

せっそう病に関する研究—XI

ピロミド酸の化学療法的研究

森川 進・田代文男・河野 薫*

Studies on the Furunculosis in Salmonoid Fishes- XI

Chemotherapeutic Studies on Piromidic Acid

SUSUMU MORIKAWA · FUMIO TASHIRO · KAORU KOHNO *

Chemotherapeutic studies on piromidic acid were carried out with the following results.

Twenty one strains of *Aeromonas salmonicida* isolated from diseased salmonid fish were susceptible to piromidic acid, and cross-resistance was not observed between piromidic acid and chloramphenicol or sulfonamides.

Chemotherapeutic effect was recognized when Amago salmon got administrations ($10\text{-}40\text{mg/kg} \cdot \text{BW}$, 5bays, po.) of piromidic acid against the artificially infected and spontaneous outbreak of furunculosis.

Piromidic acid was well absorbed into plasma and internal organs of Amago salmon and excreted within 96 hours.

Side effect of piromidic acid was observed on rainbow trout, which was forced the diet contained $50\text{mg/kg} \cdot \text{BW}$, 5days, po.

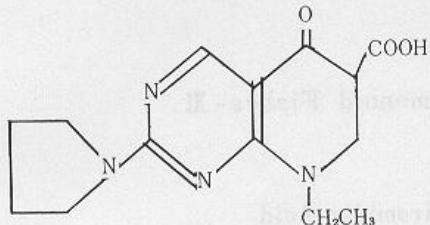
*大日本製薬株式会社総合研究所

Dainippon Pharmaceutical Co., LTD. Reserch Laboratories of Chemotherapy

^{1),2),3)}著者らは前報までに、既販及び開発中の18種の薬剤について、化学療法的検討を加えてきた。

せっそう病の原因菌である*A. salmonicida*は、近年サルファ剤をはじめ数種の薬剤に対して耐性化が進み⁴⁾、またR因子を有する多剤耐性菌の出現も知られており⁵⁾、薬剤による治療が困難になっている例もある。

ピロミド酸は下記の構造式を持つ合成抗菌剤



で、サルファ剤、抗生素質耐性菌およびR因子を有する多剤耐性菌にも抗菌作用を示すとされ⁶⁾おり、せっそう病に対する治療剤としての適性を明らかにするために、*A. salmonicida*に対する^{in vitro}抗菌作用、人為感染アマゴに対する除菌効果及び治療効果、ニジマスに対する亜急性毒性、アマゴにおける吸収および排泄、自然感染アマゴに対する治療効果を検討した。

なお本研究は、昭和50年度水産庁指定調査研究総合助成事業「病害研究」の一環として実施した。またこの一部について昭和51年度日本水産学会春季大会にて口頭発表した。⁷⁾

I *A. salmonicida*に対する^{in vitro}抗菌作用

供試菌株として、Table-1に示すように、1975

年に岐阜県内でサケ科魚類から分離した20株および、II、IIIの^{in vivo}試験に用いるG7202の計21株の*A. salmonicida*を用いた。

薬剤として、ピロミド酸（以下PA）、クロラムフェニコール（同CP）、テトラサイクリン（同TC）およびスルファモノメトキシン（同SMM）を用いた。

試験培地として、PA、CP、TCでは、ハートインフュージョン寒天を、SMMでは、75%馬溶血々液を添加したミューラーヒントン寒天を用いて各薬剤を含む平板を作成し、供試菌を接種後25°C・20時間培養後に最小発育阻止濃度（MIC）を求めた。

結 果

Table-1に示すように、PAおよびTCにはすべての株が感受性で、PAのMICは、1.56～3.13μg/ml、TCでは0.39～0.78μg/mlであった。21株のうち3株がCPに耐性を示し、うち2株はSMMにも耐性を示したが、これらの株もPAには感受性を示した。

II アマゴの筋肉内感染*A. salmonicida*に対する除菌効果

人為感染させた*A. salmonicida*に対するPAの除菌効果を、bioautography法により検討した。

Table-1 *In vitro* antibacterial activity of piromidic acid and several drugs against *A. salmonicida* isolated from diseased salmonoid fish

Strain	Source	MIC: $\mu\text{g}/\text{ml}$			
		PA	CP	TC	SMM
K C - 7501	Biwamasu	1.56	0.78	0.39	3.13
K C - 7502	"	1.56	0.78	0.39	3.13
K C - 7506	Yamame	1.56	0.78	0.39	3.13
K C - 7507	"	1.56	0.78	0.39	3.13
K C - 7509	Amago	1.56	0.78	0.39	3.13
K C - 7510	"	1.56	0.78	0.39	3.13
K C - 7518	"	1.56	1.56	0.39	3.13
K C - 7519	"	1.56	0.78	0.39	3.13
K C - 7522	"	1.56	1.56	0.39	3.13
K C - 7527	"	1.56	1.56	0.78	3.13
K C - 7530	"	1.56	0.78	0.39	3.13
K C - 7534	"	1.56	0.78	0.39	3.13
K C - 7536	"	1.56	100	0.39	3.13
K C - 7537	"	1.56	0.78	0.39	3.13
K C - 7543	"	3.13	0.78	0.39	3.13
K C - 7545	"	1.56	100	0.39	>100
K C - 7550	"	1.56	0.78	0.39	3.13
K C - 7555	"	1.56	0.78	0.39	3.13
K B - 7501	Yamame	1.56	0.78	0.39	3.13
T J - 7501	Amago	1.56	100	0.39	>100
G - 7202	"	1.56	0.78	0.39	3.13

PA : piromidic acid, CP : chloramphenicol, TC : tetracycline, SMM : sulfamonomethoxine

試験の方法

供試魚は、アマゴ0年魚で平均体重65g(60~70g)のものを各3尾づつ用いた。供試菌株は、*A. salmonicida* G7202で、普通寒天平板で20°C・48時間培養した菌体を生理食塩水に懸濁させ供試魚の背部筋肉に接種した。接種菌量は8

