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*

(平成元年 10 月 11 日受理)

春日 洋二*² 棚橋 宣康*²
荒井 真*³ 森川 進*³

Nalidixic Acid Residues in Rainbow Trout and *in vitro* Hepatic Microsomal Oxidation of Nalidixic Acid in Fresh-Water Fishes (Residue Levels of Nalidixic Acid and Its Metabolites in Cultured Rainbow Trout (II))

Yoji KASUGA*², Nobuyasu TANAHASHI*², Makoto ARAI*³ and Susumu MORIKAWA*³

(*²Gifu Prefectural Institute of Public Health: 4-6-3, Noishiki, Gifu, Japan;

*³Gifu Prefectural Fisheries Experimental Station: Hane, Hagiwara-cho,
Mashita-gun, Gifu, Japan)

Disappearance of nalidixic acid (1-ethyl-1,4-dihydro-7-methyl-4-oxo-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid, NA) from the tissues of rainbow trout was studied after consecutive administration for 5 days at the rate of 20 mg/kg. The concentrations of NA in tissues (liver, kidney, muscle and serum) reached peak levels of 5.04~11.89 µg/g within 24 hours after dosing, followed by a gradual decrease, and fell below the detection limit (0.02 µg/g) within 16 days.

In the fishes for which use of is permitted NA, for example in rainbow trout (*Salmo gairdnerii*), ayu (*Plecoglossus altivelis*), amago (*Oncorhynchus rhodurus*), yamame (*Oncorhynchus masou*) and iwana (*Salvelinus pluvius*), the activity of hepatic microsomal oxidation of NA to 7-OHNA (1-ethyl-1,4-dihydro-7-hydroxymethyl-4-oxo-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid) and 6-OHNA (1-ethyl-1,4-dihydro-6-hydroxy-7-methyl-4-oxo-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid) was evaluated *in vitro*. There was almost no difference of the activity among these fishes, and their activities were less than one-tenth of that of mouse.

This result suggests that in other fishes, as in the rainbow trout, the tissue levels of metabolites having antibacterial activity were much lower than those of unchanged NA.

(Received October 11, 1989)

key words: ナリジクス酸 nalidixic acid; ニジマス rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) アユ Ayu (*Plecoglossus altivelis*); イwana Iwana (*Salvelinus pluvius*); ヤマメ Yamame (*Oncorhynchus masou*); アマゴ Amago (*O. rhodurus*); 養殖魚 cultured fish; 肝ミクロソーム酸化 hepatic microsomal oxidation

緒 言

著者らは既報*^{1,2}で、ニジマスにおけるナリジクス酸

*¹ 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 (第2報)

* 岐阜県衛生研究所: 岐阜市野一色 4-6-3

* 岐阜県水産試験場: 岐阜県益田郡萩原町羽根 2605

*¹ 「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) を第1報とする。

(1-ethyl-1,4-dihydro-7-methyl-4-oxo-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid 以下 NA) の魚体内残留について、投薬後4日目から減少傾向が緩慢になったため、5日間の試験結果から現行休業期間が適切であるか否か判断出来なかったことを報告した。そこで今回は NA の現行休業期間を再評価するため長期残留試験を実施した。

また、NA の代謝物については、7-ヒドロキシメチル体 (1-ethyl-1,4-dihydro-7-hydroxymethyl-4-oxo-1,8-

Microsome Preparation

Liver

- add 9-fold volume of 0.25 M sucrose, 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)
- homogenize (Potter-Elvehjem type)
- centrifuge for 20 min at 15,000×g

Supernatant

- centrifuge for 60 min at 105,000×g

Precipitate

- add 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)
- suspend microsomal pellet

Microsomal suspension

Determination of hydroxylase activity

Reaction mixture (1.7 ml of 50 mM phosphate buffer containing 0.7 mM NADP, 7.0 mM glucose-6-phosphate, 0.5 U glucose-6-phosphate dehydrogenase and 5.0 mM MgCl₂, 0.1 ml of microsomal suspension (2 mg of microsomal protein) and 0.2 ml of 0.1~1.0 mM NA)

