

フェバンテルのトラフグに寄生するエラムシHeterobothrium okamotoiに対する駆虫効果

誌名	熊本県水産研究センター研究報告
ISSN	09181210
著者名	木村,武志 鮫島,守 野村,昌功 森田,淳 溝口,秀樹
発行元	熊本県水産研究センター
巻/号	7号
掲載ページ	p. 25-30
発行年月	2007年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



フェバンテルのトラフグに寄生するエラムシ *Heterobothrium okamotoi* に対する駆虫効果

木村武志¹、鮫島 守²、野村昌功²、森田 淳³、溝口秀樹³、
石原 守³

Efficacy of Orally Administrated Febantel on the Monogenean
Heterobothrium okamotoi Infected Tiger Puffer *Takifugu*
rubripes.

Takeshi Kimura¹, Mamoru Sameshima², Yoshinori Nomura,
Jun Morita³, Hideki Mizoguchi³ and Mamoru Ishihara³,

キーワード：ヘテロボツリウム、トラフグ、フェバンテル、

単生類、ディクリドフォラ科のヘテロボツリウム・オカモトイ（以下「エラムシ」という。）はトラフグの寄生虫で、鰓や鰓腔壁に寄生し吸血する。大量に寄生した場合は重篤な貧血症を起こし、また成虫の寄生部位から海水が侵入することで組織の壊死を起こして腐敗菌が繁殖し、死に至ったりすることからトラフグ養殖においては非常に重要な疾病の1つである(Okamoto,1963)。

この寄生虫は、種苗生産施設で飼育されているトラフグ稚魚からは観察されず、養殖場に移動した後に多くは感染すると考えられている。エラムシは長いフィラメントを伴った卵を産卵し、網生け簀に絡まった後にふ化し、その多くが再感染の原因になっている(Ogawa and Inouye 1997)。

トラフグ養殖業者はこのエラムシ駆除のためにホルマリンを用いていたが、日本ではホルマリンのように水産用医薬品として認可されていない化学物質

を治療薬として用いることは禁止されており、県ではホルマリンの使用禁止に向け厳重な対策を行った。また、養殖業者からは新たな効果的なエラムシ駆除薬の開発が強く望まれた。そこで水産研究センターではホルマリンを用いないトラフグの持続的養殖を目指して、新たなエラムシ駆除薬の開発を明治製菓株式会社と1998年から開始した。

まず約100種類の薬の中から新たな薬剤として、フェンベンダゾールのプロドラッグで、ベンズイミダゾール系の薬剤であり、畜産分野では広く用いられているフェバンテルを選出した(Wollweber *et al.*, 1978)。ベンズイミダゾールは寄生虫の体内に取り込まれ、寄生虫の消化管の上皮細胞における微少管構造(チューブリン)に特異的に結合し、これを変性させ、寄生虫のグルコースの吸収能力を失せ、体内に蓄積したグリコーゲン消費しつくさせて運動麻痺を起こさせることで駆虫効果を発揮する(Lacey,

1：水産振興課、2：玉名地域振興局農林水産課、3：明治製菓株式会社

1990)。

この報告では、すでに畜産動物で報告があるように(Baert *et al.*, 1993 ; Debackere *et al.*, 1993 ; BenZvi *et al.*, 1996)トラフグにおいても、フェバンテルがフェンベンダゾールへ移行すること、また、経口投与により血中に移行することを健康なトラフグを用いて確認するとともに、人為及び自然感染によってエラムシの寄生したトラフグを用いて、フェバンテルのエラムシに対する駆虫効果について検討した。

材料及び方法

試験 1

フェバンテルを経口投与したトラフグの血中のフェバンテル及びフェンベンダゾール濃度の測定

供試魚

水産研究センターで飼育中のヘテロボツリウムに非感染の健康なトラフグ 1 歳魚 63 尾 (平均魚体重 215 g) を用いた。供試魚は 2 トンの飼育水槽で濾過海水を 1 分間に 23 リットルの量で換水し、通気をしながら約 23.1°C の水温で飼育した。

