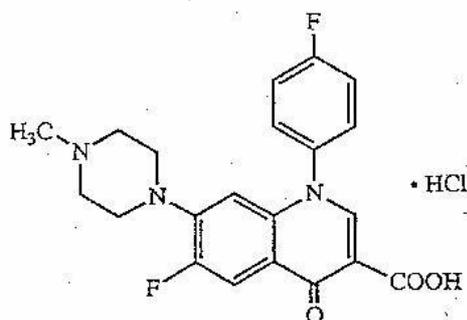


## 塩酸ジフロキサシンの食品健康影響評価について(案)

### 1. 薬剤の概要

#### (1) 物質名<sup>(1),(2)</sup>

塩酸ジフロキサシン(Difloxacin hydrochloride)



分子式 :  $C_{21}H_{19}F_2N_3O_3S \cdot HCl$

分子量 : 435.86

常温における性状 : 白～微黄白色の結晶性粉末

融点 : 210.5～212.5

溶解度 : 70 g/L (pH 4.5)、3 g/L (pH 13)

蒸気圧 : nonvolatile

#### (2) 効能・効果

ジフロキサシンはニューキノロン<sup>a</sup>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、細菌の型トポイソメラーゼ<sup>b</sup>であるDNA ジャイレース、あるいはトポイソメラーゼに作用しDNA複製を阻害するものと考えられている(グッドマンギルマン薬理学)。通常塩酸塩の形態で使用されている。

#### (3) その他

塩酸ジフロキサシンを主剤とする動物用医薬品は、国内では豚の細菌性肺炎を対象に使用されているが、欧州では食用動物全般に対して使用が認められている。

### 2. 毒性試験の概要

#### 2-1. 吸収・分布・代謝・排泄

##### 【ラットにおける単回投与試験】(資料24,25)

Sprague-Dawley系ラット(雌雄各2匹/群)における<sup>14</sup>C標識塩酸ジフロキサシン(10mg/kg体重)の単回強制経口投与において、 $T_{max}$ は1～2時間であり、その時の $C_{max}$ は3.04-5.45 $\mu$ g-eq./mlであった。放射活性は

<sup>a</sup> 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。

<sup>b</sup> 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・解離に作用する。

全般的に雄でより高い傾向が見られたが、静脈内に投与した場合、投与直後及び8-24時間後で雄がやや高かった他に差は認められなかった。また、投与終了後1、3、6、12時間後の各時点で剖検された個体における組織中濃度は肝臓で最も高く、ついで腎臓、筋肉、肺であったが、筋肉と肺の差はほとんどなく、個体によっては逆転した例も認められた。組織中濃度のピークは3時間で、その後は徐々に低下したが、12時間の時点でもピーク時の50-60%程度の残留が認められた。脂肪組織では12時間後が最も高くなっていたが個体間の差が大きかった。

投与後3日間までに尿中から雌で8.9%、雄で18.3%、糞中から雌で87.8%、雄で78.0%が回収された。この傾向は静脈内に投与した場合も同様であった。

さらに、静脈内あるいは十二指腸内にジフロキサシンを投与した胆管カニューレラットの胆汁からは、24時間以内に静脈内投与で62.2-84.9%が、十二指腸内投与では51.4-63.6%が回収されていた。この時尿中からは4.6-11.6%、2.7-5.7%がそれぞれ回収されていた。この試験は雌雄各1匹を用いて行われたため、性差について判断はできなかった。(資料24)

上記の試験で回収された血漿、尿、糞、胆汁中の代謝物が同定されている。

血漿中では、92.8-97.4%が未変化体であり、その他少量のN-oxide、N-脱メチル化体<sup>c</sup>、グルクロン酸抱合体が検出された。尿中では、27.3-51.5%未変化体であり、32.1-56.2%がN-脱メチル化体、9.6-16.0%がN-oxideであり、その他少量のグルクロン酸抱合体、3'-oxo体、未同定代謝物が検出された。糞中では88.4-96.0%が未変化体であり、3.1-10.7%がN-脱メチル化体、その他個体によっては少量のグルクロン酸抱合体、3'-oxo体、未同定代謝物が検出された。主要な排泄物(尿+糞)の総投与量に対する割合では、未変化体が約80%を占め、ついでN-脱メチル化体が約10%、N-oxideが1.7%でその他は1%未満であった。代謝物の平均糞中排泄量は雌より雄で多くなっていた。胆汁中ではグルクロン酸抱合体が主要な代謝物で60%程度、未変化体が30%程度、その他N-oxide、N-脱メチル化体、3'-oxo体が少量存在していた。(資料24)

経口投与された塩酸ジフロキサシンの利用率は高く、10mg/kg体重の投与において92%を示していた。(資料25)

### 【ラットの有色眼における放射活性】(資料28)

Long-Evansラット(雄3匹群)に<sup>14</sup>C標識塩酸ジフロキサシン(10mg/kg体重)を単回強制経口投与し、投与3時間、1、3、7、10、14、21及び42日に血漿と眼球を採取した。

血漿中濃度は3時間で平均して約2.0µg-eq./ml、24時間で0.14µg-eq./ml、3日目には0.01µg-eq./ml以下となった。一方、眼組織では、3時間で平均して約67µg-eq./g、24時間で68µg-eq./g、7、14、21及び42日ではそれぞれ25、16、9.4、5.4µg-eq./gであった。投与後3時間時点における眼中濃度は先のSprague-Dawley系ラット(アルビノ)と比較してLong-Evansラットで30倍の高値を示した。報告者はメラニン色素に富む組織に対して、ジフロキサシンあるいはその代謝物の親和性が高いのではないかと考察している。眼組織における消失曲線は2相性を示し、 $T_{1/2}$ は2.3日(相)、19日(相)であった。

