

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20580220

研究課題名（和文） 紅藻類に含まれるフグ寄生性カイアシ類の新規駆虫成分に関する研究

研究課題名（英文） Antiparasitic components newly isolated from red algae for parasitic copepods of cultured pufferfish

研究代表者

浅川 学 (ASAKAWA MANABU)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・准教授

研究者番号：60243606

研究成果の概要（和文）：

魚類寄生性カイアシ類（動物プランクトン）は魚類の組織、血液などを栄養源とし、特にフグ養殖業に大きな損害を与えていることから、安全な駆虫剤の開発が急務とされている。海藻を対象にフグ寄生性カイアシ類 *Pseudocaligus fugu* に対する駆虫物質の探索研究を行い、マクリ“海人草” *Digenea simplex*（紅藻類）の水抽出物から二つの駆虫活性成分を単離することができた。一つは興奮性アミノ酸の一種であるカイニン酸 ( $C_{10}H_{15}NO_4$ ，分子量；213) であり、もう一つは、高速液体クロマトグラフ及び質量分析などの機器分析の結果からカイニン酸と同様の分子量をもつ新たな異性体であることが推定された。

研究成果の概要（英文）：

In aquaculture industry, caligid copepods are well known as pests causing heavy mortality or acting as disease inducers by creating a portal for entry of bacteria or other pathogens. The caligid *Pseudocaligus fugu* has been causing serious damages on cultured tiger puffer in western Japan. Hence we have tried to search for some antiparasitic agents which cause no damage on the host. Two compounds isolated from crude H<sub>2</sub>O extract of “makuri”, a red alga *Digenea simplex* showed effects on the parasite. One was kainic acid ( $C_{10}H_{15}NO_4$ , MW=213), and the other one showing the same molecular weight of it.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：水圏毒物学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：フグ、カイアシ類、寄生虫、興奮性アミノ酸、紅藻類、カイニン酸、海人草、ハナヤナギ

## 1. 研究開始当初の背景

魚類寄生性カイアシ類は魚類の組織、血液などを栄養源としており、水産養殖業に巨額の損害を与えている。しかしながら、これら

の効果的な駆除法がないことから、ホルマリンなどの毒性の強い薬品が養殖フグに寄生するカイアシ類の駆除に用いられるなど、安全な駆虫剤の開発が望まれている。このような社会背景のもと、海藻を用いてフグ寄生性

カイアシ類に対する駆虫活性成分の探索を行ったところ、ある種の紅藻類に寄生性カイアシ類に対する駆虫活性成分が存在することが明らかとなり、海洋生物由来のいわゆる“環境に優しい”駆虫剤の開発の可能性が示唆されたことが、本研究の端緒となった。

## 2. 研究の目的

本研究課題では研究期間内に本紅藻類からその存在が認められたフグ寄生性カイアシ類に対する駆虫活性成分を精製・単離し、化学構造や駆虫活性の詳細などその諸性状を明らかにすることを主目的としている。一方で、前述のようにこれまで用いられてきたホルマリンなどの強い毒性を有する化学薬剤ではなく、海藻など海洋生物由来のいわゆる“環境に優しい”駆虫剤を開発する基礎データを収集することも目的としている。本駆虫活性成分は、ドウモイ酸やカイニン酸など既知の興奮性アミノ酸の性状に酷似していることからフグ寄生性カイアシ類に対する駆虫活性を構造活性相関も視野に入れながら比較検討することも目的としている。なお、本研究課題において用いた駆虫活性を有するこの海藻（紅藻類）は鹿児島大学水産学部寺田竜太准教授より紅藻類フジマツモ科マクリ属のマクリ（海人草）*Digenea simplex* (Wulfen) C. Agardh と同定された。

