

# 養殖魚における合成抗菌剤，オキシリン酸の体内動態に関する研究

誌名	中央水産研究所研究報告
ISSN	09158014
著者名	石田,典子
発行元	水産庁中央水産研究所
巻/号	4号
掲載ページ	p. 1-58
発行年月	1992年2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



## 養殖魚における合成抗菌剤, オキシリン酸の体内動態に関する研究

石田典子\*

### A Study On the Metabolic Fate of Oxolinic Acid, a Synthetic Antibacterial Agent, in Cultured Fishes

Noriko Ishida

**Abstract:** The fish culture industry showed remarkable development in Japan in the past thirty years. Due to water pollution and an increase in stocking density of fish being cultured, the frequency and intensity of the infectious diseases in the fish farms are still on the rise, and many kinds of drugs are used for chemotherapy. After drug application, a special regulation by the government of Japan is imposed only for the following seven species; yellowtail, red sea bream, coho salmon, rainbow trout, Japanese eel, carp, and sweet fish, whose annual production exceeds 10,000 tons. At present, utilization of drugs for the remaining species of fishes is not under government regulation. Making the matter more complicated, the number and volume of fish being cultured are increasing as diversification in people's taste for food progresses further. The present investigation was undertaken to elucidate the pharmacokinetic characteristics of oxolinic acid (1-ethyl-4-dihydro-6,7-methylenedioxy-4-oxo-3-quinoline carboxylic acid) after administration to fish in order to establish an effective therapeutic drug usage for various species which may show a different response.

In Chapter II, the fate of orally administrated oxolinic acid to freshwater fishes (rainbow trout, tilapia, Japanese eel, carp) and saltwater fishes (red sea bream, Japanese mackerel, yellowtail, Japanese flounder) were examined. In general, oxolinic acid appears to be retained at a lower concentration and for a shorter period in the saltwater fishes than freshwater fishes.

In Chapter III, metabolites of oxolinic acid in the bile were analyzed. Unchanged oxolinic acid and three glucuronides of oxolinic acid, 7-hydroxy derivative (7-OHOA), and 6-hydroxy derivative (6-OHOA) were detected in the bile of the fre-

shwater fishes examined. However, no detectable amount of glucuronides of oxolinic acid was found in the bile of the saltwater fishes examined.

In Chapter IV, the biotransformation of oxolinic acid was studied. Carp treated with PCB, an inducer of the microsomal monooxygenase (cytochrome P450s), was used as the experimental animals. Free forms of 7-OHOA and 6-OHOA as well as a catechole derivative (6,7-diOHOA) and its glucuronide were detected in the bile for the first time. The formation of these metabolites was confirmed in an *in vitro* experiment using the microsome and cytosol fractions prepared from the liver of PCB treated carp.

Based on these findings, the metabolic pathway of oxolinic acid in fish was assumed to be as follows: oxolinic acid taken into the bodies of fish was partly biotransformed to 6,7-diOHOA by the microsomal monooxygenase. 6,7-diOHOA was further metabolized to 7-OHOA or 6-OHOA, and these metabolites and the unchanged drug were conjugated with glucuronic acid. Judging from type of the metabolite and the concentrations in the bodies of fish, it was inferred that the difference in the retention time of oxolinic acid among the species of fish may be due, to large extent, to the difference in the activity of the microsomal monooxygenase.

In Chapter V, the metabolic fate of oxolinic acid in the body of coho salmon and rainbow trout which had been acclimated to saltwater were compared with those of coho salmon and rainbow trout which were raised in fresh water. Oxolinic acid was retained at a lower concentration and for a shorter period in the bodies of fishes which had been acclimated to saltwater than in that of fishes raised in fresh water. An experiment of intravascular injection of oxolinic acid showed that the excretory rate of oxolinic acid was faster in saltwater fish than in freshwater fish.

These findings indicate that metabolic fate of oxolinic acid taken into bodies of fish was affected not only by the activity of the microsomal monooxygenase as in the case of mammal but also by the physiological function of fish such as the osmotic regulation. These differences must be taken into consideration in drug prescription for chemotherapy of fish diseases.

## 目 次

緒言 .....	5
第1章 魚体組織中のオキシリン酸の定量法 .....	7
第2章 各種養殖魚における経口投与オキシリン酸の体内分布	
第1節 ニジマス, テラピア, ウナギおよびコイにおける組織内濃度の変化 .....	9
第2節 マダイ, マアジ, プリおよびヒラメにおける組織内濃度の変化 .....	13
第3章 各種養殖魚におけるオキシリン酸の代謝物	
第1節 ニジマスの胆汁および尿中代謝物の検出 .....	17
第2節 ニジマスの胆汁および尿中代謝物の定量 .....	21
第3節 7種養殖魚の胆汁中代謝物の比較 .....	23
第4章 コイにおけるオキシリン酸の代謝経路	
第1節 <i>In vitro</i> 代謝による生成代謝物の検出 .....	29
第2節 薬物代謝酵素の誘導方法の検討 .....	31
第3節 誘導剤処理したコイでの胆汁中代謝物の検出 .....	37
第4節 誘導剤処理したコイでの <i>in vitro</i> 代謝 .....	39
第5章 淡水および海水中的のサケ科魚類におけるオキシリン酸の体内動態の比較	
第1節 ギンザケおよびニジマスの海水馴致法 .....	45
第2節 経口投与オキシリン酸の体内分布の比較 .....	46
第3節 胆汁中オキシリン酸代謝物の比較 .....	48
第4節 <i>In vitro</i> におけるオキシリン酸血球結合率の比較 .....	50
第5節 血管内投与オキシリン酸の血中濃度変化の比較 .....	51
総括 .....	53
謝辞 .....	55
参考文献 .....	56

## 結 言

我が国の魚類養殖はここ30年の間に急速に発展し、特に、海産魚類養殖が他に類のない我が国独特の産業として目覚ましい発展をとげてきたのは周知の事実である。しかしながら、その発展はいずれの養殖魚種においても種々の疾病と戦いながらなされてきた感がある。集約的な魚類飼育では、ビブリオ病あるいは類結節症等、各種の伝染性疾病が養殖魚を侵し、またそれらの発生頻度も高いことから、もはや、魚病対策なしには集約的養殖は成り立たないといっても過言ではない。

現在のところ、上記の魚病対策は化学療法に頼るところが多い。使用薬剤は、サルファ剤系、テトラサイクリン系、キノロン系、マクロライド系等多種類にわたり、その使用量は増加傾向にある。養殖生産コストに占める水産用医薬品の比率は比較的高く、1982年には、養殖魚1トンを生産するのに要する水産用医薬品の金額は15,000円にも昇っている<sup>1)</sup>。このような状況から、我が国では生産量の多いブリ、マダイ、ニジマス、コイ、ウナギ、アユおよびギンザケにおいて、被害の大きい疾病に対する投与医薬品、その投薬量、投薬期間および休薬期間についての使用規制が定められている(薬事法第83条、動物用医薬品の使用の規制に関する省令)<sup>2)</sup>。しかし、最近、テラピア、アマゴ、アジ、ヒラメ等の魚種についても養殖技術が開発されるにおよび、投薬対象となる魚種も年々増加しているが、このような魚種に魚病が発生した場合、すでに使用規制が定められている魚種の使用基準の処方準用する状況にある。また、最近養殖が盛んである海水ギンザケにおいても、ビブリオ病あるいは細菌性腎臓病(BKD)などの発生がみられているが、それらに対する処方は淡水飼育時のものを準用する場合が多く、有効性、副作用および残留等に関しては不明のままである。このような情勢から、薬剤を正しく、より有効に使用するための技術とその学問的うらづけが必要となってきた。

魚類、特に養殖魚における疾病の治療に関する研究はその緒についたばかりであり、多くの水産用医薬品においてその抗菌性、耐性、体内動態、副作用などに関して必要な知見が十分蓄積されているとは言えない。そのような背景のなかで、各養殖場では常に新しい魚病が発生し、適切な処方が緊急に求められているのが実情である。不足の部分はある程度まではヒトや哺乳動物での手法を用いて暫定的に補うことも可能ではあるが、魚類に関する問題は魚類に適する独自の方法で解決することが魚病対策の基本である。また、医薬品の治療効果をあげるためには有効濃度を一定期間持続することが必要であり、ヒトなどでは特に薬力学的な研究がよく行われている。養殖魚についてもある程度薬力学的研究が行われており、例えば、原ら<sup>3-7)</sup>はサルファ剤を用いて、ニジマスにおける薬剤学的研究および細菌性疾病の治療研究を行い、サルファ剤は有効濃度の持続時間の長短によって分類されるが、ヒトや哺乳動物についての分類は、直ちに魚類にそのままあてはまらないことを明らかにしている。また、遠藤ら<sup>8-10)</sup>はアユおよびキンギョにおけるオキシリン酸の薬浴液からの吸収は、pH、水温、塩分濃度および収容尾数等によって影響されることを証明している。さらに、代謝に関してはニジマスでナリジクス酸<sup>11,12)</sup>、ブリでオキシリン酸<sup>13)</sup>、キンギョでピロミド酸<sup>14)</sup>等の代謝が調べられており、魚類において検出された代謝物は、哺乳動物において検出されたものと同じではあるが、その数および量はいずれも少ない傾向にあることが明らかになっている。しかし、これらの研究はいずれも

ある特定魚種を対象とし、しかも魚種差等についてはほとんど検討されていないことから、多種多様な養殖魚種のある現在、それら全般に適用するには危険性が高く、水産用医薬品の適用にあたっては、各魚種あるいは魚種間の相違について詳細に検討する必要がある。

このように、現在、医薬品の体内動態の魚種差に関しては明確でない部分が多く、しかもそれらについて明らかにすることは学問的に重要であり、養殖業においてもこれらの知見の蓄積やその体系化が急務とされている。

以上の観点から本研究においては、特に水産用医薬品の中では一般性も高く、広く使用されている合成抗菌剤のオキシリン酸について、数種の養殖魚を対象とし、主として経口投与後の医薬品の魚体内動態についての解明を行った。第1章では魚体組織中のオキシリン酸および代謝物の定量方法を検討した。第2章ではオキシリン酸の体内分布を魚種間で比較して、淡水魚と海水魚ではオキシリン酸の体内動態が異なることを明らかにした。第3章では、淡水魚と海水魚ではオキシリン酸の代謝物が異なることを明らかにした。第4章において、淡水魚と海水魚における体内動態の相違は、薬物代謝酵素の活性の差が原因の一つであることを明らかにした。第5章では、海水に馴致したニジマスおよびギンザケにおけるオキシリン酸の体内分布を調べ、海水飼育時の体内動態は淡水飼育時とは異なり、海水魚のそれと類似することを明らかにし、その原因は排泄速度の差にあることを明らかにした。本論文はこれらの成果をまとめたもので全5章からなる。

## 第1章 魚体組織中のオキシリン酸の定量法

魚体中のオキシリン酸および代謝物は以下に述べる溶媒抽出法により抽出し、高速液体クロマトグラフィー法により分離・定量した。

### 1. 実験方法

**供試薬剤** 供試薬剤としてオキシリン酸（1-エチル-1,4-ジヒドロ-6,7-メチレンジオキシ-4-オキソ-3-キノリンカルボン酸）（田辺製薬株式会社製）とその既知代謝物である7-ヒドロキシ体（1-エチル-1,4-ジヒドロ-7-ヒドロキシ-6-メトキシ-4-オキソ-3-キノリンカルボン酸；7-OHOA）および6-ヒドロキシ体（1-エチル-1,4-ジヒドロ-6-ヒドロキシ-7-メトキシ-4-オキソ-3-キノリンカルボン酸；6-OHOA）（いずれも住友化学工業株式会社製）を用いた（Fig. 1-1）。

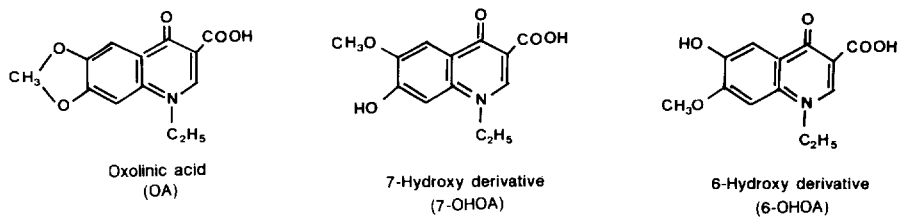


Fig. 1-1. Chemical structures of oxolinic acid and its metabolites.

**魚体中のオキシリン酸の溶媒抽出法** オキシリン酸は Fig. 1-2 に示す操作手順によって試料から抽出した。組織試料約 2g にジクロロメタン 30ml を加え、ポリトロンにより細砕後、3,000rpm で 10 分間遠心分離して有機溶媒層（以下、有機層）を得た。同様の操作を再度繰り返す、得られた有機層をすべて合わせて減圧下で濃縮乾固した。一方、血清試料の抽出溶媒には酢酸エチルを用いた。血清試料約 0.5g に 1/15M リン酸緩衝液 (pH 6) 10ml および酢酸エチル 25ml を加えて 10 分間振とう後、遠心分離し (3,000rpm, 10 分間)、有機層を分離した。同様の操作を 3 回行い、得られた有機層をすべて合わせて減圧下で濃縮乾固した。それぞれの濃縮残さは 0.1N 塩酸およびヘキサン 30ml を加え振とうし (10 分間)、遠心分離後 (3,000 rpm, 10 分間)、ヘキサン層を除去した。残りの水層をジクロロメタンを用いて抽出し、オキシリン酸を分離した。同様の操作を 2 度繰り返す、得られた有機層をすべて合わせて減圧下で濃縮乾固した。残さを 1% リン酸含有アセトニトリルの一定量に溶解し、高速液体クロマトグラフィー供試液とした。

**高速液体クロマトグラフィー法** 高速液体クロマトグラフは日立製作所 665A-12 を用い、検出は紫外分光光度計 655A によった。カラムは、Zorbax CN (4.6×250mm) を用いた。移動相には、1% リン酸含有アセトニトリルを流速 1.0ml/min で使用し、254nm を検出波長とした。ハマチ血清試料のクロマトグラムを Fig. 1-3 に示した。検量線は、オキシリン酸の 0.2、

0.5, 1.0 および 2.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  溶液を調製し、クロマトグラムにおけるピーク面積から作成した。血清、筋肉および肝臓にオキシリン酸を添加後、分析して求めた回収率は、それぞれ 91%, 89% および 91% であり、検出限界は 0.05  $\mu\text{g}/\text{ml}$  であった。

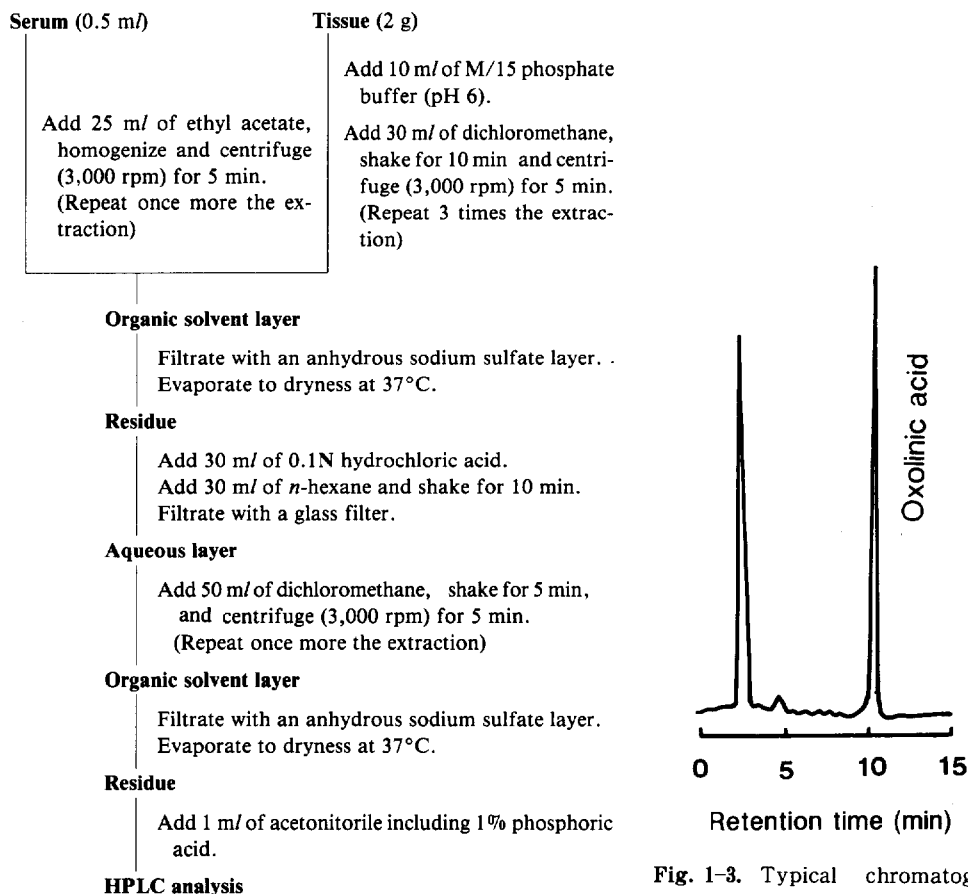


Fig. 1-2. Assay procedure for oxolinic acid

in the tissues of fish.

HPLC: High-performance liquid chromatography.

Fig. 1-3. Typical chromatogram of serum sample from yellowtail at 3 h after oral administration of oxolinic acid.

**オキシリン酸の代謝物の定量法** 胆汁および尿試料について代謝物を定量した。胆汁試料の場合は上記血清試料と同様の方法で抽出操作を行った。尿試料の場合は、1N 塩酸で pH 6 に調整後、2 倍量のジクロロメタンで 3 度抽出し、有機層を減圧濃縮した。それぞれの試料の有機層はオキシリン酸の抽出方法と同様にクリーンアップ操作後、液体クロマトグラフィー分析を行い、代謝物の濃度を測定した。胆汁試料の水層、および減圧下で 1/20 容に濃縮した尿試料の水層は  $\beta$ -グルクロニダーゼ (15,000 単位, Pharmacia 社製) によりグルクロン酸抱合体を開裂させた後、ジクロロメタンで 3 度抽出し、グルクロン酸抱合体 (グルクロニド) のアグリコンを得た。得られたそれぞれのアグリコンを含む有機層は上記方法と同様に液体クロマトグラフィー分析を行い、代謝物の濃度を測定した。



## 第2章 各種養殖魚における経口投与オキシソリン酸の体内分布

我が国の養殖業において、ブリ、マダイ、ニジマス、コイ、ウナギ、アユおよびギンザケの7養殖魚種の生産量は全養殖魚の約9割を占めており<sup>15)</sup>、これらの7魚種の病害に対しては医薬品の使用基準が定められている<sup>2)</sup>。一方、近年の養殖業の多様化に伴い、ヒラメ、テラピアなどの規制対象外の魚種（規制対象外魚種）の生産が伸び、これらの生産量は1976年から1986年までの10年間に約8倍に増加している<sup>15)</sup>。

しかし、規制対象外魚種に対しては水産用医薬品の使用基準が定められていない。その原因の一つに、規制対象外魚種に対して水産用医薬品の製造承認を受けても、その使用量が少ないことが予想され、採算の点から製薬会社が意欲的に試験開発を行わなかったことがある。このため規制対象外魚種に魚病が発生した場合には、規制7魚種を対象とした水産用医薬品の指針を準用している。しかし、規制対象外魚種での有効な治療方法の開発、あるいは健全な食品を提供するための残留問題の解決の両面から、投与薬剤の規制対象外魚種における体内動態についてもあらかじめ検討しておく必要がある。

以上の観点から本章では、経口投与した医薬品の体内分布を魚種間で比較するとともに、これらの体内動態について魚種差の有無を検討した。淡水魚4種および海水魚4種の合計8種の養殖魚を対象とし、オキシソリン酸を経口投与した後の血清、筋肉、肝臓および腎臓におけるオキシソリン酸の濃度を測定し、その経時変化を種々の魚種間で比較した。

### 第1節 ニジマス、テラピア、ウナギおよびコイにおける組織内濃度の変化

養殖魚に医薬品を投与し、医薬品の組織内濃度を測定した研究は多数報告されており、オキシソリン酸についてもその組織内濃度変化はキンギョ<sup>8)</sup>、アユ<sup>9,16)</sup>、ブリ<sup>10,13)</sup>、ヒラメ<sup>17)</sup>およびニジマス<sup>18)</sup>において調べられている。しかし、数種の魚種を用いて、淡水魚と海水魚間の濃度変化の比較を目的とした研究はほとんど見当たらない。まず、本節では養殖魚の中から、ニジマス、テラピア、コイおよびウナギにオキシソリン酸を強制経口投与し、その後の血清、筋肉、肝臓（コイでは肝臓）および腎臓内のオキシソリン酸濃度を測定し、各組織内濃度の経時変化を比較した。

#### 1. 実験方法

ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) は養殖研究所において市販のマス用配合飼料（日本配合飼料株式会社製）で飼育された平均体重176gの2年魚を用い、水温 $17 \pm 0.2^\circ\text{C}$ の飼育水で試験を行った。テラピア (*Tilapia mossambica*) は養殖研究所において市販のテラピア用配合飼料（日本配合飼料株式会社製）で飼育された平均体重50gの1年魚を用い、水温 $25 \pm 0.2^\circ\text{C}$ で試験を行った。ウナギ (*Anguilla japonica*) は三重県度会郡小俣町の露地飼育を行っている養殖業者から購入し、平均体重163gのものを用い、水温 $20 \pm 0.2^\circ\text{C}$ で試験した。コイ (*Cyprinus carpio*) は養殖研究所において市販のコイ用配合飼料（日本配合飼料株式会社製）で飼育された平均体重164gのものを用い、水温 $20 \pm 0.2^\circ\text{C}$ で試験した。いずれの供試魚も投薬2日間前から試料採取時までには給餌を停止した。

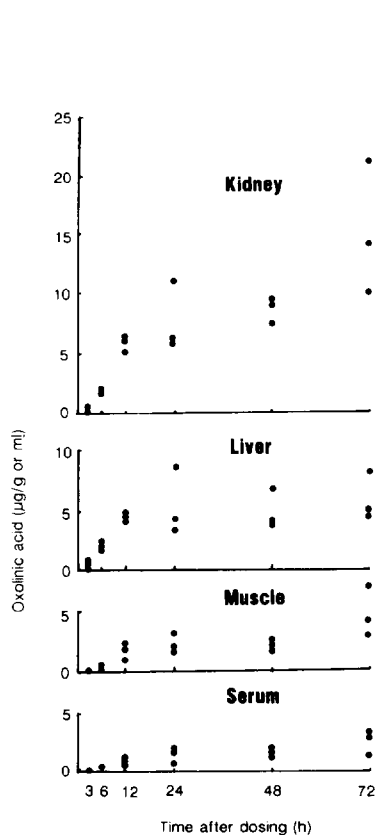


Fig. 2-1. Tissue levels of oxolinic acid in rainbow trout after single oral administration at a dose of 40mg/kg.

