

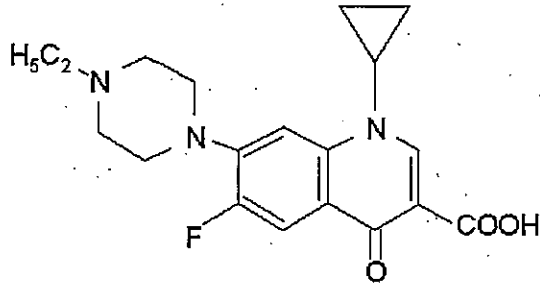
(別添)

エンロフロキサシンの食品健康影響評価について

1. 薬剤の概要

(1) 物質名⁽¹⁾

エンロフロキサシン(Enrofloxacin)



分子式 : C₁₉H₂₂FN₃O₃

分子量 : 359.40

常温における性状 : 淡黄色～黄色の結晶性粉末

融点 : 約 222°C (分解)

溶解度 : 溶解性 クロロホルムに溶けやすく、メタノール、アセトンに溶けにくく、水、エーテルにほとんど溶けない。

蒸気圧 : nonvolatile

(2) 効能・効果

エンロフロキサシンはニューキノロン剤に属し、グラム陰性菌に加え、多くのグラム陽性菌に対しても有効である。作用は殺菌的であり、細菌のⅡ型トポイソメラーゼ^aである DNA ジヤイレーズ、あるいはトポイソメラーゼⅣに作用し DNA 複製を阻害するものと考えられている。⁽²⁾

(3) その他

エンロフロキサシンを主剤とする動物用医薬品は、国内では鶏の呼吸器性マイコプラズマ病、大腸菌症、牛の肺炎、大腸菌性下痢症、豚の胸膜肺炎、大腸菌性下痢症を対象に使用されている。欧州、米国等においも広く使用されているが、米国ではフルオロキノロン耐性カンピロバクターに対するリスクを高める恐れがあるとして鶏への適用を取りやめている。また、代謝物である ciprofloxacin は抗菌活性を有し、ヒト臨床において使用されている。

2. 毒性試験の概要

2-1. 吸収・分布・代謝・排泄

【ラットにおける投与試験】

Wistar 系雄ラット(各 4 匹/群)に ¹⁴C 標識エンロフロキサシン(5mg/kg)を単回強制経口投与あるいは静脈内

^a ノルフロキサシン以降に合成された塩基性環の 6 位にフッ素、7 位に環状塩基性基を有するキノロン薬を総称して言う。

^b DNA 鎖に一時的な切れ目を導入し、閉環 DNA の超らせんの程度の調節や連環状二量体の形成・解除に作用する。

投与し、最長 48 時間までの血液を経時的に採取した。 T_{max} はいずれも投与直後(0.5 時間)に認められ、 C_{max} は経口投与で 570ng-eq/mL、静脈内投与で 1448ng-eq/mL、 $T_{1/2}$ (β 相)はそれぞれ 11.7 と 7.9 時間、AUC は 2941.8 と 3824.3 ng·h/mL で生物学的利用率は 75.3%であった。また、単回強制経口投与後 24 時間までの胆汁中からは約 40%が回収された。

Wistar 系雄ラット(各 3 匹/群)に ^{14}C 標識エンロフロキサシン(5mg/kg)を単回強制経口投与し、2、4、8、24、36、48 時間後の肝臓、腎臓、筋肉、脂肪中の放射活性が測定されている。放射活性は各組織とも投与 2 時間後に最高濃度に達し、その時の濃度は順に 1.85、1.14、0.52、0.02ppm であった。その後の消失は速やかであり、投与後 48 時間ではすべて 0.01ppm 以下となった。

6 時間後までの胆汁中の主要な代謝物は未変化体で 73.6%を占め、極性代謝物が 9.8%、シプロフロキサシンが 4.6%、その他 5 種類の未同定代謝物が検出された。尿中からは未変化体が 30.3%、シプロフロキサシンが 33.8%、極性代謝物が 24.7%検出された。⁽³⁾

Wistar 系ラットに ^{14}C 標識エンロフロキサシン 165mg/kg 体重/日を 3 日間、50mg/kg 体重/日を 4 日間連続で強制経口投与し、6 日目の投与後 24 時間までの尿について代謝物の同定が実施されている。主要な化合物として未変化体が雌 36.2%、雄 30.5%、極性代謝物が雌 31.2%、雄 26.0%、シプロフロキサシンが雌 19.0%、雄 28.9%検出された。⁽⁴⁾

未同定の極性代謝物についてさらに詳細な検討が実施されたところ、この代謝物はエンロフロキサシンのグルクロン酸抱合体であることが示唆された。⁽⁵⁾

【ウシにおける投与試験】

3 日～約 8 週齢のウシ(フリージアン種)にエンロフロキサシン 2.5 mg/kg を静脈内(6 頭)、皮下(10 頭)あるいは経口(各 4 頭)経路で単回投与し、*E. coli* を検定菌としたバイオアッセイ法により最長 24 時間までの血清中濃度が検討された。

静脈投与における T_{max} は投与直後(0.5 時間)で C_{max} は $1.8 \pm 0.3 \mu\text{g/mL}$ 、 $T_{1/2}$ (β 相)は 5.4 ± 0.9 時間で、24 時間後の平均血清中濃度は $0.06 \mu\text{g/mL}$ であった。皮下投与の T_{max} は投与後 1～2 時間(1.7 ± 0.48)に認められ、 C_{max} は $1.1 \pm 0.24 \mu\text{g/mL}$ で、2 時間後以降は静脈投与と同様に推移した。経口投与はミルク媒体と直接投与の 2 試験が実施され、 T_{max} はそれぞれ 4-6 時間、1 時間、 C_{max} は $0.9 \pm 0.23 \mu\text{g/mL}$ 、 $1.5 \pm 0.45 \mu\text{g/mL}$ であった。24 時間後の血清中濃度はそれぞれ 0.3 ± 0.19 、 $0.2 \pm 0.22 \mu\text{g/mL}$ であった。

