養殖アユのビブリオ病に対するトリメトプリムの 化学療法的研究—II.

トリメトプリム・スルファドキシン合剤を経口投与
したときの組織内濃度について

佐古 浩*・楠田理一**・太幡利一***

(昭和 54 年 5 月 21 日受理)

Chemotherapeutical Studies on Trimethoprim against Vibriosis of Pond-Cultured Ayu—II.

Tissue Levels after Administration of Trimethoprim-Sulfadoxine Mixture

Hiroshi SAKO*, Riichi KUSUDA** and Toshikazu TABATA***

*Nat. Res. Inst. Aquacult., Tamaki-cho, Watarai-gun, Mie, Japan

**Dept. Cult. Fish. Fac. Agr., Kochi Univ., Nankoku, Kochi, Japan

***Showa College Pharm. Sci., Setagaya-ku, Tokyo, Japan

(Received May 21, 1979)

The present study was designed to investigate the pharmaco-dynamic properties of trimethoprim (TMP) in ayu, *Plecoglossus altivelis*, after oral administration of TMP-sulfadoxine (SDX) mixture for the control of vibriosis. The results obtained are summarized as follows:

1. Following a single administration of 30 mg of TMP-SDX (1:5) mixture per kg body weight, the highest tissue levels of TMP were obtained 2 hours after medication in the liver at the level of 10.8 mcg/g, 6 hours in the kidney at the level of 4.4 mcg/g, 2-3 hours in the muscle at the level of 1.8 mcg/g, and 1 hour in the blood at the level of 0.4 mcg/ml.

2. Following daily administration of 30 mg of TMP-SDX (1:5) mixture per kg body weight per day for 10 days, TMP level became undetectably low 24 hours after the last medication in the liver, 48 hours in the kidney and the muscle, and 6 hours in the spleen and the blood.

3. It is concluded that TMP is once retained in the tissue for some hours, and is excreted almost completely from the fish body within a day. Therefore, it is necessary to administer TMP-SDX mixture to ayu more than once a day to maintain constant tissue levels of TMP in ayu.

前報ではトリメトプリム (TMP), および TMP とサルファ剤 (SA) の合剤のアユのビブリオ病原菌 *Vibrio anguillarum* に対する *in vitro*, ならびに *in vivo* における抗菌作用について報告した (佐古・楠田, 1978)。

本報では TMP と長時間持続型の SA であるスル

ファドキシン (SDX) を 1:5 の割合で配合した合剤をアユに経口投与したときの, TMP と SDX の組織内濃度を経時的に調べた。そして, 吸収, 排泄および残留性について検討したので報告する。

実験方法

吸収・排泄試験 供試魚には実験水槽で1週間馴化飼育した大きさのそろった平均体重 34 g のアユを用い,

* 養殖研究所

** 高知大学農学部栽培漁業学科

*** 昭和薬科大学

TMP-SDX 合剤製剤 (100 ml 中に TMP 4.00 g, SDX 20.00 g, 水酸化ナトリウム 2.65 g, ジエタノールアミン 0.30 g, グリセロールホルマル 76.17 g を含む) を TMP と SDX の純末総和換算で 30 mg/kg の投与量となるように、餌料に吸着させて 1 回だけ自由摂餌させた。そして、水温約 19°C の流水で飼育し、投与後 1, 2, 3, 6, 12, 24, 48 および 72 時間後に各々 15 尾を一群として、肝臓、腎臓、筋肉および血液を採取し、TMP および SDX を定量した。なお、試料は定量に供するまで -20°C で凍結保存した。

残留試験 供試魚には実験水槽で 1 週間馴化飼育した大きさのそろった平均体重 25 g のアユを用い、前述の TMP-SDX 合剤製剤を TMP と SDX の純末総和換算で 30 mg/kg の投与量となるように餌料に吸着させ、1 日 1 回 10 日間連続して自由摂餌させた。そして、水温約 19°C の流水で飼育し、投与後 2, 6, 12, 24, 48 および 72 時間後に各々 15 尾を一群として、肝臓、腎臓、脾臓、筋肉および血液を採取し、TMP および SDX を定量した。なお、試料は定量に供するまで -20°C で凍結保存した。

