

薬用植物を素材とした海産白点虫感染  
に対する薬剤の開発  
-苦参 *Sophora flavescens* の白点虫感染  
に対する効果と活性成分の探索-

2015

五藤 剛志



## 目次

緒言	1
第一部 植物抽出物の抗白点虫活性スクリーニング	
第一章 序論	3
第二章 セロントを用いた植物抽出物の <i>in vitro</i> 抗白点虫活性評価	5
第三章 薬用植物類の抽出物添飼料を用いた抗白点虫活性評価	8
第四章 小括	9
第二部 白点虫に対するクジン抽出物の有効性の評価	
第一章 序論	10
第二章 飼料へのクジン熱水抽出物添加量の最適化	12
第三章 白点虫感染マダいの長期飼育における クジン熱水抽出物添加飼料給餌の影響の評価	13
第四章 クジン熱水抽出物添加飼料の白点虫感染治療効果の評価	14
第五章 小括	15
第三部 クジン熱水抽出物の抗白点虫活性物質の探索	
第一章 序論	16
第二章 クジン熱水抽出物の白点虫防除活性アルカロイドの探索	17
第三章 <b>Matrine</b> ならびに <b>oxymatrine</b> 添加飼料の抗白点虫活性評価	20
第四章 白点虫感染マダい長期飼育試験における <b>matrine</b> 添加飼料給餌の影響	22
第五章 <b>Matrine</b> 添加飼料の白点虫感染治療効果	23
第六章 クジン熱水抽出物中の非アルカロイド抗白点虫活性物質の探索	24
第七章 クジン由来のフラボノイド添加飼料の抗白点虫活性評価	25
第八章 小括	26
結論	28
謝辞	29
実験の部	30
参考文献	39



## 緒言

近年、種苗生産や飼育技術の向上により各種海産魚の集約的養殖が行われるようになったが、ウイルス、細菌、原虫、寄生虫を原因とする感染症による産業的損害は増加傾向にある。その中でも寄生虫症、特に白点虫症は、有効な防除法が確立されていないことから、西日本を中心に多発し、養殖魚の大量へい死をもたらしている。一つの養殖漁場で年間数億円の被害が発生するケースもある<sup>1)</sup>。

白点虫症は、寄生性原虫の繊毛虫類に属す白点虫 *Cryptocaryon irritans* が魚の鰓や皮膚に寄生することによって生じる<sup>2)</sup>。白点虫が寄生すると粘液過多分泌、上皮の増生、崩壊が生じ、病魚は呼吸障害により死にいたる。寄生した白点虫は成長すると魚体から離れ、繊毛によって水中を遊泳する。水底に付着すると繊毛が失われ、外側を厚い膜で覆われたシストと呼ばれる状態となる<sup>3)</sup>。増殖至適温度は18~30℃である。白点虫の感染は宿主特異性が低く、マダイ、トラフグ、カンパチ、ヒラメなど数多くの海産魚で認められている<sup>4)</sup>。

海面生簀で発生した場合、現在行うことができる唯一の対処法は白点虫症が発生していない潮通しの良い海域に生簀を移動させることである。これにより水底シストならびに魚体に寄生する虫体による感染の確立を軽減することができる。一方、陸上養殖施設では、病魚を白点虫の存在しない水槽へ繰り返し移動させる対処法がある。すなわち、本虫は水温25℃付近で、感染3~4日で宿主を離脱してシストとなり、そこから孵化幼生が放出されるまでには4日以上を要することから、3日おきに魚を新しい水槽に移すことによって感染の拡大を防ぐことができる。しかしながら、この方法を行うには多大な費用と労力が必要である。

一方、水産動物の病気の治療や予防に使用される薬剤は水産用医薬品と総称され、一般医薬品と同様に薬事法に基づき、抗菌剤、駆虫剤、麻酔剤、消毒剤、ビタミン剤、生物学的製剤等が製造されている<sup>5)</sup>。白点虫の寄生に対する駆虫剤を用いた薬浴による対処は、魚に与えるストレスは大きく<sup>6)</sup>、周辺環境への負荷も高い。加えて、生け簀内の薬浴剤の濃度を長時間維持す

るといふことは困難である。このような背景から、白点虫症に対する新しい予防法あるいは治療法の開発が求められている。

現在臨床で使用されている医薬品の多くは天然物に由来している。これらの多くは、人類の長い歴史の中で見いだされた薬用植物などの伝承薬に由来しており、天然資源の医薬シードとしての高い価値を示している。

上記の背景から、著者は薬用植物を素材とした新しい海産白点虫感染に対する薬剤の開発、ならびに治療法の開発を目的に、本研究を行った。

# 第一部 植物抽出物の抗白点虫活性スクリーニング

## 第一章 序論

白点虫の感染は、セロントと呼ばれる遊泳性の感染幼虫が宿主の鰓や皮膚に取り付き、上皮組織内に侵入することにより成立する。海水温が 25°C の場合、宿主組織内で細胞分裂することなく魚の皮膚上皮内、増生皮膚などで4~6日間程度発育しトロホントと呼ばれる 500 μm 程度の成虫に成長する。その後、上皮を破り魚から離れ（トモント）、水底に付着してシストと呼ばれる被囊

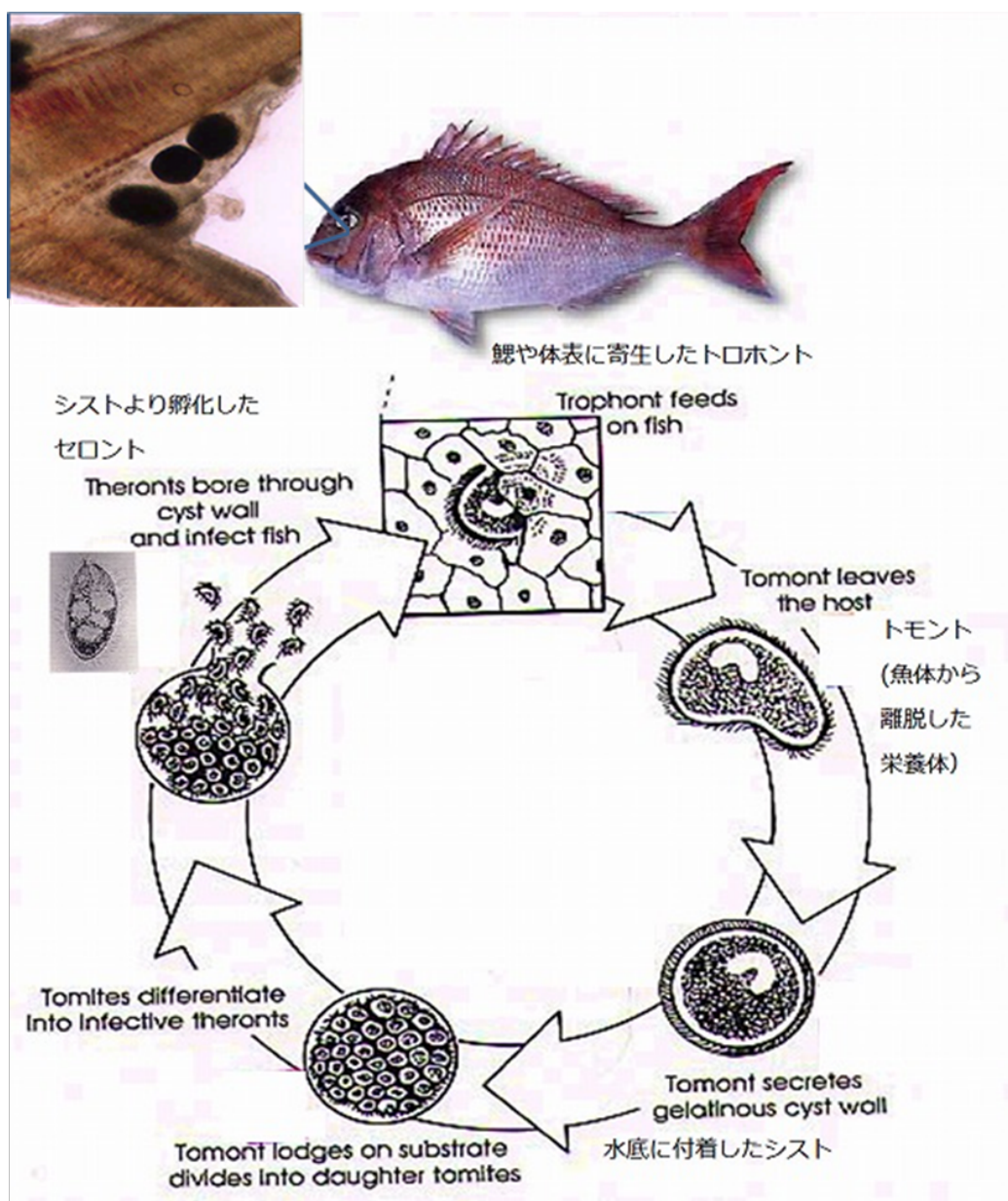


Figure 1. 海産白点虫の生活環

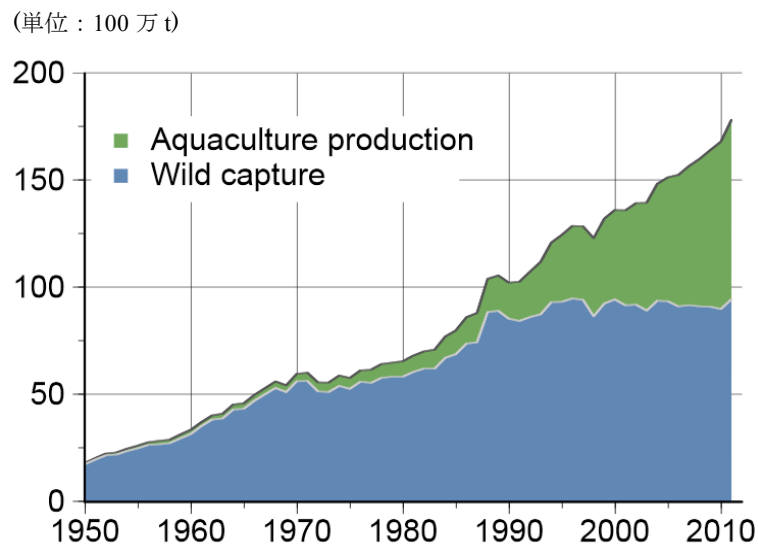
Parasites of Freshwater Fishes (1974)より抜粋 一部改変

体を形成する。このシスト内で活発な細胞分裂が繰り返された後、200 個体ほどの感染幼虫であるセロントがシスト壁をやぶり放出される。シスト形成からセロントの放出までの期間は 25°C、5 日前後である (Fig.1)<sup>3)</sup>。

本虫が寄生すると、宿主は粘液過多分泌、上皮の増生・崩壊、ならびに呼吸障害で死に至ることから、養殖場での大量へい死をもたらす、大きな被害が発生する。健康食ブームの高まりから、世界中、特に中国や東南アジアでは海産魚の養殖がますます盛んになっており (Fig. 2)、白点虫に対する防除体制作りが早急に求められている。しかしながら、白点虫感染に対して効果的かつ実用的な薬剤や治療法は見出されていない。

このような背景のもと、著者は天然物質、特に薬用植物を素材とした新しい白点虫感染に対する薬剤の開発を目的として本研究を開始した。薬剤の投与方法としては、薬浴と比較して環境への負荷が小さい飼料中への添加による投与を検討した。

薬剤探索の素材として、養殖現場での実際の利用を視野に入れ、安定かつ容易に市場から入手可能な薬用植物を含む 59 種の植物材料を選定し、抗白点虫活性のスクリーニングを行うこととした。



**Figure 2.** 世界の水産物生産量の推移

Food and Agriculture Organization of the United Nations より抜粋



## 第二章 セロントを用いた植物抽出物の*in vitro*抗白点虫活性評価

抗白点虫作用のある植物資源の探索を目的に、薬用植物を含む 59 種の植物について、熱水による抽出 [植物試料：水=1:5 (w/v)]を行い、さらにその抽出残渣をメタノールで抽出 [植物試料：MeOH=1:5 (w/v)]し、熱水抽出液及びメタノール抽出液を調製した。白点虫の遊泳性感染幼虫であるセロントを 200~400 個体含む海水 1 mL にそれぞれの抽出液を 10  $\mu$ L ずつ添加し、2 時間後に繊毛運動が停止したセロントを計数することで、抗白点虫活性の評価を行った (Table 1)。

その結果、熱水抽出物 11 種 (ボダイジュ、クジン、カリン、ホコッシ、カシ、ゴバイシ、ダイオウ、カキ葉、ユキノシタ、マオウ) 及びメタノール抽出物 10 種 (セキショウ、ジャシヨウシ、レンギョウ、ボダイジュ、クジン、ゴバイシ、ダイオウ、カキ葉、ユキノシタ、マシニン) において、セロントの繊毛運動停止が確認された。

ダイオウ、カキ葉、クジン、ユキノシタ、ゴバイシ、ボダイジュは熱水抽出物とメタノール抽出物の両方で完全な繊毛運動の停止作用が認められた。このうち、速やかな停止作用を示したのは、ダイオウ、カキ葉、クジン、ユキノシタ、ゴバイシの 5 種であった。

