

# アユに対する新ニトロフラン誘導體ニフルブラジン

(HB-115)の研究

伏木省三

アユ養殖にとって、細菌性疾病による被害は、経営上大きな隘路となっており、早急にその対策が望まれている。

現在、いくつかの抗菌剤が使用されているが、稚アユを輸送する際、しばしば大きな被害を与える細菌性疾病に対する適当な防御方法である薬浴に関する実験は、わずかに室賀らがクロルテトラサイクリンで、また大上がスルファモノメトキシンで検討しているに過ぎず、他の薬剤の薬浴効果や、薬浴処理条件等いろいろ検討する必要がある。

本報告は、アユの細菌性疾病の主たる起因菌であるヒブリオ菌に対してすぐれた抗菌力を持つ新ニトロフラン誘導體であるニフルブラジン (HB-115) を使用し、実際にフィールドで薬剤を使用する場合のさまざまな条件を設定し、薬浴に関する諸問題について検討し、とりまとめたものである。

本試験実施に際し、薬剤の組織内濃度の定量にご協力たまわった、山之内製薬株式会社、森岡保、白木建二両氏に対して深く感謝の意を表します。

## 実験材料および方法

### 1. 稚アユに対するHB-115の水温別薬浴毒性

30 cm × 60 cm × 60 cm のガラス容器を使用し、用水が11℃、22℃、26℃になるようクーラーおよびヒーターで調節した、これに稚アユを放養し、所定の水温に馴化させた後、用水が表1に示した濃度になるよう薬剤を溶解し、6時間薬浴した後、水温15℃の流水中に24時間収容し、その間の斃死数を観察した。なお流水中に移行の際の水温馴化は2時間かけて行なった。

表 1. HB-115 の水温別薬浴毒性実験区

供試魚	5月30日漁獲のもの			6月23日漁獲のもの		
	16℃	22℃	26℃	11℃	16℃	22℃
薬浴濃度	ppm 12	ppm 8	ppm 6	ppm 15	ppm 11	ppm 9
	10	6.7	4.9	13	10	8
	8	5.4	3.8	10	8	6.5
	6	4.1	2.1	8	6	5
	4	2.8	1.6	6	5	4

供試魚は昭和45年5月30日および6月23日に漁獲した琵琶湖産アユをそれぞれ15℃の流水中に4日間蓄養したものである。

II. 稚アユに対するHB-115の薬浴時間別毒性,

水温16℃と一定にし薬浴濃度を20, 10, 5, 2.5, PPMの4濃度に分け薬浴時間を20PPM, 120~300分, 10PPM, 180~420分, 5PPM, 300~660分, 2.5PPM, 600~1080分をそれぞれ60分毎に分け計24試験区を設定して実験した。

薬浴方法および観察等は実験Iと同じ方法で行い, 供試魚は6月23日漁獲したものをさらに4日間延長したものである。

III. 感染防御実験-1 (薬浴濃度と薬浴時間との関係)

一度アユに通過させ再分離した *Vibrio anguillarum* PB-15 を20℃, 15時間 Y, C, C 液体培地で培養した菌液を生理食塩水で10倍に希釈し, 大きさ10gのアユの背鰭付近の側部筋肉内に0.025ml注射し, 約4時間流水中に収容した後, 薬浴を実施した。なお本試験の薬浴濃度を0.1, 0.3, 1, 3, 10, ppmとし, それぞれの薬浴を20, 45, 90, 180, 360分の5段階に分け, 対照区を合せて26の試験区で実施した。

IV. 感染防御試験-2 (接種菌量の差異による薬浴効果の差について)

試験方法は実験3と同じであるが, ただ生理食塩水の希釈倍数を10, 100, 1000倍とし, 接種菌量の差異によるHB-115の薬浴効果を検討した。供試魚は実験3と同様のものを使用した。

V. 感染防御試験-3 (薬浴水温別薬浴効果について)

試験方法は実験3, と同じであるが, 薬浴水温が15℃と20℃の場合の薬浴効果の差を比較した。なお供試魚は実験3と同様のものを使用した。

VI. 組織内濃度

HB-115の薬液を調整した後, 第2表に示した条件のもとで供試魚を薬浴した。薬浴後清水に移し, 薬浴直後, 30分, 1時間, 2時間, 8時間および24時間後に供試魚