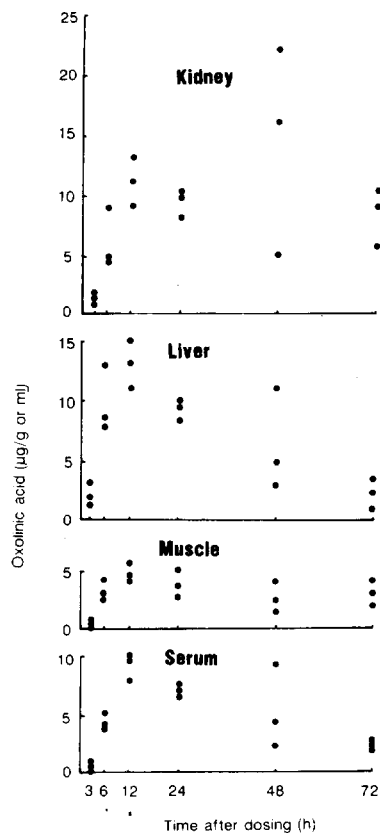


Fig. 2-2. Tissue levels of oxolinic acid in tilapia after single oral administration at a dose of 40mg/kg.

投与試料は、オキシリン酸と市販マス用粉末飼料（オリエンタル酵母株式会社製）、カルボキシルメチルセルロースナトリウム（ワコー純薬工業株式会社製）および蒸留水を混合して調製した。供試魚をMS-222で麻酔した後、魚体重1kgあたり40mgのオキシリン酸をカテーテルにより強制経口投与した。ニジマスおよびテラピアでは、投薬してから3, 6, 12, 24, 48および72時間後に3尾ずつを取り上げて、血液、肝臓、腎臓および筋肉を採取した。血液は尾柄部より注射器で採血し、直ちに3,000rpmで20分間冷却遠心して血清を得た。コイおよびウナギでは投薬してから12, 24, 48, 72, 144, 288および432時間後に試料を採取した。各組織試料は分析時まで約2ヵ月間、 $-20^{\circ}\text{C}$ 以下で保存した。

試料中のオキシリン酸の定量は、本論文の第1章に示す操作手順によって行った。

## 2. 結 果

ニジマス (Fig. 2-1) では試験したすべての組織において、投薬72時間後にオキシリン酸濃

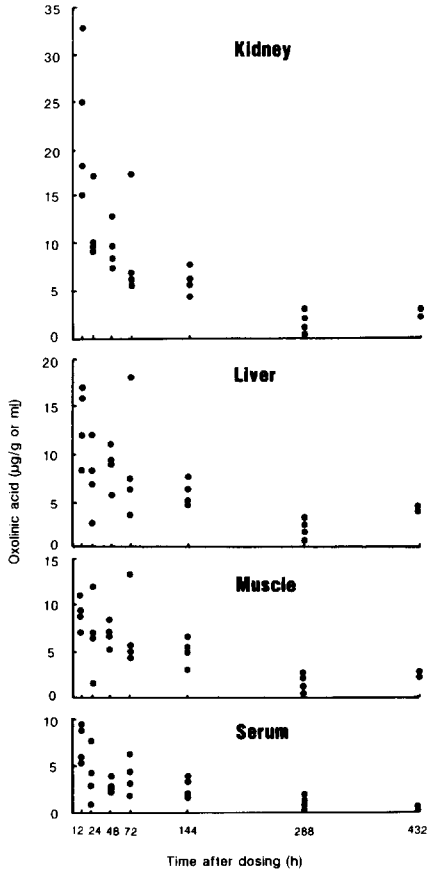


Fig. 2-3. Tissue levels of oxolinic acid in Japanese eel after single oral administration at a dose of 40mg/kg.

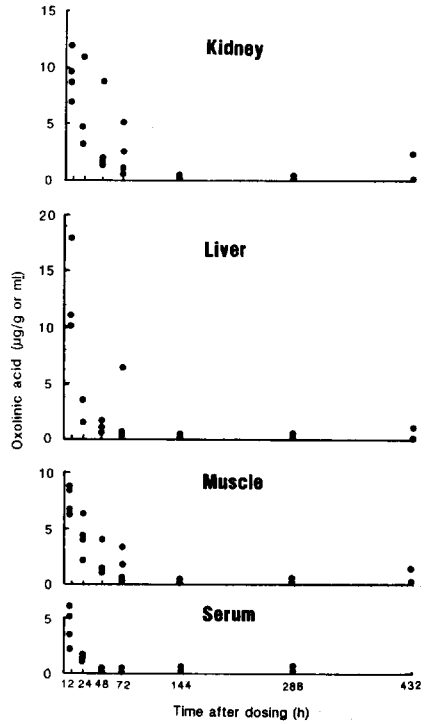


Fig. 2-4. Tissue levels of oxolinic acid in carp after single oral administration at a dose of 40mg/kg.

度は最高値を示し、3試料の平均値（平均濃度）はそれぞれ血清で $2.2\mu\text{g}/\text{ml}$ 、筋肉で $4.8\mu\text{g}/\text{g}$ 、肝臓で $5.9\mu\text{g}/\text{g}$ 、腎臓で $15.0\mu\text{g}/\text{g}$ であった。濃度は腎臓>肝臓>筋肉>血清の順であり、腎臓において $21\mu\text{g}/\text{g}$ を示す個体もあった。

一方、テラピア（Fig. 2-2）では血清、筋肉および肝臓の平均濃度は12時間後に最高値を示し、それぞれ $9.1\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $4.9\mu\text{g}/\text{g}$ 、 $13.0\mu\text{g}/\text{g}$ であった。腎臓では48時間後に最高濃度（ $11.0\mu\text{g}/\text{g}$ ）を示した。72時間後の各組織の平均濃度は、血清で $2.4\mu\text{g}/\text{ml}$ 、筋肉で $2.9\mu\text{g}/\text{g}$ 、肝臓で $2.4\mu\text{g}/\text{g}$ 、腎臓で $8.1\mu\text{g}/\text{g}$ であり、ニジマスの72時間後の値と類似していた。テラピアではニジマスに比べて最高濃度に至る時間（最高濃度到達時間）が短く、しかも最高濃度が高い傾向にあった。

ウナギの結果を Fig. 2-3 に示した。ウナギでは各供試組織において、オキシリン酸濃度は12時間後に最高値を示し、各4検体の平均値はそれぞれ血清で $7.3\mu\text{g}/\text{ml}$ 、筋肉で $9.2\mu\text{g}/\text{g}$ 、

肝臓で  $13.3\mu\text{g/g}$ 、腎臓で  $22.8\mu\text{g/g}$  であった。これらの値は、ニジマスおよびテラピアに比べて高かったが、オキシソリン酸の濃度は、腎臓>肝臓>筋肉>血清の順であり、ニジマスおよびテラピアと同様の傾向を示した。投与してから 432 時間 (18 日) 後にも各組織内にオキシソリン酸が認められ、血清で  $0.7\mu\text{g/ml}$ 、筋肉で  $2.9\mu\text{g/g}$ 、肝臓で  $4.4\mu\text{g/g}$ 、腎臓で  $3.1\mu\text{g/g}$  の濃度で残留していた。

コイでも、Fig. 2-4 に示すように、各組織では 12 時間後に最高濃度を示し、432 時間 (18 日) 後にも各組織でオキシソリン酸の残留が認められた。

### 3. 考 察

以上の結果から、ニジマス、テラピア、ウナギおよびコイのいずれにおいても腎臓でのオキシソリン酸の濃度が高く、この薬剤が腎臓に蓄積される傾向がみられ、Ueno ら<sup>18)</sup>のニジマスとアマゴ、遠藤ら<sup>10)</sup>および Ueno ら<sup>13)</sup>のブリについての報告と同様な結果を得た。哺乳動物ではオキシソリン酸は腎臓によく移行し、尿中に排泄されることから<sup>19)</sup>、魚類においても、哺乳動物と同様、尿はオキシソリン酸の主要な排泄経路の一つであると考えられた。

本実験では、ニジマスおよびテラピアは投薬後 72 時間までを実験期間としたため、両魚種ともに最高濃度に達した後の長期間にわたる変化を確認するには至らなかったが、Ueno ら<sup>18)</sup>は本研究と同じく  $40\text{mg/kg}$  をニジマスおよびアマゴに投与した場合、ニジマスでは 12 日間、アマゴでは 30 日間もオキシソリン酸が残留することを報告している。春日ら<sup>16)</sup>も  $50\text{mg/kg}$  をニジマスに投与した場合、14 日間オキシソリン酸が残留すると報告していることから、本実験のニジマスの場合も、ウナギおよびコイと同様に、十数日にわたってオキシソリン酸が残留するものと推察された。また、春日ら<sup>16)</sup>は  $50\text{mg/kg}$  をアユに投与すると、7 日後もオキシソリン酸が残留することを明らかにしている。これらのことから、本実験で供試したニジマス、ウナギ、コイの他に、アマゴあるいはアユなどの淡水魚では、 $40\text{mg/kg}$  の投与量の場合、1 週間以上にわたってオキシソリン酸が残留することが多いと推察された。

遠藤ら<sup>10)</sup>は、平均粒子径が  $1.0\mu\text{m}$  あるいは  $6.4\mu\text{m}$  のオキシソリン酸  $30\text{mg/kg}$  をブリに投与した場合、血清中のオキシソリン酸は 6 時間後にそれぞれ  $2.38\mu\text{g/ml}$ 、 $1.39\mu\text{g/ml}$  と最高濃度になり、47 時間後にはいずれも検出限界以下になると報告している。Ueno ら<sup>13)</sup>は  $50\text{mg/kg}$  をブリに投与した場合、血中濃度は 0.2 日後に  $5.14\mu\text{g/ml}$  であるのに対し、2 日後には検出限界以下となると報告している。また、ブリに  $200\text{mg/kg}$  投与した場合、その血中濃度は 9 時間後に  $3.33\mu\text{g/ml}$  であるのに対し、24 時間後には  $0.2\mu\text{g/ml}$  と低くなることを報告している<sup>13)</sup>。これらのことから、ニジマス、ウナギ、コイなどの淡水魚では、ブリに比べて、オキシソリン酸が長期間にわたって魚体内に残留することが推察された。

本実験において、淡水魚であるニジマスおよびテラピアにおける血中の最高濃度到達時間は、それぞれ 72 および 12 時間であった。一方、マウス<sup>20)</sup>にオキシソリン酸を 20、40 および  $80\text{mg/kg}$  を投与すると、各投与区ともに血清濃度は 1 時間以内に最高に達し、また、 $20\text{mg/kg}$  を投与したイヌ<sup>20)</sup>では 2 時間後に最高に達することが報告されているが、本実験により、最高濃度に到達する時間は淡水魚の方が哺乳動物に比べて遅いことが明らかになった。残留についても、本実験で供試した淡水魚では、 $40\text{mg/kg}$  の投与量の場合は 1 週間以上にわたってオキシソリン酸が残留すると推察されるが、同じく  $40\text{mg/kg}$  を投与したマウスでは、血清中のオキシ

リン酸は8時間後に消失していた<sup>20)</sup>。同様な現象は、合成抗菌剤のスルファジメトキシンにおいてもみられ、スルファジメトキシン<sup>9)</sup> 250mg/kgを投与したニジマスの血しょう中濃度変化を、ラットおよびマウス<sup>21)</sup>に250mg/kgを投与した結果と比較すると、上記オキシリン酸の場合と同様に、ニジマスでは最高濃度到達時間が遅く、体内残留期間が長い傾向がみられる。これらの現象から、淡水魚における薬物の吸収あるいは排泄等の速度は、哺乳動物に比べてはるかに遅いと推察された。

## 第2節 マダイ、マアジ、ブリおよびヒラメにおける組織内濃度の変化

第1節において、ニジマス、ウナギ、コイなどの淡水魚では、ブリに比べてオキシリン酸が長期間にわたって魚体内に残留することが推察された。本節ではブリの他にマダイ、マアジおよびヒラメの海水魚を供試し、それらに経口投与したオキシリン酸の組織内濃度の経時的変化を調べ、第1節における淡水魚での結果と比較した。

### 1. 実験方法

マダイ (*Pagrus major*) は養殖研究所において市販のマダイ用配合飼料 (日本配合飼料株式会社製) で飼育された平均体重 202g の2年魚を用い、水温  $25 \pm 0.2^\circ\text{C}$  で試験した。マアジ (*Trachurus japonicus*) は三重県度会郡南勢町の養殖業者から1年魚を購入し、1ヵ月間イカナゴを給餌して飼育した。平均体重は 121g、水温  $20 \pm 0.2^\circ\text{C}$  で試験した。ブリ (*Seriola quinqueradiata*) は養殖研究所において市販のモイストペレット (三重県漁連製) で飼育された平均体重 148g の当才魚を用い、水温  $20 \pm 0.2^\circ\text{C}$  で試験した。ヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) は養殖研究所においてイカナゴを給餌して飼育された平均体重 482g の1年魚を用い、水温  $22 \pm 0.2^\circ\text{C}$  で試験した。

第1節と同様の方法により、これらの供試魚にオキシリン酸を経口投与し、3、6、12、24、48 および 72 時間後の血清、肝臓、腎臓および筋肉内のオキシリン酸を定量した。

### 2. 結果

マダイ (Fig. 2-5) では、オキシリン酸の各組織濃度は6時間後にほぼ最高に達し、血清、筋肉、肝臓および腎臓において、それぞれ  $0.6 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $1.2 \mu\text{g}/\text{g}$ 、 $1.8 \mu\text{g}/\text{g}$  および  $3.2 \mu\text{g}/\text{g}$  であった。48時間後には腎臓以外の3組織中のオキシリン酸濃度は検出限界以下となり、腎臓における平均濃度も  $0.2 \mu\text{g}/\text{g}$  と低かった。各組織の濃度順位は腎臓 > 肝臓 > 筋肉 > 血清であり、特に腎臓における濃度が高いこともニジマス等の淡水魚と類似していた。しかし、ニジマスおよびテラピア等の淡水魚に比べて、マダイでは最高濃度到達時間が短く、濃度も低い傾向が見られた。

マアジ (Fig. 2-6) においてもオキシリン酸濃度はマダイと同様な傾向を示し、最高濃度は、3時間後に血清 ( $0.3 \mu\text{g}/\text{ml}$ )、6時間後に筋肉 ( $0.5 \mu\text{g}/\text{g}$ )、肝臓 ( $4.0 \mu\text{g}/\text{g}$ ) および腎臓 ( $2.7 \mu\text{g}/\text{g}$ ) でみられた。各組織のオキシリン酸は以後速やかに減少し、48時間後にはほとんどの試料において検出限界以下となった。

ブリ (Fig. 2-7) では最高濃度到達時間は、血清 ( $0.8 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) および肝臓 ( $3.6 \mu\text{g}/\text{g}$ ) で3時間後、筋肉 ( $1.1 \mu\text{g}/\text{g}$ ) および腎臓 ( $2.8 \mu\text{g}/\text{g}$ ) で6時間後であった。また、48時間後に

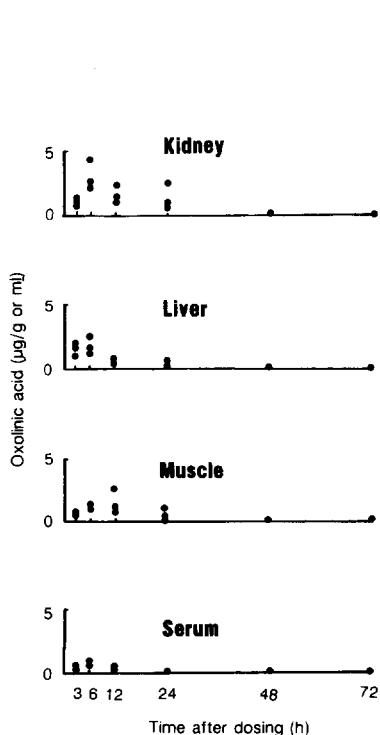


Fig. 2-5. Tissue levels of oxolinic acid in red sea bream after single oral administration at a dose of 40mg/kg.

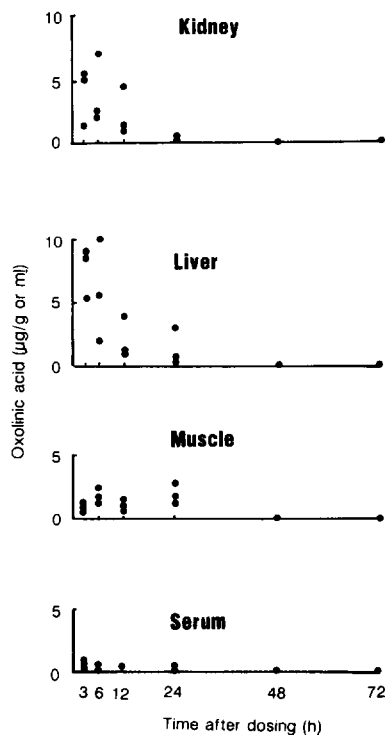


Fig. 2-6. Tissue levels of oxolinic acid in Japanese mackerel after single oral administration at a dose of 40mg/kg.

はほとんどの試料において検出限界以下となり、マダイおよびマアジの減少傾向と類似していた。

一方、ヒラメ (Fig. 2-8) では12時間後に筋肉、肝臓および腎臓で、24時間後には血清でそれぞれ  $0.7\mu\text{g/g}$ 、 $1.5\mu\text{g/g}$ 、 $6.3\mu\text{g/g}$  および  $1.4\mu\text{g/ml}$  と最高濃度を示し、マダイ、マアジおよびブリに比べるとやや高く、最高濃度到達時間も長い傾向が認められた。72時間後のヒラメでは血清で  $0.6\mu\text{g/ml}$ 、筋肉で  $0.6\mu\text{g/g}$ 、肝臓で  $0.5\mu\text{g/g}$ 、腎臓で  $2.2\mu\text{g/g}$  のオキシリン酸が検出されたが、第1節での淡水魚の72時間後の値に比べていずれも低濃度であり、淡水魚に比較して海水魚ではいずれも最高濃度到達時間が短く、最高平均濃度も低く、残留期間が短い傾向が認められた。

### 3. 考察

海水魚4種においても供試組織中腎臓内のオキシリン酸濃度が最も高く、淡水魚4種の場合と共通していた。しかし、試験したすべての海水魚においてオキシリン酸の組織内濃度変化は

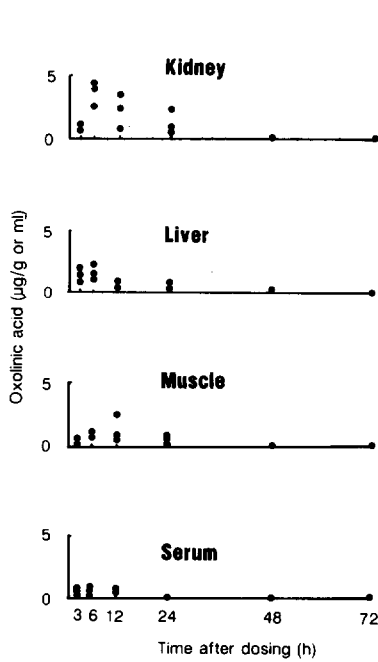


Fig. 2-7. Tissue levels of oxolinic acid in yellowtail after single oral administration at a dose of 40mg/kg.