**Table 1.** 薬用植物類の熱水及びメタノール抽出物のセロント繊毛運動に対する影響

No.	Botanical Name	Common name	Part of herb under test	Water-soluble extract	Methanol-soluble extract
1	<i>Punica granatum</i>	ザクロ (石榴皮)	Root bark & bark	++ <sup>b</sup>	++
2	<i>Acorus gramineus</i>	セキショウ (石菖蒲)	Root	- <sup>c</sup>	+++ <sup>a</sup>
3	<i>Stemona japonica</i>	ビャクブ (百部根)	Root	-	-
4	<i>Cnidium monnieri</i>	オカゼリ (蛇床子)	Fruit	-	+++
5	<i>Actinidia polygama</i>	マタタビ (木天蓼)	Fruit	-	-
6	<i>Forsythia suspensa</i>	レンギョウ (連翹)	Fruit	-	+++
7	<i>Ficus carica</i>	イチジク (無花果)	Fruit	-	-
8	<i>Tilia miqueliana</i>	ボダイジュ (菩提樹花)	Flower	+++	+++
9	<i>Sophora flavescens</i>	クララ (苦参)	Root	+++	+++
10	<i>Pinus densiflora</i>	アカマツ	Leaf	++	++
11	<i>Matricaria chamomilla</i>	カミツレ	Flower	-	-
12	<i>Ginkgo biloba</i>	イチョウ	Leaf	-	-
13	<i>Sasa veitchii</i>	クマザサ (熊笹)	Leaf	-	-
14	<i>Taxus cuspidate</i>	イチイ	Bark	-	-
15	<i>Lycium chinense</i>	クコ (枸杞葉)	Leaf	-	-
16	<i>Chaenomeles sinensis</i>	カリン (和木瓜)	Fruit	+++	-
17	<i>Gynostemma pentaphyllum</i>	アマチャヅル	Stem and leaf	-	++
18	<i>Perilla frutescens</i> var. <i>crispa</i>	シソ (蘇葉)	Leaf	-	-
19	<i>Glechoma hederacea</i> var. <i>grandis</i>	カキドオシ (連銭草)	Flower, stem, and leaf	-	-
20	<i>Ruellia brittoniana</i>	ヤナギバルイラソウ	Leaf	-	-
21	<i>Psidium guajava</i>	グアバ	Leaf	++	-
22	<i>Psidium guajava</i>	グアバ	Fruit	-	-
23	<i>Coptis quinquefolia</i>	オウレン (黄連)	Rhizome	-	++
24	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	ハイビスカス	Flower	-	-
25	<i>Taraxacum officinale</i>	セイヨウタンポポ	Stem and leaf	-	-
26	<i>Gardenia jasminoides</i>	クチナシ (山梔子)	Fruit	-	-
27	<i>Cassia acutifolia</i>	センナ	Leaf	-	-
28	<i>Fagopyrum tataricum</i>	ダツタンソバ	Leaf	-	-
29	<i>Eriobotrya japonica</i>	ビワ (枇杷葉)	Leaf	-	-
30	<i>Curcuma longa</i>	ウコン	Leaf	-	-

Table 1 . -continued

No.	Botanical Name	Common name	Part of herb under test	Water-soluble extract	Methanol-soluble extract
31	<i>Morus alba</i>	クワ	Leaf	-	-
32	<i>Ficus carica</i>	イチジク (無花果葉)	Leaf	-	-
33	<i>Chrysanthemum morifolium</i>	キク (菊花)	Flower	-	++
34	<i>Nandina domestica</i>	ナンテン (南天葉)	Leaf	++	++
35	<i>Engelhardtia chrysolepis</i>	コウキ (黄杞)	Leaf	++	++
36	<i>Thujopsis dolabrata</i>	アスナロ	Leaf	++	++
37	<i>Mallotus japonicus</i>	アカメガシワ	Bark	++	++
38	<i>Lilium auratum</i>	ヤマユリ	Bulb	-	-
39	<i>Aspalathus linearis</i>	ルイボス	Leaf	-	-
40	<i>Valeriana officinalis</i>	セイヨウカノコソウ	Root	-	++
41	<i>Aralia elata</i>	タラノキ (櫨木皮)	Root bark	-	-
42	<i>Origanum majorana</i>	マジョラム	Leaf	+++	++
43	<i>Saussurea tridactyla</i>	セツレンカ (雪連花)	Herb	-	-
44	<i>Lonicera japonica</i>	スイカズラ (金銀花)	Flower	-	-
45	<i>Psoralea corylifolia</i>	オランダビユ (補骨子)	Seed	+++	++
46	<i>Terminalia chebula</i>	ミロバラン (訶子)	Fruit	+++	-
47	<i>Prunus persica</i>	モモ	Leaf	-	++
48	<i>Coix lacryma-jobi</i> var. <i>mayuen</i>	ハトムギ (薏苡仁)	Seed	-	-
49	<i>Panax ginseng</i>	ニンジン (人參)	Root	-	-
50	<i>Rhus japonica</i> (Chinese Nutgall)	ヌルデ虫嬰 (五倍子)	Gall	+++	+++
51	<i>Rheum palmatum</i>	ダイオウ (大黃)	Rhizome	+++	+++
52	<i>Diospyros kaki</i>	カキ	Leaf	+++	+++
53	<i>Saxifraga stolonifera</i>	ユキノシタ (虎耳草)	Leaf	+++	+++
54	<i>Ephedra sinica</i>	マオウ (麻黄)	Herb	+++	++
55	<i>Cannabis sativa</i>	アサ (麻子仁)	Fruit	-	+++
56	<i>Styphnolobium japonicum</i>	エンジュ (槐花)	Flower	-	++
57	<i>Citrus unshiu</i>	ウンシュウミカン (陳皮)	Peel	-	-
58	<i>Hydrangea macrophylla</i> var. <i>thumbergii</i>	アマチャ (甘茶)	Leaf	-	-
59	<i>Plantago asiatica</i>	オオバコ (車前草)	Herb	-	-

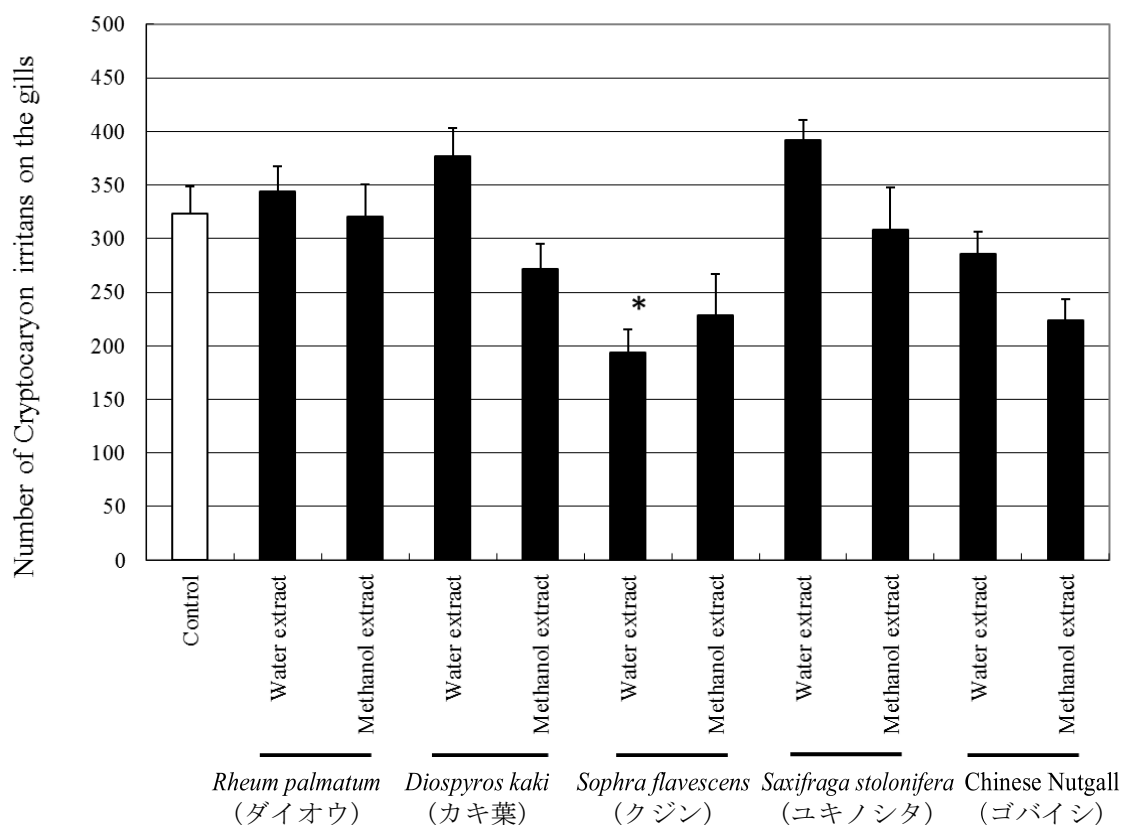
- a +++ : 100%のセロントで繊毛運動が停止  
b ++ : 80-99%のセロントで繊毛運動が停止  
c - : 80%以下のセロントで繊毛運動が停止

### 第三章 薬用植物類の抽出物添飼料を用いた抗白点虫活性評価

白点虫セロントを用いた *in vitro* スクリーニングにおいて、熱水抽出物とメタノール抽出物の両方で速やかなセロントの繊毛運動の停止が認められたダイオウ、カキ葉、クジン、ユキノシタ、ゴバイシについて、各抽出物を市販飼料に添加し、マダイに対する白点虫感染の防除効果の評価を行った。

試験は、各薬用植物抽出物を 0.5% 添加した飼料を給餌する区と、対照区の計 11 区とした。

その結果、クジン (*Sophora flavescens*) 熱水抽出物添加飼料を給餌した区に顕著な白点虫寄生数の低下が認められた。すなわち、クジン熱水抽出物を給餌した区では、鰓への白点虫寄生数が  $193 \pm 22$  個体/尾 (平均値  $\pm$  SEM) となり、対照区  $323 \pm 26$  個体/尾と比較して有意に減少した ( $P < 0.05$ ) (Fig. 3)。その他の抽出物では寄生数に有意な差はみられなかった。



**Figure 3.** Effects of in-feed botanical herb extracts on *Cryptocaryon irritans* infection in *Pagrus major*.

\* $P < 0.05$  vs. control (analysis of variance)

## 第四章 小括

白点虫は、海産魚の鰓や皮膚に取り付き、上皮組織内に侵入することにより寄生するが、有効な防除方法は確立されていない。天然資源である薬用植物は多様な薬効を有することが知られており<sup>7)</sup>、経口投与での効果が期待されるとともに、環境への影響が少ない利点がある。一方、薬用植物のヒトに対する薬効や臨床治験研究は数多く報告されているが、魚類に対する活性の報告例は非常に少ないのが現状である。そこで、白点虫に効果のある植物資源を探索する目的で抗白点虫活性スクリーニングを行った。

今回、セロントを使用した*in vitro*の試験により、15種の薬用植物類の抽出物に繊毛運動停止作用が認められ、これらが抗白点虫薬の候補となる可能性が示唆された。このうち、熱水抽出物とメタノール抽出物の両方で速やかにセロントの繊毛運動停止が確認された、ダイオウ、カキ葉、クジン、ユキノシタ、ゴバイシを0.5%添加した飼料をマダイに給餌し、白点虫感染の防除効果の評価を行った。

その結果、クジン熱水抽出物が、白点虫の寄生数を有意に低下させることを明らかにした。

## 第二部 白点虫に対するクジン抽出物の有効性の評価

### 第一章 序論

マダイに対する経口投与での白点虫防除効果を見出したクジン熱水抽出物について、抗白点虫薬としての展開を目指して、飼料への添加量の最適化と長期飼育における影響の評価、ならびにすでに白点虫に感染したマダイに対する治療効果について検討した。

