

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

上野隆二・奥村雅人・堀口吉重
三重大学水産学部

Study of Quality in Fish and Shellfish as Food—III
Metabolites of Miloxacin in Cultured Yellowtail and
their Antibacterial Activity

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

The present work was undertaken to investigate the metabolites of miloxacin, 5, 8-dihydro-5-methoxy-8-oxo-2 H-1, 3-dioxolo(4, 5-g)quinoline-7-carboxylic acid, in yellowtail, *Seriola quinqueradiata*, and their antibacterial activity. At 2 hours after oral administration at 40 mg/kg, high concentrations of intact miloxacin were observed in the kidney, bile and spleen while those of the metabolite, M-1, 8, 5-dihydro-8-oxo-2 H-1, 3-dioxolo(4, 5-g)quinoline-7-carboxylic acid, were in the kidney and spleen of yellowtail. The glucuronide of miloxacin was found in the muscle, kidney, bile and spleen(not detected in the blood and liver) as the minor metabolite, but that of M-1 was in the blood and liver as the major one. The activity of miloxacin and M-1 against bacteria was examined *in vitro*. Three strains were used; *Aeromonas liquefacience* and 2 strains of *Vibrio sp* isolated from fish. Miloxacin and M-1 were more active against *Aeromonas*, and the former was more active against *Aeromonas* and *Vibrios* than the latter.

Key words : metabolites, miloxacin and yellowtail

ミロキサシンを養殖ブリに強制投与した場合、体内残留物として intact なミロキサシン以外に、その代謝物である M-1 が、用いたすべての組織に検出された(上野ら, 1985)。そこで、本研究ではミロキサシンおよび M-1 の各種菌株に対する抗菌性、ミロキサシンの餌料中での安定性および養殖ブリにおけるミロキサシンおよび M-1 の組織内濃度およびそれらのグルクロン酸抱合体の存在について検討した。

実験材料および実験方法

1. 実験材料

供試魚には、現地で入手した健康状態の良好なブリ、*Seriola quinqueradiata*, を用いた。平均体重250g 前後であった。投薬方法は前報（上野ら1985）と同様にカテーテルによる強制経口投与方法を用いた。投与餌料として、コウナゴミンチに、投薬時に40 mg/kg 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、投与後2時間目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およびその代謝物であるM-1は、住友製薬株式会社製、 β -グルクロニダーゼ(ウシ肝臓製 78,000 Fishman units/g)は東京化成工業株式会社製、ハートインフュージョン寒天培地は栄研化学株式会社製をそれぞれ用いた。他の試薬は全て和光純薬工業株式会社製の特級または高速液体クロマトグラフィー(HPLC)用試薬を用いた。

2. ミロキサシンおよびM-1の各種菌株に対する抗菌力測定

供試菌株として *Aeromonas liquefacience* A-CA-1 (住友製薬株式会社から分譲)、*Vibrio sp.* V-F (アユから分離、三重大学水産学部宮崎助教授から分譲) および *Vibrio sp.* V-S (養殖ブリから分離、三重県北勢家畜保健衛生所 界外氏から分譲) をそれぞれ用いた。供試薬物は、1%炭酸ナトリウム溶液で0.5 mg/ml の濃度に溶解し原液とした。

抗菌力は、次のようにして測定した。すなわち、ハートインフュージョン寒天斜面25℃24時間培養菌の1白金耳を、1%塩化ナトリウム溶液5 ml に懸濁し、その0.1 ml と寒天培地20 ml とをシャーレー中でよく混合し、寒天平板を作製した。ついで、種々の濃度の供試薬物を浸み込ませたペーパーディスク(東洋濾紙株式会社製 直径8 mm×1.5 mm)を平板上にのせ、25℃、24～48時間培養後生じた阻止帯の幅を測定することにより抗菌力を求めた。

3. ミロキサシンの餌料中での安定性

餌料として用いたコウナゴをミンチし、その100 ml につき0.114 gのミロキサシンを加え、よく混合した後その一部を戸外に日光下で放置し、時間経過に伴うミロキサシン量の変化を調べた。

4. 魚体内におけるミロキサシンおよびM-1の組織内濃度およびグルクロン酸抱合の存在

ミロキサシンおよびM-1のグルクロン酸抱合体の組織内濃度は、次のようにして調べた。すなわち、各組織をホモジナイズ後、塩化ナトリウムを添加せずに前報(上野ら1985)の方法に従ってクロロホルム抽出を行ない、得られた上層液をHPLC分析に供した。抽出後に得られた水層(残渣)のpHを、水酸化ナトリウムで6.0に調整し、 β -グルクロニダーゼ4 mgを加え、トトルエン存在下で37℃、24時間保温した。保温後、常法に従って再びクロロホルム抽出を行ない、得られた上層液をHPLC分析に供した。

