Oxolinic Acid の魚類感染症治療剤 としての応用に関する研究—I.

抗菌活性, 治療効果, ならびに魚体内消長

遠藤俊夫・荻島健次・早坂治男・金子修司・大島 慧

(1972 年 9 月 26 日受理)

Application of Oxolinic Acid as a Chemotherapeutic Agent
against Infections Diseases in Fishes—I.

Antibacterial Activity, Chemotherapeutic Effects and
Pharmacokinetics of Oxolinic Acid in Fishes

Toshio ENDO*, Kenji OGISHIMA*, Haruo HAYASAKA*, Shuji KANEKO*,
and Satoshi OHSHIMA*

Oxolinic acid (1-ethyl-1, 4-dihydro-6, 7-methylenedioxy-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid) has been known to possess an antibacterial activity against gram-negative bacteria (*Aerobacter*, *Brucella*, *Pasteurella*, etc.) and chemotherapeutic effects on infected animals. We also found that this compound had a superior antibacterial activity against several bacteria (*Aeromonas*, *Vibrio*, and *Chondrococcus*) isolated from diseased fishes, and that it was also active against *Aeromonas liquefaciens* (R⁺).

Oxolinic acid exhibited a chemotherapeutic effect on carps infected with *Aeromonas liquefaciens* when it was orally administered (3 mg/kg, once a day for 5 days) or when the fishes were bathed in medicated water (1 mcg/ml, for 24 hours). The bathing method was also effective in loaches infected with *Chondrococcus columnaris*. Single oral doses of 40, 20, 10, and 5 mg/kg in carps resulted in peak serum levels of 2.23 (15 hours after administration), 0.89 (24 hours after administration), 0.59 (24 hours after administration), and 0.73 mcg/ml (24 hours after administration). Oral acute toxicity (LD₅₀) was over 4,000 mg/kg in carp.

近年, ウナギ, ハマチを初めとする養殖が盛んになつて来たが, それに伴い, 密殖等の影響で疾病が多発するようになった。現在, その対策として, サルファ剤, フラン剤, 抗生物質等の投与が行なわれている。しかし, これらの薬物の大量投与により, R 因子¹⁻³⁾による耐性菌の出現も見られ, 新しい化合物による魚病専用品が望まれている。

我々はグラム陰性菌に対して秀れた抗菌力を有し, 実験感染動物に対し治療効果を有する oxolinic acid (1-ethyl-1, 4-dihydro-6, 7-methylenedioxy-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid)⁴⁻⁶⁾ につき, 魚病菌に対する抗菌活性および実験的感染魚に対する治療効果等を検討し, 有効な成績を得たので以下に報告する。

材 料 と 方 法

魚病菌に対する抗菌活性 試験に用いた菌株は魚病由来の *Aeromonas liquefaciens* 7 株, *Aeromonas salmonicida* 1 株, *Vibrio anguillarum* 5 株, *Chondrococcus columnaris* 1 株であり, 最小発育阻止

* 田辺製薬株式会社生物研究所 (Biological Research Laboratory, Tanabe Seiyaku Co., Ltd., Saitama Japan)

濃度 (MIC) は平板希釈法により求めた。使用した培地, 培養温度, 培養期間, および結果の判定は次のように行なつた。*Aeromonas* はトリプトソイ寒天培地 (栄研), *Vibrio* は 3% NaCl トリプトソイ寒天培地を用い, 27°C, 24 時間培養後, *Chondrococcus* は TY 寒天培地⁷⁾ (バクトトリプトン 0.3%, 酵母エキス 0.2%, 寒天 1.5%) を用い, 27°C 48 時間培養後, 肉眼的に判定し, 接種菌の発育の認められなかつた最小濃度を MIC とした。対照薬物としては, Furazolidone (F), Nitrofurazone (NF), Nifuriprinol (NP), Tetracycline hydrochloride (TC), Chloramphenicol (CP), Streptomycin sulfate (SM), Kanamycin sulfate (KM) を使用した。以下これらの薬物は F, NF, NP, TC, CP, SM, KM と略記する。なお, F は 10% DMFA (N, N-Dimethylformamide) 80% acetone 溶液, NF, NP は 10% DMFA, また oxolinic acid は 1% NaOH, それ以外の薬物は滅菌蒸留水で溶解後, 1000 mcg/ml の原液とした。

