

学位論文題名

Studies on the antiviral and antibacterial activity
of Thai traditional herbs and application to prevent
the viral and bacterial diseases in aquatic animals

(タイ国伝統ハーブの抗ウイルスおよび抗菌活性と水棲生物の
ウイルスおよび細菌による疾病防除への応用に関する研究)

学位論文内容の要旨

タイ国における主要産業にまで発展した魚介類の養殖業が、各種の疾病被害の増大により岐路に立たされている。しかし現在、その有効な対策はまだ確立されていない。そこでタイ国に古くから伝わるハーブに着目し、魚介類の疾病防除・治療への応用の可能性について検討した。すなわち、タイ国伝統ハーブ 21 種を対象に、魚類およびエビ類の病原ウイルスならびに病原細菌に対する抗ウイルス効果および抗菌効果のスクリーニングを行った。優れた抗ウイルス効果を示した *C. nutans* のウシエビのイエローヘッド病抑制効果および強い抗菌効果を示した *P. guajava* のハイブリッド*キャットフィッシュの運動性エロモナス病抑制効果を *in vivo* で観察した。さらにこれらの魚類およびエビ類の生体防御能に及ぼす影響およびウイルスに対する作用機序について若干の検討を行った。

まず第 1 章ではタイ国伝統ハーブ *Cassia alata*, *Calophyllum inophyllum*, *Clinacanthus* sp., *C. nutans*, *Glinus oppositifolis*, *Hura crepitans*, *Momordica charantia*, *Ocimum sanctum* (red and white), *Orchocarpus siamensis*, *Phyllanthus acidus*, *P. amarus*, *P. debilis*, *P. reticulatus*, *P. urinaria*, *Psidium guajava*, *Tinospora cordifolis*, *T. crispa* の計 18 種についてエタノール抽出液を作成し、培養が可能でかつ抗ウイルス効果のスクリーニング法が確立されている 3 種のサケ科魚類の病原ウイルス；ラブドウイルスの伝染性造血器壊死症ウイルス (IHNV)、ビルナウイルスの伝染性膀胱壊死症ウイルス

(IPNV)およびサケ科魚類のヘルペスウイルス2型 (SaHV-2; OMV)に対する抗ウイルス効果を、CHSE-214細胞を用いたプラーク減少法により観察した。同時にハーブ抽出液のCHSE-214細胞に対する細胞毒性値を検討した。

抗ウイルス効果は100 μ g/mlに調製した抽出液をウイルス接種前に3時間細胞に添加した場合、ウイルスと3時間直接接触させた場合および重層剤に添加して感染細胞に作用させた場合について観察した。供試したハーブのうち *G. oppositifolis*, *H. crepitans*, *M. charantina* の3種類を除く15種類がIHNVおよびOMVに対し90～100%以上のプラーク減少率を示し、その作用は直接的であった。IPNVに対しては *O. siamensis* および *P. acidus* が抽出液を重層剤に添加した場合に100%のプラーク減少率を示した。CHSE-214細胞に対する細胞毒性は1.2～11 mg/mlと低かった。18種のハーブを比較検討し、最も強い抗ウイルス効果を示すハーブとして *C. nutans* を選出した。

第2章では上記18種の中から *C. inophyllum*, *Clinacanthus* sp., *G. oppositifolis*, *H. crepitans*, *O. siamensis* を除いた13種に新たに *Andrographis paniculata*, *Elicpta alba*, *P. pulcher* の3種を加えた計16種のハーブを対象にハイブリッドキョウフィッシュから分離した *Aeromonas hydrophila* およびシーバスから分離した *Streptococcus* sp.、ウシエビから分離した *Vibrio parahaemolyticus* 各1株と *V. haevey* 9株を対象にハーブ抽出液含有平板を用いて抗菌効果の観察を行った。*O. sanctum* (red and white), *C. nutans*, *P. acidus*, *T. crispa* を除く11種のハーブ抽出液が抗菌効果を示し、*P. guajava* および *M. charantia* に *V. haevey* および *V. parahaemolyticus* に対する強い抗菌活性が認められた。供試した4種の細菌に対する最小抗菌濃度は *P. guajava* で0.63mg/ml、*M. charantia* で1.25mg/mlであった。*P. guajava* 抽出液をセファデックス LH-20により分画し、得られた抗菌画分はH-NMRおよび¹³C-MNRによる分析からタンニンと同定された。