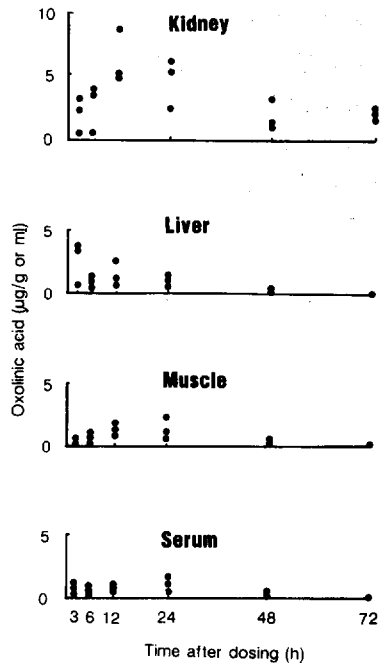


Fig. 2-8. Tissue levels of oxolinic acid in Japanese flounder after single oral administration at a dose of 40mg/kg.

淡水魚の結果とは明らかに異なる傾向が認められた。一方、遠藤ら<sup>10)</sup>はブリに連続投与試験を行い、春日ら<sup>16)</sup>のニジマスおよびアユでの連続投与試験の結果と比較し、ブリではオキシリン酸の残留性がやや低いと報告し、本研究の結果と類似する成果を得ている。以上のことから、淡水魚と海水魚ではオキシリン酸の動態が異なることが明らかとなった。

淡水魚と海水魚の間で投与された物質の動態が異なる現象は、オキシリン酸だけでなく他の化合物においても認められている。たとえば、魚臭成分の前駆体であるジメチル-β-プロピオテチン<sup>22)</sup>を含む飼料をコイおよびメジナに1回給餌すると、コイの肝臓では給餌後12時間後にジメチル-β-プロピオテチン含量は最大に達するが、一方のメジナ肝臓では給餌直後に最大に達し、その値はコイに比べて非常に低い値である。また、残留期間もコイでは長く、メジナでは短い。このように、コイおよびメジナにおけるジメチル-β-プロピオテチンの組織内濃度変化の相違は、淡水魚と海水魚におけるオキシリン酸の挙動と酷似している。これらのことから、オキシリン酸やジメチル-β-プロピオテチンだけでなく、他の水産用医薬品においても淡水魚と海水魚で動態が異なることが推察された。

最近、ニジマスあるいはギンザケなどのサケ科魚類が海水で養殖され、その生産量は年々増加の傾向にある。海面養殖されたサケ科魚類にもピブリオ病等の魚病が発生しているが、それ

らに対する処方はいまだに確立されていない。しかし、本実験により海水魚におけるオキシリン酸の体内動態は淡水魚とは異なることが明らかになったことから、海面養殖時のオキシリン酸の動態も淡水飼育時とは異なり、有効血中濃度の維持あるいは残留期間の設定の面から、海水飼育時の処方を新たに作成する必要があると考えられる。また、代表的な抗菌剤であるオキシリン酸における上記の挙動から、他の水産用医薬品についても淡水魚と海水魚で動態が異なり、新たに処方を定める必要があると推定される。これらの新しい処方を定めるための基礎資料として、今回得られた淡水魚と海水魚におけるオキシリン酸の体内動態の差は非常に興味深く、またその原因についても、さらに今後詳しく解明する必要がある。



### 第3章 各種養殖魚におけるオキシリン酸の代謝物

哺乳動物では薬物の代謝経路が動物種間で異なることから、薬物の組織内濃度、すなわち体内分布に差が生じ、それが種によって薬物の効力や毒性が異なる主な原因であることが知られ<sup>23,24)</sup>、種差に関する研究が広く行われている。最近、魚類においても、農薬である DDT の代謝経路がコイとテラピアとで異なることが明らかにされているが<sup>25)</sup>、一般に魚類における薬物の代謝経路については、種差に関しての検討はほとんどなされていない。

第2章において、淡水魚と海水魚ではオキシリン酸の組織内濃度変化、すなわち体内動態が異なることを明らかにしたが、その原因の一つとして、代謝経路の魚種差によることが考えられたため、本章では種々の魚種におけるオキシリン酸の代謝経路について比較検討した。

#### 第1節 ニジマスの胆汁および尿中代謝物の検出

本節では、養殖魚におけるオキシリン酸の代謝経路を明らかにするために、代表的な養殖魚であるニジマスを用いて代謝物の検出を行った。

魚類における薬物代謝研究は、農薬および各種の化学物質を原因とする環境汚染による魚類への影響あるいは残留などの観点から行われ、DDT、デイルドリン、ポリ塩化ビフェニルなどの魚体内における代謝経路について明らかにされている<sup>26)</sup>。一方、養殖魚類の疾病対策に用いられる医薬品を対象として行われた代謝研究は少なく、Katae ら<sup>14)</sup>のキングギョにおけるピロミド酸の代謝に関する報告等、数例があげられるのみである。本研究では、Katae ら<sup>14)</sup>の実験手法を参考にして、ニジマスにおけるオキシリン酸の代謝物について検討した。オキシリン酸やピロミド酸等のキノロン系合成抗菌剤の代謝物は、哺乳動物では一般に胆汁および尿中に排泄されることから<sup>27)</sup>、本研究においても胆汁および尿中の代謝物について検討した。

#### 1. 実験方法

養殖研究所において飼育された平均体重 225g のニジマス (2 年魚) を、実験に供する 2 日前から餌止めし、水温  $15 \pm 0.2^\circ\text{C}$  で試験した。

投薬用飼料は、適量のオキシリン酸と市販のマス用粉末飼料 (オリエンタル酵母株式会社製)、カルボキシルメチルセルロースナトリウム (ワコー純薬工業株式会社製、飼料の約 5% 量) および蒸留水 (飼料の約 2 倍量) を混合して調製した。ニジマス 10 尾を MS-222 (0.01%) で麻酔した後、オキシリン酸投与量が  $80\text{mg}/\text{kg}$  になるように強制経口投与した。48 時間後に胆汁を採取し、10 尾分を合わせて試料とした。採尿は、膀胱にネラトンカテーテル (出雲ゴム工業株式会社製 No. 3) を挿入したニジマス 4 尾から、投薬後 72 時間にわたって連続的に採取し、4 尾の尿を合わせて分析に供した。対照として無投薬のニジマスの胆汁および尿も同様に採取した。

胆汁中代謝物の抽出、分離 (分離薄層クロマトグラフィー) 操作は Fig. 3-1 に示す方法で行った。胆汁試料は McIlvaine 緩衝液で pH 6 に調整した後、2 倍量のクロロホルムを用いて脂溶性代謝物を抽出した (フラクション A)。水層にはグルクロン酸抱合された代謝物 (グルクロニド) が存在すると考えられたので、 $\beta$ -グルクロニダーゼ (15,000 単位, Pharmacia 社製)

を加えて 37°C で 42 時間インキュベートして加水分解した。その後、クロロホルムを用いて水層からグルクロニドのアグリコンを抽出した (フラクション B)。各クロロホルム層 (フラクション A および B) は減圧下で濃縮乾固し、分離薄層クロマトグラフィーに供した。シリカゲル薄層板は Kiesel gel 60 F<sub>254</sub> (HPTLC プレート, Merck 社製) を使用し、展開溶媒は、エタノール-水-28%アンモニア水 (16:3:1, v/v, 展開溶媒 I) を用いた。無投薬区の試料もフラクション A および B に分画し、投薬区と同様に処理した。投薬区および無投薬区の抽出物を同一プレートで展開後、紫外線照射下でクロマトグラムを比較し、代謝物を検出した。

**胆汁中代謝物の単離 (分取薄層クロマトグラフィー)** 厚さ 0.5mm の分取用のシリカゲル薄層板 (Kiesel gel 60 F<sub>254</sub>, Merck 社製) に全試料を塗布し、上記の方法と同様に展開操作を行い、各代謝物を単離した。

**胆汁中代謝物の同定 (同時薄層クロマトグラフィー)** 単離した代謝物は、3 種類の展開溶媒を用いて、プレート上での挙動を標品と比較する同時薄層クロマトグラフィーによって同定した。展開溶媒として、通常オキシリン酸の代謝物の同定に使用される<sup>28,29)</sup>、n-ブタノール-酢酸-水 (4:1:1, v/v, 展開溶媒 II), エタノール-水-28%アンモニア水 (12:7:1, v/v, 展開溶媒 III) およびエタノール-水 (7:3, v/v, 展開溶媒 IV) の 3 種を用いた。

**尿中代謝物の分離と同定** 尿試料についても胆汁試料と同様の方法によって代謝物の同定を行った。試料を脂溶性代謝物画分とグルクロニド画分とに分画後、各画分の分離薄層クロマトグラフィーによりそれぞれの代謝物について検討した。次いで、分取薄層クロマトグラフィーによって代謝物を単離し、単離された代謝物と標品との同時薄層クロマトグラフィーによって代謝物を同定した。

## 2. 結 果

胆汁試料では、フラクション A の分離薄層クロマトグラフィーからは 1 種類の代謝物 (A1) が、フラクション B の分離薄層クロマトグラフィーからは 3 種類の代謝物 (B1, B2, B3) が認められた (Fig. 3-1)。これら 4 種類の代謝物を分取薄層クロマトグラフィーによって単離し、さらに、通常オキシリン酸代謝物の分離に使用される展開溶媒 II, III および IV を用いて、単離された代謝物と標品の同時クロマトグラフィーを行った。

同時クロマトグラフィーにおいて、A1 および B1 は展開溶媒 II, III および IV における標品のオキシリン酸の R<sub>f</sub> 値と一致したことからオキシリン酸と同定した (Fig. 3-2, Table 3-1)。

展開溶媒 II での同時クロマトグラフィーにおいて、オキシリン酸の R<sub>f</sub> 値は 0.46 であったのに対し、B2 は 0.56, B3 は 0.43 とオキシリン酸とは異なる R<sub>f</sub> 値を示した (Fig. 3-2)。B2 および B3 はフェノール性水酸基検出試薬である Pauly 試薬で陽性を示したため、哺乳動物においてオキシリン酸の代謝物として知られている 7-OHOA あるいは 6-OHOA (Fig. 1-1) と推定された。そこで、B2 および B3 を、標品の 7-OHOA および 6-OHOA と同時薄層クロマトグラフィーを行ったところ、B2 は展開溶媒 II, III および IV において標品の 7-OHOA の R<sub>f</sub> 値と一致し (Table 3-2)、同様に、B3 は標品の 6-OHOA と完全に一致した (Table 3-2)。高速液体クロマトグラフィーでは、B2 と 7-OHOA の混合液、および B3 と 6-OHOA の混合液はそれぞれ同一の保持時間で溶出された (Table 3-2)。これらの結果から B2 は 7-OHOA, B3 は 6-OHOA と同定した。

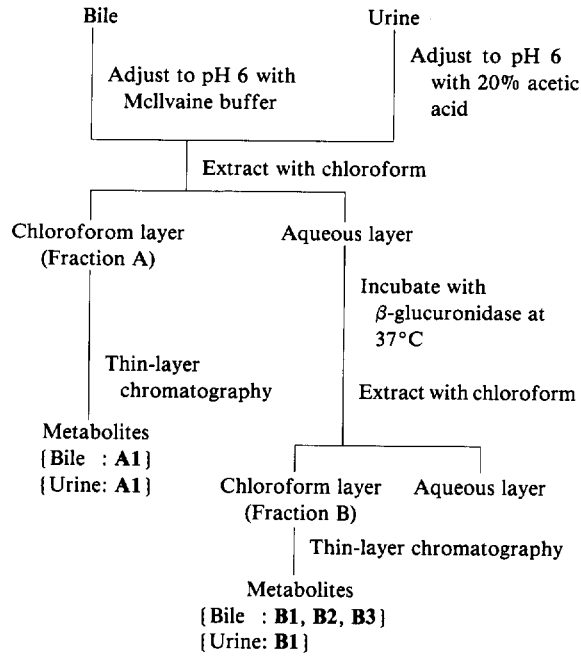


Fig. 3-1. Separation procedure for oxolinic acid metabolites excreted in the bile and urine of rainbow trout.

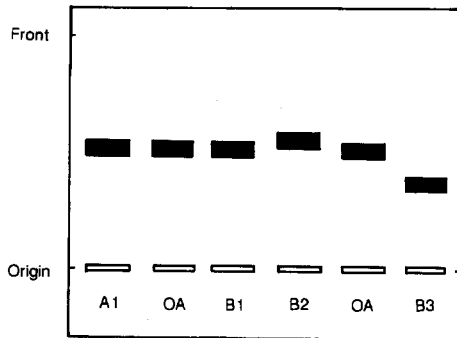


Fig. 3-2. Thin-layer chromatogram of oxolinic acid metabolites found in the bile of rainbow trout.  
 Solvent system : ethanol-water-28% ammonia water (12 : 7 : 1).  
 OA : Oxolinic acid.  
 A1, B1, B2, B3 were isolated from the bile by the procedure as shown in Fig. 3-1.

**Table 3-1.**  $R_f$  values and fluorescence of the metabolites found in the bile after oral administration of oxolinic acid to rainbow trout

Metabolite* <sup>1</sup>	Authentic sample	Solvent system* <sup>2</sup>			Fluorescence
		II	III	IV	
<b>A1, B1</b>	OA	0.46	0.55	0.41	Purple
<b>B2</b>		0.56	0.60	0.55	Light blue
<b>B3</b>		0.43	0.41	—	Yellow green

\*<sup>1</sup> The metabolites were isolated by the procedure as shown in Fig. 3-1.

\*<sup>2</sup> The solvent systems were employed as follows: II, *n*-butanol-acetic acid-water (4:1:1); III, ethanol-water-28% ammonia water (12:7:1); IV, ethanol-water (7:3).

OA: Oxolinic acid.

**Table 3-2.**  $R_f$  values, fluorescence, and retention time of the metabolites found in the bile after oral administration of oxolinic acid to rainbow trout

Metabolite* <sup>1</sup>	Authentic sample* <sup>2</sup>	Solvent system* <sup>3</sup>			Fluorescence	Retention time (min)* <sup>4</sup>
		II	III	IV		
<b>B2</b>	7-OHOA	0.56	0.60	0.55	Light blue	13.5
<b>B3</b>	6-OHOA	0.43	0.41	—	Yellow green	12.3

\*<sup>1</sup> The metabolites were isolated by the procedure as shown in Fig. 3-1.

\*<sup>2</sup> Chemical structures of compounds are shown in Fig. 1-1.

\*<sup>3</sup> The solvent systems were employed as follows: II, *n*-butanol-acetic acid-water (4:1:1); III, ethanol-water-28% ammonia water (12:7:1); IV, ethanol-water (7:3).

\*<sup>4</sup> High-performance liquid chromatography was performed on a Nucleosil C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 I.D. mm, Gasukurokogyo Co., Ltd.). The mobile phase was methanol 0.1 M citric acid-acetonitrile (6:4:1). Flow rate was 0.4 ml/min. Wavelength was 258 nm.

**Table 3-3.** Identification of oxolinic acid metabolites found in the bile and urine of rainbow trout

	Fat-soluble metabolite	Glucuronide
Bile	OA	OA-G, 7-OHOA-G, 6-OHOA-G
Urine	OA	OA-G,

OA: Oxolinic acid.

OA-G: Oxolinic acid glucuronide.

7-OHOA-G: 7-Hydroxy derivative glucuronide.

6-OHOA-G: 6-Hydroxy derivative glucuronide.

本実験のフラクション B は、各試料中のグルクロン酸抱合体（グルクロニド）のアグリコンを単離したものであり、検出および定量はオキシリン酸あるいはその脂溶性代謝物として行っているが、本来、これらは胆汁中においてはグルクロニドの状態で存在しているため、以下フラクション B で得られた各脂溶性代謝物（アグリコン）はすべてグルクロニドと表記する。すなわち、オキシリン酸投与後のニジマスの胆汁中からは、未変化のオキシリン酸の他に、オキシリン酸グルクロニド、7-OHOA グルクロニドおよび6-OHOA グルクロニドを確認した。

尿中から検出された代謝物の種類は胆汁中に比べて少なく、未変化のオキシリン酸と、オキシリン酸グルクロニドのみが検出された（Table 3-3）。

### 3. 考 察

7-OHOA はオキシリン酸のメチレンジオキシ環をもたず、6 位にメチル基、7 位に水酸基をもつ 7-ヒドロキシ-6-メトキシ体であり、6-OHOA はその異性体である 6-ヒドロキシ-7-メトキシ体である。7-OHOA グルクロニドおよび6-OHOA グルクロニドはいずれも哺乳動物の既知代謝物であり、前者はヒト<sup>30)</sup>、ラット<sup>28)</sup>、ウサギおよびイヌ<sup>31)</sup>において、後者はヒト<sup>30)</sup>およびラット<sup>28)</sup>において認められていることから、ニジマスにおけるオキシリン酸の代謝経路は哺乳動物と類似していることが分かった。

医薬品の中には、生体内で代謝されるとより高い薬理活性を獲得するものがあり、オキシリン酸と同じキノロン系合成抗菌剤であるナリジクス酸<sup>32)</sup>およびピロミド酸<sup>33)</sup>では、酸化代謝物はより強い抗菌活性を有している。オキシリン酸では、Dicarlo ら<sup>29)</sup>がオキシリン酸服用後のヒト尿中の代謝物についての 2 次元薄層クロマトグラフィーにおいて抗菌性物質 2 種を認めていることから、7-OHOA および6-OHOA も抗菌活性を有していることが予想された。これらのことから、養殖魚が食品として消費されることを考慮すると、医薬品の残留については投与された薬剤のみでなく、それらの代謝物についても十分考慮する必要がある。

## 第 2 節 ニジマスの胆汁および尿中代謝物の定量

哺乳動物においては薬物の主たる排泄経路は胆汁と尿であるが、代謝物の検出のための試料としては比較的採取の容易な尿を用いることが多く、オキシリン酸の場合もヒト<sup>30)</sup>およびラット<sup>28)</sup>等では尿を試料としている。しかし、ニジマスでは第 1 節において明らかにしたように、胆汁の方が尿よりも夾雑物が少なく、代謝物の同定が容易であったことから、代謝物検出のための試料としては尿よりも胆汁の方が適していると結論された。本章においては代謝物の検出方法についてさらに詳しく検討するために、ニジマスの胆汁および尿中におけるオキシリン酸の代謝物濃度を定量した。

### 1. 実験方法

養殖研究所において飼育されたニジマス（1 年魚）を用い、水温  $16 \pm 0.2^\circ\text{C}$  で試験した。胆汁を採取したニジマスの平均体重は 621g、採尿したニジマスの平均体重は 594g であった。

オキシリン酸の投与は第 2 章と同様の方法により行い、 $40\text{mg}/\text{kg}$  を経口投与した。3, 6, 12, 18, 24, 48, 120 および 312 時間後に 4 尾ずつ取り上げ、胆汁を採取した。採尿は、本章第 1 節と同様の方法により、4 尾から 120 時間後まで連続的に採取した。

試料中の代謝物の濃度の定量は、第1章に示す操作手順によって行った。

## 2. 結 果

胆汁での結果を Table 3-4 に示した。時間経過とともに胆汁中のオキシリン酸とその代謝物の濃度は高まり、48 時間後には、オキシリン酸は  $28.3\mu\text{g}/\text{ml}$ 、7-OHOA グルクロニドは  $11.9\mu\text{g}/\text{ml}$ 、6-OHOA グルクロニドは  $4.9\mu\text{g}/\text{ml}$ 、オキシリン酸グルクロニドは  $113.6\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度に達した。120 時間後にはオキシリン酸濃度は減少して  $18.4\mu\text{g}/\text{ml}$  となるが、グルクロ

**Table 3-4.** Changes in the concentrations of oxolinic acid and its metabolites excreted in the bile of rainbow trout after single oral administration\*<sup>1</sup>

Time after dosing (h)	OA	7-OHOA-G	6-OHOA-G	OA-G
3	$0.6 \pm 0.2^{*2}$	Tr	Tr	$0.2 \pm 0.5$
6	$0.4 \pm 0.4$	Tr	Tr	$0.6 \pm 1.0$
12	$4.7 \pm 1.9$	Tr	Tr	$4.4 \pm 4.2$
18	$6.6 \pm 5.5$	Tr	Tr	$31.9 \pm 21.8$
24	$18.1 \pm 13.5$	$1.4 \pm 1.3$	$0.7 \pm 0.5$	$34.0 \pm 37.1$
48	$28.3 \pm 12.0$	$11.9 \pm 2.3$	$4.9 \pm 1.0$	$113.6 \pm 40.4$
120	$18.4 \pm 3.4$	$16.0 \pm 8.8$	$7.7 \pm 4.9$	$128.0 \pm 26.3$

\*<sup>1</sup> Dose was 40 mg/kg.

