

動物用医薬品・飼料添加物評価書

ナラシン

2013年 1月

食品安全委員会

目次

	頁
○ 審議の経緯	4
○ 食品安全委員会委員名簿	4
○ 食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会専門委員名簿	5
○ 要約	6
I. 評価対象動物用医薬品及び飼料添加物の概要	7
1. 用途	7
2. 有効成分の一般名	7
3. 化学名	7
4. 分子式	7
5. 分子量	7
6. 構造式	7
7. 使用目的及び使用状況	8
II. 安全性に係る知見の概要	8
1. 薬物動態試験	8
(1) 薬物動態試験 (ラット)	8
(2) 薬物動態試験 (鶏)	9
(3) 薬物動態試験 (牛)	12
(4) 薬物動態試験 (豚)	13
(5) 薬物代謝比較試験 (ラット及び鶏)	14
(6) 薬物代謝比較試験 (ラット、イヌ及び牛)	15
(7) 代謝物の生物活性	15
2. 残留試験	15
(1) 残留試験 (鶏・5日間投与①)	15
(2) 残留試験 (鶏・5日間投与②)	15
(3) 残留試験 (鶏・5日間投与③)	16
(4) 残留試験 (鶏・5日間投与④)	16
(5) 残留試験 (鶏・5日間投与⑤)	16
(6) 残留試験 (鶏・21日間投与)	17
(7) 残留試験 (鶏・42日間投与①)	17
(8) 残留試験 (鶏・42日間投与②)	17
(9) 残留試験 (鶏・42日間投与③)	18
(10) 残留試験 (鶏・45日間投与)	18
(11) 残留試験 (鶏卵)	18
(12) 残留試験 (牛・5日間投与)	19
(13) 残留試験 (牛・140日間投与)	19
(14) 残留試験 (豚・5日間投与)	19

(15) 残留試験 (豚・14日間投与)	19
3. 遺伝毒性試験	19
4. 急性毒性試験	20
(1) 急性毒性試験 (マウス、ラット、ウサギ、鶏、うずら、豚及び馬)	20
(2) 急性毒性試験 (マウス及びラット)	22
5. 亜急性毒性試験	22
(1) 3か月間亜急性毒性試験 (マウス①)	22
(2) 3か月間亜急性毒性試験 (マウス②)	23
(3) 3か月間亜急性毒性試験 (マウス③)	23
(4) 3か月間亜急性毒性試験 (ラット①)	24
(5) 3か月間亜急性毒性試験 (ラット②)	24
(6) 3か月間亜急性毒性試験 (イヌ①)	25
(7) 3か月間亜急性毒性試験 (イヌ②)	26
(8) 6か月間亜急性毒性試験 (イヌ)	26
6. 対象動物等を用いた安全性試験	27
(1) 安全性試験 (鶏①)	27
(2) 安全性試験 (鶏②)	28
(3) 安全性試験 (鶏③)	28
(4) 安全性試験 (牛)	29
(5) 安全性試験 (豚①) (参考データ)	29
(6) 安全性試験 (豚②) (参考データ)	30
7. 慢性毒性試験	30
(1) 1年間慢性毒性試験 (ラット)	30
(2) 1年間慢性毒性試験 (イヌ)	31
8. 慢性毒性/発がん性併合試験	32
(1) 2年間慢性毒性/発がん性併合試験 (マウス)	32
(2) 2年間慢性毒性/発がん性併合試験 (ラット)	33
9. 生殖発生毒性試験	34
(1) 3世代生殖試験 (ラット)	34
(2) 発生毒性試験 (ラット)	34
(3) 発生毒性試験 (ウサギ)	34
10. その他の試験	35
(1) 皮膚刺激性試験 (ウサギ)	35
(2) 眼刺激性試験 (ウサギ)	35
(3) 皮膚感作性試験 (モルモット)	36
11. 一般薬理試験	36
12. 微生物学的影響に関する試験	37
(1) 臨床分離菌に対するMIC①	37
(2) 臨床分離菌に対するMIC②	38
(3) 糞便結合試験 (ヒト)	39

(4) 代謝物の微生物学的活性	40
(5) サルモネラ排菌に対する影響 (鶏)	40
13. ヒトにおける知見	40
III. 食品健康影響評価	41
1. 国際機関における評価	41
(1) JECFA における評価	41
(2) EFSA における評価	41
2. 毒性学的 ADI について	42
3. 微生物学的影響について	42
4. ADI の設定について	43
・ JECFA 及び EFSA における NOAEL 等の比較	44
・ 別紙 検査値等略称	46
・ 参照	48

〈審議の経緯〉

- 2005年 11月 29日 暫定基準告示（参照1）
2007年 3月 6日 厚生労働大臣より残留基準設定に係る食品健康影響評価について要請（厚生労働省発食安第0305026号）、関係資料接受
2007年 3月 8日 第181回食品安全委員会（要請事項説明）
2011年 8月 31日 第48回肥料・飼料等専門調査会
2012年 10月 15日 第449回食品安全委員会（報告）
2012年 10月 16日から11月14日まで 国民からの御意見・情報の募集
2012年 12月 20日 肥料・飼料等専門調査会座長から食品安全委員会委員長へ報告
2013年 1月 7日 第459回食品安全委員会（報告）
同日付で食品安全委員会委員長から厚生労働大臣に通知

〈食品安全委員会委員名簿〉

(2009年6月30日まで)

見上 彪 (委員長)
小泉 直子 (委員長代理*)
長尾 拓
野村 一正
畑江 敬子
廣瀬 雅雄**
本間 清一

* : 2007年2月1日から

** : 2007年4月1日から

(2011年1月6日まで)

小泉 直子 (委員長)
見上 彪 (委員長代理*)
長尾 拓
野村 一正
畑江 敬子
廣瀬 雅雄
村田 容常

* : 2009年7月9日から

(2012年6月30日まで)

小泉 直子 (委員長)
熊谷 進 (委員長代理*)
長尾 拓
野村 一正
畑江 敬子
廣瀬 雅雄
村田 容常

* : 2011年1月13日から

(2012年7月1日から)

熊谷 進 (委員長)
佐藤 洋 (委員長代理)
山添 康 (委員長代理)
三森 国敏 (委員長代理)
石井 克枝
上安平 浏子
村田 容常

〈食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会専門委員名簿〉

(2011年9月30日まで)

唐木 英明 (座長)
酒井 健夫 (座長代理)
青木 宙 高橋 和彦
秋葉 征夫 舘田 一博
池 康嘉 津田 修治
今井 俊夫 戸塚 恭一
江馬 眞 細川 正清
桑形 麻樹子 宮島 敦子
下位 香代子 元井 葭子
高木 篤也 吉田 敏則

(2011年10月1日から)

唐木 英明 (座長*)
津田 修治 (座長代理*)
青木 宙 舘田 一博
秋葉 征夫 戸塚 恭一
池 康嘉 細川 正清
今井 俊夫 宮島 敦子
江馬 眞 山中 典子
桑形 麻樹子 吉田 敏則
下位 香代子
高橋 和彦

*:2011年11月2日から

要 約

ポリエーテル系のイオノフォア抗生物質である「ナラシン (CAS No. 55134-13-9)」について、JECFA 及び EFSA 評価書、飼料添加物指定時資料等を用いて食品健康影響評価を実施した。

評価に用いた試験成績は、薬物動態試験 (ラット、鶏、牛及び豚)、残留試験 (鶏、牛及び豚)、遺伝毒性試験、急性毒性試験 (マウス、ラット、ウサギ、鶏、うずら、豚及び馬)、亜急性毒性試験 (マウス、ラット及びイヌ)、慢性毒性試験 (ラット及びイヌ)、慢性毒性/発がん性併合試験 (マウス及びラット)、生殖発生毒性試験 (ラット及びウサギ)、微生物学的影響に関する試験等の成績である。

各種遺伝毒性試験においていずれも陰性の結果が得られており、マウス及びラットを用いた慢性毒性/発がん性併合試験において発がん性が認められていないことから、ナラシンは遺伝毒性発がん物質ではないと考えられ、一日摂取許容量 (ADI) を設定することが可能であると考えた。

各種毒性試験で得られた無毒性量 (NOAEL) のうち最小値は、イヌの1年間慢性毒性試験における 0.5 mg (力価)/kg 体重/日であった。したがって、この NOAEL に安全係数 100 (種差 10 及び個体差 10) を適用し、毒性学的 ADI を 0.005 mg/kg 体重/日と設定した。

微生物学的試験においては、ナラシンは正常な腸内細菌叢に影響を及ぼさないと考えられ、また、MIC、糞便結合作用及び *in vivo* 定着障壁試験により、ナラシン残留物はヒト消化管の定着障壁を崩壊させないと考えられた。

これらのことから、微生物学的 ADI を設定する必要はないと考え、ナラシンの ADI として、毒性学的 ADI を採用することが適当と判断し、0.005 mg/kg 体重/日と設定した。

I. 評価対象動物用医薬品及び飼料添加物の概要

1. 用途

抗菌剤

2. 有効成分の一般名

和名：ナラシン

英名：Narasin

3. 化学名

(ナラシン A)

IUPAC

英名： α -Ethyl-6-[5-[2-(5-ethyltetrahydro-5-hydroxy-6-methyl-2H-pyran-2-yl)-15-hydroxy-2,10,12-trimethyl-1,6,8-trioxadispiro [4.1.5.3]pentadec-13-en-9-yl]-2-hydroxy-1,3-dimethyl-4-oxoheptyl]tetrahydro-3,5-dimethyl-2H-pyran-2-acetic acid

CAS (No. 55134-13-9)

(参照 2)

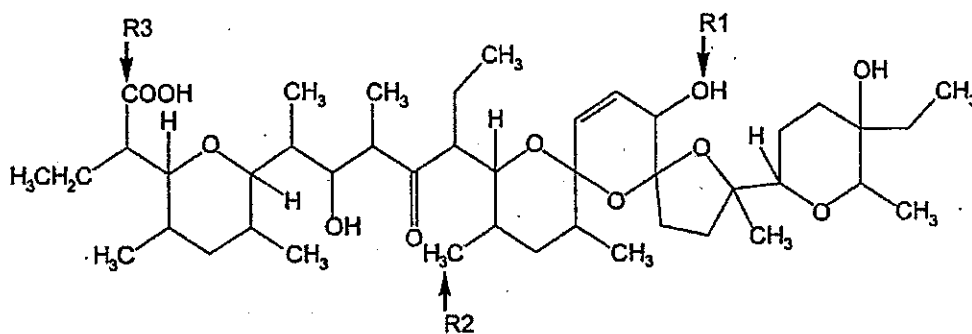
4. 分子式

$C_{43}H_{72}O_{11}$

5. 分子量

765.03

6. 構造式



Structural variants of narasin	R1	R2	R3
A	OH	CH ₃	COOH
B	=O	CH ₃	COOH
D	OH	C ₂ H ₅	COOH
I	OH	CH ₃	COOCH ₃

(参照 3)

7. 使用目的及び使用状況

ナラシンは、*Streptomyces aureofaciens* NRRL 8092 株が産生するポリエーテル系のイオノフォア¹抗生物質で、脂溶性複合物を形成し細胞膜の通過を容易にする。ナラシンは、ナラシン A (96%)、ナラシン B (1%)、ナラシン D (2%) 及びナラシン I (1%) で構成され、ナラシン A が主要な活性を有する (85%)。ナラシンは肉用鶏のコクシジウム感染のスポロゾイト及び無性生殖期 (前期及び後期) に有効である。ナラシンの抗菌スペクトルは限定的で、主に *Enterococcus* spp.、*Staphylococcus* spp. 及び *Clostridium perfringens* を含むグラム陽性菌に対して活性を有する。

海外では、鶏のコクシジウム症の予防を目的として、飼料に添加して使用されており、肉用鶏の壊死性腸炎予防にも用いられる。牛では成長促進剤として使用される。

日本では、動物用医薬品としては承認されておらず、鶏を対象とした飼料添加物が指定されている。

ヒト用医薬品としては使用されていない。(参照 3、4)

なお、ポジティブリスト制度導入に伴う残留基準値²が設定されている。(参照 1)

II. 安全性に係る知見の概要

本評価書では、JECFA 及び EFSA 評価書、飼料添加物の指定時試験成績の抄録等をもとに、ナラシンの毒性に関する主な知見を整理した。(参照 3~7)

検査値等略称は別紙に記載した。

1. 薬物動態試験

(1) 薬物動態試験 (ラット)

胆管カニューレを挿入したラット (系統、動物数等不明) に ¹⁴C 標識ナラシンを単回経口投与 (投与量不明) した。投与量の 35% が胆汁中から、6% が尿中から回収された。この結果から少なくとも投与量の 40% が吸収されたと考えられた。(参照 3)

ラット (Fischer 344 系、雌雄各 10 匹) に菌糸体ナラシン (mycelial narasin) を 5 日間経口投与 (5 mg/kg 体重/日) した。尿及び糞を毎日雌雄別に採取し、最終投与後の雌雄の糞を混合し、抽出が行われた。抽出物中のナラシンの代謝物を HPLC/ISP-MS を用いて同定した。

糞中には、3-水酸化ナラシンの少なくとも 4 種類の構造異性体が存在することがピーク保持時間の違いから示された。少なくともいくつかの 2-水酸化ナラシンを含む四つのピークが同定された。他の四つのピークは 3-水酸化ナラシン B を、また四つのピークは 2-水酸化ナラシン B を有することが確認された。1-水酸化ナラシン又は 1-水酸化ナラシン B を有するピークもあった。本試験では、HPLC/ISP-MS により水酸化の正確な位置

¹ イオン透過担体：特定のイオンの細胞膜透過性を増加させる。

² 平成 17 年厚生労働省告示第 499 号によって定められた残留基準値

は確認されなかったが、鶏の過去の試験からナラシンの水酸化は環上で生じていることが示された。これらの試験から鶏とラットは共通の代謝経路（酸化/水酸化）を有していることが示唆され、鶏でみられた水酸化代謝物がラットを用いたナラシンの毒性試験で認められたことにより確認された。（参照 3）

ラット（系統不明、雌雄）にナラシンを 5 日間強制経口投与（5 mg/kg 体重/日）した。糞中代謝物が調べられ、ナラシンの水酸化代謝物及びナラシン B の水酸化代謝物が同定された。正確な水酸化の位置は確認されなかったが、4 種類の異性体（2-水酸化ナラシン A/B 及び 3-水酸化ナラシン A/B）の存在が確認された。（参照 5）

成熟ラット（系統不明、1 匹）に ^{14}C 標識ナラシンを単回強制経口投与（2.3 mg/匹）した結果、投与後 52 時間に総投与放射活性の約 75 %が尿及び糞から回収された。尿中には、排泄された放射活性のわずか 1.1 %しかみられず、残り（98.9 %）は糞中にみられた。（参照 3）

胆管カニユーレを挿入した幼若ラット（系統不明、3 匹）に ^{14}C 標識ナラシンを単回強制経口投与（2.3 mg/匹）した結果、総投与放射活性の約 16 %が投与後 24 時間に胆汁中に排泄された。（参照 3）

ラット（Wistar 系、2 匹）に ^{14}C 標識ナラシンを投与（3.1 mg/匹、投与経路不明）した呼吸試験では、回収された $^{14}\text{CO}_2$ は投与量の 0.2 %未満であった。（参照 3）

