

に観察されたが、最終投与 72 時間後ではそれぞれ 0.7 (平均値) 及び $0.5\sim 0.5\ \mu\text{g}(\text{力価})/\text{g}$ となり最終投与 96 時間後以降は定量限界未満となった。

表 14 ホスホマイシン Ca 製剤の連続強制経口投与後の血清及び組織中平均ホスホマイシン濃度の時間的推移 (牛) ($\mu\text{g}(\text{力価})/\text{g}$ 又は mL) n=2

組 織	最終投与後時間 (h)				
	8	24	72	96	120
筋 肉	2.0	2.4	<math>< 0.5</math>	<math>< 0.5</math>	<math>< 0.5</math>
脂 肪	2.4	3.9	<math>< 0.5</math>	<math>< 0.5</math>	<math>< 0.5</math>
肝 臓	4.3	2.5	<math>< 0.5</math>	<math>< 0.5</math>	<math>< 0.5</math>
心 臓	5.2	5.2	<math>< 0.5</math>	<math>< 0.5</math>	<math>< 0.5</math>
腎 臓	90.8	40.7	0.7	<math>< 0.5</math>	<math>< 0.5</math>
腸 管	23.7	27.5	<math>< 0.5\sim 0.5</math>	<math>< 0.5</math>	<math>< 0.5</math>
血 清	12.7	6.3	<math>< 0.5</math>	<math>< 0.5</math>	<math>< 0.5</math>

定量限界 : $0.5\ \mu\text{g}(\text{力価})/\text{g}$ 又は mL

(2) 残留試験 (ホスホマイシン Na) (牛・乳汁) (参照 20)

牛 (ホルスタイン種、5~7 歳齢、3 頭/群) に朝の搾乳後にホスホマイシン Na の 3 日間連続静脈内投与 (20、60 mg(力価)/kg 体重/日) を実施した。被験物質を頸静脈から投与し、経時的 (乳汁 : 投与前、最終投与 11、24、35、48、59、72、83、96、107、120、131、144、155 及び 168 時間後、血漿 : 投与前、初回投与 5、10、30 分、1、2、3、5、7、10 及び 24 時間後) にホスホマイシンの乳汁及び血漿中濃度をバイオアッセイにより測定した (検出限界 : $0.05\ \mu\text{g}(\text{力価})/\text{g}$)。牛における経時的な乳汁中平均ホスホマイシン濃度を表 15 に示した。

20 mg(力価)/kg 体重/日投与群では、乳汁中平均ホスホマイシン濃度は最終投与 11 時間後に平均 $0.16\ \mu\text{g}(\text{力価})/\text{g}$ が検出されたが、最終投与 24 時間後には検出限界未満となった。60 mg(力価)/kg 体重/日投与群では、最終投与 11 及び 24 時間後にそれぞれ平均 0.86 及び $0.14\ \mu\text{g}(\text{力価})/\text{g}$ が観察されたが、最終投与 35 時間後には検出限界未満となった。

表 15 ホスホマイシン Na の 3 日間連続静脈内投与における乳汁中平均ホスホマイシン濃度の推移 (牛) ($\mu\text{g}(\text{力価})/\text{g}$) n=3

投与量 (mg(力価)/kg 体重)	投与前	最終投与後時間 (h)				
		11	24	35	48	59~168
20 (常用量)	<math>< 0.05</math>	0.16	<math>< 0.05</math>	<math>< 0.05</math>	—	—
60 (3 倍量)	<math>< 0.05</math>	0.86	0.14	<math>< 0.05</math>	<math>< 0.05</math>	—

— : 検出限界未満が 2 時点続いたため、分析を省略

検出限界 : $0.05\ \mu\text{g}(\text{力価})/\text{g}$

牛における経時的な血漿中平均ホスホマイシン濃度を表 16 に示した。

20 mg(力価)/kg 体重/日投与群では、血漿中平均ホスホマイシン濃度は初回投与 5 分後

に C_{max} (平均 86 μg (力価)/g) を示し、最初は急速に、初回投与 3 時間後以降は緩徐に減衰し、初回投与 24 時間後には全例が検出限界未満となった。60 mg(力価)/kg 体重/日投与群でも初回投与 5 分後に C_{max} (平均 212 μg (力価)/g) を示し、20 mg(力価)/kg 体重/日投与群とほぼ同様に減衰したが、初回投与 24 時間後にも低濃度(平均 0.21 μg (力価)/g) ながら残留が認められた。

表 16 ホスホマイシン Na の 3 日間連続静脈内投与における血漿中平均ホスホマイシン濃度の推移 (牛) (μg (力価)/g) n=3

投与量 (mg(力価)/ kg 体重)	投与前	初回投与後時間									
		5 min	10 min	30 min	1 h	2 h	3 h	5 h	7 h	10 h	24 h
20 (常用量)	<0.05	86	65	37	32	16	8.5	3.7	2.1	0.87	<0.05
60 (3倍量)	<0.05	212	171	122	54	44	25	13	6.7	3.6	0.21

検出限界：0.05 μg (力価)/g

(3) 残留試験 (ホスホマイシン Ca) (ブリ①) (参照 21)

ブリ (5 尾/群) にホスホマイシン Ca を 6 日間混餌投与 (80 mg(力価)/kg 体重/日) し、経時的 (投与前、投与 1、6、13、20、27、34 及び 41 日後) に血液及び各主要組織中ホスホマイシン濃度をバイオアッセイにより検討した (検出限界：0.05 μg (力価)/g)。

ブリにおけるホスホマイシン Ca の 6 日間混餌投与後の血漿及び各組織中平均ホスホマイシン濃度の推移を表 17 に示した。

最終投与 1 日後に血漿中平均ホスホマイシン濃度が高濃度 (15 μg (力価)/g) を示し、以下腎臓>肝臓>筋肉の順であった。最終投与 6 日後に、筋肉及び肝臓中ホスホマイシン濃度が検出限界未満となり、さらに、最終投与 13 日後に、全試料が検出限界未満となった。また、最終投与 20 日後にも全試料が検出限界未満となったため、最終投与 27、34 及び 41 日後の試料については分析を省略した。

