

## 5. 慢性毒性試験

### (1) 1年間慢性毒性試験 (イヌ) (参照 22)

イヌ (ビーグル種、雌雄各 4 匹/群) を用いたツラスロマイシンの強制経口投与 (0、2、5 及び 25 mg(力価)/kg 体重/日) による 1 年間慢性毒性試験において認められた毒性所見は以下のとおりであった。なお、対照群にはクエン酸緩衝脱イオン水を投与した。

試験期間中に、死亡例は認められなかった。

一般状態では、投与群で散発的な流涎が認められたが、5 mg(力価)/kg 体重/日以上投与群でわずかに頻度が高く、特に雌で顕著であった。

体重、摂餌量、心拍数、呼吸数、体温、血圧、心電図、眼検査、血液学的検査及び尿検査に、投与に起因する影響は認められなかった。

血液生化学的検査は投与 12、31、85、176、273 及び 357 日後に行われており、25 mg(力価)/kg 体重/日群の雌で ALT 及び AST の上昇が認められた。雄においては AST が投与 85 日後以降に上昇傾向を示し、投与 176 日後で有意であった。

臓器重量では、25 mg(力価)/kg 体重/日群で精巣の絶対及び比重量の増加が認められた。剖検及び病理組織学的検査では、投与に起因する影響は認められなかった。

以上より、5 mg(力価)/kg 体重/日以上投与群で認められた散発的な流涎をもとに、本試験における NOEL は 2 mg/kg 体重/日と考えられた。しかしながら、この影響の程度はごくわずかで、統計学的には検証できていない。また、頻度に差はあるが対照群を含めて認められており、被験物質投与に用いられた媒体の pH が弱酸性であることの影響があるものと思われる。さらには、関連した病変、特に消化管に病変は認められておらず、慢性毒性影響の評価指標としては適切でないと考えられる。このため、本試験で毒性影響と認められる指標は血液生化学的検査におけるいくつかのパラメータの変化で、NOAEL は 5 mg(力価)/kg 体重/日であると判断された。

なお、25 mg(力価)/kg 体重/日群の初回投与及び 1 年間の投与終了後 24 時間の AUC の比較では、1 年間の投与終了時で 6 倍程度高い値が認められ、長期投与による蓄積が認められたが、2 mg(力価)/kg 体重/日群では初回及び 1 年間の投与終了後の血漿中濃度はともに低く、蓄積は確認されなかった。投与終了時の肺組織中のツラスロマイシン濃度は、投与量順に 0.75、4.02 及び 321 µg(力価)/g で高投与量群でより高かったが、先の 3 ヶ月間亜急性毒性試験の知見と比較してさらなる蓄積は認められなかった。

## 6. 発がん性試験

発がん性試験については実施されていない。

## 7. 生殖発生毒性試験

### (1) 2世代繁殖毒性試験 (ラット) (参照 23)

ラット (SD 系) を用いたツラスロマイシンの強制経口投与 (0、15、50 及び 100 mg(力価)/kg 体重/日) による 2 世代繁殖毒性試験を実施した。被験物質の投与及び交配は次の要領で実施した。

F<sub>0</sub> 世代では、雌雄各 30 匹/群に交配開始前に最低 70 日間投与し、さらに交配、妊娠、

ほ育期間を通じ、F<sub>1</sub> 離乳後の剖検時まで投与した。F<sub>1</sub> 世代は離乳時に雌雄各 30 匹/群を交配のため選抜した。F<sub>1</sub> 動物には F<sub>0</sub> と同様に交配開始前に最低 70 日間投与し、さらに交配、妊娠及びほ育期間を通じ、F<sub>2</sub> 離乳後の剖検時まで投与した。F<sub>2</sub> 児動物は離乳時に剖検した。

一般状態では、投与に起因する影響は認められなかった。体重増加抑制が、F<sub>0</sub> 及び F<sub>1</sub> 世代の 100 mg(力価)/kg 体重/日群の雄で散発的に認められ、雌では F<sub>1</sub> 世代の 50 mg(力価)/kg 体重/日群で妊娠 0~4 日、100 mg(力価)/kg 体重/日群で妊娠 0~20 日に認められた。摂餌量は、F<sub>0</sub> 及び F<sub>1</sub> 世代の 100 mg(力価)/kg 体重/日群の雄で散発的に低下が認められた。血液生化学的検査は F<sub>0</sub> 世代の投与 9 及び 18 週で実施されたが、総タンパク質の低値が 50 mg(力価)/kg 体重/日以上投与群の雄の投与 9 及び 18 週、AST の高値が 50 mg(力価)/kg 体重/日以上投与群の雄の投与 18 週並びに BUN の低値が 50 mg(力価)/kg 体重/日以上投与群の雄の投与 9 週、雌の投与 18 週及び全投与群の雄の投与 18 週で認められた。肝臓の絶対及び比重量の減少が F<sub>0</sub> 世代の全投与群の雌雄にみられ、F<sub>1</sub> 世代においても肝臓の比重量が全投与群の雄と 50 mg(力価)/kg 体重/日以上投与群の雌で減少した。病理組織学的検査では、肝臓を含め検査したいずれの臓器にも異常は認められなかった。

繁殖に関する影響のパラメータ(受胎率、交尾率、同居から交尾までの日数、妊娠率、分娩率及び発情周期)には、F<sub>0</sub> 及び F<sub>1</sub> ともに投与の影響は認められなかった。