$\times 10^7$ colony forming units (CFU)/fish、接種菌液量は0.1mℓ/fishであった。菌接種の30分後に、PAの5・10および20mg/kg・BWをピンセットを用いて強制経口投与し、投与6時間後に供試魚を-20°Cで凍結後、高瀬らの方法により⁸⁾凍結切片を作製し、ハートインフェージョン寒天平板上に貼り付け、25°C・24時間培養後に、

triphenyl-tetrazonium chlorideで染色して切片上の生菌の有無を観察し、除菌効果を判定した。調薬は、マス用マッシュ90%， α -テンブン10%，水60%（外割）に所定量のピロミド酸を加えてペレット状に成型し乾燥させた。給餌率は魚体重の0.5%とした。試験池は、長さ85cm×巾46cm×高さ46cm、水深40cmのコンクリート池を用い、注水量約90cc/秒の流水飼育とし、水温は19.2~19.8°Cであった。

結 果

Table-2に示すように、PAは20mg/kg·BWの投与で筋肉内の*A. salmonicida*を除菌する効果を有することが認められたが、10mg/kg·BWではその効果は不十分であり、また5mg/kg·BWでは効果が認められなかった。

III *A. salmonicida*を人為感染させたアマゴに対する治療効果

Table-2 Effect of piromidic acid against *A. salmonicida* G7202 injected into Amago salmon

Dosage (mg/kg)	No. of tested	Inhibition of bacterial growth*	Efficacy
20	3	2	+
10	3	1	±
5	3	0	—
Control	3	0	—

*No. of fish with unstained or less stained sections

人為感染させたアマゴに対するPAの臨床的治療効果を斃死の有無によって検討した。

試験の方法

供試魚は、アマゴ0年魚で平均体重55g（50~60g）のものを各区20尾づつ用い、前項と同様に調整した菌浮遊液を背部筋肉に接種した。接種菌量は、 7×10^8 CFU/fish、接種菌液量は0.1ml/fishであった。前項と同様の調薬方法によって、PAの2.5, 5, 10, 20mg/kg·BW, CPの50mg/kg·BWを、菌接種24時間後から、1日1回、5日間強制経口投与した。CPは、³⁾前報において湿菌重量20mcg/kg·BWで攻撃された人為感染アマゴに対して、50mg/kg·BWの投与で100%の治療効果を示しており、本試験における攻撃の強度が適当であるか否かを判断するために投与した。試験池および注水量は、前項IIと同様で、水温は16.1~21.2°Cであった。菌接種後22日間観察し、毎日の斃死尾数を記録し、それらの斃死魚と試験終了時の生残魚につ

いて菌分離を行って死因判定の一助とし、治療効果を判定した。

結果および考察

結果をTable-3に示した。試験中、水生菌症

が供試魚に見られ、試験の障害となつたので、斃死魚より菌分離を行い、水生菌の着生が見られた斃死魚より、*A. salmonicida* が再分離された場合は、その死因を人為感染によるせっそう病、再分離されない場合は水生菌症と推定した。

なお水生菌の着生が見られない斃死魚からは、

Table-3 Therapeutic effect of piromidic acid and chloramphenicol against *A. salmonicida* G7202 infection to Amago salmon.

Days after injection	Dosage (mg/kg·BW)	Drug	Control	CP	PA	PA	PA	PA
				50	2.5	5	10	20
Administration	1	20*	20	20	20	20	20	20
	2	20	20	20	20	20	20	20
	3	⊕ 9	20	20	20	20	20	20
	4	⊕ 0	20	⊕ 19	20	20	20	20
	5		20	⊕ 15	20	20	20	20
	6		20	⊕ 14	⊕ 19	20	20	20
	7		20	⊕ 13	19	20	20	20
	8		20	13	19	20	20	20
	9		20	13	19	20	20	20
	10		20	13	⊕ 17	20	20	20
	11		20	⊕ 12	⊕ 17	⊕ 19	20	
	12		20	12	⊕ 16	⊕ 19	20	
	13		20	12	⊕ 16	⊕ 18	20	
	14		20	⊕ 12	⊕ 15	⊕ 18	20	
	15		20	⊕ 11	15	⊕ 17	20	
	16		20	11	15	⊕ 16	20	
	17		20	11	15	16	20	
	18		20	11	15	16	20	
	19		20	11	15	16	20	
	20		20	11	15	16	20	
	21		20	11	15	16	20	
	22		⊖ 20	⊕ 11	⊖ 15	⊖ 16	⊖ 20	
Survival rate			0%	100	55	75	80	100
Mortality due to furunculosis			100%	0	40	15	5	0

*No. of survivals

PA: Piromidic acid

CP: chloramphenicol

⊕ *A. salmonicida* was reisolated

⊖ *A. salmonicida* was not reisolated

○ Fungal disease

すべて *A. salmonicida* が再分離された。

無投薬対照区は、菌接種 4 日後に全数が斃死したのに対し、CP 50 mg/kg · BW 投与区は、接種 22 日後において全数が生残し、生残魚からも *A. salmonicida* が再分離されなかったことから、本試験における人為感染の強度が適当であったと思われた。

PA の 20 mg/kg · BW 投与区では、CP 投与区と同様に全数が生残し、顕著な治療効果が認められた。PA の 10 mg/kg · BW および 5 mg/kg · BW 投与区でも治療効果が認められ、せっそう病による斃死魚は、それぞれ 1 尾(斃死率 5 %), 3 尾(同 15 %)のみであった。また、以上の PA 投与区の生残魚からは、*A. salmonicida* は再分離されなかった。PA の 2.5 mg/kg · BW 投与区では、せっそう病による斃死魚が 8 尾(同 40 %) 出現し、生残魚からも *A. salmonicida* が再分離され、治療効果は認められなかった。以上の結果から *A. salmonicida* を人為感染させたアマゴに対する PA の ED₅₀ 値は、1.97 (1.11 ~ 3.50) mg/kg · BW と算出された。