表 17 ホスホマイシン Ca の 6 日間混餌投与における血漿及び各組織中平均ホスホマイシン濃度の推移① (μg (力価)/g) n=5

組 織	最終投与後時間 (日)				
	投与前	1	6	13	20
血 漿	<0.05*	15	1.0	<0.05	<0.05
筋 肉	<0.05	0.94	<0.05	<0.05	<0.05
肝 臓	<0.05	4.8	<0.05	<0.05	<0.05
腎 臓	<0.05	7.6	0.31	<0.05	<0.05

検出限界：0.05 μg (力価)/g

* : <0.05 は全例が検出限界未満を示す。

最終投与 27、34 及び 41 日後の検体については分析を省略。

(4) 残留試験 (ホスホマイシン Ca) (ブリ②) (参照 22)

ブリ (当歳魚、3 又は 6 尾/群) にホスホマイシン Ca を 6 日間混餌投与 (80 mg(力価)/kg 体重/日) し、経時的 (投与前、投与 1、6、13、20、27 及び 34 日後) に血液及び各主要組織中ホスホマイシン濃度をバイオアッセイにより検討した (検出限界: 0.05 µg(力価)/g)。

ブリにおけるホスホマイシン Ca の 6 日間混餌投与後の血漿及び各組織中平均ホスホマイシン濃度の推移を表 18 に示した。

最終投与 1 日後に血漿中平均ホスホマイシン濃度が高濃度 (5.4 µg(力価)/g) を示し、以下腎臓>肝臓>筋肉の順であった。最終投与 6 日後に、筋肉及び肝臓中ホスホマイシン濃度が検出限界未満となり、さらに、最終投与 13 日後に、全試料が検出限界未満となった。また、最終投与 20 日後にも全試料が検出限界未満となったため、最終投与 27 及び 34 日後の試料については分析を省略した。

表 18 ホスホマイシン Ca の 6 日間混餌投与における血漿及び各組織中平均ホスホマイシン濃度の推移② (µg(力価)/g) n=6 (腎臓のみ n=3)

組 織	最終投与後時間 (日)				
	投与前	1	6	13	20
血 漿	<0.05*	5.4	0.20	<0.05	<0.05
筋 肉	<0.05	0.98	<0.05	<0.05	<0.05
肝 臓	<0.05	1.6	<0.05	<0.05	<0.05
腎 臓	<0.05	3.5	<0.05~0.08	<0.05	<0.05

検出限界: 0.05 µg(力価)/g

*: <0.05 は全例が検出限界未満を示す。

最終投与 27、34 日後の検体については分析を省略。

3. 急性毒性試験

(1) 急性毒性試験 (ホスホマイシン Ca) (マウス及びラット) (参照 23)

マウス (ICR 系、4 週齢、雌雄各 10 匹/群) 及びラット (Wistar 系、5 週齢、雌雄各 10 匹/群) を用いて、腹腔内、皮下及び経口の各投与経路によるホスホマイシン Ca の急性毒性試験を実施した。

マウス及びラットの各投与経路における LD₅₀ を表 19 に示した。

腹腔内投与において、雌雄各投与群とも一過性のストレッチング体位、呼吸数減少、自発運動減退等が観察された。マウス及びラットの死亡例は著しい体重減少の後の衰弱死で、それぞれ投与 3~4 及び 2~3 日後に集中して観察された。皮下投与では、両動物とも一般状態に著明な変化は認められなかった。経口投与では、一過性の軽度の自発運動減退、流涙、洗顔様行動及び嘔吐様行動が観察されたが、皮下及び経口投与では死亡例は認められなかった。剖検では、腹腔内投与において投与による薬物の局所刺激性によるものと考えられる腹腔内諸臓器の癒着及び肝臓の肥大が観察された。

表 19 ホスホマイシン Ca のマウス及びラットにおける各投与経路の LD₅₀ (mg(力価)/kg 体重) n=10

動物 (系統、週齢)	投与経路	雄	雌
マウス (ICR 系、4 週齢)	腹腔内	994 (937.7~1,053.6)	1,029 (954.5~1,109.3)
	皮下	>3,500	>3,500
	経口	>3,500	>3,500
ラット (Wistar 系、5 週齢)	腹腔内	1,064 (1,013.3~1,117.2)	1,036 (933.3~1,150.0)
	皮下	>7,000	>7,000
	経口	>3,500	>3,500

(2) 急性毒性試験 (ホスホマイシン Na) (マウス及びラット) (参照 24)

マウス (ICR 系、4 週齢、雌雄各 10 匹/群) 及びラット (Wistar 系、5 週齢、雌雄各 10 匹/群) を用いて、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下及び経口の各投与経路によるホスホマイシン Na の急性毒性試験を実施した。

マウス及びラットの各投与経路における LD₅₀ を表 20 に示した。

静脈内投与においては、雌雄各投与群とも投与直後から眼球突出、呼吸数減少、跳躍転倒及び苦悶の症状を呈し、自発運動も減退したが、マウスの多くは投与 2~3 時間後、ラットでも投与 24 時間後には回復した。マウス及びラットの死亡例は、生存例とほぼ同様の一般症状を呈して、それぞれ投与 20~60 秒後及び投与 30 秒~2 分後に呼吸麻痺で死亡した。

