受賞者総説

養殖魚におけるゼノバイオティックスの比較薬理学的研究

(平成 15 年度日本水産学会賞進歩賞受賞)

上 野 隆 二*

(三重大学生物資源学部)

Comparative pharmacological studies of xenobiotics in farmed fishes

RYUJI UENO*

Faculty of Bioresources, Mie University, Tsu, Mie 514-8507, Japan

高等動物の体内に入り込む物質のうち、その動物の体構成成分でも栄養成分でもない物質は生体にとっては異物になる。異物のうち、低分子の有機化合物で、脂溶性があり、薬理・毒性作用のある物質はゼノバイオティックス(生体異物)と呼ばれている。水産分野におけるゼノバイオティックスには、水系媒介による工場汚染、農薬などや養殖場における水産用医薬品がある。近年、我が国の水産養殖技術の発展により魚介類の集約的な高密度飼育が可能になり、水産養殖業の著しい発展がなされている。これに伴い発生する種々の疾病を予防または治療するために数多くの水産用医薬品が用いられている。水産用医薬品の投与は、魚介類の食品衛生面における魚体内残留のみならず過剰または過少投与による環境汚染、耐性菌の増加など種々の問題が生じてくる。したがって、水産用医薬品の有効性、安全性を考慮した適切な投薬法が必要となる。本研究は、養殖魚に用いられる種々のゼノバイオティックスのうち、水産用医薬品(主として抗菌性物質)について比較薬理学的視点から行った。

1. HPLC による定量法の開発・改良

生体内の薬物動態を知るには、投与後の薬物濃度を知る必要がある。その定量法には、生物検定、蛍光測定法および高速液体クロマトグラフィー(HPLC)などがあるが、生物検定および蛍光測定法は感度や代謝物に対して非特異的である。一方、HPLC法は高い感度と分離能を有することから近年よく用いられている。HPLCを用いた定量法は、いずれも定量妨害の少ない血液や筋肉に関するものが多く、特に養殖魚類は筋肉中に多量の脂質を含むため、前処理に手間を要する。また、肝臓、腎臓、脾臓、胆汁などといった排泄器官も分析する必要

があるが、種々の妨害物質が存在する。そこで、本研究を遂行するにあたり、HPLCの定量法の開発から着手した。その結果、オキシテトラサイクリン(OTC),¹⁾ オキシソリン酸(OA),²⁾ ナリジクス酸(NA),³⁾ スルファモノメトキシシン(SMM),^{4,5)} スルファジメトキシシン(SDM),^{4,5)} ニフルスチレン酸(NFS),⁶⁾ ミロキサシン(MLX),⁷⁾ フロルフェニコール(FF)⁸⁾などの定量法を開発・改良し、いずれも農林水産省による残留分析法の確立基準(添加回収率70-80%以上、変動係数10%以下、検出限界0.05-0.1 ppm)に充分適合できた。また、採血後約30分以内で定量する簡易HPLC法も開発した。OTC⁹⁾およびFF(未発表)は単独で、OA, SMMとそのアセチル体、SDMとそのアセチル体、MLXは同時定量可能であった。¹⁰⁾ 本方法は筋肉にも対応できるため、養殖魚の残留検査のためのモニタリングとしても利用できる。

2. モデル解析による魚種間の比較薬物動態と薬物投与量の推定

通常、薬物動態解析では強制経口投与後の血中薬物濃度データおよび血管内投与後の血中薬物濃度データを用いる。前者の場合、種々の影響(餌料形態、薬物の溶解率、生体利用率など)なく、循環系に入るため、魚種間の動態解析に適している。しかし、パラメーターの比較は、同一モデルでなくてはならない。一方、強制経口投与後のデータは吸収・消失速度や薬物の分布状態(分布容)の評価が出来るため、薬物投与量の評価などに利用される。さらに、強制経口投与および血管内投与後の血中薬物濃度データをモーメント解析することにより、生体利用率を算出することが出来る。ここでは、養殖魚類でよ

