

No. 15 バクイロプリム

ポジティブリスト制度施行に伴う
暫定基準の設定された農薬、動物用医薬品
及び飼料添加物に係る食品健康影響評価
に関する調査

調査報告書

平成25年1月

(株) 東レリサーチセンター

目 次

ページ

1. 調査の概要	1
2. 作業内容	1
2. 1 専門家を選定等.....	1
2. 2 翻訳	2
2. 3 評価書の情報の整理	3
3. 調査期間	3
4. 調査結果	3

1. 調査の概要

ポジティブリスト制度導入に伴い、食品安全委員会において、海外のリスク評価機関等で実施された評価結果を活用し、順次食品健康影響評価が行われている。

国際的な評価機関である FAO/WHO 合同残留農薬専門家会議（以下「JMPR」という。）及び FAO/WHO 合同添加物専門家会議（以下「JECFA」という。）と最新の評価を行っている欧州食品安全機関（以下「EFSA」という。）、欧州医薬品庁（以下「EMA」という。）の評価書が我が国での評価を行う上で有益性が高いため、今後、評価を行うべき農薬、動物用医薬品及び飼料添加物（以下「農薬等」という。）のうち、JMPR、JECFA、EFSA 及び EMA の評価結果を有しているものについて、それぞれの評価書の翻訳を行うとともに必要な情報を整理し、評価書ごとに毒性試験とその結果の概要を一覧表に取りまとめた。

2. 作業内容

ポジティブリスト制度導入に伴い暫定基準が設定された農薬等のうち、平成24年度に要請される予定の物質のうち表1に示す物質を調査対象とし、JMPR、JECFA、EFSA 及び EMA における評価書の翻訳を行うとともに、必要な情報の整理を行った。

表 1 調査対象の農薬等

No.	物質名	用途
15	バクイロプリム	動物薬・合成抗菌剤

2. 1 専門家の選定等

本調査では、5分野（①動物代謝、②植物代謝及び環境中運命（土壤中、水中、土壌残留）、③毒性（一般毒性、病理、発がん性）、④生殖発生毒性、⑤遺伝毒性）の専門家に、翻訳確認のご協力を頂いた。専門家一覧を表2に示した（五十音順）。

専門家の選定は、食品安全委員会事務局担当官殿の了解のもとに実施した。

表 2 専門家一覧

分野	氏名	所属※
② 植物代謝及び環境運命	上路 雅子	日本植物防疫協会 顧問
① 動物代謝、③ 毒性	宇佐見 誠	国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 薬理部 第4室長
④ 生殖発生毒性	江馬 真	(独)産業技術総合研究所 安全科学研究部門 招聘研究員
① 動物代謝	黒瀬 陽平	北里大学獣医学部 准教授
③ 毒性	三枝 順三	(独)科学技術振興機構 技術参事

⑤ 遺伝毒性	下位 香代子	静岡県立大学 環境科学研究所 教授
① 動物代謝	須藤 まどか	(独)農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所 栄養素代謝研究チーム長
③ 毒性	高木 篤也	国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 室長
④ 生殖発生毒性	高橋 研	(財)残留農薬研究所 毒性部 生殖毒性研究室 主任
② 植物代謝及び 環境運命 ③ 毒性	中田 晴彦	熊本大学大学院 自然科学研究科 准教授
⑤ 遺伝毒性	松元 郷六	(財)残留農薬研究所 毒性部副部長 兼 遺伝毒性研究室長
② 植物代謝及び 環境運命	與語 靖洋	(独)農業環境技術研究所 有機化学物質研究領域 研究コーディネータ

(※平成 25 年 1 月現在)

2. 2 翻訳

JMPR、JECFA、EFSA 及び EMA における評価書の必要部分を原文に忠実に翻訳を行った。調査対象の評価書を表 3 に示した。

翻訳に際しては「食品の安全性に関する用語集（食品安全委員会第 4 版）」等を用いて翻訳し、原文に記載の略称等は英語での正式名称、日本語訳をまとめた表を作成した。

2. 1 に示した専門家には、専門分野に係る試験方法、試験結果等（数値及び単位を含む。）の専門的な表現、記述等について翻訳文の確認を依頼した。

表 3 調査対象の評価書

番号	物質名	評価書タイトル	文書番号 (物質名_発行機関_通し番号)
15	バクイロプリム	Baqueloprim: Summary report (1) - Committee for Veterinary Medicinal Products	バクイロプリム_EMA_01
		Baqueloprim: Summary report (2) - Committee for Veterinary Medicinal Products	バクイロプリム_EMA_02

2. 3 評価書の情報の整理

EMA における評価書の次の①～③の項目について情報の整理を行った。

- ① EMA の評価書について、評価書ごとに見出しを整理し、原文の目次を作成。
- ② 翻訳の見出し部分に原文の該当ページを記載。
- ③ EMA の評価書ごとに毒性試験とその結果の概要を一覧表に取りまとめ。該当する試験がない場合はその旨を記載。

3. 調査期間

平成 24 年 6 月 19 日～平成 25 年 1 月 31 日

4. 調査結果

表 1 に示した物質における評価書（表 3）について「毒性試験とその結果の概要一覧」および「評価書の翻訳文」（以下、「和訳版」）を作成した。その結果を物質ごとに整理して、調査報告書にまとめた。

以上

添 付 資 料

評価書 (受領文書番号) : 2 報

- バクイロプリム _EMA_01
- バクイロプリム _EMA_02

バクイロプリムの毒性試験と結果の概要一覧

(評価書：EMA, BAQUILOPRIM SUMMARY REPORT (1))