他のいずれの投与経路においても、両動物ともに一過性の呼吸数減少、自発運動低下及び沈うつ状態が観察された。死亡例でも同様の症状を呈し、マウス及びラットの多くは強直性痙攣の後に呼吸麻痺でそれぞれ投与 40 分~3 時間後及び投与 40 分~24 時間後に死亡したが、少数例では体重減少を示し、それぞれ投与 2~4 日後及び投与 3~4 日後に衰弱死した。剖検では、両動物の腹腔内投与群において投与による薬物の局所刺激性によるものと考えられる肝臓と腎臓の癒着又は被膜の癒着、肝臓辺縁部の肥厚が観察された以外特記すべき変化は認められなかった。

表 20 ホスホマイシン Na のマウス及びラットにおける各投与経路の LD₅₀ (mg(力価)/kg 体重) n=10

動物 (系統、週齢)	投与経路	雄	雌
マウス (ICR 系、4 週齢)	静脈内	1,230 (1,160~1,303)	1,225 (1,108~1,354)
	腹腔内	2,175 (2,063~2,292)	2,467 (2,350~2,590)
	筋肉内	2,625 (2,392~2,879)	2,662 (2,526~2,806)
	皮下	5,100 (4,112~6,324)	6,150 (5,211~7,257)
	経口	8,020 (7,638~8,421)	7,300 (6,606~8,067)
ラット (Wistar 系、5 週齢)	静脈内	1,650 (1,410~1,930)	1,560 (1,289~1,887)
	腹腔内	2,060 (1,943~2,183)	2,000 (1,904~2,100)
	筋肉内	2,630 (2,327~2,971)	2,460 (2,320~2,607)
	皮下	5,100 (4,340~5,992)	4,320 (3,692~5,054)

	経口	4,700 (4,234~5,217)	4,550 (3,855~5,369)
--	----	---------------------	---------------------

4. 亜急性毒性試験

(1) 35日間亜急性毒性試験(ラット) (参照23)

ラット(Wistar系、5週齢、雌雄各10匹/群)を用いたホスホマイシンCaの35日間強制経口投与(0、175、350、700、1,400及び2,800 mg(力価)/kg体重/日、週1日(日曜日)休薬)による亜急性毒性試験で認められた毒性所見は以下のとおりであった。ただし、血液は最終投与翌日に採取、尿は経時的(投与前、投与9、19及び34日後)に採取しそれぞれをまとめて1検体として検査した。また、最終投与翌日に生存していた全動物について剖検及び病理組織学的検査を実施した。

死亡例は、いずれの投与群においても認められなかった。

一般状態では、各投与群に軟便、下痢又は腹部膨満が観察された。175及び350 mg(力価)/kg体重/日投与群(4~5/20例)では投与9日後より軟便排出及び腹部膨満が見られ、下痢も散見された。700及び1,400 mg(力価)/kg体重/日投与群(3~4/20例)では投与2~4日後から、2,800 mg(力価)/kg体重/日投与群(半数以上)では投与翌日から腹部膨満及び下痢が観察され、試験終了時まで続いた。また、700 mg(力価)/kg体重/日以上投与群では、投与2~3分後から投与2~3時間後まで、前肢又は後肢で全身を掻くような行動が観察されたが、投与後一過性に生じる反応と考えられた。

体重及び摂餌量に投与に起因する影響は認められなかった。

血液学的検査では、雄において、2,800 mg(力価)/kg体重/日投与群でWBCの減少が認められた。雌においては、1,400 mg(力価)/kg体重/日以上投与群でRBCの減少、2,800 mg(力価)/kg体重/日投与群でHt及びHbの減少が認められた。

血液生化学的検査では、雄において、1,400 mg(力価)/kg体重/日以上投与群でAlbの増加又は増加傾向、及びGluの増加が認められた。雌においては、1,400 mg(力価)/kg体重/日以上投与群でT.Cholの減少及びASTの増加、2,800 mg(力価)/kg体重/日投与群でUA及び血清Caの増加が認められた。尿の生化学検査では、著変は認められなかった。

剖検では、投与群を通じ軽度の盲腸の膨満、腺胃部粘膜の軽度糜爛、肥厚、剥離等が観察された。

臓器重量では、雄において、1,400 mg(力価)/kg体重/日以上投与群の脾臓の絶対及び比重量の減少並びに心臓の絶対重量の減少、700 mg(力価)/kg体重/日以上投与群の肝臓の比重量の増加、350 mg(力価)/kg体重/日以上投与群の副腎の絶対及び比重量の増加が認められた。雌においては、2,800 mg(力価)/kg体重/日投与群の心臓、脾臓及び腎臓の比重量の減少、1,400 mg(力価)/kg体重/日以上投与群の卵巣(左)の絶対及び比重量の減少が認められた。

病理組織学的検査では、用量相関性はないが、175 mg(力価)/kg体重/日投与群の雌を除く各投与群で胃及び回腸粘膜の軽度の糜爛が2~5/20例、1,400 mg(力価)/kg体重/日以上投与群の雌雄で肝細胞の軽度の空胞化が3/20例に観察された。

本試験において、投与群の剖検で見られた軽度の盲腸の膨張は、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、毒

性学的意義に乏しい変化と判断された。一方、175 mg(力価)/kg 体重/日以上投与群の雌雄で観察された剖検所見(腺胃部粘膜の糜爛、肥厚、剥離等)は出現頻度が不明であり、175 mg(力価)/kg 体重/日投与群の雌を除く各投与群で見られた病理組織学的所見(胃及び回腸粘膜の糜爛)については用量相関性はないが、いずれもホスホマイシン投与に起因する影響と考えられた。また、175 mg(力価)/kg 体重/日以上投与群で見られた軟便及び腹部膨満については盲腸膨満に付随した変化と考えられるが、下痢については胃及び回腸の糜爛を含むホスホマイシンの反復投与による消化管への直接的な影響の可能性が考えられることから毒性影響と判断された。以上のことから、本試験のNOAELは求められず、雌雄ともLOAELは175 mg(力価)/kg 体重/日と考えられた。