## 3. 研究の方法

2008年、2010年のそれぞれ6月に沖縄県石垣島川平湾沖のリーフ(図.1)において、マクリ *D. simplex* (図.2) を採取した。

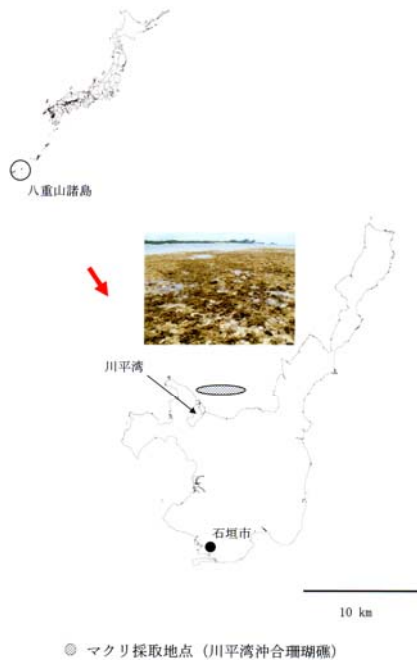


図1. 石垣島におけるマクリ *Digenea simplex* (Wulfen) C. Agardh の採取地点

採取したマクリ *D. simplex* は、広島大学大学院生物圏科学研究科海洋生物資源化学研究室に空輸し、実験に供するまで $-20^{\circ}\text{C}$ にて凍結し、フリーザーに保存した。



図2. マクリ “海人草” *Digenea simplex* (沖縄県石垣島川平湾産)

### (1) フグ寄生虫に対する駆虫活性評価

#### ① 試験液の調製

2008年6月19日、沖縄県石垣島川平湾沖のリーフにて採取したマクリ(湿重量516g)を天日乾燥した。得られた藻体(259g)を粉碎後、蒸留水を用いて攪拌抽出した。次いで、抽出液を透析チューブ(3,500 cutoff)を用いて蒸留水(5L)で透析し、透析外液を得た。最後に、この透析外液を濃縮後、減圧乾燥させて得られた固形物(乾燥物重量2.8g)を滅菌蒸留水(5mL)に溶かし試験液とし、この試験液を用いてフグ寄生性カイアシ類に対する致死活性スクリーニングを行った。

#### ② フグ寄生性カイアシ類の採取

2010年7月29日、広島大学瀬戸内圏フィールド科学教育研究センター竹原ステーション(水産実験所)の沿岸にて採取したクサフグ *Takifugu niphobles* の体表から魚類寄生虫を30匹ほど採取し、海水を満たしたプラスチック容器に保存した。なお、本実験に用いたフグ寄生性カイアシ類は、広島大学大学院生物圏科学研究科大塚 攻教授により *Pseudocaligus fugu* (Adult) と同定された。

#### ③ 駆虫活性評価

セルカルチャーインサート(Nalgen: 6well)の各wellにろ過滅菌した海水10mLを注いだ。次いで、さらに①により調製した試験液を各wellにピペットマンを用いて添加し、6種類の濃度(0, 0.3, 3.0, 30, 100, 200ppm)を設定した。さらに、各wellに採取した *P. fugu* (Adult) を3個体ずつ浸漬した後、インキュベーター( $20^{\circ}\text{C}$ )にて一晩放置し、翌日、実体顕微鏡を用いてこれらフグ寄生性カイアシ類の生死を判定することにより致死活性の有無を判断した。また、コントロール(試験液無添加)群には、滅菌ろ過海水を添加した。なお、使用した滅菌海水は、広島大学瀬戸内圏フィールド科学教育研究

センター竹原ステーション（水産実験所）沖合で採取した海水を Nalgen Filter Unit (0.2  $\mu$ m) でろ過滅菌したものをを用いた。

## (2) 興奮性アミノ酸の魚類寄生性カイアシ類に対する致死活性の検討

マクリ *D. simplex* は、ヒト消化器系寄生虫に対する駆除を目的とした煎じ薬として古くから鹿児島県徳之島で地域住民に用いられ、その活性成分として興奮性アミノ酸の一種であるカイニン酸 ( $C_{10}H_{15}NO_4$ , MW=213) が単離されている。そこで、カイニン酸（和光純薬工業、生化学用）を用いて調製した標準溶液の海産魚類寄生性カイアシ類に対する致死活性を上記③で述べた方法に従って検討した。

