

動物用医薬品評価書

エンロフロキサシンを有効成分とする製造用原体(バイトリル原体)、鶏の飲水添加剤(バイトリル 10%液)、牛の強制経口投与剤(バイトリル 2.5%HV 液)並びに牛及び豚の注射剤(バイトリル 2.5%注射液、同 5%注射液、同 10%注射液)の再審査に係る食品健康影響評価について

2006年5月

食品安全委員会

<目次>

	頁
1. バイトリルについて	3
2. 再審査における安全性に関する知見等について	3
3. 再審査に係る評価について	4
4. 参考文献	4

<別添目次>

1. 薬剤の概要	1
2. 毒性試験の概要	1
2-1. 吸収・分布・代謝・排泄	1
2-2. 毒性試験	4
(1) 急性毒性試験	4
(2) 亜急性毒性試験	4
(3) 慢性毒性試験	8
(4) 繁殖毒性試験及び催奇形性試験	11
(5) 遺伝毒性試験	14
(6) 一般薬理試験	15
(7) その他	16
(8) 微生物学的影響に関する特殊試験	17
(9) ヒトにおける知見について	19
3. 食品健康影響評価について	19
4. 参考文献	24

〈審議の経緯〉

平成16年10月29日

平成16年11月4日

平成16年11月16日

平成17年9月13日

平成17年9月15日

平成17年11月9日

平成17年12月16日

平成18年2月24日

平成18年3月16日

平成18年3月16日

—4月12日

平成18年4月28日

平成18年5月17日

平成18年5月18日

農林水産厚生労働大臣から食品健康影響評価について要請、関係書類の接受

第68回食品安全委員会（要請事項説明）

第20回動物用医薬品専門調査会

厚生労働大臣から食品健康影響評価について要請、関係書類の接受

第111回食品安全委員会（要請事項説明）

第39回動物用医薬品専門調査会

第41回動物用医薬品専門調査会

第46回動物用医薬品専門調査会

第135回食品安全委員会

国民からの意見情報の募集

第52回動物用医薬品専門調査会

動物用医薬品専門調査会座長から食品安全委員会委員長へ報告

第143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農林水産大臣、厚生労働大臣に通知

〈食品安全委員会委員〉

委員長	寺田	雅昭
委員長代理	寺尾	允男
	小泉	直子
	坂本	元子
	中村	靖彦
	本間	清一
	見上	彪

〈食品安全委員会動物用医薬品専門調査会専門委員〉

H17. 9. 30まで

座長	三森	国敏
座長代理	井上	松久
	青木	宙
	明石	博臣
	江馬	眞
	大野	泰雄
	菅野	純
	嶋田	甚五郎
	鈴木	勝士

津田	洋幸
寺本	昭二
長尾	美奈子
中村	政幸
林	眞
藤田	正一

H17. 10. 1から

座長	三森	国敏
座長代理	井上	松久
	青木	宙
	明石	博臣
	江馬	眞
	大野	泰雄
	小川	久美子
	渋谷	淳
	嶋田	甚五郎
	鈴木	勝士

津田	修治
寺本	昭二
長尾	美奈子
中村	政幸
林	眞
藤田	正一
吉田	緑

エンロフロキサシンを有効成分とする製造用原体(バイトリル原体)、鶏の飲水添加剤(バイトリル10%液)、牛の強制経口投与剤(バイトリル2.5%HV液)並びに牛及び豚の注射剤(バイトリル2.5%注射液、同5%注射液、同10%注射液)の再審査に係る食品健康影響評価について

1. バイトリルについて^{(1),(2),(3),(4),(5),(6)}

バイトリル原体、バイトリル10%液、バイトリル2.5%HV液については平成3年11月15日、バイトリル2.5%注射液、同5%注射液、同10%注射液については平成4年6月2日に農林水産大臣より動物用医薬品として承認を受けた後、所定の期間が経過したため再審査申請が行われた。製剤の内容については次の通りである。

①主剤

主剤はエンロフロキサシンである。

②効能・効果

適応症はバイトリル10%液が鶏の呼吸器性マイコプラズマ病及び大腸菌症(適応菌種はマイコプラズマ・ガリセプティカム、大腸菌)、バイトリル2.5%HV液が牛の肺炎、大腸菌性下痢症(適応菌種はマイコプラズマ・ボビス、ウレアプラズマ・ディパーサム、パスツレラ・ムルトシダ、大腸菌)、バイトリル2.5%注射液、同5%注射液、同10%注射液が牛の肺炎、大腸菌性下痢症、豚の胸膜肺炎、大腸菌性下痢症(適応菌種は大腸菌、パスツレラ・ムルトシダ、アクチノバチルス・プルロニューモニエ、マイコプラズマ・ボビス、ウレアプラズマ・ディパーサム)である。

③用法・用量

バイトリル10%液は飲水1L当たりエンロフロキサシンとして50mgを均一に混和して飲水投与する。バイトリル2.5%HV液は1日1回体重1kg当たりエンロフロキサシンとして牛の肺炎については2.5~5mgを3~5日間、大腸菌性下痢症については2.5mgを3日間、強制経口投与する。バイトリル2.5%注射液、同5%注射液、同10%注射液は、1日1回体重1kg当たりエンロフロキサシンとして牛の肺炎については2.5~5mgを3~5日間、大腸菌性下痢症については2.5mgを3日間、頸部皮下に注射、豚の胸膜肺炎については2.5~5mgを3日間、大腸菌性下痢症については1.25~2.5mgを1~3日間、頸部筋肉内に注射する。休薬期間はバイトリル10%液が7日、バイトリル2.5%HV液が30日、バイトリル2.5%注射液、同5%注射液、同10%注射液が牛については21日(搾乳は96時間)、豚については20日である。なお、これらの製剤については、第一選択薬が無効の症例のみに使用することとされている。

