

No. 17 ハロフジノン

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、EMA、EFSA 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
17	ハロフジノン	動物薬/飼料添加物・寄生虫駆除剤・抗原虫剤

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 眞	(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

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)
17	ハロフジノン	Halofuginone: Summary report (1) – Committee for Veterinary Medicinal Products	ハロフジノン_EMA_01
		Halofuginone: Summary report (2) – Committee for Veterinary Medicinal Products	ハロフジノン_EMA_02
		Halocur, INN: Halofuginone (as lactate salt) Scientific Discussion	ハロフジノン_EMA_03
		EFSA Journal (2003)8,1-45 Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on a request from the commission on the re-evaluation of coccidiostat Stenorol in accordance with article 9G of Council Directive 70/524	ハロフジノン_EFSA_01

2. 3 評価書の情報の整理

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 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 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) : 4 報

- ハロフジノン _EMA_01
- ハロフジノン _EMA_02
- ハロフジノン _EMA_03
- ハロフジノン _EFSA_01

ハロフジノンの毒性試験と結果の概要一覧

(評価書 : EMA, Halofuginone: Summary report (1) - Committee for Veterinary Medicinal Products)

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)	マウス		ハロフジノン臭化水素酸塩および乳酸塩 LD ₅₀ : およそ 30 mg/kg 体重	2	2
急性毒性 (経口)	ラット		ハロフジノン臭化水素酸塩および乳酸塩 LD ₅₀ : およそ 5 mg/kg 体重	2	2
急性毒性 (吸入)	ラット		ハロフジノン LC ₅₀ : 53 µg/l	2	2
急性毒性 (経皮)	ウサギ		ハロフジノン LD ₅₀ : 16 mg/kg 体重	2	2
急性毒性 (経口)	マウス		シス異性体 LD ₅₀ : およそ 430 mg/kg 体重	2	2
亜急性毒性 (経口)	マウス	ハロフジノン塩基で 0.070、0.160、0.350 mg/kg 体重/日 混餌投与 4 週間	ハロフジノン臭化水素酸塩および乳酸塩 NOEL : 0.070 mg/kg 体重/日 (両方の塩について) <ul style="list-style-type: none"> 0.160、0.350 mg/kg 体重/日群以上 : 血液学的に有意な変動(細胞容積、平均赤血球容積と平均赤血球ヘモグロビン)。 0.350 mg/kg 体重/日群: 雄マウスの血液化学的な変動 (尿素とコレステロール)。 	3	3
亜急性毒性 (経口)	ラット	ハロフジノン臭化水素酸塩 0、2、5、10 mg/kg 混餌投与 13 週間	NOEL : 0.13 ~ 0.16 mg/kg 体重/日 <ul style="list-style-type: none"> 10 mg/kg 群 : 雌の 80%に門脈周囲肝細胞中のグリコーゲンのわずかな減少に関連する肝臓の脂肪沈着、空胞形成。 血液学的パラメータと血液化学値への有害影響の報告なし。 	3	3
亜急性毒性 (経口)	イヌ	ハロフジノン臭化水素酸塩 0、1.25、2.5、5 mg/kg 混餌投与 13 週間	NOEL : 飼料中濃度 2.5 mg/kg (0.067 mg/kg 体重/日) <ul style="list-style-type: none"> 5 mg/kg 群 : 平均赤血球容積の有意な減少。 	3	3
慢性毒性 (経口)	イヌ	ハロフジノン臭化水素酸塩 0、1.25、2.5、5 mg/kg 混餌投与 26 週間	NOEL : 飼料中濃度 2.5 mg/kg (0.075 ~ 0.086 mg/kg 体重/日) <ul style="list-style-type: none"> 5 mg/kg 群 : 血液学的に有意な変化(平均赤血球容積の減少、平均赤血球ヘモグロビン濃度の低下、血色素量の低下)。 	3	3

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)
その他： 耐性試験 (経口)	若齢子 ウシ	推奨用量 (0.1mg/kg 体 重/日、7 日間) ～この 25 倍 強制経口投与	<ul style="list-style-type: none"> 15 倍、25 倍相当量：死亡あり。 給餌直後に投与した場合、ハロフジノン乳酸塩は、推奨用量の 1、2、3 倍で、可逆性の胃腸炎症性/壊死性の病変を誘発。 	3	3
その他： 耐性試験 (経口)	未哺乳 の子ウ シ(雄)	推奨用量(0.10 mg ハロフジ ノン塩基/kg 体 重/日を 7 日 間)の 0、1、2 倍	<p>2 倍群： 25%の動物が死亡、35 日目に残りの 60% の動物に回腸パイエル板のリンパ球枯渇あり。</p> <p>推奨用量群：投与に関連する組織学的な所見なし、6 頭のうち 1 頭の回腸パイエル板に目立たない枯渇あり。</p>	3	3
生殖毒性 (経口)	マウス	ハロフジノン 0、0.25、0.5、1 mg/kg 飼料 混餌投与 交配前 7 日間 +交配後 2 週 間	最高用量の 1 mg/kg 飼料(0.126 mg/kg 体重/日)まで、受胎率または飼育能力には有害影響なし。	4	4
生殖毒性 (経口)	イヌ	ハロフジノン 2.5、5 mg/kg 飼 料 混餌投与 68 週間	NOEL は設定できなかった。 全ての動物において、精巢の長さ と幅が低下。受胎率の低下もみられ た。これらは統計学的に有意な差で はないが、被験物質関連性、用量依 存性があると考えられ、何らかの生 物学的意義があると考えることがで きる。	4	4
生殖毒性 (経口)	マウス	ハロフジノン 0.25、0.5、1 mg/kg 飼料 混餌投与 3 世代	<p>NOEL：0.25 mg/kg 飼料(0.034 mg/kg 体重/日)</p> <ul style="list-style-type: none"> 1 mg/kg 群：F3 児動物の体重が有意に低下、F2 雄親動物の体重が有意に低。 0.5 mg/kg 群：一時的な体重の低下。F1 雄親動物の体重が有意に低。 0.25 mg/kg 群：F1 雄親動物の体重が有意に低。 <p>※F1 および F2 雄動物の低体重は主に親動物として選抜される前(授乳中または離乳直後)の低体重増加量に起因するものであるが、NOEL は 0.25 mg/kg 飼料とされた。</p>	4	4
生殖毒性 (経口)	妊 娠 ラ ット	ハロフジノン 臭化水素酸塩 9.33 mg/kg 体 重 単回強制経口 投与	児動物に有害な影響なし。 (本試験の報告の記載は不十分であ り、NOEL は設定できない)	4	4