表 21 35日間亜急性毒性試験(ラット)で認められた毒性所見

投与量 (mg(力価)/kg 体重/日)	雄	雌
2,800	・WBCの減少*	・Ht及びHbの減少* ・UA及び血清Caの増加* ・心臓、脾臓及び腎臓の比重量の減少*
1,400以上	・Alb及びGluの増加* ・脾臓の絶対及び比重量の減少、心臓の絶対重量の減少* ・肝細胞の空胞化	・RBCの減少* ・T.Cholの減少* ・ASTの増加* ・卵巣(左)の絶対及び比重量の減少* ・肝細胞の空胞化
700以上	・肝臓の比重量の増加*	
350以上	・副腎の絶対及び比重量の増加*	・胃及び回腸粘膜の糜爛(病理組織学的所見)
175以上	・下痢(雌雄不明) ・腺胃部粘膜の糜爛、肥厚、剥離等(雌雄不明)(剖検所見)	
	・胃及び回腸粘膜の糜爛(病理組織学的所見)	

*: $p < 0.05$

(2) 182日間亜急性毒性試験(ラット) (参照25)

ラット(Wistar系、5週齢、雄、10匹/群)を用いたホスホマイシンCaの182日間強制経口投与(0、87.5、175、350、700及び1,400 mg(力価)/kg 体重/日、週1日(日曜日)休業)による亜急性毒性試験で認められた毒性所見は以下のとおりであった。ただし、血液は最終投与翌日に採取、尿は経時的(投与前、投与開始後は1ヶ月毎)に各採材時点間の蓄尿1検体として検査した。各投与群の最終投与翌日に剖検及び病理組織学的検査を実施し、肝臓については電子顕微鏡を用いて観察した。

死亡例は、87.5及び350 mg(力価)/kg 体重/日投与群でそれぞれ1/10例、700 mg(力

価/kg体重/日投与群で2/10例、1,400 mg(力価)/kg体重/日投与群で3/10例見られたが、いずれも肺炎によるものであった。

一般状態では、350 mg(力価)/kg体重/日以下投与群(数例)では投与6日後から軟便が、投与13日後から腹部の膨満及び下痢が観察された。700 mg(力価)/kg体重/日以上投与群(5~6/20例)では投与2~3日後から下痢が観察された。350 mg(力価)/kg体重/日以下投与群ではこれらの所見は約1ヶ月後にはほぼ消退したが、700 mg(力価)/kg体重/日以上投与群では少数例を除いて試験終了時まで持続した。また、700 mg(力価)/kg体重/日以上投与群では投与2~3分後から前肢又は後肢で全身を掻くように動作し、投与5分後頃から前肢及び口の周辺をケージにこすりつけるように動作したが、投与2~3時間後には消退したため、投与後一過性に生じる反応と考えられた。

体重及び摂餌量に、投与に起因する影響は認められなかった。

血液学的検査及び血液生化学的検査では、1,400 mg(力価)/kg体重/日投与群においてALPの減少並びにCa及びInPの増加が認められた。尿の生化学検査では、著変は認められなかった。

剖検では、175 mg(力価)/kg体重/日以上投与群において、回腸及び盲腸の膨満が各群6~8例観察された。死亡例では、回腸及び盲腸の膨満のほか肺炎が観察された。病理組織学的検査では、1,400 mg(力価)/kg体重/日投与群の3/10例にきわめて軽度の肝細胞の空胞化が観察された。

肝細胞の電子顕微鏡検査では、1,400 mg(力価)/kg体重/日投与群ではミトコンドリアの軽度の減少並びにグリコーゲンの蓄積及び空胞部(グリコーゲンの流出又は滑面小胞体部)が観察された。しかし、グリコーゲンの蓄積及び空胞については、得られた情報のみから評価はできなかった。

本試験において、投与群の剖検所見で見られた盲腸の膨満は、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、毒性的意義に乏しい変化と判断された。回腸の膨満及び下痢についても盲腸の所見に伴う一連の変化であると考えられた。しかしながら、1,400 mg(力価)/kg体重/日投与群で観察された病理組織学的所見(肝細胞の空胞化)についてはホスホマイシン投与に起因する影響と考えられた。以上のことから、雄のNOAELは700 mg(力価)/kg体重/日と考えられた。

表 22 182日間亜急性毒性試験(ラット)で認められた毒性所見

投与量 (mg(力価)/kg体重/日)	雄
1,400	<ul style="list-style-type: none"> ・肝細胞の空胞化 ・血清Ca及びInPの増加* ・血清ALPの減少*
700以下	毒性所見なし

* : $p < 0.05$

(3) 35日間亜急性毒性試験 (ウサギ) (参照 23)

ウサギ (イエウサギ、雄、4匹群) を用いたホスホマイシン Ca の 35 日間強制経口投与 (0、200 及び 400 mg(力価)/kg 体重/日、週 1 日(日曜日)休薬) による亜急性毒性試験で認められた毒性所見は以下のとおりであった。ただし、血液学的検査、血液及び尿の生化学的検査は経時的 (投与前、投与 17 及び 35 日後) に実施し、最終投与翌日に生存していた全動物について剖検及び病理組織学的検査を実施した。

死亡例は、いずれの投与群においても認められなかった。

一般状態、体重及び摂餌量に投与に起因する影響は認められなかった。

血液学的検査及び血液生化学的検査では、投与 17 日後に各投与群の UA 及び 400 mg(力価)/kg 体重/日投与群の Alb が一過性に増加した ($p < 0.05$)。投与 35 日後に 400 mg(力価)/kg 体重/日投与群の T.Chol の増加が認められた ($p < 0.05$)。尿の生化学的検査では著変は認められなかった。

剖検及び病理組織学的検査では、投与に起因する明らかな変化は認められなかった。

以上より、400 mg(力価)/kg 体重/日投与群に脂質への影響が認められたことから、本試験における雄の NOAEL は 200 mg(力価)/kg 体重/日と考えられた。