F<sub>1</sub> 及び F<sub>2</sub> 新生児の性比、生存出生児数、分娩後生存率及び性成熟までの日数に投与の影響は認められなかった。離乳時の F<sub>1</sub> 及び F<sub>2</sub> 児の剖検及び臓器重量に被験物質の投与に起因する影響は認められなかった。

本試験における親動物の一般毒性についての LOAEL は 15 mg(力価)/kg 体重/日、生殖発生毒性に対する NOAEL は本試験における最高用量である 100 mg(力価)/kg 体重/日と考えられた。

## (2) 催奇形性試験(ラット) (参照 24)

ラット(SD 系、22 匹/群)を用いたツラスロマイシンの強制経口投与(0、15、100 及び 200 mg(力価)/kg 体重/日)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とおりであった。被験物質の投与は、妊娠 6 日から 17 日まで行い、妊娠 20 日に帝王切開した。対照群にはクエン酸媒体を投与した。

母動物に死亡は認められず、一般状態でも投与に起因する影響は認められなかった。100 mg(力価)/kg 体重/日以上投与群で、体重減少はみられなかったが、妊娠 6~9 及び 9~12 日の摂餌量の減少が認められた。

試験実施機関の背景データの範囲内の変化ではあったが、100 mg(力価)/kg 体重/日以上投与群で、総吸収胚率、着床後胚死亡率の有意な増加及び 1 腹当たり生存胎児率の有意な低下が認められた。15 mg(力価)/kg 体重/日以上投与群で雌雄の胎児体重の有意な低下がみられた。黄体数、着床前胚死亡数、着床数及び性比に投与の影響は認められなかった。また、胎児の外表、内臓及び骨格観察においても奇形や変異の発現率に投与に起因する影響は認められなかった。

以上より、本試験の母動物に対する NOAEL は 15 mg(力価)/kg 体重/日、胎児に対す

る LOAEL は 15 mg(力価)/kg 体重/日と考えられた。また、催奇形性は認められなかった。

(3) 催奇形性試験 (ウサギ) (参照 25)

ウサギ (ニュージーランドホワイト種、22 匹/群) を用いたツラスロマイシンの強制経口投与 (0、5、15 及び 50 mg(力価)/kg 体重/日) 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とおりであった。被験物質の投与は、妊娠 7 日から 20 日まで行い、妊娠 29 日に帝王切開した。対照群にはクエン酸媒体を投与した。

一般状態では、投与に起因する影響は認められなかった。50 mg(力価)/kg 体重/日群で、体重減少はみられなかったが、妊娠 7~10 日の摂餌量の減少が認められた。

生存胎児数、早期/後期吸収胚数、着床数、黄体数、胎児体重及び胎盤重量に投与の影響は認められなかった。また、胎児の外表、内臓及び骨格観察においても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、本試験の母動物に対する NOAEL は 15 mg(力価)/kg 体重/日、胎児に対する NOAEL は本試験における最高用量である 50 mg(力価)/kg 体重/日と考えられた。また、催奇形性は認められなかった。

8. 遺伝毒性試験 (参照 26~30)

ツラスロマイシンの遺伝毒性に関する各種の *in vitro* 及び *in vivo* 試験の結果を表 7~8 にまとめた。

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> TA1535, TA1537, TA98, TA100, <i>Escherichia coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	0.02, 0.1, 0.5, 2.0, 5.0, 10, 50 µg(力価)/plate (-S9)	陰性 <sup>1</sup>
		0.02, 0.1, 0.5, 2.0, 5.0, 10, 50 µg(力価)/plate (+S9)	陰性 <sup>2</sup>
		0.05, 0.15, 0.5, 1.5, 5.0, 15 µg(力価)/plate (-S9)	陰性 <sup>3</sup>
		0.15, 0.5, 1.5, 5.0, 15, 50 µg(力価)/plate (+S9)	陰性 <sup>4</sup>
染色体異常試験*	ヒト末梢血リンパ球	608, 812, 1,084, 1,450, 1,810 µg(力価)/mL (-S9; 3hr+21hr)	陰性 <sup>5</sup>
		1,450, 1,810, 2,260, 2,820, 3,520 µg(力価)/mL (+S9; 3hr+21hr)	陰性 <sup>6</sup>
		198, 248, 608, 1,084 µg(力価)/mL (-S9; 24 hr)	陰性 <sup>7</sup>
前進突然変異試験	CHO 細胞 (K1-BH4/Hprt)	500, 1,000, 2,000, 3,000, 4,000, 5,000 µg(力価)/mL (-S9; 5 hr+7 days)	陰性 <sup>8</sup>
		500, 1,000, 2,000, 3,000, 4,000, 5,000 µg(力価)/mL (+S9; 5 hr+7 days)	陰性 <sup>9</sup>

		5,000, 6,000 µg(力価)/mL (+S9 ; 5 hr+7 days)	陰性 <sup>9</sup>
	L5178Y マウスリンパ腫細胞 (TK)	100, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300 µg(力価)/mL (-S9)	陰性 <sup>10</sup>
		300, 325, 350, 400, 425, 450, 475, 500 µg(力価)/mL (-S9)	陰性 <sup>11</sup>
		400, 500, 600, 700, 800, 900, 950, 1,000 µg(力価)/mL (+S9)	陰性 <sup>12</sup>