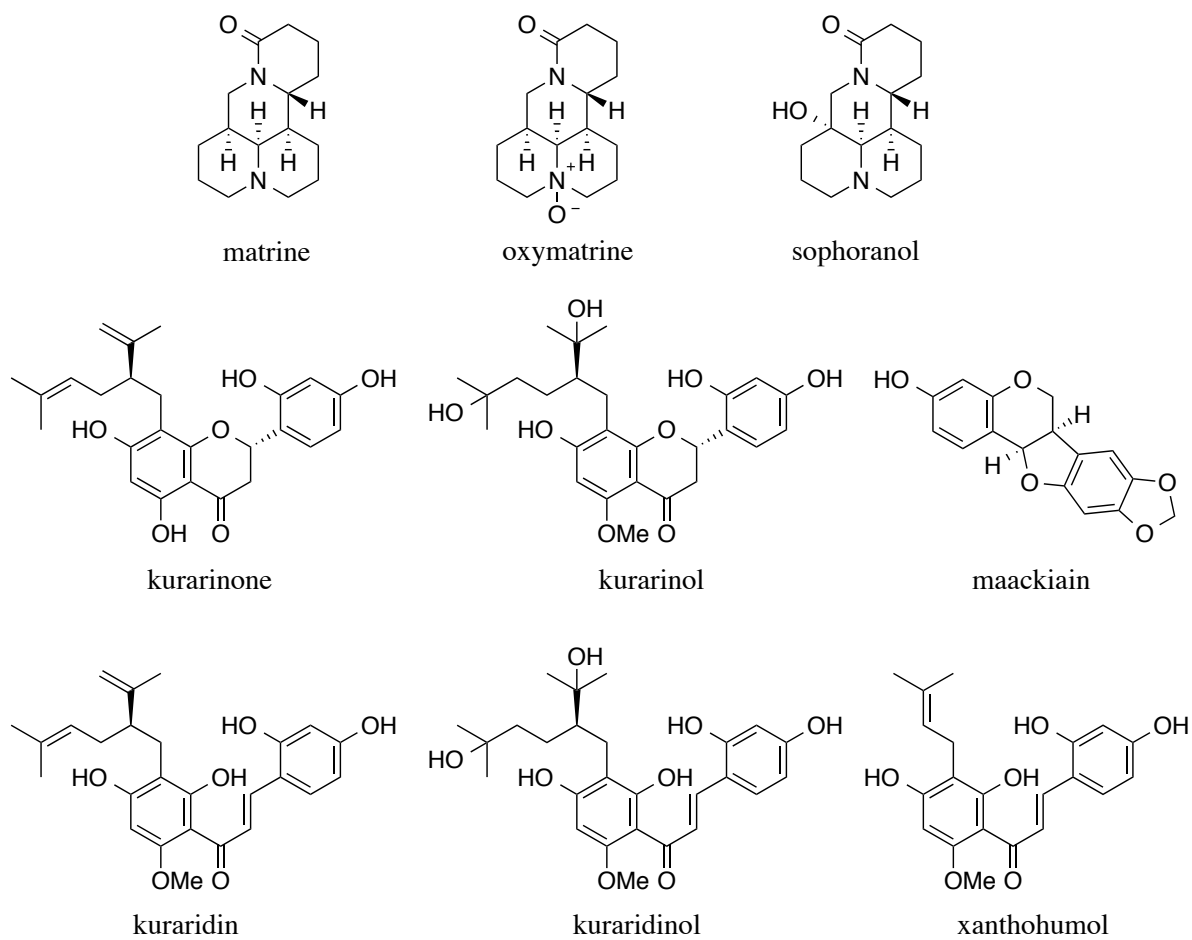
#### クジン (*Sophora flavescens*) について

クジン(苦参)はマメ科植物クララ *Sophora flavescens* Aitonの根を基原とする生薬で、日本、韓国、中国各地で産出される。クジン(苦参)の名称は、根の形態が人参に似ていて、苦味があるところに由来している。クジンは、滋養強壮苦味健胃薬として、下痢、小便不利、消炎止瀉薬、あせも、水虫、黄疸、疥癬、悪瘡等々の皮膚疾患の治療を目的に使用され、漢方では消風散や苦参湯に配剤される。抽出エキスの薬理作用として、抗真菌作用、抗トリコモナス作用、血圧降下作用、抗消化性潰瘍作用、中枢抑制作用、ホスフォジエステラーゼ阻害作用、肝障害抑制作用、止血作用、免疫賦活作用、抗面皰作用等が報告されている<sup>8~11)</sup>。



クジン (苦参)

クジンの主要成分としてキノリチジンアルカロイドの *matrine*, *oxymatrine*, *sophoranol*など、フラボノイドとして *kurarinone*, *kurarinol*, *maackiain*, *kuraridin*, *kuraridinol*, *xanthohumol*などが知られている<sup>13~16)</sup>。 (Fig. 4)



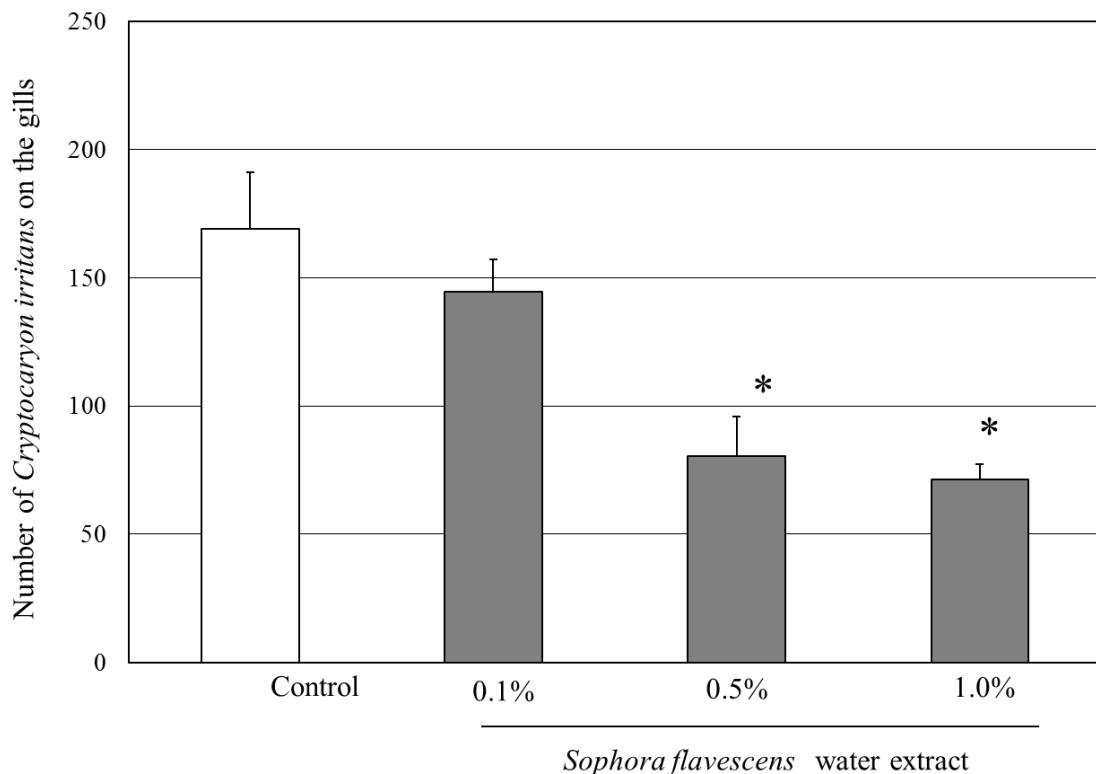
**Figure 4.** Structures of alkaloids and flavonoids isolated from the roots of *Sophora flavescens*

## 第二章 飼料へのクジン熱水抽出物添加量の最適化

クジン熱水抽出物を 0.1, 0.5, 1.0% 添加した飼料を給餌する区（クジン 0.1%, 0.5%, 1.0% 区）と対照区の 4 区（各区マダイ 10 尾：平均魚体重 31.1 g）に対して、白点虫による攻撃試験を行った。すなわち、試験飼料給餌開始 7 日後にセロントにて攻撃し、攻撃 14 日後に鰓に寄生している白点虫数を計測することにより、防除効果を評価した。

試験の結果、対照区、クジン 0.1, 0.5, 1.0% 区の白点虫寄生数（平均値  $\pm$  SEM）は、それぞれ  $172.9 \pm 19.5$  個体/尾、 $144.4 \pm 12.7$  個体/尾、 $80.3 \pm 15.6$  個体/尾、 $72.4 \pm 6.2$  個体/尾であった（Fig. 5）。

クジン 0.5% 区および 1.0% 区の白点虫の鰓への寄生数は、対照区と比較し有意に低下しており（ $P < 0.01$ ），50% 以上の寄生数の減少が認められた（Fig. 5）。



**Figure 5.** Effect of the in-feed *Sophora flavescens* water extract on *Cryptocaryon irritans* infection in *Pagrus major*. Each column represents the mean  $\pm$  SEM (n = 8).

\* $P < 0.01$  vs. control (analysis of variance)



### 第三章 白点虫感染マダイの長期飼育におけるクジン熱水抽出物添加飼料給餌の影響の評価

白点虫感染マダイの長期飼育下における、クジン熱水抽出物添加飼料給餌の影響を評価した。すなわち、クジン抽出物 0.5%添加区（クジン 0.5%区）と対照区の計 2 区（各区マダイ 38 尾：平均魚体重 15 g）に対して白点虫攻撃試験を行い、攻撃 80 日後までの生存率、白点虫寄生数を評価した。

攻撃開始 20 日後の対照区およびクジン 0.5%区の白点虫寄生数（平均値  $\pm$  SEM）はそれぞれ、 $212 \pm 11$  個体/尾、 $57 \pm 12$  個体/尾であり、クジン 0.5%区の本虫の鰓への寄生数は、対照区と比較し有意に低い値を示した ( $P < 0.01$ ) (Fig. 6)。攻撃開始 30 日後の対照区の白点虫寄生数は  $1,342 \pm 237$  個体/尾となり、31 日後からへい死が始まり、34 日後に全滅した。

これに対し、クジン 0.5%区において鰓に寄生している白点虫は観察されず、試験終了となる 80 日後までへい死は認められなかった。さらに、試験終了時にクジン 0.5%区の生残魚の鰓を観察したが、白点虫は観察されなかった。飼育期間中、すべての供試魚において、毒性や内臓組織の肥大は観察されなかった。

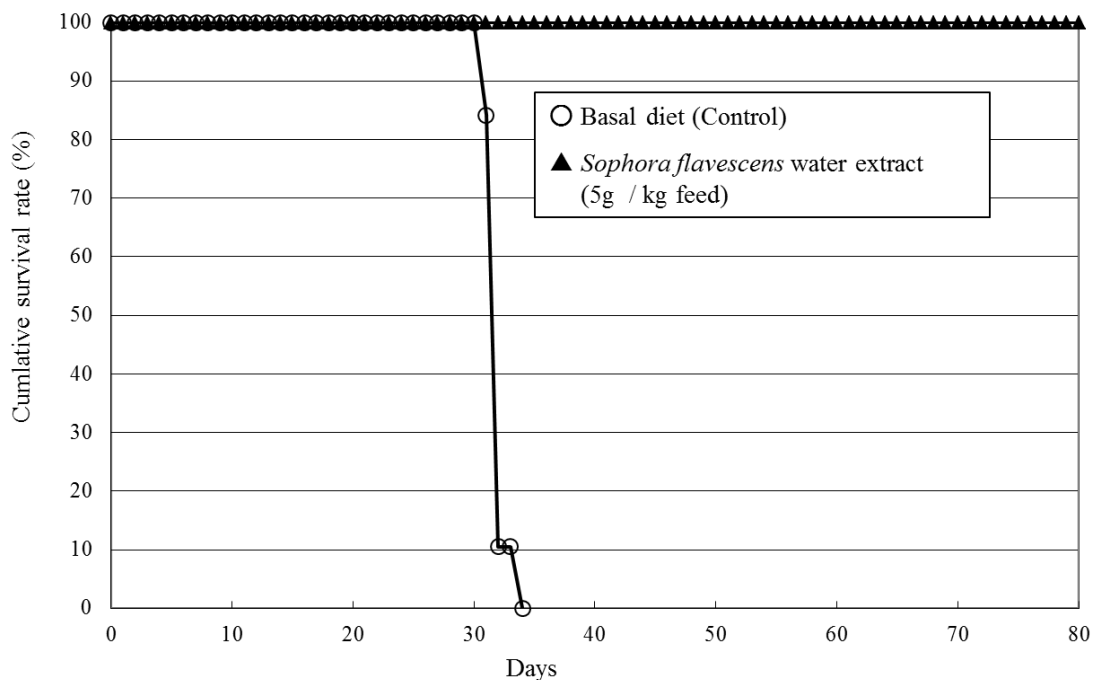


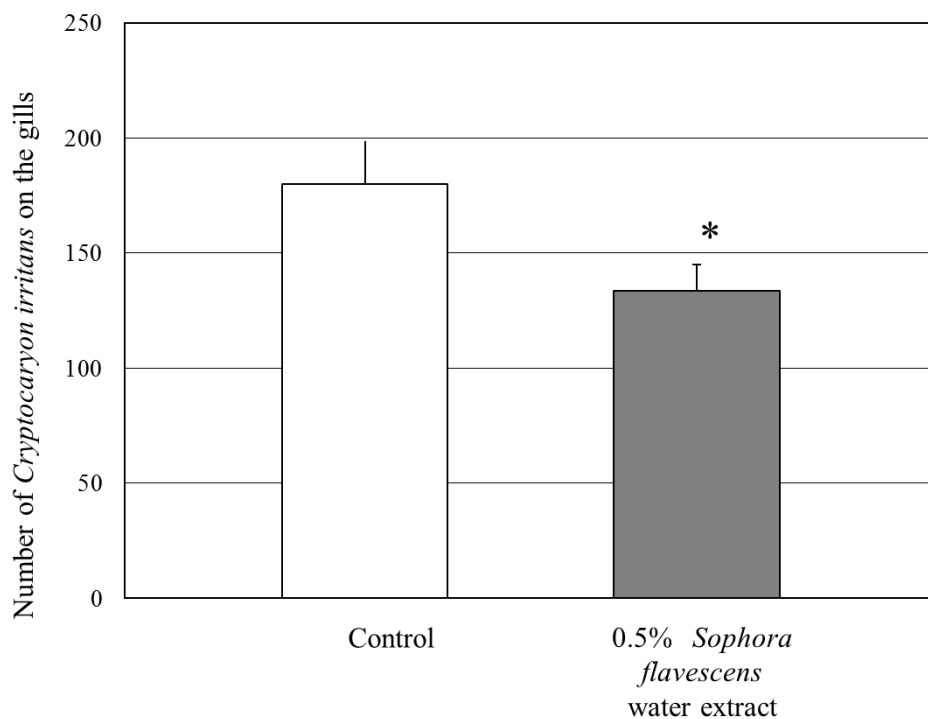
Figure 6. Survival of *Pagrus major* treated with in-feed *Sophora flavescens* water extract.

