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

遠藤 俊夫, 小野沢正人

(1986年8月5日受理)

Effects of Bath Salinity and Number of Fish on the Uptake of Oxolinic Acid by Ayu

Toshio Endo* and Masato Onozawa*

Effects of artificial sea salts and two types of salt (Gen-En and Nami-En) in the bath water and the number of fish on the uptake of oxolinic acid by Ayu *Plecoglossus altivelis* were examined.

The data were analyzed according to the one-compartment model in which the accumulation process is characterized by two pharmacokinetic parameters, the clearance constant and volume of distribution, and the volume of distribution reflects the capacity of accumulation. The volume of distribution in ayu exposed to oxolinic acid in fresh water and 0.85% salt (either Gen-En or Nami-En) water were similar and about 5 times higher than those obtained in 12.5% diluted artificial sea water.

The number of ayu had no effect on the uptake of oxolinic acid.

前報¹⁾で我々は薬浴液の pH および水温がキンギョのオキシリン酸吸収に影響することを報告した。pH および水温の他に、薬浴による魚類の薬物吸収に作用する要因として、薬浴液の塩分濃度^{2,3)}および硬度⁴⁾などがあり、また、薬物吸収量は魚種および魚体の大きさによっても差異が認められ、⁵⁾ さらに薬浴液量当りの収容尾数も薬物の毒性発現に影響する。⁶⁾ 養殖アユは海産および湖産に拘わらず、採捕後種苗地から養殖場へ輸送されることが多く、養殖場への移入魚の防疫対策として、輸送中における薬浴⁷⁾が考えられ、あるいは移入後、希釈海水あるいは食塩水などでの馴致中に治療および予防を目的として薬浴することが想定される。しかし、アユ活魚輸送における魚の積載量は一定せず、⁸⁾ また馴致に用いられる用水は、希釈海水あるいは食塩添加水と立地条件などにより異なる。そこで、輸送時ならびに馴致時におけるアユのオキシリン酸薬浴を想定し、アユのオキシリン酸取り込みに対する薬浴液中の人工海水成分および食塩濃度の影響ならびに収容尾数の影響を検討し、併せて薬浴液のオキシリン酸濃度とアユ体内オキシリン酸濃度との関係を調べた。

材料および方法

供試薬剤および試薬 アユ (*Plecoglossus altivelis*) の

薬浴には TO-77 薬浴剤 [オキシリン酸 (OA) を 5% 含有する水溶剤, lot 300020 および 00002 (田辺製薬)] を、OA 定量における OA 標準液の作製には OA 純末 (lot 841050) を、他の溶媒および試薬類は特級を用いた。

吸収試験 3 種類の実験を行なった。実験 1 は薬浴液の OA 濃度を変え、実験 2 は薬浴液の OA 濃度と薬浴液量当りの収容尾数を変え、実験 3 は薬浴液に含ませる食塩濃度あるいは人工海水成分濃度を変えて実施した。実験 1 および 2 は 1984 年 3 月 14~15 日に滋賀県水産試験場において平均体重 0.8 g の湖産アユを用いて、実験 3 は 1983 年 7 月 15~16 日に滋賀県高島郡 U 養殖場において平均体重 4.5 g の湖産アユを用いて実施した。

実験 1: OA 濃度を 1, 10 および 20 $\mu\text{g/ml}$ にした井戸水 8 l に各々供試魚 50 尾を収容し、薬浴 24 時間後迄経時的に 5 尾ずつ取り揚げた。魚体は水洗後、体表の水分をふき取って、定量時迄 -20°C に凍結保存した。薬浴液の温度は $15.2\sim 17.9^{\circ}\text{C}$ であり、通気しながら薬浴した。

実験 2: OA 濃度を 5, 10 および 20 $\mu\text{g/ml}$ とした(琵琶)湖水 20 l に供試魚を各濃度毎、約 100, 200 および 300 尾ずつ 24 時間薬浴し、10 尾採取して実験 1

* 田辺製薬(株)生物研究所 (Biological Research Laboratory, Tanabe Seiyaku Co., Ltd., Toda, Saitama 335, Japan).

