水生動物用病害防除資材。 10

## 【請求項4】

請求項2又は3に係る水生動物用病害防除資材を、餌に混合して水生動物に投与することを特徴とする水生動物の病害防除方法。

## 【請求項5】

請求項2又は3に係る水生動物用病害防除資材を、水生動物の飼育水に添加することを特徴とする水生動物の病害防除方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、水生動物の病害防除に優れた効果を有する新規微生物、及びそれを用いた水生動物用病害防除資材に関する。

#### 【背景技術】

##### 【0002】

近年では、食用又は観賞用として多様な水生動物、すなわち魚類、甲殻類、及び貝類等が養殖又は飼育されている。しかし、養殖池や水槽のように、水生動物が高密度に生息し、しかも水の入れ替わりが少ないといった、本来の自然生態系と異なる特殊な人為的環境下では、その環境に適応した微生物が異常発生し、これが水生生物の病害を引き起こす場合がある。例えば、世界的な養殖エビの生産地である東南アジアでは、近年、養殖エビが稚エビの段階で死亡する「早期死亡症候群 / 急性肝すい臓壊死病」(Early Mortality Syndrome/Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease、EMS/AHPND) とよばれる感染症が蔓延して養殖エビの生産量が激減している。このEMS/AHPNDは、病原性のビブリオ菌によって引き起こされることが分かっている。10

##### 【0003】

従来、水生動物の病原菌感染の予防や病原菌に感染した水生動物の治療（すなわち病害防除）のための手段として、抗生物質を餌に混入して水生生物に投与することが行われている。しかしながら、抗生物質の投与には、耐性菌の出現を促すという問題や、抗生物質を投与した水生生物を食用とする場合の安全性への懸念がある。

##### 【0004】

そこで、近年、抗生物質に代わるものとして、有用微生物を用いた水生動物の病害防除資材（いわゆる水産バイオティクス）に関する研究が盛んに行われている。例えば、非特許文献1には、紅色硫黄細菌である*Ectothiorhodospira shaposhnikovii* WF株をバナメイエビの幼生の飼育水に添加することにより、幼生の生残率が向上したことが記載されている。また、非特許文献2には、枯草菌である*Bacillus licheniformis* と *Bacillus subtilis* の1:1調製物をバナメイエビの幼生の飼育水に投与することにより、幼生の生残率が向上したことが記載されている。更に、非特許文献3には、同じく枯草菌である*Bacillus subtilis* E20株をバナメイエビの幼生の飼育水に投与することにより幼生の生残率が向上したことが記載されている。20

#### 【先行技術文献】

##### 【非特許文献】

##### 【0005】

【非特許文献1】"ベネフィシャル・マイクローブス (Beneficial microbes)" , 2015年, 第6巻, 第4号, pp.525-533

【非特許文献2】"プロバイオティクス・アンド・アンティマイクロバイアル・プロテインズ (Probiotics and Antimicrobial Proteins)" , 2015年, 第7巻, 第2号, pp.118-125

【非特許文献3】"フィッシュ・アンド・シェルフィッシュ・イムノロジー (Fish & Shellfish Immunology)" , 2010年, 第28巻, 第5-6号, pp.837-844

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

##### 【0006】

しかしながら、非特許文献1～3に記載された微生物が効果を発揮するためには、いずれも上記微生物をエビの飼育水に $1 \times 10^6$ cells/ml程度の濃度となるように投与する必要がある。微生物の価格は種類によって異なるが、通常は $1 \times 10^9$ cells/mlの濃度で1リットルあたり50円～500円程度である。仮に養殖池の面積を5,000m<sup>2</sup>、水深を2mとすると、その水量は10,000トンとなり、1リットル50円で計算しても、微生物添加に掛かるコストは500,000円と非常に高額になってしまう。このため、上記従来の微生物を大規模な養殖池や大型水槽に適用するのはコスト面から困難であり、例えば幼生育成の際に用いられる小型タンクでしか利用することができなかった。40

##### 【0007】

本発明は上記の点に鑑みて成されたものであり、その目的とするところは、少ない投与

50

量でも水生動物の病害防除に効果を発揮することができる新規微生物、及びそれを用いた水生動物用病害防除資材を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、海水中から単離した新規菌株が水生生物の病害防除に優れた効果を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

