

スピラマイシンに関する魚病療法的研究— I
ブリにおける吸収、分布、残留性および安全性

窪田三朗・宮崎照雄・舟橋紀男・落合忍仁・菅 善 人*
三重大学水産学部

Studies on Therapy of Fish Diseases with Spiramycin— I
Absorption, Distribution, Excretion and Toxicity
in Cultured Yellowtail (*Seriola quinqueradiata*)

Saburoh S. KUBOTA, Teruo MIYAZAKI, Norio FUNAHASHI,
Taehito OCHIAI and Yoshito SUGA*

Reprinted from
Bulletin of the Faculty of Fisheries, Mie University
No. 7, October 1, 1980

1980年10月1日

スピラマイシンに関する魚病療法的研究— I ブリにおける吸収、分布、残留性および安全性

窪田三朗・宮崎照雄・舟橋紀男・落合忍仁・菅 善 人*

三重大学水産学部

Studies on Therapy of Fish Diseases with Spiramycin— I Absorption, Distribution, Excretion and Toxicity in Cultured Yellowtail (*Seriola quinqueradiata*)

Saburoh S. KUBOTA, Teruo MIYAZAKI, Norio FUNAHASHI,
Taehito OCHIAI and Yoshito SUGA*

Pharmacokinetic and toxicological examinations of spiramycin were studied in the cultured yellowtail. Spiramycin embonate (SpE) and free base (SpF) were orally administered and adipate (SpA) was intramuscularly injected.

1. The absorption, distribution and excretion data was obtained from the bioassay. All kinds of spiramycin were easily absorbed and quickly distributed in the blood and major organs. Peak levels were reached in 3 hours (SpA), 12 hours (SpF) and 24 hours (SpE) post dosing, followed by a gradual decrease. The levels in the liver, spleen, kidney and bile were higher than in the blood. The tissue levels were maintained for 7–10 days after the administration.

2. Acute and subacute toxicity studies of SpE were performed by oral administrations with free feeding. In the acute toxicity study the fish administered a single dose at the rate of 200, 400 and 800mg/kg survived without clinical and histological changes. In the subacute study the fish administered multiple doses at the rate of 40, 80 and 400 mg/kg/day for 10 days survived without clinical and histological changes.

3. Minimal inhibitory concentration of SpE against *Streptococcus* sp. isolated from diseased yellowtail was in the range of 0.78–3.12 μ g/ml

スピラマイシンは *Streptomyces ambotaciens* 産生するがマクロライド系抗生物質で、物理化学的および生化学的に類似の性質をもつスピラマイシン I (50%), II (25%), III (25%) から成る複合体であり、グラム陽性球菌やグラム陰性球菌に対して静菌的に働くことが知られている (中

* 協和醸酵株式会社 (Kyowahakko Co. Ltd., Ohtemachi, Tiyodaku, Tokyo)

沢ら1966)。魚類ではグラム陽性球菌感染症としてブリの連鎖球菌症があり、本症に対して従来から使用されている抗菌剤では十分な治療効果が認められていない。著者らはスピラマイシンを用いてブリの連鎖球菌症の野外治療実験を行った結果、優れた治療効果が認められ、本症の有効な治療薬となることがわかった。第I報ではスピラマイシンのブリ体内における吸収、分布、残留性および安全性を確認する実験を行ったので、その結果を報告する。