試験種類	供試動物等	投与量 (投与期間等)	結果	和訳版 (ページ)	原文 (ページ)
急性毒性 (経口)	-	-	LD50:約 500~1000mg/kg 体重。重要な毒性徴候は、CNS への毒性および肝障害。	1	1
急性毒性 (経口)	ラット	0、6.25、25、 100 mg/kg 体重/日 (6-10 日間)	肝臓細胞へのヘモシテリンの蓄積、炎症および壊死の徴候などの肝毒性が認められた。血漿酵素や他の血液生化学的パラメータにも影響が認められた。	1	1
急性毒性 (経口)	ラット	0、5、20、 80 mg/kg 体重/日 (21 日間)		1	1
急性毒性、亜急性毒性 (経口)	イヌ	予備試験、 10 ~ 20 mg/kg/体重/ 日(2 および 4 週間)			
皮膚感作	モルモット	記載なし。	過敏性徴候	2	2
亜急性毒性 (経口)	ラット	0、4、16、 64 mg/kg 体重/日 (90 日間)	マージナルな NOEL=4 mg/kg 体重 4 mg/kg 体重で、僅かではあるが統計的に有意な臨床化学パラメータの用量依存性の影響あり。	1	1
亜急性毒性 (経口)	イヌ	0、2、5、8 ~ 12.5 mg/kg 体重 (6 ヶ月)	マージナルな NOEL=2 mg/kg 体重 2 mg/kg 体重で肝臓に若干の組織病理学的影響、統計的に有意でないわずかな臨床化学的影響。	1	1
生殖毒性 (2 世代)	ラット	2、5、12 mg/kg 体重/ 日	(中間報告) ・5mg/kg 体重/日以上で母体毒性と生殖への影響 ・2mg/kg 体重/日で僅かな母体毒性	2	2
催奇形性 (経口)	ラット	0、3、10、 30 mg/kg 体重/日	催奇形性影響を生じない=30mg/kg 体重/日以上 胎児毒性影響を生じない=10mg/kg 体重/日	2	2
催奇形性 (経口)	ウサギ	0、3、10、 30 mg/kg 体重/日	・最大用量 30mg/kg 体重での胎児毒性 ・催奇形性の徴候認められず。	2	2
変異原性 (エーム ズ試験)	サルモ ネラ属 菌	記載なし。	非変異原性 陽性反応を示す証拠は認められなかった。	2	2
変異原性 (彷徨変 異試験)	サルモ ネラ属 菌	記載なし。		2	2
変異原性 (彷徨変 異試験)	E. coli	記載なし。		2	2

試験種類	供試動物等	投与量 (投与期間等)	結果	和訳版 (ページ)	原文 (ページ)
変異原性 (HGPRT 試験)	CHO 細胞	記載なし。		2	2
変異原性 (染色体 異常誘発能)	ヒト末梢リンパ球	記載なし。		2	2
変異原性 (小核試験)	マウス	記載なし。		2	2
変異原性 (優性致死試験)	マウス	記載なし。		2	2
その他					
免疫毒性	モルモット	記載なし。	非免疫毒性	2	2
ADI	・毒性学的 ADI を $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重に設定。ヒトで総摂取量 $600 \mu\text{g}/\text{person}$ に相当。(イヌ 6 ヶ月試験で得た NOEL $2\text{mg}/\text{kg}$ 体重/日に基づき、安全係数を 200 として (この用量で認められたマージナルな影響(marginal effects)により補正))。			2	2

動物用医薬品委員会

バクイロプリム

サマリーレポート (1)

(原文、1 ページ)

1. バクイロプリムは、ジヒドロ葉酸レダクターゼ阻害剤として作用するジアミノピリミジン誘導体である。また、スルホンアミドと相乗作用を示す。4種類の製剤が開発されており、非泌乳牛への経口投与用の短時間作用型巨丸剤1種および長時間作用型巨丸剤2種(用量:投与1回あたり約バクイロプリム4~16mg+スルファジミジン36~144mg/kg体重)と、泌乳牛への静脈および筋肉注射用製剤(用量:バクイロプリム1.67mg+スルファジミジン2.09mg/kg体重/日を4~5日間の間投与、もしくはこの2倍の容量を48時間間隔で最大3回まで投与)、そして、ブタへの筋肉投与(用量:バクイロプリム1.67mg¹+スルファジミジン2.09mg/kg¹体重/日を6日間の間投与、もしくはこの1.5倍の容量を48時間間隔で最大3回まで投与)がある。ウシにおける適応症は、気道(respiratory tract)および胃腸管感染症(gastro-intestinal tract infections)と、趾間腐爛(foul-in-the-foot)および乳腺炎(mastitis)である。ブタにおける適応症は気道および胃腸管感染症と産褥期無乳症症候群(乳房炎-子宮炎-無乳症症候群)(mastitis-metritis-agalactia syndrome)である。
2. バクイロプリムは、実験動物において高い経口バイオアベイラビリティを有する。
3. バクイロプリムは、体内に広く分布し、長時間かけて排出される。尿および胆汁はいずれも重要な排出経路である。
4. バクイロプリムは、実験動物および対象動物の体内で広範に代謝される。各代謝物は低濃度であるため同定が難しいことから、代謝に関する情報は完全に揃っていない。利用可能な情報は、実験動物と対象動物における代謝が質的に類似していることを示している。
5. 代謝産物として、デスメチルバクイロプリム、ビス-デスメチルバクイロプリム、バクイロプリム-1-N-オキシド、バクイロプリム-3-N-オキシド、6-ヒドロキシ-バクイロプリムが同定された。投与後に組織中および乳汁中に認められた主要化合物は、未変化のバクイロプリムである。
6. 肝臓、腎臓および注入部位の残留物の多くは共有結合をし、その割合は投与後の1週間で増加する。
7. ウシ肝臓内の全残留物(休薬期間28日)と同じく、ラット体内の共有結合残留物の経口バイオアベイラビリティは最大約15%と推定された。
8. バクイロプリムは中程度の急性毒性を有する。急性経口LD₅₀値は約500~1000mg/kg体重である。重要な毒性徴候は、CNS(中枢神経系)への毒性および肝障害である。
9. 以下の経口反復投与毒性試験が実施された:ラット6~10日間試験(0, 6.25, 25および100mg/kg体重/日)、ラット21日間試験(0, 5, 20および80mg/kg体重/日)、イヌでの2および4週間試験(予備試験、10~20mg/kg/体重/日)、ラット90日間試験(0, 4, 16および64mg/kg体重/日)、イヌ6ヶ月間試験(0, 2, 5, 8~12.5mg/kg体重)。反復投与による各ラット試験およびイヌ6ヶ月間試験では肝臓の細胞(クッパー細胞)へのヘモシデリンの蓄積と、炎症および壊死の徴候などの肝毒性が認められた。また、血漿酵素(アルカリホスファターゼなど)や他の血液生化学的パラメータ(コレステロール、蛋白質およびアルブミンなど)にも影響が認められた。イヌ6ヶ月間試