TMP の定量方法 SCHWARTZ ら (1969) の分光蛍光光度法にしたがった。すなわち、各組織のアルカリ性のホモジネートから TMP をクロロホルムで抽出し、さらに希硫酸で再抽出したのち、アルカリ性過マンガン酸カリウムで酸化して、TMP をトリメトオキシ安息香酸 (TMBA) とする。これをクロロホルムで抽出後、クロロホルム抽出液の TMBA の蛍光強度を測定した。

(操作) 試料 4~5 g (血液の場合は 2~3 ml) をとり、0.1 N 炭酸ナトリウムを加えてホモジナイズし、全量を 25 ml とした。このホモジネート 10 ml およびクロロホルム 10 ml を 50 ml 共栓遠沈管にとり、50 r.p.m. で 15 分間振盪抽出したのち、3,000 r.p.m. で 5 分間遠沈した。その抽出液 6.0 ml に 0.01 N 硫酸 4.0 ml を加え、15 分間振盪後、上層から 3.0 ml 採取し、これに 0.1 M 過マンガン酸カリウム (0.1 M 水酸化ナトリウム溶液) 1.0 ml を加え、60°C 20 分間加温した。さらに、37% ホルムアルデヒド 0.3 ml, 1 N 硫酸 1.0 ml を加えて 60°C 10 分間加温した。冷却後、クロロホルム 4.0 ml を加えて振盪し、さらに 3,000 r.p.m. で 5 分間遠沈後クロロホルム層の ex. 275 nm, em. 342 nm の蛍光強度を測定し、TMBA クロロホルム標準液 (0.1 mcg/ml) の蛍光強度と比較して TMP 量を算出した。なお、TMBA 400 mcg は TMP 292.4 mcg に相当する。ホモジネートに TMP を添加して同様の操作をおこなった結果、添

加した TMP と蛍光強度が直線関係を示し、回収率は 63% であった。蛍光強度は日立 MPF-3 型蛍光光度計で測定した。

SDX の定量方法 クロロホルムを加えて組織をホモジナイズして SDX をクロロホルム中に抽出し、さらに希アンモニア水で再抽出して、Bratton-Marshall 反応 (BRATTON and MARSHALL, 1939) により呈色させたのちに、生成したアゾ色素を *n*-ブタノールで抽出し、540 nm の吸光度を測定した。

(操作) 試料 4~5 g (血液の場合は 2~3 ml) をとり、クロロホルム 30 ml を加えてホモジナイズし、ろ過した。そのろ液 20 ml を 50 ml 共栓遠沈管にとり、塩化ナトリウムアンモニア水溶液 15 ml を加えて 5 分間激しく振盪した。そして、3,000 r.p.m. で 5 分間遠沈後、上層の 10 ml に 9 N 塩酸 0.4 ml, 0.1% 亜硝酸ナトリウム水溶液 0.4 ml を加えて混合し、2 分間静置したのち、Bratton-Marshall 試液 0.4 ml を加え、さらに暗所に 10 分間放置後、*n*-ブタノール 4.0 ml で抽出した。この *n*-ブタノール層を取り、540 nm の吸光度を測定した。添加回収実験では添加した SDX と吸光度がほぼ直線関係を示し、回収率はほぼ 100% であった。

結 果

吸収・排泄試験 試験の成績は Table 1 および Fig. 1 に示すとおりである。すなわち、TMP については各組織中での最高濃度は肝臓では投与後 2 時間後に 10.8 mcg/g、腎臓では 6 時間後に 4.4 mcg/g、筋肉では、2, 3 時間後に 1.8 mcg/g、血液では 1 時間後に 0.4 mcg/ml であった。そして、肝臓では 24 時間後、腎臓では 12 時間後、筋肉では 48 時間後、血液では 3 時間後には定量限界以下となった。

SDX については最高濃度はどの組織中でも 1 時間後にあり、以後漸減した。そして、肝臓では 12 時間後、腎臓と筋肉では 24 時間後、血液では 6 時間後には定量限界以下となった。

各時間における各組織中での TMP と SDX の比率 (SDX/TMP) は各組織ごとに異なり、また時間が経過するにしたがって小さくなる傾向が認められた。

残留試験 試験の成績は Table 2 に示すとおりである。すなわち、TMP については筋肉および腎臓中の残留時間が最も長く、定量限界以下になったのは 48 時間後であった。これに対して、肝臓では 24 時間後、脾臓と血液では 6 時間後に定量限界以下になった。

SDX については肝臓、腎臓、筋肉では 24 時間後、

Table 1. The tissue levels of trimethoprim (TMP) and sulfadoxine (SDX) in ayu, *Plecoglossus altivelis*, given the single administration of 30 mg of TMP-SDX (1:5) per kg body weight. Determinations were made with pooled samples of 15 fishes in each time.