### 【イヌにおける単回投与試験】(資料23,27)

ビーグル犬(雌雄各2頭群)における<sup>14</sup>C標識塩酸ジフロキサシン(10mg/kg体重)の単回強制経口あるいは静脈内投与において、経口投与の $T_{max}$ は2時間以内であり、その時の $C_{max}$ は2.21-3.82µg-eq./mlであっ

<sup>c</sup>サラフロキサシン

た。1頭のみ6時間後にも第二のピークが認められた。静脈内投与時の $T_{1/2}$ (相)は8.2時間であった。経口投与では、4頭のうち2頭は2相性の消失を示し、1頭は1相性、さらに第二のピークが認められた個体ではモデル化できなかったが、消失の傾向は静脈投与時と同様であった。Htを45%と仮定して平均濃度を用いて計算した場合、血球/血漿比は経口投与の6時間後で0.40、12時間後で0.61であった。静脈投与された4頭では投与1, 3, 6, 12時間後で0.54-0.74の範囲であり、放射活性は血球に浸透しているものと考えられた。

経口投与では投与後5日間までに尿中から平均して雌で14.0%、雄で14.5%、糞中から雌で79.0%、雄で81.9%が回収された。この傾向は静脈内に投与した場合も同様であった。

胆管カニューレを行ったイヌ(雌;各1頭)に静脈内あるいは十二指腸内に $^{14}\text{C}$ 標識ジフロキサシンを投与し、投与6時間後の胆汁及び尿を回収したところ、静脈内投与では胆汁から総投与量の51.5%、尿から13.6%、十二指腸内投与では胆汁から39.5%、尿から5.1%が回収された。(資料23)

上記の試験で回収された血漿、尿、糞、胆汁中の数種代謝物が同定されている。

経口投与1及び3時間後、静脈内投与3時間後の血漿中では、90.2-96.4%が未変化体であり、3時間後の血漿中には極めて少量のグルクロン酸抱合体が含まれていたとコメントされている。尿中では未変化体は経口で20.8%、静脈内投与で24.8%、グルクロン酸抱合体が20.3%、21.3%、N-脱メチル化体が41.1%、39.1%、N-oxide体が13.7%、7.0%で、その他未同定の代謝物3種少量(最大5.4%)検出された。糞中では未変化体は経口で77.5%、静脈内投与で75.5%、グルクロン酸抱合体が11.9%、10.6%、N-脱メチル化体が6.9%、10.8%、その他未同定の代謝物3種少量(最大1.9%)検出され、N-oxide体は検出されなかった。胆汁中ではグルクロン酸抱合体が主要な代謝物で、静脈内投与で71.9%、十二指腸内投与で79.5%を占め、未変化体は8.6%、6.0%、その他未同定の代謝物が17.8%、13.0%存在していた。(資料23)

ビーグル犬(雄4頭)に $^{14}\text{C}$ 標識塩酸ジフロキサシン(10mg/kg体重)を単回強制経口投与し、2, 6, 24時間後に血液を採取した。さらに、2時間後に2頭、6時間後に1頭、24時間後に1頭を安楽死させ、組織を採取した。

血漿中濃度は2時間後の値が最も高く、徐々に減少していた。また、組織中濃度は消化管を除くと投与2及び6時間後では肝臓で最も高く、ついで骨、腎臓であった。24時間後では骨、肝臓の順となった。試験を通じて胆汁中に非常に高い放射活性が検出された。また、消化管も高い放射活性を示したが、これは粘膜表面に保持された未吸収の薬剤が関与しているものと考察されている。

眼組織の濃度については詳細に検討され、房水、硝子体液、水晶体及び角膜で低い一方、網膜やブドウ膜といったメラニン色素顆粒層に富む組織では約160 $\mu\text{g}\text{-eq/g}$ という高い濃度が検出された。

ラットとイヌの組織及び血液中放射能濃度は類似していると考えられた。(資料27)

### 【イヌにおける1ヶ月間経口投与試験】(資料26)

ビーグル犬(雌雄各4頭群)における塩酸ジフロキサシン(5, 25, 125mg/kg体重;カプセル)の1ヶ月間強制経口投与において、1, 15及び29回投与後の1, 3, 6及び24時間後における経時的血漿中薬物濃度の消長が測定されている。

5mg及び25mg投与群における $T_{\text{max}}$ はいずれの時点でも1~3時間であり、その時の $C_{\text{max}}$ は5mg投与群の1回投与後で1.02-2.29, 15回で1.47-2.56, 29回で1.26-2.38 $\mu\text{g}\text{-eq/ml}$ 、25mg投与群では順に1.71-5.98, 2.27-13.23, 5.11-11.04 $\mu\text{g}\text{-eq/ml}$ であった。1回投与後の $T_{1/2}$ (相)は5mgで7.62時間、25mgで7.15時間であった。125mg投与群については、 $T_{\text{max}}$ が1~6時間とばらつき、 $C_{\text{max}}$ は投与量比から予測される値より低かった。また、頻繁な嘔吐、死亡(1/8)、毒性徴候が認められたため、 $T_{1/2}$ の算出は行わなかったとされてい

る。

最終投与約 24 時間後に採取した脳脊髄液 / 血漿比の平均値は、投与量順に 0.49, 0.42, 0.47 であった。

25mg 以上投与群では剖検時に胆汁に沈殿物が認められたためこの同定が実施された。沈殿物はジフロキサシンのグルクロン酸抱合体であった。

### 【ブタにおける単回投与試験】(資料 30,31)

ブタ(去勢雄 5 頭/群)における  $^{14}\text{C}$  標識塩酸ジフロキサシンの単回強制経口(5mg/kg 体重)あるいは静脈内(1mg/kg 体重)投与において、経口投与の  $T_{\max}$  は 2 時間以内であり、その時の  $C_{\max}$  は 3.01-4.48 $\mu\text{g}\cdot\text{eq}/\text{ml}$  であった。 $T_{1/2}$ (相)は経口投与で 17.17 時間、静脈内投与で 7.92 時間であった。