\*<sup>2</sup> Values are given as mean  $\pm$  S.D. ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ),  $n = 4$ ,  $\text{Tr} < 0.001$ .

OA: Oxolinic acid.

OA-G: Oxolinic acid glucuronide.

7-OHOA-G: 7-Hydroxy derivative glucuronide.

6-OHOA-G: 6-Hydroxy derivative glucuronide.

**Table 3-5.** Changes in the concentrations of oxolinic acid and its metabolites excreted in the urine of rainbow trout after single oral administration\*<sup>1</sup>

Excretion period (day)	OA	7-OHOA-G	6-OHOA-G	OA-G
0 — 1	$0.05 \pm 0.01^{*2}$	$0.002 \pm 0.002$	Tr	$0.04 \pm 0.02$
1 — 2	$0.39 \pm 0.02$	$0.023 \pm 0.013$	$0.002 \pm 0.003$	$0.26 \pm 0.09$
2 — 3	$0.49 \pm 0.16$	$0.024 \pm 0.004$	$0.008 \pm 0.003$	$0.36 \pm 0.02$
3 — 4	$0.45 \pm 0.12$	$0.018 \pm 0.001$	$0.006 \pm 0.001$	$0.28 \pm 0.05$
4 — 5	$0.40 \pm 0.18$	$0.016 \pm 0.005$	$0.007 \pm 0.004$	$0.22 \pm 0.03$

\*<sup>1</sup> Dose was 40 mg/kg.

\*<sup>2</sup> Values are given as mean  $\pm$  S.D. ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ),  $n = 4$ ,  $\text{Tr} < 0.001$ .

OA: Oxolinic acid.

OA-G: Oxolinic acid glucuronide.

7-OHOA-G: 7-Hydroxy derivative glucuronide.

6-OHOA-G: 6-Hydroxy derivative glucuronide.

ニド3種の濃度は増加し、4物質の濃度の相対比はそれぞれ、11%、5%、9%および75%となった。

尿での結果を Table3-5 に示した。1日目の尿中の各物質の濃度はいずれも低く、6-OHOA グルクロニドは検出限界以下であった。2日目には、オキシリン酸は  $0.39\mu\text{g}/\text{ml}$ 、7-OHOA グルクロニドは  $0.02\mu\text{g}/\text{ml}$ 、6-OHOA グルクロニドは  $0.002\mu\text{g}/\text{ml}$ 、オキシリン酸グルクロニドは  $0.26\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度に達し、4物質の濃度の相対比はそれぞれ58%、3%、0.3%および39%であった。これらの値は投与後5日目までほとんど変化しなかった。

### 3. 考 察

第2章において、ニジマスの血清、筋肉、肝臓および腎臓におけるオキシリン酸濃度は、投与してから48時間後にそれぞれ最高値に達したが、本節の実験における胆汁中のオキシリン酸濃度でも同様な結果が得られた。一方、グルクロニド3種の胆汁中濃度は48時間後も増加する傾向がみられた。Kobayashi らは<sup>34,35)</sup>、ワキンをフェノールおよびペンタクロロフェノールに暴露した場合、初期には比較的少量の両薬剤が遊離形で胆汁排泄されるが、数時間以後にはそれらのグルクロニドが暴露時間とともに大量に排泄されてくることを報告している。本実験においても、ニジマスに経口投与されたオキシリン酸が肝細胞に取込まれて生成したグルクロン酸抱合体は、未変化のオキシリン酸より遅れて胆汁中に排泄されることが分かった。

尿では、1日目のオキシリン酸およびグルクロニド3種の濃度はいずれも低いが、2日目から5日目までの各濃度はほぼ一定していたことより、尿中へのオキシリン酸およびグルクロニドの排泄は2日目から本格的に始まり、これらの物質の尿中への1日当りの排泄量はほぼ一定であると推定された。

胆汁と尿について代謝物濃度を比較した場合、尿においては各代謝物の濃度が低く、特に6-OHOA グルクロニドが検出限界に近い  $0.002\mu\text{g}/\text{ml}$  であったのに対して、胆汁中の各代謝物の濃度は極めて高く尿の100倍以上であり、また、胆汁試料の方が取扱が容易であることから、オキシリン酸の代謝物検出のための試料としては胆汁の方が適することが明らかとなった。よって、以後の実験は胆汁試料を中心にして行った。

### 第3節 7種養殖魚の胆汁中代謝物の比較

本節ではオキシリン酸代謝の魚種差を調べることを目的として、ニジマス、ウナギ、テラピアの淡水魚3種、ならびにマダイ、マアジ、ブリ、ヒラメの海水魚4種を供試した。第1節および第2節の結果から、代謝物の検出に適する胆汁を試料として、オキシリン酸の代謝物を魚種間で比較した。

#### 1. 実験方法

ニジマス、ウナギ、テラピア、マダイ、マアジ、ブリおよびヒラメは、第2章において供試したのと同じものを用い、同様にオキシリン酸を投与し、胆汁を採取した。その後、第1節の Fig. 3-1 と同様の操作により、フラクションAに脂溶性代謝物を、フラクションBにグルクロニドのアグリコンを抽出し、各画分の分離薄層クロマトグラフィーにより代謝物を分離した。展開溶媒は、エタノール-水-28%アンモニア水(16:3:1, v/v, 展開溶媒I)を用いた。

## 2. 結 果

ニジマスでは、フラクション A 中に、未変化のオキシリン酸が 12 時間後から 72 時間まで検出された (Fig. 3-3, Table 3-6)。また、グルクロニド画分であるフラクション B 中には、12 時間後から 72 時間後までオキシリン酸グルクロニドが、24 時間後から 72 時間後まではその他に 7-OHOA グルクロニドおよび 6-OHOA グルクロニドも確認され、合計 3 種類のグルクロニドが認められた (Fig. 3-4, Table 3-7)。

ウナギでは、未変化のオキシリン酸が 6 時間後から 72 時間後まで検出され (Table 3-6)、オキシリン酸グルクロニドが 6 時間後から 72 時間後まで、7-OHOA グルクロニドおよび 6-OHOA グルクロニドが 24 時間後から 72 時間後まで認められた (Table 3-7)。

テラピアでは、ウナギと同じく、オキシリン酸が 6 時間後から 72 時間後まで検出された (Table 3-6)。グルクロニド画分については、24 時間後にはオキシリン酸、7-OHOA および 6-OHOA の各グルクロニドが検出されたが、48 および 72 時間後には 7-OHOA グルクロニドおよび 6-OHOA グルクロニドの 2 種のみが認められ、オキシリン酸グルクロニドは検出されなかった (Table 3-7)。

マダイでは、オキシリン酸が 6 時間後から 24 時間後まで検出されたが、48 時間以後は確認されなかった (Table 3-6)。グルクロニドとしては、12 時間後から 72 時間後まで 7-OHOA グルクロニドおよび 6-OHOA グルクロニドの 2 種のみが認められた (Table 3-7)。マダイでは

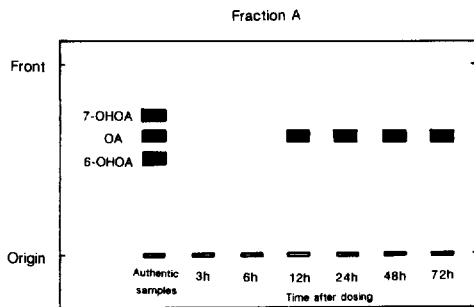


Fig. 3-3. Thin-layer chromatogram of fat-soluble metabolite in the fraction A of the bile after oral administration of oxolinic acid to rainbow trout (40mg/kg).

Solvent system : ethanol-water-28% ammonia water (16 : 3 : 1).

OA : Oxolinic acid.

7-OHOA and 6-OHOA are shown in Fig. 1-1.

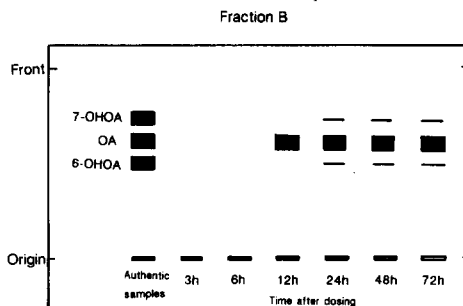


Fig. 3-4. Thin-layer chromatogram of glucuronide aglycones in the fraction B of the bile after oral administration of oxolinic acid to rainbow trout (40mg/kg).

Solvent system : ethanol-water-28% ammonia water (16 : 3 : 1)

OA : Oxolinic acid.

7-OHOA and 6-OHOA are shown in Fig. 1-1.



ニジマス、ウナギおよびテラピアの淡水魚3種とは異なり、オキシリン酸グルクロニドは検出されなかった。

**Table 3-6.** Fat-soluble metabolites found in the biles of various teleosts after oral administration of oxolinic acid\*<sup>1</sup>

Species	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
	OA,7A,6A	OA,7A,6A	OA,7A,6A	OA,7A,6A	OA,7A,6A	OA,7A,6A
Rainbow trout			+	+	+	+
Japanese eel		+	+	+	+	+
Tilapia		+	+	+	+	+
Red sea bream		+	+	+		
Japanese mackerel	+	+	+			
Yellowtail	+	+	+			
Japanese flounder		+	+	+		

\*<sup>1</sup> Dose was 40 mg/kg.

OA: Oxolinic acid.

7A: 7-Hydroxy derivative (7-OHOA).

6A: 6-Hydroxy derivative (6-OHOA).

+ : Detected by thin-layer chromatography.

**Table 3-7.** Glucuronides found in the biles of various teleosts after oral administration of oxolinic acid\*<sup>1</sup>

Species	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
	OG,7G,6G	OG,7G,6G	OG,7G,6G	OG,7G,6G	OG,7G,6G	OG,7G,6G
Rainbow trout			+	+	+	+
Japanese eel		+	+	+	+	+
Tilapia				+	+	+
Red sea bream			+	+	+	+
Japanese mackerel				+	+	+
Yellowtail		+	+	+	+	+
Japanese flounder			+	+	+	+

\*<sup>1</sup> Dose was 40 mg/kg.

OG: Oxolinic acid glucuronide.

7G: 7-Hydroxy derivative glucuronide.

6A: 6-Hydroxy derivative glucuronide.

+ : Detected by thin-layer chromatography.

マアジでは、オキシリン酸が3時間後から検出され、12時間後まで確認された (Table 3-6)。グルクロニドとしては、24時間後から72時間後まで7-OHOA グルクロニドおよび6-OHOA グルクロニドの2種が認められ、オキシリン酸グルクロニドは検出されなかった (Table 3-7)。

ブリでは、マアジと同様に、オキシリン酸が3時間後から12時間後まで検出された (Table 3-6)。7-OHOA グルクロニドおよび6-OHOA グルクロニドは6時間後から72時間後まで検出された (Table 3-7)。これらのグルクロニド2種はブリでは6時間後に検出され、ニジマス、ウナギ、テラピア、マアジの24時間後、マダイ、ヒラメの12時間後と比べると、7魚種中では最も早く出現した (Table 3-7)。

ヒラメでは、オキシリン酸およびグルクロニドともにマダイと同じ結果が得られた (Tables 3-6 および 3-7)。

以上のように、供試したすべての魚種において未変化のオキシリン酸が検出された。グルクロニドとしては、ニジマス、ウナギおよびテラピアの淡水魚3種ではオキシリン酸グルクロニド、7-OHOA グルクロニドおよび6-OHOA グルクロニドの3種が確認されたのに対して、マダイ、マアジ、ブリおよびヒラメの海水魚4種では7-OHOA グルクロニドおよび6-OHOA グルクロニドの2種のみが検出され、オキシリン酸グルクロニドは検出されず、代謝物に種差が認められた。また、これらの代謝物のうち、オキシリン酸およびオキシリン酸グルクロニドが試験期間の比較的初期に出現し、その後、7-OHOA グルクロニドおよび6-OHOA グルクロニドが出現する傾向が認められた。

### 3. 考 察

本章においてオキシリン酸グルクロニドが淡水魚3種では認められ、海水魚4種では認められないことから、オキシリン酸代謝酵素の活性が両者で異なることが分かった。さらに、未変化のオキシリン酸は淡水魚3種では72時間後まで検出されるが、海水魚4種では試験期間の比較的初期に検出されるのみで、48時間以後は全く検出されず、代謝物の7-OHOA グルクロニドおよび6-OHOA グルクロニドのみが検出されたことから、海水魚4種では淡水魚3種に比べてオキシリン酸代謝酵素の活性が相対的に強いことが分かった。第2章において、海水魚では淡水魚に比べてオキシリン酸の体内残留期間が短いことを明らかにしたが、この原因は本章で明らかになったように、オキシリン酸代謝酵素の活性が海水魚では淡水魚に比較して高いことにあると結論された。

ただし、オキシリン酸グルクロニドが認められた淡水魚3種においても、ニジマスおよびウナギでは試験期間の比較的全般にわたってオキシリン酸グルクロニドが検出されているのに対し、テラピアでは24時間後のみに検出された (Table 3-7) ことは、淡水魚3種の間にもオキシリン酸代謝酵素の作用に差があることを示唆している。

哺乳動物ではオキシリン酸は肝ミクロソームによる酸化等の反応を受けて7-OHOA および6-OHOA となり、続いてグルクロン酸抱合されることが分かっており<sup>28,30)</sup>、ラット、ウサギ、イヌ<sup>31)</sup>、ヒト<sup>30)</sup>あるいはマウス<sup>28)</sup>では遊離型と抱合型 (グルクロニド) の7-OHOA および6-OHOA が検出されている。一方、魚類では供試した全魚種において抱合型 (グルクロニド) の7-OHOA および6-OHOA は確認されたが (Table 3-7)、遊離型の7-OHOA および

6-OHOA は検出されなかった (Table 3-6) ことから、魚類においては哺乳動物の場合と異なり、肝ミクロソームの酸化酵素系の活性がグルクロン酸抱合酵素の活性に比べて相対的に弱く、生成した 7-OHOA および 6-OHOA は即座に抱合されたものと推定される。

以上のような代謝の魚種差はオキシリン酸以外の医薬品でも起こり、投与医薬品の薬効や残留が魚種によって大きく異なることも推察される。すなわち、魚類への投薬時には魚種間における薬物代謝酵素活性の差を十分考慮して処方する必要があることが示唆された。

## 第4章 コイにおけるオキシリン酸の代謝経路

第3章において養殖魚7種におけるオキシリン酸の代謝物を比較し、淡水魚では3種の、海水魚では2種のグルクロン酸抱合体（グルクロニド）が検出され、淡水魚と海水魚では代謝物に魚種差のあることが明らかになった。よって、本章ではコイにおけるオキシリン酸の代謝経路を解明し、オキシリン酸代謝物の魚種差の原因について検討した。

### 第1節 *In vitro* 代謝による生成代謝物の検出

魚類においても哺乳動物と同様に、肝臓の酵素系によってオキシリン酸が代謝されることを明らかにするために、コイの肝臓（以下、コイ肝臓）のホモジネートを用いて、*in vitro* の代謝実験を行った。

#### 1. 実験方法

コイは、東京都水産試験場より入手した平均体重55gの当才魚を用いた。コイを24時間絶食させた後に即殺し、直ちに肝臓を摘出した。摘出した肝臓は、酵素の失活を防ぐため、氷冷下で以下の操作を行った。肝臓表面を1.15%塩化カリウム-0.02M トリス-塩酸緩衝液（pH 7.4）で洗浄し、ろ紙で表面の水分を除去した後に、肝臓を細断し、2倍容の上記緩衝液とともにPotter型テフロンホモジナイザーに移し、ホモジナイズした。ホモジネートを9,000×gで20分間冷却遠心分離し、その上清を9,000×g粗上清画分として用いた。タンパク質の定量はLowryらの方法<sup>36)</sup>によった。試料は9,000×g粗上清画分1ml（タンパク量として約10mg）に基質としてオキシリン酸を0.3μmol、補酵素としてS-アデノシルメチオニン（ワコー純薬工業株式会社製）を0.6μmol加え、全体を1.15%塩化カリウム-0.02M トリス-塩酸緩衝液（pH 7.4）で5mlに調製した。つぎに、7-OHOA および6-OHOA を基質として加えた試料を同様の条件で調製した。さらに、オキシリン酸0.3μmolを基質とし、各種の補酵素（NADPH, NADP, NADH および NAD は100μmol, CoA, アセチル CoA, ATP および FMN は10 μmol）を加えた試料を同様に調製した。

オキシリン酸の既知代謝物である7-OHOA および6-OHOA は、オキシリン酸のメチレンジオキシ環が開環してできたカテコール型の誘導体に、メチル基が反応したものである<sup>28)</sup>。一方、メチル化酵素についての詳しい報告は魚類では見当たらないが、魚類肝臓の薬物酸化酵素についての報告は数多くあり、たとえば、GarrettoとKhan<sup>37)</sup>は、供試魚を冷水魚と温水魚に分類し、肝臓の酸化酵素活性の最高値は冷水魚で26℃、温水魚で37℃に認められたと報告している。また、アニリンヒドロキシラーゼ活性も冷水性のニジマスの至適温度は25℃であり、ラットの37℃に比べて低いことが報告されている<sup>38)</sup>。一方、温水性のアカエイ (*Dasyatis sabina*) およびsheepshead (タイ科, *Archosargus probatocephalus*) のベンゾ(a)ピレンヒドロキシラーゼ活性の至適温度はそれぞれ40および37℃であることが報告されている<sup>39)</sup>。これらのことから、酸化酵素の至適温度は各魚種の適水温に影響されると推察されたので、本実験では温水性のコイを用いたことから、既報の酸化酵素活性の結果に準じて*in vitro* 代謝実験は37℃で行った。

それぞれの調製液を好氣的条件下において 37°C で 60 分間振とうし、その後クロロホルムを加えて反応を止めた。反応混合物をクロロホルムで抽出し、その抽出物を薄層クロマトグラフィーに供し、生成代謝物を検出した。展開溶媒はエタノール-水-28%アンモニア水 (12:7:1, v/v, 展開溶媒Ⅲ) を用いた。

## 2. 結 果

Fig. 4-1 に示すように、オキシリン酸を基質とし、S-アデノシルメチオニンを補酵素とした *in vitro* 代謝実験によって、標品の 7-OHOA および 6-OHOA と完全に一致する ( $R_f$  値 = 0.90, 0.68) 生成物が得られた。また、同様の条件で 7-OHOA および 6-OHOA を基質とした *in vitro* 代謝実験、ならびにオキシリン酸を基質として S-アデノシルメチオニンを除く各補酵素を添加した *in vitro* 代謝実験においては、それぞれの基質が回収されたのみであった。

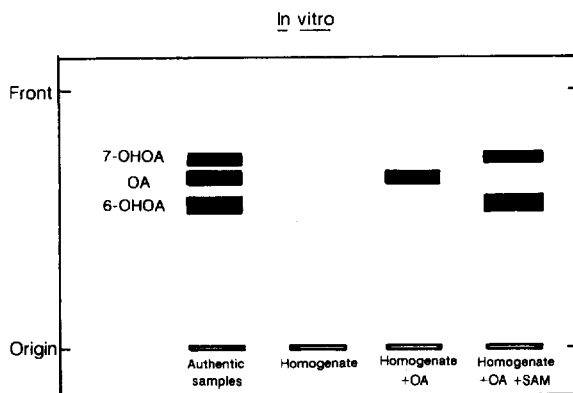


Fig. 4-1. Thin-layer chromatograms of fat-soluble metabolites in the liver homogenate after incubation with oxolinic acid.

Solvent system : ethanol-water-28% ammonia water (12 : 7 : 1).

OA : Oxolinic acid.

SAM : S-adenosylmethyonine.

7-OHOA and 6-OHOA are shown in Fig. 1-1.