- incubate for 30 min at 30°C (mouse 37°C)
- add 0.5 ml of 10% TCA
- centrifuge for 5 min at 3,000 rpm

Supernatant (1 ml)

- add 2 ml of CHCl₃
- evaporate to dryness
- add 0.5 ml of CH₃OH

HPLC

Scheme 1. Microsomal preparation and determination of hydroxylase activity

naphthyridine-3-carboxylic acid, 以下 7-OHNA) が胆汁及び脾臓で、6-ヒドロキシ体 (1-ethyl-1,4-dihydro-6-hydroxy-7-methyl-4-oxo-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid, 以下 6-OHNA) が胆汁及び肝臓で検出されたが、未変化体に比べてその濃度は極めて低く、残留期間も短かったことから、現行休業期間を遵守する限り食品衛生上問題にならないことを報告した¹⁾。

NA が使用できる対象魚には、ニジマス以外にもアユ、イwana属のイwana、サケ属のヤマメ、アマゴがいる。これら魚種についてもニジマス同様、抗菌性を有する代謝物の組織内濃度を検討することが必要であると考えられたが、これら全魚種について *in vivo* で検討することは極めて困難と思われた。そこで、*in vitro* で肝ミクロソームヒドロキシル化活性 (ヒドロキシ体生成量) を測定し、その結果と、*in vivo* でニジマスを用いて行った既報¹⁾の結果から、これらニジマス以外の魚種の *in vivo* における代謝物の組織内濃度の推定を試みた。

実験方法

1. NA の残留性

供試魚: 昭和 62 年 5 月から 6 月の期間に岐阜県水産試験場の試験池で飼育された平均体重 135.9 g の一年魚のニジマス (*Salmo gairdnerii*) 92 尾を用いた。

投薬方法: 原末換算で 20 mg/kg 魚体重/day になるように、ナリジクス酸製剤 (第一製薬(株)製ウイントマ

イロン-F 散) を局方ダイズ油で懸濁させて配合飼料に展着させ、5 日間自由摂餌させた。試験期間中は水温が 11.9~17.8° の流水水槽で試験魚を飼育した。この間、1 日 1 回給餌した。

サンプリング方法: 投薬終了後、1, 3, 5, 7, 10, 13, 16, 19, 21, 24, 27 及び 30 日目に 5 尾ずつ取り上げ、肝臓、腎臓、筋肉及び血液を採取した。血液は尾柄切断により採血し、4,000 rpm で 10 分間遠心分離後得られた血清を試料とした。全試料は分析時まで凍結保存した。

分析方法: NA の定量は既報¹⁾で著者らが報告した方法によった。ただし、紫外部吸光度法での測定は、検出感度を上げるため波長を 335 nm から 258 nm (λ_{max}) に変更し行った。

なお、本法での検出限界は 0.02 µg/g であった。

2. NA の肝ミクロソーム酸化

2.1 材料及び試薬

供試魚は岐阜県水産試験場で飼育された平均体重 235.9 g のニジマス、52.3 g のアユ (*Plecoglossus altivelis*), 146.6 g のイwana (*Salvelinus pluvius*), 274.1 g のヤマメ (*Oncorhynchus masou*), 133.1 g のアマゴ (*O. rhodurus*) を用い、マウスは ddy オス 4 週齢 (平均体重 25.7 g) を購入し用いた。NA 及びその代謝物は第一製薬(株)から供与された標準品を用い、nicotinamide adenine dinucleotide phosphate monosodium (以下