N-脱メチル化体は経口投与した場合にのみ、投与後 0.75 ~ 12 時間の間に認められ、最大濃度は 0.06 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、ジフロキサシンに対する比率は最大 2.3% であった(資料 31)。

ブタ(去勢雄 6 頭)に塩酸ジフロキサシンを単回強制経口(10mg/kg 体重<sup>d</sup>)投与し、3 頭を血中濃度測定試験及び排泄試験、3 頭を分布試験に用いた。

血中濃度測定試験において  $T_{\max}$  は 2 時間であり、その時の  $C_{\max}$  は 5.5-7.0 $\mu\text{g}/\text{g}$  であった。排泄試験においては、投与後 120 時間までに尿中から 9.7-15.1%、糞中から 57.7-63.4% が回収された。N-脱メチル化体は尿中から 1.3-2.1% が、糞中から約 1% が検出された。尿中のジフロキサシンの 50% 以上(56-84%)、N-脱メチル化体の少なくとも 10% 以上(10-43%)が抱合体として存在していた。

分布試験では、投与 2 時間後において、胆汁中で最も高濃度(51 $\mu\text{g}/\text{g}$ )が検出された。その他の組織中濃度は胃、肝臓、小腸と腎臓及び脾臓、肺、筋肉及び心臓、血漿、脂肪の順で、消化管を除くと肝臓で最も高かった。N-脱メチル化体は肝臓、腎臓、胆汁、胃、脾臓、心臓、肺、血漿及び小腸、筋肉、脂肪の順であった(資料 30)。

### 【ブタにおける 3 日間経口投与試験】(資料 32)

ブタ(3 頭/群)に塩酸ジフロキサシン(5.0, 10.1mg/kg 体重/日<sup>e</sup>)を 3 日間飲水投与し、投与期間中及び投与終了後 33 時間までの血漿中ジフロキサシン濃度の推移が測定されている。

血漿中濃度は 5mg 及び 10mg 投与群とも、投与期間中緩やかに上昇し、投与終了時点で 5mg 投与群では 0.26 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、10mg 投与群では 0.53 $\mu\text{g}/\text{g}$  の最高値を示した。投与終了後は速やかに減少し 5mg 投与群の  $T_{1/2}$  は 9.4 時間、10mg 投与群の  $T_{1/2}$  は 8.7 時間であった。投与終了後 24 時間の時点の血漿中濃度は 5mg 投与群で 0.04 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、10mg 投与群で 0.07 $\mu\text{g}/\text{g}$  となり、33 時間後にはいずれも検出限界(0.02 $\mu\text{g}/\text{g}$ )未満となった。N-脱メチル化体はいずれの時点でも検出されなかった。

### 【血漿中蛋白質結合試験】

ラット、ウサギ、イヌ及びヒトボランティアの血液を用いて、塩酸ジフロキサシン(1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )の血漿中蛋白質への結合能が測定されている。平均値はラットで 42-44%、ウサギで 52-55%、イヌで 46-52%、ヒトで 41-43% であった。(資料 29)

<sup>d</sup> フリーベース換算

<sup>e</sup> フリーベース換算

また、10mg/kg 体重<sup>f</sup>を強制経口投与したブタ(去勢ブタ;3 頭)の投与 2 時間後における結合率は 48-49%、N-脱メチル化体では 50-65%であった。(資料 30)

### 【ヒトボランティアにおける投与試験】(論文 12, 13)

健康ボランティア男性におけるカプセルによる経口投与(200, 400, 600mg/ヒト ; n=6, 6, 11)において、 $T_{max}$  は投与量順に 3.9, 5.2, 4.7 時間、 $C_{max}$  は  $2.17 \pm 0.28$ ,  $4.09 \pm 0.61$ ,  $6.12 \pm 0.68 \mu\text{g/mL}$ 、 $T_{1/2}$  は  $20.6 \pm 1.4$ ,  $27.1 \pm 3.3$ ,  $28.8 \pm 4.9$  時間であった。投与後 48(200mg)あるいは 96 時間(400 及び 600mg)までの尿中からジフロキサシン及びその代謝物を合計して  $26.8 \pm 4.0$ ,  $28.4 \pm 5.5$ ,  $28.3 \pm 6.3\%$  が回収された。400mg 投与群の代謝物毎の内訳は未変化体が 9.6%、グルクロン酸抱合体が 10%、N-脱メチル化体が 4%、N-oxide が 3%であった。代謝物比に投与量間で大きな差は認められなかった。なお、糞中の回収率は検討されていない。

## 2-2. 毒性試験

### (1) 急性毒性試験(資料 2, 3, 4)

経口投与による  $LD_{50}$  は ICR 系マウスの雌で 1.60g/kg 体重、雄で 1.38g/kg 体重、Sprague-Dawley 系ラットの雌で 6.27g/kg 体重、雄で 5.51g/kg 体重であった(資料 2)。皮下投与では、マウス(ICR)、ラット(SD)とも 2.0g/kg 体重以上であった(資料 3, 4)。

### (2) 亜急性毒性試験

#### 【ラットを用いた 3 ヶ月間亜急性毒性試験】(資料 7)

約 5 週齢の Sprague-Dawley 系ラット(雌雄各 15 匹/群)を用いた強制経口(20, 50, 150 mg/kg 体重/日<sup>g</sup>)投与における 3 ヶ月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、試験期間中に对照群の 2 匹及び 150mg 投与群の 4 匹が死亡した。また、各群 5 匹について、投与終了後 1 ヶ月間を回復期とし、その間についても状態の観察が実施されている。