R 因子耐性魚病菌に対する抗菌活性 *A. liquefaciens* 67-P-24 に R 因子を伝達させた 8 L₂, 4455, S-a および伝達させていない R⁻ を試験菌株として用いた。8 L₂ は罹病ウナギより分離した *A. liquefaciens*, 4455 は罹病アマゴより分離した *A. salmonicida*, また S-a は *Escherichia coli* よりそれぞれ R 因子を *E. coli* CSH-2 (K-12 substrain) に伝達させ, さらに *A. liquefaciens* 67-P-24 に伝達させたものである。これら菌株の耐性パターンは Table 2 に示すごとくである。MIC を求める方法は, *A. liquefaciens* に対する抗菌活性の実験と同じ方法で行ない, 対照薬物も同一薬物を用いた。

***A. liquefaciens* 実験的感染コイに対する治療効果** *A. liquefaciens* Y-62 をトリプトソイ寒天培地で 22°C, 24 時間培養し, コイの背筋中に接種した。接種菌量は湿重量 2 mg/100 g とし, 生菌を 0.05 ml の生理食塩液に浮遊させて用いた。

1. 薬浴法 平均体重 6.6 g のコイを用い, 菌接種 4 時間後より 24 時間, 水温 13°C の薬液中で薬浴させ, その後, 清水に戻し 12 日間観察した。実験期間中の水温は 15±2°C であり, 常時通気を行なつた。対照薬物として CP, NF を用い, 薬浴濃度は oxolinic acid が 10, 3, 1, 0.3 mcg/ml, CP, NF は 10, 3 mcg/ml とした。なお, oxolinic acid は 1/10 N NaOH で溶解後, 1/10 N HCl で pH を 7-8 に調整し, 薬液とした。以下 oxolinic acid の薬液作製はこの方法に準じた。

2. 経口投与方法 平均体重 11.4 g のコイを用い, 菌接種 4 時間後に初回薬物投与を行ない, 以後 1 日 1 回 5 日間投与した。薬物は 0.5% CMC 溶液に懸濁させ, ソンデを用いて投与し, その後, コイは水温 11.5±0.5°C の流水飼育下に観察を行なつた。対照薬物としては CP, NF を用い, 投与量は 1 日当り, oxolinic acid が 30, 10, 3, 1 mg/kg, CP, NF は 10 mg/kg とした。

***C. columnaris* 実験的感染ドジョウに対する治療効果** 平均体重 9.0 g のドジョウの背鰭下部を火傷させ, *C. columnaris* EK-28 を TY 寒天培地上で 23°C 48 時間培養し, 火傷部位に塗布した。感染 4 時間後より, 10, 3, 1 mcg/ml の oxolinic acid 溶液中に 24 時間薬浴させ, その後 18°C の流水中で経過を観察した。

コイにおける組織内濃度 平均体重 420 g (300-580 g) のコイに oxolinic acid を 0.5% CMC に懸濁させ, 40, 20, 10, 5 mg/kg になるよう, ソンデを用いて 1 回経口投与した。投与後, コイは水温 21±1°C の水槽中で飼育し所定時間後に取り上げ, 血液, 肝臓, 腎臓, 筋肉を採取した。血液は心臓穿刺により採血後分離し血清とした。各組織の oxolinic acid の濃度は *E. coli* 1346 株による薄層カップ法で定量した。

経口急性毒性 平均体重 22.6 g のコイ (1 群 10 尾) に oxolinic acid 4,000 mg/kg 1 回経口投与した。投与後, コイは水温 20 および 25°C の 40 l 水槽に収容し, 常時通気を行ない観察した。oxolinic acid は 0.5% CMC 溶液に懸濁させ, ソンデを用いて投与し, 投与量は 0.1 ml とした。

