

海藻の熱水抽出物がコイおよびブリに及ぼす感染防 御効果

藤木, 和浩
九州大学農学部水産化学教室

松山, 博子
九州大学農学部水産化学教室

矢野, 友紀
九州大学農学部水産化学教室

<https://doi.org/10.15017/23438>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 47 (1/2), pp.137-141, 1993-01. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：

海藻の熱水抽出物がコイおよび ブリに及ぼす感染防御効果

藤木 和 浩・松山 博子・矢野 友紀

九州大学農学部水産化学教室

(1992年7月31日 受理)

Effect of Hot-water Extracts from Marine Algae on Resistance of Carp and Yellowtail against Bacterial Infections

Kazuhiro FUJIKI, Hiroko MATSUYAMA and Tomoki YANO

Laboratory of Fisheries Chemistry, Faculty of Agriculture,
Kyushu University 46-04, Fukuoka 812

緒 言

著者らは先に、抗腫瘍物質として知られる多糖類(レンチナン, シゾフィラン, スクレログルカン)をコイ(*Cyprinus carpio*)に投与すると、細菌感染に対する抵抗力が高まることを明らかにした(Yano *et al.*, 1989, 1991). その後, Robertsen *et al.* (1990)は酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)由来の多糖類を大西洋サケ(*Salmo salar*)に投与したところ、複数の魚病細菌に対する抵抗力が高まったと報告している。

近年、ある種の海藻が抗腫瘍物質を含有することが次第に明らかになってきた。Yamamoto *et al.* (1974)はホンダワラ属とコンブ属の海藻の熱水抽出物をマウスに投与すると、移植したSarcoma-180の増殖が阻害されることを見いだした。また、Noda *et al.* (1989)は供試した56種の海藻のうち、16種がマウスのエールリッヒ腫瘍の発育を抑制したと報告している。著者らは海藻が多種多様な多糖類を含むことから、海藻の中にも魚類の免疫力を増強させる物質が含まれる可能性が高いと考え、58種の海藻の熱水抽出物をコイおよびブリ(*Seriola quinqueradiata*)に投与し、感染防御効果の有無を調べた。

なお、海藻の採集ならびに同定に当たって有益な御助言を頂いた九州大学農学部川口栄男助手に心から感謝申し上げる。

材料および方法

1. 供試魚

熊本県の養魚場から購入した体重22~30gのコイを60l水槽(水温22~23°C)に入れ、市販の配合飼料を与えながら1週間に上予備飼育した後に実験に供した。ブリは三菱油化㈱から提供を受けた体重58~96gの個体を、流水式120l水槽(海水温25~27°C)に入れ、モイストベレット(三菱油化)を与えながら2週間に上予備飼育した後に実験に供した。

2. 供試海藻

緑藻5種、褐藻33種、紅藻20種の計58種の海藻を実験に用いた。このうち、*Ecklonia maxima*, *Laminaria digitata*, *Ascophyllum nodosum* およびアサクサノリは三菱油化㈱から提供を受けた。また、チガイソ、スジメ、ガゴメ、ミツイシコンブおよびマコンブは北海道大学理学部の峯一郎氏から譲り受けた。スサビノリは熊本県八代海で1991年2月に採集し、その他の海藻は福岡県津屋崎町の海岸で1991年4月と同年7月(ワカメ、イバラノリ、ミツデソソ)に採集した。なお、ワカメは栄養葉部が時期的にすでに消滅していたので成実葉部のみを使用した。

3. 海藻熱水抽出物の調製

新鮮な海藻を水洗後、風乾し、2mm角以下の細片にした。この細片5gに脱イオン水250mlを加え、沸騰水中で3時間熱水抽出を行い、直ちにナイロンメッシュで濾過した。濾液を7,000rpmで20分間遠心し、上清を約50mlまで減圧濃縮後、その1mlを凍結乾燥