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、150mg 投与群の雄で統計学的に有意ではないが 48-97 日の間体重の低値が認められた。97 日では統計学的に有意であった。また、投与期間中の体重増加が有意に減少していた。20 及び 50mg 投与群の雄でも对照群と比較して投与期間中の体重増加の低値が認められたが、統計学的に有意ではなかった。雌では 150mg 投与群の 13-97 日の間の平均体重及び投与期間中の平均体重増加が他の群の雌と比較してわずかに低かったがいずれも統計学的に有意ではなかった。

摂餌量では、差は認められなかった。

眼検査では投与に起因した異常は認められなかった。

血液学的検査では、50mg 以上投与群の雄で RBC の減少と Ht の低値が認められ、150mg 投与群の雄では Hb の低値、雌では Ht の低値が認められた。Hb、Ht、RBC の低値は本試験に先立って実施された 1 ヶ月間の亜急性毒性試験で雌でも認められたが、値はラットの生理的変動の範囲内であった。また、150mg 投与群の雌雄で白血球数の増加が認められた。ただし、好中球/リンパ球比に異常はなく、未熟形白血球の増加や骨髓細胞の異常は認められなかった。プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間に異常は認められなかった。

血液生化学的検査では、50mg 以上投与群の雄及び 150mg 投与群の雌で総蛋白質、グロブリン、アルブミ

<sup>f</sup> フリーベース換算

<sup>g</sup> フリーベース換算

ンの減少、150mg 投与群の雄で ALT の増加が認められた他、散発的に有意差が認められる項目が認められた。グロブリン、アルブミン、総蛋白質の減少は本試験に先立って実施された 1 ヶ月間の亜急性毒性試験でも認められたが、値はラットの生理的変動の範囲内であった。

尿検査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。

臓器重量では、150 mg 投与群の雌雄で肝臓の相対重量の増加、脳の絶対重量の低値が認められた。さらに雄では心臓の絶対重量の低値、雌では腎臓の相対重量の増加が認められた。これらに関連する生化学的あるいは病理組織学的所見は認められなかった。

剖検及び病理組織学的検査では特に被験物質投与に起因した異常は認められなかったが、150mg 投与群の一部にウイルス感染によると思われる唾液腺炎症及び組織病変が認められた。

本試験における NOAEL は 50 mg/kg 体重/日であった。

### 【若齢イヌを用いた 3 ヶ月間亜急性毒性試験】(資料 8,9,10)

9~12 ヶ月齢のビーグル犬(対照群及び 60mg 投与群は雌雄各 7 頭/群、5 及び 20mg 投与群は雌雄各 4 頭/群)を用いた強制経口投与(5、20、60 mg/kg 体重/日<sup>h</sup>)による 3 ヶ月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。投与はゼラチンカプセルを用いて行い、対照群には空のカプセルを同様に投与した。なお、対照群及び 60mg 投与群の雌雄各 3 頭は、投与終了後 1 ヶ月間を回復期とし、その間についても状態の観察が実施されている。

一般的な臨床症状観察では、被験物質の投与に関連すると考えられる所見として、自発運動低下、嘔吐、眼瞼下垂、流涎、耳の腫脹、縮瞳が認められた。60mg 投与群の雄の 1 例では投与後に振戦が認められた。流涎、下痢あるいは軟便も認められたが、これらの用量相関性は明確でなかった。

眼科学検査では網膜を含む眼の構造に異常は認められなかった。

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。

血液学的検査では、60mg 投与群の雄で**活性化**部分トロンボプラスチン時間の延長が認められたが、通常の変動範囲内と考えられた。他に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、60mg 投与群の雄の数頭で ALT の増加が認められた。回復期まで観察された個体では、試験 118 日には正常範囲に回復していた。この ALT の増加は本試験に先だって実施された 1 ヶ月間亜急性毒性試験においても認められていた。1 ヶ月間亜急性毒性試験で認められていた血清中総蛋白質の減少は本試験では認められなかった。

尿検査では、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。

臓器重量では、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。

剖検では、20mg 以上の投与群で顆粒を含む胆汁が認められ(4/8、5/8)、組織学的検査では結晶性物質であった。結晶性物質については 1 ヶ月間亜急性毒性試験においてジフロキサシンのグルクロン酸抱合体であることが確認されている。これらの結晶性物質は回復試験群では認められなかった。

この他、網膜電位図検査、心電図検査が実施されている。網膜電位図検査では 20mg 以上投与群で A 及び B 波頂点時間の規則的延長と振幅の減少が観察された。同様の所見は 1 ヶ月間亜急性毒性試験においても認められている。心電図検査では特に被験物質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 5mg/kg 体重/日であった。(資料 8)

<sup>h</sup> フリーベース換算

3.5～3.8ヵ月齢のビーグル犬(対照群及び125mg投与群は雌雄各8頭/群、他の投与群は雌雄各6頭/群)を用いた強制経口投与(5、25、35、50、125mg/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。投与はゼラチンカプセルを用いて行い、対照群には空のカプセルを同様に投与した。なお、対照群及び125mg投与群の雌雄各2頭は、投与終了後1ヶ月間を回復期とし、その間についても状態の観察が実施されている。なお、跛行、手根関節の平坦化が発現したため、25mg投与群の3頭(雄2、雌1)、35mg以上投与群では4頭(雌雄各2)を投与24日に(125mg投与群の雄については8及び10日に1頭ずつ)安楽死させ、剖検に供した。その他には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、被験物質の投与に関連すると考えられる所見として、眼窩周囲の腫脹(swelling)、耳部、鼻口部、腹部の一部あるいは全ての皮膚の紅潮(red skin)、瞬膜腫脹(elevated)、結膜、耳部、鼻口部の一部あるいは全ての腫脹(swollen)が認められた。また、35mg以上の投与群で嘔吐が用量相関的に増加した。125mg投与群では瞳孔収縮、痙攣(convulsion)、脱水症状、横臥、流涎、斜視、緊張(tonic)、振戦引きつり(twitching)、衰弱も認められた。