また、各群 6 頭のウシに 2.5 あるいは 5mg/kg 体重を皮下投与後 24 時間間隔でさらに 2 回経口投与し、1、2、4、6、24 時間後の血液がそれぞれ採取された。 T_{max} は投与量にかかわらず皮下投与で 2 時間、経口投与で 6 時間、 C_{max} は 2.5 mg 投与群の皮下投与で $1.5 \pm 0.47 \mu\text{g/mL}$ 、経口投与は 2 回ともに $1.1 \pm 0.3 \mu\text{g/mL}$ 、5.0mg 投与群の皮下投与で $2.2 \pm 0.21 \mu\text{g/mL}$ 、1 回経口投与後で $1.8 \pm 0.3 \mu\text{g/mL}$ 、2 回経口投与後で $1.9 \pm 0.59 \mu\text{g/mL}$ で、蓄積性は認められなかった。

さらに、各群 6 頭のウシを用いて 2.5mg/kg 体重を単回筋肉内投与後 1、4、12 時間の血清、胆汁、尿及び各組織中濃度が検討された。投与 1 及び 4 時間後に血清中より高濃度の抗菌活性が検出されたのは、肺、腎臓、肝臓、脾臓、心臓、リンパ節、腸管壁で、特に腎臓と肝臓で約 3～4 倍の濃度であった。4 時間後で最高値となった尿を除き組織中濃度は経時的に減少していた。⁽⁶⁾

3～4 週齢の仔ウシに ^{14}C 標識エンロフロキサシン 5mg/kg 体重/日を 7 日間強制経口投与し、最終投与後 12 あるいは 72 時間における肝臓、腎臓、筋肉及び脂肪中の代謝物の同定が実施されている。主要な化合物は未変化体とシプロフロキサシンで、肝臓でシプロフロキサシンが 51.1%、未変化体が 30.9%、腎臓でそれぞれ 45.3%、37.4%、筋肉で 44.4%、51.5%、脂肪で 37.3%、49.9%検出された。検出濃度は経時的に減少したが、肝臓で最も高濃度であった。⁽⁷⁾

【ブタにおける投与試験】

ブタ(ジャーマンランドレース種)にエンロフロキサシン 2.5 mg/kg を筋肉内(18 頭)または経口(17 頭)経路で単回投与し、*E. coli* を検定菌としたバイオアッセイ法により最長 24 時間までの血清中濃度が検討された。

T_{max} は筋肉内投与で 1 時間(1.3±0.49)、経口投与で 2 時間(2.3±1.0)、 C_{max} はそれぞれ 0.8±0.12、0.6±0.19µg/mL、 $T_{1/2}$ は 5.8±1.2 時間、6.8±2.9 時間であった。24 時間後の濃度はそれぞれ 0.05、0.06µg/mL となった。

2.5mg/kg 体重を単回筋肉内投与後 1、2、4、6、8、12 時間の血清、胆汁、尿及び各組織中濃度が検討された。一般に組織中濃度は血清中より高濃度で、尿を除き 1 あるいは 2 時間後に最も高濃度を示した。投与後 2 時間目以降は、6 時間後で最高値となった尿を除き組織中濃度は経時的に減少していた。⁽⁶⁾

ブタに ¹⁴C 標識エンロフロキサシン 5mg/kg 体重/日を 7 日間強制経口投与し、最終投与後 12 あるいは 72 時間における肝臓、腎臓、筋肉及び脂肪中の代謝物の同定が実施されている。主要な化合物は未変化体とシプロフロキサシンで、あわせて 78~98%を占め、そのほとんどは未変化体であった。検出濃度は経時的に減少したが、肝臓で最も高濃度であった。⁽⁸⁾

【イヌにおける投与試験】

ビーグル犬にエンロフロキサシン 2.5 mg/kg 体重および 5.0 mg/kg 体重を単回皮下投与(各 6 頭)、または 5.0 mg/kg 体重(15 頭)を単回経口投与し、*E. coli* を検定菌としたバイオアッセイ法により最長 24 時間までの血清中濃度が検討された。

T_{max} は皮下投与で 0.8±0.3 時間、経口投与で 2.6±1.2 時間、 C_{max} は皮下投与の 2.5mg 投与群で 1.0±0.39µg/mL、5.0mg 投与群で 1.0±0.39µg/mL、経口投与で 1.2±0.47µg/mL、 $T_{1/2}$ は皮下投与で 4.3±1.6 時間、経口投与で 2.3±0.7 時間であった。24 時間後の血清中濃度は皮下投与では用量順に 0.03±0.03、0.03±0.02µg/mL、経口投与では検出限界未満であった。

5.0 mg を単回経口投与した 1 時間後の血清、胆汁、尿及び各組織中濃度は、ほとんどの臓器で血清中より高濃度であった。⁽⁶⁾

【鶏における投与試験】

3~6 週齢の雄ブロイラー(各群 18 羽)にエンロフロキサシン 2.5、10 mg/kg 体重を単回皮下投与、または 2.5、5.0、10 mg/kg を単回経口投与し、*E. coli* を検定菌としたバイオアッセイ法により最長 24 時間までの血清中濃度が検討された。

経口投与後の T_{max} は投与後 1~2 時間で、 C_{max} は 2.5 mg 投与群で 0.5µg/mL、5.0 mg 投与群で 0.6µg/mL、10 mg 投与群で 1.4µg/mL、 $T_{1/2}$ は 2~4 時間(2.0~3.5±0.4 時間)であった。皮下投与後の T_{max} は 0.5~1 時間で、 C_{max} は 2.5 mg 投与群で 0.4µg/mL、10 mg 投与群で 1.9µg/mL、 $T_{1/2}$ は 2~6 時間であった。24 時間後の血清中の抗菌活性は 10mg 投与量群でのみわずかに検出された。

2.5mg/kg 体重の単回経口投与において、血清及び組織中濃度は 1 時間に最高値となり、経時的に減少して 24 時間後には検出限界未満となった。10mg/kg 体重の単回経口投与では、血清及び組織中濃度は約 2 時間で最高値となり、その後は経時的に減少した。24 時間後では肝臓が最も高く 0.1µg/g であった。

また、エンロフロキサシン 25、50、100ppm を含む水あるいは 50、200ppm を含む飼料を 14 日間自由

摂取させ、2、7、14 日目に血液を採取し、血清中の抗菌活性が検討された。飲水投与における血清中濃度は25ppm 投与群で0.3-0.5 μ g/mL、50ppm 投与群で0.6-0.9 μ g/mL、100ppm 投与群で1.1-1.3 μ g/mL、50 ppm、200 ppm 混餌投与における血清中濃度は25ppm、100ppm の飲水投与とほぼ同等であった。試験期間中を通じて血清中濃度はほぼ同等であった。⁽⁶⁾