### ① 試験液の調製

カイニン酸標準品（和光純薬工業）200mg を滅菌ろ過海水 20ml に溶解させ、10mg/ml のカイニン酸溶液を調製した。

### ② 海産魚類寄生性カイアシ類の採取

2009年6月29, 30日に愛媛県農林水産研究所（水産研究センター）で養殖マダイ *Pagrus major* の体表から寄生性カイアシ類を10匹程度採取し、海水を満たしたプラスチック容器にて保存した。2009年7月12日に長崎県総合水産試験場で飼育された養殖トラフグ *Takifugu rubripes* の体表からフグ寄生性カイアシ類を20匹程度採取し、海水を満たしたプラスチック容器にて保存した。なお、本実験に用いたマダイ寄生性カイアシ類及びフグ寄生性カイアシ類は、広島大学大学院生物圏科学研究科大塚 攻教授によりそれぞれ *Caligus sclerotinosus* Roubal, Armitage&Rhode, 1983 及び *Pseudocaligus fugu* (Adult) と同定された

### ③ 駆虫活性評価

ろ過滅菌海水 0.5 ml を入れたセルカルチャープレート (24 well) の各ウェルに①で調製したカイニン酸溶液を適量加えた後、マダイ寄生性カイアシ類ならびにフグ寄生性カイアシ類を1個体ずつ別々に各 well に浸漬させ、実体顕微鏡下でその運動能や器官の状態変化を観察するとともに、死（腸管の運動停止）に至るまでの時間を測定した。また、以下、この腸管の運動停止を指標として、駆虫活性成分の単離・精製を行った。

## (3) マクリからの駆虫活性成分の単離・精製法

マクリにはフグ寄生性カイアシ類に対する致死活性成分が含まれることが推定されたのでこの致死活性を指標にマクリから図3. に示す方法で *P. fugu* 駆虫活性成分の単離精製並びに精査を試みた。すなわち、*D. simplex* (湿重量; 2662 g) を2日間、天日乾燥した（乾燥重量; 527 g）。その後、試料をミルで

粉碎し、約3倍量の水を加えて一晩攪拌し、活性成分の抽出を行い、遠心分離後、上清を得た。さらに、同様の操作を2回繰り返し、抽出液 4200ml を得た。次いで、透析チューブ (3500 cutoff、Dialysis Membrane、Spectrum Lab.) を用いて、充分量の蒸留水に対して透析を行い、透析外液 (Total 28L) を回収し、減圧濃縮 (110ml) した。引き続き、活性炭、Bio-Gel P-2 や ODS などを用いる各種カラムクロマトグラフィーにより、活性成分の精製を行った。なお、単離した活性成分の化学構造などの諸性状を HPLC (高速液体クロマトグラフィー)、LC-MS (液体クロマトグラフィー-質量分析) および NMR (核磁気共鳴吸収) により検討した。また、必要に応じて薄層クロマトグラフィー (TLC) 分析を併用した。

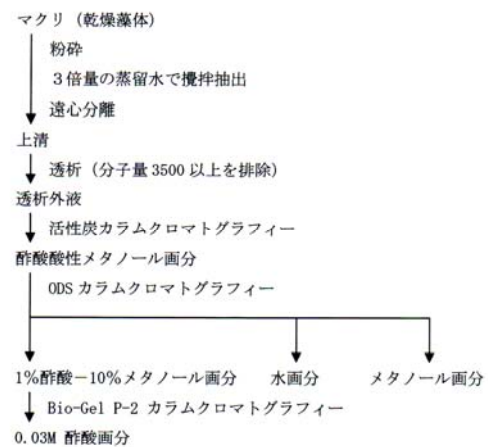


図3. マクリからのフグ寄生性カイアシ類に対する致死活性成分の抽出精製法

### ① 活性炭カラムクロマトグラフィー

よく水洗したクロマトグラフィー用活性炭素（和光純薬工業）を充填したガラスカラム ( $\phi 50 \times 500$ ml) に上述のようにして得られた抽出液を付し、3000 ml の蒸留水で水洗後、pH 3.0 に調整した酢酸酸性メタノール 3000 ml で活性成分を溶出させ、得られた本画分を減圧濃縮し、容量を 20ml とした。

### ② ODS カラムクロマトグラフィー

①で得られた活性画分 (20ml) を ODS (オクタデシルシリル; Octa Decyl Silyl; 日本精密科学) を充填したローバーカラムに付し、Intelligent HPLC Pump PU-980 (日本分光工業) を用いて 1%酢酸-10%アセトニトリル、蒸留水をそれぞれ 1800 ml、800ml の順に流速 0.5 mL/min で流し、Fr. I および Fr. II を得た。最後に、メタノール 900 ml を同様の流速で流し、メタノール画分 (Fr. III) として 750 ml を得た。得られた 3 画分は、それぞれ減圧濃縮し、以下に示す薄層クロマトグラフィーにより成分組成に検討を加えた。