させ、熱水抽出物の重量を求めた。ついで、上記濃縮液を抽出物の最終濃度が50 mg/mlとなるよう生理食塩水で希釈し、 -20°C に保存した。

4. 供試菌株

本実験に用いた *Edwardsiella tarda* NG8104 はヒラメ病魚から分離された菌で、宮崎大学農学部北尾忠利教授から分与されたものである。また、連鎖球菌 *Streptococcus* sp. M8906 はブリ病魚から分離された菌で、三菱油化㈱から提供を受けた。これらの菌は魚体通過によって病原性を高めた後、5%ブドウ糖を含む3%スキムミルク (pH 7.4) に懸濁させて -80°C に保存した。なお、接種菌液の調製は以下の要領で行った。

1) *E. tarda* の凍結保存菌体をハートインヒュージョン (HI) 寒天培地 (日水製薬) 上で 36°C 、17時間培養後、滅菌生理食塩水に 3×10^8 CFU/mlとなるよう懸濁させた。2) *Streptococcus* sp. の凍結保存菌体を1.5% NaClを含むブレインハートインヒュージョン (BHI) 寒天培地 (日水製薬) 上で 23°C 、17時間培養後、滅菌生理食塩水に 1×10^8 CFU/mlとなるよう懸濁させた。

5. 菌攻撃試験

海藻の熱水抽出物を5尾のコイの腹腔内に体重1 kg当たり50 mgの割合で、2日おきに2回投与し、最終投与から3日目に *E. tarda* を腹腔内 (3×10^8 CFU/100g) に接種した。同様にして、海藻抽出物を10尾のブリの腹腔内に投与し、最終投与から3日目に *Streptococcus* sp. を腹腔内 (1×10^8 CFU/100 g) に接種した。なお、対照区には熱水抽出物の代わりに生理食塩水を投与した。

菌接種後、毎日各試験区の生残率を記録し、限定平均生存日数 (Kaplan and Meier, 1958) を算出した。なお、有意差の検定には Cochran-Cox の t-検定を用い、 $P < 0.005$ のとき有意差ありとした。

結 果

1. *E. tarda* 攻撃後のコイの生残率

海藻 (緑藻5種、褐藻33種、紅藻20種) の熱水抽出物を2日おきに2回コイの腹腔内に投与し、最終投与から3日目に *E. tarda* で攻撃試験を行い、攻撃開始から7日目の生残率と限定平均生存日数を求めた (表1~3)。

緑藻の中では、ヒトエグサの抽出物を投与したコイの生残率が60%と最も高かったが、その平均生存日数は対照区と比べて有意差はなかった (表1)。褐藻では、供試した33種中6種で投与区の平均生存日数が対照

区に比べて有意に高かった (表2)。すなわち、イワヒゲ、ワカメ、ミツイシコンブ、マコンブ、アキヨレモク、フシスジモクの抽出物を投与したコイの生残率は80~100%と高く、平均生存日数は対照区が3.8日であったのに対して、これらの投与区では6.4~7.0日であった。一方、紅藻では、供試した20種のうち8種の海藻の熱水抽出物に感染防御効果が認められた (表3)。特にイソウメモドキ、ハナフノリ、フクロフノリ、ツノマタ、イバラノリの抽出物を投与したコイの生残率はいずれも100%であった。

2. *Streptococcus* sp. 攻撃後のブリ生残率

コイに対して感染防御効果を示した14種の海藻のうち、採集の容易な8種の海藻 (褐藻4種、紅藻4種) の熱水抽出物を2日おきに2回ブリの腹腔内 (50 mg/kg) に投与し、最終投与から3日目に *Streptococcus* sp. を用いて攻撃試験を行った (表4)。表から明らかなように、*Streptococcus* sp. 接種後7日目の対照区の生残率が10~20%であったのに対し、投与区の生残率は60~100%であった。また、平均生存日数は対照区が4.4日であったのに対し、投与区は6.5~7.0日と有意に高かった。

考 察

Yano *et al.* (1989, 1991) と Matsuyama *et al.* (1992) は真菌 (*Lentinus edodes*, *Schizophyllum commune*, *Sclerotium gluconicum*) 由来の β -1, 3-グルカンがコイおよびブリの細菌感染 (*E. tarda*, *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus* sp.) に対する抵抗力を高めることを明らかにし、この抵抗力の増大は食細胞、補体、リゾチームなどの非特異的免疫機構の活性化に基づくことを実証した。また、Robertson *et al.* (1990) は酵母 (*S. cerevisiae*) から分離した不溶性の β -1, 3-グルカン (M-グルカン) を投与した大西洋サケでは、3種の異なる病原菌 (*Yersinia ruckeri*, *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas salmonicida*) に対して抵抗力が高まることを明らかにし、この効果はおそらく非特異的免疫機構の活性化に基づくものであろうと述べている。