6~7 週齢の鶏に対してエンロフロキサシン 5mg/kg 体重を静脈内あるいは経口経路で単回投与したときの $T_{1/2}$ はそれぞれ 18.7、14.9 時間と報告されている。AUC の比較から求められた生物学的利用能率は 84.5%であった。⁽⁹⁾

30 日齢の鶏に対して 14 C 標識エンロフロキサシン 12mg/kg 体重/日を7及び10 日間経口投与し、最終投与6 時間後の肝臓、筋肉、皮膚における残留物が検討されている。いずれの組織においても主要残留物はエンロフロキサシンで 65.7、78.5、49.7%を占めた。また、シプロフロキサシンがそれぞれ 13.3%、3.1%、4.1%検出された。その他の代謝物は微量であったが、皮膚については未同定の 1 代謝物が 7.6% 検出された。^{(10)、(11)}

2-2.毒性試験

(1)急性毒性試験^{(12)、(13)、(14)、(15)}

経口投与による LD_{50} は Bor:CFW1 マウスの雄で 5000 mg/kg 体重以上、雌で 4336 mg/kg 体重、Wistar 系ラットの雌雄で 5000mg/kg 以上、ウサギ(大型チンチラ種)の雌雄で 500-800mg/kg であった。イヌ(ビーグル)では被験物質を嘔吐したため LD_{50} の算出は不可能であった。静脈内投与による LD_{50} は CFW1 マウスの雄で 225 mg/kg 体重、雌で 220 mg/kg 体重であった。

また別の試験においては、経口投与による LD_{50} は ICR 系マウスの雌雄、Wistar 系ラットの雌雄とも 5000mg/kg 以上、筋肉内投与では CD-1 マウスの雌雄、Wistar 系ラットの雌雄とも 1000mg/kg 以上、静脈内投与では CD-1 マウスの雄で 136.0 mg/kg 体重、雌で 143.9 mg/kg 体重、Wistar 系ラットの雄で 233.2 mg/kg 体重、雌で 210.0 mg/kg 体重であった。

皮下投与では、CD-1 マウスの雌雄、Wistar 系ラットの雌雄とも 3000 mg/kg 以上であった。

(2)亜急性毒性試験

【ラットを用いた 4 週間亜急性毒性試験】⁽¹⁶⁾

6 週齢の Wistar 系ラットを用いた皮下(0、5、40、300 mg/kg/日)投与における 4 週間の亜急性毒性試験において認められた毒性所見は以下の通りであった。各群の動物数は 0、300 mg 投与群では雌雄各 16 匹、5、40 mg 投与群では雌雄各 10 匹で、このうち 0、300 mg 投与群の雌雄各 6 匹は、投与終了後 4 週(28 日)間休養する回復群にあてた。なお、300mg 投与群の雄の 3 匹が試験期間中に死亡した。

一般的な臨床症状観察では、40mg 以上投与群の雄及び 300mg 投与群の雌で投与部位に皮膚の膨隆を伴う硬結が認められた。300mg 投与群では投与の反復につれその数、硬度が増し、投薬期間後半では背部全体が膨隆する重度の変化が認められ、皮膚の一部が潰瘍化する例もあった。また、300mg 投与群の雄では、20 日目頃から全身筋肉の緊張度低下を伴って行動が緩慢になり、眼は退色傾向を示した。休薬開始後は、投与部位の変化は経過につれて軽減消退し、行動や眼の変化もみられなくなった。

体重変化では、300 mg 投与群において雄で低値、雌で高値が認められた。休薬開始後は雌雄とも対照群と比較して有意差は認められなくなった。

摂餌量では各投与群において有意差は認められなかった。

⁶ 午前 8 時から午後 5 時にかけて 1 時間毎に血液を採取しプールしたもの。

眼科的検査(検眼鏡)においては、投与終了時、休薬後ともに異常は認められなかった。

尿検査では、300 mg 投与群において雌雄に比重の増加、雄にケトン体、リン酸マグネシウムアンモニウム結晶の増加が認められた。休薬期間終了時では雌雄ともこのような変化はみられなかった。休薬終了時の300 mg 投与群において尿中精子数が対照群に比べて多い傾向が認められた。

血液学的検査は投与終了時及び休薬期間終了時に実施されている。5 mg 投与群の雌に血小板数の増加が認められたが、用量相関性が無く、皮下投与による出血に伴う影響と考えられた。40 mg 以上投与群の雌雄に主に好中球、リンパ球の増加に伴う白血球数の増加ならびに血小板数の増加、雄に Hb、Ht の減少が認められ、さらに300 mg 投与群では雌雄で網状赤血球の増加を伴う赤血球数の減少、雄で MCV、MCH の減少が認められた。これらの変化はいずれも休薬終了時には雌雄とも回復した。なお、休薬終了時における300 mg 投与群のリンパ球、白血球数は対照群を下回った。

血液生化学的検査は投与終了時及び休薬期間終了時に実施されている。40 mg 以上投与群の雌雄でアルブミン量の減少が認められ、これに伴って40mg 以上投与群の雄及び300mg 投与群の雌で総たん白質量、A/G 比が低下していた。雄で塩素、雌でナトリウムの低値が認められた。また300mg 投与群の雌雄で GPT 活性、カルシウム、ナトリウム及び塩素の減少、AP、TG の増加、雄で Tcho、BUN の減少、無機リンの増加、雌でカリウムの増加が認められた。休薬期間終了時では300 mg 投与群雄の GPT 及びカルシウムの減少が認められた以外は回復した。

臓器重量では、40mg 以上投与群の雄及び300mg 投与群の雌で脾臓の相対及び絶対重量の増加が認められた。300mg 投与群の雌雄で肺重量の増加、雄で唾液腺、胸腺重量の減少、雌で肝重量の増加、子宮重量の減少が認められた。

剖検では、40 mg 以上投与群の雌雄において投与部皮下に出血点、遺残被験物質及び浸出液を含む肉芽嚢が高頻度で、雄で脾臓の腫大が40mg で1/10、300mg では全個体で認められた。その程度は300mg 投与群でより強く、肉芽嚢は全ての個体で認められ、皮膚潰瘍を伴う例もあった。300mg 投与群の雌でも脾臓の腫大が9/10で認められた。また、300 mg 投与群では盲腸の拡張が全ての個体で認められた。300mg 投与群の休薬期間終了時では雌で盲腸の拡張、投与部皮下の出血点が認められた。