（2）薬物動態試験（鶏）

鶏（肉用鶏、4 週齢、30 羽）にナラシンを 2 日間強制経口投与（10 mg（力価）/kg 体重を 1 日 2 回投与）し、血漿中濃度の推移、糞中排泄及び体内分布が TLC-バイオオートグラフで検討された。

血漿中濃度は緩やかに上昇し、投与 3 時間後に C_{\max} （0.25 mg（力価）/L）に達した後、速やかに減衰し、投与 12 時間後には検出限界（0.025 mg（力価）/kg）以下となった。AUC は 0.62 mg（力価） \cdot h/L であった。

最終投与 3 時間後の主要組織への分布を検討した結果、組織中濃度は脂肪が平均 1.189 mg（力価）/kg と最も高く、次いで小腸、皮膚、筋胃、肝臓、膵臓、血漿、腎臓、肺、心臓、脾臓、胆汁の順で、筋肉は検出限界以下であった。

糞中濃度は、全例が投与 24～48 時間後に最高値を示した。投与後 120 時間の糞中総排泄率は投与量の平均 3.2 %であった。（参照 6）

鶏（肉用鶏、雌雄各 3 羽）に ^{14}C 標識ナラシンを 4 又は 6 日間混餌投与（100 ppm）し、最終投与 6 時間後（実質上の休薬 0 日）以降の一定時間間隔の各時点で組織中濃度が調べられた。腎臓、肝臓、皮膚、脂肪及び筋肉は LSC により総放射活性を測定し、脂肪中のナラシンはバイオアッセイにより調べた。

投与開始4日後に組織中濃度が定常状態となった。ナラシンに相当する総放射活性は、肝臓、脂肪、皮膚、腎臓及び筋肉の順で高く、それぞれ0.50、0.27、0.16、0.13及び0.01 mg/kgであった。残留濃度に明らかな性差はなかった。脂肪中の総放射活性の約半分がナラシンであった。(参照3)

鶏(合計25羽)を用いて表1のとおり¹⁴C標識ナラシンの経口又は混餌投与試験が計4試験実施され、最終投与後の組織中放射活性について検討された。

いずれの試験においても、組織中放射活性は肝臓、脂肪、皮膚、腎臓、筋肉の順に高かった。組織中放射活性は速やかに消失し、残留濃度に性差はみられなかった。胆汁が¹⁴Cの排泄経路と考えられた。

表1 鶏における¹⁴C標識ナラシンの組織中残留消失試験

試験	投与方法	投与量	投与期間
試験1	経口 (カプセル投与)	80 ppm 相当量	2又は2.5日間
試験2		80 ppm 相当量	2又は2.5日間
試験3		100 ppm 相当量	2.5又は5日間
試験4	混餌	100 ppm	5日間

試験1及び2では、組織中放射活性は最終投与4時間後で肝臓:0.50 mg/kg以下、脂肪:0.22 mg/kg以下及び腎臓:0.11 mg/kg以下で、最終投与1日後には肝臓及び脂肪で約0.1 mg/kg以下、腎臓は検出限界以下であった。筋肉はいずれの時点においても検出限界以下であった。

試験3で投与期間による組織残留性の違いを検討した結果、両投与期間の残留濃度に有意差は認められなかったが、5日間投与群の平均値の方が高かった。

試験4では、組織中平均放射活性は、最終投与0日後で腎臓から0.159 mg/kg、脂肪から0.488 mg/kg及び肝臓から0.743 mg/kg検出され、筋肉からは検出されなかった。最終投与2日後の組織中残留は大幅に減少した。組織中平均ナラシン放射活性は、最終投与0日後で肝臓:0.037 mg/kg、脂肪:0.235 mg/kgで、それぞれ総放射活性の約5及び50%であった。(参照6)

代謝試験で、ナラシン及びナラシンBの水酸化代謝物が鶏の排泄物中に検出された。これらの代謝物の大部分はナラシン及びナラシンBの2又は3-水酸化物であった。

LC-MSにより、鶏排泄物中に15種類の水酸化代謝物が検出された。肝臓のクロマトグラフの分布及び相対的放射活性は排泄物と同様であり、肝臓中代謝物は排泄物中代謝物と同様であることを示している。最終投与0日の結合型残留物は肝臓中残留物のほぼ1/3であった。脂肪では、放射活性は主に未変化体にみられ、結合型残留物は総残留物の12%未満であった。皮膚/脂肪、筋肉及び腎臓中残留物は低濃度のため代謝物の同定ができなかった。(参照3)

鶏（性別及び羽数不明）に ^{14}C 標識ナラシンを 5 日間混餌投与（100 ppm）し、排泄物中のナラシン代謝物を分離及び同定した。

未変化体が排泄物中全放射活性の約 30 % を占め、主要成分であった。別の 25 % に 7 種類の代謝物が含まれることが、質量分析により確認された。4 種類の代謝物は 2-水酸化ナラシンで、2 種類が 3-水酸化ナラシンの異性体であり、この水酸化が主要代謝経路であった。数多くの残りの代謝物に放射活性があったが、それぞれ全体の 10 % 未満であった。（参照 5）

鶏に ^{14}C 標識ナラシンを 5 日間混餌投与（80 ppm）し、最終投与当日に排泄物中のナラシン及びその代謝物の分析が実施された。

未変化体は全放射活性の 5 % を占め、6 種類の代謝物が同定された。2 種類が既知の 3-水酸化ナラシンで総放射活性の約 14 % を占めた。4 種類が 2-水酸化ナラシンで 14 % を占めた。その他微量（10 % 以下）の代謝物が分離されたが同定されなかった。（参照 5）

鶏に ^{14}C 標識ナラシンを 5 日間混餌投与（50 ppm）し、最終投与 0 日に排泄物の分析が実施された。

未変化体は排泄された総放射活性の 3 % を占めた。15 種類の代謝物中では、ナラシン A 及び B の 2 及び 3-水酸化物並びに 4-水酸化ナラシン A が主要成分であり、総放射活性の約 50 % であった。残りは多くの微量成分で、同定されなかった。組織では、肝臓中放射活性が最高濃度を示し、75 % まで抽出可能であった。しかしながら、ナラシン代謝物は精製後少量しか得られなかったために同定できなかった。脂肪中の放射活性が分析され、大部分が未変化体（61 %）であった。（参照 5）

成鶏（雌雄各 10 羽）に ^{14}C 標識ナラシンを 5 日間混餌投与（71 ppm）し、最終投与 6 時間後に肝臓及び排泄物について分析された。

肝臓及び排泄物から総放射活性のそれぞれ 49 及び 96 % に当たるナラシン及びその代謝物が抽出され、LC-MS により分離同定された。その結果、肝臓及び排泄物から 1 種類の 2-水酸化ナラシン及び 2 種類の 3-水酸化ナラシンが確認された。ナラシンは、排泄物中総放射活性の 1 % 未満であったが、3 種類の 9-ケト 3-水酸化ナラシンが主要代謝物であった（総計 49 % で、最大のものは 34 %）。（参照 5）

^{14}C 標識ナラシン（100 ppm）が混餌投与された鶏の糞から 6 種類の標識ナラシン代謝物がそれぞれ分離された。糞から代謝物を溶媒抽出し、各種クロマトグラフで精製後、質量分析によって代謝物を同定した。代謝物は分子環の種々の位置が水酸基と置換したもので、鶏における主な代謝機序はナラシンの水酸化であることが確認された（表 2）。6 種類の代謝物について、ナラシンとの相対的抗菌活性を検討したが、活性はナラシンの 1/20 で、実質的に不活性と判断された。（参照 6）

表 2 鶏におけるナラシンの代謝物

代謝物	TLC-Rf 値	分子量	構造
NM-1	0.26	818	2-水酸化ナラシン A, E 環の水酸化
NM-2	0.42	834	3-水酸化ナラシン A, B, E 環の水酸化
NM-3	0.50	818	2-水酸化ナラシン A, B 環の水酸化
NM-4	0.30	818	2-水酸化ナラシン A, E 環の水酸化
NM-5 ¹⁾	~0.30		
NM-6	0.76	818	2-水酸化ナラシン B, E 環の水酸化
NM-7	~0.27	834	3-水酸化ナラシン A, B, E 環の水酸化

1) NM5 は分析必要量が得られず、未解析。

鶏（肉用鶏、羽数不明）に ¹⁴C 標識ナラシンを混餌投与（100 ppm）した。

排泄物中に 3 種類の代謝物（NM-1、NM-2 及び NM-3）が存在し、放射活性の 14 % を占めた。肝臓中には多数の標識代謝物がみられ、その中で未変化体が最も多く存在し、総放射活性の約 8.8 % に相当した。（参照 3）

鶏（肉用鶏、8 週齢）に ¹⁴C 標識ナラシンを 7 日間混餌投与（80 ppm）し、投与 4～7 日後の糞中未変化体量、¹⁴C 標識ナラシンに対する相対比及び主要標識代謝物割合が調べられた。

糞中の総放射活性は ¹⁴C 標識ナラシン当量で 237 ppm、未変化体は 11.8 ppm で、糞中放射活性の 5.0 % に相当した。ナラシンの代謝物として、NM-1+NM-7（2.9 %）、NM-2（11.3 %）、NM-3（5.3 %）、NM-4+NM-5（4.6 %）及び NM-6（1.7 %）が存在した。これら以外の非ナラシン放射活性は多くの少量代謝物から構成され、含有割合はいずれも小さかった。¹⁴C 標識ナラシンの約 95 % は代謝された。（参照 6）

鶏（肉用鶏、8 週齢、4 羽）にナラシンを混餌投与（80 ppm）した後 ¹⁴C 標識ナラシンを単回経口投与（総投与量は平均ナラシン摂取量相当）した。回収された放射活性の 85 % 以上が投与 2 日以内に排泄された。3/4 例で総回収率が 90～114 %、平均 99 % であった。1/4 例では糞中の回収率が不完全であったことから、回収率は低かった（66 %）。（参照 3）

(3) 薬物動態試験（牛）

牛（去勢雄 2 頭及び未経産雌 1 頭/群）に ¹⁴C 標識ナラシンを 3、5 又は 7 日間経口投与（飼料中 20 ppm 相当量、ゼラチンカプセル投与）し、各最終投与約 12 時間後（実質上の休薬 0 日）の組織中濃度が測定された。

最高放射活性（ナラシン相当量）は肝臓でみられた。投与 7 日後、肝臓中の未変化体は総放射活性の 6.5～12 % であった。（参照 3）

肥育牛（ヘレフォード種、去勢雄 2 頭及び未経産雌 1 頭/群）に ¹⁴C 標識ナラシンを 3、5 又は 7 日間経口投与（飼料中約 20 ppm 相当量/頭/日（最高推奨用量の 1.5 倍の総 1 日投与量）、ゼラチンカプセルを用いて 1 日 2 回投与）した。各最終投与 12 時間後（休薬

0日)に、被験動物の筋肉、腎臓、肝臓及び背部脂肪について放射活性を測定した。7日間投与群の全動物の肝臓中ナラシンをTLC-バイオオートグラフで調べた。

組織中放射活性は投与3日以内に定常状態に達した。肝臓中に最大の総放射活性(ナラシン相当量)がみられ、投与3、5及び7日後では、それぞれ0.918、0.739及び0.839 mg/kgであった。未変化体は肝臓中総放射活性の約6.5~12%を占めたが、他の組織中には痕跡程度がみられた。投与3、5及び7日後の組織中平均残留は、平均値の一元配置の分散分析(ANOVA)により統計学的な差はなかった。去勢雄及び未経産雌のナラシンの代謝は全投与期間にわたり質的に同様であった。(参照3)

牛(ヘレフォード種、未経産雌2頭)に代謝ケージ内で¹⁴C標識ナラシンをゼラチンカプセルで単回ボラス投与(79.2 mg/頭/日)した。24時間毎に尿及び糞を採取し、放射活性を分析した。

総糞中放射活性の98.0%が投与後4日以内に排泄された。尿中からは投与された放射活性の0.5%未満が回収された。¹⁴C標識ナラシンの総放射活性回収率は、2頭それぞれ93.4及び80.1%であった。牛では、¹⁴C標識ナラシンは迅速に排泄され、ほとんど糞中に排泄されると考えられた。(参照3)

(4) 薬物動態試験(豚)

豚(交雑種、雌雄各2頭/群/時点)に¹⁴C標識ナラシンを7日間混餌投与(30及び45 ppm)し、30 ppm投与群では最終投与0及び3日後、45 ppm投与群では最終投与0日後に可食組織(肝臓、腎臓、筋肉、脂肪及び皮膚)について総放射活性の分析が行われた。

全投与群で肝臓中濃度が最大であった。45 ppm投与群では、最終投与0日後の平均肝臓中濃度は1.48 mg/kgであった。30 ppm投与群では、最終投与0日後で平均肝臓中濃度は0.75 mg/kgであり、最終投与3日後では0.17 mg/kgに低下した。肝臓からメタノールで抽出される放射活性は、30及び45 ppm投与群の最終投与0日後でそれぞれ56及び59%(いずれもn=2)であった。この結果は最終投与0日後の抽出される残留物の割合に濃度依存的な差がないことを示している。30 ppm投与群では、最終投与3日後における抽出されなかった肝臓中の放射活性は最終投与0日後の22%であった。

(参照3)

豚(4頭/群)に、¹⁴C標識ナラシンを7日間混餌投与(30及び45 ppm)した。30 ppm投与群では最終投与0(第1群)及び3日後(第2群)、45 ppm投与群では最終投与0日後(第3群)に肝臓、腎臓、筋肉、脂肪、皮膚及び胆汁の総放射活性をLSCにより測定した。試験期間中、尿及び糞は毎日採取された。

肝臓、胆汁及び糞中の代謝物は酸化及び水酸化代謝物であることが判明した。肝臓中で最も多い代謝物は、2-水酸化ナラシンB代謝物(N-4)であり、第1及び第3群の糞中でも最も多い代謝物の一つであった。3-水酸化ナラシン代謝物(N-1)は第3群の糞中並びに第1及び第3群の肝臓中에서도検出され、3-水酸化ナラシンBと共に溶出された。もう一つの3-水酸化ナラシン代謝物(N-2)は、第1及び第3群の糞中から検出された

が、肝臓中にはみられなかった。3-水酸化ナラシン B 代謝物 (N-3) は、第 1 及び第 3 群の糞と肝臓中から検出されたが、他のピークと共に溶出された。2-水酸化ナラシン B 代謝物 (N-5) は第 1 及び第 3 群の肝臓及び糞中にみられた。2-水酸化ナラシン (N-6) は第 1 及び第 3 群の糞中からは検出されたが肝臓中にはみられなかった。もう一つの 2-水酸化ナラシン代謝物 (N-7) が第 1 及び第 3 群の肝臓及び糞中において検出された。胆汁中にも、肝臓及び糞中と同様の代謝物がみられたが、保持時間が異なり厳密には一致しなかった (表 3)。(参照 3)

表 3 肝臓及び糞中のナラシンの代謝物の分布状況

群 (投与量、時点)	肝臓	糞
第 1 群 (30 mg/kg 体重、最終投与 0 日後)	N-1、N-3、N-4、N-5、N-7	N-2、N-3、N-4、N-5、N-6、N-7
第 2 群 (30 mg/kg 体重、最終投与 3 日後)	記載なし	記載なし
第 3 群 (45 mg/kg 体重、最終投与 0 日後)	N-1、N-3、N-4、N-5、N-7	N-1、N-2、N-3、N-4、N-5、N-6、N-7