③ Bio-Gel P-2 カラムクロマトグラフィー  
カイニン酸を主成分とする複数の成分から構成される Fr. I を減圧濃縮して 6ml とし、Bio-Gel P-2 (Bio-Rad -400mesh) カラム (φ 20×300mm) に付し、0.03M 酢酸を用いて活性成分の精製 (5 ml/Fr.) を行った。この際、流速を Fr. 1-6 まで、0.5 ml/min、Fr. 7-12 まで 0.25 ml/min、Fr. 13-18 まで 0.40 ml./min、No. 19-100 まで、0.5 ml/min とした。

#### (4) 致死活性成分の分析

##### ① 薄層クロマトグラフィー (TLC)

各カラムクロマトグラフィーにより得られた各画分について、それぞれの画分の 1 μL をシリカゲル 60 を担体とした TLC プレート (10×20 cm, Merck) に塗布し、カイニン酸標準品 (和光純薬工業) およびプロリン標準品 (和光純薬工業) とともに展開溶媒 I、II で 10 cm 展開させた。なお、展開溶媒 I 及び展開溶媒 II の組成は n-ブタノール:酢酸:水 = 4 : 1 : 5 ならびに n-ブタノール:酢酸:水 = 4 : 1 : 2 とし、展開後、ドライヤーで有機溶媒を除き、ニンヒドリンを噴霧して、110°C のオーブンで加熱し、検出されたスポットにつき、それぞれ Rf 値を求めた。

##### ② 液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS)

各カラムクロマトグラフィーにより得られた画分に含まれる成分の分子量を LC-MS 分析により検討した。カラムには ODS-3 セミマイクロカラム (φ 1.5 mm×150mm)、移動相には 20% メタノール溶液を用い、流速は 200 μm/min とした。なお、分析装置には LCT (Waters) を使用した。

##### ③ 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

分析カラムには LiChroCART RP-18e (粒子径 5 μm、φ 4.0×250 nm, Merck) を用いた。移動相としては 0.1% トリフルオロ酢酸含有 10% アセトニトリル緩衝液を用いた。なお、流速は緩衝液 1.2 ml/min とした。カラムは 40°C に保持し、波長 210 nm における吸光度を紫外可視検出器で測定した。ポンプは Intelligent HPLC Pump PU-980 (日本分光)、反応ユニット Intelligent Column Oven CO-2067 Plus (日本分光)、紫外可視検出器は Intelligent UV Detector UV-975S (日本分光) を用いた。

##### ④ 核磁気共鳴 (NMR) 吸収分析

上記 ODS カラムクロマトグラフィー ((3) -②) において得られた Fr. III (2 ml) には、TLC (図. 4)、HPLC や LC-MS 分析において単一成分 (カイニン酸と分子量が同じ異性体) の存在が確認されたので、この単一成分の構造について検討を加えた。すなわち、この画分

を遠心分離 (3,000 rpm、10 min、4°C) して得られた上清を濃縮乾固したものを真空デシケーター内で一晚放置し水分を完全に除去した。その後、得られた固形物を 4% 重酢酸 (CD<sub>3</sub>COOD; Merck) 1.0 ml に溶解し、0.2 μm PTFE 樹脂フィルターに通し、NMR 分析用試料とし、600 MHz 超高分解核磁気共鳴装置 (日本電子 ECA-600: 広島大学自然科学研究支援開発センター) により、<sup>1</sup>H-NMR スペクトルを測定した。比較試料としてカイニン酸 (和光純薬工業) 10 mg を用いて、同様の方法にて NMR スペクトルを測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 致死活性評価

各 well に試験液を注ぐと同時にすべての濃度でそれまで各 well 中を激しく動き回っていた *P. fugu* の動きがすぐに停止した。粗抽出液濃度 100 ppm および 200 ppm において *P. fugu* は 24 時間以内にほぼ全滅していたが、他の濃度 (0 ppm, 0.3 ppm, 3 ppm, 30 ppm) では *P. fugu* の死滅は確認されなかった。以上の結果から、本海藻粗抽出液中に *P. fugu* に対する致死活性成分の存在が示唆された。カイニン酸標準品を用いた実験では、試験液濃度 100 ppm および 200 ppm において、24 時間以内にフグ寄生性カイアシ類の死滅が確認され、この結果から、*D. simplex* において、フグ寄生性カイアシ類に対する駆虫活性成分としてカイニン酸の存在が推測された。

