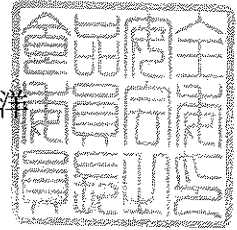




府 食 第 6 号
平成30年1月16日

厚生労働大臣
加藤 勝信 殿

食品安全委員会
委員長 佐藤 洋



食品健康影響評価の結果の通知について

平成22年3月19日付け厚生労働省発食安0319第8号をもって貴省から当委員会に意見を求められたフルメキンに係る食品健康影響評価の結果は下記のとおりですので、食品安全基本法（平成15年法律第48号）第23条第2項の規定に基づき通知します。

なお、食品健康影響評価の詳細は別添のとおりです。

記

フルメキンの一日摂取許容量を 0.071 mg/kg 体重/日とする。

動物用医薬品評価書

フルメキン

2018年1月

食品安全委員会

目次

	頁
○ 審議の経緯	4
○ 食品安全委員会委員名簿	4
○ 食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会専門委員名簿	5
○ 要約	6
I. 評価対象動物用医薬品の概要	7
1. 用途	7
2. 有効成分の一般名	7
3. 化学名	7
4. 分子式	7
5. 分子量	7
6. 構造式	7
7. 使用目的及び使用状況	7
II. 安全性に係る知見の概要	8
1. 薬物動態試験	8
(1) 薬物動態試験（ラット及びイヌ）	8
(2) 薬物動態試験（牛）	8
(3) 薬物動態試験（えび）	9
(4) 代謝試験	10
2. 残留試験	17
(1) 残留試験（牛、経口投与）	17
(2) 残留試験（牛、筋肉内投与）	17
(3) 残留試験（乳汁、皮下投与）	18
(4) 残留試験（羊、筋肉内投与）	19
(5) 残留試験（豚、経口投与）	19
(6) 残留試験（豚、筋肉内投与）	20
(7) 残留試験（鶏、飲水投与）	20
(8) 残留試験（七面鳥、飲水投与）	21
(9) 残留試験（にじます、混餌投与）	21
(10) 残留試験（えび）	22
3. 遺伝毒性試験	22
4. 急性毒性試験	24
5. 亜急性毒性試験	25
(1) 14日間亜急性毒性試験（マウス）＜参考資料＞	25
(2) 13週間亜急性毒性試験（マウス）	25
(3) 14日間亜急性毒性試験（ラット）① ＜参考資料＞	26

(4) 14 日間亜急性毒性試験 (ラット) ② <参考資料>	26
(5) 90 日間亜急性毒性試験 (ラット)	27
(6) 14 日間亜急性毒性試験 (モルモット) <参考資料>	27
(7) 21 日間亜急性毒性試験 (イヌ) <参考資料>	28
(8) 90 日間亜急性毒性試験 (イヌ)	28
(9) 15.5 週間亜急性毒性試験 (サル) <参考資料>	29
6. 慢性毒性及び発がん性試験.....	29
(1) 1 年間慢性毒性試験 (イヌ)	29
(2) 18 か月間発がん性試験 (マウス) ①.....	30
(3) 18 か月間発がん性試験 (マウス) ②<参考資料>	31
(4) 2 年間慢性毒性及び発がん性試験 (ラット)	33
(5) マウスにおける肝腫瘍に関する知見	33
7. 生殖発生毒性試験.....	40
(1) 生殖毒性試験 (ラット)	40
(2) 発生毒性試験 (マウス) ①.....	41
(3) 発生毒性試験 (マウス) ②.....	41
(4) 発生毒性試験 (ラット)	42
(5) 発生毒性試験 (ウサギ)	42
8. 微生物学的影響に関する試験.....	43
(1) ヒト腸内細菌叢分離菌に対する最小発育阻止濃度 (MIC) ①.....	43
(2) ヒト腸内細菌叢分離菌に対する MIC②.....	43
(3) ヒト腸内細菌叢分離株に対する MIC (7-ヒドロキシフルメキン)	44
(4) ヒト腸内細菌叢の利用分画	44
9. ヒトにおける知見.....	44
10. 一般薬理試験	45
(1) ヘキサバルビタール性睡眠時間に対する影響	45
11. その他の毒性試験.....	45
(1) 関節への影響に関する試験 (イヌ、若齢)	45
III. 国際機関等の評価	47
1. JECFA における評価.....	47
2. EMEA における評価	48
IV. 食品健康影響評価	49
1. 毒性学的 ADI について.....	49
2. 微生物学的 ADI について.....	49
3. ADI の設定について	50
・ 表 33 JECFA、EMEA 及び食品安全委員会における各種試験の無毒性量等の比較	51

- 別紙 1 : 検査値等略称.....53
- 別紙 2 : 代謝物名称55
- 参照.....56

〈審議の経緯〉

- 2005年 11月 29日 暫定基準告示（参照7）
2010年 3月 23日 厚生労働大臣から残留基準設定に係る食品健康影響評価について要請（厚生労働省発食安0319第8号）、関係資料の接受
2010年 3月 25日 第325回食品安全委員会（要請事項説明）
2014年 6月 4日 第87回肥料・飼料等専門調査会
2017年 6月 16日 第123回肥料・飼料等専門調査会
2017年 11月 28日 第675回食品安全委員会（報告）
2017年 11月 29日 から12月28日まで 国民からの意見・情報の募集
2018年 1月 10日 肥料・飼料等専門調査会座長から食品安全委員会委員長へ報告
2018年 1月 16日 第680回食品安全委員会（報告）
（同日付けで食品安全委員会委員長から厚生労働大臣に通知）

〈食品安全委員会委員名簿〉

- | (2011年1月6日まで) | (2012年6月30日まで) | (2015年6月30日まで) |
|---------------|----------------|----------------|
| 小泉 直子（委員長） | 小泉 直子（委員長） | 熊谷 進（委員長*） |
| 見上 彪（委員長代理*） | 熊谷 進（委員長代理*） | 佐藤 洋（委員長代理*） |
| 長尾 拓 | 長尾 拓 | 山添 康（委員長代理*） |
| 野村 一正 | 野村 一正 | 三森 国敏（委員長代理*） |
| 畑江 敬子 | 畑江 敬子 | 石井 克枝 |
| 廣瀬 雅雄 | 廣瀬 雅雄 | 上安平 冽子 |
| 村田 容常 | 村田 容常 | 村田 容常 |
- * : 2009年7月9日から * : 2011年1月13日から * : 2012年7月2日から

- | (2017年1月6日まで) | (2017年1月7日から) |
|---------------|---------------|
| 佐藤 洋（委員長） | 佐藤 洋（委員長） |
| 山添 康（委員長代理） | 山添 康（委員長代理） |
| 熊谷 進 | 吉田 緑 |
| 吉田 緑 | 山本 茂貴 |
| 石井 克枝 | 石井 克枝 |
| 堀口 逸子 | 堀口 逸子 |
| 村田 容常 | 村田 容常 |

〈食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会専門委員名簿〉

(2015年9月30日まで)

津田 修治 (座長)
今井 俊夫 (座長代理)
荒川 宜親 戸塚 恭一
池 康嘉 中山 裕之
石原 加奈子 細川 正清
今田 千秋 宮島 敦子
桑形 麻樹子 宮本 亨
小林 健一 山田 雅巳
下位 香代子 山中 典子
高橋 和彦 吉田 敏則

(2017年9月30日まで*)

今井 俊夫 (座長)
山中 典子 (座長代理)
荒川 宜親 菅井 基行
今田 千秋 高橋 和彦
植田 富貴子 戸塚 恭一
川本 恵子 中山 裕之
桑形 麻樹子 宮島 敦子
小林 健一 宮本 亨
佐々木 一昭 山田 雅巳
下位 香代子 吉田 敏則

* : 2016年10月1日から

(2017年10月1日から)

今井 俊夫 (座長*)
山中 典子 (座長代理*)
新井 鐘蔵 下位 香代子
荒川 宜親 菅井 基行
今田 千秋 高橋 和彦
植田 富貴子 中山 裕之
川本 恵子 宮島 敦子
桑形 麻樹子 山田 雅巳
小林 健一 吉田 敏則
佐々木 一昭

* : 2017年10月25日から

〈第87回肥料・飼料等専門調査会専門参考人名簿〉

唐木 英明 (倉敷芸術科学大学学長顧問)

〈第123回肥料・飼料等専門調査会専門参考人名簿〉

唐木 英明 (公益財団法人食の安全・安心財団理事長)

要 約

抗菌剤である「フルメキン」(CAS No.42835-25-6) について、JECFA 評価書、EMEA 評価書等を用いて食品健康影響評価を実施した。

評価に用いた試験成績は、薬物動態 (ラット、イヌ、牛、羊、豚、鶏、にじます及びえび)、残留 (牛、羊、豚、鶏、七面鳥、にじます及びえび)、遺伝毒性、急性毒性 (マウス、ラット、ウサギ及びイヌ)、亜急性毒性 (マウス、ラット、モルモット、イヌ及びサル)、慢性毒性及び発がん性 (マウス、ラット及びイヌ)、生殖発生毒性 (マウス、ラット及びウサギ)、微生物学的影響に関する試験等の成績である。

遺伝毒性試験において、*in vivo* のコメットアッセイでは肝臓で陽性の結果が得られたが、*gpt delta* マウスを用いた 2 つの遺伝子突然変異試験が肝臓で陰性であり、DNA 損傷はその後修復され突然変異に至らないと推察されたことから、フルメキンに生体にとって特段問題となる遺伝毒性はないと考えた。

マウスにおいて肝臓の腫瘍形成がみられたが、フルメキンに生体にとって特段問題となる遺伝毒性はないことから、遺伝毒性発現機序によるものではないと推察した。*gpt delta* マウスを用いた試験の 1 つでは、フルメキン投与群の 8-ヒドロキシデオキシグアノシン量は増加せず、5-ブromo-2'-デオキシウリジン陽性細胞が増殖していた。もう 1 つの試験では、フルメキン投与によって、病理組織学的に明らかな肝傷害に加えて、細胞周期関連遺伝子の mRNA の発現量の増加及びサイトカイン遺伝子の mRNA 量の増加が認められた。

以上のことから、フルメキンの肝腫瘍の発現機序は、細胞増殖の活性化を伴う慢性的な肝傷害が関連していると考え、一日摂取許容量 (ADI) を設定することは可能と判断した。

各種毒性試験で認められた影響は、主に肝毒性 (マウス) 及び関節傷害 (イヌ) であった。

生殖発生毒性試験では、児動物及び胎児に認められた主な影響は、体重の低下であった。催奇形性はみられなかった。

毒性学的 ADI は、マウスを用いた 13 週間亜急性毒性試験で得られた NOAEL 25 mg/kg 体重/日に安全係数として 100 を適用し、0.25 mg/kg 体重/日と設定した。

微生物学的 ADI は、VICH の算出式により 0.071 mg/kg 体重/日と算出した。

微生物学的 ADI が、毒性学的 ADI よりも小さいことから、フルメキンの ADI を 0.071 mg/kg 体重/日と設定した。

I. 評価対象動物用医薬品の概要

1. 用途

抗菌剤

2. 有効成分の一般名

和名：フルメキン

英名：Flumequine

3. 化学名

CAS (No. 42835-25-6)

英名：9-Fluoro-6,7-dihydro-5-methyl-1-oxo-1*H*,5*H*benzo[*ij*]quinolizine-2-carboxylic acid (参照 1)

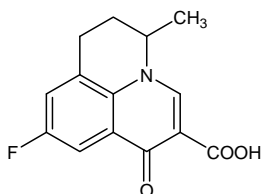
4. 分子式

$C_{14}H_{12}FNO_3$

5. 分子量

261.25

6. 構造式



(参照 1)

7. 使用目的及び使用状況

フルメキンは、キノロン系合成抗菌剤であり、主にグラム陰性菌に抗菌活性を示す。海外では、動物用医薬品として、牛¹、羊、鶏、魚類等に経口、筋肉内又は皮下投与で使用される。主に、家畜の腸管感染症の治療に用いられる。ヒト用医薬品としては、尿路感染症の治療に限定的に用いられる。(参照 2~6)

日本では、動物用及びヒト用医薬品として承認されていない。

なお、ポジティブリスト制度導入に伴う残留基準値²が設定されている。(参照 7)

¹ 本評価書において、原則として実験動物種及び人はカタカナ、動物用医薬品の使用対象となる動物等は漢字又はひらがなで記載する。

² 平成 17 年厚生労働省告示第 499 号によって定められた残留基準値 (参照 7)

II. 安全性に係る知見の概要

本評価書は、JECFA 評価書、EMEA 評価書等を基に、フルメキンの毒性に関する主な知見を整理した。

検査値等略称は別紙に記載した。

1. 薬物動態試験

(1) 薬物動態試験（ラット及びイヌ）

ラット（系統、年齢、匹数及び性別不明）及びイヌ（品種、年齢及び匹数不明、雄）に¹⁴C 標識フルメキンを単回経口投与（25 mg/kg 体重）し、薬物動態試験が実施された。

（参照 8、9）

① 血漿中濃度

ラットでは、血漿中濃度は投与約 2 時間後に C_{max} （約 70 $\mu\text{g eq/mL}$ ）に達した。血漿中の放射活性の大部分は未変化体と考えられた。フルメキンの血漿中 $T_{1/2}$ は 5.25 時間であった。

イヌでは、血漿中濃度は投与 2～4 時間後に C_{max} （約 55～65 $\mu\text{g eq/mL}$ ）に達した。投与後 12 時間の血漿中総放射活性の約半分は未変化体であった。フルメキンの血漿中からの消失は二相性を示し、 $T_{1/2}$ は α 相で 75 分、 β 相では 6.5 時間であった。

② 排泄

両動物種ともに投与 5 日以内に尿及び糞中から投与量のほとんどが回収され、組織中にフルメキンやその代謝物はほとんど存在しないことが示された。

排泄について、ラットとイヌとでは著しく異なっていた。ラットでは投与量の 10～15%が糞に排泄されたが、イヌでは投与量の 55～75%が糞に排泄された。ラットでは、投与量の 20～36%が尿に未変化体として排泄され、フルメキンのグルクロン酸等の同定可能な抱合体として排泄されるものはほとんどなかった。イヌの尿中に未変化体としてみられたのは投与量の 5%未満であり、13～15%はフルメキンの抱合体として排泄された。投与後 24 時間の尿中未変化体濃度は、両動物種でほぼ同様であった。

(2) 薬物動態試験（牛）

子牛（品種及び性別不明、体重 54～82kg、4 頭）に¹⁴C 標識フルメキンを経口又は筋肉内投与し、薬物動態試験が実施された。初回投与量は 12 mg/kg 体重で、その後 12 時間ごとに 6 mg/kg 体重を 9 回投与した。投与期間中及び最終投与後に尿、糞及び血液を採取した。（参照 4、5、10）

① 吸収及び排泄（経口投与）

経口投与試験では、血漿中濃度推移は筋肉内投与の血漿中濃度推移と同様であったが、より低値であった。初回投与後の血漿中濃度は、投与 0.5 時間後に C_{max} （2.5～5.8 $\mu\text{g eq/mL}$ ）に達した後、第 2 回投与直前には 0.8～1.5 $\mu\text{g eq/mL}$ に低下した。繰り返し投与により、最終投与まで定常状態が持続した。全血中放射活性濃度は血漿中

濃度に類似していたが、その濃度は血漿中濃度より低かった。投与された放射活性の 52~73%は尿に排泄され（最終投与後 24 時間で 49~70%）、糞への排泄は 21~36%であった。最終投与後 168 時間の放射活性の総回収率は 52~73%³であった。

② 吸収及び排泄（筋肉内投与）

筋肉内投与試験では、血漿中濃度は、初回投与後上昇し、投与 2 時間後に C_{max} (5.2 ~7.4 $\mu\text{g eq/mL}$) に達した後低下し、第 2 回投与直前には 1.3~2.6 $\mu\text{g eq/mL}$ であった。繰り返し投与により、最終投与まで定常状態が持続した。最終投与後、血漿中放射活性はゆっくりと減少し、最終投与 168 時間後には 0.2 $\mu\text{g eq/mL}$ となった。全血中放射活性濃度は血漿中濃度に類似していたが、その濃度は血漿中濃度より低かった。投与された放射活性の 48~63%は尿に排泄され（最終投与後 24 時間で 47~61%）、糞への排泄は 21~41%であった。最終投与後 168 時間の放射活性の総回収率は 85~96%であった。

(3) 薬物動態試験（えび）

えび（ブラックタイガー(*Penaeus monodon*)、体重 20~30 g、9 尾/時点/群) にフルメキンを単回筋肉内又は強制経口投与（いずれも 12 mg/kg 体重）し、薬物動態試験が実施された（水温 28~32°C）。筋肉中のフルメキン濃度を HPLC によって経時的（投与後 1~360 時間の間に 20 回）に測定した。