く使用される OTC, OA, SMM における血管内投与後の血漿内濃度を科の異なる魚種間（ウナギ、ニジマス、ブリ）で薬物動態を比較した。これらはいずれも肉食魚であるが、生息水温域が異なる。それぞれウナギはウナギ科で、広域水温、ニジマスはマス科で冷水域、ブリはアジ科で温水域である。本研究において、血管内投与の動態解析ではすべて 2-コンパートメントで解析された。OTC では、ウナギ,¹¹⁾ ニジマス,¹²⁾ ブリ¹³⁾の順に、分布速度半減期 ($T_{1/2\alpha}$) では、2.08, 1.53, 0.735 h であり、消失半減期 ($T_{1/2\beta}$) は 115, 60.3, 22.5 h あった。一方、魚体内からの薬物の除去率を表す総クリアランス (Cl_B) は、2.98, 16.2, 15.1 mL/kg/h であった。これらの結果から、ウナギの場合、投薬後ゆっくりと組織内に分布し、排泄されるが、ブリの場合、全くその反対であった。すなわち、分布も排泄も非常に早く代謝された。また、SMM^{14,15)}では、 $T_{1/2\alpha}$ は 0.25, 0.43, 0.53 h, $T_{1/2\beta}$ は 86.6, 34.7, 5.78 h, Cl_B は 3.38, 18.5, 66.7 mL/kg/h であった。さらに OA¹²⁾（ウナギおよびブリ（未発表））を用いた場合もほぼ OTC と同様の結果が得られた。このことから薬物動態速度は、薬物の種類よりも魚種によって非常に異なるといえる。なお、本研究では、上記薬物以外に、NA,¹⁶⁾ NFS,¹⁶⁾ MLX,⁷⁾ FF⁸⁾の体内動態も報告した。

生体利用率 (F) はバイオアベイラビリティとも呼ばれ、体循環血中に入った薬物量の投与された薬物量に対する比率であり、投与された部位からの薬物の吸収の割合を示す指標である。通常、経口投与された薬物は消化管より吸収され血液中出现するが、投与された薬物の全量が吸収され体循環血中に入るとは限らない。一方、血管内投与された薬物は直接血中に入るため、全量が体循環血中に入ることになる。経口投与後の血中薬物濃度一時間曲線下面積 (AUC) と血管内投与後の AUC の比率は F と定義される。AUC から算出された OTC の生体利用率 (F) は、ウナギで 0.69%,¹¹⁾ ニジマスで 0.6%,¹²⁾ ブリで 0.6%,¹³⁾ と非常に低い値を示した。OTC は、飼料中の蛋白質との結合や Mg, Ca などの金属イオンとのキレート形成により不溶性となり、消化管からの吸収が低下（脂質膜への通過が困難）すると考えられる。SMM の場合、F はウナギ、ニジマス、ブリの順でそれぞれ 24, 19, 16% であり、OTC と同様、魚種間での差はあまり認められなかった。また、ウナギでは MLX の F は 87.9%,⁹⁾ NA ではニジマスで 89.6%,¹⁶⁾ FF では 74.6%（未発表）やアンピシリン (AMP) ではブリで 74.6%（未発表）であり、F は魚種よりもむしろ餌料形態や薬物、水温などの違いにより異なると考えられる。

経口投与後の血中濃度データ、F 値および自由摂餌での血中濃度データを基にして、現行の投薬基準法を評価

し、理想投与量を算出した。本研究において、ウナギやニジマスへの現行投薬法はむしろ環境負荷を与える過剰投与の傾向、またはほぼ適正投与であった。しかし、ブリの場合、すべての薬物 (OTC, OA, FF, AMP, SMM) において、薬剤耐性菌の発生を予知するような過少投与であった。すなわち、現行の用法・用量で 1 日 1 回投与した場合、次の投与時までにはすでに目的とする病原菌の MIC（最小発育阻止濃度）以下になっていた。そこで、1 例として、ブリの疾病で常用される OA の理想投与量を算出してみた。現行の使用基準では養殖ブリは、経口投与（自由摂餌）で、30 mg/kg/日である。これを 1 日 1 回投与し、かつ自由摂餌した場合、70%（未発表）の取り込みになる。これを上記の強制経口投与後の血中濃度データをモデル解析し、シミュレーションを描くと 24 時間後にはすでに、MIC（代表的な類結節症の病原菌 *Pasteurella piscicida* では 0.2 μ g/mL）以下になる。また、実際に投薬実験した場合でも同様の結果を得た。そこで、薬の取り込みの安全性を考慮し、目的の MIC の 5 倍の範囲で血中濃度を維持する濃度を算出すると、初回投与を 17–20 mg/kg、維持投与を 9–15 mg/kg で、4–6 時間毎投与すれば、薬剤耐性菌の発生の憂いなく、治療できると思われる。なお、ブリでの OA 耐性菌の発生は非常に高く、1986 年から 1988 年に分離されたブリ由来の *P. piscicida* の OA に対する薬剤感受性 MIC 値は供試株の約 1/3 が 1.56 μ g/mL であったと報告されている。^{18,19)} したがって、ブリの場合、現行の使用基準の見直しが急務であるといえる。