¹ 原文ではg/kgとなっているが、サマリーレポート(2)では、mg/kgとなっており、間違いと思われる。

験では最低用量 2 mg/kg 体重で、肝臓に軽微な病理組織学的影響の徴候と、統計的に有意ではない僅かな臨床化学的影響が認められた。そのため、この用量がマージナルな NOEL と結論された。ラット 90 日試験では最低用量 4 mg/kg 体重で、僅かではあるが統計的に有意な臨床化学パラメータの用量依存性の影響が認められた（例えば、雄における血漿コレステロールの減少、雌における総蛋白質量の減少など）。そのため、この用量がマージナルな NOEL と考えられた。なお、これらの影響は可逆的であった。

10. ラットおよびウサギ催奇形性試験では、いずれも 0、3、10 および 30mg/kg 体重/日が経口投与され、最大用量 30mg/kg 体重での胎児毒性（恐らく母体毒性が関連）だけが認められた。催奇形性の徴候は認められなかった。胎児毒性影響を生じない用量は 10mg/kg 体重/日であり、催奇形性影響を生じない用量は 30mg/kg 体重/日以上であった。
11. 2 つの用量設定生殖試験および 2 同腹児／世代でのラット二世世代生殖試験の中間報告が提供された。最初に設定した最高用量 30mg/kg 体重は毒性があまりにも高かったため、この用量は投与を中止し、新たな最低用量群 2mg/kg /日を F1a 世代誕生後に追加した（最終的な用量は 2、5 および 12mg/kg 体重/日）。試験結果は F2a 世代誕生まで報告され、5mg/kg 体重/日以上の用量で母体毒性と生殖への影響が生じたことが示されている。2mg/kg 体重/日での僅かな母体毒性は無視できない（母体成長が統計的に有意ではないが僅かに陰性対照よりも劣り、この潜在的傾向の有意性は本試験の最終的な報告が提供されないと評価できない）。30mg/kg 体重/日での生殖指標への影響は、フォリン酸の添加によって幾らか防ぐことができ、これはバクイロプリムによる作用の薬理学的機構が関係していると思われる。この中間報告は 2mg/kg 体重/日では恐らく生殖毒性を誘導しないことを示している。試験完了後の最終報告は 1996 年 5 月までに入手可能になるはずである。
12. 以下の有効とみなされる変異原性試験の中に陽性反応を示す証拠は認められなかった：エームス試験（*Salmonella typhymurium*（ネズミチフス菌）TA98、TA100、TA1535、TA1537）、フラクチュエーションテスト（*Salmonella typhymurium*（ネズミチフス菌）TA98、TA100、TA1535、TA1537 および大腸菌 WP2 pKM101、WP2 uvrA-pKM101）、CHO-HGPRT 試験、ヒト末梢リンパ球を用いた染色体異常試験、in vivo でのマウス小核試験、マウス優性致死試験。なお、細菌を用いた試験および CHO 細胞を用いた試験は、代謝活性化系の存在下および非存在下で実施された。
13. 発がん性データは提供されなかった。変異原性を示す証拠が無いこと、反復投与毒性試験で腫瘍性病変が無いこと、また、既知の発がん性化合物と構造的類似性を示す証拠が無いため、発がん性データは必要とされていない。
14. バクイロプリムは、モルモットの皮膚感作性試験において過敏性徴候を生じさせた。反復投与経口毒性試験では、免疫毒性の証拠は認められなかった。したがって、バクイロプリムの免疫毒性に関するより特別なデータは求められていない。
15. イヌ 6 ヶ月試験で得た NOEL 2mg/kg 体重/日に基づき、安全係数を 200 として（この用量で認められたマージナルな影響(marginal effects)により補正)毒性学的 ADI を 10µg/kg 体重に設定した。これは、ヒトで総摂取量 600 µg/person に相当する。
16. 対象動物から分離された多くの細菌種におけるバクイロプリムとその代謝物 5 種の MIC 値が提供された。デスメチルバクイロプリムおよびビス-デスメチルバクイロプリムは、かなり高い抗微生物活性を有した。腸内細菌に対するバクイロプリムの MIC₅₀ 値（100 µg/ml 未満であった）に基づいて、幾何平均 MIC₅₀ 値が計算された。

微生物学的 ADI の計算には、以下の公式の利用が推奨された：

$$ADI = \frac{\frac{\text{幾何平均 MIC}_{50} \times CF2(\mu\text{g/ml})}{CF1} \times \text{1 日の糞便塊}(150 \text{ ml})}{\text{微生物が利用可能な経口用量の分画} \times \text{ヒト体重 (60 kg)}} \quad (\mu\text{g/kg 体重})$$

$$ADI = \frac{1.121 \times 1/1}{0.50} \times \frac{150}{60} = 5.6 \mu\text{g eq/kg 体重} = 336 \mu\text{g eq/person}$$