本実験で著者らは、供試した58種の海藻のうち14種の海藻の熱水抽出物がコイの *E. tarda* 感染に対して防御効果を示すことを見だし、このうち8種はブリの連鎖球菌感染に対しても効果のあることを明らかにした。著者らは、海藻の熱水抽出物は *in vitro* では殺菌ないし静菌効果を示さないことを確かめており (未発表)、また、本実験において熱水抽出物投与から感染防御効果発現までの期間がきわめて短かったこと

表1 緑藻の熱水抽出物が *E. tarda* 接種後のコイの生残率に及ぼす影響

科	種	生残率 (%)	限定平均生存日数 (mean±SE)	
ひとえぐさ科	ヒトエグサ	<i>Monostroma nitidum</i>	60	5.2±1.0
かわのり科	ウスバアオノリ	<i>Enteromorpha linza</i>	20	2.8±0.8
	アナアオサ	<i>Ulva pertusa</i>	20	4.4±0.6
みる科	ミル	<i>Codium fragile</i>	40	4.0±1.1
しおぐさ科	シオグサ sp.	<i>Cladophora</i> sp.	0	2.2±0.1
対照区			20±0	4.0±0.8

表2 褐藻の熱水抽出物が *E. tarda* 接種後のコイの生残率に及ぼす影響

科	種	生残率 (%)	限定平均生存日数 (mean±SE)	
いしげ科	イシゲ	<i>Ishige okamurae</i>	40	4.6±0.9
	イロロ	<i>I. sinicola</i>	20	3.6±0.7
ねばりも科	シワノカワ	<i>Petrospongia rugosum</i>	20	4.2±0.8
かやものり科	フクロノリ	<i>Colpomenia sinuosa</i>	80	6.0±0.9
	ハバノリ	<i>Enderachne binghamiae</i>	60	5.4±0.8
こもんぶくろ科	カヤモノリ	<i>Scytosiphon lomentaria</i>	40	4.4±0.9
	イワヒゲ	<i>Myelophycus simplex</i>	80	6.8±0.2*
はばもどき科	ハバモドキ	<i>Punctaria latifolia</i>	40	5.0±0.7
ちがいそ科	チガイソ	<i>Alaria crassifolia</i>	0	2.6±0.3
	ワカメ	<i>Undaria pinnatifida</i>	100	7.0±0.0*
こんぶ科	スジメ	<i>Costaria costata</i>	0	4.0±0.6
	クロメ	<i>Ecklonia kurome</i>	40	4.8±0.7
		<i>E. maxima</i>	20	5.0±0.4
	アラメ	<i>Eisenia bicyclis</i>	60	5.2±0.6
	ガゴメ	<i>Kjellmaniella crassifolia</i>	20	4.2±0.6
	ミツイシコンブ	<i>Laminaria angustata</i>	80	6.4±0.5*
	マコンブ	<i>L. japonica</i>	80	6.4±0.5*
		<i>L. digitata</i>	40	6.0±0.6
あみじぐさ科	ウミウチワ	<i>Padina arborescens</i>	60	5.4±0.7
うがのもく科	ジョロモク	<i>Myagropsis myagroides</i>	80	6.2±0.7
ひばまた科		<i>Ascophyllum nodosum</i>	40	4.6±0.9
	ほんだわら科	ヒジキ	<i>Hizikia fusiformis</i>	60
	アキヨレモク	<i>Sargassum autumnale</i>	100	7.0±0.0*
	フシスジモク	<i>S. confusum</i>	80	6.4±0.5*
	アカモク	<i>S. horneri</i>	80	6.0±0.9
	トゲモク	<i>S. micracanthum</i>	40	4.2±0.9
	タマハハキモク	<i>S. muticum</i>	20	4.0±0.7
	ナラサモ	<i>S. nigrifolium</i>	0	4.2±0.1
	ヤツマタモク	<i>S. patens</i>	20	3.2±0.8
	マメタワラ	<i>S. piluliferum</i>	40	4.4±0.9
	ヤナギモク	<i>S. ringgoldianum</i>	60	5.8±0.7
		ssp. <i>coreanum</i>		
	ヨレモク	<i>S. siliquastrum</i>	60	5.2±1.0
	ウミトラノオ	<i>S. thunbergii</i>	60	5.2±1.0
対照区			20±0	3.8±0.8

