

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07905

研究課題名(和文)ローズマリーを用いた寄生虫防除技術の開発

研究課題名(英文)Technical development of parasitic disease prevention using rosemary

研究代表者

片桐 孝之 (Katagiri, Takayuki)

東京海洋大学・学術研究院・准教授

研究者番号：50361811

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ローズマリーの水(Aq)とエタノール抽出液(Et)のダクチロギルス(DM)に対する予防、防除効果を検証した。AqおよびEtは、in vitroにおいて添加量に依存してDMを死滅した。DMに感染したコイの飼育水にAq、Etを添加すると、ともに鰻の虫体数が減少した。Aq添加飼料により虫体数が減少した。一方、ローズマリーの安全性を検証したところ肝臓と腎臓で病理組織学的変化が認められたが、重度な障害ではなかった。Et添加飼料による感染予防効果は認められなかったが、コントロールよりも虫体数は少なかった。以上より、完全に駆除することは難しいが、虫体数の減少による症状の緩和や二次感染の予防が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

魚類養殖における寄生虫の感染防除方法は、寄生虫の多様性と複雑な生活環から、獲得免疫機構を利用したワクチン開発は不可能である。これまで多くの魚病研究者がその困難な課題にチャレンジしたが、ほとんど成果が得られていない。本研究は、ワクチンなどの特異的な獲得免疫機構を利用した防除技術ではなく、寄生虫の孵化幼生等が魚に感染するステージをブロックするものであり、水やエタノールで抽出するため、安全かつ特別な技術が必要としない。全く新しい技術として普及する可能性が高く、波及効果が大きい。また、実用化された場合の費用も低価に抑えられる。

以上より、学術的な意義や社会的意義を持つ研究と考えている。

研究成果の概要(英文)：We examined the anthelmintic activity of rosemary water (Aq) and ethanol (Et) extracts against *Dactylogyrus minutus* (Dm) in vitro and in vivo using bath treatment and oral administration. Aq and Et extracts directly killed Dm in a dose-dependent manner. Parasite intensity and prevalence in carp exposed in Aq and Et extracts were significantly lower than in control. Oral administration of Aq extract reduced the intensity of Dm. Complete preventive effects of Dm in carp with both extracts after oral administration were not observed, though the relative reduction in the number of the parasite was counted.

研究分野：魚病

キーワード：ローズマリー 駆虫 感染予防 寄生虫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本の魚類養殖における多魚種化は、地域ブランドを創出しようという国の方針と各都道府県の取り組み努力によって達成された結果である。しかしその産業化に伴って、細菌、ウイルス、寄生虫の感染による魚病被害は、産業の基盤を揺るがすほどの損失をもたらしてきた。1960年代から急速に発展してきた日本の養殖業は、魚病の克服の歴史に支えられ、近年では、予防対策としてのワクチンの開発と普及が魚病研究者と製薬会社によってなされつつある。その実用化された成果は、農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課から養殖漁業者等に配布されている「水産用医薬品の使用について(平成27年1月31日)」に、使用方法とともに詳しくまとめられている。

魚病をもたらす病原体は、細菌、ウイルス、寄生虫に大別されるが、上記資料に記載されている実用化ワクチンは、細菌とウイルスのみである。一部の寄生虫に対する治療薬はあるものの、予防対策は全くの手つかずの状態である。新たな発想による技術が開発できなければ、今後も寄生虫感染症を全く防ぐことができないものと考えられる。つまり、魚類の獲得免疫機構を利用した種特異的なワクチンでは、魚類と同様に真核生物である寄生虫を防ぐ見込みがないためである。寄生虫は、原虫、粘液胞子虫、微胞子虫、単生虫、繊毛虫、その他大型寄生虫など多種多様な「仲間」の総称であり、寄生虫による魚病被害の撲滅は、「魚病学」に残った最大の課題となっている。