IV 経口投与におけるアマゴの組織中濃度

経口 1 回投与でのアマゴにおける各組織中濃度を定量した。

試験の方法

平均体重 100 g (79 ~ 111 g) のアマゴ 1 年魚を用い、PA の 10 mg/kg · BW および 40 mg/kg · BW を、前項と同様の方法で 1 回強制経口投与した。投与 1, 3, 6, 12, 24, 48 時間後に各 5 尾づつ取り上げ、血液、肝臓、腎臓および筋肉を採取した。血液は尾柄切断により採血し、遠心分離後の血漿を定量用試料とした。各組織は採取後直ちに -20 °C で凍結保存した。凍結組織 1 g を 3 ml の $\frac{1}{15}$ M 磷酸緩衝液(PH 6.0)と共にホモゲナイズし、肝臓の場合は沸とう水中で 10 分間加熱後冷却して遠沈し、上清を分離した。肝臓以外の組織は加熱せずに遠沈し上清を分離した。得られた上清は、同上緩衝液で適宜希釈して定量用試料とした。定量は *E. coli* kp を指示菌とする薄層カップ法によりおこなった。試験池および注水量は前項 II と同様で、試験水温は、13.2 ~ 13.7 °C であった。⁶⁾

結果および考察

10 mg/kg · BW および 40 mg/kg · BW 投与の定量結果を、それぞれ Table-4, Table-5 に、その経時変化を Fig.-1, Fig.-2 に示した。

10 mg/kg · BW 投与では、血漿および肝臓における濃度は 6 ~ 12 時間後にピークを示し、以後時間の経過と共に減少した。脾臓、腎臓および筋肉におけるピークは 12 ~ 24 時間後に見られ、血漿および肝臓に比べやや遅れる傾向を示した。

ピーク値は血漿で 2.59 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、肝臓 5.27 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、腎臓 4.10 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、脾臓 1.80 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、筋肉 3.08 $\mu\text{g}/\text{g}$

Table-4 Plasma, organ and tissue levels of piromidic acid in Amago salmon which was administrated the drug once orally, at the dosage of 10 mg/kg . BW

Sample	No. of fish	Time after administration(hour)					
		1	3	6	12	24	48
Plasma	1	<0.29 *	0.75	2.06	2.22	1.95	1.39
	2	<0.29	0.68	1.53	2.52	2.45	1.84
	3	<0.29	0.93	3.39	2.78	2.33	0.80
	4	<0.29	0.56	2.92	2.42	1.99	0.83
	5	<0.29	<0.29	2.01	3.03	2.68	0.84
	average	<0.29	0.58	2.38	2.59	2.28	1.14
Liver	1	<0.74	2.01	5.02	3.49	3.61	2.22
	2	<0.74	1.91	4.07	4.21	4.12	3.16
	3	<0.74	3.30	6.12	4.91	3.85	1.37
	4	<0.74	1.82	5.48	4.12	3.16	1.04
	5	<0.74	<0.74	5.66	5.02	3.90	3.30
	average	<0.74	1.81	5.27	4.35	3.73	2.22
Kidney	1	<0.56	<0.56	2.97	3.23	4.33	2.47
	2	<0.56	<0.56	2.30	3.63	3.63	2.52
	3	<0.56	1.16	4.54	3.42	4.13	1.16
	4	<0.56	<0.56	4.03	3.12	3.89	1.39
	5	<0.56	<0.56	3.59	4.54	4.54	1.98
	average	<0.56	<0.56	3.49	3.59	4.10	1.90
Spleen	1 - 5 **	<0.37	<0.37	1.43	1.75	1.80	0.46
Muscle	1	<0.28	0.35	2.01	2.94	2.81	1.33
	2	<0.28	<0.28	1.23	3.33	3.78	1.60
	3	<0.28	0.44	2.44	3.38	2.89	0.59
	4	<0.28	0.32	2.41	2.85	2.51	0.61
	5	<0.28	<0.28	1.65	2.89	3.38	0.78
	average	<0.28	<0.28	1.95	3.08	3.07	0.98
Body weight	1	86 ***	85	88	107	93	81
	2	90	86	98	85	91	96
	3	99	93	80	98	98	111
	4	84	93	85	94	90	85
	5	92	94	92	93	87	82
	average	90.2	90.2	88.6	95.4	91.8	91.0

* $\mu\text{g}/\text{ml}$ or g, ** average of 5 fishes *** g

Table-5 Plasma, organ and tissue levels of piromidic acid in Amago salmon which was administrated the drug once orally, at the dosage of $40\text{mg/kg} \cdot \text{BW}$

Sample	No. of fish	Time after administration(hour)					
		1	3	6	12	24	48
Plasma	1	<0.24 *	1.87	5.19	4.79	6.67	4.46
	2	<0.24	1.46	4.55	7.42	7.83	3.89
	3	<0.24	1.47	3.14	3.68	7.82	4.19
	4	<0.24	0.87	5.54	5.85	9.29	4.14
	5	<0.24	1.67	4.14	6.16	7.04	4.94
	average	<0.24	1.47	4.51	5.58	7.73	4.32
Liver	1	<0.74	4.60	9.02	10.58	13.25	8.33
	2	<0.74	7.40	14.74	13.79	17.29	9.90
	3	<0.74	4.56	7.29	10.16	18.72	6.47
	4	<0.74	4.76	15.78	10.58	22.85	8.44
	5	<0.74	5.04	13.79	11.00	14.16	9.51
	average	<0.74	5.27	12.12	11.22	17.25	8.53
Kidney	1	<0.56	2.94	9.81	9.32	14.55	8.00
	2	<0.56	1.83	8.32	14.37	15.91	8.97
	3	<0.56	3.01	5.75	4.51	21.32	8.86
	4	<0.56	1.36	7.14	10.59	18.77	10.86
	5	<0.56	3.34	8.00	11.87	16.53	12.98
	average	<0.56	2.50	7.80	10.13	17.42	9.93
Spleen	1 - 5 **	<0.37	1.62	4.70	5.43	7.76	3.96
Muscle	1	<0.28	1.43	5.94	6.55	7.98	6.19
	2	<0.28	1.26	3.58	9.59	12.71	5.77
	3	<0.28	0.89	3.78	4.36	13.63	6.93
	4	<0.28	0.37	5.30	7.34	12.18	8.10
	5	<0.28	1.21	4.94	7.33	8.93	6.65
	average	<0.28	1.03	4.71	7.03	11.09	6.73
Body weight	1	83 ***	82	95	88	82	99
	2	95	94	84	99	81	97
	3	90	87	88	91	86	99
	4	79	99	93	101	92	84
	5	86	109	90	97	96	92
	average	86.6	94.2	90.0	95.2	87.4	94.2