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)
生殖毒性 (経口)	妊 娠 ラ ット	ハロフジノン 臭化水素酸塩 6 mg/kg 飼料混 餌投与 交配後 10 日～ 20 日	児動物に有害な影響なし。 (本試験の報告の記載は不十分であ り、NOEL は設定できない)	4	4
生殖毒性 (経口)	ラット	ハロフジノン 臭化水素酸塩 0、0.17、0.34、 0.67mg/kg 体重 /日 強制経口投与 妊娠 6 日～17 日	母体毒性の NOEL : 0.34 mg/kg 体重/ 日 ・ 0.67 mg/kg 体重/日群 : 死亡、臨 床症状の変化、流産の母体毒性 あり。 ・ 最大 0.67 mg/kg 体重/日まで、胚 /胎児毒性および催奇形性は認め られなかった。	4	4
生殖毒性 (経口)	ウサギ	ハロフジノン 臭化水素酸塩 0、0.0084、 0.025、0.076 mg/kg 体重/日	母体毒性の NOEL : 0.025 mg/kg 体重 /日 ・ 0.076 mg/kg 体重/日 : 母体毒性と して死亡、低体重、低妊娠率 が 認められた。 ・ 最大 0.076 mg/kg 体重/日まで、 胚/胎児毒性および催奇形性は認 められなかった。	4	4
遺伝毒 性 : <i>in</i> <i>vitro</i> マウ スリンフ オーマ試 験			陰性	4	4
遺伝毒 性 : <i>in</i> <i>vitro</i> 染 色体異常 試験	培 養 ヒ ト リ ン パ 球		陰性	4	4
遺伝毒 性 : <i>in</i> <i>vitro</i> DNA 修 復試験	ヒト上 皮細胞		陰性	4	4
遺伝毒性 の <i>in vivo</i> 骨髄小核 試験	マウス		陰性	4	4
遺伝毒 性 : <i>in</i> <i>vivo</i> 分 裂中期試 験	ラット		陰性	4	4
遺伝毒 性 : <i>in</i> <i>vivo</i> 宿主 経由試験	マウス		陰性	4	4

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)
遺伝毒性：エームス試験	<i>Salmonella typhimurium</i> TA1538	1000 μ g/プレート	陽性（代謝活性存在下）	4	4
遺伝毒性：エームス試験	<i>Salmonella typhimurium</i> TA98	ハロフジノン臭化水素酸塩 1000 μ g/プレート以上	陽性（代謝活性存在下と非存在下）	4	4
遺伝毒性：エームス試験	<i>Salmonella typhimurium</i> TA98	ハロフジノン乳酸塩 1000 μ g/プレート	陽性	5	4
遺伝毒性： <i>in vivo</i> 骨髄小核試験	マウス	ハロフジノン乳酸塩	陰性	5	4
発がん性	マウス	ハロフジノン臭化水素酸塩 0.03、0.07、0.24 mg/kg 体重/日 混餌投与	発がん性なし。	5	5
発がん性	ラット	ハロフジノン（塩の記載なし） 0.29～0.36 mg/kg 体重/日 混餌投与 63 週間	<ul style="list-style-type: none"> 投与に関連した病理組織学的変異なし。 肝腫瘍の発症率の増加なし。 	5	5
発がん性	ラット	ハロフジノン臭化物 0、2.5、5、10 mg/kg 混餌投与	<ul style="list-style-type: none"> 毒性学的 NOEL：混餌投与で 2.5 mg/kg、すなわち 0.09～0.18 mg/kg 体重/日（血液学的結果と組織学的結果に基づく）。 発がん性なし。 	5	5
皮膚感作性	モルモット		<ul style="list-style-type: none"> Buehler 変法では、ハロフジノンの感作性に起因する皮膚反応なし。 マキシマイゼーション法では、遅延型接触過敏症に起因するわずかな皮膚反応が 35%の動物に見られた。 	5	5
皮膚刺激性	ウサギ	剃毛皮膚に塗布	遅延性の全身毒性影響を起こし、刺激作用があった。	5	5
眼刺激性	ウサギ	眼粘膜に塗布	遅延性の全身毒性影響を起こし、刺激作用があった。	5	5