\* : ツラスロマイシン A を投与。用量もツラスロマイシン A としての用量。

- 1 2 µg(力価)/plate(TA1535)、5 µg(力価)/plate(TA1537、TA98、TA100)、10 µg(力価)/plate(E. coli) 以上の用量で菌の生育阻害が認められた。
- 2 5 µg(力価)/plate(TA1535、TA100)、10 µg(力価)/plate(TA1537、TA98)、50 µg(力価)/plate(E. coli) 以上の用量で菌の生育阻害が認められた。
- 3 5 µg(力価)/plate(TA1535、TA1537、TA98、TA100)、15 µg(力価)/plate(E. coli) 以上の用量で菌の生育阻害が認められた。
- 4 5 µg(力価)/plate(TA1535、TA100)、15 µg(力価)/plate(TA1537、TA98、E. coli) 以上の用量で菌の生育阻害が認められた。
- 5 1,810 µg(力価)/mL では溶媒対照と比較して細胞生存率が 50% に低下した。
- 6 3,520 µg(力価)/mL では溶媒対照と比較して細胞生存率が 56% に低下した。
- 7 1,084 µg(力価)/mL では溶媒対照と比較して細胞生存率が 66% に低下した。
- 8 2,000 µg(力価)/mL 以上では細胞毒性が認められた。
- 9 いずれの用量においても細胞毒性は認められなかった。
- 10 300 µg(力価)/mL では溶媒対照と比較して細胞生存率が 50% に低下した。
- 11 425 µg(力価)/mL 以上では溶媒対照と比較して細胞生存率の著しい低下が認められた。
- 12 800 µg(力価)/mL 以上では溶媒対照と比較して細胞生存率の著しい低下が認められた。

表 8 *in vivo* 試験

試験	対象	用量	結果
小核試験*	ラット骨髄細胞	500, 1,000, 2,000 mg(力価)/kg 体重/日, 3 日間強制経口投与	陰性

\* : ツラスロマイシン A を投与。用量もツラスロマイシン A としての用量。

上記のように、*in vitro* 試験においては復帰突然変異試験、ヒトリンパ球を用いた染色体異常試験及びは乳類培養細胞を用いた前進突然変異試験のいずれも代謝活性化の有無にかかわらず陰性を示し、げっ歯類を用いた *in vivo* の小核試験でも陰性であった。

以上のように、*in vitro* 及び *in vivo* の複数の試験でいずれも陰性であることから、ツラスロマイ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。

## 9. 微生物学的影響に関する試験

### (1) ヒトの腸内細菌に対する最小発育阻止濃度 (MIC) (参照 31)

ヒトの腸内細菌叢を構成する細菌種のうち、*Escherichia coli*、*Proteus mirabilis*、

*Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Bacteroides* spp., *Fusobacterium* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Clostridium* spp., *Eubacterium lentum* それぞれ 10 菌株について測定されたツラスロマイシンに対する MIC は表 9 のとおりであった。

表 9 MIC の要約

菌種	菌株数	1/100 接種濃度 ( $10^{4.7}$ CFU/spot)		標準接種濃度 ( $10^{6.9}$ CFU/spot)	
		MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>
<i>Escherichia coli</i>	10	2	4	4	4
<i>Proteus mirabilis</i>	10	>128	>128	>128	>128
<i>Enterococcus</i> spp.	10	1	4	2	8
<i>Lactobacillus</i> spp.	10	4	128	4	128
<i>Bacteroides</i> spp.	10	64	>128	64	>128
<i>Fusobacterium</i> spp.	10	2	4	2	4
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	10	16	128	32	>128
<i>Bifidobacterium</i> spp.	10	0.5	8	1	16
<i>Clostridium</i> spp.	10	16	32	32	32
<i>Eubacterium lentum</i>	10	16	>128	32	>128

調査された範囲では *Bifidobacterium* spp. が最も感受性が高い細菌種であり、その  $10^{6.9}$  CFU/spot における MIC<sub>50</sub> 値は 1  $\mu$ g/mL であった。

(2) *in vitro* gut model における感受性細菌の MIC (参照 32, 33)

2~20  $\mu$ g/mL のツラスロマイシンを Cooked meat 培地に加え、適当な塩濃度、約 pH 2 の条件下でペプシン処理し、さらに約 pH 7 に調整し、胆汁酸塩及びパンクレアチン処理することにより、ヒト消化管内の食物の通過をシミュレートした溶液に、*Bifidobacterium* 及び *Fusobacterium* (それぞれ 2 菌株) を約  $10^{5.6}$  CFU/mL で加え、約 35 °C で 18 時間培養したときの菌の生存状態を検討した。この擬似消化管溶液中においては、20  $\mu$ g/mL までのツラスロマイシンは細菌の増殖に影響を与えなかった。

(3) ヒト糞便に対するツラスロマイシンの結合活性の検討 (参照 34, 35)

ヒト 6 名 (男女各 3 名) から採取された糞便を混合し 0.01 M の CaCl<sub>2</sub> に 1/150~1/5 で希釈して滅菌した溶液に、25 ppm の <sup>14</sup>C 標識ツラスロマイシンを添加した時の糞便に対するツラスロマイシンの結合活性を検討した。混合液を遠心分離した上清に回収された放射活性は 1/150 希釈では約 88 % であったが濃度とともに減少し、1/5 希釈では 47 % に低下した。1/5 希釈における吸着係数 Kd は 8.5 と計算された。(参照 34)

また、別の試験において、健常男性 4 名から採取された糞便を混合し 0.01 M の CaCl<sub>2</sub> で 1/10 に希釈して滅菌した溶液に、<sup>14</sup>C 標識ツラスロマイシンを添加した時の糞便に対するツラスロマイシンの結合活性を検討した。この試験においてはさらに 20 及び 37 °C

における結合活性の差についても検討した。混合液を遠心分離した上清に回収された放射活性は 20 °C で約 37~43 %<sup>27</sup>で Kd=17、37 °C で 24~28 % で Kd=32 とされた。