Table 1. Tissue Levels of Nalidixic Acid in Rainbow Trout

Dose: 20 mg/kg, 5 days

Tissue	No. of fish	Days after administration						
		1	3	5	7	10	13	16
Serum	1	10.42*	0.34	0.11	0.03	ND**	0.02	ND
	2	5.75	1.13	0.03	0.03	ND	ND	ND
	3	7.06	0.40	0.06	0.03	ND	0.02	ND
	4	8.30	1.38	0.03	0.02	0.02	0.02	ND
	5	4.38	0.54	0.05	0.02	ND	0.02	ND
	Average	7.18	0.76	0.06	0.03			ND
	SD	2.33	0.47	0.03	0.01			
Liver	1	—	0.94	0.06	0.03	0.02	ND	ND
	2	7.94	2.25	0.06	0.03	ND	ND	ND
	3	9.00	0.75	0.10	0.03	0.03	0.02	ND
	4	9.06	2.63	0.04	0.02	ND	ND	ND
	5	7.81	1.33	0.07	0.02	0.02	ND	ND
	Average	8.48	1.59	0.07	0.03			ND
	SD	0.70	0.81	0.02	0.01			
Kidney	1	17.23	1.40	0.13	0.03	0.04	0.02	ND
	2	11.25	2.50	0.07	0.04	0.02	0.02	ND
	3	11.77	0.77	0.07	0.03	0.05	0.02	ND
	4	9.34	2.16	0.07	0.02	0.02	ND	ND
	5	9.71	0.80	0.07	0.04	0.03	ND	ND
	Average	11.89	1.53	0.08	0.03	0.03		ND
	SD	3.17	0.79	0.03	0.01	0.01		
Muscle	1	7.69	0.73	0.17	0.04	0.02	ND	ND
	2	5.00	0.55	0.08	0.04	0.02	ND	ND
	3	2.81	0.43	0.07	0.04	0.02	0.04	ND
	4	5.06	1.75	0.07	0.03	0.02	0.02	ND
	5	4.63	0.97	0.08	0.04	0.02	ND	ND
	Average	5.04	0.89	0.09	0.04	0.02		ND
	SD	1.74	0.52	0.04	0.00	0.00		

* $\mu\text{g/g}$; ** $< 0.02 \mu\text{g/g}$

NADP), glucose-6-phosphate dehydrogenase (以下 Glc-6-PDH), D-glucose-6-phosphate (以下 Glc-6-P), 牛血清アルブミン及び Tris(hydroxymethyl)aminomethane は Sigma Chemical 社製を用いた。

その他の試薬は和光純薬工業(株)製を用いた。

2.2 肝ミクロソームの調製法

魚及びマウスを屠殺後、肝臓を摘出し重量を測定した後、9 倍量の 0.02 M ショ糖、10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4) を加え、ポッター形テフロンホモジナイザーによりホモジナイズした。次に 11,000×g で 20 分間遠心分離して得られた上清をさらに 105,000×g で 60 分間遠心分離し、沈澱部分をミクロソーム分画とした。本ミクロソーム分画は 50 mM リン酸塩緩衝液 (pH 7.4) (リン酸二ナトリウム, リン酸一カリウム) に懸濁させ、ミ

クロソーム懸濁液とした。

2.3 ヒドロキシル化活性の測定法

NADPH 生成系 {0.7 mM NADP, 7.0 mM Glc-6-P 0.5 U Glc-6-PDH, 5.0 mM MgCl_2 を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4)} にミクロソーム懸濁液 (2.05 mg protein) を加えて予備加温した後、NA を 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 及び 1.0 mM になるように加え、30° (マウスは 37°) で 15 分間インキュベートした。インキュベート後 10% TCA 溶液 0.5 ml を加えて 10 分間放置し、3,000 rpm で 5 分間遠心分離して得られた上清に 2 倍量のクロロホルムを加え、10 分間振とうした。クロロホルム層は無水硫酸ナトリウムで脱水し、ロータリーエバポレーターで減圧乾固後、残留物をメタノール 0.5 ml に溶解して HPLC 用試料とした。

NA 及びその代謝物の測定は、既報¹⁾で著者らが報告した方法で行った。ただし、紫外外部吸光度法での測定波長は 335 nm から 258 nm (λ_{max}) に変更し行った。