豚 (交雑種、雌雄各 2 頭/群/時点) に ^{14}C 標識ナラシンを 7 日間混餌投与 (30 及び 45 ppm) し、30 ppm 投与群では最終投与 0 日後、45 ppm 投与群では最終投与 0 及び 3 日後の排泄物中放射活性について検討した。糞中からは総放射活性の大部分 (95~97%) が回収されたが、尿中からは少量 (3~5%) であり、豚における主要排泄経路は糞中であると考えられた。(参照 3)

(5) 薬物代謝比較試験 (ラット及び鶏)

^{14}C 標識ナラシンが投与されたラット (Wistar 系、4 匹、経口投与 : 約 10 mg/kg 体重) 及び鶏 (肉用鶏、4 羽、混餌投与 : 80 ppm) の糞中代謝物を比較した。

その結果、2 動物種間で質的には同様であったが量的にはいくらかの違いがみられた。最も多量にみられた代謝物は NM-1、NM-2 及び NM-3 の 3 種類であった。ラット糞中ではこれらの代謝物は糞中総放射活性のそれぞれ約 4、19 及び 10% であった。鶏の排泄物中では、それぞれ 7、4 及び 3% であった。鶏排泄物から分離された NM-3 は、質量分析により暫定的に 2-水酸化ナラシンのナトリウム塩と同定された。鶏及びラットの排泄物中には、他に相対量が 3% を超える代謝物はなかった。

^{14}C 標識ナラシンを混餌投与された鶏 (4 羽) の肝臓中に多くの標識代謝物が存在していたが、肝臓中総放射活性の 5% を超えるものはなかった。量的に最も多い化合物は ^{14}C 標識未変化体であり、総放射活性の約 8.8% であった。肝臓中代謝物は鶏及びラットの排泄物中のそれと質的には同様であった。TLC を用いて排泄物中の代謝物と比較することにより NM-1、NM-2 及び NM-3 が同定された。(参照 3)

(6) 薬物代謝比較試験 (ラット、イヌ及び牛)

牛、イヌ及びラットに¹⁴C 標識ナラシンを7日間経口投与し、代謝物を比較した。肝臓及び糞から抽出された放射活性残留物を溶媒分配、シリカゲルクロマトグラフ及びTLCにより分画した。

3動物種ともに複数の代謝物が存在し、糞抽出物は20種類以上の放射活性代謝物を含有していたが、いずれも主要な代謝物ではなかった。

カラム溶出プロファイルとTLCオートラジオグラフの比較から代謝物パターンはラット、イヌ及び牛の間で質的には同様であるが量的な違いがみられた。ラット及び鶏ですでに同定された8種類の2又は3-水酸化ナラシン代謝物に加え、牛の糞及び肝臓からはさらに2種類の代謝物が分離された。これらはNM-12及びNM-13であり、それぞれ1及び2-水酸化代謝物と同定された。両代謝物はともにラット及びイヌで存在しており、牛では最も一般的な代謝物であった。牛肝臓中の放射活性の定量分画によりNM-12が最も多く(約16%)、NM-3及びNM-6はともに2-水酸化誘導体で総量の約4%を占めることが判明した。肝臓中放射活性の残量は微量の数種類の代謝物で構成され、約10%の非抽出性放射活性と10~15%の極性残留物であった。肝臓中残留のごく少量(3%未満)が未変化体であった。

本比較試験結果から、ラット、イヌ及び牛ではナラシンの経口投与により同じ代謝物が生じると考えられた。(参照3)

(7) 代謝物の生物活性

ラット肝ミトコンドリアにおいて、バリノマイシン、モナゾマイシン及びアルカリ性金属カチオン添加により誘導されたATPase又はATPの加水分解がナラシンにより減弱したという知見に続き、ナラシン代謝物のラット肝ミトコンドリアにおけるATPaseと酸素吸収についての作用が明らかにされた。より最近の試験において、代謝物F(2-水酸化ナラシン)、NM-3、NM-2並びにNM-6及びNM-3の混合物という4種類の代謝物が検出された。4種類のナラシン代謝物はラット肝ミトコンドリアにおいてリンゴ酸及びグルタミン酸の酸化におけるATPase活性及び酸素吸収率に対し比較的弱い作用を示した。4種類の代謝物は、ナラシンの1/215以下のイオノフォア作用を示した。(参照3)

2. 残留試験

(1) 残留試験 (鶏・5日間投与①)

鶏(雌雄各10羽/時点)に¹⁴C 標識ナラシンを5日間混餌投与(71 ppm)し、最終投与6時間後の組織中残留を調べた。

その結果、組織中平均残留はナラシンとして、肝臓、腎臓、筋肉及び皮膚/脂肪でそれぞれ0.272、0.068、0.015(定量限界)未満及び0.082 mg/kgであった。(参照5)

(2) 残留試験 (鶏・5日間投与②)

肉用鶏(6週齢、雌雄各4羽/群)にナラシンを5日間混餌投与(80 ppm)し、最終投与0、6、12及び24時間後の組織中残留がHPLCを用いて測定された。

結果を表4に示した。

脂肪を除いてナラシンは速やかに組織から消失することが確かめられた。脂肪では最終投与6時間後でもまだ測定可能であり、最終投与12時間後に検出可能な個体もあった。(参照5)

表4 鶏にナラシンを5日間混餌投与後の組織中残留 (mg/kg)

組織	投与後時間 (時間)			
	0	6	12	24
肝臓	<0.04 ¹⁾	<0.01	<0.01	<0.01
筋肉	<0.01 ²⁾	<0.01	<0.01	<0.01
腎臓	<0.025 ³⁾	<0.01	<0.01	<0.01
脂肪/皮膚	0.059	<0.028 ¹⁾	<0.025 ³⁾	<0.01

1) LOD及びLOQ未満のものが含まれる場合には、LOD又はLOQとして計算した最大平均値

2) 検出限界 (LOD) : 0.01 mg/kg

3) 定量限界 (LOQ) : 0.025 mg/kg

(3) 残留試験 (鶏・5日間投与③)

鶏 (約8週齢、3羽/時点) に¹⁴C標識ナラシンを5日間混餌投与 (80 ppm) し、最終投与0、1及び3日後に組織中放射活性を測定した。

その結果、放射活性は肝臓で最も高く、筋肉で最も低かった。最終投与3日後に、肝臓 (0.065 mg/kg) を除いた全組織でナラシンとして0.025 mg/kg未満となった。(参照7)

(4) 残留試験 (鶏・5日間投与④)

鶏 (約8週齢、15羽) に¹⁴C標識ナラシンを5日間混餌投与 (100 ppm) し、肝臓、腎臓、脂肪、筋肉及び皮膚を採取し、残留性について調べた。

最終投与0時間後における組織中残留は、肝臓、脂肪、皮膚、腎臓及び筋肉でそれぞれ0.45、0.21、0.14、0.14及び0.02 mg/kgであった。時間とともに残留は全組織で速やかに減少し、最終投与1日後には50%以上が減少し、肝臓 (0.18 mg/kg) を除いた全組織で0.1 mg/kg未満となった。(参照7)

(5) 残留試験 (鶏・5日間投与⑤)

鶏 (肉用鶏、32羽) にナラシンを5日間混餌投与 (80 ppm) し、最終投与0、6、12及び24時間後の組織中残留がHPLCを用いて測定された (定量限界 : 0.025 mg/kg、検出限界 : 0.0006 mg/kg)。

その結果、どの時点においても筋肉及び腎臓からは検出されなかった。肝臓では、最終投与6時間後のみに、皮膚/脂肪では、最終投与0及び6時間後に検出された。最終投与12時間後以降に残留は認められなかった。(参照7)

(6) 残留試験 (鶏・21 日間投与)

鶏(肉用鶏、4週齢)にナラシンを21日間混餌投与(8(1/10量)及び0.8(1/100量)ppm)し、バイオオートグラフにより組織中残留が検討された。

その結果、両群ともに、最終投与2時間及び1日後の時点で、全例が検出限界(0.025 mg(力価)/L)未満となった。(参照6)

(7) 残留試験 (鶏・42 日間投与①)

初生雛(肉用鶏)にナラシンを42日間混餌投与(0,80(常用量)及び160(2倍量)ppm)し、バイオオートグラフにより組織中残留が検討された。

結果を表5に示した。

80 ppm 投与群では、投与期間中(21日齢)の皮膚、脂肪及び小腸に残留がみられたが、最終投与3日後には全組織が検出限界(0.025 mg(力価)/L)未満となった。160 ppm 投与群では、投与期間中(21日齢)の皮膚、脂肪、肝臓及び小腸に残留がみられたが、最終投与3日後には全組織が検出限界未満となった。(参照6)

表5 肉用鶏におけるナラシンの混餌投与後の残留性① (mg(力価)/L)

混餌濃度 (ppm)	組織	投与期間中*	最終投与後時間			
			2時間	1日	3日	5日
80	血漿	<0.025	<0.025	<0.025	/	/
	皮膚	0.134	0.036	<0.025~0.026	<0.025	<0.025
	脂肪	0.127	0.091	<0.025	<0.025	/
	筋肉	<0.025	<0.025	<0.025	/	/
	肝臓	<0.025	<0.025	<0.025	/	/
	腎臓	<0.025	<0.025	<0.025	/	/
	小腸	0.041	<0.025	<0.025	<0.025	/
160	血漿	<0.025	<0.025	<0.025	/	/
	皮膚	0.443	0.083	<0.025~0.032	<0.025	<0.025
	脂肪	0.204	0.159	<0.025	<0.025	/
	筋肉	<0.025	<0.025	<0.025	/	/
	肝臓	<0.025~0.029	<0.025	<0.025	/	/
	腎臓	<0.025	<0.025	<0.025	/	/
	小腸	0.068	<0.025~0.045	<0.025	<0.025	/

* 投与期間中：21日齢 検出限界：0.025 mg(力価)/L

(8) 残留試験 (鶏・42 日間投与②)

(7)と同様、初生雛(肉用鶏)にナラシンを42日間混餌投与(0,80(常用量)及び160(2倍量)ppm)し、バイオオートグラフにより組織中残留が検討された。

結果を表6に示した。

80 ppm 投与群では、投与期間中(21日齢)及び最終投与2時間後の皮膚及び脂肪に残留が認められたが、最終投与1日後には全組織が検出限界(0.025 mg(力価)/L)未満となった。160 ppm 投与群では、投与期間中(21日齢)の血漿、皮膚、脂肪、肝臓及

び小腸に残留が認められたが、最終投与3日後には全組織が検出限界未満となった。(参照6)

表6 肉用鶏におけるナラシンの混餌投与後の残留性② (mg(力価)/L)

混餌濃度 (ppm)	組織	投与期間中*	最終投与後時間			
			2時間	1日	3日	5日
80	血漿	<0.025	<0.025	<0.025		
	皮膚	0.055	0.037	<0.025	<0.025	<0.025
	脂肪	0.104	0.097	<0.025	<0.025	
	筋肉	<0.025	<0.025	<0.025		
	肝臓	<0.025	<0.025	<0.025		
	腎臓	<0.025	<0.025	<0.025		
	小腸	<0.025	<0.025	<0.025	<0.025	
160	血漿	<0.025~0.027	<0.025	<0.025		
	皮膚	0.121	0.061	<0.025~0.036	<0.025	<0.025
	脂肪	0.337	0.118	<0.025	<0.025	
	筋肉	<0.025	<0.025	<0.025		
	肝臓	0.028	<0.025	<0.025		
	腎臓	<0.025	<0.025	<0.025		
	小腸	0.076	<0.025~0.031	<0.025	<0.025	

* 投与期間中：21日齢 検出限界：0.025 mg(力価)/L

(9) 残留試験(鶏・42日間投与③)

鶏(肉用鶏、9羽/時点)にナラシンを42日間混餌投与(80及び160 ppm)し、最終投与2、24、72、120及び168時間後にバイオオートグラフにより組織中残留が検討された(定量限界：0.025 mg/kg)。

その結果、80 ppm投与群では、脂肪及び皮膚で最終投与2及び24時間後に定量された。筋肉、肝臓及び腎臓では、定量可能な残留はみられなかった。160 ppm投与群では、皮膚で最終投与24時間後、脂肪で最終投与2時間後に定量された。筋肉、肝臓及び腎臓では、どの時点においても定量可能な残留はみられなかった。(参照7)

(10) 残留試験(鶏・45日間投与)

鶏(肉用鶏、80羽)にナラシンを少なくとも45日間混餌投与(80 ppm)し、最終投与6、12、18及び28時間後にバイオオートグラフにより組織中残留が検討された(定量限界：0.005 mg/kg)。

組織中平均残留濃度は、最終投与6時間後の0.0861±0.0506 mg/kg(脂肪)及び0.0588±0.0149 mg/kg(皮膚)から最終投与28時間後の0.0130±0.0095 mg/kg(脂肪)及び0.0082±0.0026 mg/kg(皮膚)までの範囲であった。(参照7)

(11) 残留試験(鶏卵)

産卵鶏にナラシンを21日間混餌投与(0.8(常用量の1/100)及び8(常用量の1/10) ppm)し、最終投与5及び7日後のナラシンの卵への移行について検討された。

その結果、0.8 ppm 投与群では、いずれの時点においても卵黄及び卵白中残留は検出限界 (0.025 mg (力価)/L) 未満であった。8 ppm 投与群では、最終投与 5 日後の卵黄に検出限界値付近の残留が認められたものの、最終投与 7 日後には全例が検出限界未満となった。卵白中残留は全例が検出限界未満であった。(参照 6)

(1 2) 残留試験 (牛・5 日間投与)

牛 (ヘレフォード種、去勢雄 6 頭及び未経産雌 3 頭) に ^{14}C 標識ナラシンを 5 日間経口投与 (1 日総投与量の 13 ppm : 6.6 ppm 相当量をゼラチンカプセルで 2 回/日投与) し、最終投与 0 時間、1 及び 3 日後の組織中濃度が比較された。

肝臓中に放射活性の最高濃度がみられ、最終投与 0 時間、1 及び 3 日後にはそれぞれナラシンとして 0.492、0.233 及び 0.050 mg/kg (去勢雄 3 頭及び未経産雌 1 頭/時点) であった。肝臓中総放射活性の 5 % 未満がナラシンであった。最終投与 1 日後では 1 例の肝臓のみにナラシンが検出された。筋肉、脂肪及び腎臓では全て最終投与 0 時間後でも 0.02 mg/kg 未満であった。(参照 3)

(1 3) 残留試験 (牛・140 日間投与)

牛にナラシンを 140 日間混餌投与 (66 ppm : 150 mg/頭/日) し、組織中残留について TLC-バイオオートグラフにより検討された (検出限界 : 0.005 mg (力価)/kg)。残留は脂肪及び肝臓で最終投与 48 時間後までみられた (最終投与 0 時間後 : 0.010 以下 ~ 0.020 mg (力価)/kg、最終投与 24 及び 48 時間後 : 0.005 以下 ~ 0.010 mg (力価)/kg)。筋肉では最終投与 0 時間後に 0.005 mg (力価)/kg 未満で最終投与 24 時間後には残留はみられなかった。腎臓では、どの時点においても残留はみられなかった。(参照 7)