すべての寄生虫が魚類に感染するタイミングは、複雑な生活環のなかのごく一部の孵化幼生等のステージの限られた時期であり、理論上、この感染段階をブロックすることができれば、魚体への感染は成立しない。特に、このステージにおける寄生虫は、薬剤や魚類のもつ非特異的な生体防御機構に影響を受けやすい「小型で比較的脆弱」な状態である。つまり、魚類に感染する寄生虫のステージで防除できれば、上記のように多種多様な「仲間」であっても、感染症対策として確立できる可能性は高い。

このような現状に対し、ハーブをはじめとした古来より食されている植物が、寄生虫対策に効果が認められるという報告が、総説にまとめられている。しかし、個々の論文を見てみると、単純に植物の抽出液に寄生虫を浸漬しただけといった報告が多く、科学的な検証がほとんどなされていないこと、さらに実際の養殖現場での利用を無視したような非現実的な投与方法が用いられていることなどから、養殖業への応用は全く進んでいない。

実用的な寄生虫感染症に対する予防技術とは、安価で入手が容易であること、飼育魚にストレスを与えることなく投与が可能であること、成長阻害や行動異常を起こさないなど、毒性が認められないこと、十分な寄生虫防除効果があることを満足させる必要がある。本申請では、すでに予備実験で最も駆虫効果の高かったローズマリーを用い、魚類養殖において問題となっている寄生虫感染症に対し、感染の成立を阻止し、実用的な治療方法へと進化させることを目指すものである。

2. 研究の目的

本研究では、魚類の養殖において予防対策が全く確立されていない寄生虫感染症に対し、新たな着想に基づき、種々の寄生虫に広く効果を発揮する感染予防と駆虫技術を開発する。特に、本研究では、ローズマリー抽出物を経口投与し、その有効成分が血中を循環後、鰓あるいは体表粘液から分泌されることにより、感染予防と駆虫効果を期待するものである。

3. 研究の方法

入手が容易な3種類のハーブ10gを50mlの蒸留水およびエタノールを用いて成分を抽出した。コイに寄生する5種類の寄生虫に対し、抗寄生虫作用をスクリーニングした。最も抗寄生虫作用の強かったローズマリーとダクチロギルスモデルとして研究を進めた。

ローズマリー抽出液の主要な5成分を用いて、寄生虫を殺すかどうかを検討した。コイの飼料に抽出液を添加して給餌し、寄生しているダクチロギルスの数を経時的に計測した。さらに、ローズマリーの毒性を検討するため、ローズマリーを添加した飼料を給餌して、病理組織学的検討を行うとともに、内臓が障害を受けた時に血清中に増加する複数のパラメーターの測定を行った。

また、感染予防にローズマリー抽出液の給餌に効果があるかどうかについても感染実験を用いて検討を行った。

4. 研究成果

ローズマリー、セージ、タイムの葉の蒸留水あるいは75%エタノール抽出液を5種類の寄生虫に対して種々の濃度に調整して加えたところ、濃度依存的に寄生虫を殺す効果が認められた。特に、ローズマリーが最も低濃度で寄生虫を殺した。さらに、その効果は、単生虫のダクチロギルスが最も顕著であり、蒸留水抽出液とエタノール抽出液を比べると、エタノール抽出液のほうが、寄生虫を殺す効果が高かった。

ローズマリーに含まれる主要5成分のうち、1,8-Cineoleの高純度精製品をダクチロギルスに

添加した場合、最も本虫を殺す効果が高いことがわかった。つまり、ローズマリー抽出液がダクチロギルスに殺す成分として、1,8-Cineole が最も強い作用を持つことが推察された。

コイに寄生するダクチロギルスに対し、ローズマリー抽出液がどのように影響するのかどうかを種々の量に調整した両抽出液を含む飼料を給餌して検討した。蒸留水抽出液を 30 日間給餌したところ、100g の飼料に対して 60ml 含んだものを給餌したコイの鰓からほぼすべての寄生虫が観察されなくなった。一方、エタノール抽出液を含む飼料においては、100g の飼料に対して 5ml 含んだものを 28 日間給餌した場合、対照区に対して有意に寄生虫数が減少した。