Organ	Drug	Time after oral administration (hr.)							
		1	2	3	6	12	24	48	72
Liver	TMP*	8.5	10.8	3.7	0.6	2.5	0	0	0
	SDX*	2.2	0.6	0.2	0.2	0	0	0	0
	SDX/TMP	0.26	0.06	0.05	0.33	—	—	—	—
Kidney	TMP*	1.3	3.2	2.9	4.4	0	0	0	0
	SDX*	2.6	1.5	0.9	0.4	0.2	0	0	0
	SDX/TMP	2.0	0.47	0.31	0.09	—	—	—	—
Muscle	TMP*	1.0	1.8	1.8	1.7	0.8	0.1	0	0
	SDX*	2.7	2.2	1.6	0.6	0.3	0	0	0
	SDX/TMP	2.7	1.2	0.89	0.35	—	—	—	—
Blood	TMP**	0.4	0.2	0	0	0	0	0	0
	SDX**	5.8	1.2	0.4	0	0	0	0	0
	SDX/TMP	14.5	6.0	—	—	—	—	—	—

* mcg/g, ** mcg/ml.

Fig. 1. The tissue levels of trimethoprim (TMP) and sulfadoxine (SDX) in ayu, *Plecoglossus altivelis*, given the single administration of 30 mg of TMP-SDX (1:5) per kg body weight. Determinations were made with pooled samples of 15 fishes in each time.

脾臓と血液では 12 時間後に定量限界以下になった。

考 察

アユに対する TMP の吸収・排泄，組織内濃度などの

薬理学的な性状を知るために，TMP と SDX の 1:5 合剤を自由摂餌により 1 回だけ投与したところ，TMP，SDX とも各組織中濃度は投与後短時間で最高値に達し，長くて 48 時間以内には定量限界以下に排泄されるこ

Table 2. The tissue levels of trimethoprim (TMP) and sulfadoxine (SDX) in ayu, *Plecoglossus altivelis*, given 30 mg of TMP-SDX (1:5) mixture per kg body weight per day successive 10 days. Determinations were made with pooled samples of 15 fishes in each time.

Organ	Drug	Time after the last oral administration (hr.)					
		2	6	12	24	48	72
Liver	TMP*	0.88	0.88	0.36	0	0	0
	SDX*	1.1	0.3	0.2	0	0	0
Kidney	TMP*	8.10	2.10	1.84	0.28	0	0
	SDX*	1.6	0.5	0.2	0	0	0
Spleen	TMP*	1.82	0	0	0	0	0
	SDX*	1.2	0.1	0	0	0	0
Muscle	TMP*	2.18	1.10	0.54	0.1	0	0
	SDX*	3.0	1.0	0.4	0	0	0
Blood	TMP**	0.35	0	0	0	0	0
	SDX**	1.4	0.3	0	0	0	0

* mcg/g, ** mcg/ml.

とがわかった。

TMP の最高濃度に達する時間は肝臓、筋肉では投与後 2 時間後、腎臓では 6 時間後、血液では 1 時間以内であると思われた。とくに、血液では最初の 1 時間目のサンプリング以前に最高濃度があり、投与後きわめて短時間で最高濃度に達し、すみやかに各組織に移行、濃縮されるものと思われる。このことは血液濃度に対するその他の組織中濃度の比率が常に 1 より大きいことでもわかる。各組織中の最高濃度値を比較すると、血液でははっきりしないが、それほど高い値とは思わず、その他の組織は肝臓、腎臓、筋肉の順である。各組織中の最高濃度からの減衰は肝臓と血液では急激であったが、筋肉と腎臓ではゆるやかであった。腎臓では排泄される TMP が最終的に蓄積されて、比較的最長維持されるものと思われる。なお、動物では TMP の代謝産物として数種類の物質が知られているが (国井, 1972), 魚類では不明である。