(1 4) 残留試験 (豚・5 日間投与)

豚 (12 頭) に ^{14}C 標識ナラシンを 5 日間混餌投与 (37.5 ppm) し、TLC-バイオオートグラフにより残留性について検討された。最終投与 0、24、48 及び 72 時間後の平均肝臓中総残留は、それぞれ 0.51、0.44、0.26 及び 0.18 mg/kg であった。筋肉及び腎臓では、最終投与 0 時間後に放射活性残留はみられず、脂肪では 0.05 mg (力価)/kg 未満であった。(参照 7)

(1 5) 残留試験 (豚・14 日間投与)

豚 (24 頭) にナラシンを 14 日間混餌投与 (0 及び 45 ppm) し、最終投与 12 及び 24 時間後の組織中残留について HPLC により検討された (定量限界 : 0.025 mg/kg)。

その結果、どの時点においても定量限界以上の残留はみられなかった。(参照 7)

3. 遺伝毒性試験

ナラシンの遺伝毒性に関する各種 *in vitro* 及び *in vivo* 試験の結果を表 7 及び 8 に示した。(参照 3、6)

表 7 *in vitro* 試験

試験	対象	用量	結果
復帰突然変異試験	<i>Salmonella typhimurium</i> C3076、D3052、G46、TA98、 TA100、TA1535、TA1537、 TA1538 <i>Escherichia coli</i> WP2、WP <i>uvrA</i>	0.1~1,000 µg/plate (±S9) (濃度勾配プレート法) 又は 1、10、100、1,000 µg/mL (±S9)	陰性
	<i>S. typhimurium</i> TA98、TA100、TA1535、TA1537、 TA1538	125~1,000 µg/plate (±S9)	陰性
染色体異常試験	チャイニーズハムスター肺由来細胞	連続処理： 0.625~20 µg/mL (±S9) 24 又は 48 h 短時間処理： 12.5~100 µg/mL (-S9) 50~200 µg/mL (+S9)	陰性
前進突然変異試験	マウスリンパ腫細胞 L5178Y TK+/-	0.1、0.5、1、2、3、4、5、 10 µg/mL (±S9)	陰性
不定期 DNA 修復合成 (UDS) 試験	ラット肝細胞初代培養細胞	0.5~1,000 µmol/L、20 h	陰性
		0.0005~1 µg/mL、20 h	陰性

表 8 *in vivo* 試験

試験	対象	用量	結果
姉妹染色分体 交換 (SCE) 試験	チャイニーズハムスター骨髄細胞	1、5、10、15、20、25、30、 35、40、45、50 mg/kg 体重、 19 h	陰性

in vitro 及び *in vivo* の遺伝毒性試験の結果はいずれも陰性であることから、ナラシンは生体にとって問題となる遺伝毒性はないものと考えられた。

4. 急性毒性試験

(1) 急性毒性試験 (マウス、ラット、ウサギ、鶏、うずら、豚及び馬)

ナラシンの各動物種における経口急性毒性試験の結果を表 9 に示した。(参照 3)

表 9 各動物種におけるナラシンの経口 LD₅₀

動物種 (系統)	経口 LD ₅₀ ±SD (mg (力価)/kg 体重)		投与ナラシン剤型
	雄	雌	
マウス (ICR)	22.8±2.9	36.7±4.3	精製物
マウス (ICR)	33 (30~37)	34 (30~39)	菌糸体
マウス (ICR)	15.8±2.6	16.7±2.1	菌糸体
ラット (Wistar)	40.8±4.0	33.8±6.0	精製物
ラット (Fischer344)	22 (19~26)	24 (21~27)	菌糸体
ラット (Fischer344)	31.6±3.06	44.3±5.78	菌糸体
ウサギ	15.5±3.9		精製物
鶏	87.7±16.4	/	力価の異なる 3 ロット を使用: 1,000、943.4、 82.6 mg (力価)/g
	89.1±24.1		
	80.1±14.3		
鶏	54±19.7	/	力価の異なる 3 ロット を使用: 1,000、943.4、 82.6 mg (力価)/g
	40.2±22.6		
	75.5±8.5		
鶏	24.9±5.7	/	力価の異なる 4 ロット を使用: 93.3、110、 86.4、82.5 mg (力価)/g
	53.9±11.6		
	42.9±8.5		
	43.3±5.0		
鶏	51.6±27.02		菌糸体
うずら (Bobwhite)	73.96±9.15	70~100	菌糸体
	102.9 (46.6~227.5)		菌糸体
豚	/		菌糸体
馬	0.8		菌糸体

菌糸体又は精製ナラシンの経口及び静脈内投与による臨床症状はマウス、ラット及び鶏で同様であり、活動性低下、脚弱 (leg weakness) 及び運動失調が特徴的であった。ウサギでは、10 mg (力価)/kg 体重の菌糸体ナラシンを経口投与しても臨床症状は生じなかった。同量を投与されたイヌでは投与 1 時間後に嘔吐が観察されたのみであった。(参照 3)

ラット及びマウスでは、臨床症状として活動性低下、脚弱、立ち直り反射の消失、呼吸困難及び眼瞼下垂が観察され、ラットでは、下痢及び利尿も観察された。また、ラットでは、純度 100 % のナラシンを静脈内投与した場合間代性痙攣を呈した。急性毒性に被験物質の純度等の違いによる大きな差異はみられなかった。(参照 5)

馬はポリエーテル系イオノフォア抗生物質の毒性影響の感受性が非常に高いことが知られており、全被験動物種の中で最低の LD₅₀ (菌糸体ナラシン: 0.8 mg (力価)/kg 体重) を示した。馬が示すナラシン臨床症状は、食欲不振、頻脈、苦痛の徴候、協調運動失調及び間欠的な多量発汗であった。腎臓、肝臓、肺、脾臓、胃、心臓及び骨格筋の病

理組織学的検査では心筋及び骨格筋に初期の筋線維変性及び壊死性変化がみられた。
(参照 3)

(2) 急性毒性試験 (マウス及びラット)

純度の異なるナラシン原体 (精製物及び菌糸体 : それぞれ純度 101.8 及び 13.2 %) 及び製剤 (10 及び 1 % 製剤) の経口急性毒性試験結果を表 10 に示した。

主要な臨床症状は、自発運動の低下、呼吸深大化、腹臥姿勢、立毛、全身の筋弛緩等であった。剖検では臓器に著変はみられなかった。(参照 6)

表 10 マウス及びラットにおける純度の異なるナラシンの経口 LD₅₀

ナラシン剤型	動物種	経口 LD ₅₀ (mg/kg 体重)	
		雄	雌
精製物 (純度 101.8 %)	マウス	90 (63~121)	61 (52~71)
	ラット	81 (59~112)	75 (44~116)
菌糸体 (純度 13.2 %)	マウス	453 (352~589)	454 (387~534)
	ラット	420 (328~543)	470 (350~664)
10 % 製剤	マウス	654 (465~882)	500 (383~644)
	ラット	805 (585~1,338)	712 (468~1,004)
1 % 製剤	マウス	>2,000	
	ラット	>2,000	

5. 亜急性毒性試験

(1) 3 か月間亜急性毒性試験 (マウス①)

マウス (ICR 系、約 30 日齢、雌雄各 15 匹/群) を用いた菌糸体ナラシン (純度 4.3 %) の 3 か月間混餌投与 (0、10、20 及び 40 ppm : 0、1.5、3 及び 6 mg (力価)/kg 体重/日) による亜急性毒性試験が実施された。眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、臓器重量測定及び病理組織学的検査が行われた。

試験期間中、死亡はみられず、投与に起因する一般状態の変化及び体重への影響はみられなかった。

定期的な眼科学的検査でも異常は認められなかった。

血液学的検査では、全群とも正常値の範囲内であった。

血液生化学的検査では、40 ppm 投与群の雌雄で Cre が低下した。20 ppm 以上投与群の雄で T.Bil が低下し、雌では対照群に比べ有意に高かった。他の血液生化学的検査値は正常であり、投与に起因した肝障害がみられなかったために、これらの所見には毒性学的意義はないものと考えられた。

臓器重量は対照群と同程度であった。

本試験で観察された剖検及び病理組織学的所見は本系統のマウスに通常みられるものであり、投与によるものではなかった。

以上より、本試験における NOAEL は、最高用量である 40 ppm (6 mg (力価)/kg 体重/日) と考えられた。(参照 3)

(2) 3 か月間亜急性毒性試験 (マウス②)

マウス(ICR系、約27日齢、雌雄各15匹/群)を用いた菌糸体ナラシン(純度10.16%)の3か月間混餌投与(0、60、80及び100ppm:0、9、12及び15mg(力価)/kg体重/日)による亜急性毒性試験が実施された。眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、臓器重量測定及び病理組織学的検査が行われた。

試験期間中、死亡は100ppm投与群の雄1例のみで、投与開始57日後に死亡した。死亡動物では亀頭包皮炎症及び膀胱拡張がみられたが、1例のみの事例であること及び生存した動物に同様の所見がみられなかったことから、死亡は偶発的であり投与に起因するものではないと考えられた。

投与に起因する臨床症状はみられず、最終の眼科学的検査でも異常はみられなかった。

体重は、試験終了時に80及び100ppm投与群の雄で、対照群に対しそれぞれ26及び27%減少した。100ppm投与群の雌では、対照群に比べ14%減少した。これらの平均体重減少は、投与開始35日後に初めて観察され試験期間中持続した。

血液学的検査では、各投与群の雄の数例及びいくつかの投与群の雌数例で血液濃縮が示唆されたが、脱水の程度を反映したものであり、投与に直接関連するものではないと考えられた。

血液生化学的検査では、60ppm投与群の雄2~3例でALTが上昇したが、80ppm以上投与群ではみられないため、投与に起因するものではないと考えられた。

臓器重量では、100ppm投与群の精巣及び子宮の体重比重量(以下「比重量」という。)が増加した。雄の精巣並びに雌の脾臓及び子宮を除き臓器重量は減少した。これらの所見は、体重減少に伴うものであり、病理組織学的所見が伴わないため毒性学的意義はないと考えられた。

本試験における病理学的所見は本系統のマウスに通常みられるものであり投与によるものではなかった。

以上より、本試験における毒性学的に意味のある唯一の変化は80ppm以上投与群の雄及び100ppm投与群の雌における対照群と比較した平均体重の減少であることから、本試験のNOAELは、60ppm(9mg(力価)/kg体重/日)と考えられた。(参照3)

(3) 3 か月間亜急性毒性試験 (マウス③)

マウス(B6C3F₁、5~6週齢、雌雄各15匹/群)を用いた菌糸体ナラシン(純度15.12%)の3か月間混餌投与(0、10、20、40及び60ppm)による亜急性毒性試験が実施され、一般状態、体重、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検、臓器重量及び病理組織学的検査について検討された。

毒性学的に意義のある所見は、60ppm投与群の雄及び40ppm以上投与群の雌における体重増加抑制であったが、被験物質の直接的影響と共に嗜好性の問題による摂餌量低下の影響も考えられた。

本試験におけるNOAELは20ppmであると考えられた。(参照6)

(4) 3か月間亜急性毒性試験 (ラット①)

ラット (Wistar 系、28~35 日齢、雌雄各 15 匹/群) を用いた菌糸体ナラシン (純度 4.3%) の 3 か月間混餌投与 (0、15、30 及び 60 ppm : 雄で 0、1.1、2.2 及び 4.7 mg (力価)/kg 体重/日に相当、雌で 0、1.1、2.6 及び 5.7 mg (力価)/kg 体重/日に相当) による亜急性毒性試験が実施された。眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、臓器重量測定及び病理組織学的検査が行われた。

試験期間中、死亡はみられず、投与に起因した臨床症状は観察されなかった。

試験終了時、対照群と比較し食餌効率は 15 ppm 投与群の雌雄では同等か又はわずかに上昇し、60 ppm 投与群の雄では 21% 低下し、30 及び 60 ppm 投与群の雌ではそれぞれ 16 及び 46% 低下した。

体重は、60 ppm 投与群の雌雄で対照群と比較して増加抑制 (雌雄それぞれ 40 及び 25%) がみられた。30 ppm 以上投与群の雌雄で平均体重が減少し、60 ppm 投与群の平均体重は、対照群と比較し雄で 18% に、雌で 21% に減少した (雌では統計学的に有意)。

血液学的検査では、投与群の雄の RBC、Ht 及び Hb が有意に増加し、血液濃縮が示唆されたが、脱水の程度を反映したものであり、投与とは直接関連がないと考えられた。

血液生化学的検査では、15 ppm 投与群の雌 1 例に ALT の上昇が、全投与群の雌及び 30 ppm 投与群の雄で Glu の上昇及び投与群の雌雄で BUN の低下がみられた。これらの所見は、用量相関性がなく、試験施設での正常値の範囲内であり、投与に関連した病理組織学的所見も認められないことから、投与に起因するものとは考えられなかった。

試験終了時の体重データから、投与の影響が示唆された (60 ppm 投与群の雌では統計学的に有意)。臓器重量では、60 ppm 投与群の精巣及び卵巣の比重量が対照群と比較して増加し、雌では腎臓、心臓、脾臓、甲状腺及び副腎の比重量も有意に高かった。これらの変化は体重減少との関連が示唆され、投与に関連した病変がみられなかったために、毒性学的意義はないと考えられた。

30 ppm 以上投与群における食餌効率、平均体重及び平均体重増加に対する影響に基づき、本試験の NOAEL は 15 ppm (1.1 mg (力価)/kg 体重/日) と考えられた。(参照 3)

(5) 3か月間亜急性毒性試験 (ラット②)

ラット (SD 系、雌雄各 10 匹/群) を用いた精製ナラシン (純度 99.3%) の 91 日間混餌投与 (0、15、30 及び 60 ppm) による亜急性毒性試験が実施された。さらに、別の群 (雌雄各 10 匹/群) を設け、菌糸体ナラシン (純度 12.3%) を混餌投与 (0 及び 60 ppm) した。対照群には基礎飼料を、菌糸体投与のプラセボ群にはナラシンを除去した菌糸体を投与した。

試験期間中、死亡はみられなかった。

臨床症状では、精製ナラシン 60 ppm 投与群の雌 5 例並びに菌糸体ナラシン 60 ppm 投与群の雄 1 例及び雌 9 例に消瘦がみられた。

体重では、精製及び菌糸体ナラシン 60 ppm 投与群の雌雄に摂餌量低下を伴う増加抑制がみられ、菌糸体ナラシン投与群でより顕著であった。

眼科学的検査、尿検査、血液学的検査及び血液生化学的検査では、投与に起因する影響はみられなかった。

臓器重量では、菌糸体ナラシン 60 ppm 投与群の雌で脳、肝臓、腎臓及び心臓の比重量が有意に増加した。この投与群の雄では心臓の比重量のみが有意に増加した。これらの変化は体重増加抑制によるものと考えられた。

剖検では、精製及び菌糸体ナラシン 60 ppm 投与群に軽度の盲腸拡張が観察されたが、病理組織学的変化はみられなかった。この影響は、抗菌性物質の投与による腸内細菌叢の変動に伴う変化であり、げっ歯類等の盲腸の特異性を考慮すると、ヒトに対する毒性的意義はないと考えられた。

病理組織学的検査では、精製ナラシン 60 ppm 投与群の雌で横隔膜及び腓腹筋の限局性筋線維変性がそれぞれ 1 例観察された。横隔膜の限局性筋線維変性は菌糸体ナラシン 60 ppm 投与群の雄 1 例にもみられた。