## 3. 考 察

本研究において、オキシリン酸から 7-OHOA および 6-OHOA が生成したことより、コイ肝臓の 9,000 × g 粗上清画分に含まれる酵素系によって、オキシリン酸が 7-OHOA および 6-OHOA に容易に代謝されることが分かった。一方、7-OHOA および 6-OHOA については同様の代謝実験の結果、それぞれの基質のみが回収されたことから、7-OHOA が 6-OHOA、あるいは 6-OHOA が 7-OHOA を経路することはなく、それぞれ独自の経路によって生成することが分かり、また、7-OHOA および 6-OHOA がさらにメチル化されないことが判明した。さらに、7-OHOA および 6-OHOA 以外の代謝物を検出するために、各種の補酵素を添加した実験においても、基質のみが回収されたことから、オキシリン酸が酸化、還元あるいは加水分解等のいわゆる薬物代謝における第一相反応を受けて、7-OHOA および 6-OHOA 以外の物質に代

謝されることはないと推定された。

## 第2節 薬物代謝酵素の誘導方法の検討

Crewら<sup>31)</sup>および藤原ら<sup>28)</sup>によって行われたラット、イヌおよびヒト等の哺乳動物でのオキシリン酸の代謝実験では、尿中に遊離の7-OHOAおよび6-OHOAが検出されている。

また、魚類では哺乳動物に比べて薬物代謝に関与する酸化酵素系の活性が極めて低いことが知られ、たとえば、シトクロームP-450含量<sup>40)</sup>はラット、マウス、ウサギではそれぞれ0.72, 0.99, 1.55nmol/mg-microsomal proteinであるのに対し、コイで0.38, ニジマスで0.22nmol/mg-microsomal proteinと哺乳動物に比べて低いことが報告されている。また、肝臓のアゾレダクターゼ活性<sup>41)</sup>もマウスでは6.8 $\mu$ mol/h/g-liverであるのに対し、ツノザメで0.33 $\mu$ mol/h/g-liver, アカエイで0.76 $\mu$ mol/h/g-liver, カマス (barracuda) で0.76 $\mu$ mol/h/g-liverと低いことが明らかになっている。

一方、著者の行ったニジマス等の魚類における実験では、第2章に示したように、グルクロン酸抱合されていない遊離の7-OHOAおよび6-OHOAは検出されなかった。また、7-OHOAおよび6-OHOAは肝臓ミクロソーム中の酵素によって酸化されて生じると推定されている<sup>30)</sup>ので、このように魚類における酸化酵素系の活性が低いことを考慮すると、第2章で得られた結果から、オキシリン酸の代謝酵素の活性も哺乳動物に比べて低いことが推察された。そこで、誘導剤によって魚類の酸化酵素系の活性を高めれば、魚類においても遊離の7-OHOAおよび6-OHOAが検出できるのではないかと考えられた。

酸化酵素系の誘導型としては、哺乳動物では、シトクロームP-450系が誘導されるフェノバルビタール型と、シトクロームP-450系が誘導されるメチルコラントレン型がある。魚類においては、PCB (ポリ塩化ビフェニル)、3-メチルコラントレン、石油あるいは $\beta$ -ナフトフラボン等の多くの化学物質によって酸化酵素系が誘導され<sup>42)</sup>、メチルコラントレン型の誘導は確認されているが、フェノバルビタール型の誘導についてはいまだに明らかとなっていない<sup>42,43)</sup>。そこで、本節では、哺乳動物あるいは魚類いずれにおいても明らかにメチルコラントレン型誘導を促す3-メチルコラントレンと、メチルコラントレン型およびフェノバルビタール型の両誘導を促すPCBを誘導剤として用いて、代謝酵素活性の誘導方法について検討した。

### 1. 実験方法

コイは、熊本県下の杉本養鯉場より入手した平均体重97gの当才魚を用い、水温19 $\pm$ 1 $^{\circ}$ Cで試験した。誘導剤として、PCB (東京化成製 PCB 48) および3-メチルコラントレン (ワコー純薬工業株式会社製) (Fig. 4-2) を用いた。誘導剤の投与方法は、誘導剤を添加した飼料を給餌しながら投与方法 (給餌法) と、誘導剤をコーン油に混入させて、それを腹腔内に注射する方法 (注射法) によって行った (Table 4-1)。

**給餌法** PCBをアセトンに溶解し、その適量を市販のコイ用飼料 (キョーリン株式会社製) にスポットした。風乾してアセトンを除いて投薬試料を得た。PCBの1回の投与量が魚体重1kgあたり1mgに (1mg/kg), また、給餌量が1%となるように給餌し、14日間連続投与した (B区)。また、対照区には市販のコイ用飼料を同量給餌した (A区)。

**注射法** 誘導剤にはPCBおよび3-メチルコラントレンを用いた。誘導剤をコーン油に混入さ

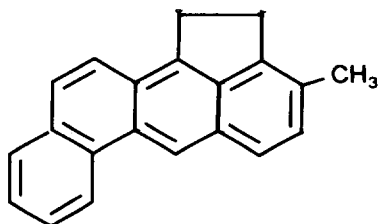


Fig. 4-2. Chemical structure of 3-methylcholanthrene (3MC).

Table 4-1. Induction method of drug-metabolizing enzyme in carp

Group	A	B	C	D	E	F
Method	Oral	Oral* <sup>1</sup>	Inj.* <sup>2</sup>	Inj.* <sup>2</sup>	Inj.* <sup>2</sup>	Inj.
Inducer	Cont.(diet)	PCB(diet)	PCB(oil)	PCB(oil)	3MC(oil)	Cont.(oil)
Dose(mg/kg)	0	1	7	30	30	0
Times	—	14	2	2	2	2
Total dose	0	14	14	60	60	0

\*<sup>1</sup> Carp fed on diet added with inducer.

\*<sup>2</sup> Carp was injected inducers mixed with corn oil intraperitoneally.

PCB: Polychlorinated biphenyl.

3MC: 3-Methylcholanthrene.

せ、魚体重 1kg あたり 0.2ml の容量を腹腔内に投与した。PCB の 1 回の投与量は 7mg/kg (C 区) および 30mg/kg (D 区) とし、3-メチルコラントレンの 1 回の投与量は 30mg/kg (E 区) とした。初回投与後 4 日目に再度注射し、合計で 2 回投与した。対照区にはコーン油を同量投与した (F 区)。

**細胞分画** コイの肝臓を摘出し、細断した後に氷冷し、結締組織や脂肪組織を除去した。9 倍量の 0.25M ショ糖溶液 (10mM トリス-塩酸緩衝液, pH 7.5) を加え、Potter 型テフロンホモジナイザーでホモジナイズし、調製したホモジネートを Fig. 4-3 に示す方法により分画した。ミクロソーム画分と可溶性画分の分画には日立製分離用超遠心機 55P-7 型 (ローター: RP-65 型) を使用し、分画中 (75,000×g, 2.7 時間) の温度は 0°C に保った。

**酵素活性の測定** 得られたミクロソーム画分について、シトクローム P-450 含量<sup>44)</sup> (Fig. 4-4) およびベンゾ(a)ピレンヒドロキシラーゼ<sup>45)</sup> (Fig. 4-5), *p*-ニトロアニソール-O-デメチラーゼ<sup>46)</sup> (Fig. 4-6), *p*-ニトロフェノール-UDP-グルクロニルトランスフェラーゼ (Fig. 4-7) の各活性を測定した。各画分のタンパク含量は Lowry らの方法<sup>36)</sup> で定量した。

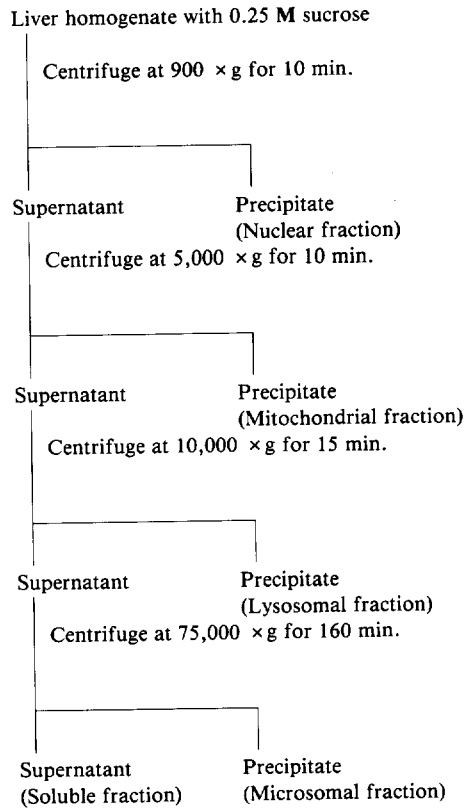


Fig. 4-3. Procedure of cell fractionation.

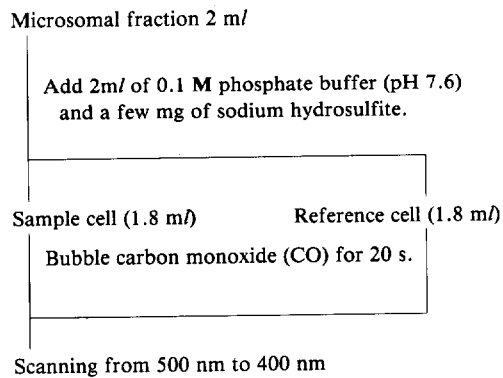


Fig. 4-4. Determination of cytochrome P-450.<sup>4)</sup>



## Microsomal fraction 0.05 ml

Add 0.1 ml of 0.5 M Tris-HCl buffer (pH 7.6),  
each 0.25 ml of 0.1 M magnesium chloride,  
0.1 M glucose-6-phosphate, glucose-6-phosphate  
dehydrogenase (20 units/ml), and 0.01 ml of  
<sup>14</sup>C-benzo(a)pyrene (10 $\mu$ Ci/ml in acetone).

Preincubate for 5 min at 30°C.

Add 0.025 ml of 10 mM NADPH and 0.03 ml of  
6 mM NADH.

Incubate for 20 min at 30°C.

Add 1 ml of 0.15 M potassium hydroxide in 85%  
DMSO and 3 ml of hexane.

Shake for 5 min and centrifuge at 3,000 rpm for  
5 min.

Aqueous layer

Hexane layer

Repeat 3 times the extraction.

Aqueous layer

Add 0.005 ml of 6N hydrochloric acid and 15 ml  
of ACS-II aqueous counting scintillator.

Counting by liquid scintillation counter

Fig. 4-5. Assay of benzo (a) pyrene hydroxylase.<sup>46)</sup>

## Microsomal fraction 0.25 ml

Add 0.5 ml of 1 M *p*-nitroanisole in 0.2 M Tris-HCl buffer  
(pH 7.8), and each 0.05 ml of 0.01 M magnesium chloride,  
0.1 M glucose-6-phosphate, glucose-6-phosphate  
dehydrogenase (20 units/ml), and distilled water.

Preincubate for 5 min at 30°C.

Add 0.05 ml of 10 mM NADPH.

Incubate for 20 min at 30°C.

Add 1 ml of 0.2N potassium hydroxide in 20% glycerol—1%  
Triton X-100.

Measuring at 400 nm

Fig. 4-6. Assay of *p*-nitroanisole-O-demethylase.<sup>46)</sup>

## Microsomal fraction 50 ml

Add 125 ml of 0.04 M phosphate buffer, 12.5 ml of 10 M magnesium chloride, 50 ml of 50 mM *p*-nitrophenol, and 212.5 ml of distilled water.

Preincubate for 5 min at 30°C.

Add 50 ml of 10 mM UDPGA.

Incubate for 10 min at 30°C.

Heat for 5 min at 80°C.

Centrifuge at 3,000 rpm for 20 min.

## Supernatant 0.5 ml

Ultrafiltrate.

Analysing by HPLC (absorbance, 300 nm: column, ODS-80T<sub>M</sub>: flow rate, 0.8 ml/min.: column temperature, 40°C)

Fig. 4-7. Assay of *p*-nitrophenol-UDP glucuronyltransferase.  
HPLC: high-performance liquid chromatography.

Table 4-2. Induction of drug-metabolizing enzymes in carp treated with polychlorinated biphenyl or 3-methylcholanthrene

Method of investigation* <sup>1</sup>	A Oral Cont.	B Oral PCB	C Inj. PCB	D Inj. PCB	E Inj. 3MC	F Inj. Cont.
Body weight (g)	94.2	98.4	96.5	98.0	96.8	91.5
Liver % body weight (g)	1.7	1.8	2.9	2.9	2.9	1.5
Microsomal protein (mg/g)	3.9	6.0	5.7	7.0	6.9	5.1
Cytochrome P-450 content* <sup>2</sup>	0.07	0.32	0.27	0.21	0.34	0.17
Benzo(a)pyrene hydroxylase* <sup>3</sup>	≤0.01	0.19	0.23	0.22	0.25	0.015
<i>p</i> -Nitroanisole- <i>O</i> -demethylase* <sup>3</sup>	0.22	0.24	0.27	0.19	0.37	0.28
UDP glucuronyltransferase* <sup>3</sup>	2.0	3.0	1.5	1.5	1.4	0.8

\*<sup>1</sup> Method of investigation: A, B, C, D, E, and F are shown in Table 4-1.

\*<sup>2</sup> nmol/mg-microsomal protein.

\*<sup>3</sup> nmol/min/mg-microsomal protein.

A microsomal fraction contained the liver from five individuals.

Three microsomal samples were prepared for each experimental group. One sample was used for blank test and the remaining two samples were used for enzyme assay.

## 2. 結 果

各酵素活性の測定値を Table 4-2 に示した。魚体重あたりの肝臓重量は、給餌法では、誘導処理した B 区と対照の A 区では差がみられなかった。一方、注射法では、誘導処理した C 区、D 区および E 区の肝臓重量は、対照区 (E 区) に比べて約 2 倍に肥大しており、赤みがかった色を呈していた。

ミクロソームの蛋白量は、給餌法では誘導処理した B 区の値を対照の A 区と比べると 1.5 倍であった。注射法では誘導処理の C 区は対照の F 区と大きな差はなかったが、D 区および E 区ともに 1.4 倍となり、給餌法と同様の傾向がみられた。

シトクローム P-450 含量は注射法に比べて給餌法で誘導され易く、B 区は 4.6 倍であった。注射法では C、D および E の各処理区ではそれぞれ 1.6 倍、1.2 倍、2.0 倍の割合で誘導され、3-メチルコラントレンで処理した E 区の方が、PCB で処理した C および D 区に比べて誘導され易かった。

ベンゾ(a)ピレンヒドロキシラーゼ活性は両法ともに高い誘導を示し、給餌法の B 区では 19 倍以上に誘導されていた。注射法の C、D および E 区はそれぞれ 15.3 倍、14.6 倍および 16.7 倍であり、わずかに F 区の 3-メチルコラントレン処理区の方が PCB 処理区に比べて誘導され易かった。

$\rho$ -ニトロアニソール-O-デメチラーゼ活性は、給餌法では PCB 処理した B 区と対照区で差がなかった。注射法でも PCB 処理した C および D 区では誘導されなかったが、E 区の 3-メチルコラントレン処理区では 1.3 倍に誘導されていた。

$\rho$ -ニトロフェノール-UDP-グルクロニルトランスフェラーゼ活性は給餌法では B 区で 1.5 倍に誘導されていた。注射法では C、D および E 区でそれぞれ 1.9 倍、1.9 倍および 1.8 倍に誘導されていた。

以上のように、給餌法および注射法ともに誘導剤で処理した区 (B, C, D, E) において薬物代謝酵素の誘導がみられ、特に、シトクローム P-450 含量およびベンゾ(a)ピレンヒドロキシラーゼ活性が強く誘導されていた。

## 3. 考 察

Kobayashi ら<sup>10)</sup>は、PCB 1mg/kg を 10 日間コイに経口投与すると、ミクロソームのシトクローム P-450 含量は約 3 倍に増加することを報告している。本実験においても、給餌法の PCB 処理 (B) 区でシトクローム P-450 含量は約 4.6 倍に誘導されており、同様の結果が得られた。注射法の PCB 処理区である C 区および D 区においてもシトクローム P-450 含量は給餌法の B 区とほぼ同じ含量を示した。また、ベンゾ (a) ピレンヒドロキシラーゼ活性も B 区、C 区および D 区の値は類似していた。これらのことから、厳密な定量については未検討であるが、B 区、C 区および D 区の各処理区の薬物酸化酵素系の活性は、誘導剤処理によってほぼ最大限に達したと推定され、各区の全 PCB 投与量 (B 区および C 区では 14mg/kg, D 区では 60mg/kg) はこれら酸化系酵素の活性を誘導するのに十分な量であったと推定された。さらに、注射法では誘導剤処理区 (C, D, E) で肝臓が肥大していたことから、魚体重あたりの各酵素活性の値はさらに高まると考えられた。また、F 区はコーン油のみを投与した区であるが、F 区のシトクローム P-450 含量は給餌法の対照である A 区よりやや高かったことから、コーン油が

シトクローム P-450 系の酵素の誘導に若干影響を与えることが推察された。

3-メチルコラントレン (60mg/kg) を注射投与した E 区では、PCB 処理した C および D 区よりもシトクローム P-450 含量および  $p$ -ニトロアニソール-O-デメチラーゼ活性がわずかに高かった。哺乳動物において PCB はメチルコラントレン型およびフェノバルビタール型の両誘導を促すことが知られていることを考慮すると、魚類においても哺乳動物と同様に、3-メチルコラントレンと PCB では酸化酵素の誘導パターンが異なることが推察された。

本章では 2 種類の投与方法について比較検討したが、給餌法は注射法に比べて簡便であり、投与量も少なく安全であることから、コイにおけるオキシリン酸代謝酵素を誘導する方法としては、B 区の方法が適当であると考えられた。また、B 区の方法で PCB 処理したコイの誘導薬物代謝酵素は 12 週間後も高い活性を維持するので<sup>7)</sup>、長期間にわたる実験にも供試できると考えられる。

### 第 3 節 誘導剤処理したコイでの胆汁中代謝物の検出

第 2 節において誘導方法を検討し、適当と考えられた経口投与によって薬物酸化酵素を誘導し、活性を最大限に増大させたコイにオキシリン酸を投与し、胆汁中のオキシリン酸代謝物の分析を試みた。

#### 1. 実験方法

PCB 経口投与によって薬物酸化酵素系の活性を増大させた、第 2 節の B 区のコイ (PCB 処理コイ) を用いた。この PCB 処理コイにオキシリン酸を 80mg/kg となるように強制経口投与し、72 時間後にその胆汁を採取した。胆汁は第 3 章と同様の方法によってフラクション A および B に分画した後、薄層クロマトグラフィーで代謝物を検出した。対照として、PCB 無処理のコイについても同様にオキシリン酸を投与し、その胆汁を分析した。

#### 2. 結果

PCB 処理コイおよび無処理コイの胆汁中代謝物の薄層クロマトグラフィーの結果を Fig. 4-8 に示した。PCB 処理コイでは、フラクション A および B において原点に新しい代謝物 (X) が一つ認められた。X は Rf 値が 0 であることと、Pauly 試薬の呈色反応に陽性であったことから、フェノール性水酸基を有する 6,7-diOHOA (1-エチル-1,4-ジヒドロ-6,7-ジヒドロキシ-4-オキソ-3-キノリンカルボン酸, Fig. 4-9) と推定された。次に、第 3 章第 1 節と同様の方法によって、X と 6,7-diOHOA (住友化学工業株式会社製) の同時薄層クロマトグラフィーを行ったところ、X は 6,7-diOHOA と同じ Rf 値を示したことから、6,7-di-OHOA と推定された。

無処理コイと PCB 処理コイのクロマトグラム (Fig. 4-8) の比較から、PCB 処理コイでは、無処理コイで検出された代謝物、すなわちオキシリン酸、7-OHOA および 6-OHOA の各グルクロニドの他に、遊離形の 7-OHOA および 6-OHOA の存在が確認された。また、遊離形の 6,7-diOHOA およびそのグルクロニドの存在が推定された。

フラクション B のクロマトグラムから、無処理コイではオキシリン酸グルクロニドが主要な代謝物であり、各スポットの大きさや濃淡から 7-OHOA グルクロニドおよび 6-OHOA グルクロニドは副次的な代謝物であることが推定された。一方、同様なクロマトグラムの検討の結果、

PCB 処理コイではオキソリン酸グルクロニドは副次的な代謝物であり、7-OHOA グルクロニドおよび6-OHOA グルクロニドが主要代謝物であることが推定された。

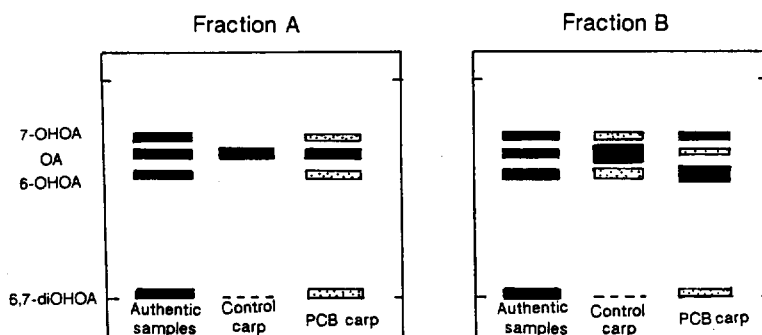
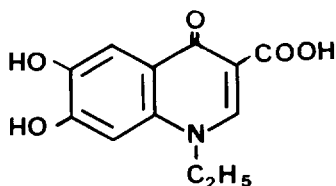


Fig. 4-8. Thin-layer chromatograms of metabolites of oxolinic acid after single oral administration to carp treated with polychlorinated biphenyl.  
Solvent system : ethanol-water-28% ammonia water (12 : 7 : 1).  
OA : Oxolinic acid.  
7-OHOA and 6-OHOA are shown in Fig. 1-1.  
6,7-diOHOA is shown in Fig. 4-9.  
PCB carp : Carp treated with polychlorinated biphenyl.