材料および方法

供試したスピラマイシンはフリーベース（以下SpF）、エンボネート塩（SpE）とアジペート塩（SpA）であり、それらの構造式は Fig. 1 に示す通りである。

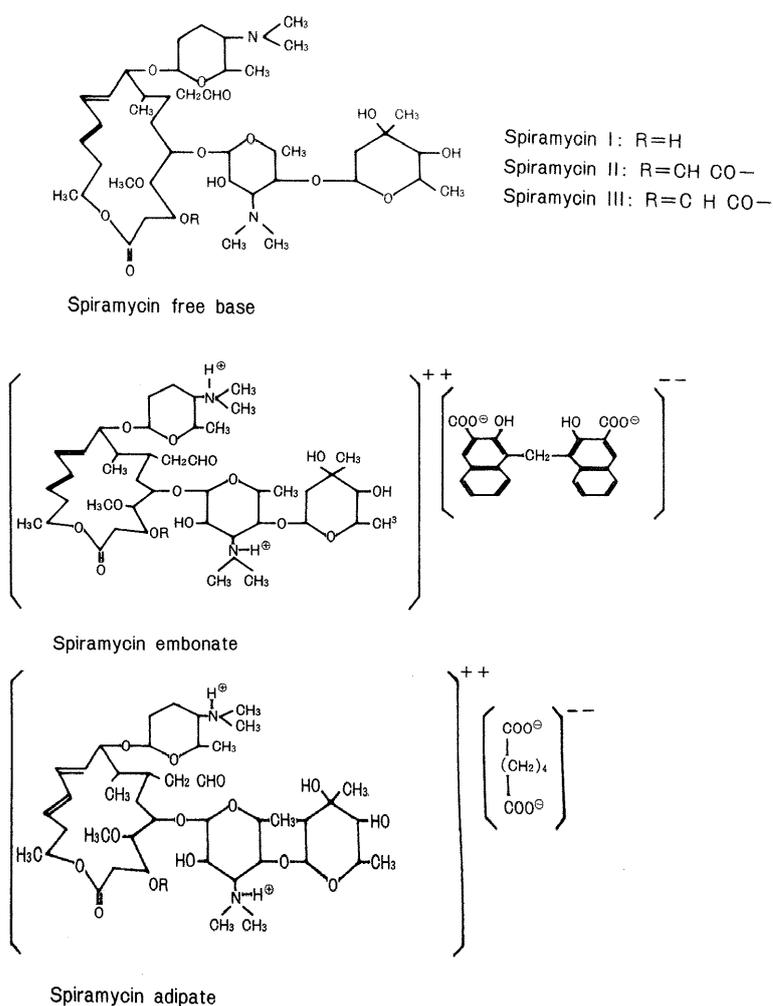


Fig. 1. Chemical structure of spiramycin

1) 吸収および分布

供試薬のうち SpE と SpF はそれぞれ原体 (798g力価/kg含有) を, SpAは注射液 (10g力価/100ml含有) を用いた。供試魚は平均体重1.6kgのブリ2才魚である。SpE と SpF はゼラチンカプセルに規定量を詰め, MS-222で麻酔した魚に体重1kg当り40mg力価 (以下mg/kgBW) の薬量を強制経口投与した。SpA は麻酔した魚に同じ薬量を腹腔内に注射した。各薬剤は1回投与とし, 処置後, 供試魚をあらかじめ設定した網生簀に収容し, SpE と SpF 投与群ではゼラチンカプセルの胃内溶解の程度から12, 24, 48, 96, 168, 336時間目に SpA 投与群からは3, 6, 12, 24, 48, 96, 168, 336時間目に, それぞれ2~3尾ずつとりあげた。採血後, 内臓諸器官と体側筋の一部を摘出し, それぞれをドライアイス・アセトンで急速冷凍した。なお実験期間中は無投餌で, 平均水温は18°Cであった。

2) 残留性

SpE の長期投与後の体内における残留性をみるため, 次の2つの実験を行った。供試薬はSpE 5%製剤 (50mg力価/g含有) を用いた。

a) 第1回実験: 平均体重150gのブリ当才魚を400尾供試し, マイワシに SpE をミンチ混合し自由摂餌により 80mg/kg BW (通常投与最高量の2倍量) を1日1回, 10日間連続投与した。その対照区には同尾数の無投薬群を設定した。最終投薬終了後, 1, 3, 6, 24, 48, 96, 144, 240, 336時間目に3尾ずつとりあげ, 採血後, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 胆汁, 体側筋を摘出してドライアイス・アセトンで急速冷凍した。投薬終了後は薬剤無添加の餌料を投与した。実験期間中の水温は24~29°Cであった。

b) 第2回実験: 平均体重550gのブリ当才魚を用い, マイワシに SpE をミンチ混合して自由摂餌により, 20, 30, 40mg/kgBW を1日1回10日間連続投与した。各投薬群とも5,000尾以上の魚を用い, 最終投薬終了後, 1, 3, 6, 24, 48, 96, 120, 240, 336時間目にそれぞれ3尾ずつとりあげ, 血液と胆汁を採取し, それぞれをドライアイス・アセトンで急速冷凍した。実験期間中の水温は24~26°Cであった。

3) 急性毒性

平均体重1.6kgのブリ2才魚を用い, SpE の原末をゼラチンカプセルに詰め, 200, 400, 800 mg/kgBW の薬量を強制経口投与した。処置後, 網生簀に収容し, 2週間無投餌のまま, 斃死数, 魚体および行動の異常について観察した。処置後7日と14日目に各区より3~6尾ずつとりあげ, 採血後, 内臓諸器官と体側筋の一部を摘出した。血液の一部は血液性状の検査に, 内臓諸器官の一部は組織検索用に10%ホルマリン水で固定し, 残りをドライアイス・アセトンで急速冷凍した。なお, 1) と3) の実験には共通の無投薬対照区を設定した。実験期間中の平均水温は18°Cであった。

4) 安全性 (亜急性毒性)

SpE の長期間投与がブリに及ぼす影響を調べるため, SpE の5%製剤を用いて次の2つの実験を行った。

a) 第1回実験: 平均体重400gのブリ当才魚を各区20尾ずつ用い, SpEをマイワシにミンチ混合して自由摂餌により, 40, 80mg/kgBW の薬量を1日1回10日間連続投与した。投薬期間中および投薬終了後2週間にわたり, 斃死数, 魚体および行動の異常を観察するとともに, 最終投薬終了

後1日と14日目に各区より3尾ずつとりあげ、内臓諸器官を10%ホルマリン水で固定した。

b) 第2回実験：平均体重600gのブリ当才魚を各区100尾ずつ用い、SpEをサンマにミンチ混合して自由摂餌により、400mg/kgBW（通常投与最大量の10倍量）の薬量を1日1回連続投与した。無投薬区を対照とした。投薬5日前と5日後に各区の体重を計測し、その間の魚体や行動の異常、摂餌量、摂餌状況についても毎日観察した。また最終投薬後5日目に5尾とりあげて解剖し、内臓諸器官の異常について観察した。

以上4種の実験に供試した魚から採取した血液と内臓諸器官におけるSp濃度の定量は所定の方法に従って、*Sarucina lutea* ATCC 9341株を用い、カップ法で行った。血液性状としては総赤血球数(RBC)、ヘモグロビン量(Hb)、ヘマトクリット値(Ht)を求めた。RBCはトーマの血球算定板を用い、Hbはシアンメトヘモグロビン法でアキュスタットシステム（藤沢メディカルサプライ）により定量した。固定標本については、常法に従ってパラフィン切片と凍結切片をつくり、H-E染色、PAS反応、ズダンⅢ染色を目的に応じて施した。

5) 薬剤感受性

SpEとSpAのほかテトラサイクリンとアミノベンジルペニシリンに対する*Streptococcus* sp.の感受性について調べた。連鎖球菌16株は1975年から1978年にかけて三重県、徳島県、長崎県の沿岸養殖場で発生したブリ病魚から分離したもので、そのうち三重県のSとX株はSpE40mg/kgBWで10日間治療が試みられた後の病魚から分離した。Spとアミノベンジルペニシリンは40%メタノール液で、テトラサイクリンは滅菌精製水で溶かした。感受性の検定にはトリプトソープロスで37°C、18時間静置培養した細菌を、薬剤溶液1ml、馬脱線維血液1ml、ハートインフュージョン寒天8mlを混合した平板上に画線塗抹した。