2. 再審査における安全性に関する知見等について

(1)ヒトに対する安全性について

バイトリルについては、上記の通り国内では鶏の呼吸器性マイコプラズマ病及び大腸菌症、牛の肺炎、大腸菌性下痢症、豚の豚胸膜肺、大腸菌性下痢症を対象に使用されている。また、欧州、米国においても広く使用されており、EMEAで6.2µg/kg体重/日^{(7),(8),(9),(10),(11)}、FDAで3µg/kg体重/日⁽¹²⁾、JECFAで2µg/kg体重/日⁽¹³⁾のADIが設定されている。日本においてADI及びMRLの設定はされていない。なお、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評価が実施され、鶏に対する使用許可が2005年9月12日に取り消された。⁽¹⁴⁾

(2)安全性に関する研究報告について^{(15),(16)}

調査期間中のMedlineを含むデータベース検索の結果、分析、耐性菌に関する報告等が複数報告されている。

(3)承認後の副作用報告について^{(15),(16)}

対象動物に対する安全性については、10%液について調査期間中に鶏171,313羽、2.5%HV液について牛661頭、2.5%注射液については牛358頭及び豚481頭、5%注射液については牛513頭及び豚502頭、10%注射液については牛431頭及び豚356頭の調査が実施され、いずれも対象動物に対する新たな副作用は認められなかったとされている。

3. 再審査に係る評価について

本製剤は鶏に飲水投与、牛や豚に筋肉内注射されるが、日本においてMRLの設定はなされていないことから、エンロフロキサシンのADI設定について別添の通り評価を実施した。

エンロフロキサ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。

エンロフロキサシン 0.002mg/kg体重/日

ただし、本剤の再審査に係る評価については、薬剤耐性菌を介した影響について考慮する必要があり、これについてはなお検討中である。

4. <参考文献>

- (1) バイトリル原体 再審査申請書(未公表)
- (2) バイトリル2.5%HV液 再審査申請書(未公表)
- (3) バイトリル10%液 再審査申請書(未公表)
- (4) バイトリル2.5%注射液 再審査申請書(未公表)
- (5) バイトリル5%注射液 再審査申請書(未公表)
- (6) バイトリル 10%注射液 再審査申請書(未公表)
- (7) ENROFLOXACIN SUMMARY REPORT(1) ; EMEA
- (8) ENROFLOXACIN SUMMARY REPORT(2) ; EMEA
- (9) ENROFLOXACIN SUMMARY REPORT(3) ; EMEA
- (10) ENROFLOXACIN SUMMARY REPORT(4) ; EMEA
- (11) ENROFLOXACIN SUMMARY REPORT(5) ; EMEA
- (12) 21CFR 556.228
- (13) WHO Food Additives Series 39, ENROFLOXACIN
- (14) <http://www.fda.gov/cvm/FQWithdrawal.html>
- (15) バイトリル原体, バイトリル 2.5%HV 液, バイトリル 10%液 再審査申請書添付資料: 効能又は効果及び安全性についての調査資料(未公表)
- (16) バイトリル 2.5%注射液, バイトリル 5%注射液, バイトリル 10%注射液 再審査申請書添付資料: 効能又は効果及び安全性についての調査資料(未公表)

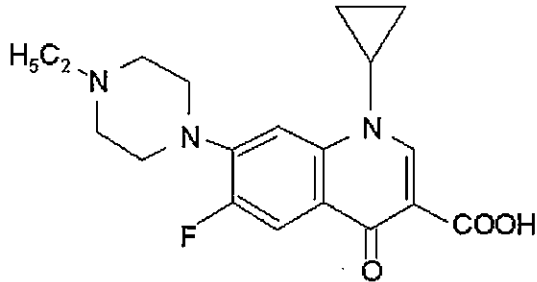
(別添)

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 ジャイレース、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、閉鎖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。⁽⁹⁾

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 ¹⁴C 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 LD₅₀ 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 LD₅₀ の算出は不可能であった。静脈内投与による LD₅₀ 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 LD₅₀ 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)間休薬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。

⁹ 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週時点に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相対及び絶対、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 ヶ月齢のビーグル犬(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 ヶ月齢のビーグル犬(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、3200ppm 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週頃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 관련된 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カ月と試験終了時の2時点で実施されている。

血液学的検査では、12カ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カ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カ月時点で雄の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カ月及び/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カ月時点で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カ月時点の雄の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カ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カ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、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)までは育てられ、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育てられた。

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、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。

(5) 遺伝毒性試験

変異原性に関する各種の *in vitro* 及び *in vivo* 試験の結果を次表にまとめた。

【変異原性に関する各種試験の結果一覧】

in vitro 試験

試験	対象	投与量	結果
不定期 DNA 合成試験 (UDS 試験)	ラット初代培養肝細胞	1~500µg/mL ¹	陰性 ⁽³⁴⁾
Ames 試験	<i>S. typhimurium</i> TA1535, TA1537, TA98, TA100, <i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	0.5~150 ng/plate(±S9) ²	陰性 ⁽³⁵⁾
	<i>S. typhimurium</i> TA1535, TA1537, TA98, TA100, <i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	0.05~15 ng/plate(±S9) ³	陰性 ⁽³⁵⁾
	<i>S. typhimurium</i> TA1535, TA1537, TA98, TA100	0.004~40ng/plate(±S9) ⁴	陰性 ⁽³⁶⁾
染色体異常試験	CHO(WBI) ⁽³⁷⁾	50~250 µg/mL ⁵ (-S9 ; 23h)	陽性 (250µg)
		25~500 µg/mL ⁶ (-S9 ; 22h)	陽性 (250µg)
		250~1000 µg/mL ⁷ (+S9 ; 2h+24.25h)	陰性
		100~2000 µg/mL ⁸ (+S9 ; 2h+22.8h)	陰性
前進突然変異試験	CHO(K1-BH/HPRT) ⁽³⁸⁾	0.25~1.25 mg/mL ⁹ (-S9 ; 4h)	不明確 ¹⁰
		0.375~1.25 mg/mL ⁹ (+S9 ; 4hr)	不明確 ¹¹

1 500µg/mL では細胞致死作用により解析不可能

2 1.5(TA1535-S9)、5(TA100±S9, TA1535+S9)、15(WP2±S9, TA98-S9, TA1537+S9)、50(TA98+S9, TA1537-S9)ng/plate で菌の生育阻害が認められた。