* $\mu\text{g/ml}$ or g, ** average of 5 fishes *** g

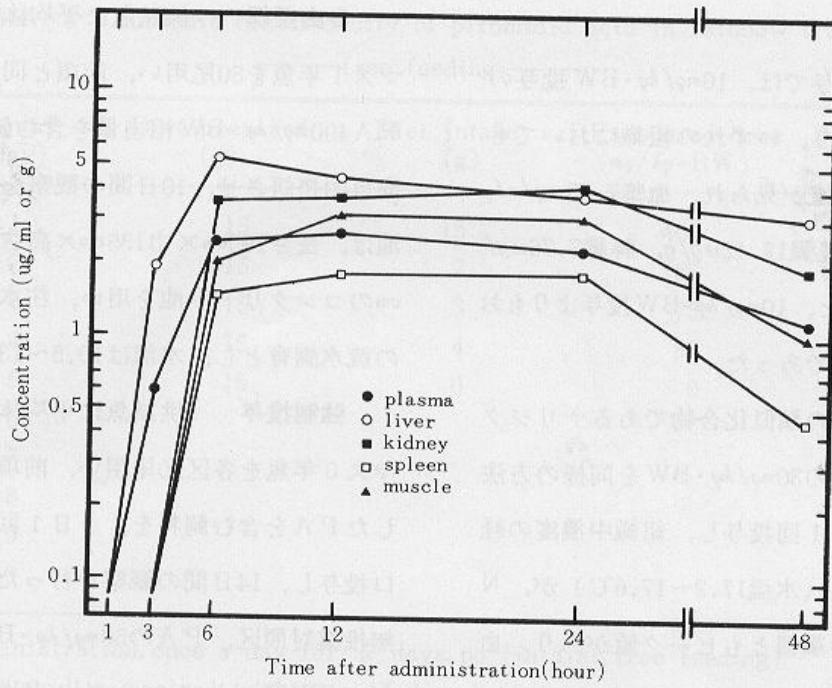


Fig. - 1 Plasma, organ and tissue levels of piromidic acid in Amago salmon which was administrated the drug once orally, at the dosage of $10\text{mg}/\text{kg} \cdot \text{BW}$

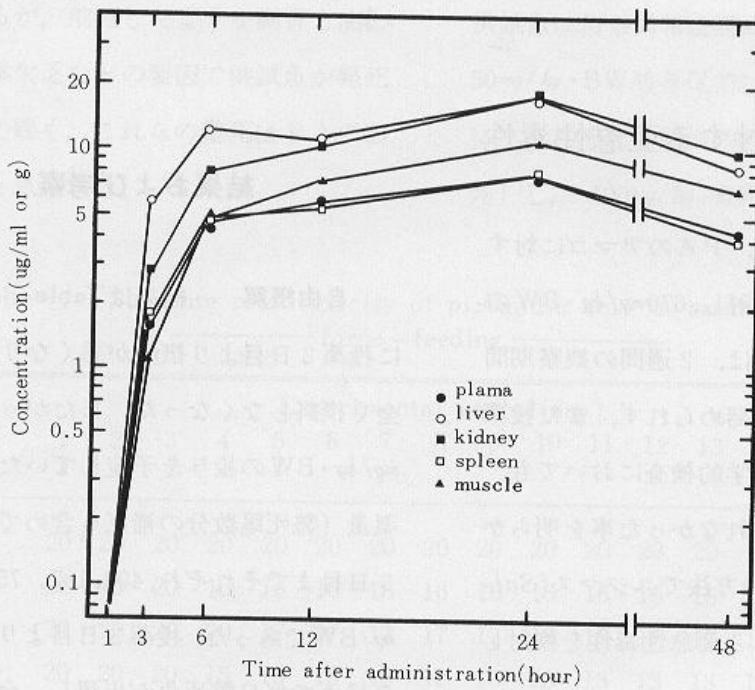


Fig. - 2 Plasma, organ and tissue levels of piromidic acid in Amago salmon which was administrated the drug once orally, at the dosage of $40\text{mg}/\text{kg} \cdot \text{BW}$

であった。

40mg/kg·BW投与では、10mg/kg·BW投与のパターンとやや異り、いずれの組織においても24時間後にピーク値が見られ、血漿7.73μg/ml、肝臓17.25μg/g、腎臓17.42μg/g、脾臓7.76μg/g、筋肉11.09μg/gと、10mg/kg·BW投与よりもおよそ3~4倍の値であった。

著者らは、PAの類似化合物であるナリジクス酸（以下NA）の30mg/kg·BWを同様の方法でアマゴ0年魚に1回投与し、組織中濃度の経時変化を測定した（水温17.2~17.6°C）が、NAは6時間後に各臓器ともピーク値があり、血漿8.6μg/ml、肝臓13.9μg/g、腎臓12.2μg/g、筋肉7.7μg/g（脾臓は測定せず）で、投薬量を考慮すると、PAとほぼ同様のピーク値であった。

V ニジマスに対する亜急性毒性

著者らは前報において、PAのアマゴに対する亜急性毒性について検討し、670mg/kg·BWの5日間連続投与においては、2週間の観察期間中、供試魚に全く異常が認められず、また投薬終了後に行った病理組織学的検査においても、主要臓器に異常が認められなかった事を明らかにした。本報では、同様の方法でニジマス (*Salmo gairdnerii*)に対する亜急性毒性を検討した。