単回筋肉内投与後の筋肉中濃度を表 1 に、単回強制経口投与後の筋肉中濃度を表 2 に示した。また、両投与経路の薬物動態パラメーターを表 3 に示した。

筋肉中濃度は、筋肉内投与で投与 2 時間後に C_{max} (2,616.45 ng/g) に達し、投与 216 時間後に定量限界 (5 ng/g) 未満に低下した。強制経口投与では、投与 12 時間後に最高濃度 (365.8 ng/g) に達し、投与 144 時間後に定量限界未満に低下した。筋肉内及び強制経口投与後の筋肉中の $T_{1/2}$ はそれぞれ 33.4 及び 60.2 時間であった。強制経口投与後の AUC は、筋肉内投与後の約 1/5 であった。（参照 11、12）

表 1 えびにおけるフルメキン単回筋肉内投与後の筋肉中濃度 (ng/g) ^a

投与後時間 (h)	1	2	4	8	12	24	48	72
濃度	1,885.80	2,616.45	2,101.87	1,777.95	744.48	600.76	149.91	121.84
投与後時間 (h)	96	120	144	168	192	216	240	264
濃度	64.64	38.42	27.36	12.22	6.66	<LOQ	<LOQ	<LOQ

LOQ : 定量限界(5 ng/g)

a : 9 尾の筋肉をプールした試料

³ 参照 10 に記載されている数値であるが、糞への排泄量が含まれていないと考えられる。

表 2 えびにおけるフルメキン単回強制経口投与後の筋肉中濃度 (ng/g) ^a

投与後時間 (h)	1	2	4	8	12	24	48
濃度	162.22	178.16	183.01	210.76	365.80	124.56	65.41
投与後時間 (h)	72	96	120	144	168	192	216
濃度	15.75	11.62	7.67	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ

LOQ : 定量限界(5 ng/g)

a : 9尾の筋肉をプールした試料

表 3 えびにおけるフルメキン単回筋肉内又は強制経口投与後の薬物動態パラメーター

パラメーター	筋肉内	強制経口
T _{1/2β} (h)	33.45	60.21
MRT (h)	28.17	35.07
AUC (ng・h/g)	56.55	12.23
F (%)		21.63
C _{max} (ng/g)	2,616.45	365.81
T _{max} (h)	2	12

(4) 代謝試験

① 牛

子牛 (品種及び性別不明) に ¹⁴C 標識フルメキンを 10 回投与 (投与経路不明) し、代謝試験が実施された。初回投与量は 12 mg/kg 体重で、その後 12 時間ごとに 6 mg/kg 体重を 9 回投与した。

酵素による加水分解後、腎臓、筋肉、脂肪、尿及び糞から分離された主要な 2 物質は、フルメキン及び 7-ヒドロキシフルメキンであった。このことから、これらの試料中の全ての主要代謝物は、フルメキン又は 7-ヒドロキシフルメキンのグルクロン酸抱合体であることが示唆された。

全試料中の加水分解後のフルメキン及び 7-ヒドロキシフルメキンの分布を表 4 に示した。(参照 4、5、10、13)

表 4 子牛における ^{14}C 標識フルメキン 10 回投与^a後の代謝物の分布

試料	放射活性の抽出率 (%)	フルメキン (%)	7-ヒドロキシフルメキン (%)
肝臓	54~63 ^c	26~40 ^d	59~60 ^d
腎臓	86~98	50~68	28~37
筋肉	99	98	
脂肪	87~97	51~77	22~47
尿		81~86 ^b	12~17 ^b
糞	79~84 ^c	72~82	16~27

a : 初回に 12 mg/kg 体重を投与。その後 12 時間毎に 6 mg/kg 体重を 9 回投与 (投与経路不明)

b : 酵素による脱抱合後に測定

c : 最終投与 6 時間後

d : より極性の高い代謝物も存在

上記の試験において、肝臓からの放射活性の抽出率は低く、主要代謝物の厳密な特定ができなかったため、最終投与後の異なる時点の子牛の肝臓から、酢酸エチル及びメタノールの両方で抽出することにより代謝物を分離した。放射活性の回収率は、最終投与 6 及び 24 時間後ではリンゴマイマイ (*Helix pomatia*) 由来の酵素を用いた加水分解による脱抱合により大きな影響は受けなかったが、時間の経過とともに酵素を用いて脱抱合した酢酸エチル層に回収される放射活性の分画が増加した。分離された代謝物の放射活性の約 20% は、抱合体であると考えられた。溶媒抽出後の組織中の残留放射活性は、プロナーゼ消化後に抽出過程を繰り返すことにより回収が可能となった。

HPLC で得られたピークの放射活性プロファイリングによって、フルメキン及び 7-ヒドロキシフルメキンのほかに 13 種の代謝物 (M1~M13) が検出されたが、フルメキン、7-ヒドロキシフルメキン及び M1 が総抽出放射活性の大部分を占めた (表 5)。最終投与 24 時間後では、フルメキンは抽出された放射活性の 10~34% であり、7-ヒドロキシフルメキンは 2~12% であった。M1 は、抗菌活性を持たず、遊離分画及びタンパク結合分画に存在しており、最終投与 24 時間後以降の肝臓における主要代謝物であったが、同定されなかった。(参照 4、5、10、13、14)

表 5 子牛の肝臓における *H. pomatia* 由来の酵素を用いた加水分解後のフルメキン関連物質の経時的放射活性割合

		最終投与後時間 (h)				
		6	24	72	120	168
総放射活性濃度 ($\mu\text{g eq/g}$)		7.73	5.41	4.19	3.98	3.00
総放射活性に対する抽出放射活性の割合 (%) (タンパク質非消化)		65.5	51.0	48.2	41.1	48.5
関連物質の抽出放射活性に対する割合 (%)	フルメキン	42~58	10~34	ND	ND	ND
	7-ヒドロキシフルメキン	9~13	2~12	6~9	ND	0~22
	M1	9~15	25~41	26~43	52~57	35~63

n 数不明 ND : 不検出

筋肉内投与又は経口投与後の尿又は糞中において同定された 2 種の主要関連物質は、未変化体及びその水酸化体であった。尿及び糞において、フルメキンは検出した放射活性の約 80% を占め、水酸化体は 10~20% であった。他の未知の物質 (12%) が筋肉内投与後の尿にのみみられた。(参照 4、5)

牛 (肉用種、7 か月齢、体重 125~135 kg、雌雄各 3 頭) の頸部に ^{14}C 標識フルメキンを 5 日間皮下投与 (12 mg/kg 体重/日) し、代謝試験が実施された。最初の 4 回は左側頸部に、最後の 1 回は右側頸部に投与した。最終投与 18 時間後に、肝臓、腎臓、背最長筋、脂肪及び投与部位を採材し、HPLC によるフルメキンの測定 (定量限界 : 筋肉 25 ng/g、肝臓、腎臓及び脂肪 50 ng/g)、並びに総放射活性及び抗菌活性の測定を実施した。抗菌活性は、試験菌として *Morganella morganii* を用いて、寒天拡散法 (採用した試験方法は不詳) によって測定した (定量限界 : 肝臓、腎臓及び筋肉 100 ng/g、脂肪 250 ng/g)。これらの測定に用いた脂肪は、腎臓周囲、大網及び皮下の脂肪の混合物であった。

HPLC 及び放射活性の測定の結果を表 6 に示した。

肝臓中の放射活性の約 83% がフルメキンの代謝物又は結合分画の残留物であることが示された。筋肉及び腎臓では、代謝物又は結合分画の残留物が放射活性の約 21% を占めた。脂肪及び投与部位では、放射活性のほとんど全てが未変化体として回収された。

抗菌活性を有する残留物の平均濃度は、筋肉で 414 ng/g、脂肪で 1,110 ng/g、肝臓で 1,794 ng/g 及び腎臓で 4,547 ng/g であった。抗菌活性を有する総残留物に対するフルメキンの比率は、肝臓で 0.69、腎臓で 0.94、筋肉で 0.77 及び脂肪で 1 であった。(参照 5、14、15)

表 6 牛における ^{14}C 標識フルメキン 5 日間皮下投与後の組織中フルメキン濃度 (ng/g) 及び総放射活性濃度 (ng eq/g)

試料	HPLC (ng/g)	総放射活性濃度 (ng eq/g)	HPLC と総放射活性濃度の比率
肝臓	1,200 ± 280	7,110 ± 1,380	0.17 ± 0.06
腎臓	4,200 ± 981	5,320 ± 1,270	0.79 ± 0.05
筋肉	321 ± 89	374 ± 92	0.79 ± 0.04
脂肪 ^a	1,080 ± 666	1,180 ± 954	1.00 ± 0.14
投与部位	455,000 ± 456,000	464,000 ± 434,000	1.04 ± 0.07

n=6 平均 ± 標準偏差 HPLC における定量限界：筋肉 25 ng/g、肝臓、腎臓及び脂肪 50 ng/g

a：腎臓周囲、大網及び皮下の脂肪の混合物

② 羊

羊（品種不明、体重 38～50 kg、雌雄各 3 頭）の頸部に ^{14}C 標識フルメキンを 1 日 2 回、5 日間筋肉内投与し、代謝試験が実施された。初回投与量は 12 mg/kg 体重で、その後 12 時間ごとに 6 mg/kg 体重を投与した。第 1～9 回投与では左側頸部に、最終投与では右側頸部に投与した。最終投与 16 時間後に、肝臓、腎臓、背最長筋、脂肪及び投与部位を採材し、HPLC によるフルメキンの測定（定量限界 5 ng/g）及び総放射活性の測定を実施した。抗菌活性は、試験菌として *M. morganii* を用いて、寒天拡散法（採用した試験方法は不詳）によって測定した（定量限界：肝臓、腎臓及び筋肉 100 ng/g、脂肪 250 ng/g）。これらの測定に用いた脂肪は、腎臓周囲、大網及び皮下の脂肪の混合物であった。

HPLC 及び放射活性の測定の結果を表 7 に示した。

肝臓中の放射活性の約 94%がフルメキンの代謝物又は結合分画の残留物であることが示された。腎臓では放射活性の約 65%が、筋肉では 51%、脂肪では 44%が代謝物又は結合分画の残留物であった。左右の投与部位では、代謝物は少なく、未変化体が多くみられた。

フルメキンが、測定した組織において抗菌活性を有する主な残留物質であった。

(参照 5、14、15)

表7 羊における¹⁴C標識フルメキン5日間筋肉内投与後の組織中フルメキン濃度(ng/g)及び総放射活性濃度(ng eq/g)

試料	HPLC (ng/g)	総放射活性濃度 (ng eq/g)	HPLCと総放射活性濃度の 比率
肝臓	139 ± 30	2,520 ± 787	0.06 ± 0.01
腎臓	710 ± 148	2,230 ± 682	0.35 ± 0.05
筋肉	49 ± 15	100 ± 21	0.49 ± 0.08
脂肪 ^a	120 ± 77	160 ± 131	0.56 ± 0.05
投与部位(左)	17,500 ± 14,300	17,800 ± 13,300	0.86 ± 0.24
投与部位(右)	13,300 ± 12,000	12,500 ± 10,000	0.96 ± 0.21

n=6 平均 ± 標準偏差 HPLCにおける定量限界：5 ng/g

a：腎臓周囲、大網及び皮下の脂肪の混合物

③ 豚

豚(品種不明、体重45~49 kg、雌雄各3頭)の頸部に¹⁴C標識フルメキンを1日2回、5日間筋肉内投与し、代謝試験が実施された。投与は、初回に15 mg/kg体重を投与し、その後12時間ごとに7.5 mg/kg体重を9回投与した。第1~9回投与では左側頸部に、最終投与では右側頸部に投与した。最終投与16時間後に、肝臓、腎臓、背最長筋、脂肪、脂肪付き皮膚及び投与部位を採材し、HPLCによるフルメキンの測定(定量限界50 ng/g)、並びに総放射活性及び抗菌活性の測定を実施した。抗菌活性は、試験菌として*M. morganii*を用いて、寒天拡散法(採用した試験方法は不詳)によって測定した(定量限界：肝臓、腎臓及び筋肉100 ng/g、脂肪付き皮膚250 ng/g)。測定に用いた脂肪は、腎臓周囲、大網及び皮下の脂肪の混合物であった。

HPLC及び放射活性の測定の結果を表8に示した。

肝臓中の放射活性の約93%がフルメキンの代謝物又は結合分画の残留物であることが示された。腎臓では放射活性の約56%が、脂肪付き皮膚では放射活性の約45%が、筋肉及び脂肪では放射活性の約25%が代謝物又は結合分画の残留物であった。

抗菌活性を有する残留物の濃度は、肝臓、腎臓、筋肉、脂肪付き皮膚及び投与部位でそれぞれ803、3,024、378、288、及び131,422 ng/gであった。抗菌活性を有する総残留物に対するフルメキンの比率は、肝臓で0.58、腎臓で0.78、筋肉で0.53及び脂肪付き皮膚で1であった。

フルメキンが、測定した組織において抗菌活性を有する主な残留物質であった。(参照5、14、15)

表8 豚における¹⁴C標識フルメキン5日間筋肉内投与後の組織中フルメキン濃度(ng/g)及び総放射活性濃度(ng eq/g)

試料	HPLC (ng/g)	総放射活性濃度 (ng eq/g)	HPLCと総放射活性濃度の 比率
肝臓	468 ± 78	7,140 ± 964	0.07 ± 0.02
腎臓	2,360 ± 861	5,270 ± 796	0.44 ± 0.10
筋肉	199 ± 45	262 ± 42	0.75 ± 0.05
脂肪 ^a	364 ± 113	483 ± 141	0.76 ± 0.09
脂肪付き皮膚	246 ± 41	446 ± 59	0.55 ± 0.05
投与部位	104,000 ± 57,600	125,000 ± 68,000	0.83 ± 0.20

n=6 平均 ± 標準偏差 HPLCにおける定量限界：50 ng/g

a：腎臓周囲、大網及び皮下の脂肪の混合物

④ 鶏

鶏（肉用種、5週齢、体重2.16～2.64 kg、雌雄各3羽）に¹⁴C標識フルメキンを溶液として5日間強制経口投与（18 mg/kg 体重/日）し、代謝試験が実施された。最終投与12時間後に、肝臓、腎臓、筋肉（胸筋及び大腿筋）、脂肪（大網）及び脂肪付き皮膚を採材し、HPLCによるフルメキンの測定（定量限界：肝臓、筋肉及び脂肪付き皮膚25 ng/g、腎臓100 ng/g）、並びに総放射活性及び抗菌活性の測定を実施した。抗菌活性は、試験菌として*M. morgani*を用いて、寒天拡散法（採用した試験方法は不詳）によって測定した（定量限界：肝臓、腎臓及び筋肉100 ng/g、脂肪付き皮膚250 ng/g）。

HPLC及び放射活性の測定の結果を表9に示した。

肝臓中の放射活性の約30%がフルメキンの代謝物又は結合分画の残留物であることが示された。腎臓では放射活性の約24%が、筋肉では約6%が、脂肪付き皮膚では約23%が代謝物又は結合分画の残留物であった。脂肪（大網）には測定可能なフルメキンの代謝物はみられなかった。

抗菌活性を有する残留物の濃度は、肝臓、腎臓、筋肉及び脂肪付き皮膚でそれぞれ2,013、1,519、629及び528 ng/gであった。抗菌活性を有する総残留物に対するフルメキンの比率は、肝臓で0.72、腎臓で0.79、筋肉で0.81及び脂肪付き皮膚で0.5であった。

フルメキンが、測定した組織において抗菌活性を有する主な残留物質であった。（参照5、14、15）

表9 鶏における¹⁴C標識フルメキン5日間強制経口投与後の組織中フルメキン濃度 (ng/g) 及び総放射活性濃度 (ng eq/g)

試料	HPLC (ng/g)	総放射活性濃度 (ng eq/g)	HPLC と総放射活性濃度の比率
肝臓	1,080 ± 397	1,550 ± 557	0.70 ± 0.04
腎臓	1,560 ± 488	2,060 ± 624	0.76 ± 0.06
筋肉	509 ± 154	553 ± 183	0.94 ± 0.10
脂肪付き皮膚	275 ± 95	361 ± 127	0.77 ± 0.06
脂肪(大網)	129 ± 38	123 ± 44	1.09 ± 0.20

n=6 平均 ± 標準偏差

HPLCにおける定量限界：筋肉、肝臓及び脂肪付皮膚 25 ng/g、腎臓 100 ng/g

⑤ にじます

7°C又は16°Cの水温の水槽で、にじます（平均体重 90.1±8.1 及び 100±10.3 g、5尾/時点/群）に¹⁴C標識フルメキンを単回強制経口投与（12 mg/kg 体重、ラクトースで2%に処方、ゼラチンカプセル投与）し、代謝試験が実施された。16°C群は投与18及び36時間後に、7°C群は投与36及び96時間後に、皮膚付き筋肉を採材し、HPLCによるフルメキンの測定（定量限界 50 ng/g）、並びに総放射活性及び抗菌活性の測定を実施した。抗菌活性は、試験菌として *M. organii* を用いて、寒天拡散法（採用した試験方法は不詳）によって測定した（定量限界 100 ng/g）。