結 果

1) 吸収と分布

SpEの吸収と分布はTable 1とFig. 2に示したように、血中と組織中濃度は投薬後24時間でピーク値に達し、その後漸減し、体側筋では168時間、血液と内臓では336時間で検出限界値（血液、0.3μg/g、臓器、0.16μg/g）以下となった。SpEは臓器移行性が顕著で、肝臓、腎臓、脾臓のピーク値はそれぞれ、106.5、35.0、40.5μg/gとなり、血中濃度24.8μg/gよりかなり高い値を示していた。しかし、筋肉中濃度は血中濃度よりも低く、他に比べて早く検出限界値以下になった。

SpFの吸収と分布はTable 2とFig. 3に示したように、投与後12時間で血中および組織中濃度はピーク値に達していた。SpFも臓器移行性が顕著で、肝臓と脾臓の組織中濃度はそれぞれ272.0と108.5μg/gとなり、血中濃度79.0μg/gよりはるかに高い値となっていた。SpFのピーク値はSpEのピーク値より高くなる性質がみられた。SpFは体内残留傾向が強く、いずれの組織中濃度も投与後336時間で検出限界値以下となっていた。

なお、SpEとSpFの実験で、薬剤が全く検出されないか、極めて低濃度の個体があったが、このことは薬剤を詰めたカプセルの吐出によると思われる。

SpAの分布はTable 3とFig. 4に示す通りで、投与後3時間で血中および組織中濃度はピーク値に達し、その後、漸減するが、96時間後もかなり高い値を維持していた。

Table 1. Tissue levels of Spiramycin embonate after oral administration in cultured yellowtail
Single dose : 40mg/kg

Tissue	Fish no.	Time after administration (hrs)					
		12	24	48	96	168	336
Blood	1	9.8 ¹⁾	8.5	2.6*	2.8	2.8	<0.3
	2	8.0	ND	8.2	ND	3.5	<0.3
	3	0.6*	41.0	7.2	2.5	1.3	<0.3
	average ²⁾	8.9	24.8	7.7	2.7	2.5	<0.3
Liver	1	55.0	125.0	6.3*	11.0	5.0	<0.16
	2	21.0	ND	12.0	ND	2.0	<0.16
	3	4.9*	88.0	25.0	11.0	1.5	<0.16
	average	38.0	106.5	18.5	11.0	2.8	<0.16
Spleen	1	23.0	35.0	1.6*	3.8	3.1	<0.16
	2	8.7	ND	7.6	ND	3.5	<0.16
	3	3.6*	46.0	13.0	2.9	1.6	<0.16
	average	15.9	40.5	10.3	3.4	2.7	<0.16
Kidney	1	3.4	16.0	0.8*	4.8	4.4	<0.16
	2	6.0	ND	9.5	ND	4.0	<0.16
	3	1.8*	54.0	11.4	2.7	1.7	<0.16
	average	4.7	35.0	10.5	3.8	3.4	<0.16
Muscle	1	3.0	15.0	1.5*	1.0	<0.16	<0.16
	2	4.0	ND	7.0	ND	<0.16	<0.16
	3	0.3*	14.0	8.0	3.0	<0.16	<0.16
	average	3.5	14.5	7.5	2.0	<0.16	<0.16

1) : $\mu\text{g/g}$ 2) average omitted value of *

* : fish vomitted up some of capsules containig the drug

ND : fish vomitted up all of capsules containing the drug

2) 排出と残留性

SpE, SpF および SpA はいずれも40mg/kgBW の1回投与では、血中および臓器中濃度が投与後336時間で検出限界値以下となり、組織に長期間残留する傾向が認められた(Table 1, 2, 3)。

SpE20, 30, 40および80mg/kgBWを10日間連続投与した後のSpEの組織中濃度の推移は Table 4, 5-1, 5-2に示す通りである。SpE80mg/kgBW投与群 (Table 4) では血中および組織中濃度は最終投薬後3~6時間でピーク値に達し、その後漸減し、筋肉では240時間で、血液、臓器および胆汁では336時間でそれぞれ検出限界値以下となっていた。また SpEの通帯投与量である20, 30および40mg/kgBW投与群における血中と胆汁中の濃度の推移 (Table 5-1, 5-2) をみると、20mg/kgBW投与群では144時間で検出限界値以下となり、30mg/kgBW投与群では240時間、40mg/kgBW投与群では336時間で検出限界値以下となり、投薬量の多いほど体内残留時間も長くなる傾向がみられた。

SpEの胆汁中への移行性は極めて強く、胆汁中の濃度は最終投薬後96時間までは高濃度が維持され、240~336時間で検出限界値以下となっていた。

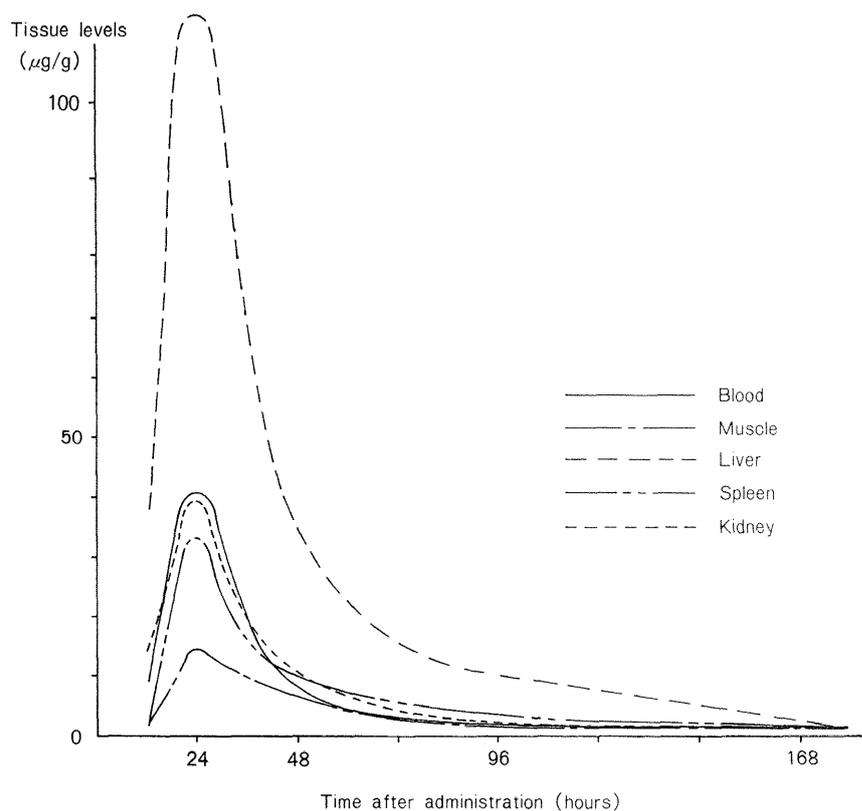


Fig. 2. Absorption and excretion of Spiramycin embonate after oral administration in cultured yellowtail. Single dose : 40mg/kg