結 果

1. ミロキサシンおよびM-1の各種菌株に対する抗菌力

ミロキサシンおよびM-1の各種菌株に対する抗菌力を調べた。その結果は表1および2に示した。ミロキサシンの場合 *Aeromonas* では、 $1\mu\text{g/ml}$ > で抗菌力が認められた。*Vibrio sp.* V-F および V-S では、 $250\mu\text{g/ml}$ > , $25\mu\text{g/ml}$ > でそれぞれ抗菌力が認められた。M-1の場合、ミロキサシンに比べて感受性が低く、*Aeromonas* で $50\mu\text{g/ml}$ > , *Vibrio sp.* V-S で $500\mu\text{g/ml}$ > で抗菌力が認められた。*Vibrio sp.* V-Fでは、用いた濃度においていずれも抗

Table 1. Susceptibility of fish pathogenic bacteria to miloxacin

Bacteria	Miloxacin (mg/ml)								
	500	250	100	50	25	10	2.5	1.0	0.3
<i>A. liquefacience</i>				26*	23	20	14	+	-
<i>Vibrio sp V.F</i>	12	10	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio sp V.S</i>			24	20		-	-	-	-

*width of clear zone (mm)

Table 2. Susceptibility of fish pathogenic bacteria to M-1

Bacteria	M-1 (mg/ml)			
	500	100	50	10
<i>A. liquefacience</i>	26*	14	10	-
<i>Vibrio sp V.F</i>	-	-	-	-
<i>Vibrio sp V.S</i>	12	-	-	-

*width of clear zone (mm)

菌力が認められなかった。

2. ミロキサシンの餌料中での安定性

ミロキサシンの餌料中での安定性について調べた。その結果は、表3に示す通りである。ミロキサシンは、調製後時間経過に従って減少し、1日目で約48%であった。M-1の場合、むしろ2時間で最高値を示し、その後、徐々に減少した。

Table 3. Stability of miloxacin mixed in feed

Drugs	Time (hr)			
	0	2	6	24
Miloxacin	964*	894	704	461
M-1	9.10	34.0	29.6	22.6

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

Miloxacin, 0.114 g, was mixed in feed (100 ml of minced sand lance, *Ammodytes personatus*) and kept outdoors. Then, the residual amount of the drugs was determined by HPLC.

3. 魚体内におけるミロキサシンおよびM-1の組織内濃度およびグルクロン酸抱合体の存在

前報(上野ら1985)によると、ブリ組織中でのミロキサシンの代謝吸収は、10 mg/kg あるいは40 mg/kg 投与において1~3時間のうちに最大値を得られたので、本実験では供試魚に、ミ

ロキサシン40 mg/kgになるよう強制経口投与し、2時間後における各組織中のミロキサシンの濃度を、HPLC法により調べた。その結果を表4および一部の組織についてHPLCによる

Table 4. The presence of the glucuronides of miloxacin and M-1 in various tissues of yellowtail at 2 hours after oral administration at a dose of 40 mg/kg

Experimental methods	Tissues					
	Muscle	Blood	Liver	Kidney	Bile	Spleen
CH ₃ Cl extracion	1.32* ¹ (0.11)	0.07* ² (0.33)	0.11 (0.68)	3.66 (1.06)	3.90 (0.30)	4.40 (2.17)
β -Glucuronidase treatment of the residue	0.19 (0.06)	— (0.80)	— (1.61)	0.43 (0.84)	0.28 (0.16)	0.11 (1.28)

*¹ μ g/g.

*² μ g/ml

The parenthesis shows the value of M-1.

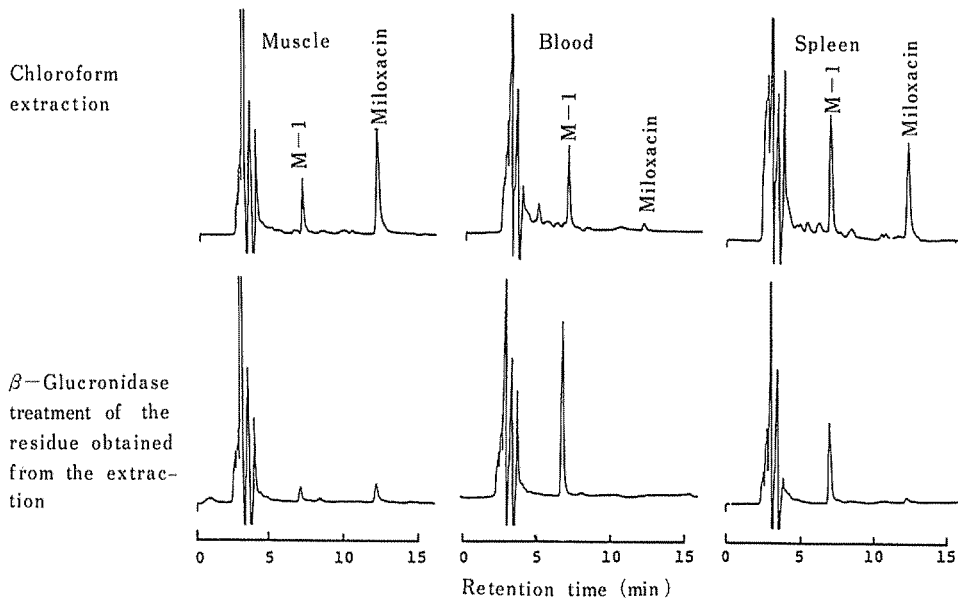


Fig. 1. Chromatograms of miloxacin and M-1 in various tissues of yellowtail at 2 hours after oral administration at a dose of 40 mg/kg by HPLC.