薬 品

明治製菓が調整したフェバンテルを 25% 含む試験用薬剤を用いた。

餌 料

試験に用いた餌料はアミ、イカナゴ、アジ及び配合飼料を用いてペレッターによりペレット状に形成したモイストペレット (MP) を用い、投薬の際には、薬剤を混合して作成した。投薬開始まで魚体重当たり 1% の給餌率で薬剤を含まない餌料を与えた。

薬剤投与濃度

投与濃度は魚体重当たり 0.8% の給餌率で、魚体重 1kg 当たりフェバンテル濃度で 25mg になるように調整した MP を 1 回投与した。

サンプリングと分析

サンプリングは経口投与後の 4,8,12,18,24,36,48 及び 72 時間後にそれぞれ 5 尾ずつトラフグの肝静脈から個別にヘパリン処理を行った注射器で採血し、遠心分離により血漿に分離した後、-80°C で分析するまで保存した。

血漿中のフェバンテルとフェンベンダゾール量及び変異体の分析は高速液体クロマトグラフィーで行った。

フェバンテルの分析方法は、試料 0.5 g からアセトニトリルで抽出し、n-ヘキサンによる脱脂及び Mega B E-C18 によるクリーンアップを行った後、最終液量を 0.5 mL とし、高速液体クロマトグラフ

法で測定し、フェバンテル濃度を求めた。高速液体クロマトグラフの操作条件は、以下に従って行った。HPLC への注入量は 10 μ L で、カラムは Wakosil 5C18 (ϕ 4.6 mm \times 250 mm) を 40°C で用いた。移動相はアセトニトリルと水を 6 : 4 で混合して用い、1 分間に 1.0 mL の流量で行った。HPLC の検出は測定波長が 280 nm を用いた。

フェンベンダゾール及び変異体については、フェンベンダゾール及びオクスフェンダゾールを酸化してフェンベンダゾールスルホンとして定量した。分析方法は、試料 0.5 g からアセトニトリル抽出、n-ヘキサンによる脱脂及び Mega BE-C18 によるクリーンアップにつづき、硫酸及び過マンガン酸カリウムによりフェンベンダゾール及びフェンベンダゾールスルホキシドを酸化しフェンベンダゾールスルホンに誘導して、一括物をクロロホルムで抽出し、最終液量を 1.0 mL とし、高速液体クロマトグラフ法で測定し、フェンベンダゾールスルホン濃度を求めた。

高速液体クロマトグラフの操作条件は、以下に従って行った。HPLC への注入量は 10 μ L で、カラムは Asahipak GS-320HQ (ϕ 7.6 mm \times 300 mm) を室温 (25°C) で用いた。移動相はメタノール、アセトニトリル及びエタノールを 6 : 4 : 2 で混合して用い、1 分間に 0.6 mL の流量で行った。HPLC の検出は励起波長は 254 nm、蛍光波長が 415 nm を用いた。

フェバンテルとフェンベンダゾールスルフォンの濃度は標準品を用いた検量線から算出した。また、今回の分析の検出限界はフェバンテル及びフェンベンダゾールスルフォンともに 0.05 μ g/g であった。得られた分析結果から、トラフグ体内におけるフェバンテルの動態を検討するために、最高血中濃度 (C_{max})、最高血中濃度到達時間 (T_{max})、薬物血中濃度半減期 (T_{1/2}) について経過時間毎のフェバンテル及びフェンベンダゾールの血中濃度の平均値を用いて算出した。また血中濃度下面積 (AUC) についても台形法により求めた。