Table 2. Tissue levels of Spiramycin free base after oral administration in cultured yellowtail. Single dose : 40mg/kg

Tissue	Fish no.	Time after administration (hrs)					
		12	24	48	96	168	336
Blood	1	76.0 ¹⁾	37.0	ND	ND	ND	<0.3
	2	82.0	33.0	15.5	3.2	2.4	<0.3
	3	1.4*	ND	2.8*	7.8	4.1	<0.3
	average ²⁾	79.0	35.0	15.5	5.5	3.3	<0.3
Liver	1	128.0	77.0	ND	ND	ND	<0.16
	2	416.0	89.0	51.0	14.0	10.0	<0.16
	3	12.6	ND	4.6*	13.0	8.0	<0.16
	average	272.0	83.0	51.0	13.5	9.0	<0.16
Spleen	1	98.0	23.0	ND	ND	ND	<0.16
	2	119.0	50.0	24.0	11.0	6.2	<0.16
	3	6.0*	ND	5.0*	20.0	5.5	<0.16
	average	108.5	36.5	24.0	15.5	5.9	<0.16

(Continue)

Tissue	Fish no.	Time after administration (hrs)					
		12	24	48	96	168	336
Kidney	1	57.0	29.0	ND	ND	ND	<0.16
	2	71.0	34.0	19.0	8.5	8.5	<0.16
	3	4.6*	ND	3.5*	15.0	13.0	<0.16
	average	64.0	31.5	19.0	11.8	10.8	<0.16
Muscle	1	55.0	35.0	ND	ND	ND	<0.16
	2	50.0	42.0	34.0	10.0	5.0	<0.16
	3	6.0*	ND	3.0*	11.0	6.0	<0.16
	average	52.5	38.5	34.0	10.5	5.5	<0.16

1) : $\mu\text{g/g}$ 2) average omitted value of *
 * : fish vomitted up some of capsules containing the drug
 ND : fish vomitted up all of capsules containing the drug

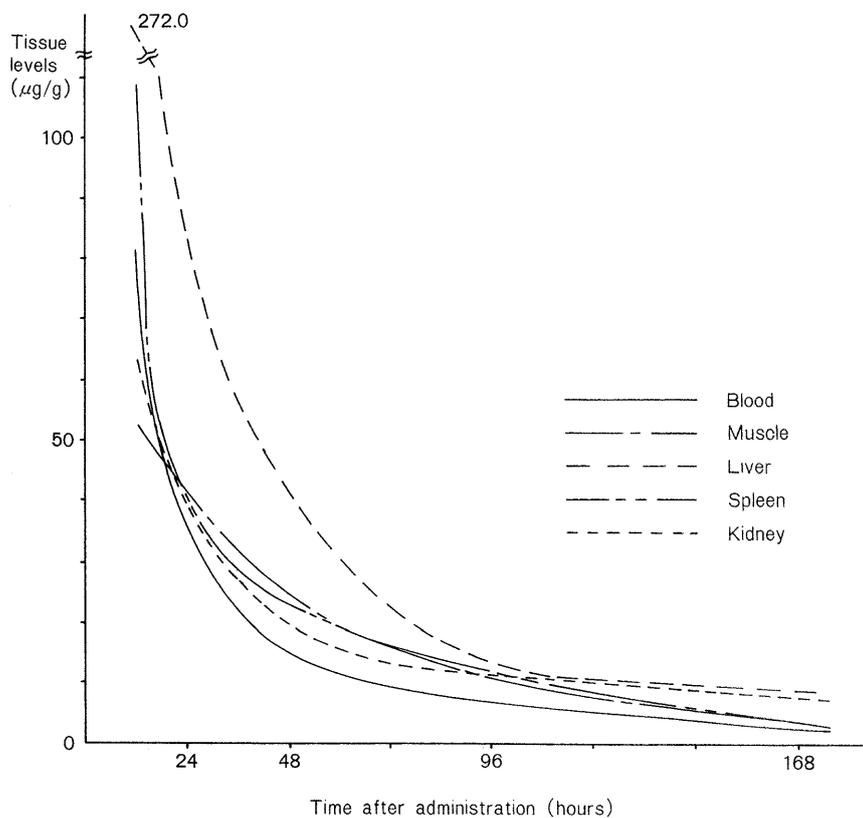


Fig. 3. Absorption and excretion of Spiramycin free base after oral administration in cultured yellowtail. Single dose : 40mg/kg

Table 3. Tissue levels of Spiramycine adipate after intra-abdominal injection in cultured yellowtail
Single dose : 40mg/kg

Tissue	Fish no.	Time after intra-abdominal injection (hrs)							
		3	6	12	24	48	96	168	336
Blood	1	80.0*	57.0	47.0	9.5	18.5	13.5	4.3	<0.3
	2	105.0	37.5	44.5	22.0	17.0	8.4	4.8	<0.3
	average	92.5	47.3	45.8	15.8	17.8	11.0	4.6	<0.3
Liver	1	162.0	102.0	66.0	34.0	30.0	7.8	9.1	<0.16
	2	118.0	96.0	71.0	58.0	28.0	25.0	18.0	<0.16
	average	140.0	99.0	68.5	46.0	29.0	16.4	13.6	<0.16
Spleen	1	73.0	46.0	45.0	19.0	15.0	12.0	9.1	<0.16
	2	25.0	35.0	14.0	20.0	14.0	10.0	7.6	<0.16
	average	49.0	40.5	29.5	19.5	14.5	11.0	8.4	<0.16
Kidney	1	50.0	26.0	25.0	15.0	15.0	8.0	3.0	<0.16
	2	99.0	48.0	26.0	17.0	13.0	10.0	6.0	<0.16
	average	74.5	37.0	25.5	16.0	14.0	9.0	4.5	<0.16
Muscle	1	21.0	23.0	22.0	21.0	9.0	2.0	<0.16	<0.16
	2	15.0	22.0	22.0	16.0	11.0	3.0	<0.16	<0.16
	average	18.0	22.5	22.0	18.5	10.0	2.5	<0.16	<0.16