(4) 182日間亜急性毒性試験 (イヌ) (参照 23)

イヌ (ビーグル種、雌 3 匹群) を用いたホスホマイシン Ca の 182 日間強制経口投与 (0、280 及び 560 mg(力価)/kg 体重/日、週 1 日(日曜日)休薬) による亜急性毒性試験で認められた毒性所見は以下のとおりであった。ただし、血液及び尿は経時的 (投与前、投与開始後は 1 ヶ月毎) に採取、尿は各採材時点間の蓄尿の一部を使用して検査した。各投与群の最終投与翌日に剖検及び病理組織学的検査を実施した。

全群において死亡例は認められなかった。

一般状態では、投与 2 日後から 280 mg(力価)/kg 体重/日投与群で投与 14 日後まで、560 mg(力価)/kg 体重/日投与群で投与 17 日後まで、全例に水様性下痢便の排出が見られ、軟便に移行して試験終了時までその状態が続いた。

体重及び摂餌量については、体重増加抑制と摂餌量減少が一致する事例が両投与群に各 1 例ずつ認められたが、いずれも一過性であった。

血液学的検査及び血液生化学的検査では、両投与群で Ca 及び InP、560 mg(力価)/kg 体重/日投与群で AST 及び BUN の増加が認められた。このうち AST の増加は一過性であった。尿の生化学的検査では、560 mg(力価)/kg 体重/日投与群において一過性の Na の減少が認められた。

剖検では、280 mg(力価)/kg 体重/日投与群で肝臓に黄色結節の散在 (1/3 例)、肝臓の軽度肥厚 (1/3 例)、腎臓うっ血 (2/3 例) 及び盲腸膨満 (1/3 例) が、560 mg(力価)/kg 体重/日投与群では全例に肝臓の軽度の肥厚、腎臓うっ血 (1/3 例)、腎臓萎縮 (1/3 例) 及び盲腸膨満 (1/3 例) が観察された。

病理組織学的検査では、投与群に尿細管上皮細胞の軽度の腫大が観察された。

本試験において、280 mg(力価)/kg 体重/日以上投与群で観察された下痢、体重増加抑制、摂餌量の減少、血清 Ca、InP 及び BUN の増加、肝臓肥厚、腎臓うっ血、盲腸膨満、尿細管上皮の腫大についてはホスホマイシン投与に起因する影響と考えられることか

ら、NOAELは設定できず、雄のLOAELは280 mg(力価)/kg 体重/日と考えられた。

表 23 182日間亜急性毒性試験(イヌ)で認められた毒性所見

投与量 (mg(力価)/kg 体重/日)	雌
560	<ul style="list-style-type: none"> ・AST、BUNの増加* ・尿中Naの減少* ・腎臓萎縮
280以上	<ul style="list-style-type: none"> ・水様性下痢便 ・体重増加抑制及び摂餌量の減少 ・血清Ca、InPの増加* ・肝臓肥厚、腎臓うっ血、盲腸膨満 ・尿管上皮の腫大

*: $p < 0.05$

(参考) 35日間亜急性毒性試験(マウス) (参照23)

マウス(ICR系、4週齢、雌雄各10匹/群)を用いたホスホマイシンCaの35日間強制経口投与(0、175、350、700、1,400及び2,800 mg(力価)/kg 体重/日、週1日(日曜日)休薬)による亜急性毒性試験で認められた毒性所見は以下のとおりであった。

死亡例は、1,400及び2,800 mg(力価)/kg 体重/日投与群でそれぞれ9/20例(雄:6/10、雌:3/10)及び8/20例(雄:4/10、雌:4/10)見られた。

一般状態では、著変は認められなかったが、1,400 mg(力価)/kg 体重/日以上投与群に投与2~7日後から軟便を排出する個体が見られ、試験終了時まで続いた。

体重は、2,800 mg(力価)/kg 体重/日投与群の雄で投与10日後から、雌では投与21日後から対照群に比較し増加抑制が認められた。

摂餌量には投与に起因する影響は認められなかった。

剖検では、各投与群に回腸及び盲腸の膨満が観察された。

臓器重量では、雄において、2,800 mg(力価)/kg 体重/日投与群の脾臓の絶対及び比重量の減少並びに心臓、腎臓及び精巣の絶対重量の減少、350 mg(力価)/kg 体重/日以上投与群の肝臓の絶対及び比重量の減少が認められた。雌においては、2,800 mg(力価)/kg 体重/日投与群の胸腺の絶対及び比重量の減少、350 mg(力価)/kg 体重/日以上投与群の肝臓の絶対及び比重量の減少が認められた。

病理組織学的検査では、剖検で観察された回腸及び盲腸の膨満に対応する所見は見られなかった。1,400 mg(力価)/kg 体重/日以上投与群の雌雄の生存例において肝細胞の限局的な空胞化が各群1~3例に見られ、2,800 mg(力価)/kg 体重/日投与群の雌2例に肝臓の円形細胞浸潤が観察された。

5. 慢性毒性/発がん性試験

慢性毒性試験及び発がん性試験は実施されていない。

6. 生殖発生毒性試験

2世代繁殖試験は実施されていない。

(1) 器官形成期投与試験 (ラット) (参照 26)

妊娠ラット (Wistar系、25~30匹/群) の妊娠7~17日にホスホマイシン Caを強制経口投与 (0、140、700及び1,400 mg(力価)/kg体重/日) し、妊娠20日に2/3例を帝王切開して胎児 (F₁) を検査した。残りの1/3例の妊娠ラットは自然分娩させ、児動物 (F₁) の生後発育状態を観察し、生後4週目に児動物 (F₁) の行動機能について検査した。

母動物について、死亡例は認められなかった。一般状態は、700 mg(力価)/kg体重/日以上投与群において軟便が観察されたが、体重に増加抑制は認められず、摂餌量に変化は認められなかった。飲水量は、各群に対照群との一時的な差異が認められた。流産発生率及び妊娠20日又は分娩4週後の臓器に異常は認められなかった。