ローズマリーの蒸留水抽出液を市販飼料 100g に対して、10、20、40、80、100ml 添加したものを 20 日間コイに給餌してその毒性を評価した。その結果、肝臓および腎臓に病変が観察された。肝細胞には、核の萎縮と濃縮が、20ml 以上添加した試験区で観察された。腎臓においては、細胞の壊死が 40ml 以上添加した試験区で観察された。従って、高い濃度のローズマリー抽出液の投与は、魚毒性を持つことが明らかとなった。一方、内臓が障害を受けた時に血清中に増加する複数のパラメーターの測定を行ったところ、ローズマリー水抽出液を含む飼料を給餌したコイで AST が対照区よりも高い値となったが、有意な差は認められなかったことから、重度な毒性ではないことが推察された。

エタノール抽出液を含む飼料（市販飼料 100g に対して、0、10、20、40ml 添加）がダクチロギルスのコイに対する 40 日後の感染予防効果について検討したところ、いずれの試験区でも経時的に寄生数が増加しており、寄生虫感染を完全に予防することはできなかった。しかし、抽出物の用量依存的に寄生数が少ない傾向がみられ、40 ml エタノール抽出液を含む飼料を給餌した試験区では、対照区と比べて寄生数が有意に少ないことが分かった。体表粘液の主成分分析を行ったところ、ローズマリー抽出物の給餌によって粘液中の成分組成に違いがみられることが分かった。加えて、ローズマリーの有効成分とされる 1,8-シネオールや α -ピネン、カンファーなどは検出されなかった。以上より、ローズマリー抽出物の経口投与によって、魚体内においてローズマリー抽出物が代謝されることで、ダクチロギルスの寄生数を抑制する効果があることが示唆された。腎臓および肝臓において、抽出物の給餌を行っても病理組織学的に病変が認められなかったことから、これらの投与量では毒性は確認されなかった。

以上の結果より、養殖現場においては、寄生虫を完全に駆除することは難しいが、寄生数を抑制することによる症状の緩和や二次感染の予防が期待できるローズマリー抽出物は養殖魚の寄生虫対策として使用できる可能性があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 M.A. Zoral, Y. Ishikawa, T. Ohshima, K. Futami, ... T. Katagiri	4. 巻 495
2. 論文標題 Toxicological effects and pharmacokinetics of rosemary (<i>Rosmarinus officinalis</i>) extract in common carp (<i>Cyprinus carpio</i>)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Aquaculture	6. 最初と最後の頁 955-960
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.048	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 M.A.Zoral, K.Futami, M.Endo, M. Maita, T.Katagiri	4. 巻 247
2. 論文標題 Anthelmintic activity of <i>Rosmarinus officinalis</i> against <i>Dactylogyrus minutus</i> (Monogenea) infections in <i>Cyprinus carpio</i>	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Veterinary Parasitology	6. 最初と最後の頁 1, 6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.09.013	査読の有無 有
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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 M. A. Zoral, T. Katagiri, K. Futami, M. Endo, M. Maita
2. 発表標題 FIRST REPORT ON THE ANTHELMINTIC ACTIVITY OF ROSEMARY (<i>Rosmarinus officinalis</i>) AGAINST MONOGENEA (<i>Dactylogyrus minutus</i>) IN COMMON CARP (<i>Cyprinus carpio</i>)
3. 学会等名 International Conference on Advances in Fish Health 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 M. A. Zoral, Y. Ishikawa, T. Ohshima, K. Futami, M. Maita, M. Endo, T. Katagiri
2. 発表標題 The anthelmintic effects of rosemary <i>Rosmarinus officinalis</i> extracts in common carp (<i>Cyprinus carpio</i>) and pharmacokinetic activity of 1,8-cineole component
3. 学会等名 日本水産学会創立85周年記念国際シンポジウム (国際学会)
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
--	---------------------------	-----------------------	----