* : $\mu\text{g/g}$

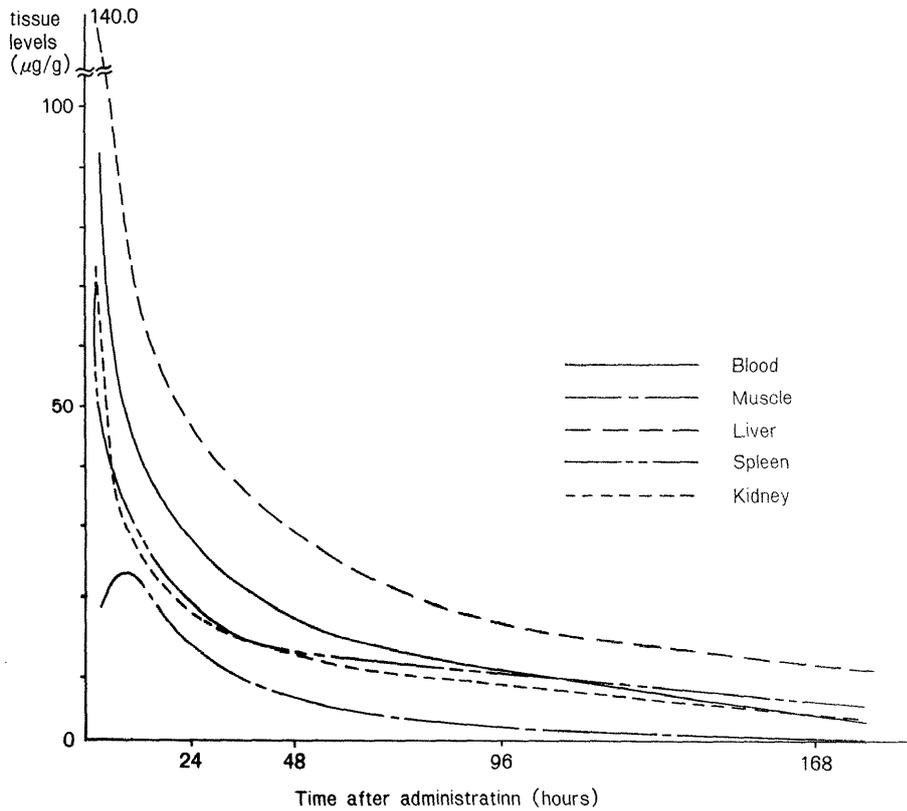


Fig. 4. Absorption and excretion of Spiramycine adipate after intra-abdominal injection in cultured yellowtail.
Single dose : 40mg/kg

Table 4. Tissue levels of Spiramycin embonate after long-period, oral administration in yellowtail

Time after final dosing	Fish no.	Tissue levels ($\mu\text{g/g}$ or ml)					
		Blood	Muscle	Liver	Kidney	Spleen	Bile
1 (hr)	1	21.0	3.6	10.6	1.2	4.0	
	2	23.6	4.9	13.8	0.8	12.2	
	3	15.0	1.9	10.2	11.5	10.5	
	average	19.9	3.5	11.5	4.5	8.9	>500
3	1	26.4	6.5	28.3	16.3	24.6	
	2	15.6	6.3	16.2	24.7	27.3	
	3	18.0	3.5	32.3	31.0	17.7	
	average	20.0	5.4	25.6	24.0	21.5	>500
6	1	22.2	7.9	20.0	20.6	19.0	
	2	26.0	4.5	18.5	24.3	23.9	
	3	23.0	6.5	3.8	7.6	12.5	
	average	23.7	6.3	14.1	17.5	18.5	>500
24	1	11.0	10.0	24.6	19.7	8.5	
	2	12.0	4.9	13.7	20.1	9.3	
	3	10.2	6.9	21.3	20.3	9.2	
	average	11.1	7.3	19.9	20.0	9.0	>500
48	1	10.2	4.2	13.8	3.6	4.2	
	2	7.8	4.8	12.1	9.2	15.3	
	3	7.2	2.4	23.3	12.7	7.1	
	average	8.4	3.1	16.4	8.5	8.9	>500
96	1	3.6	2.2	2.7	9.2	8.5	
	2	4.4	2.9	7.3	3.6	2.6	
	3	8.0	1.8	6.2	4.8	2.7	
	average	5.3	1.6	5.4	5.9	4.6	>500
144	1	2.8	0.4	6.7	3.9	2.9	
	2	3.0	1.2	6.5	3.3	3.2	
	3	2.1	0.6	6.6	3.6	2.7	
	average	2.6	0.7	6.6	3.6	2.9	80
240	1	0.6	0.16	2.8	0.5	<0.16	
	2	0.6	<0.16	1.2	0.9	0.8	
	3	0.6	<0.16	1.4	0.9	0.4	
	average	0.6	<0.16	1.8	0.7	0.6	40
336	1	<0.3	<0.16	<0.16	<0.16	<0.16	
	2	<0.3	<0.16	<0.16	<0.16	<0.16	
	3	<0.3	<0.16	<0.16	<0.16	<0.16	
	average	<0.3	<0.16	<0.16	<0.16	<0.16	<0.8

Administration : 80mg/kg once a day for 10 days

Table 5-1. Blood levels of Spiramycin embonate (SpE) after long-period, oral administration in cultured yellowtail