Catechol derivative  
(6,7-diOHOA)

Fig. 4-9. Chemical structure of a dihydroxy metabolite of oxolinic acid.

### 3. 考 察

本研究において、オキソリン酸投与後のコイの胆汁中に、遊離形の6,7-diOHOA, 7-OHOA, 6-OHOA および6,7-diOHOA グルクロニドが新たに検出されたことから、コイにおけるオキソリン酸の代謝経路は Fig. 4-10 のように推定された。遊離の6,7-diOHOA が、PCB 処理で酵素誘導することによって得られたことから、魚体内でオキソリン酸の一部はそ

のメチレンジオキシ環が開裂して6,7-diOHOA となることが分かった。さらに、7-OHOA および6-OHOA が同様のPCB処理で検出されたことから、6,7-diOHOAの7位もしくは6位がそれぞれメチル化されて7-OHOA および6-OHOA が生成し、最終的にこれらの脂溶性代謝物(6,7-diOHOA, 7-OHOA, 6-OHOA)と未変化のオキシリン酸がグルクロン酸抱合されることが明らかとなった。また、PCB処理コイではマイクロソーム中の酸化酵素系が誘導されていたことから(第4章第2節)、Dicalroら<sup>30)</sup>が推定しているように、Fig. 4-10におけるオキシリン酸から6,7-diOHOAへの反応にはマイクロソームの酸化酵素系が関与していると考えられる。

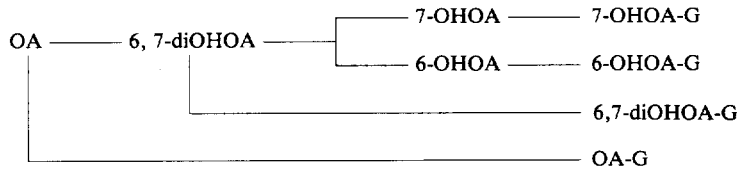


Fig. 4-10. Metabolic pathway of oxolinic acid in carp.

OA : Oxolinic acid.

G : Glucuronic acid.

7-OHOA and 6-OHOA are shown in Fig. 1-1.

6,7-diOHOA is shown in Fig. 4-9.

本節では代謝物の厳密な定量は行っていないが、薄層クロマトグラフィーにおける各スポットのサイズおよび濃淡から判断すると、無処理コイにおける主要代謝物はオキシリン酸グルクロニドであり、PCB処理コイでは7-OHOA グルクロニドおよび6-OHOA グルクロニドが主要代謝物であった。メチル化反応に関与するカテコール-O-メチルトランスフェラーゼは哺乳動物では誘導を受けないことが知られており<sup>49)</sup>、魚類においても哺乳動物と同様にメチル化酵素活性は誘導されないと仮定すると、PCBを用いた誘導処理によって、6,7-diOHOA生成能が大幅に増大し、その結果オキシリン酸の代謝が著しく促進されたものと推定された。第3章において、ニジマス、ウナギ、テラピアの淡水魚3種ではオキシリン酸グルクロニドが主要代謝物であり、一方、マダイ、アジ、ブリ、ヒラメの海水魚4種ではオキシリン酸グルクロニドは検出されず、7-OHOA グルクロニドおよび6-OHOA グルクロニドが主要代謝物であったが、これらの現象は本節で得られた結果と類似している。これは、淡水魚および海水魚の両者間で酸化酵素系の活性が異なり、6,7-diOHOAの生成能に大きな差が生じたためと考えられる。すなわち、淡水魚であるコイを用いたPCB処理による酸化酵素系の誘導実験により得られた酸化代謝物が、第3章で行った海水魚の結果と一致したことにより、供試した海水魚(4種)では淡水魚(3種)に比べて酸化酵素系の活性が高かったものと推定される。

#### 第4節 誘導剤処理したコイでの *in vitro* 代謝

前節において、PCB処理したコイにオキシリン酸を投与することにより、その胆汁中に遊離形の7-OHOA および6-OHOA とともに、遊離形の6,7-diOHOA、ならびにそれらの各グルクロニド抱合体の生成を確認することができた。本節では、コイにおけるこれらオキシリン酸代

謝物の生成を動力学的に解析するために、コイの肝臓を細胞分画し、*in vitro*における代謝実験を行った。

### 1. 実験方法

第2節におけるB区と同様のPCB処理を行い、薬物酸化酵素系の活性を最大限に増大させたコイを用いた。*In vitro*代謝実験の操作手順はFig. 4-11に示すとおりである。すなわち、PCB処理コイの肝臓を摘出し、細胞分画を行い、ミクロソームおよび可溶性画分を調製した。これらの画分にオキソリン酸を基質濃度が1mMになるように加え、グルコース6-リン酸、塩化マグネシウム、グルコース6-リン酸脱水素酵素等の補酵素も添加した。さらに、NADPHあるいはS-アデノシルメチオニンを加えて反応を開始させた。反応温度は30あるいは37°C、反応時間は20あるいは60分間とした。反応の停止は沸騰水中で反応混液を加熱することによって行った。その後、反応混液を遠心分離し、上清を限外ろ過して得られたろ液を、高速液体クロマトグラフィーにより分析した。対照としては無処理のコイ肝臓試料を用いた。標品オキソリン酸、7-OHOA、6-OHOAおよび6,7-diOHOAのクロマトグラムはFig. 4-12に示すようであった。

Microsomal fraction 0.5 ml and soluble fraction 0.6 ml.

Add 0.1 ml of 0.1 M glucose-6-phosphate, 0.025 ml of glucose-6-phosphate dehydrogenase (20 units/ml), 0.01 ml of 0.4 M magnesium chloride, 0.3 ml of 1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5), 0.065 ml of water, and 0.2 ml of 10 mM oxolinic acid.

Preincubate for 5 min at 30 or 37°C.

Add 0.1 ml of 9.5 mM S-adenosyl-L-methionine (SAM) and 0.1 ml of 5 mM NADPH.  
Incubate for 20 or 60 min at 30 or 37°C.

Heat for 5 min at 80°C.

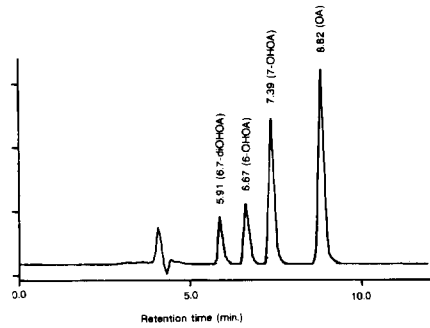
Centrifuge at 3,000 rpm for 20 min.

Supernatant 0.5 ml

Ultrafiltrate.

Analysing by HPLC (absorbance, 258 nm: column, ODS-80T<sub>M</sub>; flow rate, 0.7 ml/min: column temperature, 40°C)

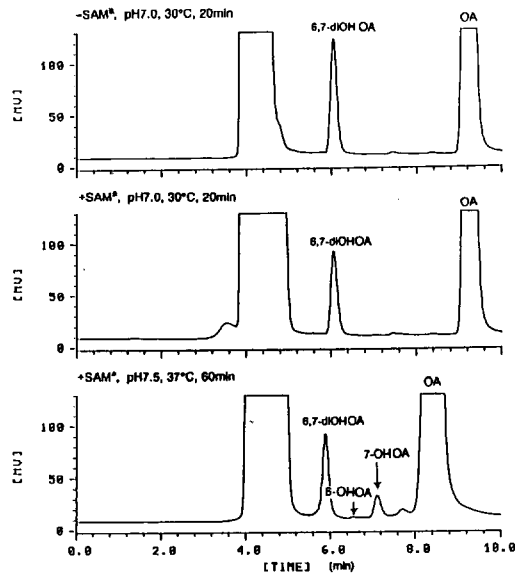
Fig. 4-11. Procedure for *in vitro* assay of oxolinic acid.  
HPLC: High-performance liquid chromatography.



**Fig. 4-12.** Chromatograms of oxolinic acid and its metabolites by high-performance liquid chromatography  
OA, 7-OHOA, and 6-OHOA are shown in Fig. 1-1.  
6,7-diOHOA is shown in Fig. 4-9.

## 2. 結 果

**代謝物の検出** PCB 処理コイを用いて, *in vitro* 代謝を行った結果を Fig. 4-13 に示した。Fig. 4-13 の上段のクロマトグラムは, S-アデノシルメチオニンを添加せずに, pH 7, 30°C の条件において *in vitro* で反応させたものであり, この条件下で 6,7-diOHOA の生成が確認され



**Fig. 4-13.** Chromatograms of oxolinic acid metabolites by high-performance liquid chromatography in the liver microsome of carp treated with polychlorinated biphenyl after *in vitro* assay.

\* S-adenosylmethionine

OA, 7-OHOA, and 6-OHOA are shown in Fig. 1-1. 6,7-diOHOA is shown in Fig. 4-9.



た。中段のクロマトグラムは、同様の条件下でさらに S-アデノシルメチオニンを添加した時の結果である。この時も 6,7-diOHOA の生成が確認されたが、7-OHOA および 6-OHOA は検出されなかった。しかし、下段の pH 7.5, 37°C の条件で 60 分間反応させた場合は、6,7-diOHOA だけでなく 7-OHOA および 6-OHOA も検出された。

**代謝物の定量** *In vitro* 代謝反応後の 6,7-diOHOA, 7-OHOA および 6-OHOA 等の代謝物の生成量を定量し、得られた結果を **Table 4-3** に示した。これらの反応は全て pH 7.5 で行った。反応条件が 30°C で 20 分間の場合は、PCB 処理コイおよび対照コイの両区において 6,7-diOHOA のみが検出された。しかし、その生成量はいずれも PCB 処理コイの方が対照コイよりも 2~9 倍も高いことが明らかとなった。PCB 処理コイの NADPH 添加区においては、6,7-diOHOA の生成量は 45.1 nmol であったが、さらに S-アデノシルメチオニンを添加した区では 29.6 nmol と低くなった。これは、生成した 6,7-diOHOA がさらにそのグルクロン酸抱合体、あるいは 7-OHOA, 6-OHOA およびそれらのグルクロン酸抱合体等に代謝されたためと

**Table 4-3.** Determination of oxolinic acid and its metabolites after *in vitro* assay of carp

			6,7-diOHOA (nmol)	7-OHOA (nmol)	6-OHOA (nmol)	
30°C, 20 min	PCB* <sup>3</sup>	+ NADPH* <sup>5</sup>	45.1	<0.10	<0.30	
		- NADPH* <sup>6</sup>	3.07	<0.10	<0.30	
	- SAM* <sup>1</sup>	Cont.* <sup>4</sup>	4.93	<0.10	<0.30	
			4.67	<0.10	<0.30	
	+ SAM* <sup>2</sup>	PCB	+ NADPH	29.6	<0.10	<0.30
			- NADPH	4.95	<0.10	<0.30
		Cont.	+ NADPH	3.61	0.34	<0.30
			- NADPH	1.60	0.19	<0.30
37°C, 20 min	PCB	+ NADPH	24.0	<0.10	<0.30	
		- NADPH	3.01	<0.10	<0.30	
	+ SAM	Cont.	+ NADPH	4.24	<0.10	<0.30
			- NADPH	1.79	<0.10	<0.30
37°C, 60 min	PCB	+ NADPH	42.3	1.66	0.35	
		- NADPH	2.31	0.15	<0.30	
	+ SAM	Cont.	+ NADPH	6.64	0.34	<0.30
			- NADPH	1.78	<0.10	<0.30

\*<sup>1</sup> S-adenosylmethionine was not added.

\*<sup>2</sup> S-adenosylmethionine was added.

\*<sup>3</sup> PCB treated carp.

\*<sup>4</sup> Control carp.

\*<sup>5</sup> NADPH was added.

\*<sup>6</sup> NADPH was not added.

考えられる。

37°Cで20分間の反応において、PCB処理コイおよび対照コイでは、6,7-diOHOAが検出されたが、7-OHOAおよび6-OHOAは検出されなかった。

37°Cで60分間の反応において、PCB処理コイのNADPH添加区では、6,7-diOHOAおよび7-OHOAの他に6-OHOAも検出された。対照コイのNADPH添加区では、7-OHOAが検出された。

以上の様に、*in vitro*代謝においても、オキシリン酸の代謝物として6,7-diOHOA、7-OHOAおよび6-OHOAが検出された。また、PCB処理コイでは、6,7-diOHOAの生成反応が亢進されることが明らかになった。

### 3. 考 察

Uenoら<sup>13)</sup>はブリの胆汁中にオキシリン酸グルクロニドを検出しているが、筆者は第3章第3節で同様の実験を行い、その場合はブリの胆汁中にオキシリン酸グルクロニドは検出されなかった。小林ら<sup>49)</sup>は、ブリの肝ミクロソームの薬物酸化酵素活性が季節によって変動し、その最大値は最低値の約3倍に達することを明らかにしている。本章において、誘導処理をしないコイではオキシリン酸グルクロニドが主要代謝物であるが、肝臓ミクロソームの酸化酵素系を誘導させたコイではそれが検出されなかったことから、Uenoら<sup>13)</sup>のブリは本研究に供試したブリと比べて酸化酵素系の活性が低く、6,7-diOHOA生成能が低い個体であったと推察される。

ルムバンバトゥら<sup>50)</sup>は、コイをPCBで前処理するとオキシリン酸の残留期間が短縮することより、酸化酵素系の活性の高低がオキシリン酸の残留期間に影響すると報告している。また、本実験から、PCB処理によりオキシリン酸から6,7-diOHOAへの代謝能が亢進されることが明らかになった。これらのことから、第2章において、淡水魚4種と海水魚4種ではオキシリン酸の動態が異なったことの原因として、酸化酵素活性が魚種により異なることが示唆された。従って、比較的残留期間が短い海水魚4種（マダイ、マアジ、ブリ、ヒラメ）では6,7-diOHOA生成能が高く、一方、残留期間が長い淡水魚3種（ニジマス、ウナギ、テラピア）では6,7-diOHOA生成能が低いことが推察された。

以上のことから、魚類におけるオキシリン酸の代謝経路（Fig. 4-10）のうち、オキシリン酸の残留には6,7-diOHOAへの代謝能およびグルクロン酸抱合能が強く関与していると考えられる。従って、養殖魚におけるオキシリン酸の残留期間を推定する場合、その魚種の薬物代謝酵素の活性がその指標となる可能性が示唆された。

## 第5章 淡水および海水中でのサケ科魚類におけるオキシソリン酸の体内動態の比較

最近、世界的にギンザケあるいはニジマスを海水で飼育する海面養殖が盛んになってきたが、これらの海面養殖魚においてもピブリオ病および細菌性腎臓病（BKD）などの伝染性疾病が発生し、それらに対する治療が必要となっている。しかし、現在のところ、海水飼育したギンザケあるいはニジマスに対する処方確立されていないため、淡水飼育時の処方を準用することが多い。

第2章において、オキシソリン酸の体内動態は淡水魚と海水魚では異なることを明らかにしたが、ギンザケおよびニジマスにおいても、海水飼育時では淡水飼育時とはオキシソリン酸の動態が異なることが推察され、薬剤の有効濃度持続時間および残留期間などの面から、海水飼育の場合には新しい処方が必要であると考えられた。

そこで、本章では広塩性魚類に対して、淡水・海水両域における医薬品投与条件に関する基礎的知見を得るために、ギンザケおよびニジマスを用いて、淡水飼育時と海水飼育時におけるオキシソリン酸の体内動態の比較研究を行った。

### 第1節 ギンザケおよびニジマスの海水馴致法

#### 1. ギンザケ

ギンザケは養殖研究所において淡水で飼育された2年魚を用いた。供試ギンザケを2群に分け、一方を淡水区、他方を海水区とした。海水区のギンザケは1/3海水（淡水：海水=2：1）、2/3海水（淡水：海水=1：2）および5/6海水（淡水：海水=1：5）にそれぞれ1日ずつ馴致し、4日目からは100%海水で飼育し、その後約1ヵ月間淡水時と同じ飼料を給餌して予備飼育し、実験に供試した（Fig. 5-1）。

#### 2. ニジマス

ニジマスは養殖研究所において淡水飼育された、海水飼育の可能なドナルドソン系の2年魚を用いた。ニジマスを淡水区と海水区に分け、海水区のニジマスは、1/2海水、3/4海水および

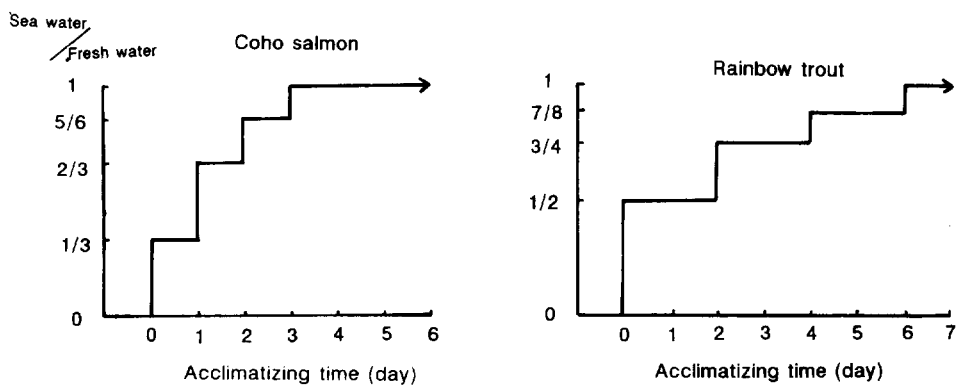


Fig. 5-1. Procedure of acclimatization to sea water from fresh water for coho salmon and rainbow trout.

び7/8海水にそれぞれ2日ずつ馴致し、7日目からは100%海水で飼育した (Fig. 5-1)。その際、馴致を始めてから8日目まで給餌はしなかった。馴致期間中に1尾より連続的に採血し、血清の浸透圧を Vapor pressure osmometer (Wescor Inc. 社製) によって測定した。同時に体重変化も調べた。Table 5-1 に示すように、海水区ニジマスの浸透圧は3/4海水時に最高であったが、海水飼育を始めた7日目以後は減少し、16日後には淡水時とほぼ同じ浸透圧まで回復したことから、16日後にはニジマスは海水に馴致したと結論された。また、体重も浸透圧と同様に変化し (Table 5-1)、ウナギ<sup>(31)</sup>における海水馴致と類似の傾向を示したことから、ニジマスの馴致が充分であったことを示唆した。以上のように海水馴致された海水区ニジマスは、その後約6ヵ月間淡水時と同じ飼料を給餌して予備飼育し、実験に供試した。

Table 5-1. Changes in the body weight and osmotic pressure of serum in rainbow trout during sea water acclimatization.

Sea water/Fresh water	0	1/2	3/4	7/8	1	1
Day after acclimatization* <sup>1</sup>	0	2	4	6	8	16
Body weight (g)	237	232	231	224	221	222
Osmotic pressure (mOsm/l)	285	338	348	331	310	293

\*<sup>1</sup> Acclimatizing method is shown in Fig. 5-1.