と同様に凍結保存した。薬浴液の温度は 15.5~18.1°C, pH は 7.0~7.6 であり, 通気しながら薬浴した。実験は 2 回繰り返した。

実験 3: 市販のアクアオーシャン (新扶桑製薬) で作製した 12.5, 25% 人工海水, 原塩および並塩のそれぞれ 0.425, 0.85% 溶液, ならびに淡水 (井戸水) それぞれ 70 l に供試魚を約 80 尾ずつ収容して 2 時間馴致した後, 供試魚を収容したこれらの溶液に TO-77 薬浴剤を加えて OA 濃度を 10 µg/ml として薬浴を始め, 24 時間後迄経時的に 5~10 尾採取し, 魚体を井戸水で洗った後, 実験 1 および 2 と同様に凍結保存した。OA 添加前および 1 時間後に薬浴液を採り, 冷蔵庫に保存した。薬浴液は通気し, その温度は 16.5~22.0°C であった。

体内 OA 濃度の測定 アユ体内 OA 濃度は前報⁹⁾の測定方法に準じ, 魚体全体について測定した。

Na, Ca および Mg 濃度 日立 208 原子吸光分析器を用い, 原子吸光法により薬浴液の Na, Ca および Mg 濃度を測定した。

吸収過程の解析 Kaka ら⁹⁾がキンギョにおける薬物吸収過程の解析に用いたモデル (One-compartment model) を応用して, 実験 1 および 3 で得られた測定値に基づくアユにおける OA 吸収過程を解析した。すなわち吸収速度 dX/dt は

$$\frac{dX}{dt} = K(C_0 - C_t) \quad (1)$$

(1) 式で表され, (1) 式における X は魚体内の薬物濃度 (µg/g), K はクリアランス定数 (ml/h/g), C_0 は薬浴液の薬物濃度 (µg/ml), C_t は魚体内の薬物濃度 (µg/ml) である。(1) 式を積分すると

$$X = VC_0[1 - e^{-(Kt/V)}] \quad (2)$$

(2) 式を得る。 V は分布容積 X_t/C_t で単位は ml/g で表され, t は薬浴開始後からの経過時間 (h), C_0 は調製した薬浴液の OA 濃度で, 薬浴中は一定とみなした。

結果および考察

薬浴液の OA 濃度とアユ体内 OA 濃度 (実験 1) 薬浴後各経過時間におけるアユ体内 OA 濃度を図 1 に示した。アユ体内 OA 濃度は薬浴後速やかに上昇し, 薬浴 24 時間目には 1 µg/ml 溶液が 2 µg/g, 10 µg/ml 溶液が 11 µg/g, 20 µg/ml 溶液が 45.8 µg/g と各薬浴液において薬浴濃度を超え, 1 µg/ml 溶液では, ほぼ定常状態となった。また, 薬浴時間が同じ場合は, 薬浴濃度が高くなるに従って体内 OA 濃度が高かった。

OA 吸収に対する収容密度の影響 (実験 2) 表 1 に薬浴 24 時間目の体内 OA 濃度を示した。体内 OA 濃度は薬浴濃度が高い程, 高くなる傾向を示したが, 収容尾数との関係は一定しない。そこで分散分析による解析を試みた。2 回の試験において薬浴の pH および水温は概ね安定し, かつ薬浴液間の差が小さいため, 解析から除いて, 試験毎の分散分析表を作成し表 2 に示した。両試験とも全ての要因が 1% 水準で有意となった。しかし, 試験毎の収容尾数と体内 OA 濃度には一定した関係を認めないこと, および薬浴液 OA 濃度の平方和に比べて他の要因の平方和が非常に小さいことから, 体内 OA 濃度への影響は薬浴液の OA 濃度のみと考えるのが妥当と推察した。

Burton ら¹⁰⁾はキンギョにおいて収容密度が高くなると, ヘモグロビン量およびヘマトクリット値が低下すると報告している。板沢ら¹¹⁾はニジマスおよびメダカの酸素消費量は小さな群より大きな群で低くなる傾向 (群効

Fig. 1. Concentration of oxolinic acid in ayu after exposure to 1 (○), 10 (□) and 20 (△) µg/ml of oxolinic acid in fresh water. Each point represents the mean of five fish and the solid line represents the model simulation.