Time after final dosing	Fish no.	Blood levels ($\mu\text{g/g}$)			
		SpE	20mg/kg	30mg/kg	40mg/kg
1 (hr)	1		3.2	11.2	12.8
	2		4.6	9.4	14.8
	3		5.8	1.8	10.6
	average		4.5	7.5	12.7
3	1		3.7	2.0	15.2
	2		4.5	1.1	14.0
	3		2.2	4.5	14.8
	average		3.5	2.5	14.7
6	1		3.0	ND	16.4
	2		1.5	11.2	16.2
	3		2.4	8.4	18.0
	average		2.3	9.8	16.9
9	1		4.6	4.0	6.2
	2		1.7	5.3	6.4
	3		3.2	7.8	7.0
	average		3.2	5.7	6.5
24	1		4.9	6.0	7.8
	2		3.2	4.4	7.4
	3		1.8	2.8	5.6
	average		3.3	4.4	6.9
48	1		2.4	ND	5.8
	2		ND	1.8	5.2
	3		2.8	5.1	6.8
	average		2.6	3.5	5.9
96	1		ND	11.8	6.4
	2		0.5	9.4	8.8
	3		0.5	3.0	9.6
	average		0.5	8.1	8.3
120	1		0.6	4.6	10.2
	2		0.6	4.5	8.4
	3		0.5	4.4	10.4
	average		0.6	4.5	9.7
144	1		<0.3	5.0	8.0
	2		<0.3	2.0	5.4
	3		<0.3	0.5	5.0
	average		<0.3	2.5	6.1
240	1		<0.3	<0.3	0.6
	2		<0.3	<0.3	0.5
	3		<0.3	<0.3	0.5
	average		<0.3	<0.3	0.5
336	1		<0.3	<0.3	<0.3
	2		<0.3	<0.3	<0.3
	3		<0.3	<0.3	<0.3
	average		<0.3	<0.3	<0.3

ND: fish did not feed

Administration: once a day for 10 days with free feeding

Table 5—2. Bile levels of Spiramycin embonate (SpE) after long-period, oral administration in cultured yellowtail

Time after final dosing	Fish no.	Bile levels ($\mu\text{g/ml}$)			
		SpE	20mg/kg	30mg/kg	40mg/kg
1 (hr)		>500	>500	>500	>500
3		>500	>500	>500	>500
6		>500	>500*	>500	>500
9		>500	>500	>500	>500
24		>500	>500	>500	>500
48		>500*	>500*	>500	>500
72		>500	>500	>500	>500
96		>500	>500	>500	>500
120		400	180		260
144		<0.8	125		500
240	1	<0.8	<0.8		55
	2	<0.8	<0.8		105
	3	<0.8	<0.8		108
	average	<0.8	<0.8		89
366		<0.8	<0.8		<0.8

Levels are an average of three fish

*: average of two fish

Administration: once a day for 10 days

3) 急性毒性

SpE 200, 400, 800mg/kgBW, 1 回投与後における供試魚の斃死状況, 魚体および行動の異常を2週間にわたって観察した。その結果, いずれの投薬群でも麻酔回復後に一部のカプセルの吐出がみられたが, 観察期間中に斃死やその他の異常はみられなかった (Table 6—1)。投薬後168と336時間でとりあげた魚について, 解剖学的, 組織学的に検索し, 血液性状についても調べた。その結果, 解剖学的に異常はみられなかった。血液性状としてRBC, Ht値, Hb量を調べた結果, 200, 400mg/kgBW 投与群の144時間目では特に異常はみられないが, 800mg/kg BW投与群では低色素性の傾向がみられ, 336時間目では各投与群とも赤血球の小型化と低色素性の傾向がみられた (Table 6—2)。組織学的には, 各投与群とも肝臓実質細胞に軽度から高度の萎縮, 脾臓に軽度から中等度のうっ血がみられた。そのうち肝細胞の萎縮は対照区にもみられ, 長期絶食による飢餓性の変化とみなされた (Table 6—3)。腎臓の造血組織には, 血液性状の変化を直接うらづける異常は認められなかった。脾臓のうっ血は撲殺時にみられるそれと一致していた。

4) 亜急性毒性および安全性

SpE を40, 80および400mg/kgBW 10日間連続投与し, その間の斃死やその他の異常について調べたが, いずれの投薬群でも観察期間中に斃死魚はなく, 魚体や行動の異常, 摂餌状況と摂餌量の異常は全くみられなかった (Table 7—1, 8)。80mg/kgBW 投与群における組織学的観察の結果では, 投薬終了後144時間の採取例の肝臓に実質細胞の軽微な萎縮がみられたにすぎなかった (Table 7—2)。400mg/kgBW 投与群における体重の推移は対照区との間に差は認められな

Table 6-1. Acute oral toxicity of Spiramycin embonate in cultured yellowtail
Single dose: 200, 400, 800mg/kg

Dose (mg/kg)	Body weight mean (kg)	Experimental period (day)							Mortality (%)
		0	1	2	3	5	7	14	
200	1.6	10*	10	10	10	10	10	10	0
400	1.6	11	11	11	11	11	11	11	0
800	1.6	11	11	11	11	11	11	11	0
Cont.	1.6	10	10	10	10	10	10	10	0

*: number of survivals

Table 6-2. Blood indices in cultured yellowtail in the acute toxicity study of Spiramycin embonate.
Single dose: 200, 400, 800mg/kg