体重変化では50mg投与群の雌及び125mg投与群の雌雄で有意に低下した期間が認められた。

摂餌量では25mg投与群の雌で投与1-2日、35mg及び50mg投与群の雌、125mg投与群の雌雄で42日までの間でしばしば有意な減少が認められた。5mg投与群の雌、25、35、50mg投与群の雌雄の平均摂餌量は有意ではないがしばしば対照群を下回った。

眼科学検査では特に異常は認められなかった。

血液学的検査では、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、25mg以上投与群の雌雄でグロブリン及び総タンパク質の低下が認められた。50mg以上投与群の雄及び125mg投与群の雌でALTが増加した。125mg投与群の雌ではASTの増加も認められた。γ-グルタミルトランスフェラーゼは125mg投与群の雌で有意な、雄で有意ではないが増加が認められた。

尿検査では、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。

臓器重量では、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。

剖検及び病理組織学的検査では、大腿骨、脛骨近位端、橈骨遠位端及び手根骨部の関節軟骨に中間層の空隙形成、軟骨原線維形成、軟骨細胞密集等の病変が全ての投与群で認められた。発生の頻度は高用量でより顕著であった。また、肝内胆管増殖が35mg以上投与群で認められた。

この他、網膜電位図検査、心電図検査、跛行検査が実施されている。網膜電位図検査では特に被験物質投与に起因した異常は認められなかった。心電図検査では投与群で心拍数の増加が認められたが、統計学的な有意差、用量相関性とも認められなかった。跛行検査では全ての投与群で左右手根関節の平坦化の発生頻度が用量依存的に増加した。跛行は50mg以上の投与群で認められた。踵関節の低位が35mg以上投与群の雄及び125mg投与群の雌で認められた。

全ての投与群で関節軟骨の変化が認められたため、本試験におけるNOAELは求められなかった。(資料9)

3～4ヵ月齢のビーグル犬(雌雄各4頭/群)を用いた強制経口投与(0、0.3、1.0、3.0mg/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。投与はゼラチンカプセルを用

<sup>i</sup> フリーベース換算

<sup>j</sup> フリーベース換算

いて行い、対照群には空のカプセルを同様に投与した。なお、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、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 0.3 及び 1.0mg 投与群の雄で数週間の間、増加が認められた。これらの投与群では散発的に摂餌量の増加が観察されていた。3.0mg 投与群ではこのような変化は認められなかった。

眼科学検査、血液学的検査、血液生化学的検査、臓器重量、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。

跛行検査では両側性で軽度な手根関節平坦化が 3.0mg 投与群の雌雄各 1 例で認められた。

本試験における NOAEL は 1.0mg/kg 体重/日であった(資料 10)。

### (3)慢性毒性試験

#### 【マウスを用いた 2 年間発がん性試験】(資料 21)

CD-1 マウス(雌雄各 70 匹/群)を用いた混餌(5, 25, 75, 150mg/kg 体重/日<sup>k</sup>; 雄 4.0, 20.5, 67.6, 123.0mg/kg 体重/日, 雌 4.1, 20.6, 61.7, 123.6mg/kg 体重/日<sup>l</sup>)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。

一般的な臨床症状観察では、対照群を含めて雄で肛門性器の汚れが認められ、75mg 以上の投与群では発生率の増加が明らかであった。雌では同様の所見は認められなかった。

体重変化では、特に投与に起因した異常は認められなかった。

飼料摂取量では、統計学的に有意な変化が散発的に認められたが、用量相関性はなかった。

血液学的検査では 150mg 投与群の雌雄でヘモグロビン、ヘマトクリットの低下、赤血球数の減少が認められたが、低下の程度は試験実施施設の背景データの範囲内であった。なお、血液生化学的検査は実施されていない。

剖検及び病理組織学的検査では、雄の 150mg 投与群で肺の結節/腫瘍が対照群と比較して多く認められた。病理組織学的検査では対照群を含めた全ての群で細気管支又は肺胞に過形成、**腺がん及び腺種**が認められた。雄では**腺がん**が 150mg 投与群で多かった。雌ではいずれも差は認められなかった。肝臓では 150mg 投与群の雌雄で小葉中心性肝細胞肥大が対照群よりも多く認められた。**肝細胞腺腫およびがん**、これらの**併発例**の発生率には投与群と対照群間で有意差は認められなかった。150mg 投与群の雌雄で鼻甲介のエオシン染色性の呼吸上皮、嗅覚上皮、エナメル器の陥入、鼻孔内のタンパク様液の発生頻度の増加が認められた。また、雌の 75mg 投与群で子宮血管腫の発現数が増加したが、150mg を含め他の投与群では認められなかった。雄の 75mg 以上投与群で精巣**細動脈**の石灰沈着(mineral deposit)、150mg 投与群で精母細胞・精子細胞の巨細胞**及び精巣白膜石灰沈着**が認められた。

本試験において被験物質投与に係るがん原性は認められなかった。また、**原末で雌雄の 75mg 投与群で影響が認められたことから、フリーベース換算**における NOAEL は 20.5mg/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】(資料 20)

CD 系ラット(雌雄各 70 匹/群)を用いた混餌(5, 25, 50, 100mg/kg 体重/日<sup>m</sup>; 雄 4.0, 20.5, 41.2, 82.2mg/kg 体重/日, 雌 4.0, 20.6, 41.0, 81.4mg/kg 体重/日<sup>n</sup>)投与による 2 年間の慢性毒性/発がん性併合試験におい