#### 第四章 クジン熱水抽出物添加飼料の白点虫感染治療効果の評価

クジン熱水抽出物の白点虫感染に対する治療効果を検討した。すなわち、マダイを白点虫に2時間暴露後、4時間後から3日間各試験飼料を摂取させ、鰓に寄生する白点虫数を計測することにより治療効果の評価を行った。

試験区は、クジン抽出物を0.5%添加した飼料を給餌する区（クジン0.5%区）、無添加飼料を給餌する区（対照区）の計2区とし、各区15尾のマダイ（平均魚体重25g）を用いた。

試験の結果、対照区および0.5%クジン区の白点虫寄生数（平均値 ± SEM）はそれぞれ、 $180 \pm 18$  個体/尾、 $133.6 \pm 11$  個体/尾であった。クジン0.5%区の本虫の鰓への寄生数は、対照区と比較し有意に低い値となり（ $P < 0.05$ ）（Fig. 7）、クジン熱水抽出物が白点虫感染に対する治療効果を有することが確認された。



**Figure 7.** Effect of in-feed *Sophora flavescens* water extract on previously-infected with *Cryptocaryon irritans* in *Pagrus major*. Each column represents mean ± SEM (n = 19). \* $P < 0.05$  vs. control (t-test)

## 第五章 小括

クジン熱水抽出物について、飼料への添加量の最適化と長期飼育における影響の評価、ならびにすでに白点虫に感染したマダイに対する治療効果について検討した。

クジン熱水抽出物添加飼料をマダイに給餌し、白点虫による攻撃試験を行った。クジン熱水抽出物の0.5%及び1.0%添加において、鰓への白点虫の寄生数は対照区と比較し50%以下に低下していたことから、クジン熱水抽出物により白点虫感染を防除できることが明らかとなった。長期給餌試験では、クジン熱水抽出物の投与が白点虫に感染したマダイの生残率を向上させることが判明した。更にクジン熱水抽出物添加飼料は、すでに白点虫に感染したマダイに対し治療効果を有することが確認された。

本研究により、クジン抽出物を添加した飼料が白点虫感染の防除あるいは治療に利用できる可能性を有することが初めて示唆された。

クジンの含有成分の抗菌、抗炎症、解熱剤、抗腫瘍活性等の報告があるが<sup>17-20</sup>、魚類の感染症に対する活性の検討は行われていない。クジン熱水抽出物の抗白点虫作用に寄与する化合物の探索により、経口投与可能な抗白点虫薬の開発に繋がることが期待される。

## 第三部 クジン熱水抽出物の抗白点虫活性物質の探索

### 第一章 序論

第二部でクジン熱水抽出物が抗白点虫活性を示すことを明らかにした。クジンには、キノリチジンアルカロイド (matrine, oxymatrine, sophoranol など) やフラボノイド (xanthohumol, kurarinone, kuraridin, kuraridinol, kurarinol など) が主として含有されることが報告されているが、これらの成分の魚類感染症に対する作用を評価した研究例は無い。

第三部では、白点虫感染に対する経口投与可能な水産医薬品の開発を視野に入れ、クジン熱水抽出物に含まれる抗白点虫活性化合物の探索を行った。

## 第二章 クジン熱水抽出物の抗白点虫活性物質の探索

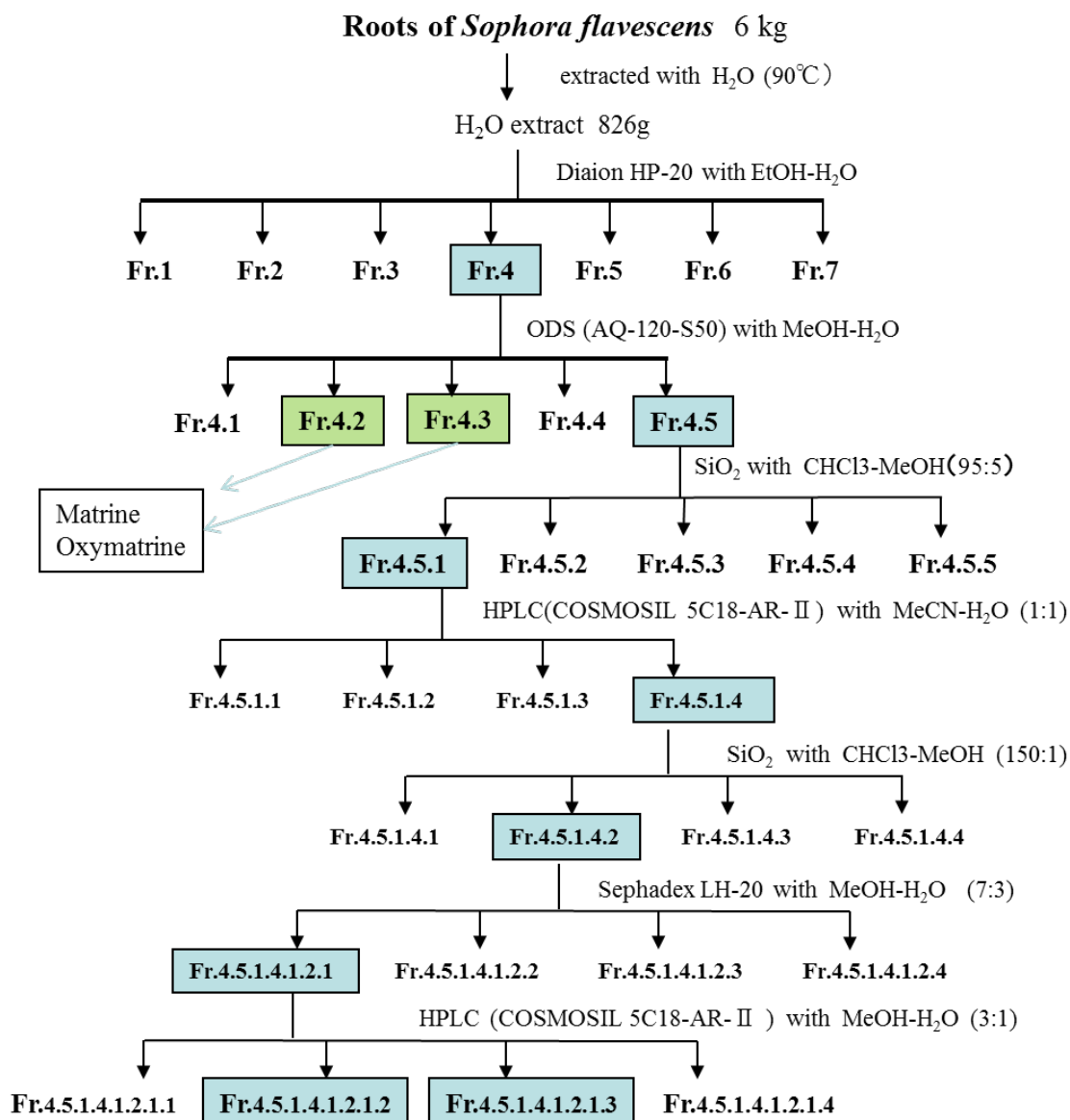
クジン熱水抽出物を、各種クロマトグラフィーにより分画し、得られたフラクションの抗白点虫活性を攻撃試験により評価した。これを繰り返すことにより、抗白点虫中活性成分の探索を行った (Scheme 1)。

クジン熱水抽出エキスを Diaion HP20 カラムに付して得た画分 (frs. 1~7) のうち、最も強い抗白点虫活性が認められた fr. 4 を (Fig. 8) , ODS カラムを用いて分画後 (frs. 4.1~4.5) , 活性を評価したところ、fr. 4.2, 4.3, 及び 4.5 に強い活性が認められた (Fig. 9)。

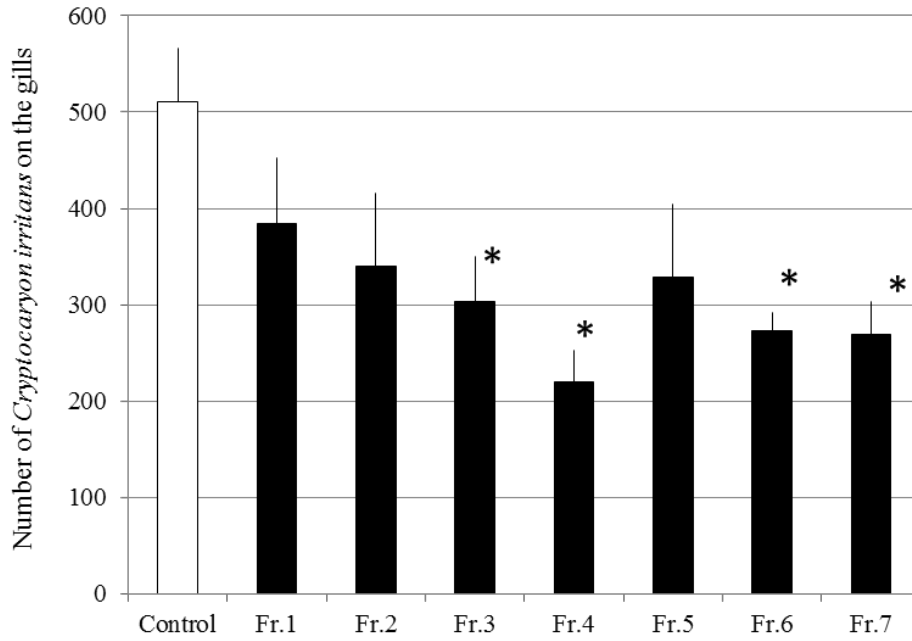
Fr. 4.1~4.5 について TLC 分析を行ったところ、fr. 4.2 と 4.3 にドラーゲントルフ試液で橙赤色の発色を示す複数のスポットが確認された。これらのうち、主な2個のスポットの  $R_f$  値がクジンの主アルカロイドであるキノリチジンアルカロイド、matrine ならびに oxymatrine の値と一致したことから、fr. 4.2 と 4.3 には matrine と oxymatrine が主として含まれることが示唆された。

このことを確認するため、fr. 4.2 と 4.3 の HPLC 分析を行った。この結果、fr. 4.2 と 4.3 それぞれに、matrine や oxymatrine と同一の保持時間を示すピークが観測された。以上の結果から、これらの画分に matrine と oxymatrine が含まれることを明らかにした。

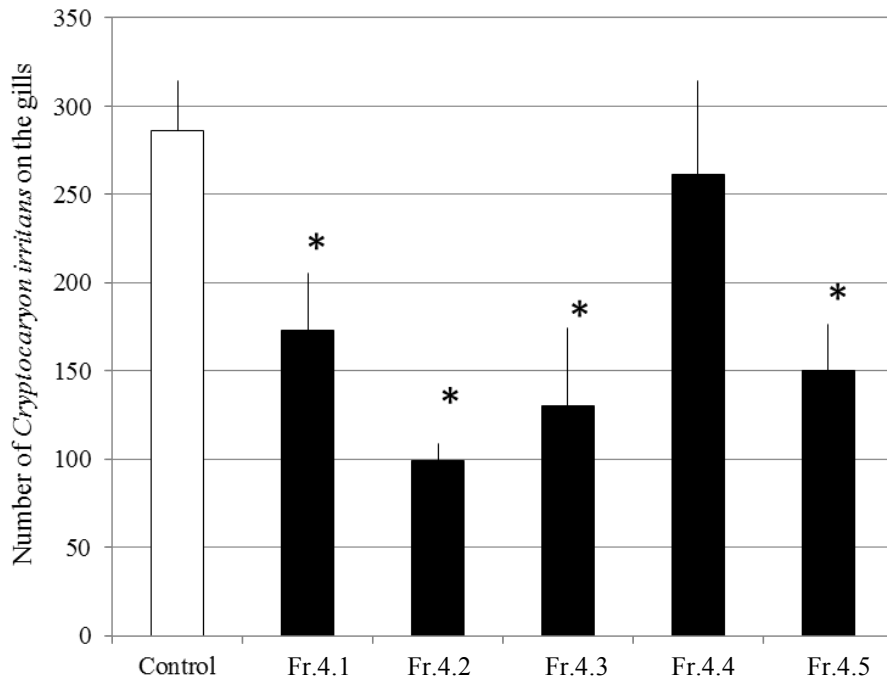
一方、ドラーゲントルフ試液で発色するスポットが見られなかった fr. 4.4 と 4.5 についても同様に HPLC による分析を行ったが、matrine や oxymatrine の存在は認められなかった。従って、fr. 4.5 には、キノリチジンアルカロイドとは異なる抗白点虫活性成分が存在すると考えられる。Fr. 4.5 に含まれる抗白点虫活性成分については、第六章にて詳述する。



**Scheme 1.** Bioassay-guided fractionation of the water extract of the roots of *Sophora flavescens*



**Figure 8.** Effect of the in-feed *Sophora flavescens* water extract (fractions 1-5) against *Cryptocaryon irritans* infection in *Pagrus major*. Each column represents the mean  $\pm$  SEM (n = 10). \* $P < 0.01$  vs. control (analysis of variance)



**Figure 9.** Effect of the in-feed *Sophora flavescens* water extract (fractions 4.1-4.5) against *Cryptocaryon irritans* infection in *Pagrus major*. Each column represents the mean  $\pm$  SEM (n = 10). \* $P < 0.01$  vs. control (analysis of variance)

### 第三章 Matrine ならびに oxymatrine 添加飼料の抗白点虫活性評価

クジン中に含まれる主アルカロイド，matrine ならびに oxymatrine が抗白点虫活性に寄与する可能性が示唆されたことから，これらのアルカロイドを飼料に添加し，抗白点虫活性を評価した。