この条件では、ツラスロマイシンはヒトの体温に近い 37 °C でヒト糞便溶液に対しより高い結合活性を示した。(参照 35)

#### (4) 糞便と pH の細菌の増殖に対する影響 (参照 36、37)

マイクロタイターブロス法 (0.031~128 µg/mL のツラスロマイシンを含み、約 pH 7.1 又は 7.4 及び約 pH 6.5 に調整された培養培地並びに 3 % 糞便懸濁培地を 96 穴マイクロタイタープレートに満たし、5×10<sup>5</sup> CFU/mL 菌液を各穴に添加し培養) により、種々の濃度のツラスロマイシンを含んだ培地及び糞便懸濁培地で 3 種 (*E. coli*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*; 各 4 菌株) の細菌を培養し、MIC を測定した。さらに各プレート穴中の培養液を寒天培地に移植し、寒天培地上にコロニーが得られなかった元のタイタープレートに添加されていたツラスロマイシン濃度を増殖阻止濃度 (CPG) とした。CPG はタイタープレートにおける培養による静菌的な作用によって増殖が認められなかった場合でも、抗菌剤を含まない寒天培地における培養によって発育することが想定され、MIC よりも高い値となると考えられる。

全ての菌で培地培養後の CPG よりも糞便懸濁培地培養後の CPG が高い値を示し、糞便懸濁培地では抗菌活性が低下することが示唆された。特に、先の MIC<sub>50</sub> 検討試験において最も感受性の高かった *Bifidobacterium* については MIC が 0.5、0.5、2、8 であった 4 菌株が使用されたが、培地培養後の CPG に対する糞便懸濁培地培養後の CPG は平均値で約 2~6 倍、個別の比較では 2~16 倍高い値を示し、糞便に対する結合により抗菌活性が低下することが示唆された。

また、*Bifidobacterium* の pH については 7 よりも 6.5 において、*in vitro* の MIC が 4 倍程度の活性低下を示した (表 10)。(参照 36)

*Fusobacterium* については 10 菌株について pH の影響が検討されたが、MIC<sub>50</sub> は 2 (pH 7) から 8 (pH 6.6) に変化し、4 倍の低下が認められた。(参照 37)

マクロライド系抗生物質は非イオン型の時に細菌細胞によく取り込まれることが知られており、一般にアルカリ性で抗菌作用が増強される。逆に酸性側の pH においては抗菌作用が低下することが知られており、ツラスロマイシンは NH 基を 2 つ有するため、この傾向が強いと推定されている。

表 10

	<i>Escherichia coli</i>		<i>Enterococcus</i>		<i>Bifidobacterium</i>	
	平均	範囲	平均	範囲	平均	範囲
MIC (pH7.1 or 7.4)	5	4~8	6	4~8	4.3	≤0.031~16
MIC (pH6.5)	128	128~>128	128	128~>128	16.3	0.062~64
培地 CPG (pH7.1 or 7.4)	68	8~>128	14	4~32	7.0	0.125~16
培地 CPG (pH6.5)	128	128~>128	128	128~>128	18.3	0.125~64
糞便懸濁培地 CPG (pH7.1 or 7.4)	128	128~128	128	128~>128	40.5	2~>128

<sup>27</sup> 添加 4、20 及び 24 時間時点の 3 点の値。

糞便懸濁培地 CPG (pH6.5)	128	>128	128	>128	40.0	8~>128
-----------------------	-----	------	-----	------	------	--------

\*平均 CPG の算出に際しては >128 は 128 として扱われた

#### (5) 豚における *in vivo* の知見 (参照 13、38)

*Salmonella enterica* serovar Typhimurium (ST) で豚を攻撃後、10 又は 15 mg/kg 体重のツラスロマイシンを単回筋肉内投与し、投与後 28 日までの糞を採取した。本試験の ST 株の MIC は 1.56 µg/mL であったが、各投与群とも対照群との間で糞中のサルモネラ排出量に影響は認められなかった。(参照 38)

投与後 3 日間の豚の糞中のツラスロマイシン濃度は、2.5 mg/kg 体重の筋肉内投与において 10~70 µg/g であることが確認されており、ツラスロマイシンは豚の消化管内では著しく抗菌活性が低下することが示唆された。(参照 13)

これらのように、*in vitro* の試験において、ツラスロマイシンは糞便等への吸着が示唆され、実際 *in vitro* の抗菌活性は糞便等の存在下では低下した。pH についても、特性上、生体内の pH 条件下では *in vitro* の MIC 測定試験で認められたものよりも抗菌活性が低下する可能性が高いと思われる。さらに、豚の試験において、攻撃試験時の *Salmonella* 排泄に *in vitro* で求められた MIC の数十倍と推定される濃度のツラスロマイシン存在下でも影響は認められておらず、*in vitro* において示された種々の要因による抗菌活性低下は *in vivo* においても認められることが示唆された。

#### 10. その他の特殊試験 (皮膚感作試験) (参照 39)

モルモット (10 匹) にプロピレングリコールに溶解した 5% のツラスロマイシン、プロピレングリコール溶解 5% ツラスロマイシンとフロイント完全アジュバントのエマルジョン及びフロイント完全アジュバントのみをそれぞれ皮下接種し、1 週間後にプロピレングリコールで湿らせたツラスロマイシンを投与部位をカバーするようにパッチで 1 日間局所投与した。さらに 2 週間後にプロピレングリコールで湿らせたツラスロマイシン、もしくはプロピレングリコールのみで投与部位とは別の部位を攻撃した。最終攻撃 24 及び 48 時間後の評価時点で、9/10 例で陽性反応が認められ、ツラスロマイシンはモルモットにおいて接触感作性物質であることが示唆された。