病理組織学的検査では、対照群および5mg 群では投与部位に炎症が認められたものの軽度であった。40mg 以上の群では投与部位の炎症性変化は増強し、中心部に被験物質を入れる肉芽嚢の形成がみられ、300mg 群では重度であった。また投与部位における炎症の反応性変化として40mg 以上投与群の雌雄に骨髓で顆粒球系細胞の過形成、脾臓で造血亢進が認められ、300mg 投与群では雌雄で肝臓における顆粒球系細胞の造血が認められた。その他では、被験物質投与に起因した変化は認められなかった。

本試験における NOAEL は5mg/kg 体重/日であった。

【ラットを用いた13週間亜急性毒性試験】

42日齢のCD(SD)BR系ラット(雌雄各15匹/群)を用いた混餌(0、500、2000、7500ppm:雄36.5、150.0、577.5mg/kg 体重/日、雌45.0、182.0、690.0mg/kg 体重/日)投与における13週間の亜急性毒性試験において認められた毒性所見は以下の通りであった。なお、試験期間中に500ppm 投与群の1匹が死亡した。

一般的な臨床症状観察では特に被験物質の投与に起因した異常は認められなかった。また眼検査(直接検眼鏡)にも異常は認められなかった。

体重変化では、7500ppm 投与群の雌雄で体重増加量の減少と体重の低値が認められた。

摂餌量では、7500ppm 投与群の雌雄で飼料効率がやや低下していたが、その他に差は認められなかった。

血液学的検査は、6週と13週時点の2回が実施されている。7500ppm投与群の雌雄でHbの低値、雌でHtの低値が認められた。Htの低値は7500ppm投与群の雄でも認められたが統計学的な有意差はなかった。6週の7500ppm投与群の雌雄で血小板数の増加が認められた。13週の7500ppm投与群の雌雄においても血小板数の増加が認められたが、統計学的に有意ではなかった。13週の雄でMCVの低値が認められた。

血液生化学的検査は、6週と13週時点で2回が実施されている。2000ppm投与群の13週の雌及び7500ppm投与群の6、13週の雌雄で血清総たん白質の低値が認められた。これはグロブリンの低下に起因しており、7500ppm投与群の雌雄で低値が認められ、雄ではA/G比も高値を示した。7500ppm投与群の6、13週目の雄でASTの低値が認められ、6週の雄の全投与群、13週では雄の7500ppm投与群でALTの低値が認められた。また、2000ppm以上投与群の6週目の雄、7500ppm投与群の13週目の雌雄で無機リンの高値、2000ppm以上投与群でTBILの低値が認められたが、13週では認められなかった。

尿検査では6週目の2000ppm以上投与群の雄、13週目の2000ppm以上投与群の雌でナトリウムの減少が認められた。

臓器重量では、2000ppm以上投与群の雄で前立腺の絶対及び相対、雌で心臓の絶対重量の低値が認められた。2000ppm投与群では雌の心臓の相対重量は低値であった。7500ppm投与群の雄の心臓の絶対重量は高値を示した。7500ppm投与群の雌雄で肝臓の絶対重量の低値が認められ、雌では統計学的に有意であった。また、雄で精巣の相対重量の高値、雌で脾臓の絶対及び相対重量の高値が認められた。なお、報告書においては、前立腺で認められた重量の低値について、対照群で前立腺炎が認められ、重量が増加したために有意差が認められたと考察されている。

剖検及び病理組織学的検査では、盲腸の拡張が2000ppm以上投与群の雄及び7500ppm投与群の雌で認められた。高用量群の雄の精巣上体及び精巣に病変が認められ、精巣上体管内及び精巣精細管内で精子集団の間に変性あるいは壊死過程の精子細胞が認められた。また、高用量群の3匹(3/30)に膝関節の軟骨変性、骨膜液増生、慢性滑液包炎が認められた。対照群を含めて耳介の腫脹が認められ、病理組織学的には耳介軟骨の異常(発生頻度は用量順に1、1、6、10)と肉芽腫が認められた。⁽¹⁷⁾

上記試験で精巣への影響が示唆されたため、さらに詳細な検討が実施された。37日齢の雄CD@BR系ラットを用いた混餌(0、125、500、7500ppm:9.9、38.0、615.0mg/kg体重/日)投与における13週間の亜急性毒性試験において認められた毒性所見は以下の通りであった。対照群、125ppm投与群、500ppm投与群は各2群(15匹/群)、7500ppm投与群は3群(15匹/群)を設定し、14日目に7500ppm投与群の1群、91日目に各用量1群を剖検し、残りの各1群は181日目まで無投薬で飼育し、回復が観察された。なお、試験期間中に125ppm投与群の1匹が死亡した。

一般的な臨床症状観察では特に被験物質の投与に起因した異常は認められなかった。

体重変化では、7500ppm投与群で体重増加量の減少と体重の低値が認められた。これは回復期の後期には回復した。

摂餌量では、7500ppm投与群で飼料効率がやや低下した。

臓器重量では、500ppm投与群で精巣上体の絶対重量の低値、7500ppm投与群で精巣上体の絶対及び相対重量の低値及び精巣の相対重量の高値が認められた。

剖検及び病理組織学的検査では、7500ppm群の14日目の検査で10/15に精巣内の異常精子が認められ、全例で精巣上体管中に異常精子の増加、壊死細胞、成熟精子の減少が認められた。91日目の検査で7500ppm投与群の全例で精細管と精巣上体管に、500ppm投与群の3例で精巣上体管に異常精子が認めら

れた。181 日目の検査ではいずれのラットの精巣にも異常精子は認められなかった。精巣の小型化が 91 日目の剖検で、7500ppm 群の 1 例(片側)、181 日目の剖検では、500ppm 投与群の 1 例(片側)および 7500ppm 投与群の 2 例(両側)に認められ、病理組織学的にいずれも萎縮性的変化が認められた。⁽¹⁸⁾

本試験における NOAEL は 9.9mg/kg 体重/日であった。

【イヌを用いた 13 週間亜急性毒性試験】

12~13 カ月齢のビーグル犬(雌雄各 4 頭/群)を用いた混餌投与(0、320、800、2000ppm; 雄 0、9.3、22、53mg/kg 体重/日、雌 0、8.9、23、51mg/kg 体重/日)による 13 週間の亜急性毒性試験において認められた毒性所見は以下の通りであった。

