

## 食品としての魚介類の品質に関する研究—II 養殖ブリのミロキサシン経口投与における体内残留

上野隆二・奥村雅人・阪中和紀・堀口吉重  
三重大学水産学部

Study of Quality in Fish and Shellfish as Food—II  
Residue of Miloxacin in Various Tissues of Cultured  
Yellowtail by Oral Administration

Ryuji UENO, Masato OKUMURA, Kazuki SAKANAKA  
and Yoshishige HORIGUCHI  
Faculty of Fisheries, Mie University

The present work was undertaken to investigate the residue of miloxacin, 5, 8-dihydro-5-methoxy-8-oxo-2H-1,3-dioxolo(4,5-g)quinoline-7-carboxylic acid, in the tissues of cultured yellowtail, *Seriola quinqueradiata*, by oral administration. The concentration of miloxacin and its metabolites, M-1, 5,8-dihydro-8-oxo-2H-1,3-dioxolo(4,5-g)quinoline-7-carboxylic acid, and M-2, 1,4-dihydro-7-hydroxy-1,6-dimethoxy-4-oxoquinoline-3-carboxylic acid, were determined by high performance liquid chromatography. The recovery of miloxacin was 87, 83 and 84% from the muscle, liver and blood, respectively. The maximum levels in these tissues were reached within 3 hours after administration of miloxacin at 10 and 40 mg/kg, and no miloxacin could be detected within 3 days following administration. Only one of the metabolites, M-1, was found in these tissues and still remained in the liver for 7 days after administration of miloxacin at 10 and 40 mg/kg.

Key words : residue, miloxacin and yellowtail

我が国の魚介類養殖の発展に従って、発生する種々の疾病を防御、治療するため多様な水産用薬品が用いられている。その様な薬品が、食品としての魚介類の体内に蓄積した場合、人間におよぼす影響は食品の品質においては言うまでもなく、栄養学上、食品衛生学上重要な問題と言わざるを得ない。本研究は、食品としての魚介類を対象とし、それらの微量汚染物質の体内残留について検討し、前報（上野ら 1984）では養殖ウナギのホルマリン薬浴による体内残留について報告した。そこで、本研究では、アユ、ウナギのヒブリオ菌感染症の治療薬として用いられるミ

ロキサシンを、試験的に養殖ブリに経口投与した場合の体内残留および残留期間について、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて検討した。

### 実験材料および実験方法

#### 1. 実験材料

供試魚として現地で入手した健康状態の良好な養殖ブリ、*Seriola quinqueradiata*、を用いた。平均体重 250 g 前後であった。投与方法として供試薬物を餌料に混ぜ、供試魚にカテーテルで強制経口投与した。投与餌料として、コウナゴミンチに、投薬時に所定量になるように供試薬物を加えたものを用いた。粘結剤としてミンチメートを用いた。投薬後直ちに供試魚を魚籠に入れ、一定時間ごとに網で取り上げて実験に供した。なお、本実験は昭和59年8月から同年10月にわたって、三重県南勢町礪浦で行なった。

試薬としてミロキサシン、その代謝産物 M-1 および M-2 は、住友製薬株式会社から分譲されたものを用いた（構造式は図1に示す）。試薬は全て和光純薬工業株式会社製の特級、または、HPLC用試薬を用いた。

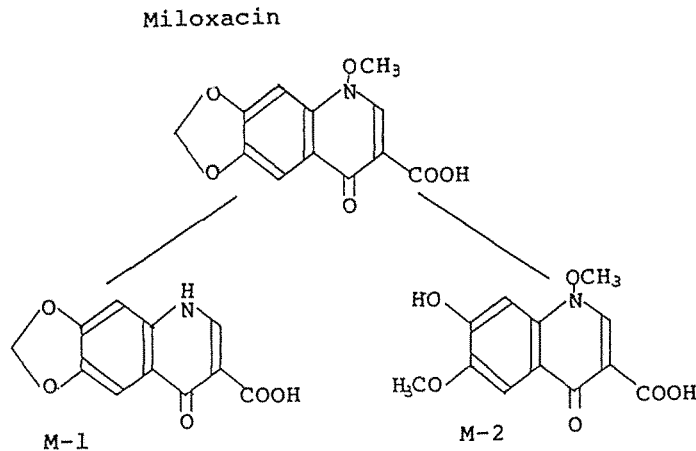


Fig. 1. Chemical structure of miloxacin, M-1 and M-2.