本試験の NOAEL は、体重増加抑制、摂餌量低下及び臓器比重量の増加より精製ナラシンで 30 ppm (雌雄それぞれ 2.4 及び 2.1 mg/kg 体重/日) と考えられた。菌糸体のプラセボ投与では毒性は認められなかった。この事実から、菌糸体ナラシンの毒性はナラシンによるものであることが確認された。(参照 5)

(6) 3 か月間亜急性毒性試験 (イヌ①)

イヌ (ビーグル種、13~16 か月齢、雌雄各 4 匹/群) を用いた菌糸体ナラシン (純度 4.3%) の 3 か月間経口投与 (0、0.5、1.0 及び 2.0 mg (力価)/kg 体重/日、ゼラチンカプセル投与) による亜急性毒性試験が実施された。一般状態、眼科学的検査、体重、血液学的検査、血液生化学的検査、骨髄検査、尿検査、臓器重量測定、剖検及び病理組織学的検査について検討された。ECG 検査を 2.0 mg (力価)/kg 体重/日群について一度だけ実施した。

試験期間中、死亡はみられなかった。

体重、血液学的検査、血液生化学的検査、骨髄細胞数、尿検査、臓器重量、剖検及び病理組織学検査において投与に起因する変化は観察されなかった。

臨床症状では、2.0 mg (力価)/kg 体重/日群で投与開始後 3 週間に 4 例、3 か月間にわたり 1 例に脚弱及び非協調運動が観察された。

ECG 検査では、2.0 mg (力価)/kg 体重/日群の 6 例に明確な徐脈 (心拍数減少) がみられ、正常から重度の洞性不整脈 (sino-arrhythmias) がみられた。このうち 3 例には、洞停止 (sino-arrest) (T-R 部の間隔が 1s 未満) が観察された。2.0 mg (力価)/kg 体重/日群のほとんどの動物に QRS 波の間隔の短縮及び深い S 波がみられた。1 例は正常な心拍を示したが、P 波及び T 波が共に不規則 (振幅 0~1 mV 超) で波形が異常であった。比較のための投与前の ECG 所見がなく、心臓に組織学的変化もなく、血液生化学的検査で大きな変化もみられなかったことから、この ECG 所見の評価は困難であった。

以上より、2.0 mg (力価)/kg 体重/日群でみられた脚弱、運動失調及び ECG の異常所見により、本試験における NOAEL は 1.0 mg (力価)/kg 体重/日と考えられた。(参照 3)

(7) 3か月間亜急性毒性試験 (イヌ②)

イヌ (ビーグル種、4か月齢、雌雄各4匹/群) を用いた菌糸体ナラシン (純度 14.7%) の3か月間経口投与 (0、0.5、1.0及び2.0 mg (力価)/kg 体重/日、ゼラチンカプセル投与) による亜急性毒性試験が実施された。別の群 (雌雄各4匹/群) を設け、精製ナラシン (純度 100%) を経口投与 (2.0 mg (力価)/kg 体重/日) した。精製ナラシン投与群は、2回の投与後2日間投与を休止した。その後、投与量を1.0 mg (力価)/kg 体重/日で投与を再開し、2.0 mg (力価)/kg 体重/日まで2週間毎に0.5 mg (力価)/kg ずつ漸増し、試験終了時まで続けた。

精製ナラシン投与群の雄1例が2 mg (力価)/kg 体重/日投与の2日目に死亡したため、他の動物に入れ替えた。対照群の1例が横隔膜ヘルニアの合併症のため投与開始67日後に安楽死させた。

菌糸体ナラシン 2.0 mg (力価)/kg 体重/日投与群の3例及び精製ナラシン 2.0 mg (力価)/kg 体重/日投与群の7例が脚弱を示した。精製ナラシン 2.0 mg (力価)/kg 体重/日投与群で運動失調、横臥、努力性呼吸、流涎過多、食欲不振等の臨床症状が観察された。菌糸体ナラシン 1.0 mg (力価)/kg 体重/日投与群の1例に嘔吐が1回みられた。

体重は、精製及び菌糸体ナラシンの2.0 mg (力価)/kg 体重/日投与群でわずかな増加抑制がみられ、この群の断続的な摂餌量低下と関連していると考えられた。食餌効率の変化はみられなかった。

眼科学的検査、ECG 検査、血液学的検査、血液生化学的検査及び尿検査に投与に起因する影響はみられなかった。

試験終了時、全例について臓器重量測定、剖検及び病理組織学的検査を実施した。精製ナラシン 2.0 mg (力価)/kg 体重/日投与群の雄で腎臓の絶対重量が有意に低下し、菌糸体ナラシン 2.0 mg (力価)/kg 体重/日投与群の雄で心臓の比重量が有意に増加した。精製ナラシン 2.0 mg (力価)/kg 体重/日の第2回投与後に死亡した雄には、投与に起因する病理組織学的な変化はみられなかった。しかしながら、その代替動物に横隔膜及びその他の骨格筋に軽度から中程度の限局性筋線維変性が認められた。精製ナラシン 2.0 mg (力価)/kg 体重/日投与群の他の2例及び菌糸体ナラシン 2.0 mg (力価)/kg 体重/日投与群の3例に横隔膜を含む骨格筋に非常に軽微又は軽度の限局性筋線維変性がみられた。精製ナラシン 2.0 mg (力価)/kg 体重/日投与群の3例及び菌糸体ナラシン 2.0 mg (力価)/kg 体重/日投与群の1例で筋肉内末梢神経に軽微な軸索変性が筋線維変性と関連してみられた。変化のみられた動物では、筋線維の変性より再生が顕著であった。心臓には、投与に起因する変化はみられなかった。

菌糸体ナラシン 1.0 mg (力価)/kg 体重/日投与群では、1回の嘔吐を除いた影響は観察されなかったことから、本試験のNOAELは1.0 mg (力価)/kg 体重/日と考えられた。本試験では、臨床症状と病理組織学的検査から菌糸体ナラシンの毒性影響は、精製ナラシンより重篤ではないと考えられた。(参照5)

(8) 6か月間亜急性毒性試験 (イヌ)

イヌ (ビーグル種、12~16か月齢、雌雄各4匹/群) を用いた菌糸体ナラシン (純度 8%) の6か月間経口投与 (0、0.5、1.0及び1.5 mg (力価)/kg 体重/日、ゼラチンカプセ

ル投与)による亜急性毒性試験が実施された。一般状態、体重、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、骨髄検査、ECG検査(投与前、投与開始2時間並びに1、3及び6か月後)、臓器重量測定、剖検及び病理組織学的検査について検討した。

試験期間中、死亡はみられなかった。

体重、一般状態及び眼科学的検査に投与に起因する影響はみられなかった。

血液学的検査及び血液生化学的検査では、いずれの測定値も正常値の範囲内であり、尿検査及び骨髄検査でも投与に起因する変化はみられなかった。

ECG検査では、1.5 mg(力価)/kg体重/日投与群の雌1例のみに異常(徐脈、低振幅のR波、T波の上昇及びST部分の顕著な抑制)が投与開始1か月後にみられた。これらの所見は、前述のイヌを用いた3か月間経口投与試験においてもECGに投与に関連のある影響がみられたため、投与に起因するものとみなされた。しかし、この動物のECGの変化は、3及び6か月後の検査では認められず、可逆性を示した。心臓の病理組織学的検査でも変化はみられなかった。

剖検及び病理組織学的検査で病変が散発性にみられたが、通常観察されるものであった。

イヌを用いた3か月間経口投与試験のECGの異常及び本試験における1.5 mg(力価)/kg体重/日投与群の雌1例のECGの異常は投与に起因する影響と考えられたことから、本試験におけるNOAELは1.0 mg(力価)/kg体重/日と考えられた。(参照3)

6. 対象動物等を用いた安全性試験

(1) 安全性試験(鶏①)

鶏(チャンキー種、初生雛、雌雄各20羽/群)を用いたナラシン(10%製剤)の6週間混餌投与(0、80(常用最高用量)及び240 ppm(常用最高用量の3倍量))による安全性試験が実施された。最終投与後1週間の休薬期間が設定された。一般状態、体重、摂餌量及び食餌効率により、投与の影響について検討した。また、最終投与当日及び最終投与7日後(休薬7日後)に雌雄各5羽/群の剖検、臓器重量測定及び病理組織学的検査を実施した。

80 ppm投与群の雄2例及び雌1例、240 ppm投与群の雄1例及び雌1例並びに対照群の雌1例が死亡した。死因は、80 ppm投与群の雄は循環不全及び腹水症で、雌は不明であり、240 ppm投与群の雄は循環不全で、雌は腹水症であった。また、対照群の雌は腹水症であった。

240 ppm投与群の雌の死亡3日前に抑鬱、摂餌量低下及び呼吸促迫がみられた。脚弱が5例(0、80及び240 ppm投与群の雄でそれぞれ2、1及び0例、雌でそれぞれ1、0及び1例)に観察された。対照群にもみられ、用量相関性がみられなかったことから、本試験において脚弱は投与の影響ではないと考えられた。

体重は、240 ppm投与群の雌で摂餌量低下を伴う増加抑制がみられた。

血液学的検査では、投与群の雌雄とも変化はみられなかった。

血液生化学的検査では、240 ppm 投与群の雌で T.Chol 及び尿酸塩が最終投与日に有意に高かったが、これらの変化は軽度であり、7 日間の休薬期間中に迅速に回復した。他の脂質及び糖質代謝に関係する変化はみられなかった。

80 ppm 投与群の雄 1 例が試験早期に死亡したことから、本試験における NOAEL は設定できなかった。(参照 3、6、8)

(2) 安全性試験 (鶏②)

鶏 (ハバード×ホワイトマウンテン、初生雛、雌雄各 53 羽/群、3 回反復、1,590 羽/試験) を用いたナラシン (純度 10.6 %) の 49 日間混餌投与 (0、70、80、120 及び 210 ppm) による安全性試験が実施された。最終投与後 3 日間の休薬期間が設定された。一般状態、体重、摂餌量、食餌効率、床敷の湿り気、羽毛の状態、死亡鶏の剖検及びプロトロンビン時間により投与の影響について検討した。また、最終投与日に雌雄各 39 羽/群を剖検し、臓器重量測定及び病理組織学的検査を実施し、5 羽/群から採血し、血液学的検査及び血液生化学的検査を実施した。

試験期間中の 0、70、80、120 及び 210 ppm 投与群の死亡は、それぞれ 16、19、13、14 及び 6 例で、各群に差はみられなかった。

臨床症状は投与開始 3 週間後にみられ、210 ppm 投与群の体重増加が対照群及び 120 ppm 以下投与群に比べ抑制された。120 ppm 以上投与群では、摂餌量低下を伴う有意な体重増加抑制がみられた。

血液学的検査では、毒性学的に重要な影響はみられなかった。

血液生化学的検査では、雄の 210 ppm 投与群で投与に起因する AST の増加がみられた。

臓器重量では、210 ppm 投与群において、雄の肝臓、腎臓及び心臓並びに雌の腎臓の絶対重量が対照群に比べて有意に減少したが、病理組織学的変化はみられず、体重変化によるものと考えられた。

病理組織学的検査では、うっ血性心不全像が 80、120 及び 210 ppm 投与群でそれぞれ雄 1 例、雌雄各 1 例、雄 2 例及び雌 1 例にみられ、発生頻度は低いものの対照群ではみられず、過去の試験でも発生したことから投与に起因する影響と考えられた。

以上より、投与に起因する毒性影響は 120 ppm 以上投与群にみられたが、うっ血性心不全の可能性を考慮し、本試験における NOAEL は 70 ppm と考えられた。(参照 3、6)

(3) 安全性試験 (鶏③)

鶏 (ハバード×ホワイトマウンテン、初生雛、雌雄各 848 羽) を用いた菌糸体ナラシン (純度未記載) の 8 週間混餌投与 (0、80、240 及び 400 ppm) による安全性試験が実施された。一般状態、死亡鶏の剖検及び病理組織学的検査、死亡率、プロトロンビン時間、体重、摂餌量、床敷の状態並びに床敷の羽毛の状態により投与の影響について検討した。

試験期間中、用量依存的な体重増加抑制が明らかであった。

80、240及び400 ppm 投与群の雌雄の死亡率は、それぞれ1.4及び5%、6.1及び10.4%、並びに18.9及び31.1%であり、投与に起因する死亡例の増加がみられた。

一般状態では、240 ppm 投与群及び400 ppm 投与群で活動性低下がみられ、特に400 ppm 投与群では羽毛も少なかった。

投与開始4日及び8週後のプロトンビン時間に変化はみられなかった。

体重は、投与開始4日後にと殺された240及び400 ppm 投与群の雌雄で用量依存的に有意に減少した。投与開始3週後には240 ppm 以上投与群の雌雄で有意な減少がみられた。投与開始8週後には、全投与群の雌雄で対照群に比べて有意に減少した。

摂餌量は、投与開始後3週間に投与群の雌及び240 ppm 以上投与群の雄で有意に減少し、投与終了までその傾向は続いた。

剖検では、死亡及びと殺鶏の体格が小さく、乾燥気味で悪液質であることが観察された。

病理組織学的検査では、240 ppm 以上投与群に骨格筋の限局性筋線維変性及びうっ血性心不全像がみられた。80 ppm 投与群には投与に起因する変化はみられなかった。

以上より、全投与群で最終投与後に有意かつ用量依存的な体重減少がみられたことから、本試験におけるNOAELは設定できなかった。(参照3)

(4) 安全性試験 (牛)

子牛(ヘレフォード及びヘレフォード交雑種、雌雄各5頭/群)を用いたナラシン(0、16.5及び50 ppm)又はナラシン及びタイロシン配合剤(それぞれ50及び33 ppm)の154日間混餌投与による安全性試験が実施された。一般状態及び体重により投与の影響について検討した。最終投与後に尿検査、剖検、臓器重量測定及び病理組織学的検査を実施した。

ナラシン50 ppm 投与群の雄1例が投与開始23日後に死亡した。心臓、胸筋及び横隔膜の明らかな筋線維変性、肺の重篤なびまん性浮腫並びに肝臓の小葉中心性うっ血がみられ、死因はうっ血性心不全で、投与に起因するものと考えられた。

投与群は対照群に比べて、体重増加量も多く、食餌効率も高かった

血液生化学的検査では、いくつかの検査値に有意差のある変化がみられたが、用量依存性がなく発現の時期もさまざまであったため投与に関連があるものとは考えられなかった。T.Cholがナラシン/タイロシン群で投与開始56及び112日後に、全投与群で投与終了時に対照群に比べて有意に増加したが、投与群の生産性向上を反映するものであり、毒性影響ではないと考えられた。

血液学的検査、尿検査、臓器重量及び死亡牛以外の病理組織学的検査では、投与に起因する変化はみられなかった。

以上より、50 ppm 投与群の雄1例の死亡が投与に関連する可能性があることから、本試験におけるNOAELは16.5 ppmと考えられた。(参照3)

(5) 安全性試験 (豚①) (参考データ)

肥育豚(雌雄各3頭/群)を用いたナラシン(純度未記載)の63~65日間混餌投与(0、30、45及び60 ppm)による安全性試験が実施された。

試験期間中、投与に起因する死亡はみられず、どの検査項目でも投与に起因する毒性変化はみられなかった。

以上より、本試験におけるNOAELは最高用量である60 ppmと考えられた。(参照3)