試験 2 人工及び自然感染でエラムシが寄生したトラフグを用いたフェバンテルの駆虫効果試験

供試魚

試験には水産研究センターで飼育されていた 1 歳のトラフグを用いた。

人為感染魚を用いた試験には平均体重が 108g のエラムシ無感染のトラフグ 85 尾を用い、自然感染魚を用いた試験には平均体重 254g のトラフグ 25 尾を

用いた。

薬 剤

薬剤は試験 1 と同様のものを用いた。

餌 料

餌料は試験 1 と同様のものを用いた。

エラムシ人為感染の方法

人為感染に用いたエラムシの卵は、水産研究センター内にある寄生虫が寄生した平均魚体重約 2.0 kg の 3 歳のトラフグ約 40 尾を飼育している 15 k l 水槽から採取した。水槽内の排水パイプやエアレーションのホースに絡んだ卵をピンセットでピーカに收容した後、フィルター濾過した海水で洗浄し、500 mL の培養フラスコに收容して 25°C で培養した。培養開始 5 日後にオンコミラキジウムへの孵化が始まり、これを感染源に用いた。

感染は人為感染用のトラフグを予備飼育している 2 t 水槽を用いて行った。流水を止め、エアレーションのみとした水槽内にオンコミラキジウムをトラフグ 1 尾当たり 251 個体になるように入れ感染させた (Chigasaki *et al.*, 2000)。

その後流水にして毎日モイストペレットを給餌しながら 10 日間飼育した。その後、供試魚は 500L の水槽 5 個に同数ずつ分槽して投薬を開始した。

寄生虫の計数方法

ヘテロボツリウム未成熟虫の計数は Anshary *et al.* (2001) の示した方法を基に、鮫島ら (未発表) が改変した次の方法に従って行った。まずトラフグの肝動脈を切り放血させ、鰓をバラバラに切りだし、両側で 6 枚の鰓を 10% の海水ホルマリン溶液に入れたサンプル瓶に收容した。そしてマグネチックスターラーで 10 分間、良く攪拌し、鰓から寄生虫を脱落させた。その後、プランクトン採集ネット (目合いが 20 μ m) の上に大きな目合いのネット (鰓を回収するように 1 mm 目合い) をかぶせた寄生虫採集用具の上に鰓と寄生虫の入ったホルマリン溶液を注いだ。大きな目合いのネットの上で切り出した鰓をフィルター濾過した海水を流しながら洗浄し、プランクトンネット内に寄生虫を回収した。さらにプランクトンネットを 3 回濾過海水で洗浄し、ネット内に採取した寄生虫はペトリ皿に移し、実態顕微鏡下で計数した。

人為感染魚試験においては未成熟虫のみを、自然感染魚試験においては、成虫も併せて計数した。成虫の計数は鰓を取り出す時に、鰓腔壁に寄生している成虫を 1 個体ずつ計数した。

経口投薬濃度

人為感染魚を用いた投薬試験はフェバンテルの 1

回の投薬濃度が魚体重 1kg 当たり 25mg、50mg、100mg になるように混合して作製した MP を 1 日 1 回、及び 50mg を 2 日間連続で 1 日 1 回投薬する 4 投薬区とし、フェバンテルを含まない MP を与える対照区の合わせて 5 試験区とした。

未成熟虫の寄生数は投薬 7 日後に各試験区から無作為に 8 尾ずつ取り出して計数した。

自然感染魚を用いた投薬試験はフェバンテルの 1 回当たりの投薬濃度が魚体重 1kg 当たり 12.5mg、25mg になるように混合して作製した MP を 1 日 1 回、5 日間連続して投薬する区及び 50mg を 1 日 1 回、3 日間連続して投薬する 3 投薬区とし、薬剤を含まない MP を与える対照区の合わせて 4 試験区とした。成虫及び未成熟虫の寄生数は投薬終了 3 日目にそれぞれの試験区から無作為に 8 尾ずつ取り上げて計数した。

人為感染及び自然感染試験とも、投薬終了後に対照区と各投薬試験区の寄生数からマンホイットニー U 検定により危険率 5% で統計的有意差を求め、駆虫率は次式により求めた。

$$\% \text{ efficacy} = [1 - (\text{Pa}/\text{Pb})] \cdot 100$$

Pa is the average number of worms detected after the drug administration and Pb is the number of worms detected in the controls.