【0009】

すなわち、本発明は、新規微生物であるロドラム・エスピ－(Rhodovulum sp.) KK M I 0 1 菌株(N I T E P - 0 2 5 4 8)を提供する。

10

【0010】

上記本発明に係る新規微生物は、 $3 \times 10^2$  cells/ml程度の濃度(すなわち上記従来の微生物の約3000分の1の投与量)でも水生動物の病害防除効果を発揮できる。そのため、微生物投与に掛かるコストを抑えることができ、大規模な養殖池や大型水槽への適用も可能である。また、上記本発明に係る新規微生物は、餌に混合して水生動物に投与した場合であっても病害防除効果を発揮することができるため、投与量を更に抑えることも可能である。

【0011】

また、本発明は、ロドラム・エスピ－(Rhodovulum sp.) KK M I 0 1 菌株(N I T E P - 0 2 5 4 8)を有効成分として含有する水生動物用病害防除資材を提供する。

20

【0012】

なお、上記水生動物用病害防除資材は、ロドラム・エスピ－(Rhodovulum sp.) KK M I 0 1 菌株(N I T E P - 0 2 5 4 8)を乾燥菌体の状態で含有するものとすることができます。

【発明の効果】

【0013】

上記の通り、本発明に係る新規微生物及びそれを用いた水生動物用病害防除資材によれば、少ない投与量でも水生動物の病害防除を行うことができ、病害防除に掛かるコストを低減することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

30

【0014】

【図1】最尤法によって作成した本発明に係る微生物の分子系統樹。図中のスケールバーは塩基置換率(substitution/site)を表す。

【発明を実施するための形態】

【0015】

本発明者らは、熊本県上天草市大矢野町の海岸から採取した海水中の細菌の中から、1種類の菌株を単離し、これをKKM I 0 1と命名した。

【0016】

上記KKM I 0 1 株の16S rRNA遺伝子配列に基づく最尤法分子系統樹解析の結果を図1に示す。この分子系統樹解析の結果から、KKM I 0 1 株は、海洋性の光合成細菌であるロドラム(Rhodovulum)属に属する菌株であることが示された。また、前記分子系統樹から前記菌株はロドラム・サルフィドフィルム(Rhodovulum sulfidophilum)に最も近縁であることが示された。

40

この菌株は、独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センターに寄託されている(受託日は2017年9月27日、受託番号はN I T E P - 0 2 5 4 8である)。

【0017】

本発明者は、上記菌株をクルマエビに投与することにより、該菌株が水生動物の病害防除に優れた効果を発揮することを確認した(後述の実施例1～実施例3を参照)。本発明に係る水生動物用病害防除資材は、このKKM I 0 1 株を有効成分として含有するものである。

50

## 【0018】

前記水生動物用病害防除資材は、上記の菌体を含む培養液又は培養液を除いた菌体の形で使用される。なお、上記本発明に係る菌株は、生菌の状態で使用した場合に限らず、乾燥菌体の状態で使用した場合にも水生動物に対する病害防除効果を発揮することができる（後述の実施例3を参照）。上記菌株を乾燥菌体とした上で使用する場合、生菌の状態で使用する場合に比べて本発明に係る病害防除資材の保管や投与に掛かる手間及びコストを低減することができる。また、本発明に係る病害防除資材は、上記菌株の生菌又は乾燥菌体を、所定の液体やゲルに分散させて液体製剤又はゲル状製剤としたものや、所定の固体から成る担体に保持させて粒剤や粉剤などの剤型としたものであってもよい。

## 【0019】

10

上記水生動物用病害防除資材は、水生動物の飼育水に添加するほか、水生動物の餌に混入することによっても、その効果を発揮させることができる。その使用量は水生動物の種類や飼育環境又は使用時期などに応じて適宜調整することが望ましい。なお、上述の通り、本発明に係る微生物は、従来の病害防除資材に用いられる微生物に比べて少ない投与量で効果を発揮することができ、飼育水に添加して使用する場合には、 $3 \times 10^2$  cells/ml(最終濃度)/日程度の添加量で病害防除効果を得ることができる（後述の実施例2を参照）。

## 【0020】

また、上記本発明に係る水生動物用病害防除資材は、魚類、甲殻類、貝類等の種々の水生動物の病害防除、特に、クルマエビ、バナメイエビ、ウシエビ（ブラックタイガー）を始めとするクルマエビ科のエビの病害防除に好適に使用することができる。なお、本発明の病害防除資材の適用対象とする水生動物は、海水、淡水、又は汽水のいずれに生息するものであってもよい。