このモルモットの皮膚で認められたアレルギー反応は細胞性免疫に関するものであるが、食物アレルギーで主として問題となるのは液性免疫で、特にアナフィラキシー等の重篤な障害をもたらす I 型アレルギーとは性質が異なっている。

経口投与におけるアレルギーについては、動物における種々の経口投与の毒性試験の知見が報告されているが、特にアレルギー様反応は認められていない。ただし、一般に動物におけるアレルギー反応の知見をそのままヒトに外挿することは難しいと考えられている。一方、マクロライド系抗生物質については、ヒト臨床における比較的長い使用歴がある。臨床におけるアレルギー様の副作用として、エリスロマイシンの例では発疹、掻痒、じんましん、血管浮腫等が知られているが、その頻度はまれであると報告されている。さらに、マクロライド系抗生物質間の比較では 15 員環のマクロライド系抗生物質はエリスロマイシンよりもアレルギー様副作用の発生頻度はまれであると報告

されている。アレルギーの惹起は用量依存的であると考えられるが、臨床使用と比較して食品を介した暴露量は著しく少ないことが想定され、食品を介して生体にとって問題となるアレルギー反応が生じる可能性は無視できる程度であると考えられる。

#### 1.1. ヒトにおける知見（ヒトにおけるマクロライド系抗生物質の影響）（参照 40～43）

ツラスロマイシンのヒト臨床における使用歴はないが、マクロライド系の抗生物質は古くからヒト臨床において利用されている。

マクロライド系の抗生物質による重篤な副作用はまれにしか起こらないとされているが、エリスロマイシンでは胆汁うっ滞性肝炎があるとされ、初期の特徴は悪心、嘔吐、腹痛とされている。その他、経口及び静脈内投与で特に高用量の場合には腹痛、悪心、嘔吐及び下痢を呈することがあるとされる。エリスロマイシンについては米国 NTP においてマウスを用いた発がん性試験が実施されているが、発がん性は認められなかったとされている。

また、ツラスロマイシンと同じ 15 員環マクロライドであるアジスロマイシンの臨床試験及び市販後の副作用調査で頻度が高かったのは血液検査値（特に肝酵素）の変動及び消化管への影響（下痢、軟便等）であった。

### III. 食品健康影響評価

#### 1. 薬物動態及び残留試験について

ツラスロマイシンの対象動物における血漿中半減期は 58～99 時間と比較的緩やかな減少を示し、イヌの 1 年間慢性毒性試験において、25 mg(力価)/kg 体重/日の投与では投与終了時に投与開始時と比較して AUC の高値が認められ、5 mg(力価)/kg 体重/日の投与では投与開始時との比較は出来なかったが AUC の上昇が示唆された。しかし、2 mg(力価)/kg 体重/日の投与では投与開始時及び投与終了時の血漿中濃度は共に低く、低用量の投与では 1 年間の長期投与においても蓄積は認められなかった。また報告された試験の多くで、筋肉、脂肪、肝臓及び腎臓よりも、肺において最も高い濃度の残留が認められているが、報告された各種の毒性試験において、特に肺に対する毒性所見は認められなかった。

#### 2. 毒性学的影響について

##### (1) 繁殖毒性及び催奇形性について

生殖発生毒性についてはラットを用いた 2 世代繁殖毒性試験及びラット、ウサギを用いた催奇形性試験が実施されている。2 世代繁殖毒性試験（0、15、50 及び 100 mg(力価)/kg 体重/日）においては、受胎率、交尾率、同居から交尾までの日数、妊娠率、分娩率、発情周期等の生殖に関する指標や、新生児の性比、生存出生児数、分娩後生存率、性成熟までの日数等の発生に関する指標のいずれにも被験物質の投与による影響は認められなかった。一方、一般毒性については、肝臓の絶対及び比重量の減少が F<sub>0</sub> 雌雄の全投与群で認められ、F<sub>1</sub> でも雄の全投与群で比重量の減少が認められたため、NOAEL が得られなかったと判断され、LOAEL は 15 mg(力価)/kg 体重/日と考えられた。また、催奇形性についてはラット（0、15、100 及び 200 mg(力価)/kg 体重/日）及びウサギ（0、



5、15及び50 mg(力価)/kg体重/日)ともに認められなかったが、ラットにおいて15 mg(力価)/kg体重/日の用量において雌雄の胎児体重に低値が認められたため、NOAELは得られなかったと判断され、LOAELは15 mg(力価)/kg体重/日と考えられた。

### (2) 遺伝毒性/発がん性について

発がん性試験については実施されていない。

しかしながら、ツラスロマイシンは *in vitro* の復帰突然変異試験、染色体異常試験、前進突然変異試験 (CHO/Hprt、マウスリンフォーマ Tk) 及び *in vivo* の小核試験 (ラット骨髄細胞) のいずれにおいても陰性であり、遺伝毒性はないと考えられる。また、亜急性及び慢性毒性のいずれの試験においても前腫瘍性病変又は増殖性病変は認められていない。さらに、マクロライド系の抗生物質については比較的長いヒト臨床における使用歴があるが、副作用として腫瘍の発生は知られておらず、代表的な薬剤であるエリスロマイシンの発がん性試験では発がん性は認められていない。