試験の方法

自由摂餌 供試魚に平均体重70gのニジ

マス1年魚を50尾用い、前項と同様に調整したPA 400mg/kg·BW相当量を含む飼料を、1日1回自由摂餌させ、10日間の観察を行った。試験池は、長さ195cm×巾135cm×高さ60cm、水深40cmのコンクリート池を用い、注水量約3ℓ/秒の流水飼育とし、水温は10.5~13.2°Cであった。

強制投与 供試魚に平均体重45gのニジマス0年魚を各区20尾用い、前項と同様に調整したPAを含む飼料を、1日1回5日間強制経口投与し、14日間の観察を行った。試験区は、無投薬対照区、PAの50mg/kg·BW区、100mg/kg·BW区および200mg/kg·BW区を設けた。試験池は、長さ100cm×巾40cm×高さ50cm、水深44cmの塩化ビニール製で、注水量約200cc/秒の流水飼育とし、水温は、11.4~16.2°Cであった。

結果および考察

自由摂餌 結果はTable-6に示すように投薬2日目より摂餌が悪くなり、5日目には全く摂餌しなくなった。したがって当初は400mg/kg·BWの投与を予定していたが、実際の投薬量（斃死尾数分の補正も含めて）は、初日から5日目までそれぞれ、400, 187, 75, 88, 0mg/kg·BWであった。投薬3日目より、投薬終了4日目まで毎日斃死魚が出現し、合計斃死尾数21尾、斃死率42%となった。投薬終了1日目および3日目に、狂奔遊泳する個体が見られたが、

Table-6 Subacute oral toxicity of piromidic acid in rainbow trout
—free feeding—

Experimental period (day)	Diet prepared (g)	Diet intake (g)	Estimated dose (mg/kg · BW)	No. of survivals
→ 1	15	15	400	50
→ 2	15	7	187	50
→ 3	15	3	75	47
→ 4	15	4	88	41
→ 5	15	0	0	38
6				35
7				31
8				29
9				29
10				29

→: Drug administration, once a day for 5 days, po (in diet, free feeding)

*: Piromidic acid was mixed with 15 g of diet in 1.4 g.

斃死魚は肉眼的に異常が認められなかった。

本試験では、無投薬の対照区を設けなかった点に問題があるが、前述したような飼育方法においては、酸素欠乏などの要因で供試魚が斃死することは考え難く、これらの斃死はPAの影響によるものと思われた。

強制投与 結果をTable-7に示した。

無投薬対照区では、試験期間中斃死魚はなく、供試魚に何ら異常は認められなかったが、PA 50mg/kg · BW投与区では、投与4および5日目に、それぞれ2尾づつ計4尾が斃死（斃死率20%）し、100mg/kg · BW投与区では5日目に3

Table-7 Subacute oral toxicity of piromidic acid in rainbow trout
—force-feeding—

Dosage (mg/kg)	Experimental period (day)													Mortality (%)	
	↓	↓	↓	↓	↓	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
0	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	0
50	20	20	20	18	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	20
100	20	20	20	20	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	15
200	20	20	20	15	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	35

* No. of survivals

↓: Administration, once a day for 5 days po (in diet, force-feeding)

尾が斃死（同15%）， $200\text{mg}/\text{kg} \cdot \text{BW}$ 投与区では，4および5日目にそれぞれ5尾および2尾の計7尾が斃死（同35%）した。これらの斃死魚は前項と同様、肉眼的には異常が認められなかつた。

Fisherの直接確率計算法によって、上記の試験結果が偶然に得られる確率を算出すると、無投与区に対して、 $50\text{mg}/\text{kg} \cdot \text{BW}$ 投与区は11.5%， $100\text{mg}/\text{kg} \cdot \text{BW}$ 投与区は5.3%， $200\text{mg}/\text{kg} \cdot \text{BW}$ 投与区は0.4%であった。これらの結果から、 $200\text{mg}/\text{kg} \cdot \text{BW}$ 投与区ではPAの影響が明らかに認められ、無投与区の供試魚に何ら異常が認められなかつたことから、 50 および $100\text{mg}/\text{kg} \cdot \text{BW}$ 投与区でもPAの影響が現われていると思われた。

病理組織等更に詳細な検討が必要であると思われるが、ニジマスについての以上二つの試験における斃死は、PAの影響によるものと考えられた。前述したように、アマゴについては、 $670\text{mg}/\text{kg} \cdot \text{BW}$ の投与でもなんら影響が見られなかつた点と対比すると、両魚種間における薬剤に対する感受性の差異が考えられ興味深い。

VI 組織における残留性

経口連続投与終了後の、アマゴにおける各組織中濃度を定量し残留性を検討した。

試験の方法

アマゴ1年魚（平均体重75.2g）の約500尾の群に、PAの $40\text{mg}/\text{kg} \cdot \text{BW}$ を1日量として、1日1回、7日間混餌自由摂餌で投与を行い、最終投薬終了3，6，12，24，48，72，96および120時間後に各6尾づつとり上げ、IV項と同様の方法で、血漿、肝臓、腎臓、脾臓および筋肉中のPA濃度を定量した。試験水温は13.0~13.9°Cであった。

結果および考察

定量結果をTable 8に、その経時変化をFig.-3に示した。血漿、肝臓および脾臓では6時間後に、また腎臓および筋肉では12時間後にピーク値を示し、血漿 $13.11\mu\text{g}/\text{ml}$ 、肝臓 $18.03\mu\text{g}/\text{g}$ 、腎臓 $19.22\mu\text{g}/\text{g}$ 、脾臓 $12.56\mu\text{g}/\text{g}$ 、筋肉 $16.15\mu\text{g}/\text{g}$ であった。各組織中濃度は、72~96時間後には検出限度以下に減少し、特定の組織に長時間残留する傾向はみられなかつた。

また、IV項の1回投与時（ $40\text{mg}/\text{kg} \cdot \text{BW}$ ）と、ピーク値を比較すると、肝臓および腎臓ではほぼ同じ、血漿、脾臓および筋肉では、連続投与時の方が1.5~1.7倍多かった。