薬浴急性毒性 平均体重 6.0 g のコイを 5 尾ずつ, 200, 100, 50, 25 mcg/ml の oxolinic acid 溶液 (4 l) 中に 7 日間連続浸漬し, その急性毒性を調べた。薬液は 3 日に 1 度換え, 常時通気を行なつた。水温は 19.5±1°C であった。

結 果

魚病菌に対する抗菌活性 魚病菌 14 株に対する MIC を Table 1 に示した。oxolinic acid の各魚病菌に対する MIC は *A. salmonicida* 0.02 mcg/ml, *A. liquefaciens* 0.02-0.09 mcg/ml, *V. anguillarum* 0.02-0.09 mcg/ml であり, 対照薬物として用いたものの内, 最も抗菌力の高かつた NP の *A. salmonicida* に対する MIC の約 4 倍, *A. liquefaciens* に対する MIC の約 10-100 倍, *V. anguillarum* に対する MIC の約 10 倍の抗菌力が認められた。また oxolinic acid は *C. columnaris* に対しては対照薬物として用いたフラン剤と同程度の抗菌力であつた。

R 因子耐性魚病菌に対する抗菌活性 *A. liquefaciens* 67-P-24 に R 因子を伝達した, 8 L₂, 4455, S-a および伝達していない R⁻ に対する MIC を Table 2 に示した。oxolinic acid の *A. liquefaciens* 67-P-24

Table 1. Minimal inhibitory concentration (MIC) of oxolinic acid against several bacteria isolated from diseased fishes.

Organisms	MIC (mcg/ml)							
	OA*	FZ*	NF*	NP*	TC*	CP*	SM*	KM*
<i>A. salmonicida</i> : Tama	0.02	12.5	25	0.09	0.39	0.39	25	12.5
<i>A. liquefaciens</i> : 711	0.09	6.25	6.25	0.78	0.78	0.78	50	100
<i>A. liquefaciens</i> : 714	0.09	6.25	25	3.12	0.78	1.56	100	100
<i>A. liquefaciens</i> : 715	0.02	6.25	12.5	1.56	0.39	0.78	50	25
<i>A. liquefaciens</i> : 718	0.04	25	25	6.25	25	0.78	100	100
<i>A. liquefaciens</i> : 719	0.09	3.12	6.25	0.39	0.78	0.78	100	100
<i>A. liquefaciens</i> : Y-62	0.04	6.25	6.25	0.39	0.78	0.78	100	100
<i>A. liquefaciens</i> : 67-P-24	0.09	6.25	12.5	0.78	0.78	0.78	100	100
<i>V. anguillarum</i> : PB-3	0.02	3.12	12.5	0.39	0.39	1.56	>100	>100
<i>V. anguillarum</i> : PB-15	0.04	3.12	6.25	0.39	0.78	0.78	>100	>100
<i>V. anguillarum</i> : PB-28	0.04	6.25	12.5	0.39	0.39	1.56	>100	>100
<i>V. anguillarum</i> : PI-6	0.09	3.12	12.5	0.39	0.39	1.56	>100	>100
<i>V. anguillarum</i> : ET-1	0.04	6.25	12.5	0.78	0.39	0.78	>100	>100
<i>C. columnaris</i> : EK-28	0.39	0.19	0.78	—**	0.39	25	—	—

* OA: Oxolinic acid, FZ: Furazolidone, NF: Nitrofurazone, NP: Nifuriprinol, TC: Tetracycline hydrochloride, CP: Chloramphenicol, SM: Streptomycin sulfate, KM: Kanamycin sulfate.

** Not examined.

Table 2. Minimal inhibitory concentration (MIC) of oxolinic acid against *A. liquefaciens* 67-P-24 (R⁺).

Strain	Resistant pattern	MIC (mcg/ml)							
		OA	FZ	NF	NP	TC	CP	SM	KM
R ⁻		0.09	6.25	6.25	0.78	1.56	1.56	>100	100
8 L ₂	SA*, TC	0.19	12.5	6.25	1.56	100	1.56	100	100
4455	SA*, SM, CP, KM	0.19	3.12	6.25	0.39	0.78	25	>100	100
S-a	SA*, SM, CP	0.19	6.25	6.25	1.56	1.56	25	>100	>100

* Sulfonamides.