これらのことから、発がん性試験を欠いていても ADI の設定は可能であると判断された。

### (3) 毒性学的 ADI について

ツラスロマイシンについては、遺伝毒性発がん性を示さないと考えられることから、ADI を設定することが可能であると考えられた。亜急性又は慢性毒性試験において、最も低い用量で被験物質投与の影響が認められたと考えられる指標は、イヌの1年間慢性毒性試験における血液生化学的検査のいくつかのパラメータの変化で、NOAEL は 5 mg(力価)/kg体重/日であると判断された。

一方、ラットの2世代繁殖毒性試験及び催奇形性試験において、それぞれ肝臓重量の減少及び胎児体重の低下が最低用量群で認められたため、NOAEL が設定できず、いずれも LOAEL は 15 mg(力価)/kg体重/日であった。

イヌの1年間慢性毒性試験における NOAEL 5 mg(力価)/kg体重/日から ADI を設定する場合、種差 10、個体差 10 の安全係数 100 を適用し、0.05 mg/kg体重/日となる。一方、ラットの2世代繁殖毒性試験及び催奇形性試験の LOAEL 15 mg(力価)/kg体重/日から ADI を設定する場合は、種差 10、個体差 10 の安全係数 100 に加え、LOAEL を使用することによる追加の安全係数 10 を考慮し、0.015 mg/kg体重/日と設定される。最も長期の慢性毒性試験で NOAEL が得られているが、これとは質的に異なる生殖発生毒性試験で毒性影響が認められ、こちらがより感度の高い指標となることから、毒性学的影響から導かれる ADI は 0.015 mg/kg体重/日を採用するのが適当と判断された。

## 3. 微生物学的影響について

### (1) 微生物学的 ADI について

ツラスロマイシンの微生物学的影響について利用可能な知見は、*in vitro* の MIC<sub>50</sub> のみであった。*Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus* 等の偏性嫌気性菌、*Enterococcus*, *E. coli*, *Lactobacillus*, *Proteus* の通性嫌気性菌、それぞれ 10 菌株を用いて MIC<sub>50</sub> が求められており、最も低い MIC<sub>50</sub>

が報告されたのは *Bifidobacterium* で、MIC<sub>50</sub> は 1 µg/mL であった。結腸内容物に 220 g、細菌が暴露される分画に 90 % (吸収率から推定)、安全係数に 1、ヒト体重に 60 kg を適用し、JECFA の算定式に当てはめ微生物学的影響を試算すると、

$$\text{ADI (mg/kg 体重/日)} = \frac{0.001 \text{ (mg/mL)} \times 220 \text{ (g)}}{0.9 \times 1 \times 60 \text{ (kg)}} = 0.004 \text{ mg/kg 体重/日}$$

となる。

しかしながら、ツラスロマイシンについては、同時に次のような *in vitro* における糞便等への結合、糞便結合状態における抗菌活性の低下、pH の変化による抗菌活性の低下について、それぞれ試験が計画・実施された。また、これらの影響が *in vivo* においても認められる可能性について豚における試験結果を用いて考察された。

- ①肉培地をペプシン及びパンクレアチン処理した溶液では 20 µg/mL までのツラスロマイシンは *Bifidobacterium* 及び *Fusobacterium* の増殖を妨げなかった。
- ②糞便とツラスロマイシンを混合した場合、可溶分画のツラスロマイシン量は 20 °C で 50 % 未満に低下した。37 °C では 30 % 未満に低下した。
- ③糞便とツラスロマイシンを混合した場合、混合しないものと比較して CPG は 2~16 倍の高値を示した。
- ④pH が 7.0 から 6.5 に低下すると、抗菌活性が 1/4 程度に低下した。
- ⑤豚において、*in vitro* の MIC が 1.56 µg/mL のサルモネラが、少なくとも数十 µg/g を超えるツラスロマイシンを含むと考えられる糞便中で影響を受けなかった。

これらのように、少なくとも *in vitro* の試験において、食物や糞便等との共存によりツラスロマイシンの抗菌活性が低下すること、その理由の一つと考えられる糞便とツラスロマイシンの結合が複数の試験で確認され、さらに pH の変化によっても抗菌活性が低下することが確認された。生体内の条件下では、食物や糞便との結合による遊離体の減少が考えられ、さらにマクロライド系抗生物質、特にツラスロマイシンは構造上生体内の pH で抗菌力が低下することから、結合しなかった遊離体についても抗菌力の減弱が推定され、*in vitro* の MIC 測定試験で認められたものよりも抗菌活性が著しく低下する可能性が高いと考えられた。さらに、豚の試験において、*in vitro* で求められた MIC より数十倍程度高い濃度のツラスロマイシンが消化管中に存在していても、サルモネラを指標とした微生物学的影響は認められず、*in vitro* で認められた諸条件による抗菌活性低下の現象は、*in vivo* においても認められることが示唆された。

微生物学的影響について VICH ガイドライン 36 では、対象物質に抗菌活性が認められるか、その物質が結腸内に入るか、結腸内に入る場合微生物学的活性が残っているか、を検討することとし、これらが認められない場合はこれ以上の評価を行う必要はないとしている。ツラスロマイシンの場合、*in vitro* の糞便との共存培養や豚の腸管において抗菌活性が低下することが確認されているが、提出されたデータからは結腸内における抗菌活性消失の確認はできないと考えられ、微生物学的影響そのものを無視することはできないとされた。

抗菌活性の低下に関する知見を定量的に評価することはできないものの、ヒト腸管内では *in vitro* の条件と比較して、控えめにみても 1/10 程度に抗菌活性が低下するものと考えられる。したがって、抗菌活性の低下を考慮した微生物学的 ADI の試算値は 0.04 mg/kg 体重/日程度と考えられた。