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)
ADI	ヒト		<p>おおよその毒性 ADI : 0.30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日 (18 $\mu\text{g}/\text{人}$) (NOEL : 0.03 mg/kg 体重/日に安全係数 100 を適用して算出)。</p> <ul style="list-style-type: none">・ ラット、イヌ、マウスで実施された 8 つの毒性試験のうちの 6 つで、NOEL は 0.070 mg/kg 体重/日以下。・ マウスでの 3 世代試験での NOEL は 0.0334 mg/kg 体重/日。・ ウサギでの催奇形性試験で NOEL は 0.025 mg/kg 体重/日。	5	5

動物用医薬品委員会

ハロフジノン

サマリー・レポート (1)

(原文、1 ページ)

1. ハロフジノンはフェブリフジン(febrifugine)から生じる合成製品である。ハロフジノンはキナゾロン類(quinazolone group)に属する化学物質である。*trans*-ハロフジノンが活性成分で、不純物として *cis*-異性体が存在する。現在用法が限られているハロフジノン乳酸塩は、0.10 mg/kg 体重/日相当のハロフジノンを7日間、経口治療計画(oral therapeutic regimen)により、日齢4日から15日の未反すうの子ウシにおける *Cryptosporidium parvum* を原因とする下痢の予防を対象とするものである。

ハロフジノン臭化水素酸塩は、休薬期間5日間のブロイラーやシチメンチョウ用の抗コクシジウム飼料添加剤として、委員会指令70/524/EECを改正した1993年4月12日の委員会指令91/248/ECに登録された。

2. 提供された試験の殆どはハロフジノンの乳酸塩と臭化水素酸塩の2種類の塩類で行われた。試験結果を比較するために、用量はハロフジノン塩基の相当量で表された。

3. *in vitro* 試験では、ハロフジノンは *Babesia equi* に感染したリンパ芽球様細胞(lymphoblastoid cells)の細胞分裂速度を阻害した。ハロフジノンは、細胞寄生複合体の全体を破壊することにより、*Theileria parva* 形質転換細胞に効果を発揮する。電子顕微鏡試験では *Theileria parva* に感染した子ウシのリンパ節で、ハロフジノンは感染細胞にのみ作用することが示された。

公表されたデータでは、ハロフジノンは鳥類とヒト(正常なヒトと強皮症の患者)の皮膚線維芽細胞において、低濃度で(それぞれ 10^{-11} 、 10^{-10} 、 10^{-9} M)で、コラーゲン $\alpha 1$ (1)の遺伝子発現とコラーゲン合成を特異的にそして一時的に阻害することを示した。

4. 静脈内投与後、ハロフジノン(塩は明記されず)はネコ(3 mg/kg 体重相当又はそれ以上の用量)とラット(0.3 mg/kg 体重以上の用量)の心血管系に作用した。マウス(ハロフジノン塩基の経口用量は1~100 mg/kg 体重の範囲)の中樞神経系への影響と、リスザル(ハロフジノン塩基の静脈内用量は1 mg/kg 体重以上)の中樞神経系への一過性の影響が認められた。

^{14}C -ハロフジノン臭化水素酸塩を0.25 mg/kg 体重でマウスに経口投与後、投与した用量の82.7%は48時間以内に主に糞便中に排出(65%)された。この放射能の約90%は未変化のハロフジノンに相当した。投与後、肝臓の放射能濃度は24時間でハロフジノン220 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当だったものが48時間で130 $\mu\text{g}/\text{kg}$ に低下した。

ラットでは、経口投与量(5 mg ^{14}C ハロフジノン臭化水素酸塩/kg 体重)の約78%が24時間以内に主に糞便中に(60%)回収された。排泄物の放射性化合物についての情報は提供されていない。

5. 3頭の1週齢の未反芻雄子ウシ(ヘレフォード種とホルスタイン種の交雑種)に ^{14}C -ハロフジノン乳酸塩(ハロフジノン塩基として0.10 mg/kg 体重)を1日7回投与した研究では、子ウシにおけるハロフジノン乳酸塩の排出は主に尿中であることが示された。最終投与後から屠殺までの間における放射能の尿中排出は、7回目に投与した放射能の10.0%(6時間)、20%(24時間)と92%(48時間)を示した。動物数が少なかったため(尿全体の収支 (complete balance) は1頭の結果から得られた)、そして回収された放射能の割合は7回目に投与された用量との比較に基づくため、この代謝試験は慎重に検討されなければならない。子ウシにおいて収支を合わせることはできない。

血漿では、ハロフジノンは総放射能の 6.5~10%しか示さなかった。ハロフジノン乳酸塩は吸収されたが、この吸収量は定量化できなかった。

もう一つの試験では、3 週齢の子ウシに推奨治療用量(0.10 mg ハロフジノン塩基/kg 体重/日)のハロフジノン乳酸塩を 7 日間、経口投与した。血漿中のハロフジノンの最高濃度(9 µg/l)は 7 回目の投与後 6 時間目に認められた。ハロフジノン濃度はその後低下し、最終投与の 7 日までに検出されなくなった(定量限界 1 µg/l)。