#### 2. 試料溶液の調製

供試魚を直ちに開腹後、血液を真空採血管を用いて動脈球より採取した。採血後、魚体を直ちに解剖し、肝臓および筋肉の一部を採取し、 $-20^{\circ}\text{C}$ のフリーザー中に貯蔵した。組織からのミロキサシンの抽出法は、重永ら(1982)の方法に順じた。図2に示すように、筋肉の場合、試料1.5 gに0.1 Mクエン酸緩衝液、pH 3.0、を加え、全量を7.5 gとした。また、肝臓の場合、試料が少量であったため0.4 gとし、これに0.1 Mクエン酸緩衝液、pH 3.0、を加え、全量を8 gとし、それぞれホモジナイザーで3分間ホモジナイズした。筋肉の場合懸濁液5 g、肝臓の場合6 gをそれぞれ50 ml容遠沈管に入れ、塩化ナトリウム2 gおよびクロホルム10 mlを加え、10分間振盪した。

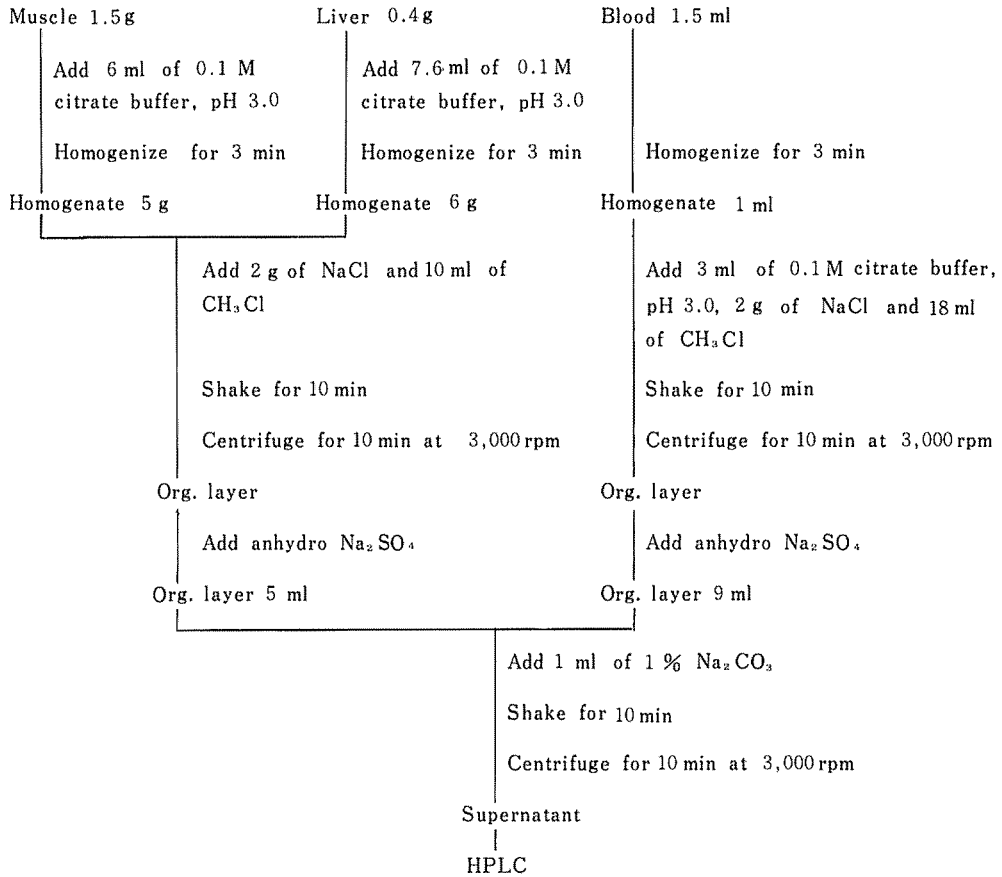


Fig. 2. Analytical procedure for miloxacin in yellowtail.