HPLC 及び放射活性の測定の結果を表 10 に示した。

両水温群の全時点でフルメキンの代謝物はみられなかった。

抗菌活性を有する残留物の濃度は、16°C群において、投与18及び36時間後でそれぞれ 4,046 及び 4,415 ng/g であり、抗菌活性を有する総残留物に対するフルメキンの比率は、それぞれ 0.83 及び 0.75 であった。7°C群においては、投与36及び96時間後でそれぞれ 4,495 及び 2,541 ng/g であり、抗菌活性を有する総残留物に対するフルメキンの比率は、それぞれ 0.79 及び 0.67 であった。（参照 5、14、15）

表 10 にじますにおける¹⁴C標識フルメキン単回強制経口投与後の皮膚付き筋肉中フルメキン濃度 (ng/g) 及び総放射活性濃度 (ng eq/g)

試料	HPLC (ng/g)	総放射活性濃度 (ng eq/g)	HPLC と総放射活性濃度の比率
16°C/18 h	3,320 ± 2,210	3,160 ± 2,030	1.04 ± 0.06
16°C/36 h	3,160 ± 1,300	3,110 ± 1,140	1.00 ± 0.07
7°C/36 h	3,680 ± 1,750	3,670 ± 1,490	0.98 ± 0.11
7°C/96 h	1,700 ± 555	1,760 ± 585	0.97 ± 0.05

n=5 平均 ± 標準偏差 HPLCにおける定量限界：50 ng/g

⑥ *in vitro* の代謝試験

マウス、ラット、子牛、羊、豚、鶏及びます（全て系統、品種、年齢、匹(頭、尾)数及び性別不明）の肝ミクロソームを用いて *in vitro* の代謝試験が実施された。フルメ

キンは、第 I 相反応酵素群で僅かに代謝された。主要な代謝物は 7-ヒドロキシフルメキンであり、総放射活性の 6%未満であった。さらに、フルメキンはグルクロン酸抱合され、抱合体は全動物種で総放射活性の 12.5%未満であった。(参照 4、5)

2. 残留試験

(1) 残留試験 (牛、経口投与)⁴

牛 (品種及び性別不明、8~12 週齢、体重 92 kg、4 頭/時点) にフルメキンを 1 日 2 回、5 日間経口投与し、残留試験が実施された。投与は、初回に 12 mg/kg 体重を投与し、その後 12 時間ごとに 6 mg/kg 体重を投与した。最終投与 24、36、48 及び 72 時間後に肝臓、腎臓、筋肉及び脂肪のフルメキン及び代謝物である 7-ヒドロキシフルメキン濃度を HPLC によって測定した (フルメキンの定量限界: 肝臓、腎臓及び脂肪 0.05 µg/g、筋肉 0.025 µg/g、7-ヒドロキシフルメキンの定量限界: 不明)。

各時点の組織中フルメキン濃度を表 11 に示した。

また、7-ヒドロキシフルメキンは、肝臓、筋肉及び脂肪からは検出されず、腎臓では最終投与 24 及び 48 時間後にそれぞれ 0.171 µg/g 及び 0.050µg/g 未満であった。

(参照 4、5、10、13)

表 11 牛におけるフルメキン 5 日間経口投与後の組織中フルメキン濃度 (µg/g)^a

試料 (n=4)	最終投与後時間 (h)			
	24	36	48	72
肝臓	0.70~1.47	0.24~0.64	0.17~0.53	0.07~0.29
腎臓	0.82~2.77	0.29~1.06	0.23~0.95	0.13~0.33
筋肉	0.18~0.43	0.06~0.18	0.09~0.16	0.06~0.17
脂肪	0.15~1.04	0.11~0.15	0.24~0.48	0.08~0.15

n=4

定量限界: 肝臓、脂肪及び腎臓 0.05 µg/g、筋肉 0.025 µg/g

検出限界: 0.018 µg/g

a: 参照 10 に記載されている数値

(2) 残留試験 (牛、筋肉内投与)⁵

牛 (品種及び性別不明、18 週齢、体重 192±5 kg、4 頭/時点) にフルメキンを 1 日 2 回、5 日間筋肉内投与し、残留試験が実施された。投与は、初回に 12 mg/kg 体重を投与し、その後 12 時間ごとに 6 mg/kg 体重を投与した。最終投与 24、36、48、72 及び 96 時間後に肝臓、腎臓、筋肉及び脂肪中のフルメキン及び代謝物である 7-ヒドロキシフルメキン濃度を HPLC によって測定した (フルメキンの定量限界: 肝臓、腎臓及び脂肪 0.05 µg/g、筋肉 0.025 µg/g、7-ヒドロキシフルメキンの定量限界: 不明)。

⁴ 参照 4 及び 5 に記載されている試験と参照 10 及び 13 に記載されている試験は同一の試験と判断し、試験結果をまとめて記載した。

⁵ 参照 4 及び 5 に記載されている試験と参照 10 及び 13 に記載されている試験は同一の試験と判断し、試験結果をまとめて記載した。

各時点の組織中フルメキン濃度を表 12 に示した。

7-ヒドロキシフルメキンは、筋肉、脂肪及び肝臓からは検出されず、腎臓では最終投与 24、48 及び 72 時間後にそれぞれ 0.108、0.053 µg/g 及び 0.050 µg/g 未満であった。(参照 4、5、10、13)

表 12 牛におけるフルメキン 5 日間筋肉内投与後の組織中フルメキン濃度 (µg/g)

試料	最終投与後時間 (h)				
	24	36	48	72	96
肝臓 ^a	0.14~0.34	0.06~0.16	0.06~0.08	<LOD~0.08	LOD~<LOQ
腎臓 ^a	0.68~1.53	0.28~0.70	0.21~0.59	0.16~0.44	0.06~0.12
筋肉 ^a	0.05~0.80	0.05~0.07	0.04~0.07	0.03~0.04	0.04~0.06
脂肪 ^a	0.12~0.28	<LOQ	0.05~0.11	<LOQ	LOD~<LOQ
投与部位 ^b	58.926		0.190		0.101

n=4

LOQ (定量限界) : 肝臓、脂肪及び腎臓 0.05 µg/g、筋肉 0.025 µg/g

LOD (検出限界) : 0.018 µg/g

a : 参照 10 に記載されている数値

b : 参照 5 に記載されている数値

(3) 残留試験 (乳汁、皮下投与)

① 放射標識試験

牛 (品種及び齢不明、4 頭) に ¹⁴C 標識フルメキンを 3 日間皮下投与 (12 mg/kg 体重/日) し、乳汁の残留試験が実施された。最終投与 48 時間後まで乳汁を採取し、乳汁中の総放射活性濃度及び抗菌活性を有する残留物の濃度及びフルメキン濃度を同時に測定した。総放射活性濃度は液体シンチレーション法によって、フルメキン濃度は HPLC によって測定した (定量限界 : 0.005 µg/g)。抗菌活性を有する残留物の測定は、試験菌として *M. morganii* を用いて、寒天拡散法 (採用した試験方法は不詳) によって実施した (定量限界 : 0.100 µg/g、検出限界 : 0.050 µg/g)。

乳汁中の放射活性濃度は、最終投与 3 時間後に 0.808 µg eq/g であり、その後減少して、最終投与 6、12、24、36 及び 48 時間後にそれぞれ 0.433、0.202、0.071、0.036 及び 0.017 µg eq/g となった。

フルメキンの平均濃度は、最終投与 3、6、12、24、36 及び 48 時間後にそれぞれ 0.205、0.110、0.050、0.020 及び 0.008 µg/g であった。

抗菌活性を有する残留物の濃度は、最終投与 3 及び 6 時間後にそれぞれ 0.288 及び 0.130 µg/g であり、その後非常に速やかに低下し最終投与 12 時間後以降は検出限界 (0.050 µg/g) 未満となった。抗菌活性を有する残留物の総量に対するフルメキンの比率は 0.85 であった。(参照 6)

② 非放射標識試験

牛 (品種及び齢不明、高泌乳及び低泌乳、8 頭) にフルメキンを 5 日間皮下投与 (12

mg/kg 体重/日) し、乳汁を最終投与 204 時間後まで採取して、残留試験が実施された。乳汁中のフルメキン濃度は HPLC によって測定した (定量限界 : 0.005 µg/g、検出限界 : 0.001 µg/g)。

フルメキン濃度は、最終投与 12 時間後の 0.107 µg/g から低下し、最終投与 24、36 及び 48 時間後にはそれぞれ 0.028、0.021 及び 0.011 µg/g となった。その後の採取時点では、フルメキンは数例から検出された (0.006~0.016 µg/g) のみであった。(参照 6)

(4) 残留試験 (羊、筋肉内投与) ⁶

羊 (品種、齢及び性別不明、4 頭/時点) にフルメキンを 1 日 2 回、5 日間筋肉内投与し、残留試験が実施された。投与は、初回に 12 mg/kg 体重を投与し、その後 12 時間ごとに 6 mg/kg 体重を 1 日 2 回投与した。最終投与 18、30、48、60 及び 78 時間後に肝臓、腎臓、筋肉及び脂肪中のフルメキン及び 7-ヒドロキシフルメキン濃度を HPLC によって測定した (フルメキンの定量限界 : 0.005 µg/g、7-ヒドロキシフルメキンの定量限界 : 不明)。

各時点の組織中フルメキン濃度を表 13 に示した。

最終投与 48 時間後の 7-ヒドロキシフルメキンは、肝臓、筋肉及び脂肪で 0.010µg/g 未満、腎臓で 0.100 µg/g 未満であった。(参照 4、5、10、13)

表 13 羊におけるフルメキン 5 日間筋肉内投与後の組織中フルメキン濃度 (µg/g)

試料	最終投与後時間 (h)				
	18	30	48	60	78
肝臓 ^a	0.1687~1.2553	0.0176~0.1452	0.0365~0.0766	0.0177~0.0640	<LOQ~0.0193
腎臓 ^a	0.1867~4.2040	0.0567~0.8798	0.1459~0.3387	0.0307~0.1858	0.0247~0.0625
筋肉 ^a	0.0549~0.4916	0.0172~0.0876	0.0245~0.0407	<LOQ~0.0197	<LOQ~0.0124
脂肪 ^a	0.0459~0.1677	0.0172~0.3649	0.0282~0.1817	0.0114~0.1166	0.0077~0.1719
投与部位 ^b	2.519		0.038		0.008

n=4

LOQ (定量限界) : 5 ng/g

a : 参照 10 に記載されている数値

b : 参照 5 に記載されている数値

(5) 残留試験 (豚、経口投与)

豚 (品種及び性別不明、4 か月齢、体重 52 kg、4 頭/時点) にフルメキンを 1 日 2 回、5 日間経口投与し、残留試験が実施された。投与は、初回に 15 mg/kg 体重を投与し、その後は 7.5 mg/kg 体重を 12 時間ごとに投与した。最終投与 12、24、36、48、72 及び 96 時間後に腎臓、肝臓、筋肉及び脂肪中のフルメキン濃度を HPLC によって測定した (定量限界 : 0.05 µg/g)。

⁶ 参照 4 及び 5 に記載されている試験と参照 10 及び 13 に記載されている試験は同一の試験と判断し、試験結果をまとめて記載した。

各時点の組織中フルメキン濃度を表 14 に示した。(参照 10、13)

表 14 豚におけるフルメキン 5 日間経口投与後の組織中フルメキン濃度 (µg/g)

試料	最終投与後時間 (h)					
	12	24	36	48	72	96
肝臓	0.30~0.50	0.07~0.19	<LOQ~0.18	<LOQ~0.30	<LOQ~0.08	<LOQ~0.08
腎臓	1.33~2.62	0.23~0.74	0.08~0.70	0.06~0.82	0.07~0.26	0.07~0.42
筋肉	0.13~0.27	<LOQ~0.07	<LOD~0.07	<LOD~0.10	<LOD~<LOQ	<LOD~<LOQ
脂肪	0.14~0.27	<LOQ~0.06	<LOQ~0.07	<LOQ~0.07	<LOD~<LOQ	<LOD~<LOQ

n=4

LOQ (定量限界) : 0.05 µg/g

LOD (検出限界) : 筋肉 0.024 µg/g、肝臓 0.010 µg/g、腎臓 0.015 µg/g、脂肪 0.021 µg/g

(6) 残留試験 (豚、筋肉内投与)

豚 (品種、性別及び年齢不明) にフルメキンを筋肉内投与し、残留試験が実施された。投与は、初回に 15 mg/kg 体重を投与し、その後 12 時間ごとに 7.5 mg/kg 体重を 9 回投与した。最終投与 12、24、48 及び 72 時間後に肝臓、腎臓、筋肉及び皮膚/脂肪中のフルメキン濃度を測定した。

各時点の組織中フルメキン濃度を表 15 に示した。

7-ヒドロキシフルメキンは、最終投与 48 時間後の肝臓及び腎臓で 0.19 µg/g が検出されたが、筋肉では 0.024 µg/g 未満、脂肪では 0.050 µg/g 未満であった。(参照 4、5)

表 15 豚におけるフルメキン 5 日間筋肉内投与後の組織中フルメキン濃度 (µg/g)

試料	最終投与後時間 (h)			
	12	24	48	72
肝臓	0.448	0.125	0.164	0.075
腎臓	1.879	0.460	0.370	0.155
筋肉	0.194	0.065	0.080	<0.050
皮膚/脂肪	0.190	0.056	0.070	<0.050

n 数不明

(7) 残留試験 (鶏、飲水投与)⁷

鶏 (肉用種、性別不明、6 羽/時点) にフルメキンを 5 日間飲水投与 (12 mg/kg 体重/日) し、残留試験が実施された。最終投与 6、24、36、48、72 及び 96 時間後に肝臓、腎臓、筋肉及び皮膚/脂肪中のフルメキン濃度を測定した。

各時点の組織中フルメキン濃度を表 16 に示した。

最終投与 96 時間後には肝臓及び腎臓からフルメキンは検出されなかった。

7-ヒドロキシフルメキンは、最終投与 6 時間後に、肝臓で 1.100 µg/g、腎臓で 1.900 µg/g、筋肉で 0.170 µg/g 及び皮膚/脂肪で 0.100 µg/g であり、最終投与 48 時間後には、

⁷ 参照 4 及び 5 に記載されている試験と参照 10 及び 13 に記載されている試験は同一の試験と判断し、試験結果をまとめて記載した。

筋肉で 0.010 µg/g 未満、皮膚/脂肪で 0.050 µg/g に、肝臓及び腎臓でそれぞれ 0.185 及び 0.165 µg/g に低下した。(参照 4、5、10、13)

表 16 鶏におけるフルメキン 5 日間飲水投与後の組織中フルメキン濃度 (µg/g) ^a

試料	最終投与後時間 (h)					
	6	24	36	48	72	96
肝臓	1.94 ~3.00	1.64 ~2.63	0.12 ~0.22	<LOQ ~0.19	<LOD ~<LOQ	<LOD
腎臓	1.84 ~3.55	1.60 ~2.91	0.12 ~0.33	<LOD ~0.16	<LOD ~<LOQ	<LOD
筋肉	1.23 ~1.81	1.15 ~1.68	0.11 ~0.19	0.04 ~0.17	0.02 ~0.05	<LOD ~<LOQ
皮膚/脂肪	0.48 ~1.10	0.39 ~0.98	<LOQ ~0.12	<LOQ ~0.12	<LOQ	<LOD ~<LOQ

n=6

LOQ (定量限界) : 肝臓、腎臓 0.1 µg/g、皮膚/脂肪 0.05 µg/g、筋肉 0.025 µg/g

LOD (検出限界) : 筋肉 0.010 µg/g、肝臓、腎臓 0.030 µg/g、脂肪 0.015 µg/g

a : 参照 10 に記載されている数値

(8) 残留試験 (七面鳥、飲水投与)

七面鳥 (品種、齢及び性別不明、6 羽/時点) にフルメキンを 5 日間飲水投与 (18 mg/kg 体重/日) し、残留試験が実施された。最終投与 24、36、48、72 及び 96 時間後に、HPLC によって各組織中のフルメキン及び 7-ヒドロキシフルメキンを測定した。

組織中のフルメキン濃度は、最終投与 24 時間後に筋肉、皮膚/脂肪、肝臓及び腎臓でそれぞれ 0.060、0.066、0.056 µg/g 及び 0.100 µg/g 未満であった。最終投与 36 時間後には、筋肉 (1 例のみで検出 : 0.115 µg/g)、肝臓及び腎臓からはフルメキンは定量可能な量は検出されなかった。その後の時点では、フルメキンは皮膚/脂肪でのみ検出され、最終投与 48、72 及び 96 時間後にそれぞれ 0.074、0.053 (n=5) 及び 0.056 µg/g (n=4) であった。腎臓では、最終投与 48 及び 72 時間後に 0.100 µg/g 未満であったが、最終投与 96 時間後には検出限界未満となった。筋肉では、フルメキンは最終投与 48、72 及び 96 時間後に検出されなかった (0.013 µg/g 未満)。肝臓では、最終投与 48 時間後に 0.050 µg/g 未満であり、最終投与 72 及び 96 時間後には 0.006 µg/g 未満であった。