20

## 【実施例1】

## 【0021】

本発明に係る微生物による病害防除効果を確認するため、クルマエビへの投与試験を行った。具体的には、布濾過した実海水を収容した150トン培養槽で飼育されているクルマエビに、ロドブラム・エスピ（*Rhodovulum sp.*）KKM101菌株の生菌を湿重量で0.01%混合した餌を、70日間、毎日エビの体重の10質量%給与した（これを投与区とよぶ）。また、対照として、別の150トン培養槽で飼育されているクルマエビに、菌体を含有しない餌を、70日間、毎日エビの体重の10質量%給与した（これを無投与区とよぶ）。表1に、試験開始時及び試験終了時における各試験区のクルマエビの平均体重及び尾数と、試験終了時における各試験区のクルマエビの生残率とを示す。

30

## 【0022】

## 【表1】

	試験開始		試験終了			生残率(%)
	平均体重(g)	尾数(尾)	経過日数	平均体重(g)	尾数(尾)	
投与区	0.03	9,000	70	2.8	7,372	81.9
無投与区	0.03	9,000	70	2.83	6,434	71.5

## 【0023】

表1のデータをカイニ乗検定で分析したところ、カイニ乗値 = 36.10, P 値 =  $1.88 \times 10^{-9}$ という結果となり、投与区と無投与区のクルマエビの生残率には高度な有意差が認められた。すなわち、上記試験により、本発明に係る微生物の投与によってクルマエビの生残率が有意に向上升ることが確認された。

40

## 【実施例2】

## 【0024】

本発明に係る微生物の投与によるクルマエビの遺伝子発現の変化を調べた。具体的には、まず以下の3つの試験区でクルマエビの飼育を行った。なお、いずれの試験区においても、30リットル水槽中に布濾過した実海水を収容して10尾のクルマエビ（平均体重約11g）を飼育した。

投与区1：KKM101菌株の生菌を湿重量で0.01%混合した餌を毎日エビの体重の10

50

質量%給与。

投与区2：KKM101菌株の生菌を飼育水槽中へ $3 \times 10^2$  cells/ml(最終濃度)/日の条件で投与し、前記菌株を含まない餌を毎日エビの体重の10質量%給与。

無投与区：飼育水槽への前記菌体の投与は行わず、且つ前記菌株を含まない餌を毎日エビの体重の10質量%給与。

#### 【0025】

続いて、各試験区で2週間飼育したクルマエビの中腸腺組織から常法に従ってRNAを抽出し、該RNAから合成したcDNAを用いて次世代シーケンサー(フローセルによる可逆的タミネーター法を用いた1塩基伸長反応)によるトランスクリプトーム解析(遺伝子発現解析)を行った。

10

#### 【0026】

トランスクリプトーム解析は、ユーロフィンジェノミクス株式会社に依託し、以下の条件で行った。

装置：HiSeq2500 (illumina社)

ソフトウェア：HiSeq Control Software 2.2.58、RTA 1.18.64、bc12fastq 1.8.4

リード条件： $2 \times 125$ bp, 0.4-0.6億read/sample

マッピング対象遺伝子：クルマエビの273遺伝子のcDNA塩基配列

発現量の比較：ソフトウェアedgeR (ver. 3.16.1)によるリード数の正規化と発現量比較(尤法検定)

#### 【0027】

20

上記発現解析により、病害抵抗性タンパク質又は抗菌ペプチドをコードする複数の遺伝子(以下、これらを「病害抵抗性遺伝子」とよぶ)の発現量の増加が確認された。投与区1及び投与区2における前記病害抵抗性遺伝子の発現量を表2に示す。なお、表2において、各遺伝子の発現量は、無投与区を1とした場合の相対値で示している。

#### 【0028】

##### 【表2】

		投与区1	投与区2
病害抵抗性タンパク質			
活性酸素発生系	Dual oxidase	5.8	5.5
	Nitric oxide synthase	5.7	3.6
	NADPH oxidase	8.2 *	3.6
活性酸素消去系	SOD-2	39 **	13 *
	SOD-5	4.0	4.9
Heat shock protein	HSP60	4.1	9.1 *
自然免疫制御系	IMD (Immune deficiency)	3.3	7.1 *
抗菌ペプチド	Crustin-like peptide	8.4 *	0.4
	Crustin-like peptide type 2	15.5 **	0.5
レクチン	Lectin D	5.0	7.8 *