3,000 rpm、10分間遠心分離後、得られたクロロホルム層に、無水硫酸ナトリウムを加え脱水した。その5 mlを、あらかじめ1%炭酸ナトリウム溶液1 mlを加えた10 ml容遠沈管に加え、10分間振盪した。3,000 rpm、10分間遠心分離を行ない、上層液を試料溶液としてHPLCに供した。血液の場合、1.5 mlをホモジナイザーで3分間ホモジナイズし、得られた懸濁液1 mlを50 ml容遠沈管に入れ、0.1 Mクエン酸緩衝液、pH 3.0、3 ml、塩化ナトリウム2 gおよびクロロホルム18 mlを加え、10分間振盪した。3,000 rpm、10分間遠心分離後、クロロホルム層に無水硫酸ナトリウムを加え脱水した。その9 mlに、1%炭酸ナトリウム溶液1 mlを加え、10分間振盪した。3,000 rpm、10分間遠心分離後、上層液を試料溶液としHPLCに供した。

### 3. 高速液体クロマトグラフィー条件

機種：ギルソンHPLC装置（ギルソン社製）

検出器：Variactor 311（エムエス機器製）

カラム：M&S PACK-C-18（直径4.6 mm×250 mm、エムエス機器製）

移動相：0.1%トリフルオル酢酸 72%：N,N-ジメチルホルムアミド 1%：アセトニトリル 27%

流速：1 ml/min

カラム温度：室温

測定波長：254 nm

感度：0.02 AUFS

記録紙速度：0.5 cm/min

注入量：20  $\mu$ l

データ処理装置：クロマトパックC-R 3 A（島津製作所製）

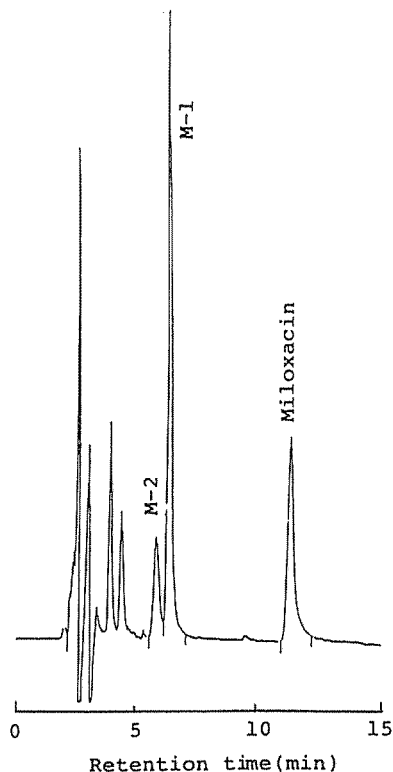
#### 4. 定量操作

標準溶液としてミロキサシン、M-1 および M-2 を 1  $\mu$ g/ml になるように 1% 炭酸ナトリウム溶液に溶かしたものを、絶対検量線法によって算出した。

## 結 果

### 1. ミロキサシンおよびその代謝物のクロマトグラム

図3に示すように、ミロキサシン、M-1 および M-2 は、いずれも本条件によってよく分離されていた。



#### HPLC conditions :

Instrument - Gilson HPLC system

Column - M&S RACK-C-18 (4.6 x 250mm)

Mobile phase - 0.1% TFA : N, N-dimethyl -  
formamide : acetonitrile (72:1:27)

Flow rate - 1 ml/min

Temperature - room temp.

Detection - 254 nm

Absorbance range - 0.02 AUFS

Chart speed - 0.5 cm/min

Sample - 20  $\mu$ l (miloxacin, M-1 and  
M-2 1  $\mu$ g/ml)

Data analysis - Chromatopack C-R 3 A

Fig. 3. High performance liquid chromatogram of miloxacin, M-1 and -2.

### 2. 魚体内からのミロキサシンおよびM-1の添加回収試験

筋肉、肝臓、血液に、ミロキサシンまたはM-1をそれぞれ2  $\mu$ gずつ添加し、前述の抽出法に従って回収試験を行なった。その結果表1に示すように、ミロキサシンでは、筋肉、血液および肝臓で、それぞれ87、84、83%であり、M-1では、16、11、22%であった。

Table 1. Recoveries of miloxacin and M-1 from various tissues of yellowtail.

Tissues	Recoveries (%)	
	Miloxacin	M-1
Muscle	87.4*	16.2
Blood	83.9	11.3
Liver	82.7	22.0

\* Average of 3 samples

Two micrograms of miloxacin and M-1 was added.