胚/胎児 (F₁) への影響については、1,400 mg(力価)/kg体重/日投与群で早期吸収胚数の増加が認められた ($p<0.05$) が、後期吸収胚及び胎生末期の死亡、生存胎児の性比、胎児体重、胎児の外表、内臓及び骨格奇形の頻度に投与に起因する影響は認められなかった。1,400 mg(力価)/kg体重/日投与群において胸椎骨化遅延の発現率の上昇が認められた ($p<0.05$)。新生児 (F₁) については分娩児数、児体重、離乳率、行動機能検査及び主要臓器に投与の影響は認められなかった。

以上より、本試験では1,400 mg(力価)/kg体重/日投与群の母動物に軟便、胚/胎児に早期吸収胚数の増加及び骨化遅延が認められたことから、NOAELは母動物、胎児ともに700 mg(力価)/kg体重/日と考えられた。催奇形性は認められなかった。

(2) 器官形成期投与試験 (ウサギ) (参照 26)

妊娠ウサギ (日本白色種、14週齢、7匹/群) の妊娠6~18日にホスホマイシン Caを強制経口投与 (0、80、140及び420 mg(力価)/kg体重/日) し、妊娠29日に帝王切開して胎児 (F₁) を検査した。

母動物について、死亡例は認められず、体重増加量にも差は認められなかった。流産は各群1/7例に観察された。

胎児 (F₁) について、胚/胎児死亡率、生存胎児の性比、胎児体重、外表及び骨格所見に投与による影響は認められなかった。

以上より、本試験ではいずれの用量においても母動物及び胎児に投与に起因する影響は認められないことから、NOAELは母動物及び胎児に対して420 mg(力価)/kg体重/日と考えられた。催奇形性は認められなかった。

(参考1) 妊娠前及び妊娠初期投与試験 (第1節) (ラット・腹腔内投与) (参照 27)

ラット (Wistar系、9~10週齢、雄20匹、雌25匹/群) を用いたホスホマイシン Naの腹腔内投与 (0、125、250、750及び1,500 mg(力価)/kg体重/日) 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。被験物質は、雄には交配63日前から交配期間を通じて77日間、雌には交配前14日から交配期間を通じ妊娠7日まで連続投与された。雄は14日間の交配終了後、雌は妊娠20日に剖検された。

親動物 (F₀) について、死亡例は、1,500 mg(力価)/kg体重/日投与群の雄6/20例、雌

3/25 例に見られた。これらは通常静注剤として使用される製剤が腹腔内に長期間適用されたことによる局所刺激性によるものと考えられた。体重は、1,500 mg(力価)/kg 体重/日投与群の雄において摂餌量の減少を伴う増加抑制が認められたが、雌では交配前の期間に摂餌量の低値が散見されたものの増加抑制は認められなかった。飲水量は、雄では投与量増加に伴い増加傾向があり、750 mg(力価)/kg 体重/日以上投与群で顕著であった。雌では、交配前の期間では高値を示す傾向が見られたが妊娠期間中は各群同様であった。剖検では、1,500 mg(力価)/kg 体重/日投与群の雌雄に肺全葉の小結節散在、腹膜又は腸間膜と他臓器との癒着、肝臓の肥厚及び被膜白濁が観察されたが、死亡例での原因と同様通常静注剤として使用される製剤が腹腔内に長期間適用されたことによる局所刺激性によるものと考えられた。交尾率は、1,500 mg(力価)/kg 体重/日投与群で低値が認められたが、腹腔内適用による局所刺激が関与していると考えられた。妊娠率及び着床率については各群に差異は認められなかった。

胎児 (F₁) について、死亡胚出現率は 1,500 mg(力価)/kg 体重/日投与群で高かったが、1 母体に集中して起ったものを除けば対照群との間に差異は認められなかった。性比、平均体重に異常は認められなかった。外表異常は認められなかった。内臓異常として 750 mg(力価)/kg 体重/日投与群に水腎症が多く認められた。骨格観察では、125 mg(力価)/kg 体重/日投与群において第 14 肋骨の頻度の上昇が認められたが、用量依存性は認められなかった。750 mg(力価)/kg 体重/日以上投与群において胸骨分節骨化遅延が認められた。

(参考 2) 胎児器官形成期投与試験 (第 2 節) (ラット・腹腔内投与) (参照 28)

妊娠ラット (Wistar 系、12 週齢) の妊娠 7~17 日にホスホマイシン Na を腹腔内投与 (0、125、250、750 及び 1,500 mg(力価)/kg 体重/日) し、妊娠 20 日に 2/3 例を帝王切開して胎児 (F₁) を検査した。残りの 1/3 例の妊娠ラットは自然分娩させ、児動物 (F₁) の生後発育状態を観察し、生後 4 週目に児動物 (F₁) の機能について検査した。

母動物 (F₀) について、死亡例は、1,500 mg(力価)/kg 体重/日投与群において 4 例が見られた。一般状態は、1,500 mg(力価)/kg 体重/日投与群において一過性の自発運動抑制及び軟便の排泄が観察された。体重は、1,500 mg(力価)/kg 体重/日投与群において投与 8 日後以降増加抑制が見られた。摂餌量及び飲水量は、各群一時的な対照群との差異が見られた。剖検では、1,500 mg(力価)/kg 体重/日投与群のほぼ全例に腹腔内に薬剤を高用量投与した場合にしばしば観察される反応と考えられる肝臓の肥厚、他臓器との癒着及び被膜白濁が観察された。