7-ヒドロキシフルメキンは、各時点で皮膚/脂肪の 2~3 例のみで検出され、その濃度は 0.025~0.074 µg/g の範囲であった。他の可食組織では検出されなかった (筋肉、肝臓及び腎臓でそれぞれ 0.011、0.012 及び 0.011 µg/g 未満)。(参照 6)

(9) 残留試験 (にじます、混餌投与)

にじます (10 尾/時点/群) にフルメキンを水温 7.4°C 又は 16.4°C でそれぞれ 5 日間混餌投与 (12 mg/kg 体重/日、12 時間ごとに 1 日 2 回に分けて投与) し、残留試験が実施された。通常比率の筋肉/皮膚中のフルメキン及び 7-ヒドロキシフルメキン濃度を HPLC によって測定した (フルメキンの定量限界 : 0.05 µg/g、7-ヒドロキシフルメキ

ンの定量限界：不明)。

各時点の筋肉/皮膚中フルメキン濃度を表 17 に示した。

最終投与 14 日後には、両水温においてフルメキンは検出されなかった。

7-ヒドロキシフルメキンは両水温の全時点で検出されなかった。(参照 4、5、10、13)

表 17 にじますにおけるフルメキン 5 日間混餌投与後の筋肉/皮膚中フルメキン濃度 (µg/g)

水温	最終投与後日数 (日)					
	1	2	4	7	14	21
7.4°C	2.71~8.58	0.63~3.92	0.08~1.49	0.06~0.13	<LOD	<LOD
16.4°C	0.58~3.65	0.08~0.68	<LOQ~0.08	<LOD	<LOD	NA

n=10

LOQ (定量限界) : 0.05 µg/g LOD (検出限界) : 0.018 µg/g NA : 分析せず

(10) 残留試験 (えび)

えび (ブラックタイガー、体重 20~30 g、9 尾/時点/群) にフルメキンを 5 日間混餌投与 (12 mg/kg 体重/日) し、残留試験が実施された。筋肉中フルメキン濃度を投与開始当日から 15 日間測定した (定量限界 : 0.005 µg/g)。

経時的な筋肉中フルメキン濃度を表 18 に示した。

投与期間中のフルメキン濃度は低く (0.030~0.046 µg/g)、最終投与 96 時間後までに定量限界未満となった。(参照 11、12)

表 18 えびにおけるフルメキン 5 日間混餌投与後の筋肉中フルメキン濃度 (µg/g)

	投与日				
	1	2	3	4	5
筋肉中濃度	0 ^a	0.0438	0.0455	0.0450	0.0298
最終投与後時間 (h)					
	24	48	72	96	120
	0.0285	0.0227	0.00929	<LOQ	<LOQ

n=9 LOQ (定量限界) : 0.005 µg/g 水温 28~32°C

a : 投与前の数値と考えられる。

3. 遺伝毒性試験

フルメキンの遺伝毒性試験結果を表 19 に示した。

表 19 フルメキンの遺伝毒性試験結果

	検査項目	試験対象	用量	結果	参照
<i>in vitro</i>	復帰突然変異試験 (Ames 試験)	<i>Salmonella typhimurium</i> TA98、TA100、 TA1515、TA1537、 TA1538	0.01~1,000 µg/disk (±S9)	陰性	8
	遺伝子突然変異試験	マウスリンフォーマ細胞 (L5178Y 細胞、 <i>hprt</i> 遺伝子座)	0~200 µg/mL (±S9)	陰性	8
		チャイニーズハムスター卵巣由来(CHO)細胞	0~200 µg/mL (±S9)	陰性	8
	DNA 損傷試験 (コメットアッセイ)	チャイニーズハムスター肺由来細胞	0~625 µg/mL (1 時間処理)	陽性	16
<i>in vivo</i>	DNA 損傷試験(コメットアッセイ)	マウス (ddY 系、8 週齢) 肝臓、胃、結腸、腎臓、膀胱、肺、脳及び骨髄	単回経口投与 (125、250、500 mg/kg 体重) 投与 1、3 又は 24 時間後に観察	陽性 (肝臓：250 mg/kg 体重(投与 3 時間後)、 胃：250 及び 500 mg/kg 体重(投与 1 及び 3 時間後)、 結腸：250 mg/kg 体重(投与 1 時間後)及び 500 mg/kg 体重(投与 1 及び 3 時間後)、 膀胱：250 mg/kg 体重(投与 1 及び 3 時間後)及び 500 mg/kg 体重(投与 3 時間後))	16
		マウス (ddY 系、5 週齢) 肝臓	単回経口投与 (125、250、500 mg/kg 体重) 投与 3 又は 24 時間後に観察	陽性 (全用量：投与 3 時間後)	
		マウス (ddY 系、8 週齢、肝部分切除) 肝臓	単回経口投与 (125、250、500 mg/kg 体重) 投与 3 時間後に観察	陽性 (全用量)	
	DNA 損傷試験(8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OHdG)検出)	<i>gpt delta</i> マウス (B6C3F1 系、雌雄各 5 匹/群、肝臓)	13 週間混餌投与 (0.4%)	増加なし	17

不定期 DNA 合成試験	ラット (Fischer 系、雄 3 匹/群) 肝臓	単回強制経口投与 (156.25、312.5、625 mg/kg 体重) 投与 2~4 又は 12~16 時間後に観察	陰性	3
染色体異常試験	ラット (骨髄)	1,000 mg/kg 体重 経口投与	陰性	8
遺伝子突然変異試験	<i>gpt delta</i> マウス (B6C3F1 系、雌雄各 5 匹/群、肝臓)	13 週間混餌投与 (0.4%)	陰性	17
	<i>gpt delta</i> マウス (B6C3F1 系、雄各 5 匹/群、肝臓)	13 週間混餌投与 (0.4%)	陰性	18

フルメキンを用いた *in vitro* の遺伝子突然変異試験の結果は Ames 試験を始めとしていずれも陰性であったが、DNA 損傷試験 (コメットアッセイ) の結果が陽性であった。コメットアッセイは *in vivo* 試験でも肝臓で陽性の結果であった。しかしながら、*gpt delta* マウスを用いた遺伝子突然変異試験が肝臓において陰性であったことから、DNA 損傷はその後修復され突然変異に至らないと推察される。フルメキンがトポイソメラーゼ II を阻害することが報告されている (参照 16、19、20) ことから、コメットアッセイにおいてみられた DNA 損傷は、本酵素阻害による二次的な作用と考えられた。

以上から、食品安全委員会は、フルメキンに生体にとって特段問題となる遺伝毒性はないと判断した。

4. 急性毒性試験

各動物種におけるフルメキンの急性毒性試験の結果を表 20 に示した。(参照 8)

表 20 フルメキンの急性毒性試験結果

動物種	雌雄	投与経路	LD ₅₀ (mg/kg 体重)
マウス	雌	経口	2,480 (2,000~3,075)
	雌	経口 (絶食)	1,630 (1,190~2,233)
	雌	静脈内	97 (90~104)
	雌	静脈内	90 (86~93)
	雌	静脈内	822 (718~944)
ラット	雄	経口 (絶食)	2,210 (1,864~2,625)
	雌	経口 (絶食)	2,450 (1,992~3,014)
	雌	経口 (絶食)	1,340 (971~1,849)
	雌	経口 (絶食)	1,375 (1,170~1,620)
	雌	経口 (絶食)	1,753 (1,520~2,025)
ウサギ	雄	経口	>2,000
イヌ	雌雄	静脈内	>120

上表のイヌを用いた急性毒性試験では、雌雄各 1 匹にフルメキンを 2%溶液として 2 日間投与（雄：100 mg/kg 体重/日、雌：120 mg/kg 体重/日）した。投与後、両例に重篤な間代性強直性痙攣、衰弱、失禁及び一般状態の不良（defection）がみられたが、投与開始 2 日後までに正常に回復し、残りの観察期間に毒性徴候はみられなかった。

5. 亜急性毒性試験

(1) 14 日間亜急性毒性試験（マウス）〈参考資料⁸〉

マウス（Swiss-Webster 系、雌 10 匹）にフルメキンを 14 日間強制経口投与（500 mg/kg 体重/日）し、亜急性毒性試験が実施された。特に脱毛の発現に注意して観察された。その結果、脱毛等の毒性徴候はみられなかった。（参照 8）

(2) 13 週間亜急性毒性試験（マウス）

マウス（CD-1 系、16 匹/群）にフルメキンを 13 週間混餌投与（雄：0、25、50、100、400 又は 800 mg/kg 体重/日相当、雌：0、100、400 又は 800 mg/kg 体重/日相当）し、亜急性毒性試験が実施された。毎日一般状態の観察及び体重測定を実施し、摂餌量測定及び飼料効率の換算を毎週実施した。血漿中酵素活性は投与開始 12 週後に一回測定した。最終投与後全動物を剖検し、肝臓重量を測定し、肝臓及び他の肉眼的に異常がみられた組織試料については病理組織学的検査を実施した。

試験終了時に肝ミクロソーム分画を用いて、TP、チトクローム P450 (CYP) 含有量、レゾルフィン及びクマリンの誘導体の脱アルキル化に關与する CYP 活性並びに 1-ナフトールのグルクロン酸抱合活性を測定することにより異物代謝酵素活性を調べた。アロクロールを投与した動物のミクロソームを陽性対照として用いた。

死亡例はみられず、一般状態に投与に起因する影響はみられなかった。

⁸ 試験の詳細が不明であることから、参考資料とした。

800 mg/kg 体重/日投与群で投与開始 1 週に摂餌量の僅かな低下を伴う体重の増加抑制がみられた。この影響は雄でより顕著であった。

血液生化学的検査では、400 mg/kg 体重/日以上投与群で ALT 及び ALP が、800 mg/kg 体重/日投与群で LDH 及び AST が有意に上昇していた。これら血漿中酵素活性から 400 mg/kg 体重/日以上投与群における肝傷害が示唆された。

肝臓重量は、400 及び 800 mg/kg 体重/日投与群で増加した。

肝臓の病理組織学的検査では、用量依存的な肝細胞の変性がみられた。この変化は、肝細胞の小葉中心性肥大及び脂肪化(50 mg/kg 体重/日以上投与群の雄及び 400 mg/kg 体重/日以上投与群の雌)、倍数性の増加、核内封入体及び小葉中心性単細胞壊死(400 mg/kg 体重/日以上投与群)を伴っていた。これらの影響は雄でより顕著であった。有糸分裂像の増加が 800 mg/kg 体重/日投与群の雄で観察された。

フルメキンは、800 mg/kg 体重/日までの用量の投与において、肝臓のレゾルフィン及びクマリンの誘導体の脱アルキル化に関する CYP 活性又は 1-ナフトールのグルクロン酸抱合活性にほとんど又は全く影響を及ぼさなかった。

これらのことから、(1)フルメキンは、肝臓のレゾルフィン及びクマリンの誘導体の脱アルキル化に関する CYP 活性又は 1-ナフトールのグルクロン酸抱合活性に目立った誘導及び阻害の効果はない、(2)肝臓はマウスにおけるフルメキンの標的器官で特に雄で顕著である、と結論付けられた。50 及び 100 mg/kg 体重/日投与群の雄にみられた僅かな変性変化を伴う肝細胞の軽度の肥大性変化は、過重な代謝というより肝毒性病変の徴候であり、変性、壊死と再生を繰り返したものとみなされた。

JECFA は、雄における肝毒性病変に基づき、NOEL は 25 mg/kg 体重/日と判断した。

EMA は、NOEL は 25 mg/kg 体重/日と判断した。⁹ (参照 4、5、13、21)

食品安全委員会は、50 mg/kg 体重/日以上投与群の雄で肝細胞の変性が認められたことから、本試験における NOAEL を 25 mg/kg 体重/日と判断した。

(3) 14 日間亜急性毒性試験 (ラット) ① <参考資料¹⁰>

ラット (SD 系、雌雄各 5 匹/群) にフルメキンを 14 日間強制経口投与 (0、125、250 又は 500 mg/kg 体重/日) し、亜急性毒性試験が実施された。

試験期間中、死亡例はみられなかった。500 mg/kg 体重/日投与群の雌雄に、投与開始 3~5 日後に顕著な脱毛が観察され、試験期間中持続した。(参照 8)

(4) 14 日間亜急性毒性試験 (ラット) ② <参考資料¹¹>

2 系統のラット (CD 又は CFN 系、雌雄各 5 匹/群) にフルメキンを 14 日間強制経口投与 (それぞれ 0 又は 800 mg/kg 体重/日) し、亜急性毒性試験が実施された。

投与群では、臨床徴候として、腹部膨満、チアノーゼ、脱水並びに体重増加抑制及

⁹ 参照 4 及び 5 では、90 日間亜急性毒性試験として記載されている。

¹⁰ 試験の詳細が不明であることから、参考資料とした。

¹¹ 試験の詳細が不明であることから、参考資料とした。

び減少が観察された。剖検では、SD ラットの投与群の雄 1 例の左側脇腹で脱毛が観察された。CFN ラットの投与群の雌雄各 1 例が試験期間中に死亡した。投与 12 日に死亡した雄では、尿で腹部が汚染され、赤色の腸内容物及び髄膜出血がみられた。投与 14 日に死亡した雌に肉眼病変はみられなかった。14 日間生存した CFN ラットの投与群における剖検所見では、雄 1 例に悪液質及び嵌頓包茎が、雌 1 例に尿による腹部汚染がみられた。(参照 8、9)

(5) 90 日間亜急性毒性試験 (ラット)

ラット (SD 系、雌雄各 10 匹/群) にフルメキンを 90 日間強制経口投与 (0、200、400 又は 800 mg/kg 体重/日) し、亜急性毒性試験が実施された。毒性徴候は毎日観察し、体重は毎週測定した。

死亡例はみられなかった。

一般状態では、投与群の全例で脱毛がみられ、雌の方が雄よりも重度であった。800 mg/kg 体重/日投与群の大部分及び 200 mg/kg 体重/日投与群の雌数例で散発的な尿失禁が発現した。400 mg/kg 体重/日以上投与群の全例で流涎が顕著であったが、200 mg/kg 体重/日投与群及び対照群ではみられなかった。立毛は対照群及び 400 mg/kg 体重/日以上投与群で散見された。

400 mg/kg 体重/日以上投与群の雌雄で有意な体重増加抑制がみられた。

血液学的検査及び血液生化学的検査では、投与に起因する影響はみられなかった。投与群の全例で、用量依存的な尿のアセトン (ケトン) 反応陽性がみられたが、フルメキン代謝物による反応干渉によるものと考えられた。

臓器重量では、投与群の全例で用量相関的な相対肝重量の増加がみられた。800 mg/kg 体重/日投与群の腎臓について雌雄の相対重量及び雄の絶対重量が増加した。800 mg/kg 体重/日投与群の雄では心臓、脳、脾臓及び精巣の相対重量も有意に増加した。400 mg/kg 体重/日以上投与群の雌雄では副腎の相対重量が有意に増加した。これらの臓器 (肝臓以外) の病理組織学的検査の情報は得られなかった。

剖検では、唯一観察された異常が全群にみられた脱毛であった。

肝臓の病理組織学的検査では、800 mg/kg 体重/日投与群で肝細胞の腫大 (30~90%) が観察された。

EMEA は、本試験における NOEL を設定できなかった。(参照 4、5、8、9)

食品安全委員会は、フルメキン投与群で脱毛及び尿失禁が観察され、肝臓の相対重量の増加がみられていることから、本試験における LOAEL を 200 mg/kg 体重/日と判断した。

(6) 14 日間亜急性毒性試験 (モルモット) <参考資料¹²>

モルモット (ハートレー種、雌 5 匹/群) にフルメキンを 14 日間強制経口投与 (0、300 又は 500 mg/kg 体重/日) し、亜急性毒性試験が実施された。試験開始時及び終了時に被毛を採取し、被毛の成長パターンの違いについて調べた。

¹² 試験の詳細が不明であることから、参考資料とした。

500 mg/kg 体重/日投与群で、投与開始後 4 日間に 2 例が、投与開始後 6 日間に 3 例が死亡した。300 mg/kg 体重/日投与群では、投与 12 日及び最終投与後に各 1 例が死亡した。試験期間中、どの時点においても脱毛はみられなかった。顕微鏡検査において、試験終了時の被毛と試験開始時に採取した被毛に変化はみられなかった。剖検の情報は得られなかった。(参照 8、9)