(6) 安全性試験 (豚②) (参考データ)

豚(去勢雄及び雌各21頭/群)を用いたナラシン(純度未記載)の69~82日間混餌投与(0、25、75及び125 ppm)による安全性試験が実施された。一般状態、体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査及び剖検について検討した。血液学的検査、血液生化学的検査及び剖検には雌雄各2頭/群を供した。

75 ppm以上投与群で投与8~14日後に臨床症状として、食欲低下、呼吸困難、活動低下、嗜眠、起立又は歩行の意欲減退、脚弱、ナックリング³、振戦、運動失調、跛行、横臥及び稀に痙攣がみられた。その他、いずれの投与群でも投与に関連した明らかな臨床症状及び剖検所見はみられなかった。

以上より、本試験におけるNOAELは25 ppmと考えられた。(参照3)

7. 慢性毒性試験

(1) 1年間慢性毒性試験(ラット)

ラット(Wistar系、雌雄各15匹/群)を用いた菌糸体ナラシン(純度8%)の1年間混餌投与(0、7.5、15及び30 ppm:雄で0、0.49、1.0及び1.9 mg(力価)/kg体重/日、雌で0、0.57、1.2及び3.2 mg(力価)/kg体重/日に相当)による慢性毒性試験が実施された。

試験期間中、計8例が死亡したが、いずれも投与に起因するものではなかった。

体重では、試験終了時に30 ppm投与群の雌で対照群と比較し投与に関連した平均体重の減少(13%)が観察された。雄の平均体重は全投与群で対照群と同程度であった。

摂餌量では、大部分の群で影響はみられなかった。30 ppm投与群の雌で投与開始第1週に平均摂餌量が有意に低下したが、その後は平均摂餌量の有意な増加が観察された。投与開始第1週の週間摂餌量の低下は飼料の嗜好性によるこぼしによるものと考えられた。摂餌量の有意でない増加が15 ppm投与群の雌にも観察されたが、平均体重への影響はなかった。15及び30 ppm投与群の雌で累積食餌効率がそれぞれ対照群の20及び29%低下したが、平均体重への影響はなく毒性影響とは考えられなかった。血液学的検査では、15 ppm以上投与群の雌雄で数項目に統計学的に有意な変化が観察されたが、全てわずかな変化であり、正常値の範囲内とみなされた。

血液生化学的検査では、7.5 ppm投与群の雄及び15 ppm投与群の雌で対照群と比較しGluが有意に増加したが、散発性であり用量相関性がないために投与に起因するものではないと考えられた。15 ppm以上投与群の雌でそれぞれBUN及びALTの低下が観察されたが、生物学的又は毒性学的意義はないと考えられた。

³ 足先が曲ったまま丸まり伸びない状態

臓器重量では、雌の脾臓及び甲状腺重量に軽度で用量相関性のない変化が観察されたが、病理組織学的変化がみられなかったことから生物学的に重要な投与に起因する影響とはみなされなかった。

剖検及び病理組織学的検査では、対照群及び投与群の心筋及び骨格筋の病変の発生にバラツキがみられたが、用量相関性はみられず加齢によるものと考えられた。いずれの投与群にも下垂体、乳腺、リンパ節、甲状腺、副腎、腹膜及び皮下組織に腫瘍が散発的にみられたが、投与による発がん性の傾向を示すものではなかった。（参照 3）

JECFA は、試験でみられたナラシン投与による平均体重及び食餌効率への毒性影響は、飼料の嗜好性による間接的な影響であり、NOAEL は本試験における最高用量である 30 ppm (1.9 mg (力価)/kg 体重/日) としている。本委員会では、30 ppm 投与群の雌でみられた平均体重減少を毒性影響と考え、本試験における NOAEL は 15 ppm (1.2 mg (力価)/kg 体重/日) と判断した。

(2) 1年間慢性毒性試験 (イヌ)

イヌ (ビーグル種、5 か月齢、雌雄各 4 匹/群) を用いた菌糸体ナラシン (純度 10.6 %) の 1 年間経口投与 (0、0.5、1.0 及び 2.0 mg (力価)/kg 体重/日、ゼラチンカプセル投与) による慢性毒性試験が実施された。追加の群 (雌雄各 4 匹/群) を設け、精製ナラシン (2.0 mg (力価)/kg 体重/日) を投与し、イヌ (幼獣) における菌糸体及び精製ナラシンによる毒性を比較検討した。試験期間中、被験動物の一般状態について観察した。投与前、中間時点及び又は試験終了後に、一般状態、神経学的検査、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、ECG 検査、骨髄検査、尿検査、体重及び摂餌量について検討した。臓器重量測定、剖検及び病理組織学的検査も実施した。

菌糸体ナラシン 2.0 mg (力価)/kg 体重/日投与群の雄 1 例が瀕死状態になり投与開始 13 日に安楽死させた。この個体は、死亡前に食欲不振、流涎過多、努力性呼吸及び横臥の臨床症状を示した。臨床症状及び心臓における病理組織学的所見から本被験動物の瀕死状態は投与に起因するものであることが示唆された。

菌糸体ナラシン 2.0 mg (力価)/kg 体重/日群の生残動物にみられた投与による影響は、軽度から重度の脚弱 (雄 2 例及び雌 1 例で起立不能) 及び流涎過多であった。試験終了時、全例に両側性の膝蓋腱反射消失又は阻害が観察された。頻度は低いものの痙攣又は強直性痙攣 (雄 2 例及び雌 1 例で投与開始 5、8 及び 9 か月後に観察された。)、両手根関節の下垂 (dropped carpus) (雌雄各 1 例)、一過性の振戦、摂餌量低下、自発運動の抑制及び努力性呼吸がみられた。投与期間終了時、全例で肩及び大腿筋の筋緊張消失が観察された。

精製ナラシン 2.0 mg (力価)/kg 体重/日投与群における臨床症状は、発生率又は重症度がより低く、脚弱、運動失調、流涎過多、食欲低下及び努力性呼吸がみられた。精製ナラシン投与群で起立不能はみられなかったが、1 例は投与 9 か月目の 1 日だけ動こうとしなかったが歩くことは可能で両側の膝蓋腱反射が消失した。試験終了時、精製ナラシン投与群の全例に膝蓋腱反射の両側性消失又は阻害が観察され、3 例では筋緊張が低下していた。

菌糸体ナラシン 1.0 mg (力価)/kg 体重/日投与群では、雄 1 例に一過性の脚弱、雌 2 例に流涎が時折みられ、雄 1 例に大腿筋後部の軽度萎縮がみられた。

体重では、増加抑制が菌糸体ナラシン 2.0 mg (力価)/kg 体重/日投与群で軽度 (3 例) から重度 (2 例)、精製ナラシン投与群では軽度 (5 例) にみられた。菌糸体及び精製ナラシン 2.0 mg (力価)/kg 体重/日群で、対照群と比べ平均体重がそれぞれ雄 (11 及び 15 %) と雌 (29 及び 11 %) で低下した。これらの低下は、平均月間摂餌量の 10 % 以上の低下 (複数回) と関連性があった。

眼科学的検査及び ECG 検査では投与に起因する異常はみられなかった。

血液学的検査、尿検査及び骨髄検査ではいずれの投与群にも毒性学的に重要な変化は生じなかった。

血液生化学的検査では、菌糸体及び精製ナラシン 2.0 mg (力価)/kg 体重/日投与群の一部の個体で投与開始後 4 週間に CPK 及び AST が一過性で軽度に上昇し、筋損傷との関連性が考えられた。しかし、この変化はナラシン投与の継続で正常範囲に回復した。

病理学的検査では、心筋、骨格筋、坐骨、脛骨及び不特定の末梢神経に用量相関的な変化が認められた。心筋の病変は瀕死状態で安楽死させた菌糸体ナラシン 2.0 mg (力価)/kg 体重/日投与群の 1 例のみにみられた。菌糸体及び精製ナラシン 2.0 mg (力価)/kg 体重/日投与群のそれぞれ雄 3 例及び雌 1 例に横隔膜を含む骨格筋の限局性筋線維変性が生じ、菌糸体投与群の方が重篤であった。精製ナラシン 2.0 mg (力価)/kg 体重/日投与群の全例で脊髄を除き末梢神経障害の重篤性は低かった。菌糸体ナラシン 1.0 mg (力価)/kg 体重/日投与群では 3 例にごく軽微から軽度の末梢神経変性と骨格筋の軽微な限局性筋線維変性がみられた。

本試験において用量相関的な毒性影響が生じた。投与に起因する毒性影響は臨床症状にみられ、流涎過多、脚弱、食欲低下、努力性呼吸、活動性低下及び横臥、体重減少、CPK 及び AST の一過性の上昇並びに心臓、骨格筋及び末梢神経の変性及び/又は再生性変化であった。菌糸体ナラシンは精製ナラシンより忍容性は低かった。菌糸体ナラシン 1.0 mg (力価)/kg 体重/日投与群より菌糸体ナラシン 2.0 mg (力価)/kg 体重/日投与群においてより多くの動物が臨床症状と病変を示した。死亡率、臨床症状、体重、血液生化学検査並びに骨格筋、心筋及び末梢神経の病理組織学的所見から、本試験における NOAEL は 0.5 mg (力価)/kg 体重/日と考えられた。(参照 3、6)

8. 慢性毒性/発がん性併合試験

(1) 2 年間慢性毒性/発がん性併合試験 (マウス)

マウス (B6C3F₁、雌雄各 30 匹/群) を用いた菌糸体ナラシン (純度 10.6 %) の 2 年間混餌投与 (0、5、15 及び 50 ppm : 雄は 0、0.59、1.91 及び 7.16 mg (力価)/kg 体重/日、雌は 0、0.71、2.29 及び 8.72 mg (力価)/kg 体重/日に相当) による慢性毒性/発がん性併合試験が実施された。また、別の群 (雌雄各 30 匹/群) を設け、精製ナラシン (純度 99.7 %) を混餌投与 (50 ppm : 雌雄それぞれ 9.49 及び 8.24 mg (力価)/kg 体重/日に相当) した。動物は毎日一般状態及び行動を観察し、死亡例及び瀕死状態の個体については剖検した。体重測定、血液学的検査、血液生化学的検査、臓器重量測定、剖検及び病理組織学的検査を実施した。

以下は両試験（雌雄各 60 匹/群）データを総合した解釈に基づくものである。

2 年間の生存率は、菌糸体ナラシン 0、5、15 及び 50 ppm 投与群並びに精製ナラシン 50 ppm 投与群でそれぞれ 73、82、87、78 及び 84 % であり、ナラシンの混餌投与は生存率に影響を及ぼさなかった。

削瘦（thinness）のみが、投与に起因する影響であった。体重は、15 ppm 以上投与群で平均体重減少及び増加抑制がみられた。精製ナラシン 50 ppm 投与群の体重減少は菌糸体ナラシン 50 ppm 投与群より大きかった。

血液学的検査、血液生化学検査、臓器重量、剖検及び病理組織学的検査には毒性学的に重要な影響はみられず、投与に起因する病変及び腫瘍もみられなかった。投与群で良性及び悪性腫瘍が散発的に発生したが、その頻度は発がん性を示すものではなかった。

以上より、投与に起因する雌雄の平均体重減少及び体重増加抑制により、本試験における NOAEL は 5 ppm（0.59 mg（力価）/kg 体重/日）であると考えられた。発がん性は認められなかった。（参照 3）

（2）2 年間慢性毒性/発がん性併合試験（ラット）

ラット（Wistar 系）を用いた、菌糸体ナラシン（純度 8 %）の 2 年間混餌投与（0、7.5、15 及び 30 ppm）による慢性毒性/発がん性併合試験の反復試験（第 1 回試験（雌雄各 40 匹/投与群）及び第 2 回試験（雌雄各 40 匹、高用量群のみ雄 39 及び雌 41 匹/群））が対照群（雌雄各 60 匹）を設けて実施された。本試験では、多世代発生毒性試験で得られた出生児が被験動物として用いられた。2 年間の平均投与量は第 1 回試験では、雄で 0、0.31、0.59 及び 1.15 mg（力価）/kg 体重/日、雌で 0、0.38、0.76 及び 2.0 mg（力価）/kg 体重/日であり、第 2 回試験では、雄で 0、0.29、0.62 及び 1.26 mg（力価）/kg 体重/日、雌で 0、0.37、0.88 及び 2.34 mg（力価）/kg 体重/日であった。

動物の生存率に影響はなかった。15 ppm 以上投与群で生存率が上昇し、加齢ラットに一般的にみられる慢性腎症の重症度が低下したことによると考えられた。

体重では、30 ppm 投与群の雌で増加抑制がみられ、投与に起因する唯一の所見と考えられた。30 ppm 投与群の雌の摂餌量は対照群より多かったが、こぼしにより実際の摂餌量は少なかったと考えられた。

血液学的及び血液生化学的検査並びに臓器重量に投与の影響はみられなかった。

心筋、骨格筋及びその他における非腫瘍性病変や腫瘍の発生には投与による影響はなかった。良性及び悪性腫瘍が各投与群に散発的に発生したが、その頻度は発がん性を示すものではなかった。

以上より、30 ppm 投与群の雌に有意な体重増加抑制がみられたことから、本試験における NOAEL は 15 ppm であり、第 1 回試験では 0.76 mg（力価）/kg 体重/日、第 2 回試験では 0.88 mg（力価）/kg 体重/日と考えられた。発がん性は認められなかった。（参照 3）

9. 生殖発生毒性試験

(1) 3世代生殖試験 (ラット)

ラット (Wistar 系、匹数不明) を用いた菌糸体ナラシン (純度 8%) の混餌投与による 3 世代生殖試験が実施された。混餌濃度は、最初 0、15、30 及び 60 ppm であったが、最初の世代で 60 ppm 群の F₁ 児体重が有意に低下したため、以降は 7.5、15 及び 30 ppm を用いた。混餌濃度 7.5、15、30 及び 60 ppm における換算投与量はそれぞれ 0.8、1.8、3.8 及び 5.9 mg (力価)/kg 体重/日であった。

30 ppm 投与群では、雌の親動物の体重が対照群より低かった。また、F₀ 及び F₂ 世代の児動物の体重が有意に低かった。7.5 及び 15 ppm 投与群の親及び児動物の体重は対照群と同様であった。親動物における生存率等のパラメータ、生殖成績及び児動物のデータに投与に起因する影響はみられなかった。

以上より、親動物及び児動物の体重への影響から、本試験における一般毒性に対する NOAEL は 15 ppm (1.8 mg (力価)/kg 体重/日)、生殖毒性に対する NOAEL は本試験における最高用量である 30 ppm (3.8 mg (力価)/kg 体重/日) と考えられた。(参照 3)

(2) 発生毒性試験 (ラット)

(1) のラット 3 世代生殖試験の各世代の親動物を用いて菌糸体ナラシン (純度 8%) の器官形成期における混餌投与 (0、7.5、15 及び 30 ppm) による発生毒性試験が実施された。それぞれの混餌濃度における投与量は、交配時でそれぞれ 0、0.5、1.3 及び 3.5 mg (力価)/kg 体重/日であった。母動物を妊娠 20 日にと殺し、生殖成績及び胎児への影響について調べた。