新たに提出された薬物動態試験では、体重 52.6 kg の 22~32 日齢の子ウシ 8 頭に、推奨治療量のハロフジノン乳酸塩(0.10 mg ハロフジノン塩基/kg 体重/日)を 7 日間、経口投与した。血漿中のハロフジノンの最高濃度(6.66 µg/l)は 7 回目の投与後 8 時間目に認められた。その後、血漿の濃度は最終投与後 36 時間で 2.3 µg/l に減少し、その後のサンプリング時には定量限界以下(1 µg/l)まで低下した。平均の終末半減期(mean terminal half-life)は 32.8 時間だった。これらの実験条件下では、蓄積は立証されなかった。しかしながら、個体差が大きく、ハロフジノンは半数の動物の血漿から検出されなかったため、この結果は慎重にとりあつかわれるべきである。

新たに提出された GLP 適合のクロスオーバー薬物動態試験では、8 頭の子ウシ(初回投与の初日で 10~15 日齢と 2 回目投与の初日で 17~22 日齢)に推奨用量(0.10 mg ハロフジノン塩基/kg 体重/日; 平均体重は 45 kg)のハロフジノン乳酸塩を静脈内投与又は経口投与した。静脈内投与後、排出半減期は 11.66 時間で、全身クリアランスは 0.6 l/kg 時間、平均滞留時間は 16.7 時間であった。単回経口投与後、血漿中ハロフジノンの最高濃度(4.12 µg/l)が投与後 11 時間でみられた。経口投与の排出半減期(30.84 時間)は静脈内投与後に算出されたものより 3 倍高かった。それは、消化管での吸収過程が律速段階となり、みかけ上血液中からの消失が遅延したように見える現象(flip-flop)現象が存在し、吸収相がハロフジノンの薬物動態学的挙動を制限する過程であることを意味する。経口の生物学的利用能は 81.1%であった。これらの薬物動態学的パラメータを使って、反復投与のシミュレーションによりこれら若齢子ウシにおけるハロフジノンの蓄積可能性が示された。動物の年齢と体重がハロフジノンの蓄積に影響するかもしれない。

6. ハロフジノン臭化水素酸塩と乳酸塩の経口急性毒性がマウス、ラットとウサギで検討された。両塩の LD₅₀はラットでおよそ 30 mg/kg 体重、マウスで 5 mg/kg 体重であった。ラットでは、ハロフジノンの粉塵の吸入後、LC₅₀は 53 µg/l と決定された。ウサギの経皮 LD₅₀は 16 mg/kg 体重であった。シス異性体は、有効成分の毒性の 100 分の 1 であった(マウスの経口 LD₅₀はおよそ 430 mg/kg 体重)。
7. ハロフジノン臭化水素酸塩と乳酸塩の 2 種類のハロフジノン塩で、マウス、ラット、イヌによるいくつかの経口反復投与毒性試験が行われた。

生物学的同等性試験で、マウスにハロフジノン臭化水素酸塩または乳酸塩を 2 mg ハロフジノン塩基/kg 体重の用量で単回経口投与した。個体差が大きいため、2 種類の塩の生物学的同等性を薬物動態的観点から結論することは不可能である。ハロフジノン臭化水素酸塩と乳酸塩の平均 AUC_{0-8h} 値はマウスの雄雌でそれぞれ 103.37 µg.h/l と 82.65 µg.h/l であった。雄では、2 種類の塩の AUC は同じであったが、(両塩とも 83 µg.h/l)、雌ではハロフジノン乳酸塩の AUC(157 µg.h/l)はハロフジノン臭化水素酸塩(97.40 µg.h/l)よりも高かった。しかし、毒性学的観点から、試験は雄雌の両方で行われたので、臭化水素酸塩について得られた結果を、乳酸塩の安全性プロファイル確立にあたって考慮することができる。

2 つの 4 週間の混餌投与毒性試験で、マウスにハロフジノン臭化水素酸塩と乳酸塩を 0.070、0.160、0.350 mg ハロフジノン塩基/kg 体重/日の用量で投与した。高用量の 2 群で、血液学的に有意な変動(細胞容積、平均赤血球容積と平均赤血球ヘモグロビン)が報告された。最高用量で、雄マウスの血液化学的な変動(尿素とコレステロール)がみられた。両方の塩に同じ毒性学的プロファイルが認められ、同じ無影響量(0.070 mg/kg 体重/日)であった。

13週間の毒性試験で、ラットにハロフジノン臭化水素酸塩を0、2、5、10 mg/kgの用量で混餌投与した。これは雄で0.13、0.33、0.70 mg/kg 体重/日に相当し、雌で0.16、0.41、0.88 mg/kg 体重/日に相当した。最高用量では、雌の80%に門脈周囲肝細胞 (periportal hepatocytes)中のグリコーゲンのわずかな減少に関連する肝臓の脂肪沈着 (fat deposition) と空胞形成 (vacuolation) が認められた。血液学的パラメータと血液化学値への有害影響の報告はなかった。無影響量は0.13~0.16 mg/kg 体重/日であった。