(7) 21 日間亜急性毒性試験 (イヌ) <参考資料¹³>

イヌ (雑種、雌雄各 1 匹、体重：雄 8.3 kg、雌 5.0 kg) にフルメキンを 21 日間経口投与 (300 mg/kg 体重/日、1 日 2 回に分けてゼラチンカプセルで投与) し、亜急性毒性試験が実施された。

投与 3 時間以内に、嘔吐、抑鬱状態、運動失調及び軽度の過活動等の際立った徴候がみられた。これらの徴候は、投与 10 日から 14 日までの間で最も重度となり、その後は軽減した。投与開始 1 週間後には両動物ともに食欲が減退し、その結果、試験期間中に体重が減少した (雄 0.6 kg、雌 0.8 kg)。剖検では、両動物に投与の影響はみられなかった。(参照 8、9)

(8) 90 日間亜急性毒性試験 (イヌ)

イヌ (ビーグル種、若齢成犬(young adult)、雌雄各 2 匹/群) にフルメキンを 90 日間経口投与 (0、50、100 又は 200 mg/kg 体重/日、1 日 2 回に分けてゼラチンカプセル又は錠剤で投与) し、亜急性毒性試験が実施された。各動物の毒性徴候は、投与直後から定期的に観察し、体重は毎週測定した。

全群に、死亡例も一貫した毒性徴候もみられなかった。

一般状態では、皮膚の潮紅が被験物質投与群にみられたのみであった。この徴候の発現は、非常にまれであり、特異的な発現パターンはなかった。

試験期間中の体重の変動は僅かであり、有意又は投与に関連した変化とはみなされなかった。

血液学的検査及び尿検査のパラメーターに、フルメキンの投与による影響はみられなかった。

血液生化学的検査では、LDH の上昇が投与開始 14 日後に 50、100 及び 200 mg/kg 体重/日投与群でそれぞれ 1、1 及び 3 例にみられたが、投与開始 42 及び 90 日後において、LDH は正常であった。

試験終了時の剖検及び病理組織学的検査では、心臓、肝臓、腎臓及び骨格筋に投与の影響はみられなかった。(参照 8)

食品安全委員会は、全投与群において血中 LDH の上昇がみられたが、投与期間中に正常に回復し、その他に毒性徴候はみられなかったことから、本試験における NOAEL を最高用量である 200 mg/kg 体重/日と判断した。

¹³ 試験の詳細が不明であること及び供試動物数が少ないことから参考資料とした。

(9) 15.5 週間亜急性毒性試験（サル）〈参考資料¹⁴〉

サル（アカゲザル、雌 3 匹）にフルメキンを 15.5 週間漸増経口投与（100 mg/kg 体重/日を 1 週間、200 mg/kg 体重/日を 3 週間、300 mg/kg 体重/日を 8 週間、400 mg/kg 体重/日を 1 週間、500 mg/kg 体重/日を 1 週間及び 600 mg/kg 体重/日を 1.5 週間、1 日 2 回に分けてゼラチンカプセルで投与）し、亜急性毒性試験が実施された。

1 例が投与 2 日目に偶発的に死亡した。

試験期間中に嘔吐、食欲廃絶及び一過性の脱毛といった臨床徴候がみられた。

剖検及び病理組織学的検査（皮膚）では、全動物に変化は観察されなかった。その他の器官も組織学的検査のために採材されたが、それらの情報は提供されなかった。

（参照 8）

6. 慢性毒性及び発がん性試験

(1) 1 年間慢性毒性試験（イヌ）

イヌ（ビーグル種、雌雄各 4 匹/群）にフルメキンを 1 年間経口投与（0、50、100 又は 200 mg/kg 体重/日、1 日 2 回に分けて投与）し、慢性毒性試験が実施された。200 mg/kg 体重/日投与群で嘔吐が生じたため、投与開始 5 日間は 100 mg/kg 体重/日のみの投与で、その後は予定どおり 200 mg/kg 体重/日を 2 回（100 mg/kg 体重/回）に分けて投与した。

1 年間の投与期間において死亡例はなかった。

一般状態では、投与群で用量相関的な痙攣の発現が観察された。痙攣は比較的軽度であったが、その発現時間は短時間（15～30 秒）であり、大部分の場合、続いて運動失調及び振戦が発現した。投与約 10 分以内に正常な行動に回復した。他の投与に起因する臨床徴候として、運動失調、活動性低下、振戦、嘔吐（特に試験初期）、摂餌量の低下及び体重減少がみられた。投与に起因した流涎及び軽度の歯肉炎が試験期間の後半 6 か月間に 200 mg/kg 体重/日投与群の 5 例及び 100 mg/kg 体重/日投与群の 1 例でみられた。投与に関連した影響として、理学的検査により 1 例で運動失調、ナックリング反応の遅延並びに膝蓋及び肢端反射の亢進がみられた。

試験期間中、全投与群で摂餌量の減少が顕著であり、その結果試験開始後 3 週間は体重が減少した。しかし、体重減少に用量相関性はみられなかった。

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、投与に起因する影響はみられなかった。

JECFA は、本試験における NOEL を 50 mg/kg 体重/日と判断した。

EMA は、本試験における NOEL を 50 mg/kg 体重/日と判断した。（参照 4、5、8、9）

食品安全委員会は、用量相関的な痙攣の詳細が不明であることから、本試験における NOAEL を設定できないと判断した。

¹⁴ 試験の詳細が不明であることから、参考資料とした。

(2) 18 か月間発がん性試験 (マウス) ①

マウス (ICR 系、雌雄各 93 匹/群) にフルメキンを 18 か月間混餌投与 (0、400 又は 800 mg/kg 体重/日) し、発がん性試験が実施された。臨床的な毒性徴候は毎日観察した。摂餌量及び体重は定期的に測定した。試験終了時には動物を剖検し、全動物の組織及び肉眼的病変部の病理組織学的検査が実施された。

毒性徴候として、投与 6 週から試験終了時まで、800 mg/kg 体重/日投与群で僅かな体重増加抑制がみられた。

生存率、摂餌量及び一般状態に投与の影響はみられなかった。

血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査又は臓器重量に関する情報は得られなかった。

肝腫瘍及び肝毒性変化がみられた動物数を表 21 に示した。

表 21 マウスを用いた 18 か月間発がん性試験における肝腫瘍及び肝毒性変化

群	対照		400 mg/kg 体重/日		800 mg/kg 体重/日	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
動物数 (匹) ^a	70	64	75	69	78	69
腫瘍がみられた動物数 (匹)	6 (9)	0	28 ^b (37)	0	69 ^b (88)	9 ^b (13)
良性のみ ^c	6 (9)	0	25 ^b (33)	0	36 ^b (46)	7 ^b (10)
良性+悪性 ^d	0	0	0	0	30 ^b (38)	0
悪性のみ ^e	0	0	3 (4)	0	3 (4)	2 (3)
肝毒性変化がみられた動物数 (匹)	— ^f	0	32 ^b (43)	1	78 ^b (100)	39 ^b (57)

括弧内は各群の動物数に対する肝腫瘍又は肝毒性変化がみられた動物数の割合 (%)

a: 剖検及び病理組織学的検査を実施した動物数

b: 対照群との有意差あり ($p < 0.05$)

c: ヘパトーマ及び/又は異型を伴うヘパトーマ

d: 同一動物に発生したヘパトーマ又は異型を伴うヘパトーマ及び肝細胞がん

e: 肝細胞がん

f: 参照 8 に記載なし

肝臓の腫瘍は、組織学的にヘパトーマ (hepatoma)、異型を伴うヘパトーマ (hepatoma with atypia) 及び肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma) に分類された。前二者は良性、後者は悪性と分類された。肝腫瘍の発生率の用量相関性は明らかであり、雄において良性及び悪性腫瘍の各発生率は高く、肉眼的所見は病理組織学的検査で確認された。400 及び 800 mg/kg 体重/日投与群の雄において全腫瘍及び良性腫瘍は対照群と比較して有意に増加した ($p < 0.05$)。800 mg/kg 体重/日投与群の雄における良性+悪性腫瘍を発現した動物数も、対照群と比較して有意に増加していた。雌では、800 mg/kg 体重/日投与群の全腫瘍発生動物数及び良性腫瘍のみの発生動物数が有意に増加していた。

また、用量相関的な肝細胞の毒性変化が 400 mg/kg 体重/日投与群の雄及び 800 mg/kg 体重/日投与群の雌雄で発現した。肝細胞の毒性変化として、細胞質の変性、空胞化及び脂肪浸潤が、病変部にはリンパ球及び好中球の浸潤がみられた。肝毒性の発

現と並行して肝腫瘍の発生もみられた。

他の組織変化は毒性学的に意義がなく、投与に起因するものではないと考えられた。

JECFA は、本試験における NOEL を設定できなかった。(参照 4、5、8、9)

食品安全委員会は、本試験でみられた肝腫瘍は細胞増殖の活性化を伴う慢性的な肝傷害が関連しているものであり、肝腫瘍発生に対する閾値を設定できると考えたが、全投与群の雄に腫瘍の発生率の増加がみられたことから、本試験における NOAEL は設定できないと判断した。

(3) 18 か月間発がん性試験 (マウス) ②<参考資料¹⁵⁾>

上記の[II. 6. (2)]の試験で観察された肝腫瘍について、投与期間の長さや肝臓の毒性変化又は腫瘍性変化との関連性を調べるため、5 群のマウス (ICR 系、雄) を用いた混餌投与試験が実施された。

各群の投与方法を表 22 に示した。

表 22 マウスを用いた 18 か月間発がん性試験の投与方法

群	動物数 (匹)	投与方法
1	60	対照群：フルメキン無投与
2	100	800 mg/kg 体重/日を 18 か月間投与 投与開始 3、6、9 及び 12 か月後に 10 匹ずつ中間剖検
3	80	800 mg/kg 体重/日を最初の 6 週間投与、次の 6 週間休薬、さらに次の 6 週間投与し、残りの期間は休薬 投与開始 12、18 及び 24 週後に 10 匹ずつ中間剖検
4	60	800 mg/kg 体重/日を最初の 6 週間のみ投与、その後休薬 投与開始 6 週後に 10 匹を中間剖検
5 ^a	50	800 mg/kg 体重/日のフルメキン製剤(ジメチルホルムアミド(DMF)の含有量：0.001%未満)を 18 か月間投与 投与開始 6 週後に 5 匹、12 か月後に 10 匹を中間剖検

a：[II. 6. (2)]の試験で投与されたフルメキン製剤のロットに含まれていた 0.3%DMF が発がん性に影響したかどうか調べるために設定された。

臨床徴候は、週末及び休日 (生死のチェックのみ) を除いて毎日観察された。試験の最後 3 日間は観察の代わりに生死のチェックが行われた。体重及び摂餌量を試験開始 18 週までは毎週測定し、その後、毎月実施された。肝腫瘍及び肝臓の毒性変化は上記の[II. 6 (2)]の試験と同様に組織学的に分類された。

2 及び 5 群では、1 群 (対照群) と比較して投与 18~78 週において平均体重が低く、死亡率が高かった。5 群では投与 18 週から試験終了時まで摂餌量が 15%多かった。腹部膨満は投与群において対照群より、より一般的にみられた。血液学的検査、血液生化学的検査並びに尿検査及び臓器重量についての情報は得られなかった。

2 群の中間剖検結果 (表 23) から、フルメキン投与後の肝腫瘍の進行が時間依存性であることが判明した。投与開始 3 か月後において、肝腫瘍を発現した動物はいなか

¹⁵⁾ 一用量の試験であることから、参考資料とした。

ったが、10例全てに肝臓における毒性変化がみられた。投与開始6、9及び12か月後における肝腫瘍を有する動物数は、それぞれ1、3及び9例（2例は悪性）であった。5群では、投与開始6週間後の中間剖検で5例全ての肝臓に毒性変化がみられた。投与開始12か月後には6例に肝腫瘍がみられた。

表 23 2群（800 mg/kg 体重/日を18か月間投与）における肝腫瘍の発生動物数（匹）

	投与開始後月数（月）			
	3	6	9	12
動物数	0	1	3	9

n=10

試験終了時に肝腫瘍の発現及び肝臓の毒性変化がみられた動物数を表24に示した。2及び5群において、腫瘍の発生率は対照群と比較して有意に増加していた。2群の2例に肝細胞がん由来の転移性肺病変がみられた。2及び5群の動物の多く（それぞれ81及び97%）に肝臓の毒性変化がみられた。

表 24 マウスを用いた18か月間発がん性試験における肝腫瘍及び肝臓の毒性変化

	群				
	1 (対照群)	2 (800 mg/kg 体重/日を18か月間投与)	3 (800 mg/kg 体重/日を6週間投与+休薬6週間+800 mg/kg 体重/日を6週間+残余期間 休薬)	4 (800 mg/kg 体重/日6週間投与+残余期間 休薬)	5 (800 mg/kg 体重/日のフルメキン製剤を18か月間投与)
動物数（匹） ^a	60	58	49	48	35
腫瘍がみられた動物数（匹）	7 (12)	39 ^b (67)	11 (22)	10 (21)	29 ^b (83)
良性のみ ^c	5 (8)	26 ^b (45)	8 (16)	7 (15)	15 ^b (43)
良性+悪性 ^d	1 (2)	12 ^b (21)	2 (4)	1 (2)	11 ^b (31)
悪性のみ ^e	1 (2)	1 (2)	1 (2)	2 (4)	3 (9)
肝毒性変化がみられた動物数（匹）	0	47 ^b (81)	0	0	34 ^b (97)

括弧内は各群の動物数に対する肝腫瘍又は肝毒性変化がみられた動物数の割合（%）

a：剖検及び病理組織学的検査を実施した動物数

b：対照群との有意差あり（ $p < 0.05$ ）

c：へパトーマ及び/又は異型を伴うへパトーマ

d：同一動物に発生したへパトーマ又は異型を伴うへパトーマ及び肝細胞がん

e：肝細胞がん

肝臓の毒性変化は可逆性であり、表24の3及び4群では、試験終了時には明らかな毒性変化はみられず、中間剖検を実施した動物にも肝腫瘍はみられなかった。3及び4群では、全腫瘍の発生率は対照群の約2倍であったが、有意な増加ではなかった。

5 群の結果から、フルメキン製剤への混入物質としてのジメチルホルムアミド (DMF) は、フルメキンの経口投与によって生じる肝臓の毒性変化及び腫瘍性変化の進行に影響を及ぼさないことが示された。(参照 4、5、8、9)

(4) 2 年間慢性毒性及び発がん性試験 (ラット)

ラット (CFN/Wistar 系、雌雄各 60 匹/群) にフルメキンを 2 年間混餌投与 (0、200、400 又は 800 mg/kg 体重/日) し、発がん性試験が実施された。臨床的毒性徴候は毎日観察した。摂餌量及び体重は定期的に測定した。試験終了時には剖検し、全動物の組織及び肉眼病変部に対して病理組織学的検査を実施した。

400 mg/kg 体重/日以上投与群で死亡率が有意に減少した。

用量相関的な平均体重及び摂餌量の低下が投与群でみられた。

血液学的検査、血液生化学的検査及び尿検査に投与の影響はみられなかった。

臓器重量では、400 mg/kg 体重/日以上投与群の雄で、下垂体、肝臓、心臓及び脳の相対重量が有意に増加した。800 mg/kg 体重/日投与群の雌の肝臓、心臓及び脳の絶対重量が有意に増加した。

病理組織学的検査では、400 mg/kg 体重/日以上投与群の雄の下垂体で良性の色素嫌性腺腫がみられたが、発生率は対照群よりも高くはなかった。肝臓では、軽度の変性変化による肝細胞腫大病巣が散在した。これらの細胞の一部は、細胞質中に脂肪滴を有していた。400 mg/kg 体重/日以上投与群の雄の多くは精子形成を欠いていたが、この影響について統計学的分析はされなかった。

フルメキンに起因する発がん影響は、2 年間の投与期間中及び投与終了時のいずれにおいても観察されなかった。全群で観察された良性及び悪性の腫瘍は自然発生的なものと考えられ、対照群に比較して投与群での腫瘍発生率に有意な増加はみられなかった。

JECFA は、本試験における NOEL を 200 mg/kg 体重/日と判断した。発がん性はみられないと判断した。

EMEA は、本試験において発がん性はみられないと判断した。(参照 4、5、8、9)

食品安全委員会は、フルメキンの全投与群で用量相関的な体重及び摂餌量の低下がみられたことから、本試験における NOAEL を設定できないと判断した。また、本試験では発がん性はみられなかった。

(5) マウスにおける肝腫瘍に関する知見

① 二段階肝発がん性試験

a. 13 週間二段階肝発がん性試験 (マウス)