3. 魚類における薬物代謝および代謝経路

魚類の薬物代謝については、哺乳類に比べて比較的単純といわれている。OA の場合、哺乳類では、OA は腎臓に移行し、尿中に排泄される。オキシリン酸の代謝物は、ラット、ウサギ、イヌ²⁰⁾では未変化体および未変化体のメチレンジオキシ環が開環し、側鎖の水酸基がメチル化された 7-OHOA ならびにそのグルクロン酸抱合体の存在が報告されている。ラット²¹⁾の尿中ではその他に 7-OHOA の異性体である 6-OHOA とそのグルクロン酸抱合体も検出された。

魚類における OA の胆汁中代謝物は、淡水産魚（ニジマス、ウナギ、ティラピア）と海水産魚（マダイ、マアジ、ブリ、ヒラメ）との間に代謝物の差異があった。²¹⁾ 前者の場合、未変化体、7-OHOA および 6-OHOA のグルクロン酸抱合体が、後者の場合、7-OHOA および 6-OHOA のグルクロン酸抱合体が検出されたが、未変化体の抱合体はいずれも検出されなかった。しかしながら、ブリ経口投与後の胆汁の β -グルクロニダーゼ処理により、未変化体のグルクロン酸抱合体の存在も報告されている。³⁾ OA を経口投与した場合、

ニジマス、アマゴ、ブリにおいても腎臓に多く蓄積されることから、魚類でも OA の尿中の排泄は主要な経路といえる。⁴⁾ 一般に、淡水産魚における OA の体内残留時間は海水産魚に比べて長い。その原因として環境水、すなわち、浸透圧調節作用の違いと報告されている。²²⁾

哺乳類におけるスルホンアミドの代謝物は N^4 -アセチル体とグルクロン酸抱合体の 2 つの型が報告されている。一方、魚類において、コイ,²³⁾ ニジマス²⁴⁾ 中の N^4 -アセチル体の体内動態についての報告がある。ニジマスの尿や胆汁中から 5 種のスルホンアミドのアセチル化された代謝物とグルクロン酸抱合された代謝物の存在も確認された。²⁵⁾ ニジマス、ウナギ、ブリでは、SMM がアセチル化およびグルクロン酸抱合されている。^{7,26)} さらに、グルクロン酸抱合化よりもアセチル化される代謝物が大部分であり、また、グルクロン酸抱合された N^4 -アセチル体の存在も報告された。SMM はアセチル化されることによって抗菌作用を失うが、代謝されたアセチル体は難溶性のため、体内で尿結石を生成し、腎障害を起こす要因となる。また、哺乳類では、アセチル体の脱アセチル化も報告されている。それゆえ、魚体そのものへ影響のみならず、抗菌作用のある未変化体への変換の可能性は、食品衛生上の問題となる。