##### (2) *P. fugu* に対する駆虫物質の単離

活性成分の精製過程において、ODS カラムクロマトグラフィーにより溶出した 1% AcOH-10% CH<sub>3</sub>CN 画分 (Fr. I)、H<sub>2</sub>O 画分 (Fr. II)、MeOH 画分 (Fr. III) を薄層クロマトグラフィー (TLC) に供したところ、Fr. I は、カイニン酸 (Rf = 0.30) を主成分としていたが、既知アミノ酸 10 成分と Rf 値の一致しない未同定成分 (Rf = 0.53) を含むなどその組成は特徴的なものであった。また、100% MeOH で溶出した Fr. III は、Rf 値がカイニン酸 (Rf = 0.30) と一致する 1 成分のみを含んでいた。次に、Fr. I-III を LC-MS 分析に供した。Fr. I-III の各画分からカイニン酸が検出されたが、カイニン酸 (*m/z* 214) クロマトグラムに関して、Fr. II, III とカイニン酸標準溶液との保持時間において明らかな相違が見られた。さらに、Fr. III をカイニン酸アナライザーに供したところ、標準溶液と異なるピーク (同 11 分) が検出され、カイニン酸の体 (化合物 I) と考えられた。本研究において、紅藻類マクリ *D. simplex* には、フグ寄生性カイアシ類 *P. fugu* やマダイ寄生性カイアシ類に対する駆虫活性成分が含まれ、その主成分は興奮性アミノ酸の一種で

あるカイニン酸 ( $C_{10}H_{15}NO_4$ 、分子量 213) であることが示されたが、一方で、マクリにはカイニン酸以外に分子量 (213) を同じくする異性体 (化合物 I) の存在も明らかとなった。

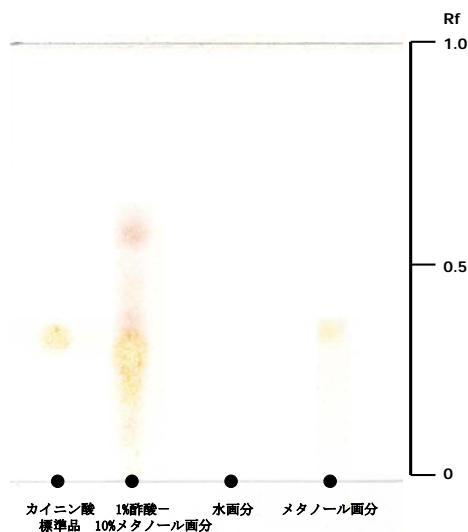


図 4. フグ寄生性カイアシ類致死活性画分を ODS カラムクロマトグラフィーにより分画し、得られた各画分の TLC 分析結果

すなわち、LC-MS では、カイニン酸として  $m/z = 214(M+H)^+$  が観測されるが、保持時間が異なるにもかかわらず同様に  $m/z = 214(M+H)^+$  が観測される成分の存在することが、確認された (図. 5)。

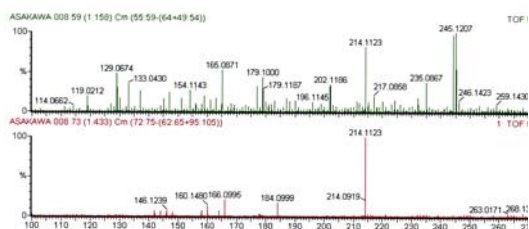


図 5. メタノール画分 (ODS カラムクロマトグラフィー) の質量分析結果

Fr. I-III の LC-MS 分析結果に関して、 $m/z=214$  をモニターした選択イオン検出クロマトグラムならびに検出スペクトルによると、Fr. I-III の各画分からカイニン酸が検出された一方、Fr. II, III とカイニン酸標準溶液との保持時間に相違が見られた。カイニン酸標準溶液では保持時間 1.8 分辺りで検出されたが、Fr. II は 0.8 分もしくは 1.2 分辺り、Fr. III では 1.4 分辺りに検出された (Fig. 15)。そこで、Fr. III をカイニン酸アナライザーに分析したところ、標準溶液と一致するピーク (保持時間 9 分) と同時に異なるピーク (同 11 分) が検出された。