マウス (C3H 系、7 週齢、雄 5 又は 8 匹/群) を用いて、二段階肝発がん性試験が実施された。

投与計画は、表 25 に示した。

表 25 マウスを用いた 13 週間二段階肝発がん性試験における投与計画

群	投与方法		D-ガラクトサミン(投与開始 2 及び 5 週に腹腔内投与(300 mg/kg 体重))
	最初の 2 週間	次の 13 週間	
1	基礎飼料のみ	基礎飼料のみ	—
2	基礎飼料のみ	基礎飼料のみ	+
3	基礎飼料のみ	基礎飼料とフェノバルビタール (PB) (飲水投与(500ppm))	+
4	フルメキン添加飼料(4,000 ppm)	基礎飼料のみ	+
5	フルメキン添加飼料(4,000 ppm)	基礎飼料と PB(飲水投与(500ppm))	+
6	フルメキン添加飼料(4,000 ppm)	フルメキン添加飼料(4,000 ppm)	+

試験期間中、フルメキン投与群 (4~6 群) で対照群に比較して有意な体重の低値がみられたが、基礎飼料に切り替えると回復した (4 及び 5 群)。

肝臓の絶対重量の有意な増加が 3、5 及び 6 群でみられ、フルメキンとフェノバルビタール (PB) の長期投与の影響と考えられた。肝臓の相対重量は全投与群 (2~6 群) で高値を示した。

肝臓の病理組織学的検査の結果を表 26 に示した。

肝細胞増殖巣が、5 及び 6 群でそれぞれ 8 例中 2 例及び 7 例中 6 例に観察された。(参照 2、16)

表 26 マウスにおける二段階肝発がん性試験における肝病変

群	検査動物数 (匹)	肝病変がみられた動物数 (匹)		
		小葉中心性脂肪変性	小葉中心性肝細胞肥大	肝細胞増殖巣
1	4	0	0	0
2	8	0	0	0
3	8	0	8 ^{a, b}	0
4	8	0	0	0
5	8	0	8 ^{a, b, c}	2
6	7	7 ^{a, b, c}	0	6 ^{a, b, c}

a : 1 群と有意差あり (P<0.05)

b : 2 群と有意差あり (P<0.05)

c : 4 群と有意差あり (P<0.05)

b. 26 週間二段階肝発がん性試験 (マウス)

*p53*ヘテロ接合欠損マウス (CBA 系、*p53*^{+/-})、雄 41 匹、雌 27 匹)¹⁶を用いて、二段階肝発がん性試験が実施された。イニシエーション相ではジメチルニトロソアミン (DMN) を単回腹腔内投与 (5 mg/kg 体重) し、プロモーション相では DMN の投与 1 週間後からフルメキンを 26 週間混餌投与 (4,000 ppm) した。また、野生型マウ

¹⁶ 発がん性物質による腫瘍を発生しやすい。

ス (CBA 系、*p53*(+/+))、雄 42 匹、雌 32 匹) にも同様に投与した。投与終了後に肝臓の病理組織学的検査を実施し、増殖細胞病巣の PCNA (増殖細胞核抗原) 陽性率を測定した。

肝臓の病理組織学的検査の結果を表 27 に示した。

p53(+/-)及び *p53*(+/+)マウスにおけるフルメキン全投与群の生存動物のほとんどに変異細胞巣がみられ、その頻度はそれぞれの対応するフルメキン非投与群より高かった。変異細胞巣は主に明細胞から成り、時折それらの病変に好酸性細胞が混じっていた。

肝臓の非増殖性病変として、*p53*(+/-)及び *p53*(+/+)マウスにおける DMN+フルメキン及びフルメキン単独投与群に、肝細胞の単細胞壊死及び核の大小不同がみられた。

p53(+/-)マウスの雌雄における DMN+フルメキン投与群の肝臓の変異細胞巣の PCNA 標識率は、*p53*(+/+)マウスと比較して有意に高かった。肝臓の非増殖性領域の PCNA 標識率は、*p53*(+/-)及び *p53*(+/+)マウス間では同様であったが、*p53*(+/-)及び *p53*(+/+)マウスの DMN+フルメキン及びフルメキン単独投与群の標識率はそれぞれの対応するフルメキン非投与群より有意に高かった。(参照 2、22)

表 27 *p53* ヘテロ接合欠損及び野生型マウスを用いた二段階肝発がん性試験における肝病変

マウス	性	投与		検査動物数 (匹)	肝病変がみられた動物数 (匹)					
		DMN	フルメキン		変異細胞巢	腺腫	がん	1匹当たりの細胞増殖巣 ^a	非腫瘍性病変 ^d	
									単細胞壊死	核の大小不同
<i>p53</i> ヘテロ接合欠損	雄	+	+	12	12 ^b	1	0	45.3 ± 16.1 ^b	+ : 9 ++ : 3	+ : 12
		+	-	6	2	0	0	0.3 ± 0.5	0	+ : 1
		-	+	12	12 ^b	1	0	34.5 ± 19.8 ^b	+ : 8 ++ : 4	+ : 12
		-	-	4	0	0	0	0	0	0
	雌	+	+	8	8	1	1	7.4 ± 4.7 ^{b, c}	+ : 8	+ : 8
		+	-	6	3	0	0	0.7 ± 0.8	+ : 1	0
		-	+	5	5 ^b	0	0	4.6 ± 1.1 ^b	+ : 4 ++ : 1	+ : 5
		-	-	4	0	0	0	0	0	0
野生型	雄	+	+	14	13	2	0	41.2 ± 19.0 ^b	+ : 11 ++ : 3	+ : 14
		+	-	6	4	0	0	1.0 ± 1.1	0	0
		-	+	14	14 ^b	0	0	27.5 ± 12.7 ^b	+ : 12 ++ : 2	+ : 14
		-	-	6	1	0	0	0.2 ± 0.4	0	0
	雌	+	+	12	12 ^b	1	0	3.2 ± 1.4 ^b	+ : 12	+ : 12
		+	-	10	1	0	0	0.1 ± 0.3	+ : 1	0
		-	+	5	5 ^b	0	0	3.6 ± 1.1 ^b	+ : 5	+ : 5
		-	-	5	0	0	0	0	0	0

a : 動物数ではなく、増殖巣の数 (平均 ± 標準偏)

b : フルメキン投与群と対応するフルメキン非投与群間に有意差あり (p<0.05)

c : *p53*ヘテロ接合欠損マウス及び野生型マウス間に有意差あり (p<0.05)

d : + 軽度、++ 中度

c. 30週間二段階肝発がん性試験 (マウス)

マウス (CD-1系、雄、5週齢、20匹/群) を用いて、二段階肝発がん性試験が実施された。

投与計画は、表 28 に示した。

投与開始 9、19、24 又は 30 週目に、各群 5 匹から肝臓を採取した。

病理組織学的検査の結果を表 28 に示した。

非腫瘍性変化として 1 及び 4 群の全時点で小葉中心性に腫大して脂肪滴を含む淡明な肝細胞、炎症性細胞浸潤及び有糸分裂肝細胞の増加がみられたが、その程度は投与期間が長くなるにつれて低下した。これらの投与群では、肝細胞の有糸分裂像及び PCNA 陽性細胞数の増加が投与開始 9 週後にみられ、その後漸減した。

また、投与開始 9 週目の 1 及び 4 群において、好塩基性の変異細胞巣がみられた。1 群では、その後時間の経過とともに 19 及び 24 週目に、好塩基性の変異細胞巣が増加した。これらの時期に、好塩基性細胞から成る腺腫に加えて好酸性及び両染色の変異細胞巣もみられたが、30 週間後にはこれらの病巣は減少した。4 群では、好塩基性細胞巣のみが 9、19 及び 24 週間後にみられ、24 週目で最も多かったが、その数は 1 群より少なく、30 週目にはみられなかった。(参照 2、23)

表 28 マウスを用いた 30 週間二段階肝発がん性試験における投与及び病変

群	投与		病変		
	<i>N</i> , <i>N</i> ² ジエチルニトロソアミン(DEN) ^a	プロモーション ^b	腺腫	変異細胞巣	主な非腫瘍性変化
1	+	フルメキン ^c	+(好塩基性)	+(好塩基性/好酸性/両染色)	低染色小葉中心性肝細胞腫大、炎症性細胞の浸潤及び有糸分裂像の増加
2	+	PB ^d	-	+(好塩基性/好酸性)	小葉中心性好酸性肝細胞腫大
3	+	基礎飼料	-	+(好塩基性)	-
4	-	フルメキン ^c	-	+(好塩基性)	低染色小葉中心性肝細胞腫大、炎症性細胞の浸潤及び有糸分裂像の増加
5	-	PB ^d	-	-	小葉中心性好酸性肝細胞腫大
6	-	基礎飼料	-	-	-

n=20

a : DEN を単回腹腔内投与(100 mg/kg 体重)。DEN 非投与群には生理食塩水を投与。

b : DEN 又は生理食塩水の投与 1 週間後から投与開始

c : フルメキンを 30 週間混餌投与(4,000 ppm)

d : PB を 30 週間飲水投与(500 ppm)

② 肝細胞増殖に関する試験

gpt delta マウス (B6C3F1 系、雌雄各 10 匹/群)にフルメキンを 13 週間混餌投与(0.4%(雄/雌 590/763 mg/kg 体重/日))した。対照群には、フルメキン無添加の基礎飼料を投与した。投与終了時に、各群 5 匹は体重及び肝重量を測定し、肝臓の病理組織学的検査を実施した。残りの各群 5 匹には、肝細胞の増殖性を検討するために、投与終了前 2 日間及び剖検 2 時間前に 5-ブロモ-2'-デオキシウリジン (BrdU) を腹腔内投与した。

体重は、フルメキン投与群の雌雄ともに対照群より有意に低かった。

肝臓の相対重量は、フルメキン投与群の雌雄ともに対照群より有意に高かった。

病理組織学的検査において、フルメキン投与群の雌雄に空胞を伴った小葉中心性の肝細胞腫大がみられた。明らかな壊死はみられず、リンパ球及び好中球の軽度の浸潤がみられた。

BrdU 標識率は、フルメキン投与群の雌雄において対照群より有意に高く、またフルメキン投与群の雄において同群の雌より有意に高かった。(参照 17)

③ 遺伝子発現への影響に関する試験 a

マウス (C3H/He 系、性別不明、18 匹) をフルメキン投与群及び対照群に割り付け、フルメキン投与群にはフルメキンを 1、4 又は 8 週間混餌投与 (4,000 ppm) した。cDNA マイクロアレイ分析のために、4 週間投与群の 1 匹から肝臓を採取し、対照群のマウスと比較した。また、フルメキン投与群の肝臓を用いて、選択された遺伝子の経時的変化を定量的 RT-PCR によって調べた。

cDNA マイクロアレイ分析から、フルメキン投与によって発現量が増加又は減少した遺伝子があったが、増加した遺伝子にはシグナル伝達及び細胞周期調節に関する遺伝子が含まれていた。特に、ストレス応答分子であるグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) α 及び GST μ の発現量の増加は著しく、酸化ストレスの発生が示唆された。一方、発現量が減少した遺伝子には、CYP2E1 のような第 I 相の代謝酵素及びアポトーシスに関連したものが含まれていた。

これらの変化は定量的 RT-PCR により確認された。遺伝子発現量の経時的観察によって、GST α 、GST μ 、細胞外シグナル制御キナーゼ 5 (ERK5) 及び CYP2E1 は試験期間を通じて発現量が増加又は減少することが明らかとなった。さらに、酸化ストレスによる DNA 損傷のマーカーである、8-オキシグアニン DNA グリコシラーゼ 1 (OGG1) の発現量は時間依存的に増加していた。

これらの結果から、酸化ストレスに対する応答がマウスにおけるフルメキンの肝発がん性に大きな役割を果たす可能性が示唆された。(参照 24)

④ 遺伝子発現への影響に関する試験 b

gpt delta マウス (B6C3F1 系、雌雄各 5 匹/群) に、フルメキン、2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (MeIQx) 又は PB を 13 週間混餌投与した。投与は、表 29 に示すように実施した。剖検時に、体重及び肝重量を測定した。また、肝臓について、cDNA マイクロアレイ分析を実施した。さらに、肝細胞の増殖活性を検討するために、剖検前 2 日間及び剖検 2 時間前に BrdU を腹腔内投与した。

表 29 *gpt delta* マウスを用いた 13 週間混餌投与試験における投与の詳細

群	投与 ^a
1	MeIQx (0.03%)
2	フルメキン (0.4%)
3	PB (0.05%)
4	MeIQx (0.03%) +フルメキン (0.4%)
5	MeIQx (0.03%) +PB (0.05%)
6	対照 (基礎飼料のみ)

a : 括弧内の数値は飼料中濃度

体重について、4 群が有意に減少した。肝臓の相対重量について、2、4 及び 5 群が有意に増加した。

病理組織学的検査において、フルメキンを投与した 2 及び 4 群に空胞を伴った小葉中心性肝細胞肥大がみられ、また軽度な細胞浸潤がみられた。PB を投与した 3 及び 5 群では、小葉中心性肝細胞肥大のみがみられた。また、2 及び 4 群の BrdU 標識率は、1 及び 6 群よりも有意に高かった。

cDNA マイクロアレイ分析において、2 及び 4 群を比較したところ、フルメキンの投与に影響された代表的な遺伝子の機能は、アポトーシスの誘導 (*Tnf* 及び *Jun*)、細胞周期の進行 (*Ccnd1*、*Ccne1*、*Cdk1*、*Jun* 及び *Fos*)、サイトカイン (*Tnf*、*Il1b* 及び *Ccl*)、DNA 修復 (*Rad51*、*Rad18* 及び *Exo1*) 及び薬物代謝 (*Cyp1a1*、*Cyp2b10*、*Cyp7b1* 及び *Ugt2b1*) に関するものであった。

フルメキンの投与による細胞周期関連遺伝子の mRNA の発現量の増加に即して、BrdU 標識率の増加もみられた。また、病理組織学的に明らかな肝傷害に加えて、サイトカイン遺伝子の mRNA 量も増加していた。サイトカインは、肝細胞傷害の際にクッパー細胞から放出されることが知られている。

これらのことから、著者はフルメキンの投与による細胞増殖活性の亢進は代償性の再生反応によるものと考えた。(参照 18)

⑤ 肝腫瘍の発現機序に関する考察

マウスを用いた発がん性試験 [II. 6. (2)] において、肝腫瘍がみられた。また、肝腫瘍の発現機序を解明するため実施されたマウスを用いた複数の二段階肝発がん性試験において、肝臓に腫瘍性変化がみられた。

しかしながら、フルメキンの遺伝毒性 [II. 3.] については、*in vivo* のコメットアッセイでは肝臓で陽性の結果が得られているものの、その他の多くの試験では陰性の結果であり、*gpt delta* マウスを用いた二つの *in vivo* の遺伝子突然変異試験でもいずれも肝臓で陰性であったことから、フルメキンに生体にとって特段問題となる遺伝毒性はないと考えられた。

これらの *gpt delta* マウスを用いた試験の一つ [II. 6. (5) ②] では、HPLC によっ

て測定したフルメキン投与群の 8-OHdG 量は増加せず、BrdU 陽性細胞が増加していた。(参照 17) もう一つの試験 [II. 6. (5) ④] では、フルメキン投与によって、病理組織学的に明らかな肝傷害に加えて、細胞周期関連遺伝子の mRNA の発現量の増加及びサイトカイン遺伝子の mRNA 量の増加がみられた。(参照 18)

以上のことから、食品安全委員会は、フルメキンの肝腫瘍の発現機序は、細胞増殖の活性化を伴う慢性的な肝傷害が関連していると考えた。

7. 生殖発生毒性試験

(1) 生殖毒性試験 (ラット)

ラット (SD 系) を用いて生殖毒性試験が実施された。雄 (体重 140~160 g、11 又は 12 匹/群) には、交配 80 日前から交配期間を通じてフルメキンを強制経口投与 (0、100、200、400 又は 800 mg/kg 体重/日) した。雌 (体重 150~215 g、20 又は 21 匹/群) には、交配 21 日前から交配、妊娠及び授乳期間を通じてフルメキンを強制経口投与した。

各群の雌の投与量及び投与期間を表 30 に示した。

表 30 フルメキンの生殖毒性試験における雌ラットに対する投与量及び投与期間

群	投与量 (mg/kg 体重/日)	投与期間量
1	0	対照群
2	800	(投与 2 週に 21 例中 19 例が死亡)
3	400	400 mg/kg 体重/日投与群の雄と交配。交配後は妊娠及び授乳期間を通じて 200 mg/kg 体重を 2 回/日投与。
4	200	200 mg/kg 体重/日投与群の雄と交配。交配後は妊娠及び授乳期間を通じて 100 mg/kg 体重を 2 回/日投与。
5	100	200 mg/kg 体重/日投与群の雄と交配。交配後は妊娠及び授乳期間を通じて 50 mg/kg 体重を 2 回/日投与。
6	0	対照群。800 mg/kg 体重/日投与群の雄と交配。
7	200	400 mg/kg 体重/日投与群の雄と交配。妊娠 15 日に投与を中止。
8	100	200 mg/kg 体重/日投与群の雄と交配。妊娠 15 日に投与を中止。