結果及び考察

フェバンテル及びフェンベンダゾールを魚体重 1kg 当たり 25mg 1 回投与した場合の血中濃度を Table 1 に示した。フェバンテルの血中濃度のピークはいずれの供試魚においても投薬後 4 時間後で、8 時間後にはピークの 30% まで減少した。また、その後緩やかに減少した。フェンベンダゾール・スルフォンの血中濃度のピークはいずれの供試魚においても投薬後 12 時間後で、その後 72 時間後まで血漿中から検出された。これらの結果から Cmax はフェバンテルで 0.58 μ /g、フェンベンダゾール・スルフォンでは 10.28 μ /g、Tmax はフェバンテルで 4.0hr、フェンベンダゾール・スルフォンでは 12hr、T1/2 はフェバンテルで 6.94hr、フェンベンダゾールスルフォンでは 12.17hr、AUC はフェバンテルで 7.00 μ g/g、フェンベンダゾールスルフォンで 241.6hr. であった。フェバンテルとフェンベンダゾールスルフォンの経過時間ごとの濃度は、図 1 に示すように、0 時間から Tmax まで、Cmax を過ぎて徐々に減少するコンパートメントモデル曲線を示した。

Table 1. Plasma concentration of febantel and oxfendazole sulphone in cultured tiger puffers following oral administration of febantel at the dose of 25 mg/kg body weight

Fish Number	Concentration of febantel ($\mu\text{g/g}$)								
	Before administration (0)	Time after administration (h)							
		4	8	12	18	24	36	48	72
1	<0.05	1.5	0.35	0.18	0.09	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
2	<0.05	<0.05	0.25	0.24	0.10	0.07	<0.05	<0.05	<0.05
3	<0.05	0.36	0.07	0.20	0.08	0.07	<0.05	<0.05	<0.05
4	<0.05	0.41	<0.05	0.06	0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
5	<0.05	0.59	0.19	0.10	<0.05	0.07	<0.05	<0.05	<0.05
average	0*	0.58*	0.17*	0.16	0.07*	0.06*	0.05*	0.05*	0.05*
S.D.		0.55	0.14	0.07	0.02	0.01	0.00	0.00	0.00
Concentration of oxfendazole sulphone ($\mu\text{g/g}$)									
1	<0.05	13	11	8.8	5.3	7.1	1.5	0.58	0.24
2	<0.05	0.16	14	14	0.8	6.5	1.6	0.13	<0.05
3	<0.05	6.3	4.0	9.4	12	4.1	2.3	2.7	0.61
4	<0.05	7.5	0.8	13	4.6	5.6	2.2	0.45	0.48
5	<0.05	9.0	10.0	6.2	6.7	5.6	0.66	1.2	0.42
average	0*	7.2	8.0	10.3	5.9	5.8	1.7	1.0	0.36*
S.D.		4.7	5.4	3.2	4.1	1.1	0.66	1.0	0.22

*: Calculation values below the detection limit were regarded as = 0 $\mu\text{g/g}$ before the drug administration and 0.05 $\mu\text{g/g}$ after administration.

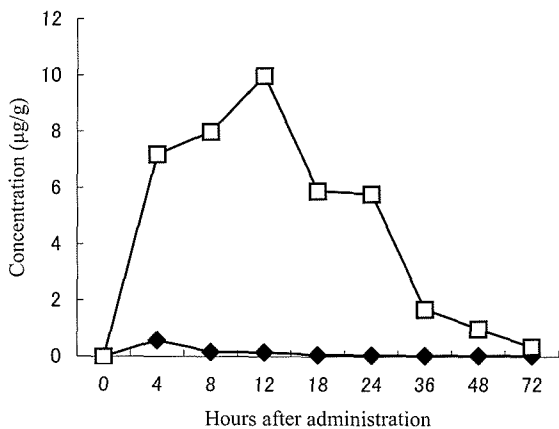


Fig. 1. The concentration-time profile of febantel and oxfendazole sulphone in the plasma after oral administration of febantel. The symbols \blacklozenge and \square represent febantel and oxfendazole sulphone, respectively.