## 第2節 経口投与オキソリン酸の体内分布の比較

ギンザケおよびニジマスの海水飼育時 (海水区) におけるオキソリン酸の組織内濃度変化を淡水飼育時 (淡水区) と比較することを目的として、両魚種の淡水区と海水区にオキソリン酸を強制経口投与し、組織内濃度を経時的に測定した。

### 1. 実験方法

ギンザケは平均体重120gのものを、水温 $17 \pm 0.2^\circ\text{C}$ で試験した。ニジマスは、淡水区で平均体重621g、海水区で平均体重472gのものを、両区ともに水温 $16 \pm 0.2^\circ\text{C}$ で試験した。第2章と同様の方法により、淡水区および海水区の各供試魚にオキソリン酸を強制経口投与し、所定の時間における血清、肝臓、腎臓および筋肉内のオキソリン酸を定量した。

### 2. 結果

淡水区ギンザケでは48時間後に肝臓 ( $5.3 \mu\text{g/g}$ ) で、72時間後に血清 ( $2.4 \mu\text{g/ml}$ )、筋肉 ( $7.0 \mu\text{g/g}$ ) および腎臓 ( $17.4 \mu\text{g/g}$ ) で最高濃度を示し (Fig. 5-2)、第2章第1節で行った淡水飼育のニジマスの結果 (Fig. 2-1) と類似していた。一方、海水区ギンザケでは12時間後に全組織において最高濃度を示したが、それらの濃度は淡水区に比べて低く、血清で  $0.2 \mu\text{g/ml}$ 、筋肉で  $1.0 \mu\text{g/g}$ 、肝臓で  $2.8 \mu\text{g/g}$ 、腎臓で  $6.3 \mu\text{g/g}$  であった (Fig. 5-3)。また、海水区では72時間後にはオキソリン酸は検出限界以下となり、第2章第2節で行ったマダイ (Fig. 2-5)、マアジ (Fig. 2-6)、ブリ (Fig. 2-7)、ヒラメ (Fig. 2-8) の海水魚の結果と類似してい

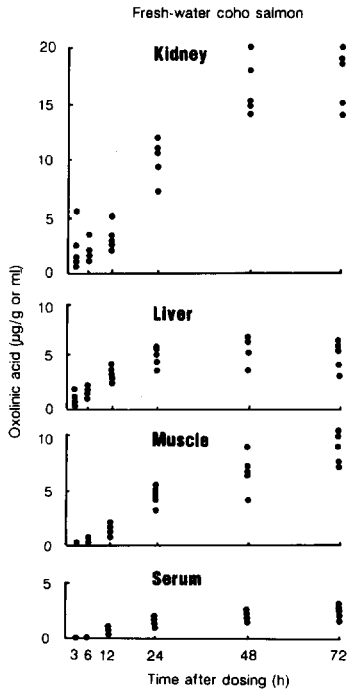


Fig. 5-2. Tissue levels of oxolinic acid in coho salmon cultured in fresh water after single oral administration at a dose of 40mg/kg.

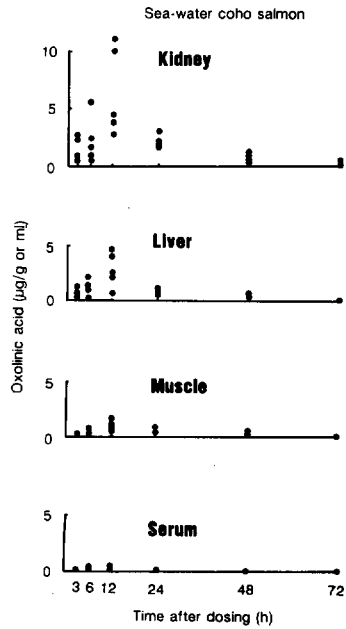


Fig. 5-3. Tissue levels of oxolinic acid in coho salmon acclimatized to sea water after single oral administration at a dose of 40mg/kg.

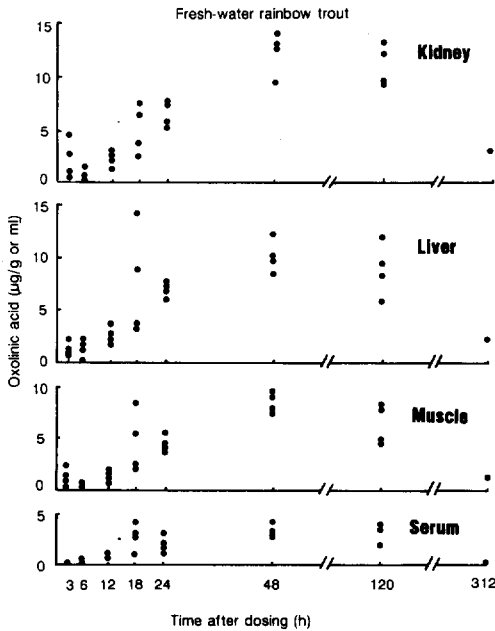


Fig. 5-4. Tissue levels of oxolinic acid in rainbow trout cultured in fresh water after single oral administration at a dose of 40mg/kg.

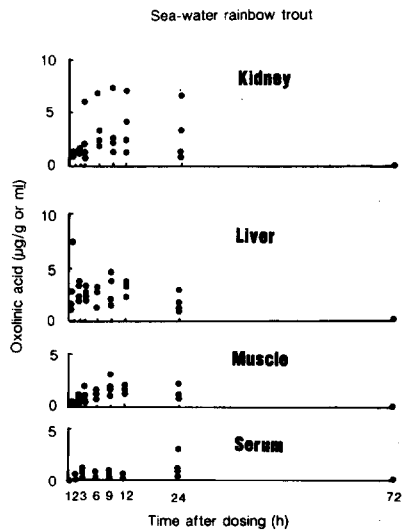


Fig. 5-5. Tissue levels of oxolinic acid in rainbow trout acclimatized to sea water after single oral administration at a dose of 40mg/kg.

た。このように、海水飼育されたギンザケでは、オキシソリン酸の魚体内動態が明らかに淡水飼育時とは異なり、むしろ海水魚と類似する挙動を示した。

淡水区ニジマス (Fig. 5-4) では48時間後に各組織内濃度は最高に達し、血清で $3.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 、筋肉で $8.2\mu\text{g}/\text{g}$ 、肝臓で $10.0\mu\text{g}/\text{g}$ 、腎臓で $12.4\mu\text{g}/\text{g}$ となった。その後、120時間後まで各組織内にオキシソリン酸は高濃度で残留していた。この結果は第2章第1節で行ったニジマス (淡水) の結果と同様であり、淡水区ニジマスにおいては再現性のある結果が得られた。一方、海水区ニジマス (Fig. 5-5) では淡水区ニジマスに比べて最高濃度は低く、約24時間後には血清で $1.4\mu\text{g}/\text{ml}$ 、筋肉で $0.6\mu\text{g}/\text{g}$ 、肝臓で $1.8\mu\text{g}/\text{g}$ 、腎臓で $3.1\mu\text{g}/\text{g}$ であった。また、海水区ニジマスでは72時間後にはオキシソリン酸はほとんど検出されず、第2章第1節の海水魚、マダイ、マアジ等の結果 (Figs. 2-5~8) と類似していた。以上のように、ニジマスにおいてもギンザケと同様に、海水飼育時では淡水飼育時に比べてオキシソリン酸濃度が低く、残留期間が短い傾向がみられた。

### 3. 考 察

同一魚種を淡水と海水で飼育して、医薬品の動態を両者で比較した研究例としては Evelyn<sup>52)</sup>等の報告がある。それによると、ギンザケを淡水あるいは海水で飼育し、抗生物質の一つであるクロラムフェニコールの経口投与後の組織内濃度変化を24時間後まで調べ、海水区ギンザケでは淡水区ギンザケに比べてクロラムフェニコール濃度が24時間後には極めて低くなることを報告している。本研究における淡水区と海水区ギンザケおよびニジマスでのオキシソリン酸の動態は同様の結果を示した。

以上のように、ギンザケおよびニジマスのサケ科魚類において、海水飼育時では淡水飼育時とはオキシソリン酸の動態が異なったことから、オキシソリン酸の有効濃度持続時間および残留期間などの面から、サケ科魚類の海面養殖の場合は淡水飼育時とは異なる新しい処方が必要であると考えられる。

#### 第3節 胆汁中オキシソリン酸代謝物の比較

第2節において、淡水魚および海水魚の区別のみならず、少なくともギンザケおよびニジマス等のサケ科魚類では、同一魚種でも淡水と海水の飼育環境において、それぞれのオキシソリン酸の動態に相違があるということが分かった。第4章において、淡水魚と海水魚ではオキシソリン酸の動態が異なり、その原因の一つは両者間におけるオキシソリン酸代謝酵素活性の差であることが明らかになったことから、本章におけるサケ科魚類の淡水飼育時と海水飼育時にオキシソリン酸代謝能が変化し、その結果オキシソリン酸の動態に差が生じた可能性が推定された。

そこで、本節ではこの点を明らかにするために、海水飼育時のニジマスの胆汁中の代謝物を定量し、第3章における淡水飼育時の結果と比較して、淡水区および海水区それぞれにおいての代謝能の相違について検討した。

#### 1. 実験方法

海水に馴致したニジマスを用い、前節と同様の方法でオキシソリン酸を強制経口投与した後、第3章第2節と同様の方法によって、胆汁中のオキシソリン酸代謝物を定量した。

## 2. 結 果

海水飼育した（海水区）ニジマスにおいても、淡水飼育時（淡水区）と同様に、胆汁中代謝物として、未変化のオキシリン酸の他に、7-OHOA グルクロニド、6-OHOA グルクロニドおよびオキシリン酸グルクロニドが検出された。海水区ニジマスの胆汁中の代謝物濃度を **Table 5-2** に示した。海水区ニジマスにおける各代謝物の濃度は24時間後に最大値を示し、オキシリン酸  $7.9\mu\text{g}/\text{ml}$ 、7-OHOA グルクロニド  $2.4\mu\text{g}/\text{ml}$ 、6-OHOA グルクロニド  $1.4\mu\text{g}/\text{ml}$  およ

**Table 5-2.** Concentrations of oxolinic acid and its metabolites in the bile of sea-water rainbow trout after single oral administration\*<sup>1</sup>

Time after dosing (h)	OA	7-OHOA-G	6-OHOA-G	OA-G
3	Tr	Tr	Tr	Tr
6	$1.1 \pm 0.8^{*2}$	Tr	Tr	$1.1 \pm 1.2$
9	$1.5 \pm 0.6$	Tr	Tr	$3.5 \pm 1.8$
12	$2.6 \pm 0.8$	$0.9 \pm 1.0$	$0.8 \pm 0.9$	$5.1 \pm 0.8$
24	$7.9 \pm 4.4$	$2.4 \pm 3.7$	$1.4 \pm 2.1$	$23.0 \pm 13.2$

\*<sup>1</sup> Dose was 40 mg/kg.

\*<sup>2</sup> Values are given as mean  $\pm$  S.D. ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ),  $n = 4$ , Tr < 0.001.

OA: Oxolinic acid.

7-OHOA-G: 7-Hydroxy derivative glucuronide.

6-OHOA-G: 6-Hydroxy derivative glucuronide.

OA-G: Oxolinic acid glucuronide.

**Table 5-3.** Relative proportions of oxolinic acid and its metabolites in the bile of fresh-water and sea-water rainbow trout after single oral administration\*<sup>1</sup>

Time after dosing (h)	OA	7-OHOA-G	6-OHOA-G	OA-G
Fresh-water rainbow trout				
6	$62.0 \pm 30.1(\%)^{*2}$	— (%)	— (%)	$38.0 \pm 30.8(\%)$
12	$58.1 \pm 36.3$	$0.9 \pm 1.0$	$0.8 \pm 0.9$	$41.9 \pm 36.3$
24	$28.8 \pm 1.2$	$3.4 \pm 3.1$	$1.8 \pm 1.3$	$66.2 \pm 3.5$
Sea-water rainbow trout				
6	$50.2 \pm 0.8$	—	—	$49.8 \pm 12.1$
12	$28.0 \pm 8.6$	$9.4 \pm 8.1$	$7.0 \pm 8.3$	$55.6 \pm 8.2$
24	$22.4 \pm 6.5$	$7.3 \pm 8.6$	$4.6 \pm 5.5$	$65.3 \pm 7.9$

\*<sup>1</sup> Dose was 40 mg/kg.

\*<sup>2</sup> Values are given as mean  $\pm$  S.D. (%),  $n = 4$ .

OA: Oxolinic acid.

7-OHOA-G: 7-Hydroxy derivative glucuronide.

6-OHOA-G: 6-Hydroxy derivative glucuronide.

OA-G: Oxolinic acid glucuronide.

びオキシリン酸グルクロニド  $23\mu\text{g}/\text{ml}$  に達した。また、海水区ニジマスの最高濃度は淡水区ニジマス (Table 3-4) に比べて低い傾向を示した。次に、Tables 3-4 と 5-2 から、淡水区および海水区ニジマスにおける胆汁中のオキシリン酸代謝物の濃度比を計算し、Table 5-3 に示した。両区ともに投薬直後は未変化のオキシリン酸の占める割合が大きいが、時間経過とともにグルクロン酸抱合体、特にオキシリン酸グルクロニドの割合が増加した。24 時間後の代謝物の濃度比は両区でほぼ等しく、主要代謝物はオキシリン酸グルクロニドで約 70% を占め、次に未変化のオキシリン酸が約 20~30% を占め、7-OHOA グルクロニドおよび 6-OHOA グルクロニドは 10% 以下であった。

### 3. 考 察

以上の結果から、オキシリン酸投与後 24 時間における海水区ニジマスの胆汁中代謝物濃度は淡水区ニジマスのそれらと類似していたことから、淡水区および海水区ニジマスにおけるオキシリン酸の代謝能に顕著な変化は生じないことが明らかになった。

一方、第 3 章において供試した淡水魚 3 種と海水魚 4 種では、投与オキシリン酸の残留性に大きな差が認められ、その原因はオキシリン酸代謝酵素の活性差によることを第 4 章で明らかにした。しかし、ニジマスを淡水から海水に移してもそのオキシリン酸代謝酵素の活性は変化しなかったという事実から、淡水魚と海水魚間における薬物代謝能の相違は淡水および海水の生息環境によって生ずるものではなく、各魚種独自のものであることが分かった。

### 第 4 節 *In vitro* におけるオキシリン酸血球結合率の比較

前節において、海水飼育したサケ科魚類におけるオキシリン酸の動態が、淡水飼育時のものと異なる原因は代謝能の差ではないことが判明した。それ故、第 2 節において述べたように、海水飼育したサケ科魚類では、オキシリン酸の体内残留期間が淡水飼育時と比べて短かったが、その原因は排泄速度の差ではないかと考えられた。よって、本節では、薬物の排泄に影響を及ぼす要因の一つである血球結合率を *in vitro* で調べ、淡水区ニジマスと海水区ニジマスで比較した。

#### 1. 実験方法

10 尾の淡水区ニジマス、および 4 尾の海水区ニジマスから血液を採取し、ヘマトクリット管を用いてヘマトクリット値 ( $H_t$ ) を測定した。各ニジマスの血液  $1\text{ml}$  に対して、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$  のオキシリン酸溶液  $40\mu\text{l}$  を加え、すばやく混合し、室温で 60 分間放置した。その後、冷却遠心 ( $3,000\text{rpm}$ , 20 分間) し、血清中のオキシリン酸濃度を定量した。全血液のオキシリン酸濃度 ( $C_{\text{Blood}}$ ,  $4\mu\text{g}/\text{ml}$ ) および血清中のオキシリン酸濃度 ( $C_p$ ) から、血液-血清分配率 ( $R_B$ ) を以下の式によって求めた<sup>53)</sup>。

$$R_B = C_{\text{Blood}} / C_p$$

また、赤血球中のオキシリン酸濃度 ( $C_R$ ) は以下の式によって計算した。

$$C_R = \{C_{\text{Blood}} - C_p (1 - H_t)\} / H_t$$

#### 2. 結 果

血液-血清分配率 ( $R_B$ ) は、淡水区で  $0.39 \pm 0.08$ 、海水区で  $0.34 \pm 0.02$  であり、T テストで



の統計処理によると、両者は1%の危険率において差が認められなかった。赤血球中のオキシリン酸濃度 ( $C_R$ ) は淡水区で  $7.0 \pm 1.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、海水区で  $7.6 \pm 0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$  であり、同様の統計処理において両者の値には差が認められなかった。

### 3. 考 察

以上の結果から、海水区ニジマスの血球結合率は淡水区のそれとほぼ等しいことが明らかになり、これが投与オキシリン酸の体内濃度差の原因ではないことが示唆された。

#### 第5節 血管内投与オキシリン酸の血中濃度変化の比較

第4節において、淡水区および海水区ニジマスでは、*in vitro* におけるオキシリン酸の血球結合率はほぼ等しく、血球結合率からは両区におけるオキシリン酸排泄速度の差は説明できなかった。そこで、本節では、それぞれのニジマスの尾柄部血管内にオキシリン酸を注入し、その後の血清中のオキシリン酸濃度を定量し、*in vivo* におけるオキシリン酸の排泄と比較検討した。

#### 1. 実 験 方 法

平均体重 404g の淡水区ニジマス 8 尾と、平均体重 483g の海水区ニジマス 6 尾を用い、水温  $15 \pm 0.2^\circ\text{C}$  で試験した。

オキシリン酸をできるだけ少量の 1N 水酸化ナトリウム溶液に溶かし、生理食塩水で  $10\text{mg}/\text{ml}$  に希釈した。この溶液をニジマスの尾柄部血管内に、投与量が  $20\text{mg}/\text{kg}$  になるように注入し、所定の時間ごとに尾柄部血管から  $0.5\text{ml}$  ずつ連続的に採血した。採取した血液を冷却

Table 5-4. Concentrations of oxolinic acid in the serum of fish after a single intravascular injection to the caudal vessel\*<sup>1</sup>

Time after dosing (h)	Fresh-water rainbow trout	Sea-water rainbow trout	Red sea bream
0.5	$17.00 \pm 6.22^{*3}$	$13.83 \pm 4.10$	$17.76 \pm 3.15$
3	$8.69 \pm 2.14$	$8.03 \pm 2.27$	$8.49 \pm 2.63$
24	$6.31 \pm 1.34^{*4}$	$0.92 \pm 0.59$	$1.43 \pm 0.61$
72	$3.41 \pm 0.44^{*4}$	$0.62 \pm 0.29$	$0.23 \pm 0.18$
144	$2.29 \pm 0.46^{*5}$	$0.04 \pm 0.05$	0.02
288	$1.01 \pm 0.43$		
n* <sup>2</sup>	8	6	9

\*<sup>1</sup> Dose was 20 mg/kg.

\*<sup>2</sup> Number of samples, except the one sample after 144 h in red sea bream.

\*<sup>3</sup> Values are given as mean  $\pm$  S.D. ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

\*<sup>4</sup> Significantly ( $P < 0.01$ ) different from sea-water rainbow trout by Duncan's multiple range test.

\*<sup>5</sup> Significantly ( $P < 0.001$ ) different from sea-water rainbow trout by Cochran-cox test. The mean concentrations of red sea bream were not significantly ( $P < 0.05$ ) different from those of sea-water rainbow trout.