飼料に添加する matrine と oxymatrine の最適な濃度を決定するために，クジン熱水抽出物中に含有される matrine と oxymatrine を HPLC により定量した。その結果，クジン熱水抽出物中には matrine が 0.28%，oxymatrine が 1.09% 含まれていることが判明した。

これらの含有率を，第二部で経口での抗白点虫活性が確認された，0.5%クジン熱水抽出物添加飼料中の含有率に換算すると，matrine が 0.01%，oxymatrine が 0.04%となる。そこで，これらのアルカロイドを 0.01%または 0.05%添加した飼料を調製し，抗白点虫活性を評価した。

Matrine を 0.01%あるいは 0.05%添加した飼料を給餌する区，ならびに対照区の計 3 区（各区マダイ 10 尾：平均魚体重 25 g）に対して，白点虫による攻撃試験を行った。すなわち，試験飼料給餌開始 7 日後にセロントにて攻撃し，攻撃 14 日後にマダイ鰓に寄生している白点虫数を計測した。Oxymatrine についても同様の評価を行った。

試験の結果，対照区，0.01%，0.05%matrine 添加区の白点虫寄生数（平均値±SEM）は，それぞれ 361±24 個体／尾，233±17 個体／尾，149±20 個体／尾であった。一方，oxymatrine では，対照区，0.01%，0.05%oxymatrine 添加区の白点虫寄生数（平均値±SEM）はそれぞれ，345±16 個体／尾，257±9 個体／尾，234±12 個体／尾であった。Matrine 及び oxymatrine の 0.01%並びに 0.05%区における白点虫の鰓への寄生数は，いずれも対照区と比較し有意に低い値を示した ( $P<0.05$ )。また，0.05%matrine 区は 0.01%区と比較し，濃度依存的な寄生数の減少 ( $P<0.05$ ) を示し，0.05%区では 58%以上の白点虫寄生数の減少が確認された。

Oxymatrine の投与区でも，濃度依存的な寄生数の減少傾向が認められたが，0.05%区と 0.01%区で有意な差は得られなかった (Table 2)。



**Table 2.** Effect of matrine-treated and oxymatrine-treated feed on *Cryptocaryon irritans* infection in *Pagrus major*.

Experimental group		No. of parasites per fish on the gills (n=10)	Reduction rate
	Basal feed without chemical (Control)	361 ± 24 <sup>a</sup>	-
Matrine	0.01%	233 ± 17 <sup>b</sup>	35.5%
	0.05%	149 ± 20 <sup>c</sup>	58.7%
	Basal feed without chemical (Control)	345 ± 16 <sup>d</sup>	-
Oxymatrine	0.01%	257 ± 9 <sup>e</sup>	25.5%
	0.05%	234 ± 12 <sup>e</sup>	32.2%

Values with different superscripts are significantly different at  $P < 0.05$ .

Values are mean ± SEM.

#### 第四章 白点虫感染マダイ長期飼育試験における matrine 添加飼料給餌の影響

抗白点虫活性が認められた matrine について、白点虫感染マダイ長期飼育（80 日間）における matrine 添加飼料給餌の影響を評価した。Matrine を 0.05% 添加した飼料を給餌する区 (matrine 区) と対照区の計 2 区 (各区 35 尾のマダイ：平均魚体重 15 g) に対し、白点虫による攻撃を行った。

攻撃開始 12 日後の対照区と matrine 区の鰓への白点虫寄生数 (平均値  $\pm$  SEM) は、それぞれ、 $393 \pm 41$  個体/尾と  $117 \pm 24$  個体/尾であり、matrine 区の寄生数は有意に低い値を示した ( $P < 0.01$ ) (Fig. 10)。

対照区の感染魚は攻撃開始 28 日後に全滅し、鰓に寄生する白点虫は 1,000 個体を超えていた。これに対し、matrine 区では試験終了まで白点虫感染によるへい死は認められなかった。また、試験終了時に matrine 区の供試魚の鰓に白点虫は観察されなかった。飼育期間中すべての供試魚において、毒性や内臓組織の肥大は観察されなかった。

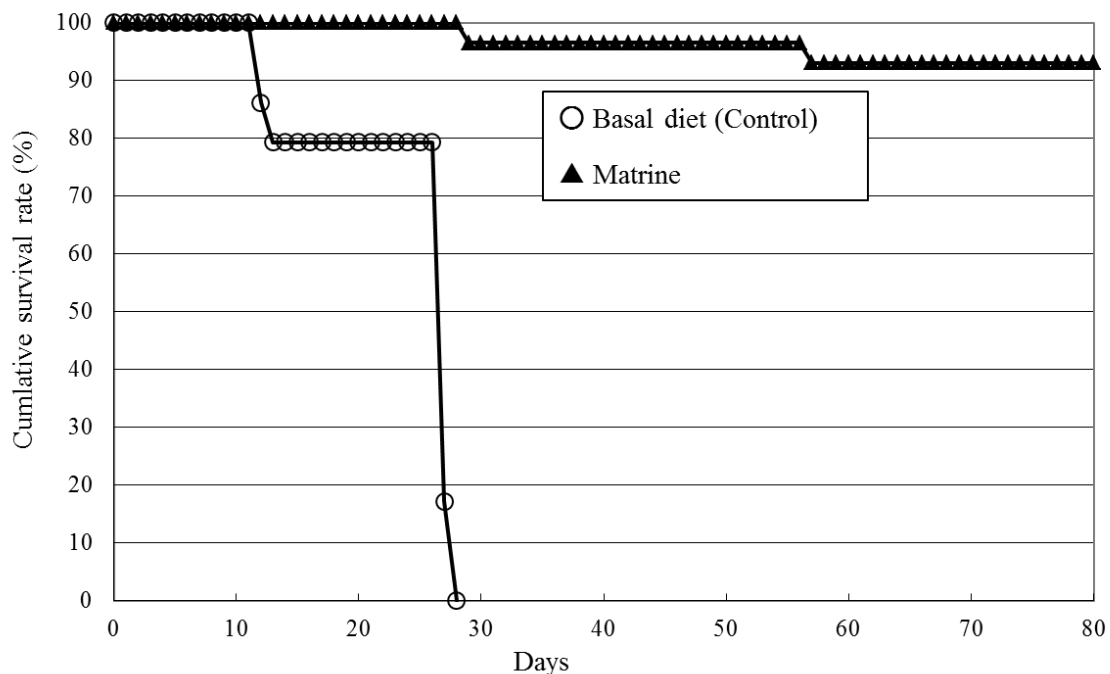
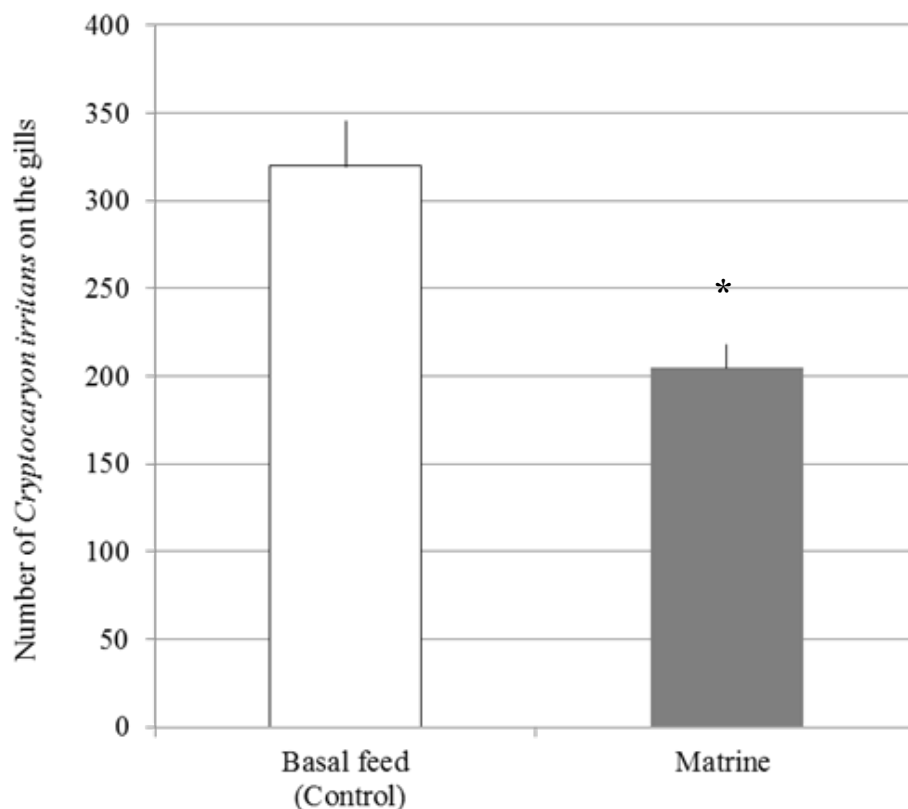


Figure 10. Survival of *Pagrus major* treated with in-feed matrine.

## 第五章 Matrine 添加飼料の白点虫感染治療効果

Matrine 添加飼料の白点虫感染に対する治療効果を評価した。試験区は、matrine を 0.05% 添加した飼料を給餌する区 (matrine 区) と対照区の計 2 区とし、各区 10 尾の白点虫に感染させたマダイ (平均魚体重 15 g) を用いた。マダイを白点虫に感染させた 4 時間後から 3 日間、各試験飼料を給餌した後、マダイ鰓に寄生する白点虫数を計測した。

試験の結果、対照区と matrine 区の白点虫寄生数 (平均値  $\pm$  SEM) は、それぞれ、 $320 \pm 25$  個体/尾と  $205 \pm 13$  個体/尾であった。Matrine 区の本虫の鰓への寄生数は、対照区と比較し有意に低い値を示した ( $P < 0.05$ ) ことから、matrine 添加飼料の白点虫感染に対する治療効果が確認された。(Fig. 11)。



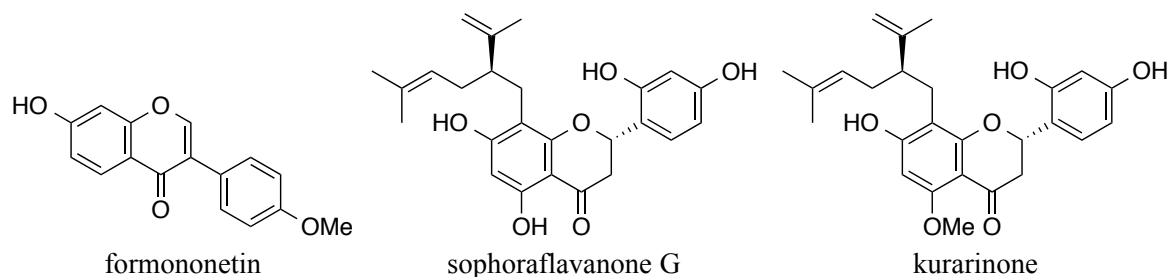
**Figure 11.** Effect of matrine-treated feed against *Cryptocaryon irritans* infection in *Pagrus major* previously infected with *C. irritans*. Each column represents the mean  $\pm$  SEM (n = 10). \* $P < 0.05$  vs. control (t-test).

## 第六章 クジン熱水抽出物中の非アルカロイド抗白点虫活性物質の探索

クジン熱水抽出物に含まれる *matrine* や *oxymatrine* が抗白点虫活性を示すことが確認されたが、第二章の検討では、アルカロイドを含まないフラクション (fr. 4.5) にも抗白点虫活性が認められていた。そこで、fr. 4.5 に含まれる非アルカロイド抗白点虫活性物質の探索を行った。

Fr. 4.5 を各種クロマトグラフィーにより分画し (Scheme 1) , 抗白点虫活性画分として2個の画分 (fr. 4.5.1.4.1.2.1.2 及び 4.5.1.4.1.2.1.3) を得た。両者の TLC パターンが類似していたことから、両画分を合わせた後 HPLC 用いて精製し、3種の既知フラボノイド、*formononetin* (51.4 mg) , *sophoraflavanone G* (503.4 mg) および *kurarinone* (612.1 mg) を単離した。これらの化学構造は、各種スペクトルデータを文献値と比較し、同定した<sup>26)</sup>。

なお、各クロマトグラフィーにより得られた画分の活性評価の詳細は実験の部に示す。

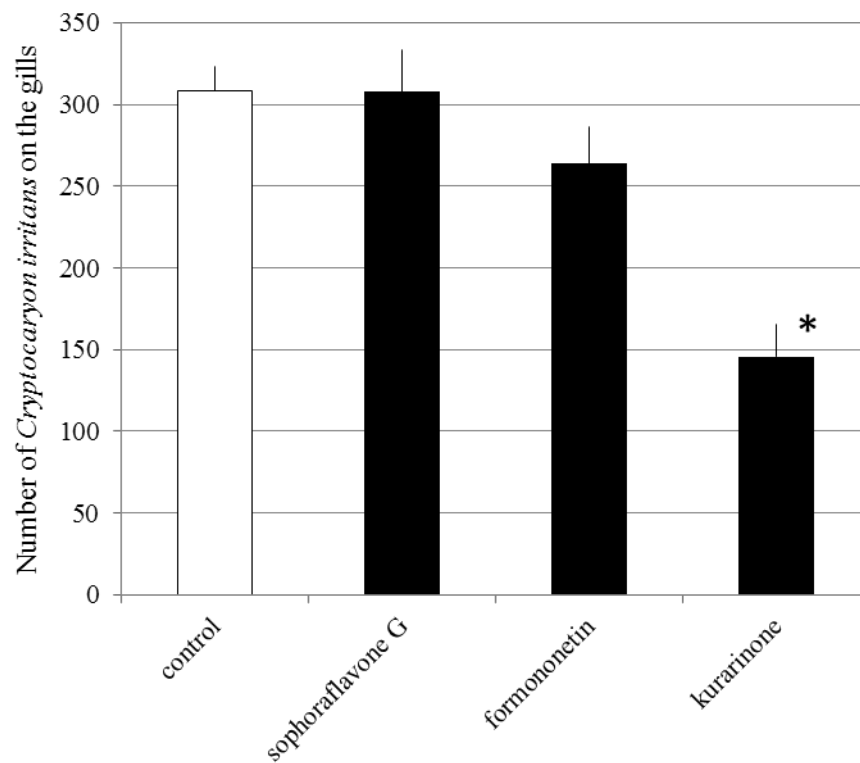


**Figure 12.** Structures of *formononetin*, *sophoraflavanone G*, and *kurarinone*

## 第七章 クジン由来のフラボノイド添加飼料の抗白点虫活性評価

クジンに含有されることを確認した三種のフラボノイド, formononetin, (-)-kurarinone および sophoraflavanone G を 0.05% 添加した飼料を給餌する区, ならびに対照区の計 4 区 (各区 7 尾のマダイ: 平均魚体重 60 g) に対して白点虫攻撃試験を行い, フラボノイド添加飼料の白点虫感染に対する防除効果評価した。

試験の結果, (-)-kurarinone 試験区において, 白点虫の寄生数が対照区と比較して約 50% 低下しており, matrine と同様の強い抗白点虫活性が確認された。一方, formononetin と sophoraflavone G 試験区では活性が認められなかった (Fig. 14)。



**Figure 13.** Effect of sophoraflavone-treated, kurarinone-treated and formononectin-treated feed against *Cryptocaryon irritans* infection in *Pagrus major*. Each column represents the mean ± SEM (n = 15).