これらの結果より、フェバンテル濃度はフェンペンダゾール・スルフォンの濃度より明らかに低いことや、フェバンテルの血中濃度のピークがフェンペンダゾール・スルフォンのピークより早い時間に達していることから、トラフグに経口投与されたフェバンテルはトラフグ体内で速やかにフェンペンダゾール及びその変異体に移行することを示した。

これは魚におけるフェバンテルの体内動態を示した最初のレポートであるが、これらの結果はすでに報告のある動物での試験結果に類似していた (Baert *et al.*, 1993; Debackere *et al.*, 1993; BenZvi *et al.*, 1996)。

人為感染魚を用いたヘテロボツリウムに対する薬効試験の結果は Table 2. に示すように、魚体重 1kg 当たり 25mg、50mg、100mg の 1 日投与では効果は得られなかった。しかし 50mg を 2 日間投薬した場合に未成熟虫の寄生数において、対照区と比較して統計的有意差が得られ 61.1% の駆虫率が得られた。

Table 2. Efficacy of febantel against immature *H. okamotoi* in experimentally infected tiger puffers (n = 8).

Experimental group	Immature worms	
	Average no. of worms	Removal rate (%)
Control	73.6 (± 20.0)	–
25 mg /kg / day	78.6 (± 22.6)	+6.8**
50 mg /kg / day	71.9 (± 22.9)	–2.4
100 mg /kg / day	83.0 (± 20.1)	+12.8
50 mg /kg / day for 2 days	28.6 (± 24.1)*	–61.1

*: significant difference ($p < 0.05$).

** : +, –: increase and decrease in %, respectively

自然感染魚を用いた試験では、魚体重 1kg 当たり 12.5mg、25mg 及び 50mg の投与区の成虫の駆虫率がそれぞれ 88%、96%、94% であり、未成熟虫の駆虫率はそれぞれ 97%、95%、97% であった。成虫及

Table 3. Efficacy of febantel against mature and immature *H. okamotoi* in naturally infected tiger puffers (n = 8).

Experimental group	Mature		Immature	
	Average no. of worms	Removal rate (%)	Average no. of worms	Removal rate (%)
Control	7.1 (± 8.1)	–	113.0 (± 101.6)	–
12.5 mg/kg/ day for 5 days	0.86 (± 2.3)*	88	3.3 (± 4.3)*	97.1
25 mg/kg/ day for 5 days	0.29 (± 0.8)*	96	5.9 (± 9.3)*	94.8
50 mg/kg/ day for 3 days	0.40 (± 1.1)*	94	3.3 (± 3.9)*	97.1

*: significant difference ($p < 0.05$).

び未成熟虫の寄生数についてはいずれも、対照区と比較して統計的有意差が得られた。

このように、フェバンテルは投与日数が長くなるほど、効果を示す傾向が伺われた。これは、フェバンテルが投与された動物体内で活性型のフェンベンダゾールに移行し、吸血された血液から寄生虫に吸収され、寄生虫のグリコーゲンの合成阻害や、細胞骨格を形成するチューブリンの合成を阻害することにより徐々に効果を現すためであり、フェンベンダゾールが、血中濃度の高さよりも一定濃度の維持がより効果的であるという薬剤特性を示した結果と考えられる。

ベンズイミダゾール系薬剤の魚の寄生虫に対する効果については、ニジマスのギロダクチルスの寄生に対してフェンベンダゾールやトリクラベンダゾールが薬浴による効果を持っていること (Tojo *et al.*, 1992)、経口投与剤として、トリクラベンダゾールやニトロスキヤネートが効果を持っていることがこれまで報告されている (Tojo and Santamarina 1998)。