を取りあげ、1.5%ウレタン液で麻醉後、開腹してペパリン処理した注射筒を用いて動脈球より採血し、遠沈して血漿を分離した。また同時に内臓（肝、脾、膵、胃腸、幽門垂を含む）および筋肉を採集した。採血した血漿および内臓はドライアイスでただちに凍結し、 $-20^{\circ}\text{C}$ のフリーザー中に保存した。ただし表2に示した実験4においては薬浴直後のみ採材した。

表2. 組織内濃度試験区

EXP NO	薬浴濃度	水温	薬浴時間	薬浴量	供試尾数	平均体重
	ppm	$^{\circ}\text{C}$	分	ℓ	尾	g
1	30	16	30	50	35	20
2	30	21	30	50	35	20
3	10	21	30	50	35	20
4	2	18	30	50	15	20
5	30	20	30	50	14	100

表3. 定量用培地の組成

	組 成	処方I	処方II
基礎培地	ベプトン	1%	1
	肉エキス	0.5	0.5
	塩化ナトリウム	0.25	0.25
	寒天	1	3
	PH	6.5	6.5
指示薬 (菌)	1% $\text{NaNO}_3$	2	2
	0.1% メチレンブルー	4	12
	E. coli NIEJ $37^{\circ}\text{C}$ 16時間培養	2	3
	100倍希釈菌液		

採取凍結した各、組織を冷時1g採取して、ガラス製ホモゲナイザー中に入れ、PH 6.0のM/10リン酸緩衝液を少量加えて、氷冷しつつ磨砕した。この磨砕液を褐色ネスラー管に移し、上記緩衝液で10mlとした後、湯浴中で $100^{\circ}\text{C}$ 10分間加熱し、冷却後遠沈して上清を分離して定量用検液とした。血漿についてはM/10リン酸緩衝液で2倍希釈したものを検液とした。

(定量方法)

E. Coli NIEJ株を被検菌とする微生物学定量法（重層法）により検液中HB-115の微生物活性濃度を測定した。すなわち表3に示した組成の培地を調整し、処方Iの培地を小試験管（内径7mm×長さ10mm）に1.4mlずつ分注固化して内臓および筋肉用定量培地とし、処方IIの培地を毛细管（メトラー、沸点測定用、内径2.2mm×長さ74mm）に

約0.15 mℓずつ分注固化して、血漿用定量培地として上記検液を重層し（内臓および筋肉では0.3 mℓ血漿では0.04 mℓ）冷蔵庫中に4時間放置後37℃で16時間培養して生じた阻止帯の長さを測定し、同時に求めた検量線より検液中の微生物活性濃度を算定した。

なお本定量法のHB-115の検出感度は、内臓および筋肉においては0.32～0.63 mcg/g・血漿においては0.061～0.13 mcg/mℓであった。

## 実験結果

### I 稚アユに対するHB-115の水温別毒性

本実験に用いた供試魚は5月30日に琵琶湖内で、また6月23日には、河川逆上途中で、それぞれ漁獲されたもので、前者は体型も小さく（1～3g）色素も完全に出ていないものも多く、後者は体型も大型で色素も完全に出ていた。したがって本試験では、ヤ、成育の異なる2種の稚アユを用いて別々に水温別薬浴毒性を検討したことになる。その結果、両試験とも同様の傾向を示し（表4、表5）この程度の成育の差では、HB-115の水温別薬浴毒性には差が見られないものと考えられる。

表4. 水温別薬浴毒性（5月30日漁獲のもの）

水温 (℃)	薬浴濃度 (ppm)	供試尾数	薬浴中の 斃数	清水中での斃死数			斃死数計	斃死率 (%)
				24h	48h	72h		
16.3	1.2	16	0	16	—	—	16	100
	1.0	15	0	13	0	2	15	100
	8	15	0	7	0	1	8	70
	6	12	0	0	0	0	0	0
	4	15	0	1	0	0	1	6.7
21.4 }	8	14	0	11	1	0	12	85.7
	6.7	16	0	4	1	0	5	31.2
	5.4	14	0	3	1	0	4	28.6
22.3	4.1	14	0	0	0	0	0	0
	2.8	15	0	0	0	0	0	0
25.8 } 26.6	6.0	16	0	14	—	—	16	100
	4.9	11	0	7	0	0	7	63.0
	3.8	13	0	0	0	1	1	7.7
	2.7	14	0	0	0	1	1	7.1
	1.6	15	0	0	0	0	0	0