VII せっそう病に対する野外治療効果

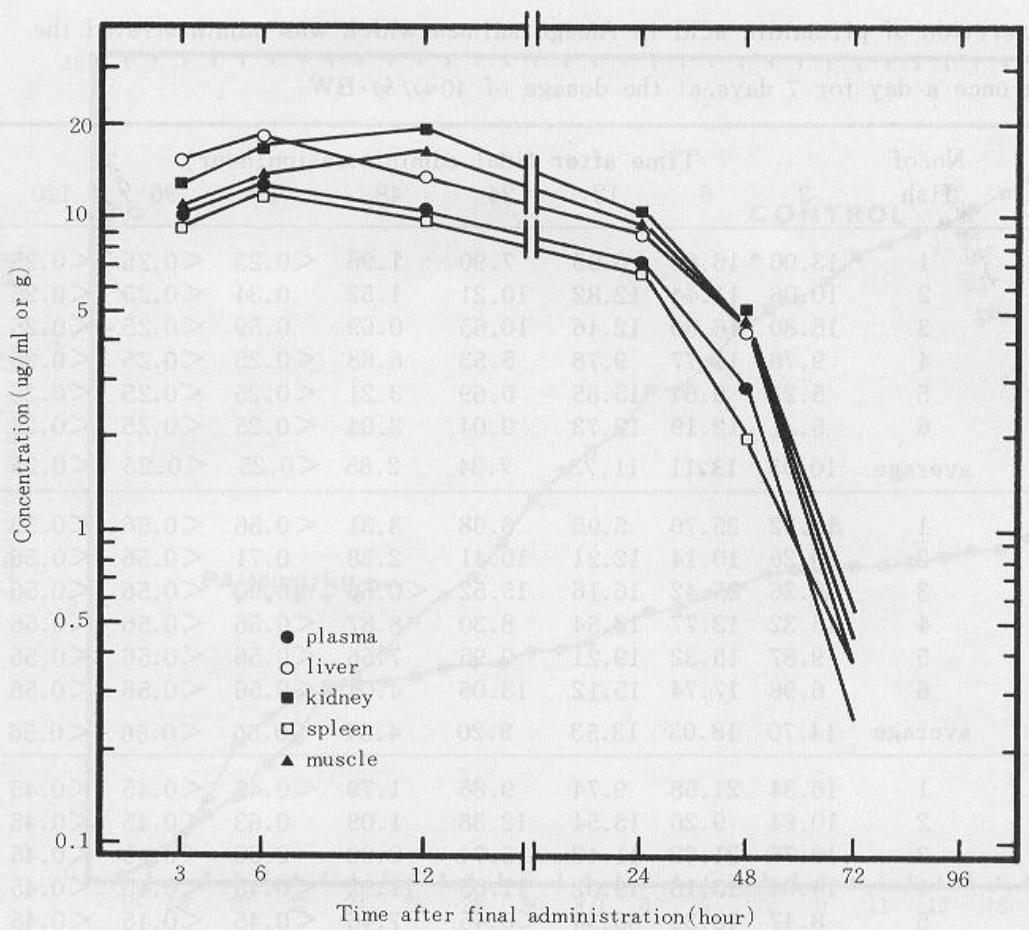


Fig. - 3 Excretion of piromidic acid in Amago salmon which was administrated the drug once a day for 7 days, at the dosage of $40\text{mg/kg} \cdot \text{BW}$

試験の方法

察を行い、斃死数を記録した。試験水温は14.8～23.0°Cであった。

1975年7月岐阜水試において飼育中のアマゴ0年魚（平均体重約26g）に感染症が発生し、菌検索によりせっそう病と診断した。病魚群を各々1,280尾の2群に分け、非投薬対照群およびPA投与群とした。PAは飼料重量に対し5%の飼料用オイルに懸濁させた後、マス用ペレットに吸着させ自由摂餌させる方法により、 $40\text{mg/kg} \cdot \text{BW}/\text{日}$ の投与量で1日1回、5日間投薬を行った。投薬前後を含め計33日間、毎日観

結果および考察

33日間の観察期間中の斃死状況をFig. - 4に示した。非投薬対照群では試験期間中ほぼ一定した斃死経過を示し、試験終了日までの累積斃死率は12.9%であった。PA投与群では、投薬3日目より斃死数が激減し、以後は散発的に斃

Table—8 Excretion of piromidic acid in Amago salmon which was administrated the drug once a day for 7 days, at the dosage of $40\text{mg}/\text{kg} \cdot \text{BW}$