13週間の毒性試験で、イヌにハロフジノン臭化水素酸塩を0、1.25、2.5、5 mg/kgの用量で混餌投与した。これは、塩基として表すと(expressed as base)¹、およそ0、0.034、0.067、0.134 mg/kg 体重/日に相当した。最高用量群にのみ平均赤血球容積の有意な減少が認められた。中用量群に認められた血液学的変化は生物学的変動の範囲内で、混餌投与で2.5 mg/kg(0.067 mg/kg 体重/日)の無影響量にとどまった。

26週の毒性試験で、イヌにハロフジノン臭化水素酸塩を0、1.25、2.5、5 mg/kgの用量で混餌投与した。これは、雄で0.045、0.086、0.16 mg/kg 体重/日に相当し、雌で0.039、0.075、0.17 mg/kg 体重/日に相当した。最高用量群で血液学的に有意な変化(平均赤血球容積の減少、平均赤血球ヘモグロビン濃度の低下、又は血色素量の低下)が認められた。他の2つの用量群に認められた血液学的変化は生物学的変動の範囲内で、混餌投与で2.5 mg/kg(0.075~0.086 mg/kg 体重/日)のNOELにとどまった。

8. 若齢子ウシ(投与開始時に4~10日齢)によるいくつかの耐性試験が行われた。子ウシにハロフジノンを推奨用量の範囲(0.1 mg/kg 体重/日を7日間)からこの用量の25倍に相当する用量までを強制経口投与した。

治療用量の15倍と25倍に相当する用量で死亡が認められた。給餌直後に投与した場合、ハロフジノン乳酸塩は、推奨用量の1、2、3倍で、可逆性の胃腸炎症性/壊死性の病変 (gastro-intestinal inflammatory/necrotic lesions) を誘発した。ハロフジノンによる作用の可能性を除外することはできない。しかしながら、治療量では、本製品は臨床的には十分に耐性がある。

もう1つの耐性試験では、雄の未哺乳の子ウシ(出生後24~66時間)に推奨用量(0.10 mg ハロフジノン塩基/kg 体重/日を7日間)の0、1、2倍の製剤を経口投与した。最高用量群では25%の動物が死亡し、35日目に残りの60%の動物に回腸パイエル板 (ileal Peyer's patches) のリンパ球枯渇 (lymphocytic depletion) が認められた。推奨用量を投与された群では、化合物に関連する組織学的な所見は認められず、6頭のうち1頭の回腸パイエル板に軽度の枯渇が報告された。これらの結果からは、最高用量を投与した動物の免疫学的状態を、この物質の起こしうる影響として正式に結論づけることは出来なかった。

9. ハロフジノン臭化水素酸塩の生殖毒性試験がマウス、イヌ、ラットを用いて実施されている。

マウスに、ハロフジノン0、0.25、0.5、1 mg/kg 飼料(およそ0、0.034、0.063、0.126 mg/kg 体重/日に相当)を交配前7日間と交配後2週間にわたって混餌投与した。最大用量の1 mg/kg 飼料(0.126 mg/kg 体重/日)まで受胎率または飼育能力には有害影響は認められなかった。

ハロフジノン2.5、5 mg/kg 飼料(0.067、0.134 mg/kg 体重に相当)を混餌投与したイヌを用いた68週間試験では、投与した全ての動物の精巢の長さや幅が低下していた。受胎率の低下もみられた。これらは統計学的に有位な差ではないが、被験物質関連性、用量依存性があると考えられ、何らかの生物学的意義があると考えられることができる。NOELは設定できなかった。

¹ 専門家コメント：ハロフジノンは塩基であり、水素酸や乳酸と反応して塩を作るようであり、その塩として投与したうちの塩基の量として表した、という意味。

3世代試験では、マウスにハロフジノン 0.25、0.5、1 mg/kg 飼料(およそ 0、0.034、0.063、0.126 mg/kg 体重/日に相当)を混餌投与した。最高用量群の F₃ 児動物の体重に有意の低下が認められ、中用量群で一時的な体重の低下が認められた。雄親動物の体重は、中及び高用量群の F₀ 及び F₁、最高用量群の F₂ で対照群と比較して低かった。中及び高用量群の F₀ 雄親動物の低体重は対照群と比べて統計学的な有意差はなかったが、中及び高用量群の F₁ 雄親動物、最高用量群の F₂ 親動物の低体重は対照群と比べて統計学的に有意の差がみられた。F₁ 及び F₂ 雄動物の低体重は主に親動物として選抜される前(授乳中又は離乳直後)の低体重増加量に起因するものであるが、NOELは 0.25 mg/kg 飼料(0.034 mg/kg 体重/日)と判断された。

10. 先に報告された研究では、妊娠ラットにハロフジノン臭化水素酸塩を交配後 9、10、11、12、13、14 日に 9.33 mg/kg 体重の用量で単回強制経口投与、または 6 mg/kg 飼料(mg/kg 体重では記載されていない)の用量を交配後 10 日～20 日までの混餌投与試験が実施されている。児動物に有害な影響はなかった。本試験の報告の記載は不十分で、欧州共同体における医薬品に関する規則(the Rules Governing Medicinal Products in the European Community)の Volume VI の要求事項に従っていないため、この試験から NOEL は設定できない。

新たに提出された催奇形性試験では、ハロフジノン臭化水素酸塩を交配した雌ラットに 0、0.17、0.34、0.67 mg/kg 体重/日の用量で妊娠 6 日～17 日まで強制経口投与した。母体毒性として死亡、臨床症状の変化、流産が最高用量群で認められている。母体毒性の NOEL は 0.34 mg/kg 体重/日であった。ハロフジノン臭化水素酸塩はラットにおいて、経口用量で最大 0.67 mg/kg 体重/日まで、胚/胎児毒性及び催奇形性を示さなかった。