Table 1. Effect of crowdeness on the uptake of oxolinic acid (OA) by ayu after exposure to various concentrations of oxolinic acid in the bath water for 24 h

	OA in water ($\mu\text{g/ml}$)		5	
	Number of fish			
Exp. 1	Total body wt (g)	100	201	298
	OA in fish ($\mu\text{g/g}$)	80	150	251
		$16.3 \pm 1.9^*$	20.4 ± 5.1	14.5 ± 3.9
	OA in water ($\mu\text{g/ml}$)		5	
	Number of fish			
Exp. 2	Total body wt (g)	99	199	300
	OA in fish ($\mu\text{g/g}$)	89	181	234
		16.5 ± 2.0	22.3 ± 2.9	18.2 ± 3.3
	OA in water ($\mu\text{g/ml}$)		10	
	Number of fish			
Exp. 1	Total body wt (g)	100	199	290
	OA in fish ($\mu\text{g/g}$)	77	152	222
		30.8 ± 7.0	22.1 ± 4.5	39.3 ± 10.2
	OA in water ($\mu\text{g/ml}$)		10	
	Number of fish			
Exp. 2	Total body wt (g)	98	193	291
	OA in fish ($\mu\text{g/g}$)	76	170	242
		43.8 ± 6.2	36.0 ± 4.3	29.7 ± 2.7
	OA in water ($\mu\text{g/ml}$)		20	
	Number of fish			
Exp. 1	Total body wt (g)	99	197	297
	OA in fish ($\mu\text{g/g}$)	79	141	238
		80.3 ± 14.1	98.4 ± 13.3	104.6 ± 5.9
	OA in water ($\mu\text{g/ml}$)		20	
	Number of fish			
Exp. 2	Total body wt (g)	101	180	298
	OA in fish ($\mu\text{g/g}$)	89	181	246
		85.8 ± 15.7	74.9 ± 13.9	61.9 ± 11.5

* Values represent mean of ten determinations $\pm$ standard deviation.**Table 2.** Analysis of variance in the concentration of oxolinic acid in ayu after exposure of different number of fish to various concentration of oxolinic acid for 24 h

Exp.	Factors	S.S.	D.F.	M.S.	F value
1	Number of fish (A)	1599.372	2	799.686	11.47*
	Conc. in water (B)	102214.539	2	51107.269	732.98*
	A $\times$ B	3229.662	4	807.415	11.58*
	Error	5647.771	81	69.726	
	Total	112691.342	89		
2	Number of fish (A)	2236.345	2	1118.172	15.21*
	Conc. in water (B)	47609.651	2	23804.826	323.82*
	A $\times$ B	1751.993	4	437.998	5.96*
	Error	5954.449	81	73.512	
	Total	57552.487	89		

* $p < 0.01$.

果)があり，心理的に落ち着いて運動量あるいは代謝量が小さくなり，酸素消費量が低下するものと推測している。また，Delphaut⁶⁾は *Gambusia holbrooki* に対する chlorpromazine の毒性は単独個体だと高まると報告している。今回これらの生理現象と類似する現象はアユの OA の薬浴では認められなかった。