表 5. 水温別薬浴毒性 (6月23日漁獲のもの)

水温 (℃)	薬浴濃度 (ppm)	供試尾数	薬浴中の 斃死数	清水中での 死数			斃死数計	斃死率 (%)
				24h	48h	72h		
11.2 }	15	13	0	11	2	0	13	100
	13	15	0	9	2	0	11	73.0
	10	15	0	2	0	0	2	13.0
	8	11	0	1	0	0	0	9
	6	14	0	0	0	0	0	0
16.2 }	11	15	0	8	3	1	12	80
	10	14	0	8	2	1	11	78.5
	8	14	0	0	0	1	1	7.1
	6	14	0	0	0	0	0	0
	5	13	0	0	0	0	0	0
22.1 }	9	16	0	14	1	1	16	100
	8	14	0	14	0	0	14	100
	6.5	12	0	10	0	0	10	83.3
	5	15	0	3	4	1	8	53.3
	4	15	0	0	0	0	0	0

HB-115の薬浴毒性は、薬浴水温に大きく影響し、薬浴水温が10℃上昇すると毒性は1.5～2倍となった。6時間薬浴で薬浴毒性が見られないHB-115の濃度は、本試験の結果から推定すると、11℃、8～7ppm、16℃、6ppm、22℃、4ppm、25℃、3～2ppmと考えられる。

II 稚アユに対するHB-115の薬浴時間別毒性

水温を一定とした場合の薬浴時間別毒性結果を表6に示した。

20ppmの高濃度で薬浴すると、毒性による斃死が見られない薬浴時間と、全数が致死する薬浴時間との時間差は約180分程度であったが、低濃度の2.5ppmの場合には薬浴時間と斃死率との関係は全体的に見ると、長時間薬浴する程斃死率は高くなる傾向が見られるが、各試験区の斃死率は変動が大きい。このことは供試魚の健康度合とか、薬剤に対する感受性や薬剤の吸収等に影響する魚の損傷度合などに差があったためと考えられる。

表6. 薬浴時間別毒性

薬浴濃度 (ppm)	薬浴時間 (分)	供試尾数	薬浴中の 斃死数	清水中の斃死数			斃死数計	斃死率 (%)
				24 h	48 h	72 h		
20	120	10	0	0	1	0	1	10
	180	9	0	8	0	0	8	80
	240	10	0	10	—	—	10	100
	300	10	0	10	—	—	10	100
10	180	10	0	0	0	1	1	10
	240	10	0	0	0	0	0	0
	300	10	0	4	0	1	5	50
	360	10	0	6	2	0	8	80
	420	10	0	10	—	—	10	100
5	300	10	0	1	0	1	2	20
	360	10	0	0	1	0	1	10
	420	10	0	0	3	0	3	30
	480	10	0	3	1	1	5	50
	540	10	0	0	5	2	7	70
	600	10	0	2	5	0	7	70
	660	10	0	6	2	2	10	100
2.5	600	10	0	0	0	0	0	0
	660	10	0	0	3	0	3	30
	720	10	0	0	1	0	1	10
	780	10	0	0	1	1	2	20
	840	10	0	2	2	0	4	40
	900	10	0	0	0	0	0	0
	960	10	0	1	2	1	4	40
	1020	10	0	4	2	0	6	60
	1080	10	0	3	2	0	5	50

Ⅲ. 感染防御試験—1

*Vibrio anguillarum* PB-115の菌液を筋注し、本細菌に感染したと考える時点で、各種の条件で薬浴し、その結果を表7に示した。

病原菌を注射して無処理のまま流水中に収容した対照区では、注射後短期間に全数が斃死したが、HB-115の10ppm20分、3ppm45分の薬浴で全数が生存し、また1ppm90分、180分、360分の薬浴では、45、82、91%の生存率を示し、HB-115の薬浴効果は明かで、また同濃度で薬浴する場合、薬浴時間を長くすればより効果的