3 5(TA100±S9, TA1535±S9, TA1537±S9)、15(WP2±S9, TA98±S9)ng/plate で菌の生育阻害が認められた。

4 予備試験において 40ng/plate 以上で菌の生育阻害が認められた

5 50µg/mL については 7.2h 処理も実施。250µg/mL では細胞毒性が認められた。

6 50µg/mL 以下については 7.5h 処理も実施。250µg/mL で細胞毒性が認められ、500µg/mL では有糸分裂中の細胞が得られなかった。

7 500µg/mL 以下については 8.25h 処理も実施。500µg/mL 以上で細胞毒性が認められた。

8 500µg/mL 以下については 8.2h 処理も実施。2000µg/mL では有糸分裂中の細胞が得られなかった。

9 1mg/mL 以上では細胞毒性が認められた。

10 陽性結果が散見されたが、再現性、用量相関性がなく、変動は背景対照の範囲内であった。

11 陽性結果が散見されたが、再現性、用量相関性がない

上記のように、*in vitro* の試験においては UDS 試験及び Ames 試験で陰性であったが、ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験では、-S9 条件下のみ、細胞毒性の認められる用量で陽性の結果が得られている。また、ほ乳類培養細胞を用いた前進突然変異試験では陽性結果が散見されるものの、再現性に乏しく、用量相関性の無い、不明瞭な結果が得られている。

in vivo 試験

試験系	試験対象	投与量	結果
小核試験	マウス骨髄 ⁽³⁹⁾	2000 mg/kg/日, 単回腹腔内 ¹	陰性
		1000, 1500, 2000 mg/kg/日, 単回腹腔内 ²	陰性
染色体異常試験	ラット骨髄 ⁽⁴⁰⁾	40, 200, 1000mg/kg/日, 単回経口 ³	陰性

¹ 9/30 の動物が死亡し、72 時間後の観察では多染性赤血球に対する成熟赤血球比率に毒性影響が認められた。

² 1500mg 以上投与群で 3/10 の動物が死亡した。

³ 予備試験で 1500mg 以上の投与では副作用のため試験が困難とされた。1000mg 投与群では一部に重度の副作用が認められた。

上記の通り、げっ歯類を用いた *in vivo* の骨髄小核試験、骨髄染色体異常試験ではいずれも陰性であった。

エンロフロキサシンの遺伝毒性については CHO 培養細胞を用いた前進突然変異試験で陽性を疑わせる結果及び染色体異常試験で S9 条件下の細胞毒性が認められる用量において陽性の結果が報告されている。しかし、骨髄に毒性影響が認められる用量まで試験されたマウスを用いた骨髄小核試験及び個体に著しい毒性が認められる用量まで試験されたラットを用いた骨髄染色体異常試験のいずれも陰性であった。

これらのことから、エンロフロキサシンに生体にとって問題となる遺伝毒性はないと考えられる。

(6) 一般薬理試験

【一般症状及び行動】

Irwin の多次元観察法(マウス)において 25mg/kg 体重以上の腹腔内投与で運動性の抑制、83mg/kg 体重以上で認知力の抑制、250mg/kg 体重で振戦、攣縮、痙攣等の中枢興奮症状、姿勢制御抑制、眼裂縮小、排尿、流涎、立毛、体温降下等の自律神経症状が認められた。これらの症状は投与後 30~60 分で最大となり、約 2-3 時間で消失した。8.3mg/kg 体重の投与では一般症状及び行動に著変は認められなかった。

(41)

【中枢神経系への作用】

体温測定(ウサギ; 直腸温)においては 83mg/kg 体重の静脈投与で 1 例に(1/3)軽度の上昇が認められた(8.3, 25mg/kg では影響なし)。(41)

ヘキソバルビタール麻酔(マウス; 睡眠時間)、中枢性協調能(マウス; 平行棒法)、鎮痛作用(マウス; 熱板法)、抗痙攣作用(マウス; 電気刺激、ペントテトラゾール痙攣)、懸垂能(マウス; 水平棒)、カタレプシー(マウス、ラット)、探索行動(マウス; Hoffmeister らの方法)、反射(ラット; 舌下顎反射、神経伝達阻害)において、100mg/kg までの経口投与で影響は認められなかった。自発運動(マウス)は 100mg/kg の経口投与で軽度の亢進作用を示した。(42)

【自律神経系への作用】

ウサギでは投与直後に一過性の縮瞳が認められた他に変化は認められなかった。(41)

【平滑筋に対する作用】

生体位子宮運動(ウサギ)では 83mg/kg 体重の静脈投与で自発性収縮の軽度な減少が認められた。(41)

摘出回腸(モルモット; 自発収縮)では 10^{-7} ~ 10^{-4} g/mLの濃度でコリン作動薬による収縮、ヒスタミン収縮に対して濃度依存的に抑制作用を示した。単独では収縮及び弛緩作用を示さなかった。⁽⁴¹⁾

摘出気管(モルモット; 自発収縮)においては、10 μ g/mLまでの濃度で摘出気管の固有緊張(トーン)、ヒスタミン及びロイコトリエンD₄による収縮に影響を及ぼさなかった。⁽⁴³⁾

【消化器系に対する作用】

腸管輸送能(ラット; 炭末移動)、胃忍容性(ラット; 損傷測定)においては、100mg/kgまでの濃度の経口投与で影響を及ぼさなかった。胃酸基礎分泌(ラット; 胃管流液の測定)においては、100mg/kgまでの用量の十二指腸内投与で影響を及ぼさなかった。⁽⁴⁴⁾

【呼吸循環器系への作用】

呼吸、血圧、心拍数(いずれもウサギ; 8.3、25、83mg/kgの静脈投与)が観察された。呼吸数はいずれの用量でも投与直後から用量依存的に減少したが、15分から回復傾向を示し、60分には回復した。血圧は投与直後から60-90分まで軽度低下したが、その後は回復傾向を示した。心拍数は83mg投与群で投与直後から減少し、5分後には約23%の減少が認められた。その後は増加に転じ、30分後には約10%増加し、以後180分まで持続した。25mg以下では変化は認められなかった。⁽⁴¹⁾