Table 3. Chemotherapeutic effect of oxolinic acid by bathing on carps infected with *A. liquefaciens*.

Compd.	Conc. (mcg/ml)	Days after inoculation													
		0*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
OA	10	8**	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	
	3	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	
	1	8	8	8	7	7	7	7	7	7	7	6	6	6	
	0.3	8	8	8	7	7	7	7	7	7	6	3	2	2	
	0.1	8	8	8	5	4	3	3	2	2	2	1	1	1	
CP	10	8	8	8	7	7	7	5	4	4	4	2	1	1	
	3	8	8	8	8	8	8	3	1	1	1	1	1	1	
NF	10	8	8	8	6	5	3	1	0						
	3	8	8	7	5	2	2	2	1	1	1	1	1	1	
Control	—	8	8	8	4	2	1	0							

* Bathing started 4 hours after inoculation, and continued for 24 hours.

** Survival number.

Table 4. Chemotherapeutic effect of oxolinic acid by oral administration on carps infected with *A. liquefaciens*.

Compd.	Dose (mg/kg)	Days after inoculation													
		0*	1*	2*	3*	4*	5	6	7	8	9	10	11	12	
OA	30	8**	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	
	10	8	8	8	8	8	8	7	7	7	7	7	6	6	
	3	8	8	8	8	8	8	7	7	7	7	7	5	5	
	1	8	8	7	5	3	1	0							
CP	10	8	8	8	8	8	8	7	7	6	6	6	6	5	
NF	10	8	8	7	2	1	1	0							
Control	—	8	8	7	3	0									

* Administration started 4 hours after inoculation, and continued for 5 days once a day.

** Survival number.

に対する MIC は R⁻ では 0.09 mcg/ml, 8 L₂, 4455, S-a では 0.19 mcg/ml であった。また, 8 L₂ に対する TC, SM, KM の MIC が 100 mcg/ml, 4455 に対しては CP は 25 mcg/ml, SM は 100 mcg/ml 以上, KM は 100 mcg/ml の MIC であり, S-a に対しては, CP は 25 mcg/ml, SM, KM は 100 mcg/ml 以上の MIC であった。KM, SM は R⁻ に対しても 100 mcg/ml 以上の高い MIC であった。

A. liquefaciens 実験的感染コイに対する治療効果

1. 薬浴法 oxolinic acid, CP, NF の薬浴効果を Table 3 に示した。感染対照群は 6 日後までに全数死亡した。oxolinic acid は, 0.3 mcg/ml 以下の薬浴で 12 日後に半数以下になったが, 1 mcg/ml では半数以上, 3, 10 mcg/ml では全数生存していた。一方, CP では 10 mcg/ml で oxolinic acid の 0.3 mcg/ml とほぼ同じ経過をとり, 感染対照群と比較すると延命効果が見られた。しかし CP の 3 mcg/ml, NF の 10, 3 mcg/ml では感染対照群とあまり差が見られず, 治療効果は認められなかった。

2. 経口投与方法 Table 4 に示すように感染対照群では感染 4 日後に全て死亡した。oxolinic acid 30 mg/

kg 投与群では 12 日後で、全て生存していた。10, 3mg/kg 投与群では 12 日後に半数以上が生存していたが、3mg/kg 投与群では、接種部に異常が認められた。また 1mg/kg 投与群では感染対照群に比べ僅かに延命効果が認められたが、6 日後に全て死亡した。対照薬物として用いた CP 10mg/kg 投与群は 12 日後で半数以上生存し、oxolinic acid 3mg/kg 投与群とほぼ同程度の治療効果を示した。NF 10mg/kg 投与群の経過は、感染対照群の経過とほとんど同じであり、治療効果は認められなかった。