前報 (佐古・楠田, 1978) では *V. anguillarum* に対する TMP の最小発育阻止濃度 (MIC) は 0.20~1.56 mcg/ml であることを示した。今回、TMP と SDX の合剤 (TMP 5 mg, SDX 25 mg) を魚体重 1 kg 当り 30 mg となるように、1 回だけ餌料のクランブルに混ぜて自由摂餌投与した場合の TMP の血液中濃度は、1 時間後の 0.4 mcg/ml が最高であった。前後の関係から 1 時間以前にこれよりも高い濃度に達すると思われるが、

それにしても TMP の血液中濃度が MIC 値以上に維持される時間はきわめて短時間であると思われる。それにもかかわらず、この程度の投与量で治療効果の認められるのは (佐古・楠田, 1978), 血液中濃度はすみやかに減少するものの、他の組織中での有効濃度持続時間が血液中のそれにくらべて長いことが考えられる。

TMP の組織中濃度と持続時間の関係から、今回と同じ投与量で TMP の組織中濃度を一定レベルに保つためには、1 日 1 回以上の投薬間隔が必要であると思われる。

SDX については最高濃度に達するまでの時間は前後の関係から各組織とも 1 時間以内にあるものと思われ、血液中濃度は比較的上昇するが、ほかの組織中ではあまり上昇せず、排泄も早いことがわかった。

SMP と SDX の投与後の組織中での比率 (SDX/TMP) が、投与した TMP-SDX 合剤の比率よりも大きい値は血液の 1 時間後のみに認められ、その他の組織ではいずれも 5 以下であった。また、投与薬剤の比率と組織中での比率とは大きく異なり、各組織とも時間の経過とともに小さくなる傾向が認められた (Table 1)。これらのことから、アユ体内における TMP と SDX の代謝速度が異なり、全体的に TMP よりも SDX の方が消化管から組織への移行も排泄もすみやかなこと、TMP は血液から組織内へすみやかに濃縮されること、また、組織ごとにも両薬剤の挙動が異なることが推察された。このように、TMP と SDX のアユ体内での挙動が異なること

は TMP と SA の合剤本来の目的である組織内での両薬剤の一定比率での共存による抗菌作用の相乗作用効果からみると好ましいことではなく、魚体内で TMP と似た挙動をとる SA の選択と、配合比率、投与量が決定されるべきであろう。

魚類に対する TMP の吸収については McCARTHY ら (1974) がニジマスに対して TMP と 7 種の SA を組み合わせた合剤を投与したときの報告がある。それによると、TMP 20 mg+SA 200 mg/kg を 1 回強制的に経口投与したとき、TMP の血液中濃度は 5 時間後に最高値に達し、約 20 時間同一レベルを維持し、血液中から筋肉や腎臓への移行は投与後 2～3 時間のうちにすみやかにおこなわれるとしている。また、腎臓と筋肉中の TMP 濃度は投与後 5～6 時間で一たん減少するが、9～11 時間後には再び増加するとしている。そして、TMP と組み合わせる SA にはスルファメチルフェナゾールが最も適していることを報告している。

今回実験のアユではニジマスにくらべると TMP はすみやかに消化管から血液、ついで各組織へと移行し、短時間のうちに排泄されたが、血液や各組織内濃度はニジマスほど上昇しなかった。しかし、本実験における TMP 投与量は McCARTHY らの投与量の 1/4 の 5 mg/kg であり、単なる魚種の相違ばかりではなく、投与量の差異による違いが考えられ、簡単には比較できない。ヒトでは TMP の投与量を増すと、血液中濃度も増すことが知られている (加藤, 1972)。また、今回の実験は自由摂餌投与によるものであり、薬剤の逸散なども考慮する必要がある。

アユに SA を経口投与したときの組織中濃度については高橋・石井 (1968) の報告がある。そのなかで、スルファモノメトキシ 200 mg/kg を強制的に 1 回経口投与して、経時的に血液と筋肉中の濃度を測定した結果、アユの SA 代謝はニジマスに比較してはやいことが明らかにされている。

本実験の SDX の投与量は 25 mg/kg で SA としては少ない投与量であったが、調査した範囲では各組織とも 1 時間後の値が最高となり、以後急激に減少したことから、今回の実験からもアユの SDX の代謝はかなりはやいことが確かめられた。