血圧、心拍数、血流量、心電図(麻酔イヌ)では5及び15mg/kgの静脈内投与で一過性の軽度血圧低下を伴った末梢血管拡張、左心室内圧上昇速度の増加が認められた。これらの変化は投与量に関わりなく同様であり、内因性ヒスタミンの遊離の可能性が示唆された。⁽⁴⁵⁾

【血液系への作用】

血液系への作用は、血液凝固能(ラット; 血液凝固時間、血小板凝集、線維素溶解作用)について実施されたが、100mg/kgまでの経口投与では影響は認められなかった。⁽⁴⁶⁾

【その他】

尿排泄への作用(ラット; 尿量、Na⁺、K⁺測定)においては100mg/kgの経口投与でK⁺の排泄が増加した。30mg/kgまでの濃度では影響は認められなかった。⁽⁴⁷⁾

血糖値、血清トリグリセライド値(ラット)においては、摂食ラットでは100mg/kgまでの経口投与では影響は認められなかったが、絶食ラットでは30mg/kg以上の経口投与で血糖値、血清トリグリセライド値の上昇が認められた。耐糖能(絶食ラット; グルコース経口負荷試験)においては、100mg/kgまでの経口投与では影響は認められなかったが、100mg/kgの投与120分後の血糖値には上昇が認められた。⁽⁴⁸⁾

(7)その他

【皮膚感作性】

雄モルモット(白色種)15匹に25%エンロフロキサシン懸濁液を粘着性パッチを用いて試験0、7、14日目にそれぞれ6時間皮膚に貼付し、感作を行った。27日目に感作と同様の処置を行い、24及び48時間後の発赤の程度を確認したところ、48時間後に1例で非常に弱い発赤が認められたのみであり、感作性はないものと考えられた。⁽⁴⁹⁾

(8) 微生物学的影響に関する特殊試験

【*in vitro* の MIC に関する試験】

①臨床分離菌に対する最小発育阻止濃度 (MIC)^{(50),(51)}

ヒト臨床分離株等に対するエンロフロキサシンの 10^7 cfu/mL における MIC が報告されている。

菌名	株数	最小発育阻止濃度(μg/mL)		
		Enrofloxacin		
		MIC ₅₀	MIC ₉₀	範囲
偏性嫌気性菌				
<i>Bacteroides</i> spp.	10 ⁷	1	4	0.5-4
<i>Bifidobacterium</i> spp.	10	0.5	2	0.016-2
<i>Clostridium</i> spp.	10	0.5	4	0.125-4
<i>Eubacterium</i> spp.	10	0.25	0.25	0.125-4
<i>Fusobacterium</i> spp.	10	0.125	8	0.062-8
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	10	0.25	8	0.062-16
通性嫌気性菌				
<i>Enterococci</i>	10	1	1	0.5-1
<i>Escherichia coli</i>	10	0.031	0.062	0.031-0.062
<i>Lactobacillus</i> spp.	10	0.5	1	0.5-4
<i>Proteus</i> spp.	10	0.125	0.125	0.062-0.125

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 *Escherichia coli* の 0.031 μg/mL であった。次いで *Fusobacterium* spp.、*Proteus* spp. の 0.125 μg/mL であった。

②代謝物のヒトの腸内細菌に対する最小発育阻止濃度 (MIC)

エンロフロキサシン及びエンロフロキサシンの代謝物として同定されたシプロフロキサシン、オキソシプロフロキサシン、開環オキソシプロフロキサシン、7-aminoacetic fluoroquinolonic acid、desethylene enrofloxacin、desethylene ciprofloxacin、n-formyl ciprofloxacin、7-aminofluoro-quinolonic acid、オキソエンロフロキサシンについて、*Escherichia coli*、*Proteus*、*Lactobacillus*、*Enterococcus*、*Staphylococcus* に対する MIC が測定されたが、抗菌活性はシプロフロキサシンを除きいずれもエンロフロキサシンよりも弱かった。

③pHの最小発育阻止濃度 (MIC)に及ぼす影響

エンロフロキサシンの *Bacteroides* spp.、*Bifidobacterium* spp.、*Clostridium* spp.、*Enterococcus* spp.、*Escherichia coli*、*Eubacterium* spp.、*Fusobacterium* spp.、*Lactobacillus* spp.、*Peptostreptococcus* spp.、*Proteus* spp. に対する MIC(算術平均)に pH が及ぼす影響が調査されている。少数例を除き pH7.2 で pH6.2 あるいは 5.2 よりも強い抗菌活性が認められた。

^o *Peptostreptococcus* spp.、*Eubacterium* spp. は pH5.2 においてやや強い抗菌活性を示した

④ *in vitro* 擬似腸内環境における細菌の生存率

エンロフロキサシンを Cooked meat 培地に加え、適当な pH、塩濃度でペプシン、パンクレアチン処理した腸内環境を模した条件下において、*Bifidobacterium* は 0.4、*Escherichia coli* は 0.56、*Enterococcus*、*Clostridium* は 0.9、*Bacteroides* は 1.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度のエンロフロキサシン存在下においても菌の増殖が認められた。これらはいずれも①で測定された MIC よりも高い濃度であった。

【ヒトボランティアにおける微生物学的影響】

エンロフロキサシンについて、ヒトにおける直接の知見は得られていないが、シプロフロキサシンについては複数の事例が報告されている。

12名の健常男性ボランティアについて、500mgのシプロフロキサシンを1日2回、7日間経口投与し、投与前、投与最終日及び投与終了後1週時点の糞便中の大腸菌(*Coli forms*)、*Streptococci*、*Staphylococci*、酵母及び偏性嫌気性菌数の変動が報告されている。投与最終日では、大腸菌が消失し、*Streptococci*、*Staphylococci* は統計学的に有意に減少した。酵母は増加、偏性嫌気性菌は減少したがいずれもわずかであった。投与終了後1週の時点では、これらはほぼ回復した。⁽⁵²⁾