タンパク濃度の測定は、牛血清アルブミンを標準として Lowry 法²⁾で行った。

以上の操作を Scheme 1 に示した。

結果及び考察

1. NA の残留性

ニジマス組織中の NA 濃度を Table 1 に示した。

血清、肝臓、腎臓及び筋肉の平均濃度は投薬終了後 1 日目で最高値 (それぞれ 7.18, 8.48, 11.89 及び 5.04 $\mu\text{g/g}$) を示し、5 日目までは指数関数的に減少した。その後は数十 ppb の低レベルで推移し、全組織とも投薬終了後 16 日目で検出限界未満となった。

薬物を経口投与したとき、薬物、器官間の親和性の大きさにより器官濃度序列が見られ、薬物の残留や排泄を問題にする場合は最高濃度器官に注目する必要があるとされる。本序列は実験条件により必ずしも一致しないが、薬物によりある一定の傾向があり、一般に肝臓、腎臓及び脾臓の濃度は高く、血液はこれらより低く、筋肉は血液より低い場合が多いと言われている³⁾。本報での NA に対する器官濃度序列も腎臓>肝臓>血液>筋肉の順で、肝臓及び腎臓の濃度は高く、筋肉は低かった。

本結果は“動物用医薬品・飼料添加物の畜産物への残留とその分析法³⁾”に引用された結果 (筋肉>肝臓>腎臓>血液) とは異なったが、これは実験条件の違いによることが考えられる。

今回実施した残留試験結果では、投薬終了後 7 日目の血清、肝臓、腎臓及び筋肉の NA 濃度はそれぞれ 0.03 ± 0.01 , 0.03 ± 0.01 , 0.03 ± 0.01 及び 0.04 ± 0.00 であり、公定法⁴⁾での NA の検出限界が $0.05 \mu\text{g/g}$ であることから、現行休薬期間 (7 日) を遵守すればニジマス中の NA 濃度は検出限界未満となり、食品衛生上問題ないと言える。

Table 2. The Effect of Incubation Temperature on Hydroxylase Activity

Fish	Temp. (°C)	Metabolites (nmol/mg protein/min)	
		7-OHNA	6-OHNA
Ayu	20	0.012	0.001
	25	0.012	0.001
	30	0.017	0.002
	35	0.017	0.002
	40	0.010	0.001
Amago	20	0.006	0.001
	25	0.008	0.001
	30	0.006	0.002
	35	0.006	0.001
	40	0.006	0.001

Table 3. The Effect of Substrate Concentration on Hydroxylase Activity

Substrate concentration (mM/ml)	Metabolites (nmol/mg protein/min)		
	7-OHNA	6-OHNA	
Mouse	0.1	0.137	0.038
	0.2	0.175	0.045
	0.4	0.253	0.067
	0.6	0.255	0.036
	0.8	0.264	0.027
	1.0	0.244	0.027
Rainbow trout	0.1	0.008	0.001
	0.2	0.011	0.002
	0.4	0.011	0.002
	0.6	0.011	0.002
	0.8	0.013	0.002
	1.0	0.016	0.002
Amago	0.1	0.008	0.001
	0.2	0.013	0.002
	0.4	0.015	0.002
	0.6	0.013	0.002
	0.8	0.012	0.002
	1.0	0.011	0.002
Yamame	0.1	0.002	0.001
	0.2	0.002	0.001
	0.4	0.004	0.002
	0.6	0.003	0.002
	0.8	0.004	0.001
	1.0	0.008	0.001
Iwana	0.2	0.010	0.002
	0.6	0.012	0.002
	0.8	0.013	0.002
	1.0	0.017	0.002
Ayu	0.1	0.003	0.002
	0.2	0.007	0.002
	0.4	0.008	0.003
	0.6	0.009	0.003
	0.8	0.011	0.003
	1.0	0.015	0.002

るが、飼育条件の多様性、より高感度な分析法の開発 (堀江ら⁵⁾が第 52 回食品衛生学会で発表した方法での検出限界は $0.01 \mu\text{g/g}$ であった。)等を考慮すれば、休薬期間の延長が望まれ、著者らが行った試験結果では 16 日程度必要と考えられる。

2. NA の肝ミクロソーム酸化

肝ミクロソーム酵素活性はラット等哺乳動物では一般

* 堀江正一, 斎藤貢一, 星野庸二, 能勢憲英, 中澤裕之: 日本食品衛生学会, 第 52 回学術講演会要旨集 p. 41 (1986).