Doses	Fish no.	RBC $\times 10^4$	Ht	Hb	Blood levels of SpE ($\mu\text{g/g}$)	Doses	Fish no.	RBC $\times 10^4$	Ht	Hb	Blood levels of SpE ($\mu\text{g/g}$)
200mg/kg 168hrs*	1	—	—	—	5.0	200mg/kg 336hrs	1	519	56.8	14.6	<0.3
	2	—	—	—	12.5		2	358	59.0	13.4	<0.3
	3	310	64.7	16.3	6.9		3	399	61.5	15.0	<0.3
	4	—	—	—	ND		4	466	66.7	15.8	<0.3
	5	359	53.6	15.4	20.0		5	420	56.7	14.3	<0.3
	average	334.5	59.2	15.9	11.1		average	432.4	60.1	14.6	<0.3
400mg/kg 168hrs	1	—	—	—	ND	400mg/kg 336hrs	1	440	58.6	13.4	<0.3
	2	312	57.8	15.2	7.1		2	394	64.1	15.5	<0.3
	3	—	—	—	8.0		3	—	—	—	<0.3
	4	428	76.7	17.8	4.5		4	503	59.3	15.5	<0.3
	5	351	55.5	14.2	28.0		5	528	69.7	18.0	<0.3
	average	363.7	63.3	15.7	11.9		average	466.3	62.9	15.5	<0.3
800mg/kg 168hrs	1	354	52.6	14.0	5.1	800mg/kg 336hrs	1	431	72.0	15.4	<0.3
	2	334	55.8	13.6	18.0		2	394	62.8	15.9	<0.3
	3	320	49.5	14.3	6.6		3	406	59.0	16.0	<0.3
	4	—	—	—	5.3		4	432	61.8	16.0	<0.3
	5	469	64.5	16.8	4.5		5	439	67.6	16.2	<0.3
	average	369.3	55.6	14.7	7.9		average	420.4	65.7	15.6	<0.3
Control 96hrs	1	378	60.9	16.3	—	Control 336hrs	1	—	66.4	15.3	—
	2	343	53.6	14.8	—		2	321	58.2	14.8	—
	3	397	67.3	16.3	—		3	369	63.9	16.2	—
	4	340	58.2	16.7	—		average	345.0	62.8	15.4	—
	5	359	74.9	15.3	—						
	6	358	58.1	16.3	—						
average	362.5	62.2	16.0	—							

*: Time after administration

RBC: Red blood cell count (cells/mm³)

Ht: Hematocrit (%)

Hb: Hemoglobin content (g/dl)

ND: fish vomitted up all of capsules

Table 6-3. Summary of histological findings in cultured yellowtail in the acute toxicity study of Spiramycin embonate.

Single dose : 200,400,800mg/kg

Doses (mg/kg)	200		400		800		Control											
	Time after administration (hrs)		168	336	168	336	168	336	1		96		168		336			
Fish no.	1	2	1	3	5	4	2	3	4	1	2	1	2	3	1	3	2	5
Liver, atrophy	+	++	+	-	###	##	+	+	##	-	-	-	++	-	+	++	++	##
granuloma	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Spleen, congestion	++	++	-	+	-	-	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
granuloma	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
Kidney, hyaline droplet degeneration	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
congestion	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
granuloma	-	-	-	-	++	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Stomach	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pyloric appendage	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- : no alteration, + : slight, ++ : moderate, ### : marked,
Granuloma : caused by Nocardia infection

Table 7-1. Subacute oral toxicity of Spiramycin embonate in cultured yellowtail

Dose mg/kg	Body weight mean (g)	Experimental period (day)		Mortality (%)
		1	14	
40	400	20*	20	0
80	400	20	20	0

* : number of survivals
Administration : once a day for 10 days with free feeding

Table 7-2. Summary of histological findings in cultured yellowtail in the subacute toxicity study of Spiramycin embonate

Dose (mg/kg)	80					
	Time after administration (hr)			114		
Fish no.	1	2	3	1	2	3
Liver, atrophy	-	-	-	+	+	-
Spleen	-	-	-	-	-	-
Kidney	-	-	-	-	-	-
Heart	-	-	-	-	-	-
Stomach	-	-	-	-	-	-
Intestine	-	-	-	-	-	-
Pyloric appendage	-	-	-	-	-	-

Administration : once a day for 10 days with free feeding
- : no alteration, + : slight

Table 8. Subacute oral toxicity of Spiramycin embonate in cultured yellowtail

Group	Body weight (kg)		Survival/tested
	initial	terminal	
Control	61.27	70.05	100/100
400mg/kg/day for 10 days	61.27	70.25	100/100

Initial: 5 days before administration

Terminal: 5 days after administration

った (Table 8)。

5) 薬剤感受性

連鎖球菌の *in vitro* での最小発育阻止濃度 (MIC) は SpEで0.78~3.12 μ g/ml, SpAで0.78~1.56 μ g/ml, テトラサイクリンで0.39~3.12 μ g/ml, アミノベンジルペニシリンで0.78 μ g/mlであった (Table 9)。なお、供試菌株のうち S株とX株は SpE40mg/kgBW 10日間連続投与による治療の病魚から分離したものであるが、薬剤未使用地区からの分離菌株 (No. SN, ST 株) に比べて感受性の低下は認められなかった。

Table 9. Minimal inhibitory concentration of antibiotics against *Streptococcus* sp. isolated from cultured yellowtail

Strain of Streptococcus	Location	MIC of antibiotics (μ g/ml)			
		SpE	SpA	Tc	AbP
No-1	Mie Pre. 1977	1.56	1.56	1.56	
No-2		0.78	0.78	0.78	
S -1*	Mie Pre. 1978	1.56		1.56	0.78
S -2		1.56		1.56	0.78
S -3		1.56		3.12	0.78
S -4		1.56		0.78	0.78
S -5		3.12		3.12	0.78
S -6		3.12		1.56	0.78
X -1**	Mie Pre. 1978	3.12		0.78	
X -2		3.12		0.78	
X -3		3.12		1.56	
X -4		3.12		1.56	
X -5		3.12		0.78	
X -6		3.12		0.78	
SN-5	Nagasaki Pre. 1975	1.56		1.56	0.78
ST-13	Tokushima Pre. 1975	1.56		3.12	0.78

SpE: spiramycin embonate; SpA: spiramycin adipate;