クロマトグラムを図1に示した。ミロキサシンの場合、腎臓、脾臓、胆汁に高く、M-1の場合、ミロキサシン濃度の少ない肝臓に高い濃度を示した。

次に、各組織中に存在するミロキサシンおよびM-1のグルクロン酸抱合体の存在を知るために、 β -グルクロニダーゼ処理を行ない、酵素処理後に増加するミロキサシンおよびM-1量を求めた。その結果を表4および一部の組織についてHPLCによるクロマトグラムを図1に示した。ミロキサシンの場合、血液、肝臓では組織内濃度が低いために、殆んどグルクロン酸抱合体が検出されなかったが、それら以外の組織では、明らかに抱合体の存在が確認された。しかしながら、その量も少なく、検出された全ミロキサシン量に対して、筋肉で12.6%、腎臓で10.5%、胆汁で6.7%、脾臓で2.4%であった。一方、M-1の場合、用いたすべての組織にわたって、グルクロン酸抱合体の存在がみられ、ことに肝臓で最高値が得られた。検出された全M-1量に対して、筋肉で35.3%、血液で70.8%、肝臓で70.3%、腎臓で44.2%、肝汁で34.8%、脾臓で37.1%であった。

考 察

楠田ら(1978)によると、ミロキサシンはグラム陰性菌に対して強い抗菌力を示すが、グラム陽性菌に対して弱い抗菌力しか示さず、魚病細菌に対する最小発育阻止濃度は*Vibrio anguillarum*で0.78~0.025 $\mu\text{g/ml}$ 、*Vibrio fischeri* 12.5~0.025 $\mu\text{g/ml}$ 、*Aeromonas*で0.025~<0.025 $\mu\text{g/ml}$ と報告している。本実験で用いた供試菌株においても、菌株によってかなり感受性に差があると考えられる。さらに、M-1の抗菌力は、ミロキサシンに比べて非常に低く、また同様に菌株によっても感受性に有意の差が認められる。

武仲ら(1980)によると、ミロキサシン希薄溶液(15 $\mu\text{g/ml}$)を蛍光灯下で24時間放置した場合、約21%の低下を認め、脱メトキシ化によるM-1の生成を報告している。本実験での餌料中におけるミロキサシンの減少とM-1の増加、それに伴う減少は、光分解に加えて、餌料中に含まれているコウナゴから由来する薬物代謝酵素による分解にも基づいているとも考えられるが、いずれにしても薬物を餌料に添加した場合、ただちに対象魚に投与することが望ましいと考えられる。

供試魚にミロキサシン40 mg/kg 経口投与した場合、2時間後の各組織中のミロキサシン濃度は、その最高値を比較すると、脾臓>肝汁>腎臓>筋肉>血液・肝臓の順であった。また、本実験においても岩田ら(1978)の結果に比べ、かなり低い組織内濃度を示した。M-1の組織内濃度は、その最高値を比較すると、脾臓>腎臓>肝臓>血液>肝汁>筋肉の順であり、特に、血液、肝臓では他の組織に比べ、ミロキサシンに対するM-1の占める割合が、かなり高かった。本実験によると、魚体内でのミロキサシンは、おもにintactな形で存在し、グルクロン酸抱合体はあまり形成されないと推定されるが、一方、M-1では、その抱合体が形成されやすく、ことに、ミロキサシン濃度の非常に少ない肝臓や血液中では、投与後、2時間目で検出される全M-1量の70%以上が抱合体であった。従って、種々の組織中に蓄積されたミロキサシンは、おもに血液、肝臓でM-1のグルクロン酸抱合され、代謝・排出されるものと推定される。

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 靖氏に謝意を表する。

文 献

- 岩田一夫, 1978. 合成抗菌剤 A B-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.
- 上野隆二・奥村雅人・阪中和紀・堀口吉重, 1985. 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. 三重大水研報, 12:167-173.
- 楠田理一・久保勢津美, 1978. 魚類の細菌感染症に対する A B-206 の応用に関する研究-I. 各種魚病細菌標準保存株に対する A B-206 の試験管内抗菌力について. 住友化学生物研究所, 未発表.
- 武仲 宏・水田 恵, 1980. ミロキサシンの希薄水溶液の安定性について. 住友化学生物科学研究所, 未発表.