* 対照区に対して有意差 ($P < 0.005$) あり。

表3 紅藻の熱水抽出物が *E. tarda* 接種後のコイの生残率に及ぼす影響

科	種	生残率 (%)	限定平均生存日数 (mean±SE)	
うしけのり科	オニアマノリ	<i>Porphyra dentata</i>	80	6.4±0.5*
	ベンデアマノリ	<i>P. ishigecola</i>	60	5.8±0.5
	アサクサノリ	<i>P. tenera</i>	60	5.8±0.9
	スサビノリ	<i>P. yezoensis</i>	80	6.4±0.5*
さんごも科	ピリヒバ	<i>Corallina pilulifera</i>	0	2.4±0.2
りゅうもんそう科	イソウメモドキ	<i>Hyalosiphonia caespitosa</i>	100	7.0±0.0*
	ふのり科	ハナフノリ	<i>Gloiopeltis complanata</i>	100
むかでのり科	フクロフノリ	<i>G. furcata</i>	100	7.0±0.0*
	マツノリ	<i>Carpopeltis affinis</i>	80	6.4±0.5
	ムカデノリ	<i>Grateloupia filicina</i>	20	4.2±0.6
すぎのり科	ツルツル	<i>G. turuturu</i>	40	5.4±0.5
	ツノマタ	<i>Chondrus ocellatus</i>	100	7.0±0.0*
おごのり科	オゴノリ	<i>Gracilaria asiatica</i>	0	2.4±0.4
	カバノリ	<i>G. textorii</i>	20	3.6±0.8
いばらのり科	イバラノリ	<i>Hypnea charoides</i>	100	7.0±0.0*
ゆかり科	ユカリ	<i>Plocamium telfairiae</i>	0	3.0±0.3
まさごしぱり科	タオヤギソウ	<i>Chrysymenia wrightii</i>	40	5.6±0.5
いぎす科	アミクサ	<i>Ceramium boydenii</i>	60	5.4±0.7
ふじまつも科	ミツデソゾ	<i>Laurencia okamurae</i>	20	5.4±0.5
	シヨウジヨウケノリ	<i>Polysiphonia senticulosa</i>	60	4.2±0.8
対照区			20±0	3.8±0.8

* 対照区に対して有意差 ($P < 0.005$) あり。表4 海藻の熱水抽出物が *Streptococcus* sp. 接種後のブリの生残率に及ぼす影響

綱	種	生残率 (%)	限定平均生存日数 (mean±SE)	
褐藻	イワヒゲ	<i>Myelophycus simplex</i>	100	7.0±0.0*
	ワカメ	<i>Undaria pinnatifida</i>	90	7.0±0.0*
	マコンブ	<i>Laminaria japonica</i>	60	6.8±0.1*
	アキヨレモク	<i>Sargassum autumnale</i>	90	6.9±0.1*
紅藻	スサビノリ	<i>Porphyra yezoensis</i>	80	6.5±0.2*
	フクロフノリ	<i>Gloiopeltis furcata</i>	100	7.0±0.0*
	マツノリ	<i>Carpopeltis affinis</i>	70	6.6±0.2*
	イバラノリ	<i>Hypnea charoides</i>	80	7.0±0.0*
対照区			15±5	4.4±0.5*

* 対照区に対して有意差 ($P < 0.005$) あり。

から、熱水抽出物は魚類の非特異的免疫機構の活性化を通じて感染防御効果を発現したと考えられる。

海藻には多種多様の多糖類が含まれている。例えば、褐藻にはアルギン酸、フコイダン、ラミナランなどが含まれており、紅藻にはポルフィラン、カラゲナン、フノランなどのガラクトサン硫酸が含まれている。従って、いずれかの多糖類が感染防御効果を発揮した可能性が高い。仮に、多糖類が有効成分だとすると、同じ