母動物では、30 ppm 投与群の体重が対照群に比べ有意に低かった。剖検で、投与に起因した所見は得られなかった。黄体数、着床数、吸収胚率、生存胎児数及び胎児体重に投与の影響はみられなかった。

胎児発生に対する影響もみられなかった。

30 ppm 投与群における母動物の平均体重の有意な減少に基づき、母体毒性の NOAEL は 1.3 mg (力価)/kg 体重/日であると考えられた。催奇形性は認められなかった。(参照 3)

(3) 発生毒性試験 (ウサギ)

ウサギ (Dutch Belted 種、15 匹/群) に菌糸体ナラシン (純度 8%) を妊娠 6~18 日に強制経口投与 (0、0.6、1.2、1.8 及び 2.4 mg (力価)/kg 体重/日) し、胎児に対する影響を調べた。

2.4 mg (力価)/kg 体重/日投与群の 2 例が死亡した。摂餌量、飲水量及び体重の減少並びに流産等の臨床症状がみられた。これらの影響は全投与群でみられたが、最高用量である 2.4 mg (力価)/kg 体重/日投与群で最も顕著であった。0.6 mg (力価)/kg 体重/日投与群の胎児 1 例に短尾が観察されたが、他の胎児に形態異常はみられなかった。0.6 及び 1.2 mg (力価)/kg 体重/日群のそれぞれ 1 例が流産したが、1.8 mg (力価)/kg 体重/日投与群の胎児発生に対する影響は認められなかった。

以上より、妊娠したウサギは最高約 1.8 mg (力価)/kg 体重/日のナラシンの反復投与に忍容性があると考えられた。(パイロット試験) (参照 3)

ウサギ (Dutch Belted 種、15 匹/群) に菌糸体ナラシン (純度 8 %) を妊娠 6~18 日に強制経口投与 (0、0.6、1.2 及び 1.8 mg (力価)/kg 体重/日) し、発生毒性試験が実施された。妊娠 28 日に帝王切開し、妊娠維持及び胎児に対する影響について調べた。

親動物では、1.2 及び 1.8 mg (力価)/kg 体重/日投与群の各 2 例、計 4 例が流産した。1.8 mg (力価)/kg 体重/日投与群の 2 例が瀕死状態となり安楽死させた。これらのうち 3 例 (1.2 mg (力価)/kg 体重/日投与群の 1 例、1.8 mg (力価)/kg 体重/日投与群の 2 例) に脚弱及び運動失調が観察された。1.2 mg (力価)/kg 体重/日以上投与群で摂餌量減少を伴う平均体重のわずかな減少がみられたが、統計的に有意ではなかった。1.8 mg (力価)/kg 体重/日投与群で一腹中の生存胎児数がわずかに減少し、吸収胚数がわずかに増加した。その他、生殖パラメータ及び胎児の生存数、性別及び体重に投与の影響は認められなかった。

胎児では、外表異常は、0.6 mg (力価)/kg 体重/日投与群の 1 例、1.2 mg (力価)/kg 体重/日投与群の同腹児の 5 例及び 1.8 mg (力価)/kg 体重/日投与群の 1 例に眼瞼開裂及び又は口蓋裂がみられた。内臓異常は水頭症及び腎無形成 (0.6 mg (力価)/kg 体重/日投与群の 1 例) 並びに心臓肥大 (1.2 mg (力価)/kg 体重/日投与群の 1 例) がみられた。背景データ (3,646 例) では、該当する外表異常として眼瞼開裂 3 例及び口蓋裂 6 例及び内臓異常として内水頭症 13 例、腎無形成 1 例及び心臓肥大 1 例が発現していた。第 13 肋骨の発達異常、背側頭蓋骨の発達不良及び胸骨分節異常は投与群と対照群で同様の頻度で発現した。

1.2 mg (力価)/kg 体重/日以上投与群で観察された母体毒性及び体重への影響、1.8 mg (力価)/kg 体重/日投与群における同腹生存胎児数の減少及び胚吸収増加に基づき、母体毒性の NOAEL は 0.6 mg (力価)/kg 体重/日であると考えられた。催奇形性は認められなかった。(参照 3)

10. その他の試験

(1) 皮膚刺激性試験 (ウサギ)

ウサギに菌糸体ナラシンを 24 時間閉塞局所投与 (250 mg (力価)/kg 体重) しても明確な皮膚刺激性は発生しなかった。(参照 3)

ウサギ (ニュージーランドホワイト種、雌雄各 5 匹) を用いて、菌糸体ナラシンの皮膚刺激性試験 (2,000 mg (力価)/kg 体重) が実施された結果、全身性の明らかな臨床症状はみられなかった。非常に軽微な皮膚刺激性が投与後 72 時間以内に 5 例で観察された。皮膚刺激性徴候は 1 例を除き投与後 14 日以内に消退した。剖検では、投与に起因する変化はみられなかった。(参照 5)

(2) 眼刺激性試験 (ウサギ)

ウサギに菌糸体ナラシンを点眼 (1.7 mg (力価)/kg; 菌糸体ナラシンの総投与量 40 mg) した結果、角膜、虹彩及び結膜に重度の障害が生じた。投与した 6 例のうち 2 例の眼に

は、永久的な眼の障害を示すパンヌス⁴が生じた。投与 2 分後に眼を洗浄するとわずかな刺激性を示したが、48 時間以内には治癒した。(参照 3)

ウサギ (ニュージーランドホワイト種、雄 5 及び雌 4 匹) を用いて菌糸体ナラシン (純度 4.3 %、0.1 mL 懸濁液) の眼刺激性試験を実施した。投与 21 日後まで眼反応性を Draize 法で評価した。

投与 2 分後に洗浄した 3 例には、一過性の中程度の結膜炎が生じたが、投与 7 日後には正常に回復した。しかしながら、非洗浄の 6 例では角膜混濁、重度の結膜炎及び虹彩炎がみられた。これらの 2 例にはパンヌス (不可逆的障害) が生じ、角膜混濁、虹彩炎及び結膜炎は試験終了時でもみられた。

本被験物質には眼刺激性があると結論された。

イヌを用いたナラシン粉塵の暴露試験においても、眼刺激性が観察された。(参照 5)

ウサギ (ニュージーランドホワイト種、雌雄各 3 匹又は雄 3 匹) を用いて、菌糸体ナラシンを結膜嚢に滴下 (74 mg (力価)/0.1 mL) し、3 日又は 7 日後まで観察した。

投与 24 時間以内に完全な角膜白濁及び重度の結膜炎がみられたが、投与直後の眼洗浄により眼刺激性は大幅に軽減し、軽度の角膜、虹彩、結膜の炎症等が認められたのみで症状は 7 日以内に消失した。(参照 6)

(3) 皮膚感作性試験 (モルモット)

モルモット (2~3 か月齢、雌 10 匹/投与群、雌 8 匹/対照群) に精製ナラシン (0.025 %、サフラワー油溶媒) を 3 週間にわたり計 10 回皮内投与し、ナラシンの感作性を調べた。対照群には溶媒のみを投与した。最終投与 2 週間後に再投与 (惹起投与) し、各再投与 24 時間後に反応部の直径を測定した。再投与後の反応を元の 10 回の注射後に測定した平均値と比較して感作性を調べた。

皮内惹起投与後に遅発性過敏症は認められなかった。体重の減少はナラシンの注射に起因するものであった。(参照 3)

1 1. 一般薬理試験

ナラシンの一般薬理試験の結果を表 11 に示した。(参照 3、6)

⁴ 肉芽組織の浸潤を伴う角膜表面の血管新生

表 11 ナラシンの一般薬理試験

試験内容	動物種	動物数、	投与方法 (投与量) (mg/kg 体重)	結果
一般行動及び 中枢神経症状	マウス	雌雄各 3 匹/ 群	単回経口投与 (1~100)	≥10 : 用量依存的な全身抑制状態 (運動性、認知性、反射性、筋緊張の低下等)
	ウサギ	雄 3 匹/群	単回経口投与 (10~100)	≥30 : 運動量低下、四肢の脱力、 運動失調、筋緊張低下、呼吸抑制 等
<i>in situ</i> 子宮 運動	ウサギ	経産雌 3 匹	静脈内漸増投与 (0.03~1)	≥0.1 : 子宮収縮の低下及び収縮 頻度の減少
<i>in situ</i> 前脛 骨筋収縮	ウサギ	雄 4 匹	静脈内漸増投与 (0.03~1)	≥0.3 : 直接・間接刺激に対し軽 微~軽度の用量依存的な収縮増 大
炭末輸送能	マウス	雄 6 匹/群	単回経口投与後炭 末投与 (0.1~10)	10 : 小腸内輸送能低下
尿排泄	ラット	雄 6 匹/群	単回経口投与 (0.3~30)	30 : 2 例が死亡 尿の定性試験、 尿量等に明らかな変化なし
心臓血管系に 対する影響	イヌ	不明	静脈内投与 (0.0076~0.153) 又は経口投与 (1.53)	静脈内投与では、冠状動脈血流 量、平均血圧、心拍数が用量依存 的に増加。経口投与では影響無し

1 2. 微生物学的影響に関する試験

(1) 臨床分離菌に対する MIC ①

平成 18 年度食品安全確保総合調査「動物用抗菌性物質の微生物学的影響についての調査」(平成 18 年 9 月~平成 19 年 3 月)において、ヒト臨床分離株に対するナラシンの約 5×10^6 CFU/spot における MIC が調べられている (表 12)。

表 12 ヒト腸内細菌におけるナラシンの MIC₅₀

菌名	株数	最小発育阻止濃度 (µg/mL)	
		MIC ₅₀	範囲
通性嫌気性菌			
<i>Escherichia coli</i>	30	>128	>128
<i>Enterococcus</i> sp.	30	0.25	0.12~0.5
嫌気性菌			
<i>Bacteroides</i> sp.	30	16	2~32
<i>Fusobacterium</i> sp.	20	>128	64~>128
<i>Bifidobacterium</i> sp.	30	0.5	0.25~8
<i>Eubacterium</i> sp.	20	0.5	0.12~2
<i>Clostridium</i> sp.	30	0.12	≤0.06~0.12
<i>Peptococcus</i> sp./ <i>Peptostreptococcus</i> sp.	30	≤0.06	≤0.06~0.25
<i>Prevotella</i> sp.	20	2	0.5~4
<i>Lactobacillus</i> sp.	30	0.25	0.12~2
<i>Propionibacterium</i> sp.	30	0.25	0.12~0.5

調査された菌種のうち、最も低い MIC₅₀ が報告されているのは *Peptococcus* sp./*Peptostreptococcus* sp. の 0.06 µg/mL 以下であった。MICcalc⁵ は 0.189 µg/mL (0.000189 mg/mL) と算出された。(参照 9)

(2) 臨床分離菌に対する MIC②

健常なヒト腸内細菌叢の 100 菌株 (代表的 10 菌種各 10 株) を用いてナラシンの MIC について調べた。菌は投薬を受けていない健常ヒトボランティアの糞便から分離されたものであった。MIC は 10⁷~10⁸ CFU/mL の接種濃度で決定された。

MIC の範囲及び MIC₅₀ を表 13 に示した。

ナラシンの抗菌活性の程度は各細菌群により大きく異なった。*Peptostreptococcus* sp. が最も感受性が高く MIC 範囲が 0.062~0.5 µg/mL、MIC₅₀ は 0.125 µg/mL であった。ナラシンは *Bacteroides fragilis* 及び他の *Bacteroides* sp. には非常に弱い活性を示し、MIC₅₀ は 32 µg/mL であった。*Escherichia coli* には測定できるほどの抗菌活性を示さず、MIC は 128 µg/mL より大きかった。(参照 3)

⁵ 試験薬に活性のある最も関連のある属の平均 MIC₅₀ の 90% 信頼限界の下限値

表 13 ヒト腸内細菌（ヒトボランティア由来）におけるナラシンのMIC

菌種 (各菌種 10 株)	ナラシンのMIC (µg/mL)	
	範囲	MIC ₅₀
<i>Bacteroides fragilis</i>	8~32	32
その他の <i>Bacteroides</i> sp.	16~32	32
<i>Bifidobacterium</i> sp.	0.125~4	0.5
<i>Clostridium</i> sp.	0.125~1	0.25
<i>Enterococcus</i> sp.	全て 0.5	0.5
<i>Escherichia coli</i>	全て >128	>128
<i>Eubacterium</i> sp.	0.25~0.5	0.25
<i>Fusobacterium</i> sp.	0.125~32	8
<i>Lactobacillus</i> sp.	0.5~4	1
<i>Peptostreptococcus</i> sp.	0.062~0.5	0.125

接種濃度：10⁷~10⁸ CFU/mL

(3) 糞便結合試験（ヒト）

ナラシンの糞便結合試験が 12 添加濃度（0、0.5、1、2、5、10、20、50、100、120、140 及び 160 µg/mL）で実施された。糞便は過去 4 週間下痢がなく過去 3 か月間抗菌剤の投与を受けていない 3 名のボランティア由来のもので、参照菌株として *Enterococcus faecalis* を用いた。各濃度のナラシンは滅菌したヒト糞便試料（糞便濃度：0、25 及び 50 w/v%）と混合し、培養（0、1、2、6、8 及び 12 時間）した。各培養時間後の試料から得られた上清の抗菌活性を、糞便の培養前後における細菌発育の有無により評価した。

ナラシンのヒト糞便との結合率を表 14 に示した

表 14 ナラシンのヒト糞便との結合率

培養時間 (h)	糞便濃度 (w/v%糞便)				
	0	25		50	
	増殖阻害に必要な最低ナラシン濃度 (µg/mL) (a)	増殖阻害に必要な最低ナラシン濃度 (µg/mL) (c)	ナラシンと糞便との結合率 (%) [(c-a) / c] × 100	増殖阻害に必要な最低ナラシン濃度 (µg/mL) (d)	ナラシンと糞便との結合率 (%) [(d-a) / d] × 100
0	1	>160	>99.4	>160	>99.4
1	1	>160	>99.4	>160	>99.4
2	1	100	99.0	>160	>99.4
6	1	100	99.0	>160	>99.4
8	1	100	99.0	>160	>99.4
12	1	100	99.0	>160	>99.4

ナラシン添加濃度：0、0.5、1、2、5、10、20、50、100、120、140、160 µg/mL

糞便試料 3 例全てが 25 及び 50 %の両濃度で最大の結合率（99.4 %）を示した。混合直後に 99 %以上のナラシンが糞便と結合した。糞便濃度 50 %が *in vivo* と最も近い状

況であると考えられた。この結果は、ナラシンのヒト糞便との迅速かつ強固な結合を示すと考えられた。

以上より、ナラシン残留物の無希釈糞便との結合は迅速で99%を超えると考えられた。(参照3)

(4) 代謝物の微生物学的活性

ナラシンは豚及びラットにおいて大部分が代謝され数多くの代謝物に変換される。水酸化が主要な代謝経路と考えられている。水酸化代謝物ナラシンA及びBの肝臓、胆汁及び糞中で同定された。ナラシンの6種類の水酸化代謝物の抗菌活性が *Bacillus subtilis* に対するバイオオートグラフにより測定された。このバイオアッセイにより全代謝物の抗菌活性はナラシンの少なくとも1/20以下であった。さらに、鶏及び牛の排泄物から単離された2及び3-水酸化ナラシン代謝物のイオノフォアとしての活性が調べられており、2及び3-水酸化ナラシン代謝物はナラシンの1/200以下であった。(参照3)