Tc: tetracycline; AbP: aminobenzyl penicilline

* and **: strains isolated after medication with spiramycin embonate

考 察

1) 吸収および分布

SpE と SpF は経口投与により、SpA は注射により、いずれも血中および組織中濃度が高くなり、魚体内吸収の良いことがわかった。体内分布は胆汁、肝臓、腎臓、脾臓、血液で高濃度となり、筋肉中濃度はそれらより低かった。また臓器移行性が顕著なものも Sp の特性であった。Sp の臓器移行性は *in vitro* で連鎖球菌に感受性の認められている薬剤（楠田ら1976）であるオキシテトラサイクリン（松島1971, 静岡水試抄録）、クロラムフェニコール（畑井ら1974, 1975）、アミノペンシルペニシリン（楠田ら1977, 畑井ら1978）のブリ体内における臓器移行性よりも優れていた。SpE と SpF の吸収の比較では SpF のほうがまさっているが、SpF はアルカリ性が強く、用法上に問題があることから、経口薬としては SpE が良いと考えられた。SpA は体内吸収も良いが注射薬であり、ブリの連鎖球菌症の治療には応用できないが、同じ原因菌による疾病が発生している養殖ヒラメ（著者ら未発表）のように個体別に扱わねばならない魚種での使用の可能性も残されている。

2) 排出および残留性

SpE, SpF, SpA はともに体内残留が長期的であるのが特徴であり、このような長期残留性は前述のオキシテトラサイクリン、クロラムフェニコール、アミノペンシルペニシリンにはみられない特性である。ブリの連鎖球菌症は慢性の経過をたどり（宮崎1980）、また上記の薬剤での治療も困難である。以上の結果から Sp の体内長期残留性は本症の治療にはむしろ有利と言える。

SpE は胆汁内に高濃度で排出されることから、胆汁排出型とみなされる。哺乳動物でも Sp は胆汁排出型で、その時の Sp は活性型（ネオスピラマイシン）であり、腸管から再度吸収され体内に移行すると報告されている（真下ら1962, 高平ら1963）。ブリにおいて SpE を長期連続投与した後の血中と胆汁中の濃度の推移をみると、血中濃度に小ピーク値が認められる。これは胆汁中に排出された SpE が消化管から再吸収されていることを示唆する現象と考えられる。SpE の体内長期残留性は SpE の再吸収によっても持続されると思われる。従って、SpE による治療後の出荷には少なくとも14日以上休薬期間が必要である。

3) 急性毒性、亜急性毒性および安全性

ブリに対する SpE の急性毒性は200, 400, 800mg/kgBW を投与することにより判断した。その結果、投与後、斃死、行動や魚体の異常などはみられなかった。しかし、血液性状に低色素性の変化がみられたが、組織学的に腎臓造血組織にその変化を裏づける異常はみられなかった。また肝臓実質細胞の萎縮は飢餓性と判断され、脾臓のうっ血も放血不十分で撲殺した時の変化と全く同じであった。以上のことから通常投与最高量（40mg/kgBW）の5～20倍量でも急性毒性という上では顕著な影響を現わさないと見えよう。

SpE の亜急性毒性は SpE40, 80, 400mg/kgBW を10日間連続投与して判断したが、斃死、行動・魚体・臓器・摂餌状況・摂餌量・成長には全く異常がみられなかった。SpE のブリに対する安全性が高いことが、急性および亜急性毒性の実験結果からわかった。

4) 感受性

連鎖球菌に対する SpE の MIC は0.78～3.12 μ g/mlであった。Sp を含むマクロライド系薬剤

では血中濃度が MIC の約10倍前後に達して有効とみなされている（真下1977）。SpE40mg/kgBW 1回投与後の血中濃度は24.8 μ g/mlであり、MIC の8～32倍となっており、理論上、上記の条件を充分満している。

要 約

1. ブリに対する Sp の吸収、体内分布、排出、残留性および安全性について調べた。
2. その結果、SpE, SpF, SpA はそれぞれ吸収が良く、組織移行性が優れていることがわかった。
3. SpE のブリに対する急性毒性と亜急性毒性はほとんど認められず、高い安全性が証明された。
4. SpE は胆汁排出型であり、体内残留性が約10日間であることがわかった。

本研究をすすめるにあたり、Sp の定量などで御協力を賜った協和醗酵株式会社医薬品研究所の研究者諸氏、および実験施設の貸与をいただいた漁協関係者の方々に深謝する。

文 献

- 畑井喜司雄・平岡孝・江草周三, 1974. 魚類におけるクロラムフェニコールの吸収および排泄—Ⅰ 養殖ハマチに経口投与した時の組織内濃度. 魚病研究, 9(1): 50—70.
- 畑井喜司雄・松島又十郎・江草周三, 1975. — —Ⅱ 養殖ハマチに投与した時の組織内濃度に対する給餌および絶食の影響. 同誌, 9(2): 119—133.
- 畑井喜司雄・岩橋義人・江草周三, 1978. 養殖ハマチにおけるアンピシリンの吸収および排泄. 同誌, 13(2): 73—78.
- 楠田理一・川合研児・豊島利雄・小松功, 1976. 養殖ハマチから分離された *Streptococcus* 属の新魚病細菌について. 日水誌, 42: 1345—1352.
- 楠田理一・井上喜久治, 1977. 養殖ハマチの類結節症に対するアンピシリンの水産薬としての応用に関する研究—Ⅱ 経口投与によるハマチへの吸収, 排泄, 残留および安全性. 高知大学学術研究報告(農学), 26(1): 1—6
- 真下啓明・清水喜八郎・原田敏雄, 1962. Spiramycin の基礎的, 臨床的研究. *Chemotherapy*, 10(3): 188—191
- 真下啓明, 1977. 抗生物質・化学療法剤. 分光堂, 東京, 232pp.
- 宮崎照雄, 1980. 魚類の細菌感染症の病理組織学的研究. 本誌本号: 63—149
- 中沢昭三・横田芳武, 1966. 新しいスピラマイシン誘導体 Acetyl-Spiramycin に関する基礎的研究. *J. Antibio.*, 19(2): 90—94
- 高原汎志・加藤博正・羽田友互, 1966. Acetyl-Spiramycin に関する基礎的研究. *J. Antibio.*, 19(2): 95—97.