\* $P < 0.01$  vs. control (analysis of variance)

## 第八章 小括

クジン熱水抽出物中の抗白点虫活性成分を探索したところ、アルカロイド含有画分に活性が認められた。キノリチジンアルカロイドの *matrine* 及び *oxymatrine* が活性画分に主として含まれることが明らかになったことから、これらを添加した飼料の抗白点虫活性を *in vivo* で評価した。その結果、*matrine* 0.05%添加飼料の経口投与により白点虫の寄生が 58%抑制されることを見出した。*Oxymatrine* にも抗白点虫活性が認められたが、その活性は *matrine* よりも弱いことが分かった。

*Matrine* は、マウスへのクリプトスポリジウム原虫の感染に対する治療効果が報告されているが<sup>25)</sup>、これまでに魚類の寄生虫に関する報告例はない。本研究により、魚類寄生虫、白点虫に対する効果が初めて明らかにされた。

*Matrine* や *oxymatrine* 等のキノリチジンアルカロイドは、様々な薬理作用を示す一方で、高濃度では毒性を示すことが知られている<sup>23,24)</sup>。今回の飼育試験における *matrine* と *oxymatrine* の添加量は哺乳類で報告されている LD<sub>50</sub> 値と比較して大幅に低い。飼育期間中にこれらの毒性や内臓組織への影響は見られなかったが、今後、水産用医薬品としての応用に際し、投与量の詳細な検討が必要とされる。

一方、マダイに対する *matrine* 0.1%添加飼料投与時に、吐き戻しが観察された。*Matrine* や *oxymatrine* 等のキノリチジンアルカロイドはクジンの苦味成分であることが知られている。カンパチのハダムシ(*Neobenedenia girellae*) 感染に対する駆虫剤プラジカンテルも苦味を有する薬剤であり、高容量で摂餌性が低下する<sup>21)</sup>。しかしながら、この苦みをマイクロカプセルによりマスクングすると、摂餌性が改善することが報告されている<sup>22)</sup>。*Matrine* 添加飼料についても同様のマスクング処理により、高濃度での適用が可能と考えられる。

クジン熱水抽出物の抗白点虫活性画分のうち、非アルカロイド画分を探索したところ、3種の既知フラボノイド、*formononetin*、(-)-*kurarinone* および *sophoraflavanone G* が得られた。これらを添加した飼料の抗白点虫活性を評価したところ、(-)-*kurarinone* の 0.05%添加飼料区に白点虫感染の防除作用が認められた。

これまでに、抗マラリア活性を示すフラボノイド配糖体 *multinoside A acetate* や<sup>27)</sup>、抗トリパノ

ソーマ活性を示すフラボノイド *agecoryflavone C*<sup>28)</sup>などが報告されているが, (-)-*kurarinone* は新しい白点虫感染治療薬の候補化合物となりうる化合物である。

## 結論

海産白点虫感染に対する薬剤の開発を目的に、薬用植物を含む59種の植物熱水抽出物及びメタノール抽出物の、*in vitro*抗白点虫活性スクリーニングを行ったところ、熱水抽出物で11種類、メタノール抽出物で10種類に活性が確認された。熱水抽出物とメタノール抽出物の両方において効果が確認された薬用植物を0.5%含有する固形飼料を、マダイに給餌し*in vivo*での抗白点虫活性を評価した。その結果、クジン熱水抽出物の0.5%及び1.0%添加飼料飼育によって、マダイの鰓への白点虫の寄生数が50%以下に低下することを見出した。加えて、マダイを用いたクジン熱水抽出物添加飼料の給餌による長期飼育において、生残率が向上することを明らかにした。さらに、クジン熱水抽出物添加飼料は、すでに白点虫に感染したマダイに対して治療効果を有することが明らかになった。

クジンに含まれる抗白点虫活性成分を探索したところ、キノリチジンアルカロイドmatrine及びoxymatineを含む画分に活性を確認した。これらのアルカロイドを添加した飼料の、抗白点虫活性を評価したところ、matrineに濃度依存的な強い活性が確認された。加えて、非アルカロイド画分からも抗白点虫活性を示すフラボノイド(-)-kurarinoneを見出した。

これまでに、薬用植物を含む植物抽出エキスのヒトを含む哺乳類感染症に対する効果は広く検討されているが、海産白点虫などの魚類感染症に対する評価はほとんど行われていない。本研究では、薬用植物クジン熱水抽出物が海産白点虫に対して経口で活性を示すこと、ならびに含有成分matrineが活性本体であることを確認し、これらが新たな白点虫感染に対する薬剤の候補となることを見出した。本成果を契機に、様々な魚類感染症に対する植物抽出エキスあるいは植物由来成分の活性評価、さらには水産医薬品への応用を目指した研究が展開されることを期待する。



## 謝辞

本研究を行うにあたり，終始御懇篤な御指導と御鞭撻を賜りました徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 柏田 良樹 教授に心より感謝いたします。

本研究において，種々の有益な御教示，御助力を賜りました徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 高石 喜久 前教授（現徳島大学副学長）に衷心より感謝いたします。

また，種々の御指導，御協力を頂きました平澤 徳高 博士，山下 伸也 博士，塩谷 格 博士，佐藤 誠造 博士，三星 亨 主任研究員を始めとする日本水産株式会社中央研究所の諸氏に深く感謝いたします。

合わせて，様々な御援助を賜りました崇城大学 村上 光太郎 教授ならびに田中 直伸 准教授を始めとする徳島大学薬学部生薬学研究室の諸氏に深く感謝いたします。

最後になりましたが，様々な面で御支援を賜りました，家族や友人に心より感謝いたします

## 実験の部

$^1\text{H-NMR}$  スペクトル,  $^{13}\text{C-NMR}$  スペクトルは Bruker DPX400 ( $^1\text{H}$ , 400 MHz;  $^{13}\text{C}$ , 100 MHz) で測定した。Chemical shiftは溶媒peakを基準とし,  $\delta$  (ppm)で, 結合定数は $J$  (= Hz)で表示した。MS スペクトルは, 島津製作所製ガスクロマトグラフ質量分析計 (GCMS-QP2010), 比旋光度はDIP-370 (JASCO)で測定した。またColumn chromatographyはChromatorex DM1020T (Fuji Silysia Chemical, Ltd), Silica gel 60N (63-210  $\mu\text{m}$ ; KANTO CHEMICAL), Sephadex LH-20 (25-100  $\mu\text{m}$ ; GE Healthcare Bioscience), YMC-gel ODS-A (S-50  $\mu\text{m}$ ; YMC Co, Ltd), Diaion HP-20 (Mitsubishi Chemical Corporation)を用いた。HPLCカラムには, COSMOSIL 5C18-AR-II packed column ( $\phi 20 \times 250$  mm; Nacalai tesque, Inc), COSMOSIL 5C18-AR-II packed column ( $\phi 4.6 \times 150$  mm; Nacalai tesque Inc), およびCAPCELL PAK ACR TYPE (Shiseido Co.,Ltd)を用い, 装置はL-7100 pump (Hitachi)とL-7400 UV variable wavelength detector (Hitachi)を使用した。TLCは, silica gel 60 F254 (0.20 mm, Merck), NH silica gel (Fuji Silysia Chemical, Ltd), RP-18 F254S (0.20 mm, Merck)を用い, スポットの検出にはUV lamp (254 nm)と発色試薬{10%硫酸試薬 (噴霧後加熱), 1%硫酸セリウム試液 (噴霧後加熱), ドラージェンドルフ試液, 塩化第二鉄・メタノール試液}を用いた。

### 第一部の実験

#### 植物試料

クジンを含む59種の薬用植物類はダイセルファインケム株式会社より購入した。

#### 薬用植物抽出物の調製

薬用植物粉碎物に蒸留水を1:5 (w/v) の割合で加え,  $90^\circ\text{C}$ に加熱した後, ホモゲナイザー (ポリトロン; Littau社製) で成分を10分間溶出させた。抽出液を1,200 rpm, 20分間遠心分離した後, 上清をミリポアフィルター (0.22  $\mu\text{m}$ , ミリポア社製) でろ過し, 熱水抽出物を得た。残渣にメタノール (和光純薬社製) を1:5 (w/v) の割合で混合後 $80^\circ\text{C}$ まで加熱し, ディスパーサーで溶出させた。この抽出液を1,200 rpm, 20分間遠心分離し, 上清をミリポアフィルターでろ過し, メタノ

ール抽出物を得た。

### 白点虫の飼育

白点虫は日本水産株式会社大分海洋研究センターにおいて、100 L水槽にて育成したマダイ（20～40g）を宿主として使用し、継代を行っている。マダイより離脱したシストは粘性物質を分泌し、水槽の底に付着するため、水槽の底にスライドガラスを沈め、シストを付着させた(Fig. 15)<sup>29,30</sup>。スライドガラスを回収後、25℃に保たれたろ過海水を含む300 mLプラスチックビーカー内で5日間インキュベートし、5日後に孵化させた<sup>3)</sup>。実験には孵化後12時間以内のものを用いた。プラスチックビーカーのろ過海水を攪拌し、1.0 mLを5回ピペットにて採水し、1.0 mL中に含まれるセロントを計数し、平均数を1.0 mL中のセロントの数とした。

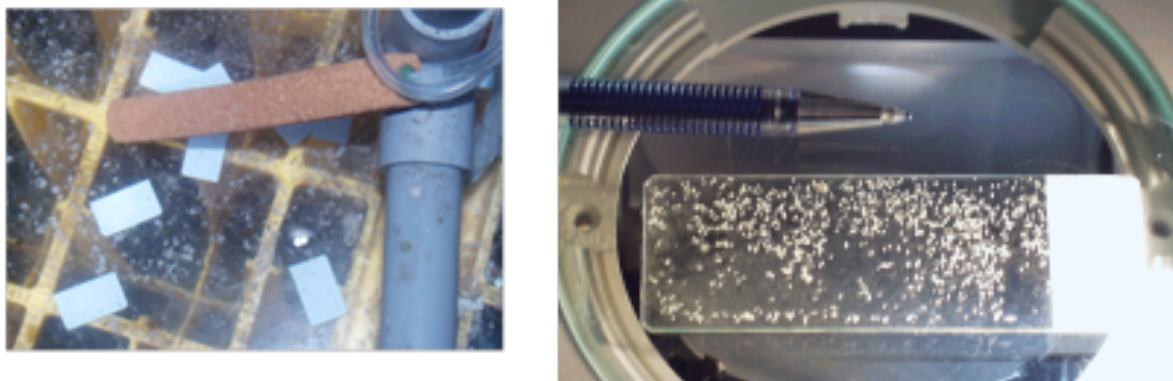


Figure 14. スライドガラスに付着したシスト

### セロントを用いた植物抽出物の *in vitro* 抗白点虫活性評価

セロントを含む海水1.0 mLに対し、各薬用植物抽出液10  $\mu$ Lを加えて浸漬し、2時間後に繊毛運動が停止したセロントを計数することで、その効果の評価を行った。なお、供試した白点虫は200～400個体とし、浸漬時の水温は25℃とした。また対照区は海水のみとした。

### 試験飼料の作製

各薬用植物抽出物を用いて、試験飼料の作製を行った。即ち、各薬用植物熱水抽出物 5 g

を 100 mL の蒸留水に，メタノール抽出物 5 g をメタノール 100 mL にそれぞれ溶解し，混合しながら市販の 2.5 mm のペレット飼料（日本水産株式会社）1 kg に噴霧し，90℃で 2 時間乾燥させ，薬用植物抽出物を 0.5% 含有する固形飼料を得た。