ウサギを用いた催奇形性試験では、ハロフジノン臭化水素酸塩をウサギの妊娠 6 日から 18 日に 0、0.0084、0.025、0.076 mg/kg 体重/日の用量で強制経口投与した。最高用量で母体毒性として死亡、低体重、低妊娠率が認められた。母体毒性の NOEL は 0.025 mg/kg 体重/日であった。ハロフジノン臭化水素酸塩は、ウサギにおいて、経口用量で最大 0.076 mg/kg 体重/日まで、胚/胎児毒性及び催奇形性を示さなかった。

11. ハロフジノンとその 2 種の塩類の変異原性が検討された。

ほとんどの試験の報告は不十分であったが、ハロフジノン(塩類は明記されず)は 3 種の *in vitro* 試験(マウスリンフォーマ試験、*in vitro* 染色体異常試験(培養ヒトリンパ球)、ヒト上皮細胞による DNA 修復試験と、3 種の *in vivo* 試験(マウスの *in vivo* 骨髄小核試験、ラット *in vivo* 分裂中期試験、マウス宿主経路試験))において陰性の結果であったと結論することができる。ハロフジノンは、*Salmonella typhimurium* TA1538 において代謝活性存在下で 1,000 µg/プレート、TA98 において代謝活性存在下と非存在下でハロフジノン臭化水素酸塩 1,000 µg/プレート以上の用量で行われたエームス試験では、陽性の結果であった。

ハロフジノン乳酸塩では、エームス試験とマウスでの *in vivo* 骨髄小核試験の 2 つの試験のみが報告された。ハロフジノン乳酸塩は、*Salmonella typhimurium* TA98 において代謝活性存在下と非存在下で 1,000 µg/プレートの用量で行った *in vitro* 試験でのみ陽性反応を示した。

エームス試験で用量依存性ではない復帰突然変異株が認められ、遺伝子の突然変異を検出するマウスリンフォーマ試験は陰性であったことから、委員会はハロフジノンの遺伝毒性の可能性は低いと結論した。

12. Swiss マウスを起源とする系統で発がん性試験が行われた。ハロフジノン臭化水素酸塩を 0.03、0.07、0.24 mg/kg 体重/日相当の用量で混餌投与した。発がん性は認められなかった。

Sprague-Dawley ラットにハロフジノン(塩の記載なし)を 0.29～0.36 mg/kg 体重/日の用量で 63 週

間経口で混餌投与した結果、投与に関連した病理組織学的変異は認められず、肝腫瘍の発症率の増加もなかった。

26ヶ月の長期毒性/発がん性試験で、Sprague-Dawley ラットにハロフジノン臭化物を 0、2.5、5、10 mg/kg の用量で混餌投与し、雄は 0、0.09、0.18、0.36 mg/kg 体重/日相当、雌は 0、0.11、0.23、0.47 mg/kg 体重/日相当であった。血液学的結果と組織学的結果に基づき、毒性学的の無影響量は混餌投与で 2.5 mg/kg、すなわち 0.09~0.18 mg/kg 体重/日となった。対照群との比較では、腫瘍発生率の増加や投与特異的な腫瘍は認められなかった。ハロフジノンはどのような発がん性も示さなかった。

ハロフジノンはマウスとラットにおいてどのような発がん性も示さなかった。

- 13 ハロフジノンについて、ヒトと子ウシの腸内細菌叢 (gut flora) の典型である 135 種類の好気性微生物と 75 種類の嫌気性微生物に対する微生物活性について *in vitro* で試験が行われた。ヒトと子ウシの腸内細菌叢へ有意な影響は認められず、最少発育阻止濃度 MIC 値は試験された過半数の系統で 128 µg/ml より高かった。
- 14 モルモットにより、皮膚感作性試験の Buehler 変法が実施された。ハロフジノンの感作性に起因する皮膚反応は認められなかったが、Magnusson と Kligman のマキシミゼーション法では、遅延型接触過敏症に起因するわずかな皮膚反応が 35%の動物に見られた。
- 15 ハロフジノンとその 2 種類の塩を剃毛したウサギの皮膚と眼粘膜に塗布した場合は、遅延性の全身毒性影響を起こし、刺激作用があった。
- 16 本化合物はヒトでは使用されないため、ヒトの所見に関するデータは入手できない。
- 17 ラット、イヌとマウスで実施された 8 つの毒性試験のうちの 6 つにおいて、無影響量は同じ大きさで、0.070 mg/kg 体重/日以下であった。しかし、マウスで実施された 3 世代試験とウサギで実施された催奇形性試験で、無影響量はそれぞれ 0.0334 と 0.025 mg/kg 体重/日であった。その結果、0.03 mg/kg 体重/日の無影響量と安全係数 100 を適用し、おおよその毒性 ADI は 0.30 µg/kg 体重/日、すなわち 18 µg/ヒトを確立することができる。毒性試験は臭化水素酸塩で行われてきたが、これらの試験は雌雄両方で行われたため、それ以上の係数は使われなかった。
- 18 2 つの組織消失試験が 1 週齢と 3 週齢の未反芻子ウシにおいて実施された。