#### 4. ADI の設定について

毒性学的 ADI は、ラットの 2 世代繁殖毒性試験及び催奇形性試験において得られた LOAEL 15 mg(力価)/kg 体重/日に、安全係数として種差 10、個体差 10 の 100 に加え、さらに追加の安全係数 10 を考慮した 0.015 mg/kg 体重/日と考えられた。

一方、微生物学的影響については、現時点で利用可能なデータからは、抗菌活性の低下に関する定量的な評価は困難であるものの、*in vitro* の MIC<sub>50</sub> の最も低い値から算出された微生物学的 ADI の試算値は、抗菌活性の低下を考慮すると 0.04 mg/kg 体重/日程度と考えられた。

毒性学的 ADI の 0.015 mg/kg 体重/日は、微生物学的 ADI の試算値の 0.04 mg/kg 体重/日と比較してより低い値であり、微生物学的影響についても十分な安全域を確保していると考えられることから、ADI 設定に当たっては、毒性学的 ADI の 0.015 mg/kg 体重/日を採用することが適当と考えられた。

#### 5. 食品健康影響評価について

以上より、ツラスロマイ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考えられる。

ツラスロマイシン 0.015 mg/kg 体重/日

〈別紙1：検査値等略称〉

略称	名称
ADI	一日摂取許容量
ALT	アラニンアミノトランスフェラーゼ
AST	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
AUC	血漿中薬物濃度曲線下面積
BUN	血液尿素窒素
CHO	チャイニーズハムスター卵巣由来細胞株
$C_{max}$	最高血（漿）中濃度
EMEA	欧州医薬品庁
FDA	米国食品医薬品庁
JECFA	FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議
LC-MS/MS	高速液体クロマトグラフィータンデム質量分析計
LOAEL	最小毒性量
MIC	最小発育阻止濃度
NOAEL	無毒性量
NOEL	無作用量
NTP	米国国家毒性プログラム
$T_{max}$	最高血（漿）中濃度到達時間
$T_{1/2}$	消失半減期
VICH	動物用医薬品の承認審査資料の調和に関する国際協力会議

〈参照〉

1. ファイザー株式会社.動物用医薬品製造販売承認申請書 ドラクシン:添付資料 1(未公表)
2. ファイザー株式会社.国外で使用される動物用医薬品に係わる残留基準値設定の要請書 ツラスロマイシン:添付資料 44; [Study # 1530N-60-00-359] (未公表)
3. ファイザー株式会社.国外で使用される動物用医薬品に係わる残留基準値設定の要請書 ツラスロマイシン:添付資料 45; [Study # 1530N-60-00-363](未公表)
4. ファイザー株式会社.国外で使用される動物用医薬品に係わる残留基準値設定の要請書 ツラスロマイシン:添付資料 46; [Study # 1530N-60-00-362](未公表)
5. ファイザー株式会社.国外で使用される動物用医薬品に係わる残留基準値設定の要請書 ツラスロマイシン:添付資料 48; [Study # 1535N-60-99-294] (未公表)
6. ファイザー株式会社.国外で使用される動物用医薬品に係わる残留基準値設定の要請書 ツラスロマイシン:添付資料 47; [Study # 1576N-60-00-209](未公表)
7. ファイザー株式会社.国外で使用される動物用医薬品に係わる残留基準値設定の要請書 ツラスロマイシン:添付資料 39; [Study # 1535N-60-99-296](未公表)
8. ファイザー株式会社.動物用医薬品製造販売承認申請書 ドラクシン:添付資料 39; 吸収、分布、代謝、排泄に関する資料 豚におけるツラスロマイシンの血漿中および肺組織中薬物動態(未公表)
9. ファイザー株式会社.動物用医薬品製造販売承認申請書 ドラクシン:添付資料 40; 吸収、分布、代謝、排泄に関する資料 豚におけるツラスロマイシンの生物学的利用能(未公表)
10. ファイザー株式会社.国外で使用される動物用医薬品に係わる残留基準値設定の要請書 ツラスロマイシン:添付資料 51; [Study # 1521E-60-01-194](未公表)
11. ファイザー株式会社.動物用医薬品製造販売承認申請書 ドラクシン:添付資料 41; 吸収、分布、代謝、排泄に関する資料 豚における C<sup>14</sup> ツラスロマイシンの残留消長試験(未公表)
12. ファイザー株式会社.動物用医薬品製造販売承認申請書 ドラクシン:添付資料 42; 吸収、分布、代謝、排泄に関する資料 豚における C<sup>14</sup> ツラスロマイシンの組織中代謝分析試験(未公表)
13. ファイザー株式会社.動物用医薬品製造販売承認申請書 ドラクシン:添付資料 43; 吸収、分布、代謝、排泄に関する資料 豚における C<sup>14</sup> ツラスロマイシンの組織および排泄物の代謝分析試験(未公表)
14. ファイザー株式会社.動物用医薬品製造販売承認申請書 ドラクシン:添付資料 45; 残留試験に関する資料 PC-5145 の豚における国内残留試験(未公表)
15. ファイザー株式会社.動物用医薬品製造販売承認申請書 ドラクシン:添付資料 46; 残留試験に関する資料 CP-472,295(e)の豚における海外残留試験(未公表)
16. ファイザー株式会社.動物用医薬品製造販売承認申請書 ドラクシン:添付資料 16; 毒性および安全性に関する資料 CP-472,295 のラットにおける単回経口および静脈内投与毒性試験(未公表)
17. ファイザー株式会社.動物用医薬品製造販売承認申請書 ドラクシン:添付資料 17; 毒