となった。

この結果から、HB-115の薬浴効果は、薬浴時間の相互関係によって決定されるものと考えられる。しかしこの相互関係は接種菌量の差によって、多少変わることが次の実験によって明かにされた。

また本実験の対照区のアユが短期間内に斃死したのは、比較的大量の病原菌を接種したためと思われる。

表7. 薬浴効果と薬浴時間、薬浴濃度との関係

薬浴時間 (分)	薬浴濃度 (ppm)	感 染 後 の 日 数							生存数計	生 存 率 (%)	
		1	2	3	4	5	6	7			
20	10	11*	11	11	11	11	11	11	11	11	100
	3	11	9	8	8	8	8	8	8	8	78
	1	11	1	1	0	0	0	0	0	0	0
	0.3	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.1	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
45	10	11	11	11	11	11	11	11	11	11	100
	3	11	11	11	11	11	11	11	11	11	100
	1	11	9	4	3	2	1	1	1	1	9
	0.3	11	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.1	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0
90	10	11	11	11	11	11	11	11	11	11	100
	3	11	11	11	11	10	10	10	10	10	91
	1	11	8	7	6	5	5	5	5	5	45
	0.3	10	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.1	9	1	1	1	0	0	0	0	0	0
180	10	9	9	9	9	9	9	9	9	9	100
	3	11	11	11	11	11	11	11	11	11	100
	1	10	10	10	10	9	9	9	9	9	82
	0.3	11	4	2	2	2	2	2	2	2	18
	0.1	11	1	1	1	1	0	0	0	0	0
360	10	11	11	11	11	11	11	11	11	11	100
	3	11	11	11	11	11	11	11	11	11	100
	1	11	11	11	10	10	10	10	10	10	91
	0.3	11	8	6	6	6	6	6	6	6	54
	0.1	11	4	2	2	2	2	2	2	2	18
対 照 区		8	0	0	0	0	0	0	0	0	0

\* 生存数

N, 感染防御試験 - 2

培養菌液を3段階に希釈して、病原菌の接種菌量を変え、HB-115の薬浴効果について検討した結果を表8に示す。

病原菌培養原液の $1/10$ の希釈液を接種した対照区では、注射後3日間で全部斃死したが $1/100$ 、 $1/1000$ の希釈液を同量接種したものでは、試験期間中に斃死しないものもあり、また斃死期間が延長する傾向が見られた。これらの試験魚にHB-115、1ppmの濃度で20~180分薬浴したが、 $1/10$ の希釈液を接種し、1ppm、20分の薬浴を行った区では全数斃死したのに対して、 $1/100$ 、 $1/1000$ の希釈液を接種し、同方法で薬浴した区では、それぞれ70%、50%の生存率を示し、接種菌量が少ないと薬浴効果が大きく現われることが明らかになった。

V, 感染防御試験 - 3

薬浴毒性は薬浴水温によって大きく左右されることは、前記実験結果から明かで、これは薬浴水温がアユの薬剤の吸収、排泄等の生理機能に大きく影響するためと考えられる。したがって薬浴水温が変われば、当然薬剤の組織内濃度も変化し、その結果薬浴効果にも差が見られるものと期待されたが、本実験の結果では差が見られなかった(表9)この理由について不明で再度検討する予定である。

表8. 接種菌量の相違によるHD-115の薬浴効果について

培養液 希釈度	薬浴時間 (分)	薬浴濃度 (ppm)	感 染 後 の 日 数							生存数計	生存率 (%)
			1	2	3	4	5	6	7		
原 液 $\times 10^{-1}$	180	1	10*	10	10	9	9	9	9	9	90
	90	1	10	10	8	8	8	7	7	7	70
	45	1	10	9	7	7	7	7	7	7	70
	20	1	10	2	0	0	0	0	0	0	0
	対照		10	1	1	0	0	0	0	0	0
原 液 $10 \times 10^{-2}$	180	1	10	10	10	10	10	10	10	10	100
	90	1	10	10	10	9	8	8	7	7	70
	45	1	10	10	10	10	10	9	9	9	90
	20	1	10	9	8	7	7	7	7	7	70
	対照		10	5	4	2	2	2	2	2	20
原 液 $\times 10^{-3}$	180	1	10	10	10	10	10	10	10	10	100
	90	1	10	10	10	10	10	10	10	10	100
	45	1	10	10	9	7	7	7	7	7	70
	20	1	10	10	7	6	5	5	5	5	50
	対照		10	9	3	3	1	1	1	1	10