(5) サルモネラ排菌に対する影響 (鶏)

肉用鶏雛 (11 及び 12 日齢) にサルモネラを実験感染させた後、ナラシンを混餌投与した場合の、サルモネラ排菌 (検出率、排菌持続期間、排菌量) 及び組織からのサルモネラ分離に及ぼす影響について検討された。雛に *S. Typhimurium* を人工感染させ、サルモネラ感染日から試験期間を通じてナラシンを混餌投与 (80 ppm) した。感染後 56 日間に計 12 回糞を採取し、サルモネラの検出を試みるとともに、へい死時又は試験終了時に剖検し、肝臓、脾臓、結腸内容物及び盲腸内容物についてサルモネラの検出を試みた。

その結果、ナラシンの混餌投与は、サルモネラ排菌量、検出率、排菌持続時間等のサルモネラ排菌の指標及び組織からのサルモネラ分離に何ら影響を及ぼさなかった。(参照6)

サルモネラに感染させた鶏 (肉用鶏) にナラシンを8週間混餌投与 (100 ppm) した。その結果、投与に起因するサルモネラの糞中排泄及びナラシン耐性大腸菌の糞中の割合に有意な影響はみられなかった。(参照3)

1.3. ヒトにおける知見

意図的にナラシン製剤をヒトに投与した計画的な試験は実施されていない。しかしながら、プレミックス剤や完全飼料の製造中の現場で偶然に暴露されることは起こり得ると考えられた。ナラシン及びナラシン製品の製造過程に従事した163名に関する広範な医学的報告の評価が実施された。この中には、定期健康診断、社内医療施設での診察記録及び労働障害又はナラシン暴露の可能性のある事故報告が含まれる。ナラシン暴露により起きることが知られている皮膚の発疹、アレルギー症状、神経筋障害及び心疾患は特別に考慮された。調査項目には血液学的検査 (Hb、Ht、RBC、WBC 及び PLT)、血液生化学的検査 (Glu、BUN、Cre、Chol、T.Bil、AST、ALP、LDH、UA、TP、

電解質及び Alb)、肺機能検査(努力肺活量 FVC、努力呼気肺活量 FEV、FEV/FVC)及び健康に関するアンケートが含まれていた。

163名の従業員の調査結果のまとめから、ナラシン暴露に関連付けられる有意な検査値はみられなかった。特に、血液疾患、肝臓又は腎臓障害、肺機能異常、新生物及び慢性皮膚病並びに神経筋、心臓等の異常は認められなかった。

同じ163名の従業員に関する医学的報告と事故/傷害報告のまとめでは、ナラシンに対する2例のIgE介在性アレルギー反応が確認されており、一過性の顔面蕁麻疹、掻痒症、鼻のうっ血及び胸部圧迫感が示されている。さらに、3例にアレルギー症状が疑われたが皮内試験では確認されなかった。この症例は、アレルギー反応というよりはむしろ局所的な呼吸障害を示していたと考えられた。5例全ての症状は一過性であり、ナラシン製造区域からの異動後に完全に回復し長期の持続性はなかった。(参照3)

III. 食品健康影響評価

1. 国際機関における評価

(1) JECFAにおける評価

JECFAでは、各種毒性試験の結果、イヌを用いた1年間慢性毒性試験において得られた最小のNOAELを用いて毒性学的ADIが設定されている。

イヌを用いた1年間慢性毒性試験では、死亡率、臨床症状、体重、血液生化学的検査並びに骨格筋、心筋及び末梢神経の病理組織学的所見に基づき、NOAELは0.5 mg/kg 体重/日と設定された。このNOAELに、安全係数として種差10及び個体差10の100を適用し、0~5 µg/kg 体重/日の毒性学的ADIが設定された。

MIC、糞便結合作用及び*in vivo*の定着障壁試験から、ナラシン残留物はヒト消化管の定着障壁を崩壊させないと考えられ、ナラシン残留物に関して微生物学的ADIを設定する必要はないとしている。以上のことから、JECFAでは、ナラシンのADIを毒性学的ADIである0~5 µg/kg 体重/日と設定している。(参照3)

(2) EFSAにおける評価

EFSAでは、飼料に添加して使用されるナラシンを含有する抗コクシジウム剤について評価が実施されている。

ナラシンには遺伝毒性がないことが示されており、マウス、ラット及びウサギを用いた試験では発がん性及び発生毒性は認められなかった。

経口の毒性試験で得られた最小のNOAELは、イヌを用いた1年間慢性毒性試験においてみられた神経障害に基づく0.5 mg/kg 体重/日であり、毒性学的ADIを0.005 mg/kg 体重/日と設定している。

⁶ 定着障壁とは、結腸において、外来微生物の定着及び内因性の潜在性病原菌の過剰増殖を制限する正常腸内細菌叢の機能。抗菌性物質が正常腸内細菌叢をかく乱することにより、この障壁を崩壊させ、ヒトの健康に影響することが知られている。

なお、微生物学的 ADI については設定されておらず、EFSA では、消費者の安全性評価に係るナラシンの ADI として 0.005 mg/kg 体重/日が設定された。(参照 5)

2. 毒性学的 ADI について

各種遺伝毒性試験においていずれも陰性の結果が得られており、マウス及びラットを用いた慢性毒性/発がん性併合試験において発がん性が認められていないことから、ナラシンは遺伝毒性発がん物質ではないと考えられ、ADI を設定することが可能であると考

えた。
各種毒性試験において、ナラシン投与による主な影響として、平均体重低下及び体重増加抑制 (マウス、ラット)、脚弱及び運動失調 (イヌ、豚)、骨格筋限局性筋線維変性 (イヌ、鶏)、うっ血性心不全 (鶏、牛)、ECG 異常 (イヌ) 等が認められたが、試験で得られた最も小さい NOAEL は、イヌの 1 年間慢性毒性試験における 0.5 mg (力価) /kg 体重/日であった。したがって、この NOAEL に安全係数 100 (種差 10 及び個体差 10) を適用し、毒性学的 ADI を 0.005 mg/kg 体重/日と設定した。

3. 微生物学的影響について

ナラシンのヒト腸内細菌叢への影響については、ヒト腸内細菌に対する MIC、糞便結合率及びナラシン残留物の微生物学的活性を評価した。

その結果、ナラシンはほとんどの腸内細菌に抗菌活性を示したが、*Escherichia coli* に対しては抗菌活性はみられず、MIC₅₀ は 128 µg/mL より大きかった。

したがって、MIC に関する知見から、ナラシンはヒト腸内細菌叢に対して影響し定着障壁の崩壊の可能性がある。しかしながら、結腸内のナラシン残留物の大部分 (99.4 %) は糞便に結合しており生物学的には非活性であると考えられる。

また、代謝物の微生物学的活性については、豚及びラットの 6 種類の水酸化代謝物の抗菌活性はナラシンの 1/20 であり、鶏及び牛の排泄物から単離された 2 及び 3-水酸化ナラシン代謝物のイオノフォアとしての活性はナラシンの 1/200 であった。

さらに、サルモネラに感染させた鶏 (肉用鶏) にナラシンを 8 週間混餌投与 (100 ppm) した結果、投与に起因するサルモネラの糞中排泄及びナラシン耐性大腸菌の糞中の割合に有意な影響はみられなかった。

したがって、ナラシンは正常な腸内細菌叢に影響を及ぼさないと考えられる。また、MIC、糞便結合作用及び *in vivo* 定着障壁試験により、ナラシン残留物はヒト消化管の定着障壁を崩壊させないと考えられた。

以上のことから、ナラシン残留物に関して微生物学的 ADI を設定する必要はないと考えた。

4. ADI の設定について

微生物学的 ADI については、上述のとおり設定する必要がないと考え、ナラシンの食品健康影響評価については、ADI として次の値を採用することが適当と判断した。

ナラシン 0.005 mg/kg 体重/日

暴露量については、当評価結果を踏まえ暫定基準値の見直しを行う際に確認することとする。

表 15 JECFA 及び EFSA における NOAEL 等の比較

動物種	試験	投与量 (mg/kg 体重/日)	NOAEL (mg/kg 体重/日) 等	
			EFSA	JECFA
マウス	一般行動及び中枢神経症状	0、1、3、10、30、100、経口投与		3 全身抑制状態
	一般薬理 (炭末輸送能)	0、0.1、0.3、1、3、10、経口投与		3 小腸輸送能低下
	3 か月間亜急性毒性	菌糸体 : 0、9、12、15、混餌投与	9 体重増加抑制	9 平均体重減少
		菌糸体 : 0、1.5、3、6、混餌投与	1.5	6 (最高用量)
	2 年間慢性毒性/発がん性	菌糸体:雄0、0.59、1.91、7.16、雌0、0.71、2.29、8.72 精製物:雄0、8.24、雌0、9.49、混餌投与	LOAEL ; 0.59 体重増加抑制	0.59 平均体重減少、体重増加抑制
ラット	一般薬理 (尿排泄)	0、0.3、1、3、10、30、経口投与		有意な変化なし
	3 か月間亜急性毒性	菌糸体 : 0、15、30、60 ppm (雄0、1.1、2.2、4.7、雌0、1.1、2.6、5.7)、混餌投与		菌糸体 1.1 (15 ppm) 食餌効率、体重への影響
	3 か月間亜急性毒性	精製物 : 0、15、30、60 ppm、菌糸体 : 0、60 ppm、混餌投与	精製物 ; 30 ppm 雄 ; 2.1、雌 ; 2.4 摂餌量減少、体重増加抑制	
	1 年間慢性毒性	0、7.5、15、30 ppm (雄0、0.49、1.0、1.9、雌0、0.57、1.2、3.2)、混餌投与	菌糸体 ; 15 ppm 雄 ; 0.51~1.41 雌 ; 0.77~1.58	菌糸体 1.9 (30 ppm) 雄の最高用量
	2 年間慢性毒性	菌糸体 : 0、7.5、15、30 ppm、混餌投与	30 ppm 雄 0.57~0.60、 雌 0.73~0.84 体重増加量/食餌効率低下	15 ppm 第1回0.76、第2回0.88 体重増加抑制
	3 世代生殖毒性	菌糸体 : 0、7.5、15、30 ppm、混餌投与	15 ppm 雄 0.7~1.5、雌 1.0~1.8 平均体重低下	15 ppm 1.8 平均体重低下
	発生毒性	菌糸体 ; 0、7.5、15、30 ppm、混餌投与	母体毒性 ; 0.7~1.3 胚毒性/胎児毒性/催奇形性なし	母体毒性 ; 1.3 平均体重低下

モルモット	皮膚感作性	精製物	遅延性過敏症なし	遅延性過敏症なし
ウサギ	一般行動及び中枢神経症状	0、1、10、30、100、 経口投与		10 運動量低下、四肢の脱力、運動失調、筋緊張低下、呼吸抑制
	一般薬理 (<i>in situ</i> 子宮運動)	0、0.03、0.1、0.3、 1、静脈内投与		0.03 子宮収縮低下
	一般薬理 (<i>in situ</i> 前脛骨筋収縮)	0、0.03、0.1、0.3、 1、静脈内投与		0.1 収縮幅の増大
	局所皮膚刺激性	菌糸体/局所塗布 2,000 mg/kg	わずかな皮膚刺激性有、 全身毒性なし	
	眼粘膜刺激性	菌糸体/局所滴下	総投与量不明、眼刺激性有	総投与量 40 mg で 眼刺激性有
	発生毒性/催奇形性	菌糸体：0、0.6、 1.2、1.8、経口投与	母体毒性；0.6 流産、催奇形性なし	母体毒性；0.6 流産、催奇形性なし
イヌ	3 か月間亜急性毒性	菌糸体：0、0.5、 1.0、2.0、経口投与		1.0 脚の筋力低下、運動失調、ECG 異常
		菌糸体：0、0.5、 1.0、2.0、精製： 2.0、経口投与	1.0 脚の筋力低下、体重/臓器重量への影響	
	6 か月間亜急性毒性	菌糸体：0、0.5、 1.0、1.5、経口投与	1.0 ECG 異常	1.0 ECG 異常
	1 年間慢性毒性	菌糸体：0、0.5、 1.0、2.0、精製： 2.0、経口投与	0.5 神経学的/病理組織学的変化	0.5 臨床症状、体重、血液生化学的検査、病理組織学的検査
毒性学的 ADI			ADI: 0.005 mg/kg 体重/日	ADI: 0.005 mg/kg 体重/日
毒性学的 ADI 設定根拠資料			イヌ 1 年間毒性試験、 NOAEL: 0.5 mg/kg 体重/日、SF100	イヌ 1 年間毒性試験、 NOAEL: 0.5 mg/kg 体重/日、SF100
微生物学的 ADI			設定なし	必要なし

<別紙 検査値等略称>

略称	名称
ADI	一日摂取許容量
Alb	アルブミン
ALT	アラニンアミノトランスフェラーゼ (=グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ (GPT))
AST	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (=グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT))
ATP	アデノシン三リン酸
ATPase	アデノシン三リン酸加水分解酵素
AUC	血漿中薬物濃度曲線下面積
BUN	血中尿素窒素
CFU	コロニー形成単位
Chol	コレステロール
C _{max}	最高濃度
CPK	クレアチンホスホキナーゼ
Cre	クレアチニン
ECG	心電図
EFSA	欧州食品安全機関
Glu	グルコース
Hb	ヘモグロビン (血色素量)
HPLC	高速液体クロマトグラフィー
HPLC/ISP-MS	高速液体クロマトグラフィー/イオンスプレー質量分析
Ht	ヘマトクリット値
IgE	免疫グロブリンE
JECFA	FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議
LC-MS	液体クロマトグラフィー/質量分析
LD ₅₀	半数致死量
LDH	乳酸脱水素酵素
LOAEL	最小毒性量
LSC	液体シンチレーションカウンター
MIC	最小発育阻止濃度
MIC ₅₀	50%発育阻止濃度
NOAEL	無毒性量
PLT	血小板数
RBC	赤血球数
T.Bil	総ビリルビン
T.Chol	総コレステロール

TLC	薄層クロマトグラフィー
TP	総タンパク質
UA	尿酸
WBC	白血球数

<参照>

1. 食品、添加物等の規格基準（昭和 34 年厚生省告示第 370 号）の一部を改正する件（平成 17 年 11 月 29 日付、平成 17 年厚生労働省告示第 499 号）
2. The Merck Index. 14th Edition, 2006
3. JECFA: Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. WHO Food Additives Series 61, Narasin: 2009, p133~182.
4. “イオノフォア”. 友田勇, ブラッド獣医学大辞典, 文永堂出版, 1998
5. EFSA: Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on a request of the Commission on the re-evaluation of efficacy and safety of the coccidiostat Monteban^R G100 in accordance with article 9G of Council Directive 70/524/EEC, The EFSA Journal 2004, 90, p1-44
6. 日本イーライリリー株式会社. ナラシンの残留基準の設定に関する資料（未公表）
7. JECFA: Evaluation of certain veterinary drug residues in food, WHO Technical Report Series 954, Narasin: 2008, p71-83
8. 財団法人畜産生物科学安全研究所. “ナラシンのプロイラーを用いた飼養試験”. 2000（未公表）
9. 食品安全委員会、平成 18 年度食品安全確保総合調査；動物用抗菌性物質の微生物学的影響についての調査