4. 閉鎖系養殖場における薬物分布と環境評価

ニジマスやウナギなどの閉鎖系養殖場において、薬物投与した場合、残存薬物によって池水、沈殿物が汚染され、それらの近辺への廃棄により多大な環境負荷への影響が考えられる。養殖ニジマスおよびサケの治療後における野生の魚類および沈殿物の中の OTC の残留物の存在を報告し、また多くの OTC 耐性細菌が野生の魚の腸から分離されたことを報告された。²⁷⁾ そこで、現行の用法、用量によって投薬された OTC の養鰻場における分布状況を調べた。¹¹⁾ 規定どおり経口投与された OTC の血中濃度は、最終投薬日には最高水準 ($0.64 \mu\text{g}/\text{mL}$) に達した。しかしながら、この濃度はウナギの病原菌である *Aeromonas punctata* や *A. liquefaciens* に対する OTC の MIC ($0.7\text{--}1.25 \mu\text{g}/\text{mL}$) を超えることなく、明らかに過少投与と判断された。投薬中に、池水の中の OTC のレベル ($0.23\text{--}0.27 \mu\text{g}/\text{mL}$) はほぼ一定であったが、投薬終了後速やかに減少し、5 日目で検出限界以下になった。一方、沈殿物中には、OTC が大量に蓄積したが、終了後、27 日目で検出されなかった。OTC 投薬後の養鰻場における分布状況を概算してみると、沈殿物に 74%、池水に 25.9%、魚体内利用は 0.07% であった。すなわち、投薬された OTC の 99.9% が環境に流出し、環境汚染や耐性菌の出現が示唆された。この主な理由として、投薬する際の練り餌が原因と考えられる。OTC の代替薬の使用か、もっと効率のよい投薬用餌料

の開発が必要とされる。

5. 養殖ウナギにおける簡易残留検査法

本研究は養鰻業界が行う自主検査システムの構築に必要な医薬品の簡易残留検査を開発することを目的とした。すなわち、養殖ウナギの食品としての安全性を確保するとともに、その客観的な安全性評価により付加価値向上を目指すものである。まず、技術的に簡便で高度な機器等を必要としないバイオアッセイ法、すなわち、ウナギ用医薬品全般に感受性を有する供試菌株を選定し、検査部位や培養条件などの検査条件を調べ、ウナギにおける直接バイオアッセイ法を開発した。^{28,29)} 一方、バイオアッセイ法を技術補完し、安全性を確認できる高感度で迅速な検査法が必要である。そこで、指導機関が行う高感度で迅速な検出法として HPLC 簡易法のシステム化も考察した。³⁰⁾ これらの簡易法はすでに愛知県の養鰻漁協の自主検査に使用されており、養殖業者にとってはすでに出荷に伴う作業の 1 つとして認知されている。

6. おわりに

わが国で現在使用されている水産用医薬品の多くは、治療効果すなわち、生残率を目的とした投薬量で設定しているため、実際に魚体内血中濃度を調べた場合、薬物の過剰投与や過少投与を示す結果も出ている。最近、消費者は、食の安全性に対し、非常に関心を持っているため、養殖魚の品質評価を厳しくしなければならない。したがって、今後食品としての養殖魚の品質向上や投薬による養殖場への環境負荷低減を考慮した、可能な限り適正な投薬法が必要といえる。

文 献

- 1) Ueno R, Uno K, Kubota SS. Determination of oxytetracycline in fish tissues by high performance liquid chromatography. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1989; **55**: 1273-1276.
- 2) Ueno R, Horiguchi Y, Kubota SS. Levels of oxolinic acid in cultured yellowtail after oral administration. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1988; **54**: 479-484.
- 3) Uno K, Aoki T, Ueno R. Pharmacokinetics of nalidixic acid in cultured rainbow trout and amago salmon. *Aquaculture* 1992; **102**: 297-307.
- 4) Ueno R, Uno K, Kato M, Kubota SS, Aoki T. Simultaneous determination of sulfamonomethoxine, sulfadimethoxine and their N^4 -acetylated forms in fish tissues by high performance liquid chromatography. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1991; **57**: 549-554.
- 5) Uno K, Aoki T, Ueno R. Pharmacokinetics of sulphamonomethoxine and sulphadimethoxine following oral administration to cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 1993; **115**: 209-219.
- 6) Uno K, Aoki T, Ueno R. Pharmacokinetics of sodium nifurstyrenate in cultured yellowtail after oral administration. *Aquaculture* 1993; **116**: 331-339.