12名の健常ボランティア(男女各6名)について、400mgのシプロフロキサシンを1日2回、7日間経口投与し、投与前、投与期間中の2、5日、投与終了後1、3、8日時点の糞便中の *E. coli*、*Streptococci*、*Staphylococci*、カンジダ酵母、偏性嫌気性菌(*Bacteroides*、*Bifidobacterium*)等の変動が報告されている。投与開始後、*E. coli* が消失し、*Streptococci*、*Staphylococci* が減少した。カンジダ酵母、偏性嫌気性菌は減少したがいずれもわずかであった。投与終了後、これらは徐々に回復した。また、*Clostridium difficile* は投与前、投与期間中、投与後共に検出されなかった。⁽⁵³⁾

12名の健常ボランティア(男女各6名)について、500mgのシプロフロキサシンを1日2回、5日間経口投与し、投与前、投与期間中の1、3、5日、投与終了後2、14日時点の糞便中の種々の通性嫌気性菌(*enterobacteria*、*enterococci* 等)や偏性嫌気性菌(*anaerobic cocci*、*Bacteroides*、*Bifidobacterium*、*Fusobacterium* 等)の変動が報告されている。投与開始後、*enterobacteria*、*enterococci* は顕著に減少したが、偏性嫌気性菌の減少はわずかであった。投与終了後14日の時点では、これらはほぼ回復した。*Clostridium difficile* 及びその毒素は投与前、投与期間中、投与後共に検出されなかった。また、MIC₅₀が1mg/Lを超える耐性菌の出現は認められなかった。⁽⁵⁴⁾

12名の健常ボランティアについて、200mgのシプロフロキサシンを1日4回、6日間経口投与し、投与前、投与期間中毎日、投与終了後4日までの糞便中の *Streptococci*、カンジダ酵母、腸内細菌科の細菌の変動が報告されている。腸内細菌科の細菌は投与4日目には消失し、*Streptococci* はわずかに減少、カンジダ酵母がわずかに増加した。投与終了後7日の時点では、これらはほぼ回復した。また、耐性菌の出現は認められなかった。⁽⁵⁵⁾

14名の肝硬変患者(男性5、女性9名)について、シプロフロキサシン500mgを1日1回、もしくは250mgを1日2回、5-10日間経口投与し、投与前、投与期間中3-5日、投与終了後2-4、5-8、9-14日の糞便中の種々の通性嫌気性菌、偏性嫌気性菌、酵母の変動が報告されている。投与開始後、腸内細菌科の細菌は顕著に減少し、*bacteroides* も減少したが、投与終了後14日の時点ではこれらはほぼ回復した。それぞれの投与群の各1名で投与期間中カンジダ酵母が認められ、投与終了後14日の時点においてもなお認められた。⁽⁵⁶⁾

10名の健常ボランティアについて、750mgのシプロフロキサシンを単回経口投与し、投与前及び投与後8日までの糞便中の種々の通性嫌気性菌、偏性嫌気性菌、酵母の変動が報告されている。投与開始後、腸内細菌科の細菌が顕著に減少し、このため通性嫌気性菌数が減少した。偏性嫌気性菌、*Streptococci*、

Staphylococci、酵母には投与の影響はほとんど認められなかった。また、*Pseudomonas aeruginosa*、*Clostridium difficile* は投与前に *C. difficile* の健常キャリアーであった1名を除き検出されなかった。投与によりナリジクス酸耐性の腸内細菌科の細菌が増加したが、投与後5-8日までには投与前の状態となった。⁽⁵⁷⁾

(9) ヒトにおける知見について

【ヒトにおけるキノロンの毒性影響】

エンロフロキサシンのヒト臨床における使用歴はないが、同系統に属するキノロン類あるいはフルオロキノロン類の抗生物質、代謝物であるシプロフロキサシンは広くヒト臨床において利用されている。

臨床で認められた副作用で最も一般的なものは消化器系への影響で、悪心、嘔吐等であるが下痢や抗生物質に起因する大腸炎はまれであるとされている。その他、中枢神経系に関連するものとして頭痛、めまい、消炎薬との併用で痙攣、アレルギー反応に関連するものとして発疹があるとされる。この系統の薬剤による副作用に特徴的なものとして、特に未成熟な動物における関節痛や関節膨張等の関節障害、一部では光毒性に由来する光過敏症がある。

【薬剤耐性菌について】

エンロフロキサシンの代謝物であるシプロフロキサシンはヒト臨床において広く使用されている。なお、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評価が実施され、鶏に対する使用許可が2005年9月12日に取り消された。

3. 食品健康影響評価について

【関節影響に関する知見について】

キノロン剤は未成熟な動物における関節痛や関節膨張等の関節障害を起こすことが知られている。エンロフロキサシンについては、3カ月齢のビーグル犬を用いた13週間の混餌投与試験において関節影響が観察されている。3.0、9.6、75mg/kg 体重/日の用量が13週間投与され、臨床症状観察で75mg 投与群に手根関節の過伸展、病理組織学的検査で9.6mg 以上の投与群に股関節や膝関節の異常が認められた。これらは3.0mg 投与群では観察されず、関節影響に対するNOAELは3.0mg/kg 体重/日であると考えられた。

【若齢犬における精巢毒性について】

若齢犬における精巢に対する影響については、3ヶ月齢のビーグル犬を用いた13週間の混餌投与試験が実施されている。精細管中の精原細胞の空胞化が対照群を含めて観察された。空胞化自体は対照群を含めて観察されていたが、用量相関性はないものの最高用量(2500ppm)における発生頻度が高く認められたため、この変化がエンロフロキサシンの投与に関連するものであるかを検討する目的で最高用量を3200ppmに設定した追加試験が実施されている。追試験においても、対照群を含めた全ての群で同様の精原細胞の空胞化が認められ、これらの試験条件下においては被験物質投与の有無にかかわらず空胞変性の発生が認められるものと考えられた。一方、発生頻度は最高用量を含め投与群間で差は認められず、高用量における空胞変性の発生頻度の増加は再現できなかった。これらのことから、これら若齢犬において認められた精原細胞の空胞変性は発達過程における生理的な変化の範囲内であり、エンロフロキサシンの投与に伴う影響ではないと判断された。なお、成熟犬においては2000ppmまでの投与でもこれらの変化は認められていない。