C. columnaris 実験的感染ドジョウに対する治療効果 感染対照群は Table 5 に示すように感染 20-26 時間後に全数死亡した。oxolinic acid 薬浴群は 7 日後まで全て生存したが、3, 1mcg/ml 薬浴群で、各々 1 尾ずつ、カラムナリス病独特の病徴が 7 日後に見られた。

コイの組織内濃度 Table 6 に示すように血中濃度は 10 mg/kg 以上の投与群では 6 時間後に 0.2 mcg/ml (定量限界) 以上に上昇し、各投与群共 15-24 時間後に最高値を示した。また、血中濃度が 0.2 mcg/ml 以下になる時間は 40 mg/kg 投与群で 144 時間後、20 mg/kg 投与群で 120 時間後、10, 5 mg/kg 投与群で 72 時間後であった。40 mg/kg 群

Table 5. Chemotherapeutic effect of oxolinic acid by bathing on loaches infected with *C. columnaris*.

Conc. (mcg/ml)	Days after inoculation							
	0*	1	2	3	4	5	6	7
10	5**	5	5	5	5	5	5	5
3	5	5	5	5	5	5	5	5
1	5	5	5	5	5	5	5	5
Control	5	0						

* Bathing started 4 hours after inoculation, and continued for 24 hours.

** Survival number.

Table 6. Tissue levels of oxolinic acid in carps after oral administration (Means of 3 carps).

Dose (mg/kg)	Tissue	Hours after administration							
		6	15	24	48	72	96	120	144
5	Serum	<0.2*	0.73	0.62	0.25	<0.2	—***	—	—
	Hepatopancreas	<1.0**	1.0	<1.0	<1.0	<1.0	—	—	—
	Kidney	<1.0**	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	—	—	—
	Muscle	<1.0**	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	—	—	—
10	Serum	0.36	0.59	0.52	0.45	<0.2	—	—	—
	Hepatopancreas	<1.0	<1.0	<1.0	3.4	<1.0	—	—	—
	Kidney	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	—	—	—
	Muscle	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	—	—	—
20	Serum	0.40	0.84	0.89	0.67	0.47	0.36	<0.2	—
	Hepatopancreas	<1.0	<1.0	3.4	1.7	<1.0	1.4	<1.0	—
	Kidney	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	1.8	<1.0	—
	Muscle	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	—
40	Serum	1.18	2.23	1.65	0.83	0.78	0.51	0.32	<0.2
	Hepatopancreas	2.7	17.0	4.9	1.2	7.9	<1.0	<1.0	<1.0
	Kidney	2.0	2.3	2.2	<1.0	2.1	<1.0	<1.0	<1.0
	Muscle	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0

* mcg/ml

** mcg/g

*** not examined

Table 7. Acute toxicity in carps by oral administration.

Water temperature (°C)	20	25
Number of fishes	10	10
LD ₅₀ (mg/kg)	>4,000	>4,000

Table 8. Acute toxicity in carps by bathing.

Conc. (mcg/ml)	Period of bathing (days)							
	0	1	2	3	4	5	6	7
200	5*	2	0					
100	5	5	2	1	1	1	1	1
50	5	5	5	5	5	5	5	4
25	5	5	5	5	5	5	5	5
0	5	5	5	5	5	5	5	5

* Survival number.

acid の魚病菌に対する抗菌力 (MIC) は、他の薬物と比較すると、NP の約 4-100 倍の抗菌力を示した。また R 因子を伝達し、SM, KM, CM 等に高度耐性にした *A. liquefaciens* に対して 0.09 mcg/ml の低い MIC を示し、これらの抗生物質との交叉耐性は認められなかった。