### 3. 養殖ブリに対するミロキサシンの組織内残留

岩田ら (1978) によると、ブリにミロキサシンを経口投与した場合、すべての組織にわたって3時間以内に、ミロキサシンの最大値を得たと報告している。そこで、本実験では、10 mg/kg および 40 mg/kg について、強制経口投与を行ない、投与後1、3時間、1、3、7日間における組織内濃度を調べた。その結果を表2に示した。ミロキサシンの場合、いずれの投与区でも、投与後1時間または、3時間に各組織で最高値を示した。1日目では、40 mg/kg投与区の筋肉を除き、いずれの組織も急激に消失した。10 mg/kg投与区における1時間および3時間での組織内濃度を比較すると、1時間では、筋肉が0.5 μg/g で最高値を示し、ついで肝臓、血液の順であった。3時間では、血液が0.56 μg/ml で最高値を示し、ついで筋肉、肝臓の順であった。

Table 2. Disappearance of miloxacin from various tissues of yellowtail

Tissues	Miloxacin : 10 mg/kg					Miloxacin : 40 mg/kg				
	Time after administration					Time after administration				
	1 hr	3 hr	1 day	3 days	7 days	1 hr	3 hr	1 day	3 days	7 days
Muscle	0.50* <sup>1</sup> (0.19)	0.53 (0.24)	— (0.04)	— —	— —	0.47 (0.41)	1.13 (0.80)	0.16 (0.01)	— —	— (0.03)
Blood	0.10* <sup>2</sup> (0.17)	0.56 (0.19)	— (0.02)	— —	— —	0.45 (0.32)	0.66 (0.31)	— (0.02)	— —	— —
Liver	0.36* <sup>3</sup> (0.69)	0.40 (0.74)	— (0.43)	— (0.33)	— (0.40)	1.48 (1.50)	0.48 (0.93)	— (0.62)	— (0.36)	— (0.68)

\*<sup>1</sup>μg/g、\*<sup>2</sup>μg/ml and \*<sup>3</sup>μg/g

Av. water temp. 21.7°C

The parenthesis shows the value of M-1.

Av. body weight 250 g

40 mg/kg投与区では、投与後1時間では、肝臓が1.48 μg/kgで最高値を示し、ついで筋肉および血液の順であった。3時間では、筋肉が1.13 μg/g で最高値を示し、ついで血液、肝臓の順であった。なお、岩田ら (1978) の微生物定量法による養殖ブリのミロキサシンに対する魚体内残留実験では、肝臓を除く他の組織中に投与後1～3時間で急速な取り込みが見られ、その平均値は、筋肉で約8 μg/g、血清で約4 μg/mlであった。M-1では、ミロキサシンと同様に、いずれの投与区でも、1時間または3時間に各組織で最高値を示した。1日目では、いずれの投与区も筋肉および血液で急激に減少していた。しかしながら、肝臓では減少の傾向を示しつつも、7日目においてもまだかなり高い濃度を示した。10 mg/kg投与における1時間および3時間での組織内濃度を比較すると、1時間および3時間では、肝臓がそれぞれ0.69 μg/g および0.74 μg/gで最高

を示し、ついで筋肉、血液の順であったが、筋肉と血液の間には、有意な差は認められなかった。40 mg/kg 投与区では、肝臓がそれぞれ1.50  $\mu\text{g/g}$  および0.93  $\mu\text{g/g}$  で最高値を示し、ついで筋肉、血液の順であり、10 mg/kg 投与区とほぼ同様の結果が得られた。

## 考 察

ミロキサシンの定量法としては、オキシリン酸およびナリジクス酸と同様に、微生物定量法(岩田、1978、洲崎ら、1980) が用いられている。しかしながら、この方法は、感度、定量性、薬物に対する特異性に欠け、多くの問題を残していると言わざるを得ない。そこで本研究では、これらの欠点を補う方法として HPLC を用いて、魚体内組織中のミロキサシンの残留について検討した。岩田ら(1978)によると、微生物定量法によるミロキサシンの定量限界は、血清で0.2  $\mu\text{g/ml}$ 、筋肉および肝臓で1.0  $\mu\text{g/g}$  とされている。本実験における、HPLC 法による定量限界を求めたところ、カラムへの注入量(20 $\mu\text{l}$ )で約0.4 ngであった。これより血液1 mlについて試験した場合の定量限界は、回収率を100%として約40 ng/mlとなり、同様に筋肉1 gの場合は約40 ng/gとなる。肝臓については試料0.3 gであるため約133 ng/gとなる。このことから、HPLC 法は、微生物定量法に比べて、かなり微量まで検出可能と言える。

ブリ各組織からのミロキサシンの添加回収実験では、各組織において83~87%の回収率を得たが、重永ら(1982)によると、血漿で90%、筋肉で97%、肝臓で90%であり、本結果よりやや高い値を示した。