【繁殖毒性及び催奇形性について】

繁殖毒性及び催奇形性については、ラットの2世代繁殖試験、ラット、ウサギの催奇形性試験が実施されている。ラットの繁殖試験において高用量で精子の変性が認められたが、NOAEL が明確になっており(10mg/kg 体重/日)、また回復性の変化であった。

ラット、ウサギとも催奇形性は認められなかった。

【遺伝毒性／発がん性について】

遺伝毒性試験については、*in vitro* のUDS試験、Ames試験では代謝活性化の有無にかかわらず陰性を示した。ほ乳類培養細胞を用いた前進突然変異試験では遺伝子変異を疑わせる所見が散見されたが、その発生頻度には用量相関性が無く、再現性も認められなかった。一方、ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験では非代謝活性化条件下の細胞毒性が認められる用量で陽性の結果が得られている。しかしながら、*in vivo* の骨髄に毒性影響が認められる用量まで試験されたマウスを用いた骨髄小核試験及び個体に著しい毒性が認められる用量まで試験されたラットを用いた骨髄染色体異常試験のいずれも陰性であった。これらのことから、生体にとって問題となる遺伝毒性はないと考えられる。

発がん性については、マウス及びラットの2年間の発がん性試験が実施されている。このうちマウスの試験では発がん性を示唆する報告は認められなかった。ラットの試験では、雌の6000ppm投与群で統計学的な有意差はないが、心内膜下神経鞘腫の増加が認められ、心内膜下間葉性細胞過形成と合算した場合、統計学的に有意であった。この所見は別途評価され、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。

【光毒性について】

1990年代後半からフルオロキノロン剤について光毒性／光遺伝毒性があることが報告されてきており、そのメカニズムについて光照射によって活性化された分子のDNAとの直接作用、光照射によって生じた活性酸素やフリーラジカルの生成による二次的傷害が提案されている。フルオロキノロン剤の光毒性や光遺伝毒性についてはいくつかの報告があり、構造的に6位及び8位にハロゲン置換基を有するフルオロキノロン剤が明らかに強い光毒性を示すこと⁽⁵⁸⁾、1位の置換基の種類によっては光毒性が減弱することが報告されている⁽⁵⁹⁾、⁽⁶⁰⁾。エンロフロキサシンについて直接のデータは得られていないが、代謝物であるシプロフロキサシンについてはいくつかの報告が得られている。エンロフロキサシンとシプロフロキサシンの構造的な違いはエチル基の有無のみであり、光毒性／光遺伝毒性についてはほぼ同様と推定される。

シプロフロキサシンについて、*in vitro* ではCHLV79培養細胞を用いたUV照射による細胞毒性の増強、コメットアッセイ⁽⁶¹⁾や光小核試験⁽⁶²⁾でいずれもUV照射による毒性の増強が認められたが、他のフルオロキノロン剤との比較では相対的に弱いものであった。また、UV照射後のマウスの耳炎炎症を指標とした試験⁽⁵⁸⁾、⁽⁵⁹⁾において光毒性が弱いことが知られるオフロキサシンとほぼ同レベルであったこと、ヒトボランティアのUV照射後皮膚紅斑を指標とした試験においては、1回500mg、7日間の投与でも影響

は弱かったこと⁽⁶³⁾が報告されている。

これらのことから、少なくともエンロフロキサシンについてはフルオロキノロン剤の中では光毒性／光遺伝毒性は弱い部類に分類される。また、適切に管理される限り、通常食品中のエンロフロキサシンの残留はごく微量であり、食品を介して生体にとって問題となる光遺伝毒性が生じる可能性は無視できる程度と考えられる。

【毒性学的影響のエンドポイントについて】

毒性学的影響につ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、ラットの2年間慢性毒性試験で認められた胆管過形成であり、NOAELは2.9mg/kg体重/日であった。

【微生物学的影響のエンドポイントについて】

微生物学的影響の評価については、ヒトの腸内細菌叢への影響を十分に反映できる単独の試験法が確立されていない現状を考慮すると、得られている知見のうち最も適切と考えられるものを用いて微生物学的ADIを設定する手法が妥当であると考えられる。エンロフロキサシンは生体内で代謝されるが、シプロフロキサシンを除き、代謝物の抗菌活性はほとんどない。シプロフロキサシンの抗菌活性はエンロフロキサシンとほとんど同等であり、主要な畜産動物における残留物は未変化体のエンロフロキサシンが主であった。エンロフロキサシンについてヒトにおける直接の知見は得られておらず、シプロフロキサシンについてはいくつかのヒトにおける知見があるが、明確な無影響量は特定できていない。このため、現時点ではエンロフロキサシンの *in vitro* の MIC₅₀ を用いて検討するのが妥当と考えられた。

エンロフロキサシンの MIC₅₀ については、ヒト腸内細菌叢から優勢に検出される *Bacteroides*、*Bifidobacterium*、*Clostridium*、*Eubacterium*、*Fusobacterium*、*Peptostreptococcus*、*Enterococci*、*E. coli*、*Lactobacillus*、*Proteus* の10種について10菌株の合計100菌株についてMIC₅₀の情報が得られている。

単純に最も感受性が高かった細菌種は *E. coli* であり、その MIC₅₀ 値は0.031 µg/mLであったが、*E. coli* についてはヒト腸内細菌の総細菌数に占める割合はごくわずか(1%程度)で、腸内細菌叢の変動に対する寄与率は軽微であること、一般的に高度に感受性か非感受性であることが多いことから、単独で微生物学的ADIの評価に用いるMIC₅₀として採用するべきではないとされている⁽⁶⁴⁾ ⁽⁶⁵⁾。指標として妥当と考えられる細菌種の中で、最も感受性が高かったのは *Fusobacterium* spp.、*Proteus* spp.における0.125 µg/mLであり、現時点においてはこれらにおけるMIC₅₀の0.125 µg/mLを採用することが妥当であると判断された。

なお、ニューキノロンはナリジクス酸等のオールドキノロンと比較して耐性を付与しにくいとされているが、耐性菌が選択される可能性は否定できない。この問題についての定性あるいは定量的評価には、別途のリスク評価が必要であると考えられる。