第3章では第1章で強い抗ウイルス効果を示した *C. nutans* のウシエビのイエローヘッド病原ラドウイルス(YHV)に対する *in vivo* での抗ウイルス効果を検討した。体重15～20gのウシエビ15尾を1群とし、ペレットにハーブ抽出液を0.1, 1.0, 10 g/Kgに添加し、7日間毎日2回給餌した。7日後にYHV感染病エビの鰓1gのホモジネートを10 l水槽に添加し、28.5～30 Cで3時間

浸漬攻撃し、以後 14 日間観察した。累積死亡率はコントロール群が 75.5%、0.1g/Kg 投与群が 42.2%、1 g/Kg 投与群 33.3%、10g/Kg 投与群 68.9%であり、最も高い効果の認められたのはペレット 1 Kg 当たり 1g の *C. nutans* 抽出液を添加した餌料を給餌した群であった。さらに 10 l タンクに 10 μ g/ml となるようにハーブ抽出液を加えた水槽で、体重 10 ~ 15g のウシエビ 6 尾を、9 日および 1 時間飼育後に上記と同様の攻撃を行った。累積死亡率はコントロール群で 100 %、9 日間飼育群で 41.7 %、1 時間のみの群で 27.8%であり、強い抗ウイルス効果が観察された。

第 4 章では第 2 章で選抜した強い抗菌効果を示した *P. guajava* のハイブリッドキャットフィッシュに対す抗菌効果を *in vivo* で観察した。平均魚体重 35g のハイブリッドキャットフィッシュ 10 尾にハーブ抽出液を 1.0g/Kg 含むペレットを毎日 2 回 7 日間給餌した。7 日後に *A. hydrophila* を筋肉内に 1.2×10^9 CFU/0.1 ml 宛注射し、40 l 水槽を用い 27.5 ~ 29 C で 14 日間観察した。累積死亡率はコントロール群で 80%、1.0 g/Kg 群で 0%であった。潰瘍患部は 3 日目に快復傾向を示し、10 日後には完治した。

ウシエビの場合、体重 12.6 ~ 16.9g のエビを 40 l 水槽に 18 尾収容し *P. guajava* 抽出液を 0.5g/Kg と 5.0g/Kg 添加した餌料を毎日 2 回 7 日間給餌し、28 ~ 31C で飼育した。この間 1、3、7 日目に *V. harvey* を 1.4×10^{10} CFU/0.2 ml 宛筋肉内に注射し、30 分後に第 3 頭脚のリンパ節から体液を採取し、*V. harvey* の生菌数を測定し、コントロール群の生菌数との比較から排菌率を求めた。給餌 1 日目の排菌率はコントロール群を 0% として、0.5g 群 7.9%、5.0g 群 2.3%であった。対照として設定した oxytetracycline (OTC) 投与群は 4.9%であった。3 日目の排菌率は 0.5g 群 58.7%、5.0 g 群 50.7%、OTC 群 53.6% であった。7 日目では 0.5g 群 66.9%、5.0g 群 60.9%、OTC 群 69.0%で、*P. guajava* は OTC と同程度の効果を示した。

第 5 章では *P. guajava* 抽出液を対象にハイブリッドキャットフィッシュの *A. hydrophila* に対する免疫応答とウシエビの *E. coli* に対する免疫応答を検討すると共に、*C. nutans* 抽出液の IHNV に対する直接的影響の有無を観察した。

ハイブリッドキャットフィッシュに *P. guajava* 抽出液をペレットに 5.0g と 10.0g/Kg 添加し、30 日間飼育後、ホルマリン不活化 *A. hydrophila* で免疫した。10, 20, 30 日後