<sup>k</sup> 原末

<sup>l</sup> フリーベース換算

<sup>m</sup> 原末

<sup>n</sup> フリーベース換算

て認められた毒性所見は以下の通りであった。なお、雌の 50mg 投与群で生存率が低かった他は、群間比較では有意な生存率の変化は認められなかったが、雄では傾向検定で生存率の減少傾向が認められた。

一般的な臨床症状観察では、毒性学的な意義は不明であるが、赤く腫脹した耳部が 50mg 投与群の雌及び 100mg 投与群の雌雄で認められた。片側性血涙が 50mg 以上投与群の雄で認められた。

体重変化では、100mg 投与群の雌雄の 2 年目に減少が認められた。

飼料摂取量では、100mg 投与群の雄で全期間を通じて、雌の 100mg 投与群で 44 週まで、25 及び 50mg 投与群で 40 週まで増加が認められた。

血液学的検査は 3 ヶ月毎に血液を採取して実施された。白血球数の増加が 100mg 投与群の雄及び 12 ヶ月までの雌で認められ、50mg 投与群の雄でも 3 及び 9 ヶ月に認められた。100mg 投与群の雄では、投与開始後 12 ヶ月までヘモグロビン濃度、ヘマトクリット、9 ヶ月まで赤血球数が低下もしくは減少した。15 ヶ月では血小板数が増加していた。これらの変化はいずれも背景データの範囲内であった。また、12 ヶ月までの間にプロトロンビン時間の変化が認められたが、**投与との関連性は不明**であった。

血液生化学的検査では、50mg 以上投与群の雌雄で投与 15 ヶ月までの間でしばしば無機リン酸濃度の増加が認められた。また、総タンパク質の減少と総コレステロールの増加が散発的に認められたが、これらは背景データの範囲内であった。

尿検査では、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。

臓器重量では、50mg 以上投与群の雄で前立腺の相対及び絶対重量の減少が認められた。また、100mg 投与群の雄で精巣の絶対重量の減少、腎臓の相対重量の増加、脳の絶対重量の減少、雌で脳の絶対重量の減少が認められた。

剖検では、50mg 以上投与群の雌雄で耳部の腫脹及び褪色、肝臓の褪色の発生頻度が上昇した。100mg 投与群の雄で精巣の萎縮又は軟化が認められ、雌の投与群で卵巣の嚢胞が認められた。

病理組織学的検査では、腫脹あるいは褪色した耳部で類軟骨過形成、うっ血が認められた。肝臓では胆管増生及び胆管線維症が 25mg 以上投与群の雌雄で認められたが、これらの病変では**投与との関連性はなかった**。肝臓の褪色部ではうっ血が認められたが、不完全な放血に起因するものと考えられた。

100mg 投与群の雄では精母細胞・精子細胞性巨細胞の精細管内形成を伴う精上皮の変性又は萎縮が高頻度で認められた。これらの変化を有する精巣上体では無精子症、精子減少症、上体管腔内の細胞破片集簇が認められた。卵巣の嚢胞は対照群を含めて用量に無関係に散発的に認められ、剖検で嚢胞とカウントされたものの多くは病理組織学的には嚢胞を確認できなかった。

腫瘍の発生頻度については、対照群と投与群間で有意差は認められなかった。

**原末で雌雄の 25mg 投与群で肝臓に影響が認められたことから、フリーベース換算における本試験の NOAEL は 4.0mg/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 3 世代繁殖試験】(資料 11)

Sprague-Dawley 系ラット(Crl:CD<sup>®</sup>BR; 雌雄各 30 匹/群)を用いた混餌投与(0, 25, 50, 100 mg/kg 体重/日)による 3 世代繁殖試験が実施されている。100mg 投与群では受胎率及び出生率の著しい減少が認められたため、F<sub>1</sub> 世代以降は 50mg までの 3 用量で実施された。

被験物質の投与は F<sub>0</sub> 世代では 7 週齢、F<sub>1</sub> 及び F<sub>2</sub> 世代では生後 22 日に開始し、雌雄とも最短でも第 1 回交配前の 70 日間及び 2 回の繁殖期を通して投与を行った。第 1 産児(F<sub>1a</sub>, F<sub>2a</sub>, F<sub>3a</sub>)は生後 21 日の離乳まで哺育させ、第 1 産児の離乳から最短 10 日後に 2 回目の交配を行い、第 2 産児(F<sub>1b</sub>, F<sub>2b</sub>, F<sub>3b</sub>)を離乳まで哺育させた。F<sub>1b</sub>, F<sub>2b</sub> については離乳後各群から雌雄各 30 匹を繁殖用に選抜し、それぞれ F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub> 世代を得た。なお、

被験物質の平均摂取量は期間によって変動した。F<sub>0</sub> については次の表の通りであった。この被験物質濃度はフリーベース換算されていない。

性	時期	投与量理論値(mg/kg 体重/日)		
		25	50	100
雄	第1回交配前	25.4	50.7	101.1
	第1回と第2回交配の間	24.3	47.0	94.6
	第2回交配後	24.2	48.5	95.5
雌	第1回交配前	25.3	50.9	101.9
	第1回妊娠期間	24.3	46.7	115.0
	第1回授乳期間	62.3	127.0	148.8
	第2回交配前	28.0	53.3	95.7
	第2回妊娠期間	23.7	48.7	112.7
	第2回授乳期間	59.3	117.3	172.3
	第2回離乳後	25.5	52.0	109.5