胎児 (F₁) について、着床数に各投与群の差は認められなかった。胚/胎児死亡率は全投与群において対照群を上回った。胎児体重では、全投与群の雄及び 1,500 mg(力価)/kg 体重/日投与群の雌において低値が認められた。外表、内臓及び骨格奇形が各群に散見されたが、発現頻度には投与の影響は認められなかった。1,500 mg(力価)/kg 体重/日投与群において第 14 肋骨を有する胎児の発現頻度の上昇が認められた。

新生児 (F₁) については、分娩率 [(分娩児数/着床数) × 100 %]、哺育率 [(生存児数/分娩児数) × 100 %]、体重、生存児性比、外表奇形所見、聴覚、行動及び主要臓器に特記すべき変化は認められなかった。

(参考3) 周産期及び授乳期投与試験 (第3節) (ラット・腹腔内投与) (参照29)

妊娠ラット (Wistar系、10週齢、27~31匹/群) に妊娠14日から分娩21日後までホスホマイシンNaを腹腔内投与 (0、250、750及び1,500 mg(力価)/kg体重/日) し、自然分娩させ、児 (F₁) の成長及び行動機能について検討した。児 (F₁) は生後63日に雌雄各10匹を群内交配させ、妊娠20日に剖検し、着床状況及び生存胎児 (F₂) についても観察した。

母動物 (F₀) について、分娩予定日に1,500 mg(力価)/kg体重/日投与群に分娩障害に起因すると考えられる死亡が1/31例見られた。一般状態は、1,500 mg(力価)/kg体重/日投与群に一過性の自発運動抑制及び軟便が観察された。体重増加量に投与に起因する影響は認められなかった。摂餌量は、1,500 mg(力価)/kg体重/日投与群に低値が認められ、飲水量は、被験物質投与開始日から妊娠末期まで1,500 mg(力価)/kg体重/日投与群において高値を示したが、分娩後に変化は認められなかった。分娩率は、750 mg(力価)/kg体重/日以上投与群に低下が見られたが、児の周産期死亡が増加したことに起因すると考えられた。離乳後の母動物 (F₀) の剖検では、1,500 mg(力価)/kg体重/日投与群の多数例に肝臓の肥厚及び被膜白濁並びに腹部臓器の癒着が観察された。

児 (F₁) について、生後7日以降の生存率は1,500 mg(力価)/kg体重/日投与群で対照群を下回った。生後28日までの体重は1,500 mg(力価)/kg体重/日投与群の雌雄において対照群を下回った。哺育期間中及び離乳後に実施した身体発達・一般分化観察 (耳介の開展、毛生開始、眼瞼開裂、精巣下降及び陰開口) 並びに生後4~5週後に実施した視聴覚器試験 (耳介反射及び対光反射) 及び条件回避試験 (Shuttle box法) において各群ともに投与に起因した異常は認められなかった。また、臓器重量及び剖検においても投与に起因した異常は認められなかった。

児 (F₁) の生殖能力について投与群と対照群との差異は認められず、得られた胎児 (F₂) についても、750 mg(力価)/kg体重/日以上投与群において低体重が見られたが1腹当たりの胎児数が多いことによると考えられた。性比については、250 mg(力価)/kg体重/日投与群に有意差が認められたが、被験物質投与によるものではないと考えられた。投与に起因した内臓異常、骨格異常及び骨格変異も認められなかった。

(参考4) 器官形成期投与試験 (ウサギ・静脈内投与) (参照28)

妊娠ウサギ (ニュージーランドホワイト種、14週齢、10~15匹/群) の妊娠6~18日にホスホマイシンNaを静脈内投与 (0、80、100、200、400及び800 mg(力価)/kg体重/日) し、妊娠29日に帝王切開して胎児 (F₁) を検査した。

母動物 (F₀) について、死亡例は認められず、体重増加量に投与の影響は認められなかった。流産は400 mg(力価)/kg体重/日投与群で1例見られたにすぎなかった。

胎児 (F₁) への影響については、800 mg(力価)/kg体重/日投与群の雌に体重の低値が認められたが、胚/胎児死亡率、生存胎児の性比、胎児の外表、内臓及び骨格の奇形・変異の頻度に投与の影響は認められなかった。

7. 遺伝毒性試験 (参照30~34)

遺伝毒性に関する各種の *in vitro* 及び *in vivo* 試験の結果は表24、25に示されている。

表 24 *in vitro* 試験

試験	対象	用量	結果
復帰突然変異試験 (参照 30、31)	<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535、TA1537、 TA1538、TA100、TA98 <i>Escherichia coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	0 (溶媒対照)、0.1、0.3、1、3、10、 30 µg/プレート (S9±) ¹⁾ (ホスホマイシン Ca)	陰性
	<i>S. typhimurium</i> TA1535、 TA1537、TA100、TA98 <i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	0 (溶媒対照)、50、150、500、1,500、 5,000 µg/mL (S9±) ²⁾ (ホスホマイシン Na)	陰性
DNA 損傷試験 (rec-assay 法) (参照 32)	<i>Bacillus subtilis</i> H17Rec ⁺ 、M45Rec ⁻	5、10、100 µg(力価)/mL ³⁾ (ホスホマイシン Na)	陰性
突然変異試験 (酵母) (参照 33)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> D ₅ (F.K.Zimmermann)	5 × 10 ⁻⁶ 、2.5 × 10 ⁻⁵ 、1.25 × 10 ⁻⁴ M/mL ⁴⁾ (ホスホマイシン Na)	陰性

- 1) 陽性対照として N-ethyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (ENNG)、2-nitrofluorene (2NF)、9-aminoacridine (9AA)、2-aminoanthracene (2-AA) を使用。
- 2) +S9 試験の陽性対照として 2-AA、-S9 試験の陽性対照として ENNG、2NF、9AA を使用。
- 3) 対象菌株を液体ブロス (beef extract 1%、yeast extract 1%、NaCl 0.5% 含有) 中で over night 37°C に振盪培養。この培養液を M45 Rec⁻ 株はそのまま、H17 Rec⁺ 株は同ブロスにて 10 倍に希釈して使用した。陽性対照として mitomycin C (MMC) を使用。
- 4) Zimmermann の方法に準じた定量的方法。陽性対照として MMC を使用。