- 幾何平均 MIC₅₀ = 1.121 μg/ml
 - CF1 = 1 (MIC₅₀ 値の範囲は既に幾何平均 MIC₅₀ 計算において考慮されている)
 - CF2 = 1 (MIC 値は高細菌密度での試験から得られているため)
 - 腸内細菌叢が利用することができる微生物学的に活性な残留物の分画は 0.5 と推定された(ラットの経口バイオアベイラビリティ試験において糞中排泄されたバクイロプリムの用量の割合 (%) に基づく)。
 - この ADI は微生物学的に活性な残留物の量として μg eq で表される。組織中の微生物学的に活性な残留物は、親化合物と主要代謝物で構成されるものとされた。
17. 残留物の濃度とバイオアベイラビリティおよび代謝物の性質を考慮すると、毒性学的懸念のある残留物のほうが微生物学的に活性な残留物よりも重要である。したがって、最も適切な ADI は毒性試験から算出された値の 10 μg/kg 体重/日 である。
 18. 利用可能な MIC データおよび多数のチーズおよびヨーグルトのスターター培養物における酸の生成に関するデータは、濃度 0.1μg/ml milk のバクイロプリムによって一部の培養物では酸の生成に影響を受けることを示唆している。この影響を防ぐため、乳汁中のバクイロプリムの MRL は 0.1μg eq/ml を超えてはならない。乳汁中のバクイロプリム由来残留物の平均 64% が抗微生物作用を有するため、この値は全バクイロプリム由来残留物の最大濃度では 0.150μg eq/ml に相当する。
 19. 仔牛と泌乳牛における標識および非標識バクイロプリムの経口および筋肉内投与製剤を用いた幾つかの残留物分布および消失試験が提供された。一部の試験では、肝臓や腎臓や注入部位組織内の残留物組成が調べられた。なお、5~42 日の休薬期間が設定された。これらの試験では、肝臓で最も残留濃度が高くなり、腎臓と注入部位ではそれよりも低濃度になることが示された。例えば、ある試験では放射性標識したバクイロプリム 3.3mg +スルフアジミジン 16.2mg /kg 体重を 48 時間間隔で 3 回筋肉注射してから 14、28 および 42 日後の仔牛では、親化合物の濃度範囲に対する肝臓内の全バクイロプリム由来残留物の平均濃度もしくは濃度範囲は、14 日後に 20.6~43.2 mg/kg に対して 4629 mg/kg、28 日後に 5 未満~18.9 mg/kg に対して 1983 mg/kg、および 42 日後に 5 未満~14.6 mg/kg に対して 2511 mg /kg であった。同様の結果が仔牛を用いた他の試験でも得られた。この試験では、残留物中の親化合物の割合の減少が、休薬期間 5 日(平均値で肝臓：8.5%、腎臓：17%、筋肉注入部位：正確な% は不明だが残留物のほとんどが親化合物であった)および 14 日(肝臓 1.8%、腎臓 2.0%、注入部位 3%)の間に認められた。一方、これと同じ期間に結合残留物の割合は増加した(肝臓では 5 日目約 64%~14 日目 73%、腎臓では 5 日目約 60%~14 日目約 71%)。正常筋および脂肪組織中の残留物組成は、14 日以前の時点では調べられなかった。14~42 日の間の残留物組成の変化は比較的小さかった。42 日目の指標残留物の割合は肝臓では 1.3%、腎臓では 3.1% であり、筋肉および脂肪では測定できないほど低く、注入部位組織では 1.7% であった。
 20. ブタ筋肉内の残留物分布および消失試験が休薬期間 7 から最大 28 日で標識および非標識バクイロプリムを用いて実施された。2 つの試験で、肝臓や腎臓および注入部位組織中の残留物組成が調べられた。これらの試験において、残留物の濃度は肝臓で最も高くなり、腎臓、注入部位および皮膚ではそれよりも低くなることが示された。例えば、放射性標識試験において放射性標識したバクイロ

リム 5.0mg+スルファジミジン 25mg/kg 体重を 48 時間間隔で 3 回筋肉注射して 14 および 28 日後のブタでは、肝臓における全バクイロプリム由来残留物の平均濃度もしくは濃度範囲に対して親化合物の濃度範囲は、14 日後に 2.514mg/kg に対して 0.005 未満～0.007mg/kg、および 28 日後に 1.304mg/kg に対して 0.005 mg/kg 未満であった。

他の放射性標識試験では、ブタが同様の投与処理を経て 7～28 日後に食肉処理された。投与 7 日後の残留物濃度は、肝臓 2.82 (親化合物 0.052)、腎臓 0.82 (親化合物 0.018)、筋肉 0.03、脂肪 0.05、皮膚 0.32 および注入部位 2.577mg/kg であった。肝臓と腎臓内の残留物における親化合物の割合の減少が、休薬期間 7 日(肝臓 1.8 %、腎臓 2.2%)と 14 日(肝臓 1.2 %、腎臓 0.7 %)の間に認められた。筋肉と脂肪内の親化合物の割合は 7 日目には測定されず、14 日目の脂肪中で約 7%であり、28 日目の脂肪中および 14 および 28 日目の筋肉中の指標残留物の濃度は無視できるほど低かった。皮膚の指標残留物の割合は 7 日目には測定されず、14 日目に 14%、28 日目に 7%であった。また、注入部位組織における指標残留物の割合は 7 日目には測定されず、14 日目に 0.3%で、28 日目には測定できないほど低かった。プロテアーゼ消化処理および限外濾過法を用いて調べた結合残留物の割合は 7～14 日目の間に増加し、肝臓では 7 日目に約 68%であったのが 14 日目に 74%となり、腎臓では 7 日目に 75%であったのが 14 日目に分析不可能なほど低くなった。

21. バクイロプリム処理牛の乳汁中残留物は、最初は高濃度であったが急速に消失した。例えば、市販製剤を投与した後、初回および 2 回目の搾乳時の残留物は 300～800µg/kg であったが、これらは 8 回目の搾乳時までには 20～40µg/kg になるまで消失した。
22. 投与後 14 日以降に屠殺されたウシとブタの組織中の残留物組成は、ウシおよびブタの肝臓から得られたバイオアベイラビリティの推定データとほとんど変わらなかった。また、残留物組成のデータに基づき、これらは 14 日以降の腎臓におけるバイオアベイラビリティ推定の根拠としても用いられた。
23. 総バクイロプリム由来残留物に親化合物が占める割合は、ほんの僅かであった。しかし、同定された代謝産物の割合は、親化合物よりも低いもしくは高くても有意ではなかった。したがって、親化合物が最適な指標残留物と考えられた。
24. 対象組織は肝臓、腎臓、脂肪組織、ブタの皮膚およびウシの乳汁である。肝臓、腎臓、ブタの皮膚およびウシの乳汁が対象組織として選ばれた理由は、それらが比較的高濃度の残留物を含むためである。筋肉および脂肪組織中の残留物は比較的速やかに消失して、検出不可能なレベルになる。しかし、監視する目的ならば、これら 2 つの組織の少なくとも一方の測定が不可欠である。幾つかの試験において脂肪組織の残留物濃度が筋肉組織よりも僅かに高かったことから、ウシでは脂肪組織が対象組織に選ばれた。ブタに関しては、自然な比率の脂肪および皮膚組織に対して MRL が 1 つ設定された。
25. 毒性学的 ADI、残留物のバイオアベイラビリティ、残留物消失プロファイルおよび標準的な食品パッケージに基づき、以下の MRL が提案された：

ウシ	肝臓	300 µg
	腎臓	150 µg
	脂肪	10 µg
	乳汁	30 µg
ブタ	肝臓	50 µg
	腎臓	50 µg
	脂肪+皮膚	40 µg

ウシの脂肪組織に関しては、極めて低濃度の残留物が検出されたことを考慮し、分析法による定量限界の 2 倍の値が MRL に設定された。同様に、ブタの腎臓に対する MRL は脂肪と皮膚に対する