放射性試験では、ハロフジノン乳酸塩を推奨用量(0.10 mg のハロフジノン塩基/kg 体重/日を 7 日間)の ¹⁴C-ハロフジノン乳酸塩で 3 頭の子ウシに経口投与し、投与 6、24 と 48 時間後に屠殺した。経口投与後、24 時間と 48 時間で、非常に少量の総残留物が食用組織において測定された。すなわち、筋肉と脂肪に 40 µg 相当のハロフジノン/kg、肝臓に 500 µg/kg、腎臓に 300 µg/kg であった。これらのデータは屠殺時間あたり 1 頭の動物から得られたものであるため、個体差に関する結論は得られない。

総放射能の 68~95%を、溶媒によって組織から抽出することが出来た。

全ての組織で、¹⁴C-ハロフジノンが主要な放射性化合物として同定され、筋肉、脂肪および腎臓では総放射能の約 60%に、並びに肝臓では 52.6%に相当した。

親化合物は残留マーカでありえた。

非放射性消失試験でハロフジノン乳酸塩を 16 頭の子ウシに 0.1 mg のハロフジノン塩基/kg 体重/日の推奨用量で 7 日間、経口投与した。子ウシは 4 つの群として屠殺した。最終投与 6 時間後

で、ハロフジノンが筋肉中に 90 µg/kg、脂肪中に 220 µg/kg、肝臓中と腎臓中に 500 µg/kg が測定された。5 日の休薬期間で、ハロフジノンの残留物は肝臓と腎臓で 50 µg/kg、筋肉と脂肪で 25 µg/kg 未満であった。7 日の休薬期間で、ハロフジノンの残留物は筋肉(30 µg/kg)を除く全ての食用組織で 50 µg/kg 台であった。

- 19 UV 検出の HPLC 法はルーチン分析法として提案された。全ての検証パラメータは欧州共同体における医薬品に関する規則の Volume VI の勧告に従って測定された。提案された分析方法は全ての可食組織に対して適切に検証されたと結論された。定量限界は筋肉で 5 µg/kg、肝臓、腎臓と脂肪で 10 µg/kg である。

結論および勧告

以下のことを認めた。

- ハロフジノンの毒性学的 ADI は 0.30 µg/kg 体重(すなわち 18 µg/ヒト)を確立した。
- 消失試験では、可食組織のハロフジノンの濃度は提案されているルーチン分析方法よりも感受性の低い分析方法で試験を行い、組織の分布を詳細に考察することはできなかった。
- ハロフジノンを投与中または直後に屠殺する可能性が低い日齢 4 日～15 日の未反芻子ウシへの使用の示唆。
- 親化合物は標識残留物として保持され、投与後最大 48 時間で筋肉、脂肪と腎臓の総残留物の 60%、肝臓の 52.6%が保持される。
- 提案された分析方法は筋肉、肝臓と腎臓で検証され、脂肪は検証中である。分析方法の定量限界と可食組織のハロフジノンの測定方法は現在の CVMP のアプローチ(LOQ の 2 倍)に従って暫定 MRLs を決定するのに十分である。

動物医薬品委員会は下表に従い、ハロフジノンを委員会規則(EEC) No 2377/90 附属書(Annex) I に含めることを勧告する。

薬理的活性物質	標識残留物	動物種	MRLs	標的組織	その他条件
ハロフジノン	ハロフジノン	ウシ属	10 µg/kg 25 µg/kg 30 µg/kg 30 µg/kg	筋肉 脂肪 肝臓 腎臓	暫定 MRLs は 2001 年 1 月 1 日に期限切れとなる。

これら MRLs 値に基づき、一日摂取量は ADI の約 85%を意味する。

動物用医薬品委員会がハロフジノン委員会規則(EEC)No2377/90 附属書(Annex)I に含める前に、質問リストに含まれる点に取り組みなければならない。

質問リスト

1. 申請者は、日齢 4 日から 15 日の非反すう子ウシで、治療用量の推奨用法による、より長期の休薬期間で標識残留物に対する総残留物の比率を測定しより長期の休薬期間での親化合物の濃度を測定する追加の残留物試験を提出しなければならない。これらの試験は、各屠殺時につき十分な数の動物種で行われなければならない。
2. 申請者は、欧州共同体における医薬品に関する規則の Volume VI に従い、全てのウシの可食組織についてルーチンの分析方法の検証を完了しなければならない。全ての原資料データは提供され、提供される分析方法は ISO 78/2 で認められたフォーマットに従って提出されなくてはならない。

原文目次

SUMMARY REPORT(1)	1
Conclusions and recommendation.....	6
LIST OF QUESTIONS	7

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
AUC	area under the blood concentration time curve	血中濃度曲線下面積
CVMP	Committee for Medicinal Products for Veterinary Use	動物用医薬品委員会
GLP	Good Laboratory Practice	優良試験所基準
ISO	International Organization for Standardization	国際標準化機構
LOQ	Limit of Quantification	定量下限
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

ハロフジノンの毒性試験と結果の概要一覧

(評価書 : EMA, Halofuginone: Summary report (2) - Committee for Veterinary Medicinal Products)