【微生物学的ADIの設定について】

微生物学的影響について現時点で利用可能なものは *in vitro* の MIC₅₀ のみであった。結腸内容物に220g、細菌が暴露される分画に20%、ヒト体重に60kgを適用すると、

$$\text{ADI (mg/kg 体重/日)} = \frac{0.000125 \text{ (mg/mL)} \times 220 \text{ (g)}}{0.2^f \times 60 \text{ (kg)}} = 0.002 \text{ mg/kg 体重/日}$$

^f シプロフロキサシンのヒトにおける知見に基づく

となる。

【一日摂取許容量(ADI)の設定について】

エンロフロキサシンについては、遺伝毒性および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。

毒性学的影響につ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、ラットの2年間慢性毒性試験におけるNOAEL 2.9 mg/kg 体重/日であった。この知見からADIを設定するにあたっては、種差 10、個体差 10 の安全係数 100 を考慮し、毒性学的データからはADIは 0.029 mg/kg 体重/日と設定される。一方、微生物学的影響から導かれたADIは 0.002mg/kg 体重/日であった。

毒性学的データから導かれるADIと微生物学的データから導かれるADIを比較すると、微生物学的データから導かれた値がより小さくなり、感受性が高いと考えられる。このためエンロフロキサシンの残留基準を設定するに際してのADIとしては、0.002 mg/kg 体重/日と設定することが適当であると考えられる。

【食品健康影響評価について】

以上より、エンロフロキサ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。なお、本剤の再審査に係る評価については、薬剤耐性菌を介した影響について考慮する必要があり、これについては検討中である。

エンロフロキサシン 0.002 mg/kg 体重/日

本評価書中で使用した略号については次にならった

ADI	一日許容摂取量
ALT	アラニンアミノトランスフェラーゼ
AP	アルカリフォスファターゼ
AST	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
AUC	血中薬物濃度-時間曲線下面積
BUN	血液尿素窒素
cAMP	サイクリック AMP
CHL	チャイニーズハムスター肺由来細胞株
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
CPK	クレアチンフォスフォキナーゼ
GOT	グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ
GPT	グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ
Hb	ヘモグロビン(血色素)
Ht	ヘマトクリット
LOAEL	最小毒性量
LOEL	最小作用量
MCH	平均赤血球血色素量
MCHC	平均赤血球血色素濃度
MCV	平均赤血球容積
MIB	最小殺菌濃度
MIC	最小発育阻止濃度
MLA	マウスリンフォーマ試験
NOAEL	無毒性量
NOEL	無作用量
$T_{1/2}$	消失半減期
TBIL	総ビリルビン
Tcho	総コレステロール
TDI	耐容一日摂取量
TG	トリグリセリド
T_{max}	最高血(漿)中濃度到達時間

4. <参考文献>

1. エンロフロキサシンの構造決定、物理的・化学的性質に関する試験資料(バイエルメディカル社内資料)
2. 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
3. Disposition and metabolism of Bay Vp 2674 in male rats(バイエルメディカル社内資料)
4. Biotransformation of BAY Vp 2674-2-¹⁴C in Sprague-Dawley Rats(バイエルメディカル社内資料)
5. Characterization of a rat urinary polar metabolite of BAY Vp 2674(バイエルメディカル社内資料)
6. M. Scheer (1987); Concentrations of active ingredient in the serum and tissues after oral and parenteral administration of Baytril
Vet Med Rev :1987 (2), 104-118
7. Metabolism of BAY Vp 2674-2-¹⁴C in the cow(バイエルメディカル社内資料)
8. Metabolism of BAY Vp 2674-2-¹⁴C in swine(バイエルメディカル社内資料)
9. Pharmacokinetics of BAY Vp 2674 in chickens(バイエルメディカル社内資料)
10. Metabolism of BAY Vp 2674-2-¹⁴C in chickens and turkeys(バイエルメディカル社内資料)
11. Metabolic profile of (2-¹⁴C) BAY Vp 2674-2-¹⁴C in chickens(バイエルメディカル社内資料)
12. BAY Vp 2674 Akute toxisität bei ratte, maus, kaninchen und hund(バイエルメディカル社内資料)
13. BAY Vp2674 のラット及びマウスにおける急性毒性試験(バイエルメディカル社内資料)
14. BAY Vp 2674 のマウスを用いた皮下投与による急性毒性試験(バイエルメディカル社内資料)
15. BAY Vp 2674 のラットを用いた皮下投与による急性毒性試験(バイエルメディカル社内資料)
16. BAY Vp 2674 のラットにおける4週間皮下投与による亜急性毒性試験(バイエルメディカル社内資料)
17. Safety evaluation of BAY Vp 2674: Subchronic (13week) feeding study in the rat(バイエルメディカル社内資料)
18. A subchronic (13week) feeding study followed by a 13-week withdrawal period in male rats with BAY Vp 2674
(バイエルメディカル社内資料)
19. Safety evaluation of BAY Vp 2674: Subchronic (13week) feeding study in the dog (バイエルメディカル社内資料)
20. Safety evaluation of BAY Vp 2674: repeat of a subchronic (13week) feeding study in the dog
(バイエルメディカル社内資料)
21. Safety evaluation of BAY Vp 2674: subchronic (13week) feeding study in male dogs(バイエルメディカル社内資料)
22. Safety evaluation of BAY Vp 2674: subchronic (13week) feeding study in male dogs followed by a 13-week withdrawal period(バイエルメディカル社内資料)
23. BAY Vp 2674 study of chronic toxicity and carcinogenicity (administration in feed over 24 months)
(バイエルメディカル社内資料)
24. BAY Vp 2674 study of chronic toxicity and carcinogenicity in rats after administration in feed over 2 years
(バイエルメディカル社内資料)
25. Pathology working group on a 2-year chronic feeding study with 1-year interim kill in rats on the compound BAY Vp 2674(バイエルメディカル社内資料)
26. WHO: Food Additives Series 34, 1994. Enrofloxacin
27. FDA: Freedom of Information Summary, NADA 140-828, 1996.
28. EMEA: COMMITTEE FOR VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS, ENROFLOXACIN, SUMMARY REPORT(1)~(5), 1998~2002
29. A two-generation reproduction study in rats with BAY Vp 2674(バイエルメディカル社内資料)