## 供試魚

スクリーニング試験には，日本水産株式会社にて孵化し1000 Lもしくは100 L水槽で飼育した感染履歴の無いマダイを用いた。これらの水槽には砂でろ過後，紫外線照射した滅菌海水（塩分濃度 34 ppt, pH 8.1, 化学的酸素要求量 1.0 mg/L）を1.2 L/分の流速で供給した。飼料には市販の2.5 mmのペレット飼料を用い，魚体重の3%を給餌した<sup>31,32</sup>。なお，各試験前に任意に採取した10尾の鰓と皮膚を顕微鏡下にて観察し，寄生虫に感染していないことを確認した。

## 試験飼料による白点虫防除試験

マダイを  $25.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で維持した 100 L 水槽へ分養し，馴致を目的に 7 日間，市販の 2.5 mm のペレット飼料を給餌した後，白点虫に対する飼料添加試験に供試した。給餌量は，各区魚体重に対し 2%/日とした。

攻撃試験は各試験飼料を給餌し，給餌開始 7 日後に各水槽に一定数のセロントを入れ，2 時間止水の状態に感染させることにより行った。その後，一定期間，各試験飼料にて飼育した。試験終了時に全試験魚をサンプリングし，顕微鏡下で鰓に寄生している本虫の寄生数を計測することで白点虫防除効果の評価を行った。試験期間中の水温は  $24 \sim 25^\circ\text{C}$  であった。試験期間中の換水は 24 回転/日とした。

## 統計解析方法

すべての測定値について各試験区の平均値±標準誤差を算出した。鰓への寄生数の群間の有意差はpost-hoc Tukey's testの多重検定もしくは，*t*-検定を行った。

## 第二部の実験

### 試験飼料の作製

クジン熱水抽出物を各 0.1%、1.0%含有する飼料は、クジン熱水抽出物 1 g、10 g をそれぞれ 100 mL の蒸留水に溶解し、第一部の試験飼料の作成に記載した方法で調製した。

### クジン熱水抽出物添加飼料による白点虫防除試験

第一部の試験飼料による白点虫防除試験と同様な方法で試験を行った。

### 白点虫感染マダイの長期飼育におけるクジン熱水抽出物添加飼料給餌の影響の評価

試験区の設定、攻撃試験については第一部の試験飼料による白点虫防除試験と同様の方法で行った。攻撃後、各試験飼料にて80日間継続飼育した。評価は、毎日の死亡個体数を記録し飼育期間中の生残率の比較、および飼育期間中に各区5尾をサンプリングし、その鰓に寄生している本虫の寄生数を計測することで行った。また試験終了となる80日目にすべてのマダイを取り上げ、その鰓に寄生している本虫の寄生数を確認した。飼育条件は9と同様の方法にて実施した。

### クジン熱水抽出物添加飼料の白点虫感染治療効果の評価

試験区の設定は第一部の試験飼料による白点虫防除試験と同様の方法にて行った。

攻撃試験について、各水槽に一定数のセロントを入れ、2時間止水の状態で感染させた。感染させた4時間後から3日間各試験飼料を給餌した。

評価は、攻撃開始3日後に行った。評価方法や飼育条件は10と同様の方法にて実施した。

## 第三部の実験

### 試薬

Matrine, oxymatrineはそれぞれICN Biomedicals Inc. (California, USA) 及び Wako Pure Chemicals (Osaka, Japan)より購入した。

### クジン熱水抽出物の調製, 分画

クジン粉砕物 6 kg (3kg を 2 回)に蒸留水を 1 : 5 (w/v) の割合で加え, 90°C 180 分で加熱し抽出した。抽出液をろ過 (6 µm, アドバンテック社製) 後, エバポレーターで濃縮し, クジン熱水抽出物 826 g を得た。熱水抽出物を水に溶解し, Diaion HP20 カラムに付し, H<sub>2</sub>O-EtOH (0 → 100 %) でグラジエント溶出し, Fr. 1~7 を得た。Fr.4 を ODS-AQ-120-S50 カラムクロマトに付し, H<sub>2</sub>O-MeOH (0 → 100 %) でグラジエント溶出し Fr. 4.1~4.5 を得た。

Fr. 4.5 をシリカゲルカラムクロマト[CHCl<sub>3</sub>-MeOH (95:5)]により分画を行い, Fr. 4.5.1~4.5.5 に分画した。Fr.4.5.1 を HPLC COSMOSIL 5C18-AR- II [MeCN- H<sub>2</sub>O (1:1)]により分画を行い Fr. 4.5.1.1~4.5.1.4 に分画した。Fr.4.5.1.4 を, シリカゲルカラム[CHCl<sub>3</sub>-MeOH (150:1→100:10) ]により分離を行い Fr. 4.5.1.4.1~4.5.1.4.4 を得た。Fr.4.5.1.4.2 を Sephadex LH-20 カラム[MeOH : H<sub>2</sub>O (7:3)]で分離し, Fr. 4.5.1.4.1.2.1~4.5.1.4.1.2.4 を得た。Fr.4.5.1.4.2.1 を HPLC COSMOSIL 5C18-AR-II [MeOH : H<sub>2</sub>O (3:1→ 1:0)]で分離し, Fr. 4.5.1.4.1.2.1.1~4.5.1.4.1.2.1.4 を得た。

Fr.4.5.1.4.2.1.2, 4.5.1.4.2.1.3 を合わせ, 更に CAPCELL PAK ACR TYPE [MeCN:H<sub>2</sub>O (6:4)], Chromatorex DM1020T [MeOH-H<sub>2</sub>O (1:1→1:0) ]により精製を行い, formononetin (51.4mg), kurarinone (612.1mg), sophoraflavanone G (503.4mg) を得た。Formononetin, sophoraflavanone G, kurarinone は各種スペクトルデータを文献値と比較することにより同定した<sup>26)</sup>。

### クジン熱水抽出物中の matrine, oxymatrine の定量

クジン熱水抽出物 1.0 g に 10.0 mL の蒸留水を加え, 90°C, 15 分で加熱し抽出した後, 抽出液を 1200 rpm, 20 分間遠心分離した。上清をミリポアフィルター (0.22 µm, ミリポア社製) でろ過後,

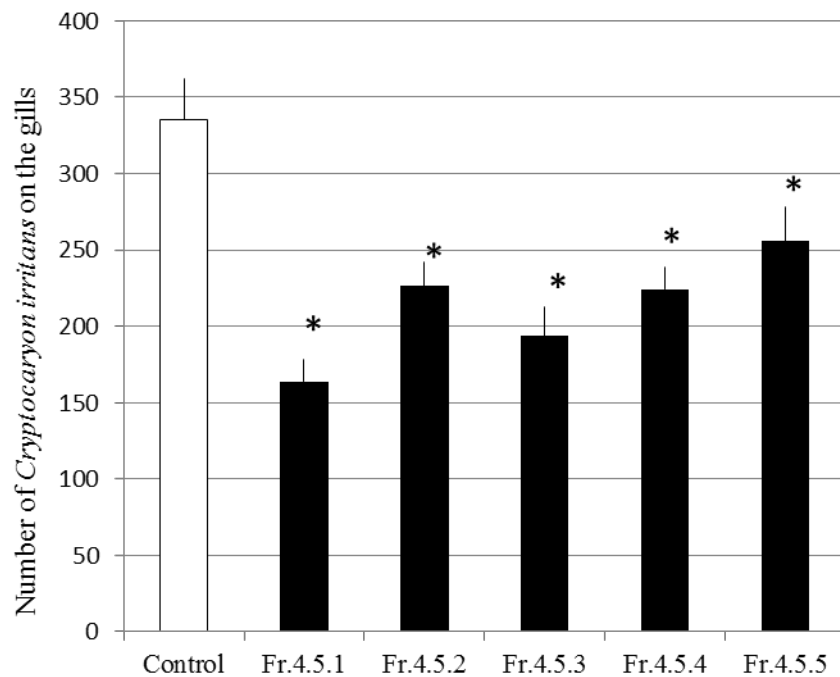
蒸留水にて 100 mL にメスアップし、その 10  $\mu$ L を HPLC に注入した。HPLC の条件は、紫外吸光度計（測定波長: 207nm）、カラム（TSKgel ODS-80Ts 4.6mm $\Phi$ ×150mm, 5  $\mu$ m, 東ソー）、カラム温度；50°C 付近の一定温度、移動相；42 mM SDS を含む 1/15M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-1/15M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 2.0) ・ CH<sub>3</sub>CN (740 : 260), 流速；1.0 mL/min とした<sup>33)</sup>。定量は、標準物質の検量線を作成し、ピーク面積からその含量を算出した。

#### アルカロイド及びフラボノイド添加飼料の作製

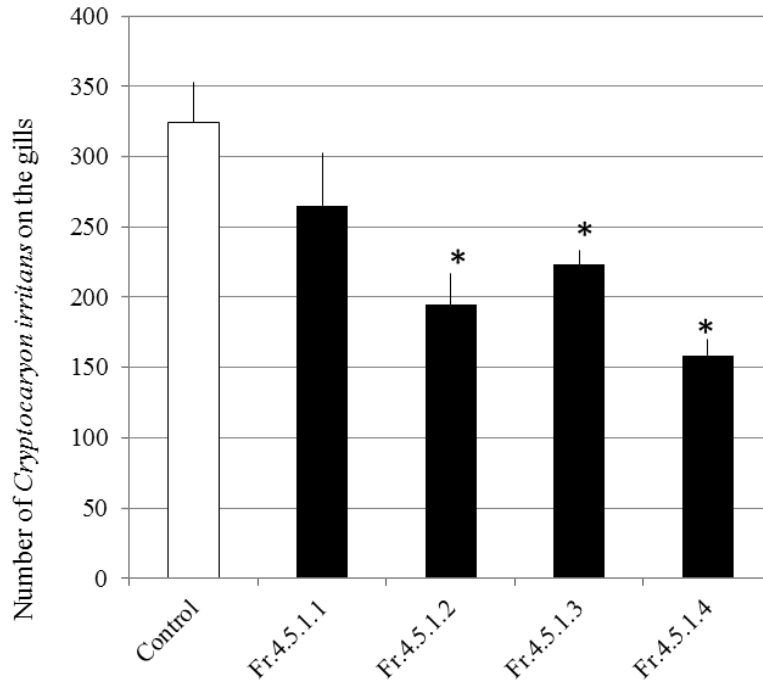
Matrine, oxymatrine, formononetin, kurarinone, sophoraflavanone G, それぞれ 0.05 g をメタノール 100 mL に溶解し、混合しながらペレット飼料 100 g に噴霧し、第二章に記載した試験飼料の作製と同様の方法により、それぞれの化合物を 0.05% 含有する固形飼料を得た。

#### クジン熱水抽出物画分の白点虫防除試験

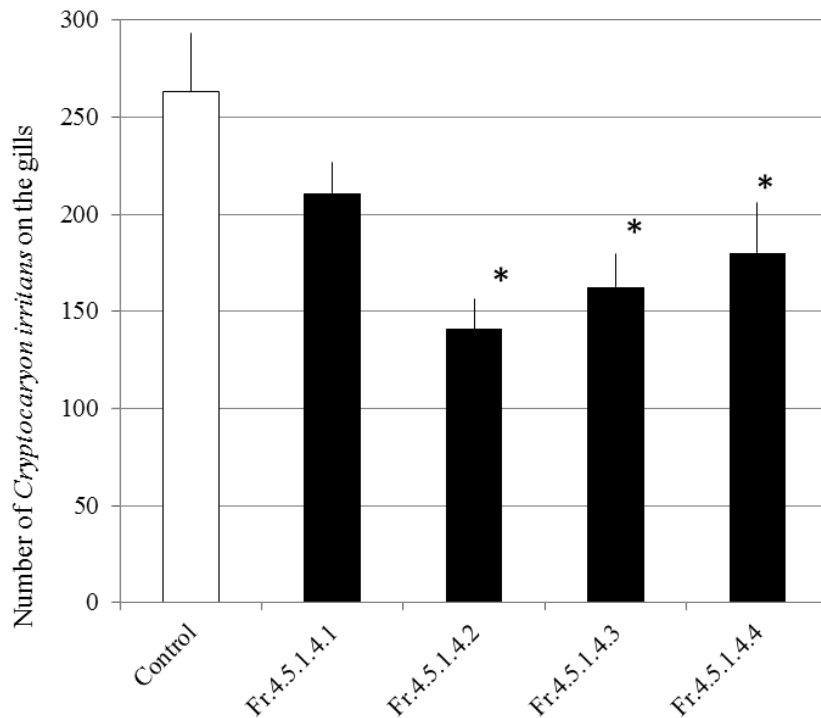
第二部の白点虫防除試験に記載の方法に従い、クジン熱水抽出画分について、白点虫防除試験を行い、得られた画分の活性を評価した(Figs. 8, 9, and 15~19)。



**Figure 15.** Effect of the in-feed *Sophora flavescens* water extract (Fraction 4.5.1 – 4.5.5) on *Cryptocaryon irritans* infection in *Pagrus major*. Each column represents the mean  $\pm$  SEM (n = 12). \* $P < 0.01$  vs. control (analysis of variance)