次いでこの Fr. III (100%MeOH 画分) に含

まれる成分の化学構造について検討した。まず、カイニン酸標品の 600MHzNMR スペクトル (4%重酢酸) における化学シフトについて検討したところ、3.97、2.94、2.87、3.47、3.27、2.32、2.25、4.88、4.59 及び 1.59ppm が、それぞれ H2、H3、H4、H5'、H5''、H7'、H7''、H10'、H10'' 及び H11 (Fig. 17) と帰属された。

一方、Fr. III の 600 MHzNMR スペクトルにおける化学シフトについては、スペクトルの形状から基本骨格としてカイニン酸の化学構造を持つ誘導体であることが推定された。また、その化学シフトについては、一部帰属のできなかったシグナルもあったが、4.05、2.90、2.82、3.51、2.22、2.18、及び 1.58ppm を、それぞれ H2、H3、H4、H5'、H5''、H7'、H7'' 及び H11 と帰属することができた。

以上、NMR、LC-MS、HPLC、TLC およびニンヒドリンによる発色試験などを総合して検討した結果、Fr. III に含まれる単一成分は、 $\alpha$ -カイニン酸の異性体である  $\alpha$ -アロカイニン酸 (I) であることが示唆された。また、この化合物 (I) の収量は 100 mg であった。

## 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 5 件)

1. Asakawa Manabu, Gomez-Delan Gloria, Tsuruda Shintaro, Shimomura Michitaka, Shida Yasuo, Taniyama Shigeto, Barte-Quilantang Mercy, Shindo Jo, Toxicity Assessment of the Xanthid Crab *Demania cultripes* from Cebu Island, Philippines, Journal of Toxicology, 査読有, Article ID 172367, 電子投稿 (7 pages, ページなし), 2010

2. Ohtsuka Susumu, Takami Ikuo, Venmathi Maran B.A., Ogawa kazoo, Shimono Takaki, Fujita Yusuke, Asakawa Manabu, Boxshall G. A. Developmental stages and growth of *Pseudocaligus fugu* Yamaguchi, 1936 (Copepods: Siphonostomatoida: Caligidae) host-specific to puffer, Journal of Natural History, 査読有, 43, 1779-1804 (2009).

3. 谷山茂人, 相良剛史, 西尾幸郎, 黒木亮一, 浅川 学, 野口玉雄, 山崎脩平, 高谷智裕, 荒川 修 ハコフグ類の喫食による食中毒の実態と同魚類の毒性調査, 食品衛生学雑誌, 査読有, 50, 270-277 (2009)

4. 浅川 学, 魚類の毒 (3): コイ毒およびその他の毒, 食品衛生研究, 査読有, 59, 35-40 (2009).

5. 中野宏幸, 浅川 学, 自然毒中毒 (動物

毒, 植物毒) 生態影響と予防, 臨床検査、  
査読有、53, 673-681(2009)

〔学会発表〕(計3件)

1. Yasui Kaori, Asakawa Manabu, Toxicity of excitatory amino acids in red algae for parasitic copepods of cultured pufferfish, 50<sup>th</sup> Anniversary Annual Meeting and ToxExpo, Mar. 8, 2011, Washington, D. C., USA.

2. Asakawa Manabu, Toxicity of ribbon worm *Cephalothrix* species on the surface of the shell of cultured oysters in Hiroshima Bay, Hiroshima Prefecture, Japan, 50<sup>th</sup> Anniversary Annual Meeting and ToxExpo, Mar. 8, 2011, USA.

3. 安井かおり, 藤田雄介, 石本泰之, 金田拓磨, 日比野由衣, 志田保夫, 孫世春, 柁原宏, 浅川学 日本沿岸に生息する数種紐形動物の毒性、平成22年度日本水産学会秋季大会、平成22年9月24日、京都大学総合人間学部

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

浅川学 (ASAKAWA MANABU)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・准教授

研究者番号：60243606

### (2) 研究分担者

研究者番号：

### (3) 連携研究者

研究者番号：