一般的な臨床症状観察では、嘔吐が全ての群で観察されたが、2000ppm 投与群で顕著であった。

体重変化では、800ppm 以上の投与群の雄及び 2000ppm 投与群の雌で試験の初期に体重減少が認められた。同時期においては飼料摂取量も減少していた。これらは試験期間中に回復した。

血液学的検査、尿検査、眼検査(直接検眼鏡)では、特に被験物質の投与に起因した異常は認められなかった。

血液生化学的検査では、試験の初期に 800ppm 以上投与群の雄でグロブリンの低値、A/G 比の高値、総たん白質の減少傾向が認められた。これらは、試験の進行に伴って回復もしくは回復傾向を示した。

臓器重量、剖検及び病理組織学的検査では、特に投与に起因した異常は認められなかった。⁽¹⁹⁾

【若齢イヌを用いた 13 週間亜急性毒性試験】

3 カ月齢のビーグル犬(雌雄各 4 頭/群)を用いた混餌投与(0、100、320、2500ppm; 0、3.0、9.6、75mg/kg 体重/日)による 13 週間の亜急性毒性試験において認められた毒性所見は以下の通りであった。

一般的な臨床症状観察では、初期に散発的な嘔吐、下痢が 100 及び 2500ppm 投与群で認められた。2500ppm 投与群の雌雄に活動低下(1/4、2/4)、前脚の手根関節の過伸展(2/4、2/4)が認められた。手根関節の異常は 2 週目には 2500ppm 投与群の全頭で認められるようになった。前脚の X 線検査が 2500ppm 投与群 3 頭、100 及び 320ppm 投与群各 2 頭、対照群 1 頭について実施されたが、2500ppm 投与群では橈骨手根部再形成が認められた。

体重変化、摂餌量に特に被験物質の投与に起因した変化は認められなかった。

血液学的検査、血液生化学的検査は試験終了時のみ実施されているが、特に被験物質の投与に起因した異常は認められなかった。

尿検査では、2500ppm 投与群の尿中に結晶が認められた。尿沈渣からはエンロフロキサシン及びシプロフロキサシンが検出された。

眼検査(直接検眼鏡)で異常は認められなかった。

臓器重量では、対照群との比較で全投与群の精巣の相対及び絶対重量の増加が認められたが、投与群間での用量相関性、有意差はともに認められなかった。

剖検及び病理組織学的検査では、320ppm 投与群の 2 頭(2/8)及び 2500ppm 投与群の 7 頭(7/8)で股関節、2500ppm 投与群の全頭で後膝関節、雌 1 頭で肩関節に異常が認められた。320ppm 投与群の 1 頭で大腿骨頭にびらん、2500ppm 投与群の全例に股関節の大腿骨頭部及び/又は膝関節の大腿骨頭に表面上の混濁を伴う表面のびらんが認められた。精巣については、成熟段階に個体による差が認められ、対照群 1 頭、320ppm 投与群 3 頭では成熟、対照群 3 頭、320 及び 2500ppm 投与群各 1 頭では未成熟であることが明らかであった。認められた所見は精細管の内腔の拡張と精細管に満たされている精原細胞の空胞状変化であっ

た。内腔の拡張は対照群を含め全ての投与群で認められた(1、1、2、1)。精原細胞の空胞状変化は対照群 1 頭、100ppm 投与群 2 頭、2500ppm 投与群 3 頭で認められ、100ppm 及び 2500ppm 投与群の所見は正常範囲外とされていたが、320ppm 投与群では認められず、用量相関性は認められなかった。⁽²⁰⁾

上記試験で認められた精巣の変化を明らかにするため、若齢イヌを用いた追加試験が実施されている。

3ヵ月齢の雄ビーグル犬(各4頭/群)を用いた混餌投与(0、10、20、40、3200ppm;0、0.3、0.6、1.2、92.1mg/kg 体重/日)による13週間の亜急性毒性試験において認められた毒性所見は以下の通りであった。試験期間中に死亡例はなかった。

一般的な臨床症状観察では、対照群を含め散発的に軟便/下痢、嘔吐が認められた。3200ppm 投与群で活動低下、手根関節の過伸展、後肢の硬直が投与初期から認められ、幾分軽減したものの試験終了時まで継続して認められた。

体重変化では3200ppm 投与群で3週間まで体重増加の抑制が認められた。摂餌量では3200ppm 投与群で5週まで低値が認められた。

眼検査(直接検眼鏡)では特に異常は認められなかった。

臓器重量では、精巣重量の変動幅は大きかったが、用量に相関した変動は認められず、成熟段階の差によるものと考えられた。

剖検では精巣及び精巣上体に特に異常は認められなかった。

病理組織学的検査では、先の試験と同様、精巣の成熟段階の違いによるばらつきが認められた。精細管中の精原細胞の空胞状変化は対照群を含めた全て群で認められたが、投与量による差はなく生理的変動の範囲内と考えられた。3200ppm 投与群では1頭で両側性の精巣の異常が認められ、精細管に多核巨細胞と、時に有糸分裂像を認める大きな核を有する大型の細胞が認められた。⁽²¹⁾

幼若時の暴露が成長後に影響を及ぼすかについて追加で検討が行われている。

3ヵ月齢の雄ビーグル犬(各4頭/群)を用いた混餌投与(0、10、40ppm;0、0.3、1.2mg/kg 体重/日)による13週間の亜急性毒性試験において認められた毒性所見は以下の通りであった。全ての動物は13週間の投与期間終了後、さらに13週間休薬し、その後精巣及び精巣上体の病理組織学的検査を実施した。

一般的な臨床症状観察、体重変化、飼料摂取量、剖検及び病理組織学的検査では、いずれも特に被験物質の投与に起因した異常は認められなかった。精巣及び精巣上体はいずれも成熟し、正常な精子を含有していた。⁽²²⁾

本試験におけるNOAELは3mg/kg 体重/日であった。

(3)慢性毒性試験

【マウスを用いた2年間発がん性慢性毒性併合試験】⁽²³⁾

B6C3F₁マウス(雌雄各60匹/群)を用いた混餌(0、1000、3300、10000ppm;雄0、323、1097、3526mg/kg 体重/日、雌0、373、1206、3696mg/kg 体重/日)投与による2年間の発がん性試験において認められた毒性所見は以下の通りであった。各群10匹は12ヵ月の時点で中間剖検された。また中間剖検用に雌雄各10匹/群について、各投与群に加え20000ppm(雄8031、雌8007 mg/kg 体重/日)が12ヵ月間混餌投与された。