MRLに基づいて設定された。残留物試験で認められたウシとブタの MRL 値の差異は、恐らく両種間の薬物動態の違いが反映されていると思われる。

残留物のバイオアベイラビリティと標準的な食品パッケージを考慮すると、これらの MRL は ADI を超えないと推察される。

26. 監視には、UV 検出 HPLC 法をウシおよびブタの肝臓と腎臓に適用することが提案された。それらの定量限界は親化合物 20µg/kg が妥当とされ、検出限界 (LOD)は 10 µg/kg である。脂肪およびブタ皮膚組織中の残留物に対しては、MS 検出 HPLC 法が妥当とされた(LOQ=5µg/kg および LOD=2.5µg/kg)。乳汁に関しては、HPLC-UV 法が定量限界 10µg/kg および検出限界 2µg/kg で提案および妥当性が確認された。申請者はこれらの方法の説明書を ISO 78/2 様式で作成した。

結論および提言 (原文、5 ページ)

ラット二世代生殖試験の最終的な報告書はまだ入手可能ではなかったため、暫定的な ADI が設定された。

したがって、動物用医薬品委員会は理事会規則(EEC) No 2377/90 の付則 III にバクイロプリムを含めることと、バクイロプリムの暫定 MRL を以下の表に示すように設定することを提言する：

薬理活性物質	指標残留物	動物種	MRL	対象組織	その他の規定
バクイロプリム	バクイロプリム	ウシ	300 µg/kg 150 µg/kg 10 µg/kg 30 µg/kg	肝臓 腎臓 脂肪 乳汁	暫定 MRL 1998 年 7 月 1 日失効
		ブタ	50 µg/kg 50 µg/kg 40 µg/kg	肝臓 腎臓 皮膚+脂肪	暫定 MRL 1998 年 7 月 1 日失効

質問リスト (原文、6 ページ)

1. 申請者はラット二世代生殖試験の最終報告を提供しなければならない。

原文目次

SUMMARY REPORT(1)	1
Conclusions and recommendation.....	5

略称等

略称等	正式名称(英語)	日本語訳
ADI	Acceptable Daily Intake	一日摂取許容量
CHO	chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣
CNS	Central nervous system	中枢神経系
CVMP	Committee for Medicinal Products for Veterinary Use	動物用医薬品委員会
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	高速液体クロマトグラフィー
LD50	Lethal Dose 50%	半数致死量
MIC	minimal inhibitory concentration	最小発育阻止濃度
MRL	Maximum residue level	残留基準
NOEL	No Observed Effect Level	無影響量

バクイロプリムの毒性試験と結果の概要一覧

(評価書：EMA, BAQUILOPRIM SUMMARY REPORT (2))

試験種類	供試動物等	投与量 (投与期間等)	結果	和訳版 (ページ)	原文 (ページ)
急性毒性 (経口)	-	-	LD50:約 500~1000mg/kg 体重。重要な毒性徴候は、CNS への毒性および肝障害。	1	1
急性毒性 (経口)	ラット	0、6.25、25、 100 mg/kg 体重/日 (6-10 日間)	肝臓細胞へのヘモシテリンの蓄積、炎症および壊死の徴候などの肝毒性が認められた。血漿酵素や他の血液生化学的パラメータにも影響が認められた。	1	1
急性毒性 (経口)	ラット	0、5、20、 80 mg/kg 体 重/日 (21 日間)		1	1
急性毒 性、亜急 性毒性 (経口)	イヌ	予備試験、 10 ~ 20 mg/kg/体重/ 日(2 および 4 週間)			
皮膚感作	モルモ ット	記載なし。		過敏性徴候	2
亜急性毒 性(経口)	ラット	0、4、16、 64 mg/kg 体 重/日 (90 日間)	マージナルな NOEL=4 mg/kg 体重 4 mg/kg 体重で、僅かではあるが統計的 に有意な臨床化学パラメータの用量依 存性の影響あり。	1	1
亜急性毒 性(経口)	イヌ	0、2、5、8 ~ 12.5 mg/kg 体重 (6 ヶ月)	マージナルな NOEL=2 mg/kg 体重 2 mg/kg 体重で肝臓に若干の組織病理 学的影響、統計的に有意でないわずかな 臨床化学的影響。	1	1
生殖毒性	ラット	0~60 mg/kg 体重/日	(離乳後・母体) 一般毒性 NOEL =2 mg/kg 体重/日 2 mg/kg における影響にはほとんど有意 性がないため。	2	2
生殖毒性	ラット	0~30 mg/kg 体重/日		2	2
生殖毒性 (2 世代)	ラット	0、2、5、12 mg/kg 体重/ 日		2	2
催奇形性 (経口)	ラット	0、3、10、 30 mg/kg 体 重/日	催奇形性 NOEL=12 mg/kg 体重/日 生殖毒性 NOEL=5 mg/kg 体重/日 ・最大用量 30mg/kg 体重で胎児毒性。 ・催奇形性の徴候認められず。	2	2
催奇形性 (経口)	ウサギ	0、3、10、 30 mg/kg 体 重/日		2	2
変異原性 (エーム ズ試験)	サルモ ネラ属 菌	記載なし。	非変異原性 陽性反応を示す証拠は認められなかつ た。	2	2

試験種類	供試動物等	投与量 (投与期間等)	結果	和訳版 (ページ)	原文 (ページ)
変異原性 (彷徨変異試験)	サルモネラ属菌	記載なし。		2	2
変異原性 (彷徨変異試験)	E. coli	記載なし。		2	2
変異原性 (HGPRT試験)	CHO細胞	記載なし。		2	2
変異原性 (染色体異常誘発能)	ヒト末梢リンパ球	記載なし。		2	2
変異原性 (小核試験)	マウス	記載なし。		2	2
変異原性 (優性致死試験)	マウス	記載なし。		2	2
その他					
免疫毒性	モルモット	記載なし。	非免疫毒性	2	2
ADI	<p>・毒性学的 ADI を 10 μg/kg 体重に設定。ヒトで総摂取量 600 μg/person に相当。(イヌ 6 ヶ月試験で得た NOEL2mg/kg 体重/日に基づき、安全係数を 200 として (この用量で認められたマージナルな影響(marginal effects)により補正))。</p>			2	2