に採血し、凝集抗体価と赤血球数、白血球数を測定した。10日目の抗体価はコントロール群で 2^{36} 、5.0g 給餌群 2^{68} 、10g 給餌群で 2^{74} と測定された。20日目にはそれぞれ 2^{99} 、 2^{68} 、 2^{70} 、30日目に 2^{36} 、 2^{66} 、 2^{76} となった。白血球数に変化は見られなかったが、赤血球数は20日後から約2倍に増加した。

最後に *C. mutans* 抽出液の IHNV に対する直接的影響の有無を観察した。ウイルス液と抽出液を3時間作用させたが、構造蛋白泳動像に変化は認められず、RT-PCRの結果にも影響は認められなかった。ただ抗 *C. mutans* ウサギ血清と抗 IHNV ウサギ血清との間に拮抗作用が認められたことから、*C. mutans* はウイルス表面の抗体結合部位へ作用するものと考えられた。

以上の結果から、タイ国伝統ハーブは魚介類の疾病対策に応用可能であることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 絵 面 良 男
副 査 教 授 猪 上 徳 雄
副 査 教 授 吉 水 守
副 査 助 教 授 田 島 研 一

学位論文題名

Studies on the antiviral and antibacterial activity of Thai traditional herbs and application to prevent the viral and bacterial diseases in aquatic animals

(タイ国伝統ハーブの抗ウイルスおよび抗菌活性と水棲生物のウイルスおよび細菌による疾病防除への応用に関する研究)

タイ国において主要産業にまで発展した魚介類の養殖業は各種の疾病被害の増大により岐路に立たされている。しかし、その有効な対策は未確立のままである。本論文はタイに古くから伝わるハーブに着目し、魚介類の疾病防除・治療への応用について検討したものであり、特に評価される成果は以下のとおりである。

1. タイ国伝統ハーブ *Cassia alata*, *Calophyllum inophyllum*, *Clinacanthus* sp., *C. nutans*, *Glinus oppositifolis*, *Hura crepitans*, *Momordica charantia*, *Ocimum sanctum* (red and white), *Orchocarpus siamensis*, *Phyllanthus acidus*, *P. amarus*, *P. debilis*, *P. reticulatus*, *P. urinaria*, *Psidium guajava*, *Tinospora cordifolis*, *T. crispa* の計 18 種についてエタノール抽出液を作製し、抗ウイルス効果のスクリーニング法が確立されている 3 種のサケ科魚類の病原ウイルス；ラブドウイルスの伝染性造血器壊死症ウイルス (IHNV)、ビルナウイルスの伝染性腭臓壊死症ウイルス (IPNV) およびサケ科魚類のヘルペスウイルス 2 型 (SaHV-2; OMV) に対する抗ウイルス効果を、CHSE-214 細胞を用いたプラーク減少法により観察し、同時にハーブ抽出液の CHSE-214 細胞に対する細胞毒性値を検討した。供試したハーブのうち *G. oppositifolis*, *H. crepitans*, *M. charantina* の 3 種類を除く 15 種類が IHNV および OMV に対し 90 ~

100% 以上のプラーク減少率を示し、その作用が直接的であることを明らかにした。IPNV に対しては *O. siamensis* および *P. acidus* 抽出液を重層剤に添加した場合、100%のプラーク減少率を示すことを明らかにした。CHSE-214 細胞に対する細胞毒性は 1.2 ~ 11mg/ml と低く、18 種のハーブを比較検討し、最も強い抗ウイルス効果を示すハーブとして *C. nutans* を選出し得た。

2. 上記 18 種の中から *C. inophyllum*, *Clinacanthus* sp., *G. oppositifolis*, *H. crepitan*, *O. siamensis* を除いた 13 種に *Andrographis paniculata*, *Elicpta alba*, *P. pulcher* の 3 種を加えた計 16 種のハーブを対象にハイブリッドキャットフィッシュから分離した *Aeromonas hydrophila* およびシーバスから分離した *Streptococcus* sp., ウシエビから分離した *Vibrio parahaemolyticus* 各 1 株と *V. haevey* 9 株を対象に抗菌効果の観察を行った。*O. sanctum* (red and white), *C. nutans*, *P. acidus*, *T. crispa* を除く 11 種のハーブ抽出液が抗菌効果を示し、特に *P. guajava* および *M. charantia* が *V. haevey* および *V. parahaemolyticus* に強い抗菌活性を示すことを明らかにした。最小抗菌濃度は *P.guajava* で 0.63mg/ml、*M.charantia* で 1.25mg/ml であり、*P.guajava* 抽出液の抗菌作用の主成分がタンニンであることを明らかにした。