ミロキサシンの体内残留については、投与後、体内に1~3時間のうちに吸収され、1日目には筋肉を除いて殆んど排泄されていた。しかしながら、岩田ら(1978)の実験値に比べかなり低く、40 mg/kg 投与区では、投与後3時間においても筋肉で約1/8、血液で約1/7の取り込みしか見られなかった。この相違は、供試魚の成長差、投薬方法の相違、あるいは水温等に起因するものか否か今後の検討が必要とされる。

岩田ら(1978)によると、ブリでは投与後数時間においても、肝臓のみにミロキサシンが検出されなかったと報告している。同様の結果は、アユやウナギにおいても報告されている(井沢ら、1978)。しかしながら、本実験によると、養殖ブリの肝臓中に明らかにミロキサシンの存在が確認されていることから、抽出法の相違によると考えられる。洲崎ら(1980)も、酢酸エチルを用いることにより、アユ、ウナギの肝臓からミロキサシンが検出されたことを報告している。

上野ら(1984)によると、ミロキサシンに類似の化学構造を有する養殖ブリのオキシリン酸に対する体内残留では、50 mg/kg 投与区では、用いたすべての組織において、投与後3~6時間で最高値が得られ、オキシリン酸では、筋肉、血液に8日間でもまだ検出されると報告されているが、それらに比べミロキサシンは、養殖ブリにおける代謝、排泄がきわめて早いものと考えられる。

ミロキサシン代謝過程について、吉武ら(1978<sup>a</sup>、1978<sup>b</sup>)によると、哺乳動物では、代謝産物としてミロキサシン以外に M-1、M-2 などやそれらの抱合体が存在し、コイの場合、肝臓および胆汁中には intact なミロキサシンが相当量存在し、代謝体として M-1 およびこれらの抱合体のみが検出されたと報告している。ブリにおいても、用いたすべての組織中からミロキサシンおよび M-1 が検出されることから、哺乳動物とは明らかに異なった代謝経路を有すると考えられる。

組織からの M-1 の回収は、本方法では非常に低く同様の結果は重永ら(1982)によるウナギを用いた添加回収実験においても得られている。従って、正確な定量は困難であるが、ブリの組

織中で検出される M-1 の濃度は、実測値より相当高いものと言える。M-1 はミロキサシンに比べ、各種菌株に対してかなり低い感受性を示す（上野ら、1985）が、抗菌性を有する M-1 が肝臓中に長期間にわたって検出されることは、食品衛生上、品質上好ましくないと考えられる。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、供試薬物および菌株を分譲して下さった住友製薬株式会社特薬部、平 靖氏に謝意を表す。

## 文 献

- 井沢昭雄・木崎容子・小松敏昭・原 寛・杉田和彦・大村貞文、1978、AB-206の微生物学的定量法、*Chemotherapy*, 26 (S-4) : 65-70.
- 岩田一夫、1978、合成抗菌剤 AB-206 (5-Methoxy-5,8-dihydro-8-oxo-1,3-dioxolo [4,5-g] quinoline-7-carboxylic acid) をハマチに強制投与した場合の組織内濃度について、住友化学生物科学研究所、未発表。
- Ryuji UENO, Yoshishige HORIGUCHI and Sabroh S. KUBOTA, 1984, Study of Quality in fish and Shellfish as Food -I. Concentration of Formaldehyde in Various Tissues of Cultured Eel by Formalin Bath. *Bull. Fac. Fish., Mie Univ.* 11 : 37-42.
- 上野隆二・堀口吉重、1984、水産用医薬品の副作用に関する研究-V. 医薬品オキソリン酸とナリジクス酸の残留等について、魚病対策技術開発研究報告書、1-13.
- 上野隆二・奥村雅人・堀口吉重、1985、食品としての魚介類の品質に関する研究-III. 養殖ブリにおけるミロキサシンの代謝物およびその抗菌性について、三重大水研報、12 : 175-180.
- 重永 均・中沢 宏・土井 侃、1982、AB-206の魚類における微量分析法-2. 住友化学生物科学研究所、未発表。
- 洲崎秀国・赤栗信二、1978、魚類生体試料中の AB-206 の微生物学的定量法の検討、住友化学生物科学研究所、未発表。
- 吉武 彬・川原一夫・庄野文章・井沢昭雄・小松敏昭・山森 芬、1978<sup>a</sup>、<sup>14</sup>C 標識 AB-206 の各種実験動物における代謝、*Chemotherapy*, 26 S-4 : 83-90.
- 吉武 彬・庄野文章・鎌田 健、1978<sup>b</sup>、<sup>14</sup>C-AB-206 のコイにおける代謝、吸収、分布、代謝および鰓からの吸収、住友化学生物科学研究所、未発表。