\* 生存数



表 9. 薬浴水温差による薬浴効果

水温 (℃)	薬浴時間 (分)	薬浴濃度 (ppm)	感 染 後 の 日 数							生存数計	生存率 (%)
			1	2	3	4	5	6	7		
15	180	1	10*	10	10	9	9	9	9	9	90
	90	1	10	10	8	8	8	7	7	7	70
	45	1	10	9	7	7	7	7	7	7	70
	20	1	10	2	0	0	0	0	0	0	0
	対照		10	1	1	0	0	0	0	0	0
20	180	1	10	10	10	10	10	9	9	9	90
	90	1	10	10	9	9	9	9	9	9	90
	45	1	10	9	5	5	5	5	5	5	50
	20	1	10	2	1	1	1	1	1	1	10
	対照		10	1	1	0	0	0	0	0	0

\* 生存数

表 10. HB-115 の水溶液にアユを薬浴した時の筋肉中の HB-115 濃度

EXP. NO.	薬浴濃度 (ppm)	薬浴温度 (℃)	薬浴時間 (分)	薬浴後の各経過時間における HB-115 の濃度							
				0	0.5	1	2	4	8	24h	
1	30	16	30	3.1*	-**	-	-	-	-	-	-
2	30	21	30	0.88	-	0.46	-	-	0.42	-	-
3	10	21	30	2.6	0.39	0.38	-	-	-	-	-
4	2	18	360	0.56							
5	30	20	30	-	-	-	-	-	-	-	-

\* mcg/g    \*\* 検出感度以下

表 11. HB-115 の水溶液にアユを薬浴した時の血漿中の HB-115 の濃度

EXP. NO.	薬浴濃度 (ppm)	薬浴温度 (℃)	薬浴時間 (分)	薬浴後の各経過時間における HB-115 の濃度							
				0	0.5	1	2	4	8	24h	
1	30	16	30	-	-	-	-	-	-	-	-
2	30	21	30	-	-	-	-	-	-	-	-
3	10	21	30	-	-	-	-	-	-	-	-
4	2	18	360	-							
5	30	20	30	0.22	-	-	-	-	-	-	-

## V. 組織内濃度

測定の結果では、内臓にはHB-115は検出されなかった。筋肉および血漿中にはHB-115が検出され、その濃度は表10および表11に示したように、薬浴直後が最も高く、清水中に長時間放置するに従って減少する傾向が認められた。

しかし、表11に示したように、血漿においては、実験1~4ではHB-115は全く検出されず、実験5では薬浴直後のみ0.22mg/ml検出された。

筋肉において、実験1~4では表皮を含む筋肉を供試したためであって、表皮中のHB-115が検出されたものと考えられる。

以上からアユをHB-115水溶液に薬浴すると、血漿および表皮中でHB-115は検出されるが、筋肉および内臓には、ほとんど検出されないものと推定される。また血漿中のHB-115は薬浴後、流水中にもどすと、比較的すみやかに排泄されるものと考えられる。

## 考察

本実験はアユの細菌性疾病に対して、新ニトロフラン誘導体ニフルブラジン(HB-115)を用いて、薬浴による安全かつ効果的な防御方法を見出す目的で、実際にフィールドで薬剤使用する場合の諸条件を考慮して実験条件を設定し検討した。

薬浴による毒性は薬浴水温に左右され、水温が上昇すると薬浴毒性は約1.5~2倍となった。これは魚の生理代謝は水温により変化するためであろう。また薬浴毒性は水温のほか、薬浴濃度と薬浴時間との相互関係にも大きく影響されるので、実際に薬浴する場合には、上記3要因の相互関係を充分考慮して実施すべきであろう。