科に属する海藻（例えばスジメとマコンブ、アキヨレモクとナラサモ）の感染防御効果の差異は、活性多糖類の含量の差か性質の違いによることになる。

著者らは今後、海藻から各種多糖類を単離し、それらの魚類に対する感染防御効果と魚類の非特異的免疫機構に及ぼす影響を明らかにしたいと考えている。

摘 要

海藻（緑藻5種、褐藻33種、紅藻20種）の熱水抽出物をコイ (*Cyprinus carpio*) に投与し、感染防御効果の有無を調べた。熱水抽出物をコイの腹腔内に体重1 kg 当り 50 mg の割合で2日おきに2回投与し、最終投与から3日目に *Edwardsiella tarda* を腹腔内 (3×10^8 CFU/100 g) に接種し、菌攻撃から7日目の生残率と限定平均生存日数を求めた。

供試した海藻のうち、6種の褐藻と8種の紅藻の抽出物を投与したコイの生残率は、対照区が20%であったのに対して80~100%と高く、また、平均生存日数も対照区に比べて有意に長くなった。一方、緑藻の熱水抽出物には効果が認められなかった。

次に、コイに対して効果のあった8種の海藻（イワヒゲ、ワカメ、マコンブ、アキヨレモク、スサビノリ、フクロフノリ、マツノリ、イバラノリ）の熱水抽出物をコイと同様にしてブリに投与し、連鎖球菌 (*Streptococcus* sp., 1×10^6 CFU/100 g) で攻撃試験を行った結果、これらの抽出物はブリに対しても効果があることがわかった。

文 献

Kaplan E. L. and P. Meier 1958 Nonparametric estimation from incomplete observations. *J.*

- Am. Stat. Assoc.*, 53: 457-481
- Matsuyama H., R. E. P. Mangindaan and T. Yano 1992 Protective effect of schizophyllan and scleroglucan against *Streptococcus* sp. infection in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Aquaculture*, 101: 197-203
- Noda H., H. Amano, K. Arashima, S. Hashimoto and K. Nisizawa 1989 Studies on the antitumor activity of marine algae. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55: 1259-1264
- Robertsen B., G. Rørdstad, R. Engstad and J. Raa 1990 Enhancement of nonspecific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *J. Fish Dis.*, 13: 391-400
- Yamamoto I., T. Nagumo, K. Yagi, H. Tominaga and M. Aoki 1974 Antitumor effect of seaweeds I. Antitumor effect of extracts from Sargassum and Laminaria. *Japan. J. Exp. Med.*, 44: 543-546
- Yano T., R. E. P. Mangindaan and H. Matsuyama 1989 Enhancement of the resistance of carp *Cyprinus carpio* to experimental *Edwardsiella tarda* infection, by some β -1, 3-glucans. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55: 1815-1819
- Yano T., H. Matsuyama and R. E. P. Mangindaan 1991 Polysaccharide-induced protection of carp, *Cyprinus carpio* L., against bacterial infection. *J. Fish Dis.*, 14: 577-582

Summary

Hot-water extracts from 58 species of marine algae (5 green, 33 brown and 20 red algae) were evaluated for their ability to enhance the resistance of carp (*Cyprinus carpio*) against *Edwardsiella tarda* infection. The extract was injected intraperitoneally to carp at a dose of 50 mg/kg on days 1 and 4. On day 7 the fish were challenged with *E. tarda* (3×10^8 CFU/100g) and the survivors were recorded daily for 7 days. Among the algae tested, the extracts from 6 brown and 8 red algae significantly prolonged the survival time of fish, but those from green algae were not effective. In addition, the extracts from 4 brown algae (*Myelophycus simplex*, *Undaria pinnatifida*, *Laminaria japonica*, *Sargassum autumnale*) and 4 red algae (*Porphyra yezoensis*, *Glotopeltis furcata*, *Carpopeltis affinis*, *Hypnea charoides*), which were effective to carp, also increased the resistance of yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) against *Streptococcus* sp. infection.