一般的な臨床症状観察では対照群との間に所見の差はなかった。

親動物では 100mg 投与群の F<sub>0</sub> で雄の低体重と増加量減少、妊娠雌でも低体重と増加量減少が認められた。50mg 投与群では、F<sub>0</sub> の妊娠雌で低体重と増加量減少、F<sub>1</sub> の雌雄で低体重、F<sub>1</sub> の妊娠期間及び授乳期間中の低体重、F<sub>2</sub> の雌雄で低体重と増加量減少が認められた。摂餌量の減少が 100 mg 投与群の F<sub>0</sub> 雌の授乳中、50 mg 投与群の F<sub>0</sub> 雌の妊娠中及び授乳中、F<sub>1</sub> の雄、F<sub>2</sub> の妊娠中及び授乳中に認められた。

100mg 投与群において F<sub>0</sub> 雄の肝臓、腎臓、精巣および下垂体の相対重量の増加、雌の卵巣の相対及び絶対重量の減少、肝臓の相対重量の減少が認められた。50mg 投与群では F<sub>0</sub> 雄で肝臓、腎臓の相対重量の増加、F<sub>1</sub> 雄で肝臓と精巣の相対重量の増加、雌で肝臓と腎臓の相対重量の増加、F<sub>2</sub> 雌の腎臓で相対重量の増加が認められた。いずれの臓器においても被験物質投与に関連すると考えられる病理組織学的変化はみられなかった。

100 mg 投与群の F<sub>0</sub> 雌雄で受胎率<sup>o</sup>および妊娠率<sup>p</sup>の著しい低下がみられ、精子検査の結果雄 12 匹に精子数減少、精子活動性低下、精子の形態異常の増加が認められた。出生児数が著しく減少し、平均体重も低下が認められた。25 mg 及び 50 mg 投与群の交尾率、受胎率、妊娠率及び妊娠期間はいずれの世代においても対照群と同様であり、出生児の数、性比、授乳期間中の生存率及び体重に被験物質投与の影響はみられなかった。離乳児の肉眼的検査で形態異常は認められず、病理組織学的検査 (F<sub>2b</sub>) でも投与に起因した異常は認められなかった。

本試験においては、母動物の一般毒性に対する NOAEL は 23.7mg/kg 体重/日であり、生殖発生毒性に対する NOAEL は 46.7mg/kg 体重/日と考えられた。なお、これらの値は塩酸塩としてのものであり、フリーベースとしての値は約 80%程度と推定される。

<sup>o</sup> 妊娠が成立した雌の数(または最低一腹を妊娠させた雄の数)/交配に使われた雌 (または雄) の総数

<sup>p</sup> 妊娠が成立した雌の数/交尾した雌の数

### 【ラットを用いた催奇形性試験】(資料12)

CDラット(20匹/群)の妊娠6-15日に強制経口(15、65、275 mg/kg 体重/日<sup>q</sup>)投与して胚および胎児発育への影響試験が実施されている。

275mg 投与群で試験期間中の母動物の体重増加抑制及び、摂餌量の低下が認められた。275mg 投与群では妊娠ラット 17 例中 10 例で全胚吸収が認められ、胚 / 胎児生存率の著大な低下がみられ、胎児体重は低値を示した。

275mg 投与群の 8 胎児に浮腫が認められたが、発現頻度に対照群との差は認められなかった。65mg 以上投与群で肋骨、腰椎数、胸骨の変異または化骨遅延の発現頻度の上昇が認められた。

本試験における NOAEL は母動物に対して 65mg/kg 体重/日、胎児動物に対して 15mg/kg 体重/日と考えられた。

### 【ラットを用いた受胎能および一般生殖能試験】(資料17,18)

CDラット(雌40匹/群)の交配14日前から分娩後21日の離乳時まで強制経口(0、15、45、150 mg/kg 体重/日)投与して、受胎能および一般生殖能試験が実施されている。各群の雌(F<sub>0</sub>)の半数は妊娠20日に帝王切開して胎児の検査を行い、残りの雌については分娩させ、児(F<sub>1</sub>)を生後21日に離乳して40日齢まで行動検査を行なった。すべての行動観察終了後6週齢でF<sub>1</sub>動物の中から雌雄各20匹/群を選抜して生殖能を調べ、雌を妊娠20日に帝王切開して剖検し、雄は帝王切開終了後に剖検した。

母動物(F<sub>0</sub>)において、150mg 投与群で流産が認められ、45 mg 以上投与群で鼻周囲の赤色乾燥物が観察された。

150mg 投与群において妊娠期から授乳期にかけて体重増加抑制と体重の低値が認められた。母動物の剖検では被験物質投与に関連した異常は認められなかった。母動物の性周期、妊娠期間、分娩行動に被験物質投与の影響は認められなかった。

帝王切開では、生存胎児数、黄体数、着床数に被験物質投与の影響は認められなかった。胎児体重は45mg 以上投与群で用量依存的な低下が認められた。(資料17)

150mg 投与群の4匹の胎児に異常(内3匹は同腹で臍帯ヘルニア)が認められたが、胎児奇形の発現率に有意差はみられなかった。胎児の骨格変異及び化骨遅延については、45mg 以上投与群で頸肋、骨化遅延の腹当たりの発現率の上昇が認められた。(資料18)

分娩されたF<sub>1</sub>児の授乳1日及び4日の生存率は150 mg 投与群でやや低かった。授乳1日におけるF<sub>1</sub>児体重は45 mg 以上投与群で有意に低く、150 mg 投与群では授乳期間中低値であった。

生後のF<sub>1</sub>児の耳介開展、眼瞼開裂、正向反射、断崖回避、音響驚愕反応、聴覚機能<sup>r</sup>、眼科的検査、オープンフィールド行動検査<sup>v</sup>、M 迷路学習検査<sup>w</sup>の結果には被験物質投与の影響は認められなかった。