一般的な臨床症状観察では、中間剖検された20000ppm 投与群を含め特に被験物質の投与に起因した異常は認められなかった。試験期間中の死亡率に差は認められなかった。

体重変化では、10000ppm以下の投与群では雌雄でしばしば顕著な高値が認められた。20000ppmでは対照群と差は認められなかった。

摂餌量、飲水量では、10000ppm以下の投与群では差は認められなかった。20000ppm投与群では雌雄で摂餌量・飲水量ともやや多かった(但し、20000ppm投与群は12ヶ月間、対照群ないし10000ppm以下の群では24ヶ月間投与の平均値の比較)。

血液学的、血液生化学的検査は12ヶ月と試験終了時の2時点で実施されている。

血液学的検査では、12ヶ月の時点で雄の全投与群と雌の3300ppm以上投与群でMCVの低値が認められたが、試験終了時には雄の3300ppm以上投与群と雌の10000ppm投与群のみとなった。12及び24ヶ月のいずれの時点でも雄の3300ppm以上投与群、雌の10000ppm以上投与群でMCHの低値が認められた。12ヶ月時点で雄の10000ppm以上投与群、試験終了時で3300ppm以上投与群の雄及び10000ppm投与群の雌で白血球数の減少が認められた。また、12ヶ月時点でHb、Htの低下が20000ppm投与群の雄、10000ppm以上投与群の雌で認められた。10000ppm以上投与群の雌雄でHb、Htの低下が12ヶ月及び/又は試験終了時で認められた。その他いくつかの項目で散発的に有意差を示す項目が認められたが、毒性学的意義はないと考えられた。

血液生化学的検査では、12ヶ月時点で3300ppm以上、試験終了時で10000ppm投与群の雌でAPの低値が認められた。ALT、ASTには異常は認められなかった。12ヶ月時点の雄の20000ppm投与群、雌の3300ppm以上投与群、試験終了時の雄の10000ppm投与群、雌の3300ppm以上投与群で総たん白質の減少が認められ、アルブミンの知見からグロブリンの低値によるものと考えられた。また、12ヶ月時点で、雌の10000ppm以上投与群でCREAの増加を認めた。その他散発的に有意差のある項目が散見されたが毒性学的意味は無いと考えられた。

試験終了時での眼検査では10000ppm投与群の雌雄で限局的な混濁が認められたが、病理組織学的検査では異常は認められなかった。

臓器重量では雌において12ヶ月時点で20000ppm投与群、試験終了時で10000ppm投与群に腎臓の相対及び絶対重量の増加が認められた。他にも有意差のある項目が散見されたが、多くは体重差に起因するものであり、その他用量相関性や程度から毒性学的な意義のある変化とは認められなかった。

試験終了時の剖検では、雄の1000ppm以上投与群、雌の3300ppm以上投与群で盲腸の拡張が認められた。他には期間途中の剖検例も含め、特に被験物質の投与に起因した異常は認められなかった。

病理組織学的検査では、3300ppm以上投与群の雄及び10000ppm投与群の雌で胆管過形成と胆嚢の限局性の粘膜乳頭状過形成が認められた。腫瘍の発生率については、投与群間で特に被験物質の投与に起因した有意差は認められなかった。

本試験において発がん性は認められなかった。また、盲腸の拡張を除いたNOAELは323mg/kg体重/日であった。

【ラットを用いた2年間慢性毒性/発がん性併合試験】^{(24), (25), (26), (27), (28)}

Wistar(Bor:WISW)ラット(雌雄各50匹/群)を用いた混餌(0, 770, 2000, 6000ppm; 雄0, 41.0, 103.4, 337.6mg/kg体重/日、雌0, 57.7, 146.0, 465.6mg/kg体重/日)投与による2年間の発がん性試験において認められた毒性所見は以下の通りであった。また同時に中間剖検用に別途各用量について雌雄各10匹/群及びさらに10000ppm(雄855.5, 雌1001.4mg/kg体重/日)が設定され12ヶ月間混餌投与された。

群間比較では有意な生存率の変化は認められなかった。

体重変化では6000ppm投与群の雄及び10000ppm投与群の雌雄で体重増加量の減少が認められたが、770, 2000ppm投与群の雄では増加していた。体重増加量の減少は10000ppm投与群の雄で顕著であった。

飼料摂取量では10000ppm 投与群の雌雄で、飲水量は6000ppm 以上投与群の雌雄で増加が認められた。

血液学的検査は6、12、18、24 カ月に実施されている。6 カ月の時点において、RBC、Hb、Ht、MCV の低値が認められ、6000ppm 以上投与群の雄の Ht、10000ppm 投与群の雄の RBC、雌雄の Hb、雌雄の Ht は背景対照をうわまわっていた。また、白血球数の減少も認められたがこれは抗生物質の場合、細菌が死滅することにより二次的によく認められる現象である。これらはいずれも24 カ月時点では差は認められなかった。

血液生化学的検査は6、12、18、24 カ月に実施されている。雄の全ての投与群で24 カ月の2000ppm 投与群を除き6 カ月以降のいずれの時点においても総たん白質の有意な減少が認められた。雌では6 カ月時点及び試験終了時に2000ppm 以上投与群、12 カ月時点で2000ppm 及び10000ppm 投与群で減少が認められた。総たん白質の減少はたん白質の電気泳動による解析結果からグロブリンの低下によるものと考えられた。報告者は、抗菌剤の投与により病原体が減少し、免疫系の活性化が低下したものと考察している。

尿検査ではたん白質排泄量が減少したが、これは血液中のたん白質の減少に伴うものと考えられた。

眼検査では特に被験物質投与の影響は認められなかった。

臓器重量では、2000ppm 以上投与群の雄で肝臓の相対及び絶対重量の減少が認められた。雌では中間剖検で770 と10000ppm 投与群で同様の変化が認められたが用量相関性はなく、試験終了時では2000ppm のみで認められ一貫性がない結果であった。その他散発的な変化が認められたが多くは体重差に起因するものであり、毒性学的な意義は不明であった。