2 群では、雌ラットは投与 1 週目に 4 例が、投与 2 週目に 15 例が死亡した。平均体重は対照群に比べて有意に低かった。毒性徴候として、脱毛、衰弱及び呼吸抑制が顕著であった。3 群では、雌ラットは対照群と比較して、体重の有意な低値、妊娠期間の延長、同腹児数の減少及び死亡児数の増加がみられた。4 群の雌でも、妊娠率、妊娠期間、同腹児数及び生存児数は 3 群と同様の傾向であったが、統計学的な有意差はみられなかった。3 及び 4 群の出生児体重は対照群に比較して有意な低下がみられた。5、6、7 及び 8 群の雌に生殖パラメーターの有意な変化はみられなかった。しかし、妊娠期間及び授乳期間を通じてフルメキンを投与された母動物から出生した児動

物では、出生時及び離乳時における平均体重の有意な低下がみられた。

JECFA は、フルメキンの全投与群の児動物の体重が対照群と比較して低値を示したことから、NOEL を設定できなかった。(参照 8、9)

食品安全委員会は、400 mg/kg 体重/日投与群の母動物において対照群と比較して、有意な母動物の体重の低下、妊娠期間の延長、同腹児数の減少がみられ、200 mg/kg 体重/日投与群 (4 群) でも同様の傾向がみられたことから、本試験における母動物の NOAEL を 100 mg/kg 体重/日と判断した。児動物については、全投与群の児動物に体重の低下がみられたことから、NOAEL は設定できないと判断した。

(2) 発生毒性試験 (マウス) ①

妊娠マウス (CD-1 系、18 又は 22 匹/群) の妊娠 6~15 日にフルメキンを強制経口投与 (0、50、100、200 又は 400 mg/kg 体重/日) し、発生毒性試験が実施された。妊娠 17 日に卵巣、子宮及び子宮内容物を調べた。

母動物では、体重が 200 mg/kg 体重/日以上投与群で妊娠 12 日以降、妊娠期間を通じて有意に低下した。生存胎児数及び吸収胚・胎児数は、いずれの投与群においても有意差はみられなかった。

胎児では、400 mg/kg 体重/日投与群で、胎児体重の僅かな低下がみられたが、対照群と比較して有意ではなかった。肉眼検査で、口蓋裂が 400 mg/kg 体重/日投与群の 3% (227 例中 6 例) にみられた。胎児 72 例を解剖したところ、9 例 (13%) に口蓋裂がみられ、このうち 4 例は肉眼検査でも検出された。50 及び 100 mg/kg 体重/日投与群では、口蓋裂を有する胎児は各 1 例であったが、200 mg/kg 体重/日投与群ではみられなかった。胸骨分節及び頭蓋骨の骨化遅延は、対照群を含む全群の多くの胎児で顕著であった。この骨化遅延は、通常、帝王切開を行う妊娠 18 日より早く胎児を検査したことによるものと考えられた。

JECFA は、本試験における NOEL を本試験の最高用量である 400 mg/kg 体重/日と判断した。

EMA は、本試験における NOEL を 100 mg/kg 体重/日と判断した。(参照 4、5、8、9)

食品安全委員会は、200 mg/kg 体重/日以上投与群の母動物において有意な体重の低下がみられたことから、本試験における母動物の NOAEL は 100 mg/kg 体重/日と判断した。胎児については、400 mg/kg 体重/日群の胎児に胎児体重の低下傾向がみられたことから、本試験における胎児の NOAEL は 200 mg/kg 体重/日と判断した。また、催奇形性はみられなかった。

(3) 発生毒性試験 (マウス) ②

妊娠マウス (OFI-IOPS 系、32 又は 35 匹/群) の妊娠 2~15 日にフルメキンを強制経口投与 (0、100、200 又は 400 mg/kg 体重/日) し、発生毒性試験が実施された。

200 mg/kg 体重/日以上投与群で、骨化遅延、陥入した気管、腎盂拡張及び口蓋裂が観察された。これらの所見は、フルメキンの投与に起因した催奇形性ではなく胎児毒性と考えられた。

JECFA は、本試験における NOEL を 100 mg/kg 体重/日と判断した。(参照 8、9)
食品安全委員会は、200 mg/kg 体重/日以上投与群の胎児に胎児毒性がみられていることから、本試験における胎児の NOAEL を 100 mg/kg 体重/日と判断した。また、催奇形性はみられなかった。

(4) 発生毒性試験 (ラット)

妊娠ラット (COBS 系、23 又は 27 匹/群) の妊娠 6~15 日にフルメキンを強制経口投与 (0、100、200 又は 400 mg/kg 体重/日) し、発生毒性試験が実施された。妊娠 20 日に、卵巣及び子宮内容物を調べた。

母動物では、用量相関的な体重の低下がみられ、400 mg/kg 体重/日投与群では対照群と有意差がみられた。

胎児では、200 mg/kg 体重/日以上投与群の体重が対照群と比較して有意に低かった。200 mg/kg 体重/日以上投与群では、胸骨分骨、椎骨及び頭蓋骨の骨化遅延も顕著であった。投与に起因した内臓又は骨格異常はみられなかった。

JECFA は、本試験における NOEL を 100 mg/kg 体重/日と判断した。

EMA は、本試験における NOEL を 100 mg/kg 体重/日と判断した。(参照 4、5、8、9)

食品安全委員会は、各投与群の母動物において用量相関的な体重の低下がみられたが、各投与群における体重の低下の程度は不明であることから、国際機関の評価を支持し、本試験における母動物に対する NOAEL を 100 mg/kg 体重/日と判断した。胎児については、200 mg/kg 体重/日以上投与群の胎児に、対照群と比較して有意な体重の低下がみられたことから、本試験における胎児の NOAEL は 100 mg/kg 体重/日と判断した。また、催奇形性はみられなかった。

(5) 発生毒性試験 (ウサギ)

妊娠ウサギ (NZW 種、15 又は 21 匹/群) の妊娠 6~18 日にフルメキンを強制経口投与 (0、100、200 又は 400 mg/kg 体重/日) し、発生毒性試験が実施された。妊娠 29 日に子宮内を調べた。生存胎児については、胎児体重、性別、並びに内部及び外部異常を調べた。

200 mg/kg 体重/日以上投与群において、母動物及び胎児の体重の軽微な減少がみられたが、対照群と比較して有意ではなかった。

児動物の骨格検査の結果、いずれの投与群においても骨化遅延はみられなかった。本試験において、投与に起因する胎児毒性はみられなかった。

JECFA は、本試験における NOEL を本試験の最高用量である 400 mg/kg 体重/日と判断した。(参照 4、5、8、9)

食品安全委員会は、全投与群の胎児に投与に起因する毒性徴候がみられなかったことから、本試験における胎児の NOAEL を 400 mg/kg 体重/日と判断した。

8. 微生物学的影響に関する試験

(1) ヒト腸内細菌叢分離菌に対する最小発育阻止濃度 (MIC) ①

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影響についての調査」において、ヒト腸内細菌叢分離菌に対するフルメキンの最小発育阻止濃度 (MIC) が調べられている (表 31)。

表 31 フルメキンのヒト腸内細菌叢分離菌に対する MIC

菌名	株数	MIC (µg/mL)	
		MIC ₅₀	範囲
<i>Escherichia coli</i>	30	0.5	0.5~8
<i>Enterococcus</i> spp.	30	>128	>128
<i>Bacteroides</i> spp.	30	128	32~128
<i>Fusobacterium</i> spp.	20	64	32~64
<i>Bifidobacterium</i> spp.	30	>128	>128
<i>Eubacterium</i> spp.	20	>128	32~>128
<i>Clostridium</i> spp.	30	>128	>128
<i>Peptococcus</i> sp./ <i>Peptostreptococcus</i> spp.	30	16	4~128
<i>Prevotella</i> spp.	20	32	32~64
<i>Lactobacillus</i> spp.	30	>128	128~>128
<i>Propionibacterium</i> spp.	30	>128	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 *E. coli* の 0.5 µg/mL であった。本調査の結果から、MIC_{calc}¹⁷ は 1.94 µg/mL (0.00194 mg/mL) と算出された。(参照 25)

(2) ヒト腸内細菌叢分離菌に対する MIC②

健康なヒトボランティアの糞便から分離された 100 菌株 (ヒト腸内細菌叢の 10 種の好気性及び嫌気性菌の 10 菌株) について、嫌気性及び好気性下で寒天を用いた連続希釈法により、MIC₅₀、MIC₉₀ 及び MIC₅₀ の幾何平均が調べられた (表 32)。

¹⁷ 試験薬がその菌に対して活性を有する属の平均 MIC₅₀ の 90% 信頼限界の下限值

表 32 ヒト腸内細菌叢分離菌のフルメキンに対する MIC

菌名	MIC (µg/mL)			
	範囲	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀ の幾何平均
<i>Escherichia coli</i> (好気性)	0.25~0.50	0.33	0.48	0.47
<i>E. coli</i> (嫌気性)	0.25~0.50	0.33	0.48	0.47
<i>Streptococcus</i> spp.	16~>32	>32	>32	>32
<i>Proteus</i> spp.	>32	>32	>32	>32
<i>Lactobacillus</i> spp.	>32	>32	>32	>32
<i>Bifidobacterium</i> spp.	>32	>32	>32	>32
<i>Bacteroides fragilis</i>	16~>32	>32	>32	>32
<i>Eubacterium</i> spp.	>32	>32	>32	>32
<i>Clostridium</i> spp.	0.50~2.0	0.95	1.70	1.32
<i>Fusobacterium</i> spp.	1.0~32	1.0	5.1	3.25
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	>32	>32	>32	>32

E. coli が最も感受性が高く、10 菌株に対する MIC₅₀ は 0.33 µg/mL であった。ヒトの腸から分離され、最も感受性の高かった *Clostridium* spp. 及び *Fusobacterium* spp. に対する MIC₅₀ は、それぞれ 0.95 及び 1.0 µg/mL であった。(参照 5、13、21)

(3) ヒト腸内細菌叢分離株に対する MIC (7-ヒドロキシフルメキン)

上記試験と同様の条件下で *E. coli*、*Clostridium* spp. 及び *Fusobacterium* spp. 各 10 菌株に対する 7-ヒドロキシフルメキンの MIC を測定した。*E. coli* はフルメキンよりも 7-ヒドロキシフルメキンに対して感受性が低く、7-ヒドロキシフルメキン濃度が 2 µg/mL では発育の阻止がみられなかったが、4 µg/mL では発育が 100% 阻止された。*Clostridium* spp. 及び *Fusobacterium* spp. は、測定した最高濃度 (16 µg/mL) でも感受性を示さなかった。ヒト腸内細菌叢に対する 7-ヒドロキシフルメキンの活性は、フルメキンに比較すると僅かであった。(参照 5、13、21)

(4) ヒト腸内細菌叢の利用分画

腸内細菌叢に対するフルメキンの利用分画を調べるために、健康なヒトボランティア (性別不明、5 名) に ¹⁴C 標識フルメキンを経口投与 (830 mg/ヒト) し、投与 5 日後まで、尿及び糞中の放射活性を測定した。

排泄物からは合計 84% (76~92%) の放射活性が回収され、糞便で 9% (5.7~13%)、尿では 75% (70~81%) であった。その結果、フルメキンの投与量の約 10% がヒト腸内細菌叢で利用可能であると結論付けられた。(参照 5、21)

9. ヒトにおける知見

EMA 評価書では、フルメキンは、ヒト用医薬品として 1,200 mg/ヒト/日の用量で 1

日 3 回に分けて投与されること、また医薬品の安全性監視試験（治療に用いられた 40,722,119 錠について）が 1984～1993 年に実施され、アレルギー、消化管に対する影響、神経学的影響及び知覚神経への影響といった副作用が報告されている¹⁸。（参照 4、5）

10. 一般薬理試験

(1) ヘキソバルビタール性睡眠時間に対する影響

フルメキンの 14 日間投与（100 mg/kg 体重/日、投与経路不明）による前処置をしたラットでは、ヘキソバルビタール性睡眠時間が著しく短縮された。このことから、これらの試験条件下では、フルメキンの投与によりラットにおいて、薬物代謝酵素が誘導される可能性が示唆された。（参照 8）

11. その他の毒性試験

(1) 関節への影響に関する試験（イヌ、若齢）

イヌ（ビーグル種、3 か月齢、雌雄各 10 匹/群）にフルメキンを 13 週間強制経口投与（0、15、30、60 又は 150 mg/kg 体重/日、錠剤で投与）し、関節への影響に関する試験が実施された。定期的に血漿中のフルメキン及び 7-ヒドロキシフルメキンを HPLC により測定し、フルメキンの吸収について調べた。一般状態の観察は毎日実施し、跛行及び運動性に特に注意を払った。体重は毎週測定した。試験期間中に血清中 ALP を 3 回測定した。投与開始 3 週後に各群 4 匹を、残りは 13 週後に剖検し、前後肢の体重を支える関節の表面の異常及び変化を検査した。肩及び股関節の病理組織学的検査を実施した。

死亡例はみられなかった。

一般状態では、用量相関的に頻度を増す嘔吐、摂餌量の減少等の有害反応の徴候のみが観察された。失調性歩行及び運動性の低下といった関節障害の臨床徴候はみられなかった。

150 mg/kg 体重/日投与群の雌で顕著な体重の増加抑制がみられた。

血液生化学的検査では、血清中 ALP に変化はなかった。

150 mg/kg 体重/日投与群では、投与 3 週後には雌雄各 2 例に滑膜の限局性過形成及び関節の病変（このうち 2 例には、軟骨の空洞）がみられた。投与 13 週後には、雌 1 例に肉眼所見の関節病変（肩部の関節にびらん）、雌 2 例に組織学的所見の関節病変（軟骨の軽度のびらん）及び雄 1 例に滑膜の過形成がみられた。

60 mg/kg 体重/日投与群では、投与 3 週後には、組織学的所見として雄 1 例の股関節の軟骨にびらんがみられた。

30 mg/kg 体重/日投与群では、投与 3 週及び 13 週後においても肉眼的及び組織学的所見はみられなかった。

15 mg/kg 体重/日投与群では、投与 13 週後の雌 1 例の股関節に肉眼所見としてびらんがみられたが、この病変には組織学的変化はみられなかった。

¹⁸ 平成 29 年 6 月時点で、EMA でヒト用医薬品の承認はない。

JECFA は、15 mg/kg 体重/日投与群の雌 1 例の股関節でみられた肉眼所見のびらんは、毒性学的に意味があるものと考えなかったことから、幼若イヌにおける関節傷害の誘発に関する NOEL を 30 mg/kg 体重/日と判断した。

EMEA は、15 mg/kg 体重/日投与群の雌 1 例の股関節でみられた肉眼所見は毒性学的な意義はないと考えたことから、若齢イヌにおける関節傷害の誘発に関する NOEL を 30 mg/kg 体重/日と判断した。(参照 5、13、21)

食品安全委員会は、15 mg/kg 体重/日投与群の雌 1 例の股関節でみられた肉眼所見のびらんは偶発的なものであり、60 mg/kg 体重/日投与群の雄 1 例に股関節の軟骨のびらんがみられていることから、本試験における NOAEL を 30 mg/kg 体重/日と判断した。

Ⅲ. 国際機関等の評価

1. JECFA における評価

第 48 回会議（1997 年）において、フルメキンが遺伝毒性を有するというエビデンスはないとし、マウスの肝臓にみられた腫瘍の発生は肝毒性に起因する肝細胞の壊死及び再生によるものと考えられた。したがって、マウスの 13 週間亜急性毒性試験における肝毒性に対する NOEL 25 mg/kg 体重/日は、フルメキンの肝毒性及び関連する発がん性に対する閾値と考えられた。

微生物学的 ADI は、以下の式によって 37 µg/kg 体重/日と算出された。

$$\text{微生物学的 ADI} = \frac{1^a \times 220^b}{0.1^c \times 1^d \times 60^e} = 37 \mu\text{g/kg 体重/日}$$

- a : 腸内の優勢菌種のうち最も感受性が高かった *Fusobacterium* 及び *Clostridium* の MIC₅₀ (µg/g)
- b : 結腸内容物 (g)
- c : 腸内細菌叢が利用可能な経口用量の分画（ヒトへ ¹⁴C 標識フルメキンを経口投与(830 mg)した試験において糞便からの回収率が 9%であったことから、経口用量の約 10%が腸内細菌叢に利用可能と判断した。）
- d : 適切で十分な微生物学的データが得られていることから、安全係数として「1」を適用
- e : ヒト体重(kg)

フルメキンの ADI の設定においては、フルオロキノロンに対して *E. coli* は通常非常に感受性が高いが、腸内細菌叢の中ではマイナーな細菌種であり、腸内で優勢な偏性嫌気性菌はフルオロキノロンに比較的感受性が低いことから、フルメキンによるヒト腸内細菌叢の乱れは生じそうにないと考えられた。このことから、毒性学的 ADI を採用することが適切であると考え、マウスを用いた 13 週間亜急性毒性試験における肝毒性を根拠とした NOEL 25 mg/kg 体重/日に、安全係数 1,000（試験期間が短く、変異肝細胞巢の組織化学的特性の情報が欠如しているため）を適用し、ADI として 0~30 µg/kg 体重/日が設定された。（参照 13、21）