動物用医薬品委員会

バクイロプリム

サマリーレポート(2)

(原文、1 ページ)

1. バクイロプリムは、ジヒドロ葉酸レダクターゼ阻害剤として作用するジアミノピリミジン誘導体である。また、スルホンアミドと相乗作用を示す。4種類の製剤が開発されており、非泌乳牛への経口投与用の短時間作用型巨丸剤1種および長時間作用型巨丸剤2種(用量:投与1回あたり約バクイロプリム4~16mg+スルファジミジン36~144mg/kg体重)と、泌乳牛への静脈および筋肉注射用製剤(用量:バクイロプリム1.67mg+スルファジミジン2.09mg/kg体重/日を4~5日間投与、もしくはこの2倍の容量を48時間間隔で最大3回まで投与)、そして、ブタへの筋肉投与(用量:バクイロプリム1.67mg+スルファジミジン2.09mg/kg体重/日を6日間投与、もしくはこの1.5倍の容量を48時間間隔で最大3回まで投与)がある。ウシにおける適応症は、気道(respiratory tract)および胃腸管感染症(gastro-intestinal tract infections,)と、趾間腐爛(foul-in-the-foot)および乳腺炎(mastitis)である。ブタにおける適応症は気道および胃腸管感染症と産褥期無乳症症候群(乳房炎-子宮炎-無乳症症候群)(mastitis-metritis-agalactia syndrome)である。
2. バクイロプリムは、実験動物において高い経口バイオアベイラビリティを有する。
3. バクイロプリムは、体内に広く分布し、長時間かけて排出される。尿および胆汁はいずれも重要な排出経路である。
4. バクイロプリムは、実験動物および対象動物の体内で広範に代謝される。各代謝物は低濃度であるため同定が難しいことから、代謝に関する情報は完全に揃っていない。利用可能な情報は、実験動物と対象動物における代謝が質的に類似していることを示している。
5. 代謝産物として、デスメチルバクイロプリム、ビス-デスメチルバクイロプリム、バクイロプリム-1-N-オキシド、バクイロプリム-3-N-オキシドおよび6-ヒドロキシ-バクイロプリムが同定された。投与後に組織中および乳汁中に認められた主要化合物は、未変化のバクイロプリムである。
6. 肝臓、腎臓および注入部位の残留物の多くは共有結合をし、その割合は投与後の1週間で増加する。
7. ウシ肝臓内の全残留物(休薬期間28日)と同じく、ラット体内の共有結合残留物の経口バイオアベイラビリティは最大約15%と推定された。
8. バクイロプリムは中程度の急性毒性を有する。急性経口LD₅₀値は約500~1000mg/kg体重である。重要な毒性徴候は、中枢神経系(CNS)への毒性および肝障害である。
9. 以下の経口反復投与毒性試験が実施された:ラット6~10日間試験(0, 6.25, 25および100mg/kg体重/日)、ラット21日間試験(0, 5, 20および80mg/kg体重/日)、イヌでの2および4週間試験(予備試験、10~20mg/kg/体重/日)、ラット90日間試験(0, 4, 16および64mg/kg体重/日)およびイヌ6ヶ月間試験(0, 2, 5, 8~12.5mg/kg体重)。反復投与による各ラット試験およびイヌ6ヶ月間試験では肝臓の細胞(クッパー細胞)へのヘモシデリンの蓄積と、炎症および壊死の徴候などの肝毒性が認められた。また、血漿酵素(アルカリホスファターゼなど)や他の血液生化学的パラメータ(コレステロール、蛋白質およびアルブミンなど)にも影響が認められた。イヌ6ヶ月間試験では最低用量2mg/kg体重で、肝臓に軽微な病理組織学的影響の徴候(肝細胞の変性(hepatocyte degeneration)、線維性癒着化(fibrous scarring))と、統計的に有意ではない僅かな臨

床化学的影響が認められた。これらの影響はほとんど意義がないため、2mg/kg 体重/日がこの試験の NOEL と結論された。ラット 90 日試験では最低用量 4 mg/kg 体重で、僅かではあるが統計的に有意な臨床化学パラメータの用量依存性の影響が認められた（雄における血漿コレステロールの減少、雌における総蛋白量の減少など）。ただし、これらの影響はほとんど意義がないため、4 mg/kg 体重/日が本試験に関する NOEL と考えられた。なお、これらの影響は可逆的であった。

10. 2つのラット用量設定生殖試験（用量：0～60 mg/kg 体重/日；0～30 mg/kg 体重/日）が実施され、45 および 60 mg/kg 体重/日投与群で強い母体毒性が示された。また、ラット二世世代試験が 0, 2, 5 および 12 mg/kg 体重/日の用量にて 2 産同腹児/2 世代で実施された。高用量の 30 mg/kg 体重/日では母体毒性があまりにも高かったため、この用量での投与は第 1 世代の最初の産児の離乳後に中止した。口蓋裂の発生は、正式な二世世代試験では 30 mg/kg 体重/日で増加し、用量設定試験では 45 mg/kg 体重/日で増加したが、フォリン酸 8 mg/kg 体重/日をバクイロプリム 30 mg と共に与えられた母ラットの産児には認められなかった。二世世代試験における他のバクイロプリムに関連する影響は、12 および 30 mg/kg 体重/日における母ラットの肝毒性、産児数および新生児体重の減少と、5～30 mg/kg 体重/日における体重、成長および飼料摂取量の低下であった。また、2 mg/kg 体重/日では僅かな体重、成長および飼料摂取量の減少が F2 世代にだけ認められた。2 mg/kg 体重/日における影響にはほとんど有意性がないため、2 mg/kg 体重/日が（離乳後・母体の）一般毒性に関する NOEL と考えられた。ラットおよびウサギ催奇形性試験では、いずれも 0, 3, 10 および 30mg/kg 体重/日が経口投与され、最大用量 30mg/kg 体重/日において母体毒性に関連すると考えられる胎児毒性が認められた。催奇形性は認められなかった。これらの生殖試験および催奇形性試験の結果に基づき、催奇形性に関する NOEL は 12 mg/kg 体重/日、生殖毒性に関する NOEL は 5 mg/kg 体重/日と考えられた。
11. 以下の有効とみなされる変異原性試験の中に陽性反応を示す証拠は認められなかった：エームス試験（ネズミチフス菌 TA98、TA100、TA1535、TA1537）、フラクチュエーションテスト（ネズミチフス菌 TA98、TA100、TA1535、TA1537 および大腸菌 WP2 pKM101、WP2 uvrA-pKM101）、CHO-HGPRT 試験、ヒト末梢リンパ球を用いた染色体異常試験、in vivo でのマウス小核試験、マウス優性致死試験。なお、細菌を用いた試験およびチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞を用いた試験は、代謝活性化系の存在下および非存在下で実施された。
12. 発がん性データは提供されなかった。変異原性を示す証拠が無いこと、反復投与毒性試験で腫瘍性病変が無いこと、また、既知の発がん性化合物と構造的類似性を示す証拠が無いため、発がん性データは必要とされていない。
13. バクイロプリムは、モルモットの皮膚感作性試験において過敏性徴候を生じさせた。反復投与経口毒性試験では、免疫毒性の証拠は認められなかった。したがって、バクイロプリムの免疫毒性に関するより特別なデータは求められていない。
14. イヌ 6 ヶ月試験で得た NOEL 2mg/kg 体重/日に基づき、安全係数を 200 として（この用量で認められたマージナルな影響(marginal effects)により補正)毒性学的 ADI を 10µg/kg 体重に設定した。これは、ヒトで総摂取量 600 µg/person に相当する。
15. 対象動物から分離された多くの細菌種におけるバクイロプリムとその代謝物 5 種の MIC 値が提供された。デスメチルバクイロプリムおよびビス-デスメチルバクイロプリムは、かなり高い抗微生物活性を有した。腸内細菌に対するバクイロプリムの MIC₅₀ 値（100 µg/ml 未満であった）に基づいて、幾何平均 MIC₅₀ 値が計算された。