最終剖検時の肉眼的所見では、2000ppm 以上投与群の雌雄で肝嚢胞の増加、6000ppm 投与群で盲腸の拡張が認められた。

病理組織学的検査では、中間剖検時に線維化を伴う胆管過形成が対照群を含めた雄の全ての群及び雌の6000ppm 以上投与群で認められ、雄の6000ppm 以上投与群では有意であった。また、精巣萎縮が6000ppm 以上投与群で認められ、10000ppm では有意であった。試験終了時では線維化を伴う胆管過形成及び嚢胞性胆管過形成、精巣の萎縮及び石灰沈着、心筋症、骨格筋線維の核数の増加が対照群を含めた雌雄で認められ、線維化を伴う胆管過形成は雄の全ての投与群と雌の2000ppm 以上投与群、嚢胞性胆管過形成は雄の2000ppm 以上投与群と雌の6000ppm 投与群、雄の精巣萎縮、石灰沈着は6000ppm 投与群、心筋症は雌の全ての投与群と雄の6000ppm 投与群、骨格筋変化は雌雄の6000ppm 投与群で有意であった。

腫瘍発生については、中間剖検ではほとんど認められなかった。試験終了時では、雄の6000ppm 投与群で甲状腺の C-細胞腺腫の発生頻度の増加が認められ、腺癌との合計では統計学的に有意となったが、背景対照の範囲内であった。雌の6000ppm 投与群で統計学的な有意差はないが、心内膜下間葉性細胞腫瘍(神経鞘腫)の増加が認められた。これを心内膜下間葉性細胞過形成と合算した場合、統計学的に有意に増加した。この所見は別途評価された結果、本試験では対照群の雌雄で心内膜下間葉性細胞腫と過形成の発生がなく、対照群における同病変の頻度は背景データより低い値であること、雄では用量相関性が観察されなかったこと等から、雌雄ともこれらの病変の増加は投与との関連性はないと結論されており、EMEA および JECFA においてもその結論は支持されている。また、本試験の雌雄で増加した心筋症との関連性も認められていない。さらに、心内膜下神経鞘腫はラットにのみ発生する種特異的な腫瘍であると考えられている。これらの結果より、心内膜の腫瘍性病変の発生頻度の増加が投与に関連する可能性は極めて低く、またヒトへの外挿性はないと考えられる。その他の腫瘍及び悪性腫瘍の頻度に差は認められなかった。

本試験において発がん性は認められなかったが、770ppm 投与群においても胆管過形成及び心筋症が

認められたため、NOAELは求められなかった。

上記で認められたいくつかの病変についてのNOAELを確認するため、同系統のラットを用いた追加試験が実施されている。

Wistar(Bor:WISW)ラット(雌雄各50匹/群)を用いた混餌(0、100、500ppm;雄0、5.3、26mg/kg体重/日、雌0、7.2、36mg/kg体重/日)投与による2年間の発がん性/慢性毒性試験において認められた毒性所見は以下の通りであった。各群雌雄各10匹は12ヵ月の時点で中間剖検に供された。

生存率、一般臨床症状観察、眼検査、摂餌量、飲水量、体重変化、血液学的検査、血液生化学的検査、臓器重量には投与に起因した異常は認められなかった。

剖検及び病理組織学的検査では、雄で肝臓の肥大が認められたが、重量及び病理組織学的に後述の変化を除き異常は認められなかった。肝臓で線維化を伴う胆管過形成が中間剖検時で雄の100ppm以上投与群、試験終了時で雌雄の500ppm投与群で認められた。

腫瘍形成については肝臓と心臓のみ病理組織学的検査が実施されているが特に腫瘍の発生率の上昇は認められなかった。

上記2試験で最低投与量においても線維化を伴う胆管過形成が認められたことから、この病変に対するNOAELを決定するため、再度試験が実施された。

Wistar(Bor:WISW)ラット(雌雄各50匹/群)を用いた混餌(0、10、50ppm;雄0、0.6、2.9mg/kg体重/日、雌0、0.7、3.5mg/kg体重/日)投与による2年間の慢性毒性試験において認められた毒性所見は以下の通りであった。各群雌雄各10匹は12ヵ月の時点で中間剖検に供された。

生存率、一般臨床症状観察、眼検査、摂餌量、飲水量、体重変化、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、臓器重量、剖検及び病理組織学的検査において被験物質の投与に起因した異常は認められなかった。

本試験におけるNOAELは2.9mg/kg体重/日であった。

(4)繁殖毒性試験及び催奇形性試験

【ラットを用いた2世代繁殖試験】^{(29),(30),(31)}

Sprague-Dawley系ラット(Crl:CD®BR;雌雄各30匹/群)を用いた混餌(0、500、2000、7500ppm;)投与による2世代繁殖試験が実施されている。

被験物質の投与はF₀世代雄では40日齢以上の動物を用いて交配前70日間、雌では100日齢以上の動物を用いて交配前14日間、F₁世代では離乳後、雌雄とも交配70日前から剖検時まで行った。F₀世代交配の出生児(F₁)は一部を除き、離乳(生後21日)までほ育され、離乳後各群雌雄25匹を選抜し、これらを交配しF₂世代を得た。選抜されなかったF₁は剖検に供された。F₂世代は一部を除き離乳までほ育された。

一般的な臨床観察では、7500ppm投与群のF₁雌数匹で鼻孔周辺に茶褐色の付着物が認められた。体重変化ではF₀、F₁ともに7500ppm投与群の雌雄で低体重と増加量の減少が認められた。飼料摂取量は7500ppm投与群のF₁雄で試験期間中減少した。

性周期に投与の影響は認められなかったが、F₀、F₁世代ともに妊娠率の低下、妊娠期間の軽度な延長、総産児数、出生率、着床数の低下が7500ppm投与群で認められた。

死産児数には、F₀およびF₁世代とも投与群と対照群の間に差はみられなかった。

F₁およびF₂児の生後1~4日の生存率、生後5~21日の生存率(離乳率)は7500ppm投与群で低下し、ほ育期間中低体重と体重増加の抑制が認められた。

児の外表面、骨格ともに投与に起因した異常は認められなかった。

病理組織学的検査では、7500ppm 投与群の F₁ 雄の数例で片側性の精巣萎縮、散在性の精細管萎縮、精巣上体中の細胞残屑が認められた。また、F₀、F₁ 雄の多くで変性した精子細胞が精細管や精巣上体中に認められた。雌の生殖器官には病理組織学的異常はみられなかった。