\*\*: P < 0.01, \*: P < 0.05

#### 【0029】

表2から明らかなように、投与区1及び投与区2の双方において様々な病害抵抗性遺伝子の発現量の増加が認められた(但し、抗菌ペプチドをコードする遺伝子については、投与区1のみで発現上昇が見られた)。これらの遺伝子は自然免疫(先天性免疫)に寄与す

50

るタンパク質又はペプチドをコードするものであることから、本発明に係る微生物の投与によりクルマエビの自然免疫が賦活化されたと推定される。

【実施例 3】

【0030】

本発明に係る微生物の投与を行ったクルマエビに対し、病原性ビブリオ菌を強制感作させて病害抑制効果を確認した。具体的には、以下の 3 つの試験区で本発明に係る微生物を与えてクルマエビ（平均体重 1g）を 7 日間飼育し、その後クルマエビ病原性ビブリオ菌であるビブリオ・ニグリブルクリチュード (*Vibrio nigripulchritudo*) を強制感作させ 6 日間飼育し、最終日における生残率を求めた。なお、いずれの試験区においても、人工海水 (marine-salt、株式会社カイスイマレン製) を収容した水槽中でクルマエビを飼育した。

生菌餌投与区：KKM I 0 1 菌株の生菌を湿重量で 0.01% 混合した餌を毎日エビの体重の 10 質量 % 納入。

乾燥菌体餌投与区：KKM I 0 1 菌株の乾燥菌体を生菌換算で 0.01% 相当となるよう添加した餌を毎日エビの体重の 10 質量 % 納入。

無投与区：前記菌株を含まない餌を毎日エビの体重の 10 質量 % 納入。

なお、前記強制感作は、人工海水中にビブリオ・ニグリブルクリチュード (*Vibrio nigripulchritudo*) を終濃度が  $1 \times 10^6$  cfu/ml となるように添加したものに、クルマエビを 3 時間漬けることによって行った。試験開始時（0 日目）及び試験終了時（6 日目）における各試験区のクルマエビの尾数と、試験終了時における各試験区のクルマエビの生残率とを表 3 に示す。

【0031】

【表 3】

エビの数		
無投与区	生菌餌投与区	乾燥菌体餌投与区
0 日目	9	7
6 日目	2	4
生残率(%)	22	57
		56

【0032】

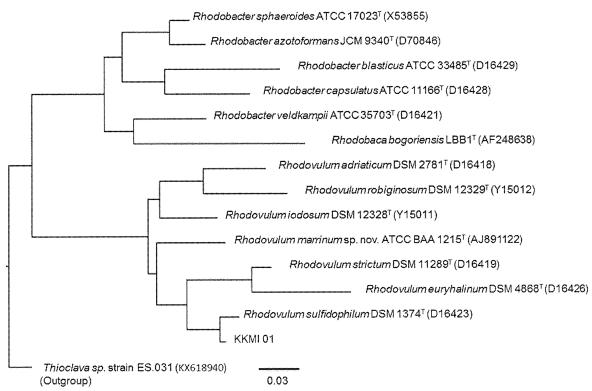
表 3 に示す通り、生菌餌投与区及び乾燥菌体餌投与区の双方において、生残率が無投与区の 2 倍以上に上昇した。これは、本発明に係る微生物の投与により、病原性ビブリオ菌に対するクルマエビの抵抗性が高められたためと考えられる。

10

20

30

【図1】



---

フロントページの続き

(72)発明者 宮坂 均  
熊本県熊本市西区池田4丁目22番1号 崇城大学内

(72)発明者 奥畑 博史  
大阪府大阪市北区中之島三丁目6番16号 関西電力株式会社内

(72)発明者 牧 孝昭  
長野県松本市大字新村2904番地 株式会社松本微生物研究所内

(72)発明者 尾崎 健一  
福岡県福岡市中央区舞鶴3-6-23-708 株式会社拓水内

審査官 赤坂 祐樹

(56)参考文献 國際公開第2009/063969 (WO, A1)  
特開2013-118828 (JP, A)  
米国特許出願公開第2006/0147410 (US, A1)  
特開2010-051247 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A01K 61/13  
A01K 63/04  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
P u b M e d