- 性および安全性に関する資料 CP-472,295 のビーグル犬における単回経口および静脈内投与毒性試験(未公表)
18. ファイザー株式会社 動物用医薬品製造販売承認申請書 ドラクシン: 添付資料 18; 毒性および安全性に関する資料 CP-472,295 の Sprague-Dawley 系ラットにおける 1ヶ月間経口毒性試験(未公表)
  19. ファイザー株式会社 動物用医薬品製造販売承認申請書 ドラクシン: 添付資料 20; 毒性および安全性に関する資料 CP-472,295(e) の Sprague-Dawley 系ラットにおける 3ヶ月間経口毒性試験(未公表)
  20. ファイザー株式会社 動物用医薬品製造販売承認申請書 ドラクシン: 添付資料 19; 毒性および安全性に関する資料 ビーグル犬における CP-472,295 の 1ヶ月間経口毒性試験(未公表)
  21. ファイザー株式会社 動物用医薬品製造販売承認申請書 ドラクシン: 添付資料 21; 毒性および安全性に関する資料 CP-472,295(e) のビーグル犬における 3ヶ月間経口毒性試験(未公表)
  22. ファイザー株式会社 動物用医薬品製造販売承認申請書 ドラクシン: 添付資料 22; 毒性および安全性に関する資料 CP-472,295(e) のビーグル犬における 1年間経口毒性試験(未公表)
  23. ファイザー株式会社 動物用医薬品製造販売承認申請書 ドラクシン: 添付資料 25; 毒性および安全性に関する資料 CP-472,295(e) のラットにおける経口(強制)投与 2世代生殖毒性試験(未公表)
  24. ファイザー株式会社 動物用医薬品製造販売承認申請書 ドラクシン: 添付資料 23; 毒性および安全性に関する資料 CP-472,295(e) のラットの催奇形性試験(未公表)
  25. ファイザー株式会社 動物用医薬品製造販売承認申請書 ドラクシン: 添付資料 24; 毒性および安全性に関する資料 CP-472,295(e) のウサギの催奇形性試験(未公表)
  26. ファイザー株式会社 動物用医薬品製造販売承認申請書 ドラクシン: 添付資料 26; 毒性および安全性に関する資料 CP-472,295 の細菌を用いた復帰突然変異試験(未公表)
  27. ファイザー株式会社 動物用医薬品製造販売承認申請書 ドラクシン: 添付資料 27; 毒性および安全性に関する資料 CP-472,295 のヒトリンパ球細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験(未公表)
  28. ファイザー株式会社 動物用医薬品製造販売承認申請書 ドラクシン: 添付資料 28; 毒性および安全性に関する資料 CP-472,295(e) マウスリンパ腫 L5178YTK+/- 細胞を用いた前進突然変異試験(未公表)
  29. ファイザー株式会社 動物用医薬品製造販売承認申請書 ドラクシン: 添付資料 29; 毒性および安全性に関する資料 CP-472,295(e) の CHO 細胞を用いた遺伝子突然変異試験(未公表)
  30. ファイザー株式会社 動物用医薬品製造販売承認申請書 ドラクシン: 添付資料 30; 毒性および安全性に関する資料 CP-472,295 のラット骨髄細胞を用いた小核試験(未公表)
  31. ファイザー株式会社 国外で使用される動物用医薬品に係わる残留基準値設定の要請書 ツラスロマイシン: 添付資料 30 [Study # 1671N-03-00-217](未公表)

32. ファイザー株式会社. 国外で使用される動物用医薬品に係わる残留基準値設定の要請書 ツラスロマイシン: 添付資料 32; [Study # 1671N-03-01-231](未公表)
33. ファイザー株式会社. 国外で使用される動物用医薬品に係わる残留基準値設定の要請書 ツラスロマイシン: 添付資料 33; [Study # 1671N-03-01-240](未公表)
34. ファイザー株式会社. 国外で使用される動物用医薬品に係わる残留基準値設定の要請書 ツラスロマイシン: 添付資料 34; [Study # 1A72N-60-00-203](未公表)
35. ファイザー株式会社. 国外で使用される動物用医薬品に係わる残留基準値設定の要請書 ツラスロマイシン: 添付資料 35; [Study # 53056/54866](未公表)
36. ファイザー株式会社. 国外で使用される動物用医薬品に係わる残留基準値設定の要請書 ツラスロマイシン: 添付資料 36; [Study # 1671N-03-01-226](未公表)
37. ファイザー株式会社. 国外で使用される動物用医薬品に係わる残留基準値設定の要請書 ツラスロマイシン: 添付資料 37; [Study # 1671N-03-01-232](未公表)
38. ファイザー株式会社. 国外で使用される動物用医薬品に係わる残留基準値設定の要請書 ツラスロマイシン: 添付資料 38; [Study # 98-RJY-002] (未公表)
39. ファイザー株式会社. 国外で使用される動物用医薬品に係わる残留基準値設定の要請書 ツラスロマイシン: 添付資料 19; [Study # 00-1507-24](未公表)
40. William 2001; 抗微生物薬 グッドマン・ギルマン 薬理書(下) 薬物治療の基礎と臨床 第10版; 廣川書店
41. 梅崎倫也 他(2005); Azithromycin の使用成績調査. 日本化学療法学会雑誌: 2005, 53(5), 313-325
42. 青木宏二 他(2005); 小児を対象とした azithromycin の市販後調査. 日本化学療法学会雑誌: 2005, 53(6), 371-383
43. 青木宏二 他(2005); 成人を対象とした azithromycin の市販後調査. 日本化学療法学会雑誌: 2005, 53(7), 421-430