F<sub>1</sub>世代各群雌雄の交配実験では被験物質投与の影響はみられなかった。

<sup>q</sup> フリーベース換算

<sup>r</sup> フリーベース換算

<sup>s</sup> 仰向けの状態からの復帰反応

<sup>t</sup> 単発の短音に対する反応

<sup>u</sup> Veiner and Alleva の方法によるガルトン笛に対するプレイヤー反射の観察

<sup>v</sup> Hall の方法による行動観察

<sup>w</sup> Butcher らの方法による水を満たしたM字型迷路における刺激光に対する反応観察

F<sub>1</sub> 世代には被験物質の投与に起因した一般症状の異常は認められなかったが、150mg 投与群の雌雄で平均体重が試験期間を通じて低値を示した。45mg 以上の投与群では腎の病理組織学的変化(集合管と腎盂の嚢胞性拡張、出血、線維症)の発現頻度が高かった。F<sub>1</sub>の性周期、受胎率、生存胎児数、着床数、黄体数、着床胚/胎児死亡数、F<sub>2</sub>胎児体重、頭臀長および性比には被験物質の投与に起因した影響は認められなかった。(資料18)

本試験の母動物および児に対する NOAEL は 15mg/kg 体重/日と考えられた。

### 【ウサギを用いた催奇形性試験】(資料13)

ニュージーランドホワイト種のウサギ(18 匹/群)の妊娠6 - 18日に強制経口(0, 15, 35, 75 mg/kg/日<sup>x</sup>)投与して催奇形性試験を実施した。

被験物質の投与に起因すると考えられる流産が 75 mg 投与群で 9 例、15 及び 35 mg 投与群で 2 例認められた。75mg 投与群では妊娠 12 日以降に体重減少が認められた。35mg 投与群では妊娠 12 日、15mg 投与群では妊娠 18 日に体重の低下が認められた。75mg 投与群のすべて、15mg、35mg 投与群では 2 あるいは 3 匹で排便及び排尿が減少した。軟便が 75mg 投与群で高頻度でみられた。

75mg 投与群では、妊娠 29 日に剖検された 5 匹の妊娠動物のうち 3 匹で全胚吸収が認められた。その他の投与群では、着床数、黄体数、胎児重量、性比に異常は認められなかった。母動物の剖検においては 75mg 投与群の流産例で肝臓の小葉明瞭化が認められた他、投与に関連した影響は認められなかった。

胎児の奇形及び変異の発現率は、75mg 投与群では得られた胎児数が少なかったため評価できなかったが、他の投与群と対照群との間に差は認められなかった。

以上の結果から、本試験における母動物に対する NOAEL は求められなかったが、胎児動物に対する NOAEL は 35 mg/kg/日と考えられた。

### (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 <sup>1</sup>	結果
染色体異常試験	培養ヒト全血リンパ球(資料14)	37.5 , 75.0 , 113 , 150 µg/mL <sup>2</sup> (-S9 ; 50.5hr)	陰性
		100 , 250 , 500 , 750 , 1000 µg/mL <sup>3</sup> (+S9 ; 27.4hr)	陰性
前進突然変異試験 (Hprt)	CHO(K1-BH4/HGPRT)(資料15)	288 , 384 , 511 , 682 , 909 µg/mL <sup>4</sup> (-S9 ; 5+20hr)	陰性
		216 , 288 , 384 , 511 , 682 µg/mL(+S9 ; 5+20hr)	陰性
		511 , 682 , 909 , 1212 µg/mL <sup>5</sup> (-S9 ; 5+20hr)	陰性

<sup>x</sup> フリーベース

		511,682,909,1212 µg/mL <sup>5</sup> (+S9 ; 5+20hr)	陰性
前進突然変異試験 (Tk)	L5178Y マウスリンパ腫細胞(資料16)	10 ~ 700 µg/mL(-S9) <sup>6</sup>	陰性
		10 ~ 500 µg/mL(+S9) <sup>7</sup>	陰性 <sup>8</sup>
不定期DNA合成(UDS)	ラット初代培養肝細胞(-S9) (資料19)	5.03-503 µg/mL <sup>9</sup>	陽性 ( 101µg/mL)

1 塩酸塩の値

2 150µg/mL で 細胞毒性が認められた。

3 500µg/mL 以上で著しい細胞毒性が認められた。

4 909µg/mL で 著しい細胞毒性が認められた。また 288µg/mL は試験途中で細菌が混入したため評価できなかった。

5 1212µg/mL では 著しい細胞毒性のため平板培地上で細胞を得ることができなかった。

6 700µg/mL では 相対増殖率が 10%未満に低下。

7 500µg/mL では 相対増殖率が 10%未満に低下。

8 500µg/mL では 所定の変異率をわずかに超過したが、細胞毒性が著しいため解析から除外された。

9 503µg/mL では 細胞生存率がやや低下(81.3%)。

*in vitro* の試験においては、染色体異常試験、ほ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た。一方、UDS 試験では陽性所見がみられた。UDS については、キノロン系の抗生物質でしばしば陽性が認められている。リンパ球を用いた UDS 試験においてもジフロキサシンは陽性であったが、DNA 鎖の傷害は確認できなかったと報告されている(論文 14)。UDS における陽性所見は DNA への直接の傷害性ではなく、キノロン系薬剤の二次作用によるものと考えられる。また、~~EMEA では、ジフロキサシンは報告にある UDS 試験条件で溶解度が低い~~ため沈殿物が生じ、これに<sup>3</sup>Hチミジンが凝集して細胞内に保持されたため生じたものであり、~~沈殿物を除いて試験を行った場合陰性であったことから、疑陽性と判断している。~~

*in vivo* の試験は実施されていないが、フルオロキノロン剤が一般的に遺伝毒性を有しないこと、*in vitro* の複数の試験結果から、ジフロキサシンは遺伝毒性を有さないものと考えられる。

## 食品健康影響評価について

### 【催奇形性について】

### 【遺伝毒性 / 発がん性について】

### 【毒性学的影響のエンドポイントについて】