OA 吸収に対する食塩および人工海水成分の影響 (実験 3) 薬浴液の食塩濃度あるいは人工海水成分濃度を

変えた OA 10 $\mu\text{g/ml}$ 溶液に薬浴した場合のアユ体内 OA 濃度の推移を図 2 に示した。薬浴 24 時間目における体内 OA 濃度は淡水が 43.50 $\mu\text{g/g}$ ，0.85% 並塩溶液が 43.14 $\mu\text{g/g}$ ，0.425% 同溶液が 46.05 $\mu\text{g/g}$ ，0.85% 原塩溶液が 40.64 $\mu\text{g/g}$ ，0.425% 同溶液が 48.68 $\mu\text{g/g}$ で，薬浴濃度の約 4~5 倍で，これら薬浴液間で大きな差を認めなかったが，25% 希釈人工海水が 4.78 $\mu\text{g/g}$ ，12.5% 希釈人工海水が 9.12 $\mu\text{g/g}$ で，淡水あるいは原

Fig. 2. Concentration of oxolinic acid in ayu after exposure to 10 µg/ml oxolinic acid in salt water and diluted artificial sea water. Each point represents the mean of ten determinations and the solid line represents the model simulation.

Table 3. The clearance constants, volume of distribution and half-life of oxolinic acid in ayu

Bath water	Clearance constant* ¹ (ml/h/g)	Volume of distribution* ¹ (ml/g)	Half-life* ² (h)
Fresh water	0.378	5.224	9.58
12.5% diluted artificial sea water	0.102	0.972	6.62
25% diluted artificial sea water	0.158	0.558	2.45
0.425% salt (Gen-En) water	0.351	6.767	13.37
0.85% salt (Gen-En) water	0.302	5.443	12.50
0.425% salt (Nami-En) water	0.360	6.188	11.92
0.85% salt (Nami-En) water	0.453	4.684	7.17

*¹ Estimated from the non-linear least squares fit of Eq. (2) to the data shown in Fig. 2.

*² Calculated from $0.693 V/K$.

塩および並塩溶液と比べて希釈人工海水で低かった。

実測値 (経過時間および体内 OA 濃度) から (2) 式のパラメータ [クリアランス定数 (K) および分布容積 (V)] を非線型最小 2 乗法により求め, 更に X が定常状態における蓄積量 ($X_{\max}$) の半分量になるために要する時間 (half-life, h) を $0.693 V/K$ で算出し, これ

ら値を表 3 に示した。(2) 式において t を無限時間にすると X_t は VC_0 となり, この値は定常状態における体内薬物濃度 ($X_{\max}$) となる。 C_0 を一定とみなした時, V が大きい程, $X_{\max}$ は大きくなり, 従って分布容積は薬物吸収能の指標となる。実験 3 で得られた分布容積は希釈人工海水で薬浴した場合, 淡水あるいは 0.425 およ

Table 4. Concentration of Na, Ca and Mg in the water used for the absorption experiment

Bath water	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)		
	Na	Ca	Mg
Fresh water	8.25 (6.13)*	5.45 (8.25)	1.3 (1.2)
12.5% diluted artificial sea water	1110	55.5	127
25% diluted artificial sea water	2370	109	180
0.425% salt (Gen-En) water	1300	8.75	2.5
0.85% salt (Gen-En) water	2950	11.8	3.2
0.425% salt (Nami-En) water	1380	8.25	2.7
0.85% salt (Nami-En) water	3070	10.8	4.3

* The numbers in parentheses were determined before addition of oxolinic acid to water.

び 0.85% 原塩ならびに並塩溶液で薬浴した場合に比べて小さく、人工海水成分の増加とともに小さくなる傾向を示した。すなわち、0.425% および 0.85% 原塩ならびに並塩溶液の薬浴で得られた分布容積はそれぞれ 6.767, 5.443, 6.188 および 4.684 ml/g で、食塩の精製法およびその濃度の違いに拘わらず、淡水溶液の薬浴における分布容積 (=5.224 ml/g) と近似で、これらの値は 0.85% 原塩および並塩溶液とほぼ同等の塩化ナトリウムを含有する 12.5% 人工海水薬浴における分布容積 (=0.972 ml/g) の約 5 倍であった。吸収バリアーに対する透過性を表すクリアランス定数も分布容積と同様で、希釈人工海水薬浴と比べて、並塩および原塩ならびに淡水薬浴で大きい値を示した。また、half-life は 25% 人工海水薬浴において 2.45 時間と最も短く、12.5% 人工海水薬浴が 6.62 時間と次に短く、他の薬浴においては 7.17~13.37 時間であった。