残留性試験のため TMP-SDX (1:5) 合剤を純末総和換算で 30 mg/kg/day の投与量となるように 1 日 1 回、10 日間自由摂餌投与したところ、TMP は SDX に比べてやや残留性の長い傾向が認められた。すなわち、最も長時間残留する組織の定量限界以下に減少する時間は

SDX では肝臓、腎臓、筋肉の 24 時間であるのに対し、TMP では腎臓と筋肉の 48 時間であった。

残留性試験における各組織中濃度を TMP-SDX 合剤 30 mg/kg、1 回投与の吸収・排泄試験の結果と比べると、肝臓と腎臓、とくに肝臓中の TMP 濃度に差がみられた。これは単に投与回数の違いのほか、TMP と SDX の副作用による影響の可能性も考えられないではない。

実験にあたって、御便宜をはかっていただいた徳島県水産試験場の小竹子之助場長、城泰彦技師、供試薬剤の提供をいただいた共立商事株式会社の高居百合子社長、および実験に御協力いただいた昭和薬科大学の福島清実氏、高知大学の川合研児講師に厚く感謝いたします。

要 約

アユに TMP と SA の合剤を経口投与したときの、アユ体内での TMP および SA の吸収、排泄および残留性について試験をおこない、次の結果を得た。

1. アユに TMP と SDX の合剤 (1:5) を純末総和換算で 30 mg/kg の投与量となるように餌料のクランブルに吸着させ、1 回だけ自由摂餌投与したところ、各組織中における TMP の最高濃度値は肝臓では 2 時間後に 10.8 mcg/g、腎臓では 6 時間後に 4.4 mcg/g、筋肉では、2, 3 時間後に 1.8 mcg/g、血液では 1 時間後に 0.4 mcg/ml であった。SDX については各組織とも 1 時間後に最高濃度を示し、肝臓では 2.2 mcg/g、腎臓では、2.6 mcg/g、筋肉では 2.7 mcg/g、血液では 5.8 mcg/ml であった。また、各組織中での TMP と SDX の比率 (SDX/TMP) は時間および組織ごとに異なった。

2. アユに TMP と SDX の合剤 (1:5) を純末総和換算で 30 mg/kg/day の投与量となるように餌料のクランブルに吸着させ、1 日 1 回 10 日間連続投与したところ、TMP は肝臓では 24 時間後、腎臓、筋肉では 48 時間後、血液と脾臓では 6 時間後には定量限界以下となった。SDX については肝臓、腎臓、筋肉では 24 時間後、血液と脾臓では 12 時間後には定量限界以下となった。

文 献

- BRATTON, A. C. and E. K. MARSHALL (1939): A new coupling component for sulfanilamide determination. *J. Biol. Chem.*, 128, 537-550.
 加藤康道 (1972): 新薬シンポジウム 1. Sulfamethoxazole Trimethoprim 合剤. 吸収・排泄・臓器内濃度. *Chemotherapy*, 20(2), 317-318.
 国井乙彦 (1972): 新薬シンポジウム 1. Sulfamethoxazole Trimethoprim 合剤. 代謝 (特別発言). *Chemo-*

- therapy*, 20(2), 318-319.
- MCCARTHY, D. H., J. P. Stevenson and A. W. Salsbury (1974): A comparative pharmaco-kinetic study of seven sulphonamides and a sulphonamide potentiator trimethoprim, in rainbow trout (*Salmo gairdneri*, RICHARDSON). *Aquacult.*, 4, 299-303.
- 佐古 浩・楠田理一 (1978): 養殖アユのビブリオ病に対するトリメトプリムの化学療法的研究—I. 病原菌に対するサルファ剤とトリメトプリムの細菌学的評価. 魚病研究, 13(2), 91-96.
- SCHWARTZ, D. E., B. A. KOEHLIN and R. E. WEINFELD (1969): Spectrofluorimetric method for the determination of trimethoprim in body fluids. *Chemotherapy*, Suppl., 14, 22-29.
- 高橋哲夫・石井重之 (1968): アユにサルファ剤を与えた時の組織内濃度について—I. 千葉内水面報, 1, 24-30.