に37°で測定されているが、魚類、特に冷水性の魚種では哺乳動物より低い温度(25°)で測定されている例⁶⁾があることから、まず冷水性魚種のヒドロキシル化活性測定のための最適温度条件を検討し、結果をTable 2に示した。

アユは30~35°が最適条件と思われたが、アマゴでは温度による活性の差は認められなかった。本結果から測定温度は30°とした。

次にヒドロキシル化活性に及ぼす基質濃度について検討した。

予備試験で基質濃度を1.0~10.0 mMの範囲に設定して検討したところ、低濃度ほど活性が強かった(1.0 mMで最高値を示した)ので基質濃度は1.0 mM以下で検討した。結果をTable 3に示した。

各魚種とも6-OHNAの生成量は基質濃度によりほとんど変わらなかったが、7-OHNAの生成量は基質濃度が1.0 mMで最も多かった。本結果から基質濃度は1.0 mMとした。

以上の測定条件下でニジマス、アマゴ、ヤマメ、イワナ、アユの各魚種及び魚類と哺乳動物を比較する目的でマウスについてヒドロキシル化活性を測定した結果、各魚種共その活性はマウスの1/10以下であった。

魚類の薬物酸化能が哺乳動物に比べて著しく低いことの主因は、肝ミクロソーム中のチトクロームP-450含量が多く、魚類で哺乳動物に比べてかなり低いことによるものと考えられている⁶⁾。

又、ニジマスと他の魚種では活性にほとんど差はなかった。

本結果と既報¹⁾でNAを経口投与したときの代謝物の組織内濃度が未変化体に比べてかなり低く、残留期間も短かったことを考え合わせると、ニジマス同様他の魚種においても抗菌性を有する代謝物の組織内濃度は未変化体よりかなり低いことが推察され、その残留性は食品衛生上問題にならないと考えられる。

ま と め

1. NAの残留性

各組織共投薬終了後16日で検出限界(0.02 µg/g)未満となった。公定法の検出限界(0.05 ppm)からすれば、現行休薬期間(7日)で十分であるが、飼育条件の多様性、より高感度な分析法の開発などを考慮すれば、16日程度の休薬期間が望まれる。

2. NAの肝ミクロソーム酸化

ニジマスと他の魚種(アユ、イワナ、ヤマメ、アマゴ)のヒドロキシル化活性を比べると、その差はほとんどなかった。本結果と既報¹⁾の結果を考え合わせると、ニジマス同様他の魚種においても食品衛生上危惧された抗菌性を有するNA代謝物の組織内濃度は、未変化体に比べかなり低いことが推察され、現行休薬期間を遵守する限り問題ないと考えられる。

謝 辞

本研究に際し、御協力頂きました第一製薬(株)井上進氏に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 春日洋二, 杉谷 哲, 荒井 真, 森川 進: 食衛誌, **28**, 267~272 (1987).
- 2) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J.: J. Biol. Chem. **193**, 265 (1959).
- 3) (財)畜産生物科学安全研究所編: “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” p. 88~91 (1985) 近代出版.
- 4) 厚生省環境衛生局乳肉衛生課編: “畜水産食品中の残留物質検査法第2集の5” p. 1~8 (1982).
- 5) 小野邦夫: 化学と生物 **17**, 761~768 (1980).
- 6) Ahokas, J. T.: “Pesticide Xenobiotic Metabolism in Aquatic Organisms”, ed. by Khan, M. A. Q., Lech, J. J., Menn, J. J., ACS Symposium Series 99, p. 279 (1975), American Chemical Society, Washington, D. C.