また、本報告はフェバンテルの 12.5mg/kg・魚体重、25mg/kg・魚体重及び 50mg/kg・魚体重の3日または5日間連続経口投与がエラムシの未成熟虫のみならず成虫にも駆虫効果を持つことを示した重要なレポートである。なぜなら、成虫が未成熟虫にくらべはるかに大量の血液を吸血すること (Ogawa *et al.*, 2005)、また、水産用医薬品としてエラムシの駆虫用に使用されている過酸化水素製剤が未成熟虫のみに対する駆虫効果を薬効としているからである。

要 約

- 1) トラフグのエラムシ症対策薬として畜産動物の経口投与駆虫剤として用いられているフェンベンダゾールのプロドラッグであるフェバンテルの有効性について検討を行った。
- 2) フェバンテルはトラフグ体内で速やかにフェンベンダゾールへ移行し、エラムシに対して 12.5mg/kg・魚体重又は 25mg/kg・魚体重の5日間連続経口投与によって未成熟虫のみならず成虫にも駆虫効果が得られた。

文 献

- Anshary, H., K. Ogawa, M. Higuchi and T. Fujii (2001): A study of long-term change in summer infection levels of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* with the monogenean *Neoheterobothrium hirame* in the central Sea of Japan, with an application of a new technique for collecting small parasites from the gill filaments. *Fish Pathol.*, 36, 27-32
- Baert, L., S. van Poucke, H. Vermeersch, J. P. Pemon, J. Vercrusysse, P. Bastiaensen and P. Debackere. (1993): Pharmacokinetics and anthelmintic efficacy of febantel in the racing pigeon (*Columba livia*). *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, 16, 223-231.
- Ben-Zvi, Z., E. Gussarsky, C. van Creveld and R. Yagil. (1996): The bioavailability of febantel in dehydrated camels. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, 19, 288-294.
- Chigasaki, M., M. Nakane, K. Ogawa and H. Wakabayashi (2000): Standardized method for experimental infection of tiger puffer *Takifugu rubripes* with oncomiracidia of *Heterobothrium okamotoi* (Monogenea: Diclidophoridae) with some data on the oncomiracidial biology. *Fish Pathol.*, 35, 215-221.
- Debackere, M., J. Landuyt, J. Vercrusysse and Q. McKellar (1993): The influence of *Ostertagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* infections on the pharmacokinetics of febantel in lambs. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, 16, 261-274.
- Lacey, E. (1990): Mode of action of benzimidazoles. *Parasitol. Today*, 6, 112-115.
- Okamoto, R. (1963): On the problems of monogenetic trematode infection of puffers from the Inland Sea of Japan. *Suisanzoshoku*, Special Issue No.3, 17-29. (In Japanese).
- Ogawa, K. and K. Inouye (1997): *Heterobothrium* infection of cultured tiger puffer, *Takifugu rubripes* — A field observation. *Fish Pathol.*, 32, 15-20.
- Ogawa, K. and H. Yokoyama. (1998): Parasitic diseases of cultured marine fish in Japan. *Fish Pathol.*, 33, 303-309.
- Ogawa, K., Yasuzaki, M. and T. Yoshinaga (2005): Experiments on

the evaluation of the blood feeding of *Heterobothrium okamotoi* (Monogenea: Diclidophoridae). *Fish Pathol.*, 40, 169-174.

Tojo, J., M. T. Santamarina, F. M. Ubeira, J. Estevez and M. L. Sanmartín (1992): Anthelmintic activity of benzimidazoles against *Gyrodactylus* sp. infecting rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Org.*, 12, 185-189.

Tojo, J. and M. T. Sanmartín (1998): Oral pharmacological treatment for parasitic disease of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. II: *Gyrodactylus* sp. *Dis. Aquat. Org.*, 33, 187-193.

Wollweber, H., H. Kölling, A. Widdig, H. Thomas, H.-P. Schulz and P. Mürmann (1978): Febantel, a new broad-spectrum anthelmintic. *Arzneimittel-forsch Drug Reseach*, 28, 2193-2195.

本報告は魚病研究 2006.12 41(4),147-151 に掲載された英文論文を和訳したものである。