第 60 回会議（2003 年）では、第 48 回会議以降に入手した腫瘍発生に関するマウスの試験について評価した。遺伝毒性については、*in vitro* 及び *in vivo* のバッテリー試験の結果からは遺伝毒性を有しないと考えられるが、新しく得られた試験では、壊死は認められないものの、好塩基性病巣及びコメットアッセイでの DNA 鎖の損傷が認められたことから、フルメキンがマウスの肝臓に対して遺伝毒性的影響を含む発現機序によって腫瘍を誘発させる可能性を否定することができなかつたため、第 48 回会議で設定された ADI が一旦取り消された。（参照 2）

第 62 回会議（2004 年）では、第 60 回会議で評価したマウスの短期間毒性試験（二段階肝発がん性試験）を再評価した。これらの試験では、フルメキンによって肝臓に好塩基性病巣がみられたことから、フルメキンの腫瘍イニシエーションの可能性が示唆されたが、同時に肝毒性（染色性が低く、空胞を伴い脂肪滴を含む肝細胞、炎症性細胞の浸潤、有糸分裂及び/又は壊死の増加）がみられ、これらの毒性影響に対する再生反応及

び酸化ストレス指標の増加もみられたことに留意した。

遺伝毒性については、第 42 回会議で評価した試験結果は陰性であった。第 60 回会議で評価した *in vivo* のコメットアッセイの結果からフルメキンの遺伝毒性が示唆されたが、コメットアッセイには限界があり、肝臓の結果は限定的 (*marginal*) であったことに留意した。また、*in vivo* の不定期 DNA 合成試験 (ラットの肝臓) で陰性であったことから、フルメキンは肝臓の DNA に直接的に作用しないと考えられた。

これらのことから、マウスの肝臓における腫瘍形成は非遺伝毒性発現機序に基づくものであり、閾値が設定できると結論付け、第 48 回会議で設定された ADI 0~30 µg/kg 体重/日が再び設定された。(参照 3)

2. EMEA における評価

1996 年に以下のように評価した。

遺伝毒性については、*in vitro* の *S. typhimurium* TA98、TA100、TA1515、TA1537 及び TA1538 を用いた復帰突然変異試験、マウスリンパ腫細胞 (L5178Y、*hprt* 座位) を用いた遺伝子突然変異試験、CHO 細胞を用いた遺伝子突然変異試験並びに *in vivo* のラット骨髄細胞を用いた染色体異常試験において陰性結果が得られていることから、フルメキンに遺伝毒性はないと考えた。

フルメキンは、ラットに対して発がん性を示さず、CD-1 系マウスに自然発生する肝腫瘍の頻度を肝毒性に関連した発現機序によって増加させると考えられた。マウスの 13 週間亜急性毒性試験の NOEL (25 mg/kg 体重/日) に、安全係数 100 に追加の 10 (腫瘍の発現機序が完全に解明されていないため) の 1,000 を適用し、毒性学的 ADI として 0.025 mg/kg 体重/日 (1.5 mg/ヒト/日) が設定された。

微生物学的 ADI については、CVMP の式を用いて以下のとおり算出し、8.25 µg/kg 体重/日と設定された。

$$\text{微生物学的 ADI} = \frac{\frac{0.33^a \times 1^b}{1^c} \times 150^d}{0.1^e \times 60^f} = 8.25 \text{ } \mu\text{g/kg 体重/日} = 495 \text{ } \mu\text{g/ヒト/日}$$

a : 最も感受性の高い菌である *E. coli* の MIC₅₀ (µg/mL)

b : *in vitro* と *in vivo* 間の条件の違いの補正のため及び MIC に対する菌液濃度の影響を考慮した係数を MIC₅₀ に乗じるが、接種菌液濃度 (10⁷ 又は 10⁹ 菌/mL) により MIC が大きく変わることはないことから、「1」を適用

c : 最も感受性の高い菌の MIC₅₀ を用いていることから、「1」を適用

d : 1 日当たりの糞便量 (g)

e : 腸内細菌叢が利用可能な経口用量の分画 (ヒトのデータから、「0.1」とした。)

f : ヒト体重 (kg)

微生物学的 ADI が毒性学的 ADI より小さいことから、フルメキンの ADI は 8.25 µg/kg 体重/日と設定された。(参照 4、5)

IV. 食品健康影響評価

ラット、イヌ及び牛にフルメキンを経口投与した後の血漿中濃度は投与 0.5~4 時間後に C_{max} に達した。体内に吸収されたフルメキンは、7-ヒドロキシフルメキン又は代謝物 M1 に代謝されると考えられた。主な排泄は、ラット及び牛では尿であり、イヌでは糞であった。

フルメキンを経口投与したヒトの排泄物からの回収率は、糞便では投与量の 9%、尿では 75%であった。

牛及び豚の残留試験では、フルメキンは分析した臓器等のうち腎臓に比較的長く残留したが、最終投与 96 時間後には定量限界近くまで濃度は低下した。鶏では、最終投与 72 時間後の筋肉にフルメキンの残留がみられたが、定量限界近くの濃度であった。乳汁では、最終投与 48 時間後にごく低濃度検出された。

遺伝毒性試験において、*in vivo* のコメットアッセイでは肝臓で陽性の結果が得られたが、*gpt delta* マウスを用いた 2 つの遺伝子突然変異試験が肝臓で陰性であり、DNA 損傷はその後修復され突然変異に至らないと推察されたことから、フルメキンに生体にとって特段問題となる遺伝毒性はないと考えられた。

マウスにおいて肝臓の腫瘍形成がみられたが、フルメキンに生体にとって特段問題となる遺伝毒性はないことから、遺伝毒性発現機序によるものではないと推察した。*gpt delta* マウスを用いた試験の 1 つでは、フルメキン投与群の 8-OHdG 量は増加せず、BrdU 陽性細胞が増殖していた。もう 1 つの試験では、フルメキン投与によって、病理組織学的に明らかな肝傷害に加えて、細胞周期関連遺伝子の mRNA の発現量の増加及びサイトカイン遺伝子の mRNA 量の増加が認められた。

以上のことから、フルメキンの肝腫瘍の発現機序は、細胞増殖の活性化を伴う慢性的な肝傷害が関連していると考え、ADI を設定することは可能と判断した。

各種毒性試験で認められた影響は、主に肝毒性（マウス）及び関節傷害（イヌ）であった。

生殖発生毒性試験では、児動物及び胎児に認められた主な影響は、体重の低下であった。催奇形性はみられなかった。

1. 毒性学的 ADI について

各種毒性試験で得られた NOAEL 又は LOAEL の最小値は、マウスを用いた 13 週間亜急性毒性試験で得られた NOAEL 25 mg/kg 体重/日であり、毒性学的 ADI は、この NOAEL に安全係数として 100 を適用し、0.25 mg/kg 体重/日と設定することが適当と判断した。

2. 微生物学的 ADI について

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」から得られた $MIC_{calc} 0.00194 \text{ mg/mL}$ を用いて、VICH の算出式により、微生物学的 ADI を 0.071 mg/kg 体重/日 と算出した。

$$\text{微生物学的 ADI} = \frac{0.00194^a \times 220^b}{0.1^c \times 60^d} = 0.071 \text{ mg/kg 体重/日}$$

a : 試験薬がその菌に対して活性を有する属の平均 MIC₅₀ の 90 %信頼限界の下限值

b : 結腸内容物(g)

c : 微生物が利用可能な経口用量の分画(ヒトの経口投与試験の結果から「0.1」を適用した。)

d : ヒトの体重(kg)

3. ADI の設定について

微生物学的 ADI が、毒性学的 ADI よりも小さいことから、フルメキンの ADI として、0.071 mg/kg 体重/日と設定することが適当であると判断した。

以上から、フルメキ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。

$$\text{ADI} \quad 0.071 \text{ mg/kg 体重/日}$$

ばく露量については、当該評価結果を踏まえ暫定基準値の見直しを行う際に確認することとする。

表 33 JECFA、EMEA 及び食品安全委員会における各種試験の無毒性量等の比較

動物種	試験	投与量 (mg/kg 体重/日)	無毒性量等(mg/kg 体重/日)		
			JECFA	EMEA	食品安全委員会
マウス	13 週間亜急性毒性	雄：0、25、50、100、400、800 雌：0、100、400、800 (混餌投与)	25 肝毒性	25	25 肝細胞変性
	18 か月間発がん性①	0、400、800 (混餌投与)	— 肝腫瘍発生	— 肝腫瘍発生	— 肝腫瘍発生
	発生毒性①	0、50、100、200、400 (強制経口投与)	400 影響なし	100 骨化遅延 催奇形性なし	母動物：100 胎児：200 母動物：体重低下 胎児：体重低下傾向 催奇形性なし
	発生毒性②	0、100、200、400 (強制経口投与)	100 胎児：口蓋裂、骨化遅延	/	胎児：100 胎児：骨化遅延及び口蓋裂 催奇形性なし
ラット	90 日間亜急性毒性	0、200、400、800 (強制経口投与)	— 肝臓の相対重量の増加	— 肝臓の相対重量の増加	LOAEL：200 脱毛、尿失禁、肝臓の相対重量の増加
	2 年間慢性毒性及び発がん性	0、200、400、800 (混餌投与)	200 精子形成不全、臓器重量変化及び肝細胞腫大 発がん性なし	— 発がん性なし	— 体重及び摂餌量の低下、発がん性なし
	生殖毒性	0、100、200、400、800 (強制経口投与)	— 母動物：生殖能力への影響なし 児動物：体重低下	/	母動物：100 児動物：— 母動物：体重低下、妊娠期間の延長及び同腹児数の減少 児動物：体重低下
	発生毒性	0、100、200、400 (強制経口投与)	100 胎児：体重低下及び骨化遅延	100 骨化遅延 催奇形性なし	母動物：100 胎児：100 母動物：用量相関的な体重低下 胎児：体重低下、骨化遅延 催奇形性なし

ウサギ	発生毒性	0、100、200、400 (強制経口投与)	400 胎児毒性なし 催奇形性なし	— 催奇形性なし	400 胎児：影響なし
イヌ	90日間亜急性毒性	0、50、100、200 (経口投与)	—	—	200 影響なし
	1年間慢性	0、50、100、200 (経口投与)	50 神経学的毒性	50	— 痙攣
	関節への影響	0、15、30、60、150 (経口投与)	30 関節傷害	30 関節傷害	30 関節傷害
毒性学的 ADI (mg/kg 体重/日)			0.03 NOEL : 25 安全係数 : 1,000	0.025 NOEL : 25 安全係数 : 1,000	0.25 NOAEL : 25 安全係数 : 100
毒性学的 ADI の設定根拠			13 週間亜急性毒性試験 (マウス)	13 週間亜急性毒性試験 (マウス)	13 週間亜急性毒性試験(マウス)
微生物学的 ADI (mg/kg 体重/日)			0.037	0.00825	0.071
微生物学的 ADI の設定根拠			ヒト腸内細菌叢分離菌から得られた MIC ₅₀ : 1 µg/mL	ヒト腸内細菌叢分離菌から得られた MIC ₅₀ : 0.33 µg/mL	ヒト腸内細菌叢分離菌から得られた MIC _{calc} : 1.94 µg/mL
ADI (mg/kg 体重/日)			0.03	0.00825	0.071

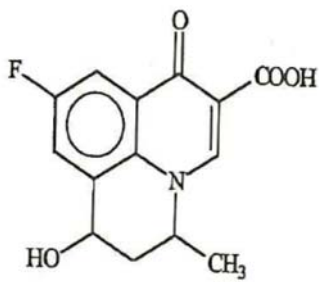
—：無毒性量等の記載なし

〈別紙 1：検査値等略称〉

略称等	名称
ADI	一日摂取許容量
ALP	アルカリホスファターゼ
ALT	アラニンアミノトランスフェラーゼ [=グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ (GPT)]
AST	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ [=グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT)]
AUC	薬物濃度曲線下面積
BrdU	5-ブロモ-2'-デオキシウリジン
CVMP	欧州動物用医薬品委員会
CYP	チトクローム P450
C _{max}	血 (漿) 中最高濃度
DEN	N, N'-ジエチルニトロソアミン
DMF	ジメチルホルムアミド
DMN	ジメチルニトロソアミン
EM(E)A	欧州医薬品審査庁
F	バイオアベイラビリティ
GST	グルタチオン S-トランスフェラーゼ
HPLC	高速液体クロマトグラフィー
JECFA	FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議
LD ₅₀	半数致死量
LDH	乳酸脱水素酵素
LOAEL	最小毒性量
MeIQx	2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline
MIC	最小発育阻止濃度
MIC ₅₀	50%最小発育阻止濃度
MIC ₉₀	90%最小発育阻止濃度
MRT	平均滞留時間
NOAEL	無毒性量
NOEL	最大無作用量
PCNA	増殖細胞核抗原
PB	フェノバルビタール
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
T _{max}	最高濃度到達時間
T _{1/2}	消失半減期
TP	総タンパク質
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

8-OHdG	8-ヒドロキシデオキシグアノシン
--------	------------------

〈別紙 2 : 代謝物名称〉

代謝物名称	構造式
7-ヒドロキシフルメキン	 <p>(参照 10)</p>

〈参照〉

1. The Merck Index, 15th Edition, 2004
2. JECFA: Flumequine, Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. WHO Food Additives Series 51, 2003
3. JECFA: Flumequine, Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. WHO Food Additives Series 53, 2004
4. EMEA (Committee for Veterinary Medicinal Products): Flumequine, Summary Report (1), 1996
5. EMEA (Committee for Veterinary Medicinal Products): Flumequine, Summary Report (2), 1999
6. EMEA (Committee for Veterinary Medicinal Products): Flumequine, Summary Report (3), 1999
7. 食品、添加物等の規格基準（昭和 34 年厚生省告示第 370 号）の一部を改正する件（平成 17 年 11 月 29 日付け、厚生労働省告示第 499 号）
8. JECFA: Flumequine, Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. WHO Food Additives Series 33, 1994
9. JECFA : Flumequine, Evaluation of certain veterinary drug residues in food. WHO Technical Report Series No.851, 1995
10. JECFA: Flumequine, Residues of some veterinary drugs in animals and foods. FAO Food and Nutrition Paper 41/10, 1998
11. JECFA: Flumequine, Residues of some veterinary drugs in animals and foods. FAO Food and Nutrition Paper 41/15, 2003
12. JECFA: Flumequine, Evaluation of certain veterinary drug residues in food. WHO Technical Report Series No.918, 2003
13. JECFA : Flumequine, Evaluation of certain veterinary drug residues in food . WHO Technical Report Series No.879, 1998
14. JECFA: Flumequine, Residues of some veterinary drugs in animals and foods. FAO Food and Nutrition Paper 41/13, 2000
15. JECFA: Flumequine, Evaluation of certain veterinary drug residues in food. WHO Technical Report Series No.900, 2001
16. Kashida Y, Sasaki F, Yu, Ohsawa K, Yokohama N, Takahashi A, Watanabe T et al.: Mechanistic study on flumequine hepatocarcinogenicity focusing on DNA damage in mice. *Toxicol Sci* 2002; 69(2): 317-321
17. Kuroiwa Y, Umemura T, Nishikawa A, Kanki K, Ishii Y, Kodama Y, et al.:Lack of in vivo mutagenicity and oxidative DNA damage by flumequine in the livers of *gpt* delta mice. *Arch Toxicol* 2007; 81(1): 63-69
18. Kuroda K, Kijima A, Ishii Y, Takasu S, Jin M, Matsushita K et al.: Flumequine enhances the in vivo mutagenicity of MeIQx in the mouse liver. *Arch Toxicol* 2013; 87: 1609-1619
19. 食品安全委員会：動物用医薬品評価書「マルボフロキサシンに係る食品健康影響評価

- について」 2007年8月
20. 食品安全委員会：動物用医薬品評価書「ノルフロキサシン」 2014年1月
 21. JECFA：Flumequine, Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food, WHO Food Additives Series 39, 1997
 22. Takizawa T, Mitsumori K, Takagi H, Onodera H, Yasuhara K, Tamura T et al.: Modifying effects of flumequine on dimethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in heterozygous *p53* deficient CBA mice. *J Toxicol Pathol* 2001; 14(2): 135-143
 23. Yoshida M., Miyajima K., Shiraki K., Ando J., Kudoh K., Nakae D., et al.:Hepatotoxicity and consequently increased cell proliferation are associated with flumequine hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett* 1999; 141: 99-107
 24. Kashida Y, Takahashi A, Moto M, Okamura M, Muguruma M, Jin M, et al. Gene expression analysis in mice liver on hepatocarcinogenesis by flumequine. *Arch Toxicol* 2006; 80(8): 533-539
 25. 食品安全委員会：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についての調査」報告書