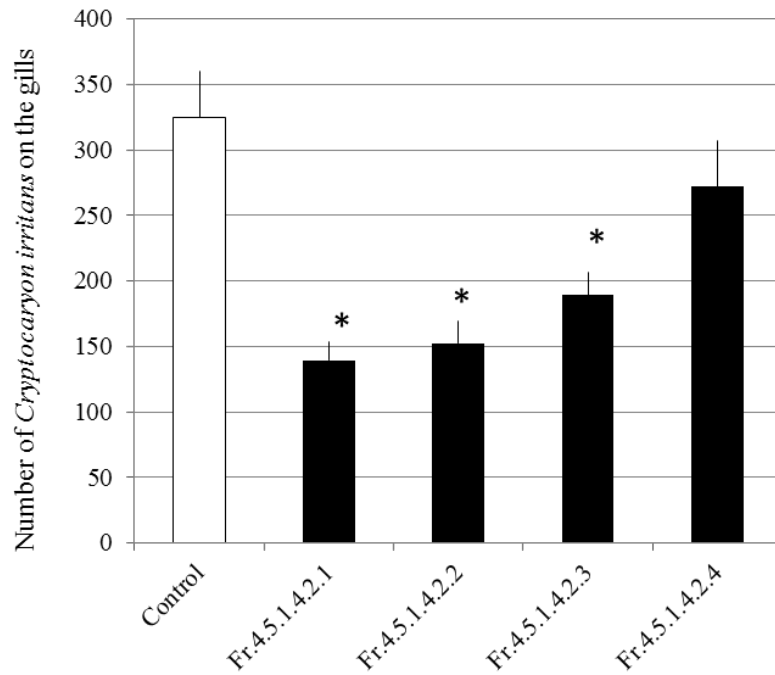


**Figure 16.** Effect of the in-feed *Sophora flavescens* water extract (Fraction 4.5.1.1 – 4.5.1.4) on *Cryptocaryon irritans* infection in *Pagrus major*. Each column represents the mean  $\pm$  SEM (n = 12). \* $P < 0.01$  vs. control (analysis of variance)

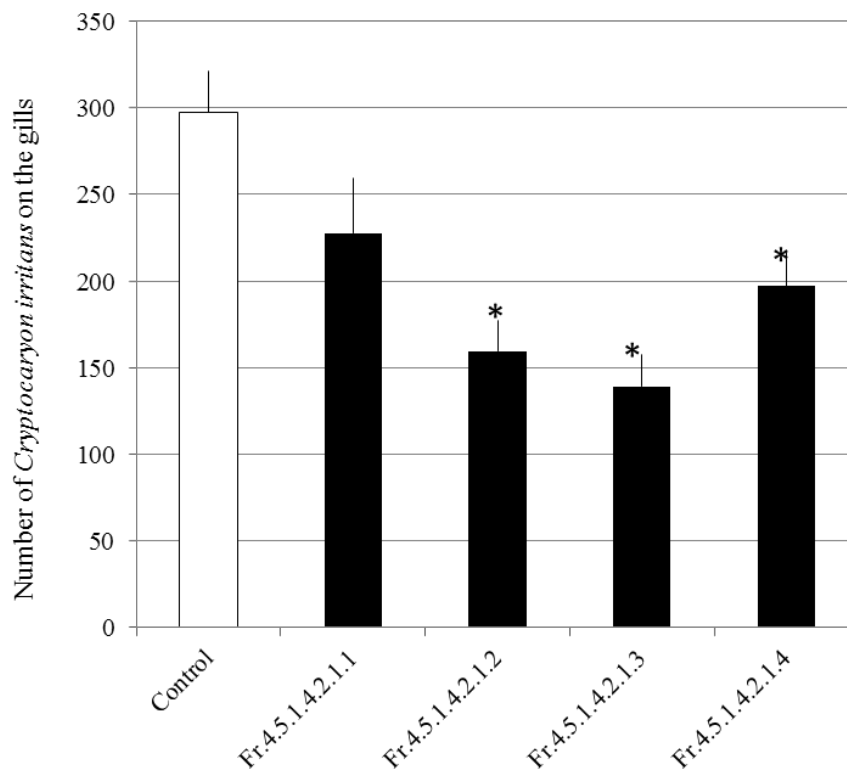


**Figure 17.** Effect of the in-feed *Sophora flavescens* water extract (Fraction 4.5.1.4.1 – 4.5.1.4.4) on *Cryptocaryon irritans* infection in *Pagrus major*. Each column represents the mean  $\pm$  SEM (n = 13). \* $P < 0.01$  vs. control (analysis of variance)





**Figure 18.** Effect of the in-feed *Sophora flavescens* water extract (Fraction 4.5.1.4.2.1 – 4.5.1.4.2.4) on *Cryptocaryon irritans* infection in *Pagrus major*. Each column represents the mean  $\pm$  SEM (n = 15). \* $P < 0.01$  vs. control (analysis of variance)



**Figure 19.** Effect of the in-feed *Sophora flavescens* water extract (Fraction 4.5.1.4.2.1.1 – 4.5.1.4.2.1.4) on *Cryptocaryon irritans* infection in *Pagrus major*. Each column represents the mean  $\pm$  SEM (n = 15). \* $P < 0.01$  vs. control (analysis of variance)

### **Matrine, oxymatrine, formononetin, kurarinone, sophoraflavanone G 添加飼料の白点虫防除試験**

Matrine 及び oxymatrine は 0.01%あるいは 0.05%添加した飼料, ormononetin , kurarinone, sophoraflavanone G は 0.05%添加した飼料について, 第二部の白点虫防除試験と同様な方法で白点虫防除試験を行った。

### **白点虫感染マダイ長期飼育試験における matrine 添加飼料給餌の影響**

Matrine を 0.05%添加した飼料について, 第二部の長期飼育試験と同様な方法で長期飼育試験を行った。

### **Matrine 添加飼料の白点虫感染治療効果**

Matrine を 0.05%添加した飼料について, 第二部の白点虫防除試験と同様な方法で白点虫感染治療効果の評価を行った。

参考文献

- 1) Yoshinaga, T., 1998. Controlling of *Cryptocaryon irritans*. Kaiyo monthly 14, 73–76.
- 2) Brown, E. M., 1951. A new parasitic protozoan, the causal organism of a white spot disease in marine fish *Cryptocaryon irritans* gen and sp.n. Proceedings of the Zoological Society London 11, 1–2 (Agenda and Abstracts of Scientific Meetings of the Zoological Society of London, 1950).
- 3) Yoshinaga, T., Dickerson, H. W., 1994. Laboratory propagation of *Cryptocaryon irritans* on saltwater-adapted black mollies (*Poecilia latipinna*). Journal of Animal Health. 6, 197–201.
- 4) Matsuoka, S., 1995. Occurrence of viral, parasitic and other non-bacterial diseases in cultured marine fin-fish in Ehime prefecture form 1961 to 1993. Suisanzoshoku 43, 535–541. (In Japanese with English abstract).
- 5) Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, 2014. 水産用医薬品の使用について (第 27 報)
- 6) Kim, K. H., Choi, E. S., 1998. Treatment of *Microcotyle sebastis* (Monogenea) on the gills of cultured rockfish (*Sebastes chelegeli*) with oral administration of mebendazole and bithionol. Aquaculture 167, 115–121.
- 7) Mukherjee, P. K., Wahile, A., 2006. Integrated approaches towards drug development from Ayurveda and other Indian system of medicines. J. Ethnopharmacol. 103, 25–35.
- 8) Bae, K. H., Kim, Y. K., Min, B. S., 1997. A cytotoxic constituent from *Sophora flavescens*. Archives of Pharmacal Research 20(4), 342.
- 9) Ryu, S. Y., Lee, S. H., No, Z., Kim, K.-Y., Lee, S.-G., Ahn, J. W., 1995. The structure of kushenol M from *Sophora flavescens*. Archives of Pharmacal Research 18, 41–43.
- 10) Wu, L., Miyase, T., Ueno, A., Kuroyanagi, M., 1985, Studies on the constituents of *Sophora flavescens* Ait. III Yakugaku Zasshi 105, 736.
- 11) Yamaki, M., Kashihara, M., Takagi, S., 1990. Activity of Ku Shen compounds against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans*. Phytother Research 4, 235–236
- 12) Krishna, P. M., Rao K. N. V., Sandhya, S., Banji, D., 2012. A review on phytochemical, ethnomedical and pharmacological studies on genus *Sophora*, Fabaceae *Braz. J. Pharmacog.* 22,

1145-1154.

- 13) Kang, T. H., Jeong, S. J., Ko, W. K., Kim, N. Y., Lee, B. H., Inagaki, M., Miyamoto, T., Higuchi, R., Kim, Y. C., 2000. Cytotoxic Lavandulyl Flavanones from *Sophora flavescens*. Journal of Natural Products 63, 680–681.
- 14) Ryu, S. Y.; Lee, H. S.; Kim, Y. K.; Kim, S. H., 1997, Determination of isoprenyl and lavandulyl positions of flavonoids from *Sophora flavescens* by NMR experiment. Archives of Pharmacal Research 20(5), 491.
- 15) Tang, W., Eisenbrand, G., 1992. *Sophora flavescens* Ait. Chinese Drugs of Plant Origin. 931–943.
- 16) Yagi, A., Fukunaga, M., Okuzako, N., Mifuchi, I., Kawamoto, F., 1989. Antifungal Substances from *Sophora flavescens*. Shoyakugaku Zasshi 43, 343–347.
- 17) Cho, C. H., Chuang, C. Y., Chen, C. F., 1986. Study of the antipyretic activity of matrine. A lupin alkaloid isolated from *sophora subprostrata*. Planta Medica 5, 343–345.
- 18) Chuang, C. Y., Xiao, J. G., Chiou, G. C., 1987. Ocular anti-inflammatory actions of matrine. Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics Summer 3(2), 129–134.
- 19) Liu, X. S., Jiang, J., Jiao, X. Y., Wu, Y. E., Lin, J. H., 2006. Matrine-induced apoptosis in leukemia U937 cells: Involvement of caspases Activation and MAPK-independent pathways. Planta Medica 72, 501–506.
- 20) Long, Y., Lin, X. T., Zeng, K. L., Zhang, L., 2004. Efficacy of intramuscular matrine in the treatment of chronic hepatitis B. Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International 3(1), 69–72.
- 21) Hirazawa, N., Akiyama, K., Umeda, N., 2013. Differences in sensitivity to the anthelmintic praziquantel by the skin-parasitic monogeneans *Benedenia seriolae* and *Neobenedeniagirellae*. Aquaculture 404–405, 169–180.
- 22) Partridge, G. J., Michael, R. J., Thuillier, L., 2014. Praziquantel form, dietary application method and dietary inclusion level affect palatability and efficacy against monogenean parasites in yellowtail kingfish. Diseases of Aquatic Organisms 109, 155–163
- 23) Shao, J., Wang, T., Yan, Y., Shi, G., Cheng, H., Wu, D., Wang, C., 2014. Matrine reduces

- yeast-to-hypha transition and resistance of a fluconazole-resistant strain of *Candida albicans*. *Journal of Applied Microbiology* 117, 618–626.
- 24) Yang, Y., Xiu, J., Zhang, X., Zhang, L., Yan, K., Qin, C., Liu, J., 2012. Antiviral Effect of Matrine against Human Enterovirus 71. *Molecules* 17, 10370–10376.
- 25) Chen, F., Huang, K., 2012. Effects of the Chinese medicine matrine on experimental *C. parvum* infection in BALB/c mice and MDBK cells. *Parasitology Research* 111(4), 1827–32.
- 26) Sato, S., Takeo, J., Aoyama, C., Kawahara, H., 2007. Na<sup>+</sup>-Glucose cotransporter (SGLT) inhibitory flavonoids from the roots of *Sophora flavescens*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 15, 3445–3449
- 27) Murakami, N., Mostaqul, H. M., Tamura, S., Itagaki, S., Horii, T., Kobayashi, M., 2001. New Anti-Malarial Flavonol Glycoside from *Hydrangeae Dulcis* Folium. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 11, 2445–2447
- 28) Nour, A. M. M., Khalid, S. A., Kaiser, M., Brun, R., Abdalla, W. E., Schmidt, T. J., 2010. The antiprotozoal activity of methylated flavonoids from *Ageratum conyzoides* L. *Journal of Ethnopharmacology* 129, 127–130
- 29) Hirazawa, N., Goto, T., Shirasu, K., 2003. Killing effect of various treatments on the monogenean *Heterobothrium okamotoi* eggs and oncomiracidia and the ciliate *Cryptocaryon irritans* cysts and theronts. *Aquaculture* 223, 1–13.
- 30) Hirazawa, N., Oshima, S., Hara, T., Mitsuboshi, T., Hata, K., 2001. Antiparasitic effect of medium-chain fatty acids against the ciliate *Cryptocaryon irritans* infestation in the red sea bream *Pagrus major*. *Aquaculture* 198, 219–228.
- 31) Aoki, H., Watanabe, T., Furuichi, M., Tsuda, H., 1997. Use of alternative protein sources as substitutes for fish meal in red sea bream diets. *Suisanzoshoku* 45, 131–139.
- 32) Takagi, S., Hosokawa, H., Shimeno, S., Maita, M., Ukawa, M., Ueno, S., 1999. Utilization of soy protein concentrate in a diet for red sea bream, *Pagrus major*. *Suisanzoshok* 47, 77–87. (In Japanese with English abstract)
- 33) Hirayama, F., Namiki, C., Sagara, K., Tong, Y. Y., He, L. Y., Chen, Y. H., 1995. Determination of

lupin alkaloids and pterocarpan in *Sophora* root by HPLC. Nature Medicine 49(3), 317–321. (In Japanese with English abstract)