3. 強い抗ウイルス効果を示した *C. nutans* のウシエビのイエローヘッド病原因ラブドウイルス (YHV) に対する *in vivo* での抗ウイルス効果を検討した。体重 15 ~ 20g のウシエビを対象に、ペレットにハーブ抽出液を 0.1, 1.0, 10g/Kg に添加して 7 日間毎日 2 回給餌した。7 日後に YHV 感染病エビの鰓ホモジネートを添加して 3 時間浸漬攻撃し、以後 14 日間観察した。累積死亡率はコントロール群が 75.5%、0.1g/Kg 投与群 42.2%、1 g/Kg 投与群 33.3%、10g/Kg 投与群 68.9%となり、ペレット 1 Kg 当たり 1g の *C. nutans* 抽出液を添加した餌料を給餌した場合、高い効果が認められることを明らかにした。さらに 10 l タンクに 10 μ g/ml となるようにハーブ抽出液を加えた水槽で、体重 10 ~ 15g のウシエビを、9 日および 1 時間飼育後に上記と同様の攻撃を行ったところ、累積死亡率はコントロール群で 100 %、9 日間飼育群で 41.7 %、1 時間のみの群で 27.8%となり、強い抗ウイルス効果が観察されることを明らかにした。

4. 強い抗菌効果を示した *P. guajava* のハイブリッドキャットフィッシュに対す抗菌効果を *in vivo* で観察した。平均魚体重 35g のハイブリッドキャットフィッシュにハーブ抽出液を 1.0 g/Kg 含むペレットを毎日 2 回 7 日間給餌し、7 日後に *A. hydrophila* を筋肉内に 1.2×10^9 CFU/ 0.1 ml 宛注射して 40 l 水槽を用い 27.5 ~ 29 C で 14 日間観察

した。累積死亡率はコントロール群で 80%であったが、1.0g/Kg 群では 0%であり、潰瘍患部も 3 日目に快復傾向を示し、10 日後には完治した。ウシエビの場合も、体重 12.6 ~ 16.9g のエビを 40 l 水槽に収容し *P.guajava* 抽出液を 0.5g/Kg と 5.0g/Kg 添加した餌料を毎日 2 回 7 日間給餌し、28 ~ 31°C で飼育した。この間 1、3、7 日目に *V.harvey* を 1.4×10^{10} CFU/0.2 ml 宛筋肉内に注射し、30 分後に第 3 頭脚のリンパ節から体液を採取し、*V.harvey* の生菌数を測定して排菌率を求めたところ、給餌 1 日目の排菌率はコントロール群を 0% とし、0.5g 群で 7.9%、5.0g 群 2.3%であった。対照として設定した oxytetracycline (OTC) 投与群は -4.9%であった。3 日目の排菌率は 0.5g 群 58.7%、5.0 g 群 50.7%、OTC 群 53.6%、7 日目では 0.5g 群 66.9%、5.0 g 群 60.9%、OTC 群でも 69.0 % と、*P.guajava* は OTC と同程度の排菌効果を示すことを明らかにした。

5. *P.guajava* 抽出液を 5.0g と 10.0g/Kg 添加した餌料を 30 日間給餌後、ホルマリン不活化 *A. hydrophila* で免疫し、ハイブリッドキャットフィッシュの *A. hydrophila* に対する免疫応答を観察した。*P.guajava* 抽出液を与えた場合、凝集抗体価の上昇と赤血球数の増加が観察され、*P.guajava* 抽出液が免疫応答を促進している可能性を示した。

以上の成果は魚介類疾病の防御・治療にハーブが有効であることを示唆しており、今後の水産増養殖の発展に大きく寄与するものであることから、審査員一同は申請者が博士(水産学)の学位を授与される十分な資格を有すると判定した。