Sample	No. of fish	Time after final administration(hour)							
		3	6	12	24	48	72	96	120
Plasma	1	13.00 *	16.80	6.95	7.90	1.96	<0.25	<0.25	<0.25
	2	10.06	11.44	12.82	10.21	1.52	0.34	<0.25	<0.25
	3	16.80	16.80	12.46	10.65	0.69	0.59	<0.25	<0.25
	4	9.78	11.77	9.78	5.53	6.68	<0.25	<0.25	<0.25
	5	5.23	9.64	15.65	0.69	3.21	<0.25	<0.25	<0.25
	6	5.41	12.19	12.73	9.04	3.04	<0.25	<0.25	<0.25
	average	10.05	13.11	11.73	7.34	2.85	<0.25	<0.25	<0.25
Liver	1	15.52	25.76	5.95	6.98	3.31	<0.56	<0.56	<0.56
	2	20.26	10.14	12.21	10.41	2.28	0.71	<0.56	<0.56
	3	20.26	25.42	16.16	15.52	<0.56	0.90	<0.56	<0.56
	4	15.32	13.77	12.54	8.30	8.87	<0.56	<0.56	<0.56
	5	9.87	15.32	19.21	0.95	7.56	<0.56	<0.56	<0.56
	6	6.98	17.74	15.12	13.06	4.04	<0.56	<0.56	<0.56
	average	14.70	18.03	13.53	9.20	4.34	<0.56	<0.56	<0.56
Kidney	1	16.34	21.58	9.74	9.86	1.79	<0.45	<0.45	<0.45
	2	10.64	9.26	15.54	12.38	1.09	0.63	<0.45	<0.45
	3	19.76	21.32	11.47	15.74	0.90	0.90	<0.45	<0.45
	4	14.04	13.18	19.02	11.05	11.92	<0.45	<0.45	<0.45
	5	8.47	18.32	35.34	<0.45	7.46	<0.45	<0.45	<0.45
	6	6.26	17.19	24.18	13.02	4.07	<0.45	<0.45	<0.45
	average	12.59	16.81	19.22	10.34	4.54	<0.45	<0.45	<0.45
Spleen	1 - 3 **	12.89	13.45	6.57	9.40	0.73	<0.37	<0.37	<0.37
	4 - 6 **	5.15	11.66	12.89	4.07	3.35	<0.37	<0.37	<0.37
	average	9.02	12.56	9.73	6.74	2.04	<0.37	<0.37	<0.37
Muscle	1	13.64	17.66	9.24	8.64	2.95	<0.37	<0.37	<0.37
	2	7.86	7.97	14.82	14.04	2.16	0.43	<0.37	<0.37
	3	14.23	16.07	10.58	12.97	1.35	0.73	<0.37	<0.37
	4	13.48	12.97	17.43	9.00	9.49	<0.37	<0.37	<0.37
	5	6.78	13.48	23.77	0.68	5.86	<0.37	<0.37	<0.37
	6	4.84	13.48	21.05	12.27	4.55	<0.37	<0.37	<0.37
	average	10.14	13.61	16.15	9.60	4.39	<0.37	<0.37	<0.37
Body weight	1	76 ***	59	71	65	64	72	72	65
	2	86	56	83	66	47	80	80	63
	3	82	65	49	90	80	84	67	61
	4	59	60	81	78	66	74	88	57
	5	71	78	82	55	78	62	80	68
	6	67	62	75	61	61	77	63	63
	average	73.5	63.3	73.5	69.2	66.0	74.8	75.0	62.8

* $\mu\text{g}/\text{ml}$ or g, ** average of 3 fish *** * g

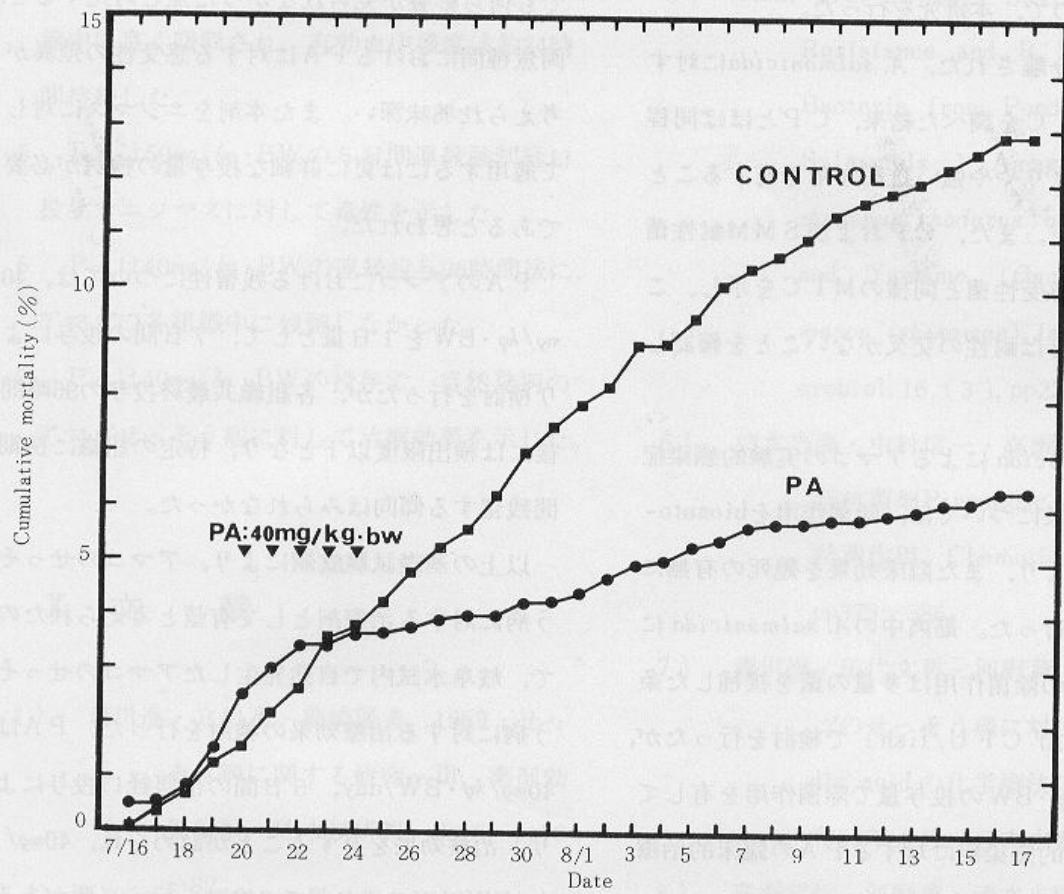


Fig. - 4 Therapeutic effect of piromidic acid against the spontaneous furunculosis in Amago salmon

死魚が認められたのみで、試験終了日までの累積斃死率は 6.3%（投薬終了後の斃死率は 2.8 %）であった。このことから、PAは $40\text{mg}/\text{kg}\cdot\text{BW}$ の 5 日間投与でアマゴのせっそう病に対し治療効果が認められた。また PA 投与区において、摂餌の悪化等、薬剤の影響と思われる所見は認められなかった。なお III 項の人為感染魚に対する治療試験では、 $20\text{mg}/\text{kg}\cdot\text{BW}$ で 100% の治療効果が得られており、 $40\text{mg}/\text{kg}\cdot\text{BW}$ 以下の投与量での野外試験を行う必要があると思われた。

VIII 総合考察

アマゴのせっそう病に対して、これまでスルフィソゾールなどのサルファ剤およびクロラムフェニコールなどの抗生素質が用いられてきたが、これらの薬剤に対する耐性菌の出現により治療が困難になってきた。^{4), 5)}