- 7) Ueno R, Okada Y, Tatsuno T. Pharmacokinetics and metabolism of miloxacin in cultured eel. *Aquaculture* 2001; **193**: 11-24.
- 8) 上野隆二, 寺門弘悦, 青木恭彦. 高速液体クロマトグラフィーによる養殖ブリ中のフロルフェニコールの定量. 三重大学生物資源紀要 2000; **24**: 23-29.
- 9) Ueno R, Uno K, Aoki T. Determination of oxytetracycline in blood serum by high performance liquid chromatography with direct injection. *J. Chromatogr.* 1992; **574**: 333-335.
- 10) Ueno R, Aoki T. High-performance liquid chromatographic method for the rapid and simultaneous determination of sulfamonomethoxine, miloxacin and oxolinic acid in serum and muscle of cultured fish. *J. Chromatogr.* 1996; **B682**: 179-181.
- 11) Ueno R, Kinoshita A, Wakabayashi J. Comparative pharmacokinetics of oxytetracycline in eel and its fate in a closed aquatic environment. *Aquaculture* 2004 (in press).
- 12) Björklund HV, Bylund G. Pharmacokinetics and bioavailability of oxolinic acid and oxytetracycline in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Acta Vet. Scand. Suppl.* 1991; **87**: 298-299.
- 13) Ueno R, Uno K, Aoki T. Pharmacokinetics and bioavailability of oxytetracycline in cultured yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Proceedings of Diseases in Asian Aquaculture* 1995; **2**: 523-531.
- 14) Ueno R. Pharmacokinetics and bioavailability of sulfamonomethoxine in cultured eel. *Fish Path.* 1998; **33**: 297-301.
- 15) Uno K, Aoki T, Ueno R, Maeda I. Pharmacokinetics and metabolism of sulphonamethoxine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) following bolus intravascular administration. *Aquaculture* 1997; **153**: 1-8.
- 16) Uno K, Aoki T, Ueno R, Maeda I. Pharmacokinetics of nalidixic acid and sodium nifurstyrenate in cultured fish following bolus intravascular administration. *Fish Path.* 1996; **31**: 191-196.
- 17) Björklund HV, Bylund G. Comparative pharmacokinetics and bioavailability of oxytetracycline in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Xenobiotica* 1991; **21**: 1511-1520.
- 18) 和田有二. 1983 ; 1982 年に愛媛県内で分離された α -haemolytic *Streptococcus* sp. および *Pasteurella piscicida* の薬剤感受性. 愛媛県水産試験場研究報告 1983; **3**: 14-21.
- 19) 楠田理一, 杉浦浩義, 川合研児. 1986 年から 1988 年に養殖ブリから分離された *Pasteurella piscicida* の薬剤感受性. 日水誌 1990; **56**: 239-242.
- 20) Crew CM, Melgar MD, Haynes LJ, Gala RL, DiCarlo FJ. Comparative metabolism of oxolinic acid by the rat, rabbit and dog. *Xenobiotica* 1971; **1**: 193-201.
- 21) 藤原充雄, 大塚峰三, 佐藤喜重. ^{14}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* 1975; **24**: 22-28.
- 22) 石田典子. 淡水魚および海水魚におけるオキシリン酸の組織内濃度の比較. 日水誌 1990; **56**: 281-286.
- 23) Grondel JL, Nouws JFM, Haenen OLM. Fish and antibiotics: Pharmacokinetics of sulphadimidine in carp (*Cyprinus carpio*). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1986; **12**: 281-286.
- 24) Ginneken VJ, Nouws JFM, Grondel JF, Diessens F, Degen JM. Pharmacokinetics of sulphadimidine in carp (*Cyprinus carpio* L.) and rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) acclimated at two different temperature levels. *Vet. Q.* 1991; **13**: 88-96.
- 25) Ishida N. Metabolites of five sulfa drugs in the bile and urine of rainbow trout. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1989; **55**: 2163-2166.
- 26) Ueno R, Uno K, Aoki T. Pharmacokinetics of sulfamonomethoxine in cultured yellowtail after oral administration. *Food Research International* 1994; **27**: 33-37.
- 27) Björklund HV, Rabergh CMI, Bylund G. Residues of oxolinic acid and tetracycline in fish sediments from fish farms. *Aquaculture* 1991; **97**: 85-96.
- 28) 宮川宗記. 養殖ウナギにおける抗菌性物質の簡易残留検査法. 水産養殖 2000; **48**: 117-122.
- 29) 宮川宗記. 養殖ウナギにおける抗菌性物質の簡易検査に用いる直接バイオアッセイ法の改良. 水産養殖 2000; **48**: 221-225.
- 30) 宮川宗記, 竹内嘉夫, 川原佐妃子, 上野隆二. 養殖ウナギにおける抗菌性物質の HPLC 簡易残留検査法. 水産養殖 2000; **48**: 553-557.