表 25 *in vivo* 試験

試験	対象	投与量	結果
優性致死試験 (参照 32)	ICR 系雄マウス (8~10 週齢)	0、2,000 mg(力価)/kg 体重 ¹⁾ 単回腹腔内投与 ホスホマイシン Na	陰性
小核試験 (参照 34)	ICR 系雄マウス 脾臓及び骨髓細胞	0、750、1,500 mg/kg 体重 ²⁾ 単回腹腔内投与 ホスホマイシン (塩不明)	陰性

- 1) 陽性対照として MMC を使用。
- 2) 陽性対照として MMC、cyclophosphamide (CP) を使用。

上記のとおり、*in vitro* の復帰突然変異試験、DNA 損傷試験、突然変異試験及び *in vivo* のげっ歯類を用いた優性致死試験、小核試験のいずれも陰性であり、ホスホマイシンは生体にとって問題となる遺伝毒性は示さないものと考えられた。

8. 微生物学的影響に関する試験

(1) 臨床分離菌株に対する最小発育阻止濃度 (MIC) (牛由来) (参照 35)

牛の呼吸器疾患より分離された *Pasteurella multocida* (72 株) 及び *P. haemolytica* (15 株) に対するホスホマイシン Na の MIC を寒天平板希釈法により検討した。結果は表 26 に示した。

表 26 牛由来菌に対するホスホマイシン Na の MIC₅₀

菌名	株数	最小発育阻止濃度(MIC) (μg (力価)/mL)	
		MIC ₅₀	範囲
<i>Pasteurella multocida</i>	72	12.5	0.39~25
<i>P. haemolytica</i>	15	0.78	$\leq 0.05\sim 50$

(2) 臨床分離菌株に対する最小発育阻止濃度 (MIC) (ヒト由来) (参照 36)

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調査 (平成 18 年 9 月~平成 19 年 3 月実施) において、ヒト臨床分離株等に対するホスホマイシンの約 5×10^6 CFU/spot における MIC が調べられている。(表 27)

表 27 ホスホマイシンの MIC₅₀

菌名	株数	最小発育阻止濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
		Fosfomycin	
		MIC ₅₀	範囲
通性嫌気性菌			
<i>Escherichia coli</i>	30	4	2~32
<i>Enterococcus</i> sp.	30	64	8~128
嫌気性菌			
<i>Bacteroides</i> sp.	30	>128	>128
<i>Fusobacterium</i> sp.	20	8	4~16
<i>Bifidobacterium</i> sp.	30	64	8~>128
<i>Eubacterium</i> sp.	20	64	16~128
<i>Clostridium</i> sp.	30	8	8~64
<i>Peptococcus</i> sp./ <i>Peptostreptococcus</i> sp.	30	0.5	0.5~>128
<i>Prevotella</i> sp.	20	>128	>128
<i>Lactobacillus</i> sp.	30	>128	>128
<i>Propionibacterium</i> sp.	30	>128	>128

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 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、MIC_{calc}²⁾ は 4.397 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (0.004397

²⁾ 試験薬に活性のある最も関連のある属の平均 MIC₅₀ の 90% 信頼限界の下限值

mg/mL)であった。

9. 一般薬理試験

(1) 中枢神経系に及ぼす影響 (参照 37)

ホスホマイシン Ca は、1%アラビアゴム液に懸濁した。投与量は、40 mg(力価)/kg 体重と 400 mg(力価)/kg 体重とした。

① 脳波に対する影響

ウサギ (雄、3 匹/群) を用いた。脳波の観察は、ホスホマイシン Ca を経口投与し無麻酔無拘束状態で 3 時間にわたり行った。ホスホマイシン Ca の両濃度投与群とも自発運動に著変を認めず、また、中脳網様体を高頻度刺激することにより誘発される覚醒波及び扁桃体を高頻度刺激することにより誘発される後発射にも影響しなかった。

② 抗痙攣作用

a. 抗ペンテトラゾール誘発痙攣作用

マウス (ICR 系、雄、10 匹/群) にホスホマイシン Ca を経口投与して 1 時間後に pentetrazol 100 mg/kg 体重を背部皮下に注射した。30 分にわたりペンテトラゾールにより誘発される間代性痙攣を観察した結果、ホスホマイシン Ca 投与による抑制は認められなかった。

b. 抗 bemegride 誘発痙攣作用

マウス (ICR 系、雄、10 匹/群) にホスホマイシン Ca を経口投与して 1 時間後に bemegride 30 mg/kg 体重を背部皮下に注射した。30 分にわたり bemegride により誘発される間代性痙攣を観察した結果、ホスホマイシン Ca 投与による抑制は認められなかった。

③ 闘争行動抑制作用

マウス (ICR 系、雄、10 匹/群 (1 組 2 匹)) を用いた。Tedeschi らの方法を一部変更して行った。ホスホマイシン Ca を経口投与した。投与 1、2 時間後に闘争行動発現を観察した結果、ホスホマイシン Ca 投与による抑制は認められなかった。

④ 立ち直り反射抑制作用

マウス (ICR 系、雄、10 匹/群) にホスホマイシン Ca を経口投与し、投与 1、2、4 及び 6 時間後に立ち直り反射を観察した結果、ホスホマイシン Ca 投与による抑制は認められなかった。

⑤ 傾斜板順応性抑制作用

マウス (ICR 系、雄、10 匹/群) にホスホマイシン Ca を経口投与し、投与 1、2、4 及び 6 時間後に傾斜板順応性を観察した。影響はほとんど観察されなかったが、ホスホマイシン Ca 400 mg/kg 体重投与 2 時間後に、1 例でのみ順応性の抑制が観察された。