また一連の感染防御試験の結果から、HB-115の1ppm、20~60分の薬浴で充分効果が期待されるが、薬浴対象魚の病原菌の保菌数もまちまちであるので、その場その場に応じた薬浴方法で実施すべきであろう。

また稚魚輸送時には、長時間の薬浴も可能であるので、上記薬浴濃度よりもさらに低い濃度でも十分な効果が期待されよう。

またHB-115の薬浴毒性と有効濃度との間には、大きな差があり、安全な薬といえるであろう。

## 要約

種々の条件を考慮して薬浴に関する諸問題について、新ニトロフラン誘導体ニフルブラジン(HB-115)を用いて検討し、下記のことになった。

1. 薬浴毒性は水温に左右され、水温が上昇すれば、薬浴毒性は1.5~2倍となり、また薬浴時間と薬浴濃度の相互関係によっても影響される。
2. 薬浴効果は薬浴濃度と薬浴時間の相互関係によって決定される。
3. 病原菌の接種量を少なくすれば、斃死数の減少や斃死に至る期間が延長されるが、薬浴効果についても接種菌量が少ないと、その効果も顕著に現われる。
4. 薬浴水温と薬浴効果の関係は、はっきりとしなかった。
5. 一連の感染防御試験より、HB-115、1ppm、20~60分で十分な効果が期待でき

るが、その場その場に応じた、薬浴方法で実施すべきであろう。

6. 薬浴によるHB-115の組織内濃度は、筋肉および内臓に検出されず、血漿や表皮中に検出されまた流水中にもどすとすみやかに排泄される。

#### 文献

- 1) 白木建二 宮本文雄 佐藤紀久 曾根崎巖 矢野邦一郎 (1970): 魚類感染症に対する新化学療法剤 Nifurprazine (HB-115) の研究-I 魚病研究 4 (2) 130~137
- 2) 白木建二 田中二良 (1970): ハマチ幼魚輸送試験 魚病研究 5 (1) 45~47
- 3) 大上皓久 (1969): 海産稚アユのヒブリオ病に対するスルファモノメトキシン薬浴の効果. 魚病研究 2 (1) 59~67
- 4) 高瀬善行 清水当尚 (1968) 魚類感染症に対する化学療法剤の研究-抗菌性化合物P-7138 魚病研究 2 (1) 59~67
- 5) 田中二良 白木建二 (1970) ハマチに対する新ニトロフラン誘導体 Niturprazine (HB-115) の研究 4 (2) 138~145
- 6) 室賀清邦 江草周三 (1968) 魚の細菌性感染症治療法としての Cklorotetra Cgcline 薬浴について-魚病研究 2 (2) 141~147

#### Studies on a New Nitrofurane Derivative Nifurprazine (HB-115)

in Ayu Fish, *Plecoglossus altivelis*

Shozo FUSHIKI

The toxicity, therapeutic effect and distribution of 1-(5-nitro-2-furyl)-2-(6-amino-3-pyridazyl)-ethylene hydrochloride (nifurprazine hydrochloride, HB-115 HCl) were investigated in ayu, a salmonoid fish. The results were as follows.

1. Ayu fry were immersed in the water containing various concentrations of HB-115 HCl at various temperatures (11-26 °C) for 6hrs., and then transferred into clean water. Mortalities were checked 3days later. Minimum lethal concentrations were 1.6, 4.1, 6.0, 6.0 ppm at 26, 22, 16, 11 °C, respectively.
2. When immersing periods were prolonged 1.5 times, toxicities were enhanced approximately 2 times.
3. Cumulative effects of HB-115 HCl on the infection caused by intramuscular injection of *Vibrio anguillarum* in ayu fish were diminished by increasing the inoculum size.
4. Good therapeutic effects by bathing were achieved by the suitable combination of concentration and immersing period (e. g. 10ppm-20mins., 3ppm-45mins., 1ppm-360mins.).
5. Effects of water temperatures on the therapeutic effects of HB-115 were not noticed.
6. When ayu fishes were immersed in the water containing 2-30ppm of HB-115 HCl was detected in serum and skin, but not in muscle and viscera.