微生物学的 ADI の計算には、以下の公式の利用が CVMP により推奨された：

$$ADI = \frac{\frac{\text{幾何平均 MIC}_{50} \times CF2(\mu\text{g/ml})}{CF1} \times \text{1 日の糞便塊}(150 \text{ ml})}{\text{微生物が利用可能な経口用量の分画} \times \text{ヒト体重 (60 kg)}} \quad (\mu\text{g/kg 体重})$$

$$ADI = \frac{1.121 \times 1/1}{0.50} \times \frac{150}{60} = 5.6 \mu\text{g eq/kg 体重} = 336 \mu\text{g /person}$$

なお、本公式では以下の想定がおこなわれた：

- 幾何平均 MIC₅₀ = 1.121 μg/ml
- CF1 = 1 (MIC₅₀ 値の範囲は既に幾何平均 MIC₅₀ 計算において考慮されている)
- CF2 = 1 (MIC 値は高細菌密度での試験から得られているため)
- 1 日の糞便塊の重量は 150 ml であった。
- 腸内細菌叢が利用することができる微生物学的に活性な残留物の分画は 0.5 と推定された(ラットの経口バイオアベイラビリティ試験において糞中排泄されたバクイロプリムの用量の割合 (%) に基づく)。

この ADI は微生物学的に活性な残留物の量として μg eq で表される。組織中の微生物学的に活性な残留物は、親化合物と主要代謝物で構成されるものとされた。

17. 残留物の濃度とバイオアベイラビリティおよび代謝物の性質を考慮すると、毒性学的懸念のある残留物のほうが微生物学的に活性な残留物よりも重要である。したがって、最も適切な ADI は毒性試験から算出された値の 10 μg/kg 体重/日 である。
18. 利用可能な MIC データおよび多数のチーズおよびヨーグルトのスターター培養物における酸の生成に関するデータは、濃度 0.1μg/ml milk のバクイロプリムによって一部の培養物では酸の生成に影響を受けることを示唆している。この影響を防ぐため、乳汁中のバクイロプリムの MRL は 0.1μg eq/ml を超えてはならない。乳汁中のバクイロプリム由来残留物の平均 64% が抗微生物作用を有するため、この値は全バクイロプリム由来残留物の最大濃度では 0.150μg eq/ml に相当する。
19. 仔牛と泌乳牛における標識および非標識バクイロプリムの経口および筋肉内投与製剤を用いた幾つかの残留物分布および消失試験が提供された。一部の試験では、肝臓や腎臓や注入部位組織内の残留物組成が調べられた。なお、5~42 日の休薬期間が設定された。これらの試験では、肝臓で最も残留濃度が高くなり、腎臓と注入部位ではそれよりも低濃度になることが示された。例えば、ある試験では放射性標識したバクイロプリム 3.3mg +スルファジミジン 16.2mg /kg 体重を 48 時間間隔で 3 回筋肉注射してから 14、28 および 42 日後の仔牛では、親化合物の濃度範囲に対する肝臓内の全バクイロプリム由来残留物の平均濃度もしくは濃度範囲は、14 日後に 20.6~43.2 μg/kg に対して 4629 μg/kg、28 日後に 5 未満~18.9 μg/kg に対して 1983 μg/kg、および 42 日後に 5 未満~14.6 μg/kg に対して 2511 μg /kg であった。同様の結果が仔牛を用いた他の試験でも得られた。この試験では、残留物中の親化合物の割合の減少が、休薬期間 5 日(平均値で肝臓：8.5%、腎臓：17%、筋肉注入部位：正確な% は不明だが残留物のほとんどが親化合物であった)および 14 日(肝臓 1.8%、腎臓 2.0%、注入部位 3%)の間に認められた。一方、これと同じ期間に結合残留物の割合は増加した(肝臓では 5 日目約 64%~14 日目 73%、腎臓では 5 日目約 60%~14 日目約 71%)。正常筋および脂肪組織中の残留物組成は、14 日以前の時点では調べられなかった。14~42 日間の残留物組成の変化は比較的小さかった。42 日目の指標残留物の割合は肝臓では 1.3%、腎臓では 3.1% であり、筋肉および脂肪では測定できないほど低く、注入部位組織では 1.7% であった。