遠心し (3,000rpm, 20 分間), 血清中のオキシリン酸濃度を測定した。比較対象として, 平均体重 1,442g のマダイ 9 尾を用いて同様な試験を水温  $18 \pm 0.2^\circ\text{C}$  で行った。

各区の測定値は Bertlett 法によって分散を調べた後, 分散が等しい時は Duncan 法で, 等しくない時は Cochran-co 法で統計処理して差を検討した。

## 2. 結 果

オキシリン酸を血管内に注入した後の血清中の濃度変化を Table 5-4 に示した。両区ともに注入後オキシリン酸は血清から速やかに消失し, 3 時間後の値は淡水区で  $8.69\mu\text{g}/\text{ml}$ , 海水区で  $8.03\mu\text{g}/\text{ml}$  であった。その後海水区では速やかに減少して 72 時間後には検出限界以下になったのに対し, 淡水区での減少は緩やかであり, 72 時間後では  $3.41\mu\text{g}/\text{ml}$ , 244 時間後でも  $1.01\mu\text{g}/\text{ml}$  が残留していた。淡水区および海水区ニジマスの各測定結果を比較すると, 0.5 および 3 時間後のオキシリン酸濃度は両者では差がみられなかったが, 24 時間以後では両区の値には大きな差がみられ, 海水区ニジマスでは淡水区に比べてオキシリン酸の排泄が速いことが明らかになった。

一方, マダイにおける血清中オキシリン酸濃度の経時変化は海水区ニジマスの場合と類似する結果であったことから, 海水区ニジマスにおけるオキシリン酸の排泄速度も, 海水魚であるマダイと近似することが示唆された。実際にマダイと海水区ニジマスに経口投与したオキシリン酸の魚体内濃度の経時変化は, Figs. 2-5 および 5-5 から明らかなように, 本実験の結果 (Table 5-4) と同様であった。

## 3. 考 察

以上のように, 海水区ニジマスおよび海水魚マダイではオキシリン酸は時間の経過とともに直線的に速やかに排泄されていくが, 淡水区ニジマスでは, 血中のオキシリン酸が比較的高濃度の時には海水魚と類似の傾向を示すものの, その濃度が低下するに従って排泄速度は極めて遅くなることが判明した。すなわち, このようなオキシリン酸の低濃度時での排泄速度の差が原因となって, 淡水区と海水区においてオキシリン酸の残留期間に大きな差が生ずることが明らかになった。第 4 章において, 第 2 章において認められたニジマス等の淡水魚 4 種とマダイ等の海水魚 4 種でのオキシリン酸の体内動態が異なる原因は, 魚種間における代謝酵素活性の差であることを明らかにしたが, 本章の結果から, 淡水, 海水の飼育環境の違いによるオキシリン酸の排泄速度の差も関与することが新たに判明した。これらのことから, 水産用医薬品の使用基準が定められていない規制対象外魚種に投薬する場合には, それら魚種の薬物代謝酵素活性とともに, 飼育環境水の塩分濃度を考慮して処方を作成する必要があることが実証された。

さらに, 哺乳動物において主たる薬剤の排泄経路は尿および胆汁であるが, Kobayashi ら<sup>50)</sup> がワキンにおけるペンタクロロフェノールの解毒経路について報告しているように, 魚類では尿や胆汁だけでなく鰓も主要な経路であり, 淡水魚と海水魚では明らかにオキシリン酸の排泄速度が異なることから, 鰓および腎臓からの薬剤の排泄については今後詳細に研究すべき課題である。

## 総 括

本研究は、水産用医薬品の適正な使用条件の設定に有用な基礎知見を得ることを目的として行った。水産用医薬品として広く使用されているオキシリン酸を、規制対象外魚種を含む数種の養殖魚に種々の条件で投与し、それらの魚体内における動態について詳細に検討し、次のような結果を得た。

### 1. 各種養殖魚における経口投与オキシリン酸の体内分布

8種の養殖魚にオキシリン酸を1回強制経口投与し、血清、筋肉、肝臓および腎臓中のオキシリン酸濃度の経時的変化を調べた。

ニジマス、テラピア、ウナギおよびコイの淡水魚4種では、48時間後に各組織におけるオキシリン酸の濃度は最高となるが、以後の濃度の減少速度はゆるく、10日以上魚体内に残留することが推定された。一方、マダイ、マアジ、ブリおよびヒラメの海水魚4種では、供試淡水魚に比べて各組織の最高濃度が低く、最高濃度到達時間が早く、残留期間が短い傾向が見られた。

### 2. 各種養殖魚におけるオキシリン酸の代謝物

淡水魚と海水魚でオキシリン酸の体内動態が異なる原因として、オキシリン酸の代謝経路の違いが考えられたため、7種の養殖魚においてオキシリン酸の代謝物を比較した。

まず、魚類における代謝物を調べるために、代表的な養殖魚種であるニジマスを用いて、胆汁および尿中代謝物を同定したところ、未変化のオキシリン酸、7-OHOA グルクロニド、6-OHOA グルクロニドおよびオキシリン酸グルクロニドを検出した。

また、魚類におけるオキシリン酸代謝物の検出用試料を検討する目的で、ニジマスの胆汁および尿中の代謝物を定量した。その結果、胆汁試料の方が尿試料に比べて夾雑物が少なく、代謝物の濃度が高いことから、オキシリン酸の代謝物を検出するには、胆汁試料の方が適することが分かった。

ついで、7種の養殖魚にオキシリン酸を投与し、胆汁中代謝物を魚種間で比較した。ニジマス、ウナギ、テラピアの淡水魚3種の胆汁中には未変化のオキシリン酸の他に7-OHOA グルクロニド、6-OHOA グルクロニドおよびオキシリン酸グルクロニドが検出された。一方、マダイ、マアジ、ブリ、ヒラメの海水魚4種では未変化のオキシリン酸、7-OHOA グルクロニドおよび6-OHOA グルクロニドが検出されたのみで、オキシリン酸グルクロニドは検出されず、淡水魚と海水魚ではオキシリン酸代謝能が異なることが明らかになった。

以上のような、淡水魚と海水魚におけるオキシリン酸代謝能の差が、両者間でオキシリン酸の体内動態が異なる原因であると考えられた。

### 3. コイにおけるオキシリン酸の代謝経路

淡水魚と海水魚におけるオキシリン酸代謝能の種間差と両者間におけるオキシリン酸の動態との関連性を明らかにするために、コイにおけるオキシリン酸の代謝経路を明らかにし、さらに、誘導剤で処理して薬物酸化酵素系の活性を高めた時の代謝について検討した。

コイの肝臓ホモジネートを作成し、オキシリン酸を加えてインキュベートすることにより、遊離型の7-OHOA および6-OHOA が *in vitro* において生成され、オキシリン酸から7-OHOA および6-OHOA を生成する酵素系が肝臓中に存在することが分かった。

つぎに、コイの薬物酸化酵素系を誘導させる方法について検討し、PCBを誘導剤として用い、魚体重1kg当たり1mg/日のPCBを給餌によって14日間投与する方法が適当であることが分かった。

上記誘導方法によって酸化酵素系の活性を高めたコイに、オキシリン酸40mg/kgを強制経口投与し、胆汁中の代謝物を検出したところ、オキシリン酸のカテコール型誘導体である6,7-diOHOAとそのグルクロニド、遊離の7-OHOA および6-OHOAが新たに検出された。同様にこれらの代謝物は肝臓試料による*in vitro* 実験においても確認された。これらのことから、オキシリン酸から6,7-diOHOAへの生成反応には肝臓ミクロソームの酸化酵素系が関与すると推定された。

また、コイにおけるオキシリン酸の代謝経路としては、まず、オキシリン酸が肝臓ミクロソームの酸化酵素系によって6,7-diOHOAとなり、次いでメチル化されて7-OHOAおよび6-OHOAとなる。さらに、これらの代謝物(6,7-diOHOA, 7-OHOA, 6-OHOA)と未変化のオキシリン酸がグルクロン酸抱合を受けると推定された。これらの点を明確に実証するために、コイにPCBによる酸化酵素系の誘導処理を行って以下の検討をした。

PCB処理したコイではオキシリン酸グルクロニドに比べて、7-OHOA グルクロニドおよび6-OHOA グルクロニドが多量に検出され、マダイ等の海水魚4種と類似した結果が得られたことから、マダイ等の海水魚4種ではニジマス等の淡水魚3種に比べて酸化酵素系の活性が高く、このことが両者におけるオキシリン酸の体内残留性が異なる主要原因であると推定された。

#### 4. 淡水および海水中でのサケ科魚類におけるオキシリン酸の体内動態の比較

本章では、広塩性魚類に対して、淡水・海水両域における医薬品投与条件に関する基礎的知見を得ることを目的として、ギンザケとニジマスを用い、同一魚種を淡水と海水で飼育して、オキシリン酸の動態を比較した。

淡水飼育および海水飼育したギンザケおよびニジマスにオキシリン酸を1回強制経口投与し、血清、筋肉、肝臓および腎臓中のオキシリン酸濃度を経時的に調べた。ギンザケおよびニジマスの淡水飼育区では48時間後に各組織内濃度は最高となり、以後オキシリン酸濃度はゆっくり減少した。一方、ギンザケおよびニジマスの海水飼育時の濃度変化は、マダイ、マアジ等の海水魚4種の濃度変化と類似しており、淡水区に比べて各組織の最高濃度が低く、最高濃度到達時間が速く、残留期間が短い傾向がみられた。しかしながら、両試験区においてオキシリン酸代謝経路は等しく、代謝酵素活性も同レベルであることが分かった。

そこで、排泄速度に着目し、*in vitro* で血球結合率を淡水飼育時と海水飼育時で比較したが、差はみられなかった。次に、*in vivo* において淡水飼育時と海水飼育時のオキシリン酸の排泄を比較するために、オキシリン酸を血管内に投与し、その後の血中のオキシリン酸濃度を経時的に定量した。その結果、淡水飼育時ではオキシリン酸の消失が遅く、144時間後も高濃度(2.29  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )で残留していたのに対し、海水飼育時ではオキシリン酸の消失は速く、海水魚のマダイの結果と類似していた。それらの主たる原因の一つとして飼育水の塩分に対する浸透圧調節

作用がオキシリン酸の排泄に影響を及ぼすと推定された。

以上要するに、本研究は、魚種間でオキシリン酸の体内動態が異なることを明らかにし、その原因解明を試みた。その結果、哺乳動物と同様に、薬物酸化系酵素活性の魚種差が医薬品の動態に関与することを明らかにした。また、海水魚では淡水魚に比べてオキシリン酸の排泄が速く、それには浸透圧調節作用が関与していることも明らかにした。

## 謝 辞

本論文をまとめるにあたり、終始懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました九州大学教授・小林邦男先生に衷心より感謝の意を表します。本研究の遂行に有益な御助言および御激励を賜りました九州大学農学部増殖環境学教室の木村清朗助教授、今田信良先生および大嶋雄治先生に深く御礼申し上げます。また、共同研究者として惜しめない御協力を頂いた水産増殖環境学教室の院生、学生諸氏に感謝致します。

論文作成に御協力を頂いた水産庁中央水産研究所利用化学部の徳永俊夫前部長および小長谷史郎部長に感謝致します。また、論文の校閲をお願いした同部の斎藤洋昭脂質化学研究室長に深謝致します。

最後に、オキシリン酸の代謝物標品を御供与くださいました住友化学工業株式会社に厚くお礼申し上げます。

## 文 献

- 1) 飼畜産生物科学安全研究所：動物用医薬品・飼料添加物の畜・水産物への残留とその分析法，近代出版，東京，1985，p. 28.
- 2) 水産庁：水産用の医薬品の使用について第9報，平成2年5月21日，1990.
- 3) 原 武史・井上進一・今井重之・吉田文三：サルファ剤の魚類に関する研究—Ⅲサルファ剤を連続投与した時のニジマス組織内濃度について，魚病研究，1，10-14 (1966).
- 4) 原 武史・井上進一：スルファモノメトキシンをニジマスに経口投与した時の組織内濃度の維持投薬量について，魚病研究，1，35-40 (1967).
- 5) 原 武史・井上進一：各種サルファ剤をニジマスに経口投与した時の組織内濃度について，日水誌，33，618-623 (1967).
- 6) 原 武史・井上進一：サルファ剤のナトリウム塩をニジマスに経口投与した時の組織内濃度について，日水誌，33，624-627 (1967).
- 7) 原 武史・井上進一：スルファモノメトキシンをニジマスに経口投与した時の血液中の分布について，魚病研究，3，9-12 (1969).
- 8) 遠藤俊夫・小野沢正人：キンギョにおけるオキシリン酸の吸収に対する薬浴液のpHおよび水温の影響，日水誌，53，551-555 (1987).
- 9) 遠藤俊夫・小野沢正人：アユにおけるオキシリン酸の吸収に対する塩分濃度および収容尾数の影響，日水誌，53，557-562 (1987).
- 10) 遠藤俊夫・小野沢正人・浜口昌巳・楠田理一：微細化によるオキシリン酸のブリにおけるバイオアベイラビリティの向上，日水誌，53，1711-1716 (1987).
- 11) 春日洋二・杉谷 哲・荒井 真・森川 進：養殖ニジマスにおけるナリジクス酸及びその代謝物の組織内濃度について，食衛誌，28，267-272 (1987).
- 12) 春日洋二・棚橋宣康・荒井 真・森川 進：ナリジクス酸のニジマスにおける残留性及び *in vitro* における淡水魚肝ミクロソーム酸化について，食衛誌，31，166-170 (1990).
- 13) R. UENO, Y. HORIGUCHI, and S. S. KUBOTA : Levels of oxolinic acid in cultured yellowtail after oral administration, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54, 479-484 (1988).
- 14) H. KATAE, K. KOUNO, Y. SEKINE, M. HASHIMOTO, and M. SHIMIZU : Distribution, excretion and biotransformation of <sup>14</sup>C-piromidic acid in goldfish *Carassius auratus*(L.), *J. Fish Diseases*, 2, 529-542 (1979).
- 15) 農林水産省統計情報部：昭和61年漁業・養殖業生産統計年報，水産庁，東京，1987，pp. 156-157.
- 16) 春日洋二・杉谷 哲・山田不二造・荒井 真・森川 進：養殖ニジマス及びアユにおけるオキシリン酸の組織内残留について，食衛誌，25，512-516 (1984).
- 17) 安永統男・安元 進：ヒラメのオキシリン酸の強制投与による組織内濃度について，水産増殖，34，231-234 (1987).
- 18) R. UENO, M. OKUMURA, Y. HORIGUCHI, and S. S. KUBOTA : Levels of oxolinic acid in cultured rainbow trout and amago salmon after oral administration, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54, 485-489 (1988).
- 19) 大塚峯三・内藤一秋・佐藤善重：<sup>14</sup>C 標識 Oxolinic acid の生体内運命に関する研究 (第2報) 各種動物における<sup>14</sup>C 標識 Oxolinic acid の全身オートラジオグラフィ的分布，*RADIOISOTOPES*, 25, 215-220 (1976).
- 20) S. M. RINGEL, F. J. TURNER, S. ROEMER, J. M. DALY, R. ZLATANOFF, and B. S. SCHWARTZ : Oxolinic acid, a new synthetic antimicrobial agent III. Concentrations in serum, urine, and

- renal tissue, *Antimicrob. Ag. Chemother.*, **1967**, 486-489 (1967).
- 21) 大島康夫・笠原明・小島浩：新サルファ剤 Sulfadimethoxine の基礎的研究, *総合医学*, **17**, 881-887 (1960).
  - 22) 飯田 遙：水産物におけるジメチル- $\beta$ -プロピオラチンの蓄積とジメチルサルファイドの生成に関する研究, *東海水研報*, **124**, 35-111 (1988).
  - 23) B. B. BRODIE and R. P. MICKEL : Comparative biochemistry of drug metabolism, *Proc. 1st Int. Pharm. Meeting*, **6**, 299-324 (1962).
  - 24) 加藤隆一：薬物代謝の種差の実体, ラジオアイソトープ薬物代謝実験法 (日本アイソトープ協会編), 丸善, 東京, 1981, p. 222.
  - 25) 内田直行・金子雅春・武蔵達也・田中佳代・安斎 寛・西出英一：コイおよびテラピアにおける p, p'-DDT の初期代謝経路の比較, *日水誌*, **54**, 2217-2221 (1988).
  - 26) S. M. SIEBER and R. H. ADAMSON : The metabolism of xenobiotics by fish. in "Drug metabolism from microbe to man", ed. by D. V. Parke and R. L. Smith, Taylor&Francis Ltd., London, 1976, pp. 233-245.
  - 27) 松本文夫：合成抗菌剤, 新化学療法ハンドブック (上田泰・清水喜八郎編), 永井書店, 大阪, 1975, pp. 314-318.
  - 28) 藤原充雄・大塚峰三・佐藤喜重：<sup>14</sup>C-標識 Oxolinic Acid の生体内運命に関する研究 (第3報) ラットにおける尿中代謝物について, *RADIOISOTOPES*, **24**, 22-28 (1975).
  - 29) F. J. DICARLO, M. C. CREW, M. D. MELGAR, S. ROEMER, S. M. RINGEL, L. J. HAYNES, and M. WILSON : Oxolinic acid metabolism by man, *Arch. int. Pharmacodyn.*, **174**, 413-427 (1968).
  - 30) F. J. DICARLO, M. C. CREW, and R. C. GREENOUGH : Biotransformation of the methylenedioxy moiety of oxolinic acid in man, *Arch. Biochem. Biophys.*, **127**, 503-511 (1968).
  - 31) M. C. CREW, M. D. MELGAR, L. J. HAYNES, R. L. GALA, and F. J. DICARLO : Comparative metabolism of oxolinic acid by the rat, rabbit and dog, *Xenobiotica*, **1**, 193-201 (1971).
  - 32) I. M. ROLLO : Antibacterial chemotherapy. *Ann. Rev. Pharmacol.*, **6**, 209-230 (1966).
  - 33) Y. SEKINE, M. MIYAMOTO, M. HASHIMOTO, and K. NAKAMURA : Metabolism in rats and man of piromidic acid, a new antibacterial agent, *Xenobiotica*, **6**, 185-198 (1976).
  - 34) K. KOBAYASHI, S. KIMURA, and E. SHIMIZU : Studies on the metabolism of chlorophenols in fish-VIII. Isolation and identification of phenyl- $\beta$ -glucuronide accumulated in bile of goldfish, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **42**, 1365-1372 (1976).
  - 35) K. KOBAYASHI, S. KIMURA, and E. SHIMIZU : Studies on the metabolism of chlorophenols in fish-IX. Isolation and identification of pentachlorophenyl- $\beta$ -glucuronide accumulated in bile of gold fish, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **43**, 601-607 (1977).
  - 36) O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, and R. J. RANDALL : Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
  - 37) M. GARRETTO and M. A. Q. KHAN : Hydroxylation and epoxidation of chlordane by the mixed-function oxidase of the tropical and cold fresh water fish, *Gen. Pharmacol.*, **6**, 91-96 (1975).
  - 38) D. R. BUHLER and M. E. RASMUSSEN : The oxidation of drugs by fishes, *Comp. Biochem. Physiol.*, **25**, 223-239 (1968).
  - 39) M. O. JAMES, M. A. Q. KHAN, and J. R. BEND : Hepatic microsomal mixed-function oxidase activities in several marine species common to coastal Florida, *Comp. Biochem. Physiol.*, **62 C**, 155-164 (1979).
  - 40) J. T. AHOKAS : Cytochrome P-450 in fish liver microsomes and carcinogen activation, in

- "Pesticide and xenobiotic metabolism in aquatic organisms" (ACS Symposium Series 99) ed. by M. A. Q. Khan, J. J. Lech and J. J. Menn, American Chemical Society, New York, 1979, pp. 279-296.
- 41) R. H. ADAMSON : Drug metabolism in marine vertebrates, *Federation Proceedings*, **26**, 1047-1055 (1967).
  - 42) K. M. KLEINOW, M. J. MELANCON, and J. J. LECH : Biotransformation and Induction : Implications for toxicity, bioaccumulation and monitoring of environmental xenobiotics in fish, *Environ. Health Perspet.*, **71**, 105-119 (1987).
  - 43) 吉田多摩夫 : 魚類における薬物代謝—酵素誘導を中心に—, 酵素誘導—薬物代謝酵素を中心に— (高島英伍・佐藤哲男監修), 清至書院, 東京, 1985, pp. 111-123.
  - 44) T. OMURA and R. SATO : The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes, *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370-2378 (1964).
  - 45) J. V. CANTFORT, J. D. GRAEVE, and J. E. GIELEN : Radioactive assay for aryl hydrocarbon hydroxylase. Improved method and biological importance, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **79**, 505-511 (1977).
  - 46) K. J. NETTER and G. SEIDEL : An adaptively stimulated O-demethylating system in rat liver microsomes and its kinetic properties, *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **146**, 61-65 (1964).
  - 47) K. KOBAYASHI, Y. OSHIMA, C. TAGUCHI, and Y. WANG : Induction of drug-metabolizing enzymes by long-term administration of PCB and duration of their induced activities in carp, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **53**, 487-491 (1987).
  - 48) ボンゼ・メツラー : 薬物代謝 (有吉敏彦・渡辺烈訳), 朝倉書店, 東京, 1980, pp. 149-151.
  - 49) 小林邦男・大嶋雄治 : 水産用医薬品の安全性に関する研究—魚類の薬物代謝関連酵素について, 昭和63年度魚病対策技術開発研究成果報告書, 日本水産資源保護協会, p. 5 (1989).
  - 50) D.F. ルムバンバトゥ・大嶋雄治・大家耕司・河原義彦・小林邦男 : コイにおける薬物代謝酵素活性の誘導と投与医薬品の体内持続性への影響, 平成2年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, No. 338, 1990.
  - 51) M. OIDE and S. UTIDA : Changes in water and ion transport in isolated intestines of the eel during salt adaptation and migration, *Marine Biol.*, **1**, 193-197 (1967).
  - 52) T. P. T. EVELY : Tissue levels of chloramphenicol attained in sockeye (*Oncorhynchus nerka*) and coho (*O. kisutch*) salmon by feeding, *Bull. Off. int. Epiz.*, **69**, 1453-1463 (1968).
  - 53) 緒方宏泰 : バイオアベイラビリティの実験法, 医薬品開発のためのファーマコキネティクス実験法 (花野学・梅村甲子郎・伊賀立二編), ソフトサイエンス社, 東京, 1985, pp. 462-463.
  - 54) K. KOBAYASHI and N. NAKAMURA : Studies on the metabolism of chlorophenols in fish—X II. Major detoxication pathways for pentachlorophenol in goldfish, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **45**, 1185-1189 (1979).