薬浴液の Na, Ca および Mg 濃度を表 4 に示した。希釈人工海水中の Ca および Mg 濃度は高く、同程度の Na を含有する原塩 および 並塩溶液の Ca および Mg 濃度と比較すると、Ca は約 6~10 倍、Mg は約 40~60 倍であった。TO-77 薬浴剤を含まない淡水 (井戸水) の Na, Ca および Mg 濃度は低く、琵琶湖南部の湖水における小林の測定値,¹²⁾ 5.4 $\mu\text{g/ml}$ (Na), 8.1 $\mu\text{g/ml}$ (Ca) および 1.5 $\mu\text{g/ml}$ (Mg) に近い値であった。これらの結果からアユの OA 吸収は 0.85% 程度の食塩濃度では影響を受けないが人工海水成分の内、塩化ナトリウムを除く成分、俱らく Mg および Ca 等が薬浴液中に一定濃度以上存在すると低下することが示唆された。

Bergsjö ら²⁾ はニジマスに sulfanilamide および sulfadimidine で薬浴した場合、淡水と比べて海水での取り込み量は多く、それは消化管からの吸収で部分的に説明出来ると報告している。Murphy³⁾ は mosquito fish において DDT の蓄積性は塩分濃度が高い場合に有意

に低く、水代謝の変化か、吸収あるいは水-脂質分配の変化によると考察している。また、金沢¹³⁾ は毒物に対する淡水魚と海水魚の間における感受性の相違は体液の浸透圧の違いによる差と考えられるが明らかではないと報告している。塩化ナトリウムを除く海水成分が薬浴液中で一定量以上存在すると OA の吸収量が低下する今回の現象は、海水の pH が淡水に比べてかなり高い (pH 8.5 前後) こと、また淡水の pH も硬度が高くなるに従って高くなること、¹⁴⁾ かつキンギョの OA 吸収は高い pH で低いことから、薬浴液の pH と密接に関連していると推察された。

本報をまとめるにあたって、協力して頂いた田辺製薬有機化学研究所中荃幸正氏、前橋良夫氏に感謝いたします。また、御助言を賜った滋賀県水産試験場里井晋一技師に深謝致します。

文 献

- 1) 遠藤俊夫, 小野沢正人: 日水誌, **53**, 551-555 (1987).
- 2) T. Bergsjö and T. H. Bergsjö: *Acta. Vet. Scand.*, **19**, 102-109 (1978).
- 3) P. G. Murphy: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **5**, 404-407 (1970).
- 4) J. B. Hunn and J. L. Allen: *Ann. Rev. Pharmacol.*, **14**, 47-54 (1974).
- 5) A. Spacie and J. R. Hamelink: *Environ. Sci. Technol.*, **13**, 817-822 (1979).
- 6) J. Delphaut: *C. R. Soc. Biol.*, **156**, 1881-1885 (1962).
- 7) 原 武史: 活魚輸送 (日本水産学会編), 恒星社厚生閣, 東京, 1982, pp. 86-91.
- 8) 山崎隆義: 活魚輸送 (日本水産学会編), 恒星社厚生閣, 東京, 1982, pp. 92-95.
- 9) J. S. Kaka and W. L. Hayton: *J. Pharm. Sci.*, **67**, 1558-1563 (1978).
- 10) C. B. Burton and S. A. Murray: *Comp.*

- Biochem. Physiol.*, **62A**, 555-558 (1979).
- 11) 板沢靖男, 松本 勉, 神田 猛: 日水誌, **44**, 965-969 (1978).
- 12) 小林 純: 水の健康診断, 岩波書店, 東京, 1971, p. 50.
- 13) 金沢 純: 科学, **46**, 108-115 (1976).
- 14) L. L. Marking: *Natl. Cancer. Inst. Monogr.*, **65**, 195-199 (1984).