Sprague-Dawley 系ラット(Crl:CD@BR; 雌雄各 30 匹/群)を用いた混餌(0、125、300、2000ppm; 0、10、25、165mg/kg 体重/日)投与による 2 世代繁殖試験が実施されている。

投与は F₀ 世代雄では 47 日齢の動物を用いて交配前 70 日間、雌では 103 日齢の動物を用いて 14 日間、F₁ 世代では離乳後、雌雄とも交配の 77 日前から剖検時まで行った。F₀ 世代交配の出生児(F₁)は一部を除き、離乳(生後 21 日)までほ育され、離乳後各群雌雄 25 匹を選抜し、これらを交配して F₂ 世代を得た。選抜されなかった F₁ は剖検に供された。F₂ 世代は一部を除き離乳までほ育された。

一般的な臨床観察、体重、飼料摂取量には投与の影響は認められなかった。

性周期、妊娠率、着床数、同腹児数、死産児数、児の生存率には、F₀ および F₁ 世代とも投与群と対照群の間に差はみられなかった。F₂ の 2000ppm 投与群では離乳前の体重増加が軽度に低下した。

児の外表面、骨格ともに投与に起因した異常は認められなかった。

臓器重量では、2000ppm 投与群の F₀、F₁ 雄の精巣上体重量に統計学的有意差はないが減少傾向が認められた。剖検、病理組織学的検査では、300ppm 以上投与群の F₀ 及び F₁ 雄で変性した精子細胞が精巣の精細管や精巣上体中に認められた。125ppm 投与群ではこれらの変化は認められなかった。

本試験における NOAEL は 10mg/kg 体重/日であった。

上記 2 試験で雄の精子に形態異常が認められたため、これらの異常が発現する時期について検討するために追加試験を行った。

Sprague-Dawley 系ラット(Crl:CD@BR; 雄 60 匹/群)に 0 または 7500ppm の濃度でエンロフロキサシンを添加した飼料を 90 日間投与した。投与 3、6、9 週にそれぞれ各群 10 匹、13 週に 15 匹を剖検し、残りの雄 15 匹には基礎飼料を与え回復群としてさらに 13 週間飼育した。投与 11 週及び投与終了後 3、7、11 週に各群の雄 15 匹を薬剤未投与の雌と最長 2 週間交配させ、雌ラットを妊娠 20 日に剖検し、繁殖成績を調べた。

投与雄では投与期間を通じて低体重及び体重増加の減少が認められ、飼料摂取量も減少した。これらは投薬終了後に回復した。

いずれの時期の交配においても交尾率に影響は認められなかったが、投与雄の 3 例で繁殖成績の低下が認められ、これらの動物では両側精巣の完全あるいは中程度の萎縮が観察された。精巣重量では中間剖検で相対及び絶対重量の増加が認められ、試験終了時には絶対重量の低値がみられた。精巣上体重量は回復期を含めて試験期間中を通じて相対及び絶対重量の低値を示した。精巣あるいは精巣上体中の精子の変性は投与 3 週の剖検時で認められ、経時的に増加した。また、精巣上体中の細胞残屑の増加が認められた。投与雄における異常精子は 1 例を除いて休薬期間中に回復したが、精細管の萎縮は投与雄の 6/15 でなお認められた。

投与 11 週に交配した雌で妊娠率、同腹児数及び着床数の低下、未着床胚数^dの増加が認められた。着床後吸収胚数の増加は認められなかった。妊娠率、同腹児数及び着床数の低下、未着床胚数増加は休薬期間中に回復した。

^d 黄体数と着床数から計算

被験物質の投与に起因すると考えられる胎児の外形異常は認められなかった。

【ラットを用いた催奇形性試験】⁽³²⁾

COBS CD 系ラット(28 匹/群)を用いた強制経口(0、50、210、875 mg/kg 体重/日)投与による催奇形性試験において認められた毒性所見は以下の通りであった。被験物質の投与は、妊娠 6 日から 15 日の間行った。

母動物の死亡は認められなかった。一般的な臨床症状観察では、被験物質の投与に起因した異常は認められなかった。体重増加の低値が 875 mg 投与群の妊娠期間中で認められた。また、妊娠 20 日の体重は低値を示した。飼料摂取量の低下が妊娠 8 日の 210mg 以上投与群、12 日の 875mg 投与群で認められたが、後半には回復し、20 日には高用量群で有意に増加した。

875mg 投与群で同腹子数の減少、着床後胚/胎児死亡数の増加が認められた。210mg 以上投与群において胎児重量の低値が認められた。黄体数、胎児の性比に投与の影響は認められなかった。

210mg 投与群の胎児で椎骨と胸骨、875mg 投与群の胎児で頭蓋骨、椎骨、骨盤骨、胸骨、肢骨の骨化遅延が認められた。胎児の外表、内臓および骨格の奇形や変異の発現率に投与の影響は認められなかった。

以上の結果から、本試験の母動物及び胎児動物に対する NOAEL は 50mg/kg/日であった。

【ウサギを用いた催奇形性試験】⁽³³⁾

ウサギ(チンチラ種; 16 匹/群)を用いた強制経口(0、1、5、25mg/kg 体重/日)投与による催奇形性試験において認められた毒性所見は以下の通りであった。被験物質の投与は、妊娠 6 日から 18 日の間行った。なお、25mg までの投与において母体毒性が認められなかったため、対照群と 75mg 投与群を用いた試験が追加で設定され、同様の方法で実施された。

追加試験対照群の母動物の 1 例を除き死亡例は認められなかった。一般的な臨床症状観察では、75mg 投与群の 1 例で妊娠 19 日及び 20 日に流産の兆候が観察された他は、被験物質の投与に起因した異常は認められなかった。体重増加の低値が 75 mg 投与群の交配後 15 日まで認められ、交配後 6-8 日に体重の軽度な減少が認められ、11 日以降は有意な低値を示した。被験物質の投与期間を通じて 75mg 投与群の飼料摂取量は低値を示した。

75mg 投与群で着床後胚/胎児死亡数の増加が認められた。この他には特に投与の影響は認められなかった。

胎児の外表、内臓および骨格の奇形や変異の発現率、骨化状態に投与の影響は認められなかった。

以上の結果から、本試験の母動物及び胎児動物に対する NOAEL は 25mg/kg/日であった。