

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が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