PAは、抗生素質およびサルファ剤とは交叉耐性を示さないこと、および R 因子の伝達を阻止する作用を有することが知られており、せっそう病に対する治療剤として興味ある化合物と

考えられたので、本研究を行った。

病魚から分離された、*A. salmonicida*に対するPAのMICを調べた結果、CPとほぼ同程度、SMMよりやや強い抗菌作用を有することが認められた。また、CPおよびSMM耐性菌に対しても感受性菌と同様のMICを示し、これらの薬剤とは耐性の交叉がないことを確認した。

*A. salmonicida*によるアマゴの実験的感染症に対する効果については、除菌作用をbioautography法により、また臨床効果を斃死の有無により評価を行った。筋肉中の*A. salmonicida*に対するPAの除菌作用は多量の菌を接種した条件下 (8×10^7 CFU/fish) で検討を行ったが、 $10\sim20\text{mg/kg} \cdot \text{BW}$ の投与量で除菌作用を有していた。実験的感染症に対するPAの臨床的治療効果は、 $5\text{mg/kg} \cdot \text{BW}$ で認められたが、 $10\sim20\text{mg/kg} \cdot \text{BW}$ を用いた方がより効果的であった。

PAをアマゴに経口投与し、血漿および組織への分布をしらべた結果、 $10\text{mg/kg} \cdot \text{BW}$ の投与量において各組織中濃度は、*A. salmonicida*に対するMIC値以上になり、いわゆる有効組織中濃度は約24時間持続することが認められた。またPAの投与量を $40\text{mg/kg} \cdot \text{BW}$ に増したところ、各組織中濃度も3~4倍上昇し、投与量にはほぼ比例して高くなると思われた。

PAのニジマスに対する亜急性毒性について検討した結果、自由摂餌では、 $400\text{mg/kg} \cdot \text{BW}$ 、強制投与では $50\text{mg/kg} \cdot \text{BW}$ の投与で、PAの影響によると思われる斃死魚が出現した。アマゴに対する同様の試験では、 $670\text{mg/kg} \cdot \text{BW}$ の投与

でも何ら影響が見られなかった点と対比すると、両魚種間におけるPAに対する感受性の差異が考えられ興味深い。また本剤をニジマスに対して適用するには更に詳細な投与量の検討が必要であると思われた。

PAのアマゴにおける残留性については、 $40\text{mg/kg} \cdot \text{BW}$ を1日量として、7日間の投与により検討を行ったが、各組織共最終投与の96時間後には検出限度以下となり、特定の組織に長期間残留する傾向はみられなかった。

以上の基礎試験成績により、アマゴのせっそう病に対する治療剤として有望と考えられたので、岐阜水試内で自然発生したアマゴのせっそう病に対する治療効果の検討を行った。PAは $40\text{mg/kg} \cdot \text{BW/day}$ 、5日間の混餌経口投与により、治療効果を有することが認められ、 $40\text{mg/kg} \cdot \text{BW}$ 以下の投与量での検討を行う必要があると思われた。

これらの結果より、アマゴのせっそう病に対して、PAは $10\sim40\text{mg/kg} \cdot \text{BW}$ を投与すれば適当であると思われた。

IX 要 約

1. ピロミド酸 (PA) について、アマゴのせっそう病に対する化学療法的研究を行った。
2. 病魚より分離された*A. salmonicida*は、PAに感受性があり、PAは、CPおよびSMと交叉耐性を示さなかった。

4. PAは $10\text{mg/kg} \cdot \text{BW}$ の投与でアマゴの各組織中に良く吸収され、有効血中濃度は約24時間持続した。

5. PAは $50\text{mg/kg} \cdot \text{BW}$ の5日間連続強制経口投与でニジマスに対して毒性を示した。

6. PAは $40\text{mg/kg} \cdot \text{BW}$ の連続投与96時間後に、アマゴの各組織中に残留しなかった。

7. PAは $40\text{mg/kg} \cdot \text{BW}$ の投与で、自然発病のアマゴせっそう病に対して治療効果を示した。

X 文 献

- 1) 森川進・立川瓦・熊崎隆夫, 1969 ; せっそう病に関する研究—III, 薬剤効果試験, 岐水試研報, No.16, pp79~82
- 2) 森川進・田代文男・谷口朝臣, 1975 ; Ditto—VI, 薬剤に関する試験 (1), 同誌, No.20, pp. 67~98
- 3) 森川進・田代文男, 1975 ; Ditto—VII, クロラムフェニコール・オキシテトラサイクリン・AMF-16・テトラサイクリン・ピロミド酸の治療効果・毒性・吸収について, 同誌, No.21, pp97~110
- 4) 森川進・荒井真・田代文男, 1975, Ditto—IX, 1975年に県内で分離された *A. salmonicida* の薬剤感受性について, 同誌, No.21, pp111~117
- 5) Aoki T. et al, 1972, Studies of Drug Resistance and R Factors in Bacteria from Pond -Cultured Salmonids 1. Amago (*Oncorhynchus rhodurus macrostomus*) and Yamame (*Oncorhynchus masou ishikawai*), Japan J. Microbiol, 16 (3), pp233~238
- 6) 清水当尚・中村信一・高瀬善行, 1971 ; 新抗菌剤Piromidic acidの研究 I, 抗菌作用, Chemotherapy, 19(5), pp379~386
- 7) 森川進・田代文男・河野薰, 1976 ; アマゴのせっそう病に対するPiromidic acidの化学療法的研究, 昭和51年4月, 日本水産学会講演
- 8) 高瀬善行・河野薰・清水当尚, 1969 ; 魚類を用いたBioautography, その1 : 抗菌物質の魚体内への吸収及び分布の検討, 魚病研究, 4 (1), pp45~47
- 9) 東京大学医科学研究所学友会, 1965 ; 細菌学実習提要, 丸善, pp461
- 10) Nakamura S. et al, 1976 ; Inhibition of Conjugal Transfer of R Plasmids by Pipemidic Acid and Related Compounds, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, (5), pp779~785