30. A two-generation reproduction study in rats with BAY Vp 2674(第二報)(ノバリエルメディカル社内資料)
31. A specialized male fertility study with BAY Vp 2674 in the rat(ノバリエルメディカル社内資料)
32. A Teratology (Segment II) study in the rat with BAY Vp 2674(ノバリエルメディカル社内資料)
33. Embryotoxicity (including teratogenicity) study with BAY Vp 2674 in the rabbit(ノバリエルメディカル社内資料)
34. Evaluation of BAY Vp 2674 in the rat primary hepatocyte unscheduled DNA synthesis assay
(ノバリエルメディカル社内資料)
35. 細菌による変異原性試験報告(ノバリエルメディカル社内資料)
36. BAY Vp 2674 Salmonella/Mikrosomen-Test zur untersuchung auf punktmutagene Wirkung
(ノバリエルメディカル社内資料)
37. Clastogenic evaluation of BAY Vp 2674: in an in vitro cytogenetic assay measuring chromosome aberration frequencies in chinese hamster ovary (CHO) cells(ノバリエルメディカル社内資料)
38. Mutagenicity evaluation of BAY Vp 2674 in the CHO HGPRT forward mutation assay: Final report
(ノバリエルメディカル社内資料)
39. BAY Vp 2674 micronucleus-test on the mouse to evaluate for mutagenic effect(ノバリエルメディカル社内資料)
40. BAY Vp 2674: Investigation of effects on bone marrow chromosomes of the rat after acute oral administration
(Amended Report)(ノバリエルメディカル社内資料)
41. BAY Vp2674 の一般薬理試験(ノバリエルメディカル社内資料)
42. ZNS-sicherheitspharmakologische Studie mit BAY Vp 2674(ノバリエルメディカル社内資料)
43. BAY Vp 2674 general/safety respiratory pharmacology: evaluation of bronchoactivity in the guinea-pig isolated trachea
(ノバリエルメディカル社内資料)
44. Safety pharmacology of BAY Vp 2674 in the gastrointestinal tract: its effect on intestinal charcoal transit, on gastric tolerability and basal gastric acid secretion in rats(ノバリエルメディカル社内資料)
45. Influence on hemodynamics and cardiac contractility of anaesthetized dogs after intravenous administration
(ノバリエルメディカル社内資料)
46. BAY Vp 2674 Blutpharmakologische untersuchungen(ノバリエルメディカル社内資料)
47. BAY Vp 2674 Prüfung auf diuretische wirkung an ratten(ノバリエルメディカル社内資料)
48. Beeinflussung der blutglucose-bzw. Serumtriglyceridkonzentration gefütterter bzw. nüchtemer ratten und glucosetoleranz nüchtemer ratten nach oraler applikation von BAY Vp 2674(ノバリエルメディカル社内資料)
49. Dermal sensitization evaluation of BAY Vp 2674 in the guinea pig(ノバリエルメディカル社内資料)
50. Determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) of enrofloxacin against 100 bacterial strains of human gut origin at three inoculum levels(ノバリエルメディカル社内資料)
51. Expert report on microbiological safety of enrofloxacin. Evaluation of the effects of enrofloxacin on human gut flora and microbial starter cultures.(ノバリエルメディカル社内資料)
52. W Brumfitt, et al. (1984); Changes in the pharmacokinetics of ciprofloxacin and fecal flora during administration of a 7-day course to human volunteers
Antimicrob Agents Chemother.: 1984 (26), No.5, 757-761
53. R Enzensberger, et al. (1985); Impact of oral ciprofloxacin on the faecal flora of healthy volunteers
Infection: 1985 (13), Nr.6, 33-35
54. T Bergan, et al. (1986); Pharmacokinetics of ciprofloxacin and effect of repeated dosage on salivary and fecal microflora
Antimicrob Agents Chemother.: 1986 (29), No.2, 298-302

55. JJM VAN SAENE, et al. (1986); Quinolones and colonization resistance in human volunteers
Pharmaceutisch Weekblad Sci Ed : 1986 (8), 67-71
56. S Esposito, et al. (1987); Intestinal microflora changes induced by ciprofloxacin and treatment of portal-systemic encephalopathy (PSE)
Durg Exptl Clin Res : 1987 XIII(10), 641-646
57. S Pecquet, et al. (1990); Faecal excretion of ciprofloxacin after a single oral dose and its effect on faecal bacteria in healthy volunteers
J of Antimicrob Chemother. : 1990 (26), 125-129
58. K Marutani, et al. (1993); Reduced phototoxicity of a fluoroquinolone antibacterial agent with a methoxy group at the 8 position in mice irradiated with long-wavelength UV light
Antimicrob Agents Chemother. : 1993 (37), No.10, 2217-2223
59. N Hayashi, et al (2004); New finding on the structure-phototoxicity relationship and photostability of fluoroquinolones with various substituents position 1
Antimicrob Agents Chemother. : 2004 (48), No.3, 799-803
60. N Hayashi (2005); New findings on the structure-phototoxicity relationship and photostability of fluoroquinolones
Yakugaku Zasshi : 2005 (125), No.3, 255-261.
61. T Zhang et al., (2004); Compare two methods of measuring DNA damage induced by photogenotoxicity of fluoroquinolones
Acta Phaemacol Sin : 2004, 25(2), 171-175
62. DS Ronald and SC Curt (1999); Photogenotoxicity of fluoroquinolones in Chinese hamster V79 Cells: Dependency on active topoisomerase II
Photochem and photobiol : 1999, 69(3), 288-293
63. J Ferguson and R Dawe (1997); Phototoxicity in quinolones: comparison of ciprofloxacin and grepafloxacin
J of Antimicrob Chemother. : 1997 (40), Suppl. A, 93-98
64. WHO: Technical Report Series 893, 2000.
65. EMEA (2002); REVISED GUIDELINE ON SAFETY EVALUATION OF ANTIMICROBIAL SUBSTANCES REGARDING THE EFFECTS ON HUMAN GUT FLORA