抗菌物質が魚病薬として用いられるには、投与された抗菌物質が魚体内に吸収されることが必要である。われわれは oxolinic acid をコイに 40, 20, 10, 5 mg/kg 1 回経口投与したが、血中濃度は 15-24 時間後に最高値を示した。淡水魚に抗菌物質を経口投与し、その吸収を調べた実験としては、ニジマスにサルファ剤を投与した原等⁹⁾ の報告があるが、一般にサルファ剤を投与した場合ラット、マウス等の哺乳動物に比べ、ニジマスはその吸収が遅いと報告されている。同様に oxolinic acid の血中濃度を哺乳動物の場合と比較すると、Ringel 等の報告によれば血中濃度は、80, 40, 20 mg/kg 1 回経口投与したマウスで 0.5 時間後、20 mg/kg, 1 回経口投与した犬では 1.6 時間後に最高値を示し、コイに比べその吸収は遙かに速い。このように、oxolinic acid は哺乳動物と魚類間で、その吸収に差が見られ、これらの点についてはさらに検討の必要があろう。

実験的感染症に対する oxolinic acid の治療効果の検討は、コイに *A. liquefaciens* を実験的に感染させ、経口および薬浴による治療効果を試みたが、経口では 10 mg/kg 5 日間投与、薬浴では 1 mcg/ml 24 時間薬浴で 75% の生存率であった。また、対照薬物として用いた CP, NF は経口では、10 mg/kg 5 日間投与で CP は 62%, NF は 0% の生存率であり、10 mcg/ml の 24 時間薬浴では、CP は 12.5%, NF は 0% の生存率であった。これらの結果は *in vitro* における MIC の値とほぼ parallel であった。

経口急性毒性の面からは、コイに対しては 4,000 mg/kg, 1 回経口投与で何等異常は認められなかった。

これらの結果から、oxolinic acid は魚体内における代謝等、さらに検討の余地があるが、魚病用治療剤として有望であると考えられる。

よりみると、臓器 (肝臓、腎臓) 内濃度は血中濃度とほぼ平行した値を示し、それらの濃度は、肝臓、腎臓、血清、筋肉の順に低くなった。

経口急性毒性 4,000 mg/kg 1 回経口投与のコイでは Table 7 に示すように、特に異常は認められなかった。

薬浴急性毒性 Table 8 に示すように、25 mcg/ml では 7 日間死亡はなかったが、50 mcg/ml では 7 日後に 1 尾、100 mcg/ml では 2 日後に 3 尾、3 日後に 1 尾死亡した。また、200 mcg/ml では 1 日後に 3 尾、2 日後には残り全てが死亡した。

考 察

われわれは、魚病用化学療法剤を探索しているが nalidixic acid⁸⁾ に類似化合物で、従来の魚病薬と異なる系統の化学物質 oxolinic acid が魚病菌に対し秀れた抗菌作用を有することを見出した。oxolinic

稿を終るにあたり、種々貴重な御意見と、菌株の分与を賜わった、東京大学農学部江草周三教授、広島大学水産学部室賀清邦氏、東京都水産試験場奥多摩分場原武史氏に深謝いたします。

文 献

- 1) T. WATANABE, T. AOKI, Y. OGATA, and S. EGUSA: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **182**, 383-410 (1971).
- 2) T. AOKI, S. EGUSA, Y. OGATA, and T. WATANABE: *J. Gen. Microbiol.*, **65**, 343-349 (1971).
- 3) T. AOKI, S. EGUSA, T. KIMURA, and T. WATANABE: *Appl. Microbiol.*, **22**, 716-717 (1971).
- 4) F. J. TURNER, S. M. RINGEL, J. F. MARTIN, P. J. STORINO, J. M. DALY, and B. S. SCHWARTZ: Antimicrobial Agents and Chemotherapy-1967, 475-479 (1968).
- 5) S. M. RINGEL, F. J. TURNER, F. L. LINDO, S. ROEMER, B. A. DIRENGA, and B. S. SCHWARTZ: *ibid.*, 480-485 (1968).
- 6) S. M. RINGEL, F. J. TURNER, S. ROEMER, J. M. DALY, R. ZLATANOFF, and B. S. SCHWARTZ: *ibid.*, 486-489 (1968).
- 7) 若林久嗣・江草周三: 本誌, **32**, 1015-1027 (1966).
- 8) 江草周三・益田信之: 魚病研究, **6**, 41-43 (1971).
- 9) 原 武史・井上進一: 本誌, **33**, 618-623 (1967).