20. ブタ筋肉内の残留物分布および消失試験が休薬期間 7 および 28 日で標識および非標識バクイロプリムを用いて実施された。2 つの試験で、肝臓や腎臓および注入部位組織中の残留物組成が調べられた。これらの試験において、残留物の濃度は肝臓で最も高くなり、腎臓、注入部位および皮膚ではそれよりも低くなること示された。例えば、放射性標識試験において放射性標識したバクイロプリム 5.0mg + スルファジミジン 25mg /kg 体重を 48 時間間隔で 3 回筋肉注射して 14 および 28 日後のブタでは、親化合物の濃度範囲に対する肝臓における全バクイロプリム由来残留物の平均濃度もしくは濃度範囲は、14 日後に 5 未満～7 µg/kg に対して 2514 µg/kg、および 28 日後に 5 µg/kg 未満に対して 1304 µg/kg であった。

他の放射性標識試験では、ブタが同様の投与処理を経て 7～28 日後に屠殺された。投与 7 日後の残留物濃度は、肝臓 2820 µg/kg (親化合物 52 µg/kg)、腎臓 820 µg/kg (親化合物 18 µg/kg)、筋肉 3 µg/kg、脂肪 5 µg/kg、皮膚 320 µg/kg および注入部位 2577 µg/kg であった。肝臓と腎臓内の親化合物の割合の減少が、休薬期間 7 日(肝臓 1.8 %、腎臓 2.2%)と 14 日(肝臓 1.2 %、腎臓 0.7 %)の間で認められた。筋肉と脂肪内の親化合物の割合は 7 日目には測定されず、14 日目の脂肪中で約 7%であり、28 日目の脂肪中および 14 および 28 日目の筋肉中の指標残留物の濃度は無視できるほど低かった。皮膚の指標残留物の割合は 7 日目には測定されず、14 日目に 14%、28 日目に 7%であった。また、注入部位組織における指標残留物の割合は 7 日目には測定されず、14 日目に 0.3%で、28 日目には測定できないほど低かった。結合残留物の割合は 7～14 日目の間に増加した。プロテアーゼ消化処理および限外濾過法を用いて調べたところ、肝臓では 7 日目に約 68%であったのが 14 日目に 74%となり、腎臓では 7 日目に 75%であったのが 14 日目に分析不可能なほど低くなった。

21. バクイロプリム処理牛の乳汁中残留物は、最初は高濃度であったが急速に消失した。例えば、市販製剤を投与した後、初回および 2 回目の搾乳時の残留物は 300～800µg/kg であったが、これらは 8 回目の搾乳時までには 20～40µg/kg になるまで消失した。
22. 投与後 14 日以降に屠殺されたウシとブタの組織中の残留物組成は、ウシおよびブタの肝臓から得られたバイオアベイラビリティの推定データとほとんど変わらなかった。また、残留物組成のデータに基づき、これらは 14 日以降の腎臓におけるバイオアベイラビリティ推定の根拠としても用いられた。
23. 総バクイロプリム由来残留物に親化合物が占める割合は、ほんの僅かであった。しかし、同定された代謝産物の割合は、親化合物よりも低いもしくは高くても有意ではなかった。したがって、親化合物が最適な指標残留物と考えられた。
24. 対象組織は肝臓、腎臓、脂肪、ブタの皮膚およびウシの乳汁である。肝臓、腎臓、ブタの皮膚およびウシの乳汁が対象組織として選ばれた理由は、それらが比較的高濃度の残留物を含むためである。筋肉および脂肪組中の残留物は比較的速やかに消失して、検出不可能なレベルになる。しかし、監視する目的ならば、これら 2 つの組織の少なくとも一方の測定が不可欠である。幾つかの試験において脂肪の残留物濃度が筋肉組織よりも僅かに高かったことから、ウシでは脂肪組織が対象組織に選ばれた。ブタに関しては、自然な比率の脂肪および皮膚に対して MRL が 1 つ設定された。
19. 毒性学的 ADI、残留物のバイオアベイラビリティ、残留物消失プロファイル、および標準的な食品パッケージに基づき、以下の MRL が提案された：

ウシ	肝臓	300 µg
	腎臓	150 µg
	脂肪	10 µg
	乳汁	30 µg
ブタ	肝臓	50 µg
	腎臓	50 µg

脂肪+皮膚 40 µg

ウシの脂肪組織に関しては、極めて低濃度の残留物が検出されたことを考慮し、分析法による定量限界の 2 倍の値が MRL に設定された。同様に、ブタの腎臓に対する MRL は脂肪と皮膚に対する MRL に基づいて設定された。ウシとブタの MRL 値の差異は、残留物試験で認められた差異を表し、これは恐らく両種間の薬物動態の違いを反映している。

残留物のバイオアベイラビリティと標準的な食品パッケージを考慮すると、これらの MRL は ADI を超えないと推察される。

25. 監視には、UV 検出 HPLC 法をウシおよびブタの肝臓と腎臓に適用することが提案された。それらの定量限界は親化合物 20µg/kg が妥当とされ、検出限界は 10 µg/kg である。MS 脂肪およびブタ皮膚組織中の残留物に対しては、MS 検出 HPLC 法が妥当とされた(定量限界 5µg/kg および検出限界 2.5µg/kg)。乳汁に対しては、HPLC-UV 法が定量限界 10µg/kg および検出限界 2µg/kg で提案および妥当性が確認された。申請者はこれらの方法の説明書を ISO 78/2 様式で作成した。

結論および提言 (原文、5 ページ)

以下のことを考慮して：

- 暫定的な毒性 ADI の 10 µg/kg 体重 (すなわち 600 µg/person)を最終的な ADI として確定すべきである；
- 暫定 MRL の修正は求められなかった；

本委員会は、以下の表に従って理事会規則(EEC) No 2377/90 の付則 I にバクイロプリムを含めることを提言する：

薬理活性物質	マーカー残留物	動物種	MRL	対象組織	その他の規定
バクイロプリム	バクイロプリム	ウシ	10 µg/kg 300µg/kg 150 µg/kg 30 µg/kg	脂肪 肝臓 腎臓 乳汁	
		ブタ	40 µg/kg 50 µg/kg	皮膚+脂肪 肝臓、腎臓	

原文目次

SUMMARY REPORT(2) 1
Conclusions and recommendation..... 5

略称等

略称等	正式名称(英語)	日本語訳
ADI	Acceptable Daily Intake	一日摂取許容量
CVMP	Committee for Medicinal Products for Veterinary Use	動物用医薬品委員会
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	高速液体クロマトグラフィー
MIC	minimal inhibitory concentration	最小発育阻止濃度
MRL	Maximum residue level	残留基準
NOEL	No Observed Effect Level	無影響量