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)	マウス		ハロフジノン臭化水素酸塩および乳酸塩 LD ₅₀ : およそ 30 mg/kg 体重	2	2
急性毒性 (経口)	ラット		ハロフジノン臭化水素酸塩および乳酸塩 LD ₅₀ : およそ 5 mg/kg 体重	2	2
急性毒性 (吸入)	ラット		ハロフジノン LC ₅₀ : 53 µg/l	2	2
急性毒性 (経皮)	ウサギ		ハロフジノン LD ₅₀ : 16 mg/kg 体重	2	2
急性毒性 (経口)	マウス		シス異性体 LD ₅₀ : およそ 430 mg/kg 体重	2	2
亜急性毒性 (経口)	マウス	ハロフジノン塩基で 0.070、0.160、0.350 mg/kg 体重/日 混餌投与 4 週間	ハロフジノン臭化水素酸塩および乳酸塩 NOEL : 0.070 mg/kg 体重/日 (両方の塩について) <ul style="list-style-type: none"> 0.160、0.350 mg/kg 体重/日群以上 : 血液学的に有意な変動(細胞容積、平均赤血球容積と平均赤血球ヘモグロビン)。 0.350 mg/kg 体重/日群: 雄マウスの血液化学的な変動 (尿素とコレステロール)。 	3	3
亜急性毒性 (経口)	ラット	ハロフジノン臭化水素酸塩 0、2、5、10 mg/kg 混餌投与 13 週間	NOEL : 0.13 ~ 0.16 mg/kg 体重/日 <ul style="list-style-type: none"> 10 mg/kg 群 : 雌の 80%に門脈周囲肝細胞中のグリコーゲンのわずかな減少に関連する肝臓の脂肪沈着、空胞形成。 血液学的パラメータと血液化学値への有害影響の報告なし。 	3	3
亜急性毒性 (経口)	イヌ	ハロフジノン臭化水素酸塩 0、1.25、2.5、5 mg/kg 混餌投与 13 週間	NOEL : 飼料中濃度 2.5 mg/kg (0.067 mg/kg 体重/日) <ul style="list-style-type: none"> 5 mg/kg 群 : 平均赤血球容積の有意な減少。 	3	3
慢性毒性 (経口)	イヌ	ハロフジノン臭化水素酸塩 0、1.25、2.5、5 mg/kg 混餌投与 26 週間	NOEL : 飼料中濃度 2.5 mg/kg (0.075 ~0.086 mg/kg 体重/日) <ul style="list-style-type: none"> 5 mg/kg 群 : 血液学的に有意な変化(平均赤血球容積の減少、平均赤血球ヘモグロビン濃度の低下、血色素量の低下)。 	3	3

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)
その他： 耐性試験 (経口)	若齢子 ウシ	推奨用量 (0.1mg/kg 体 重/日、7 日間) ～この 25 倍 強制経口投与	<ul style="list-style-type: none"> 15 倍、25 倍相当量：死亡あり。 給餌直後に投与した場合、ハロフジノン乳酸塩は、推奨用量の 1、2、3 倍で、可逆性の胃腸炎症性/壊死性の病変を誘発。 	3	3
その他： 耐性試験 (経口)	未哺乳 の子ウシ (雄)	推奨用量(0.10 mg ハロフジ ノン塩基/kg 体 重/日を 7 日 間)の 0、1、2 倍	<p>2 倍群： 25%の動物が死亡、35 日目に残りの 60% の動物に回腸パイエル板のリンパ球枯渇あり。</p> <p>推奨用量群：投与に関連する組織学的な所見なし、6 頭のうち 1 頭の回腸パイエル板に目立たない枯渇あり。</p>	3	3
生殖毒性 (経口)	マウス	ハロフジノン 0、0.25、0.5、1 mg/kg 飼料 混餌投与 交配前 7 日間 +交配後 2 週 間	最高用量の 1 mg/kg 飼料(0.126 mg/kg 体重/日)まで、受胎率または飼育能力には有害影響なし。	4	4
生殖毒性 (経口)	イヌ	ハロフジノン 2.5、5 mg/kg 飼 料 混餌投与 68 週間	NOEL は設定できなかった。 全ての動物において、精巣の長さ と幅が低下。受胎率の低下もみられ た。これらは統計学的に有意な差で はないが、被験物質関連性、用量依 存性があると考えられ、何らかの生 物学的意義があると考えることがで きる。	4	4
生殖毒性 (経口)	マウス	ハロフジノン 0.25、0.5、1 mg/kg 飼料 混餌投与 3 世代	<p>NOEL：0.25 mg/kg 飼料(0.034 mg/kg 体重/日)</p> <ul style="list-style-type: none"> 1 mg/kg 群：F3 児動物の体重が有意に低下、F2 雄親動物の体重が有意に低。 0.5 mg/kg 群：一時的な体重の低下。F1 雄親動物の体重が有意に低。 0.25 mg/kg 群：F1 雄親動物の体重が有意に低。 <p>※F1 および F2 雄動物の低体重は主に親動物として選抜される前(授乳中または離乳直後)の低体重増加量に起因するものであるが、NOEL は 0.25 mg/kg 飼料とされた。</p>	4	4
生殖毒性 (経口)	妊 娠 ラ ット	ハロフジノン 臭化水素酸塩 9.33 mg/kg 体 重 単回強制経口 投与	児動物に有害な影響なし。 (本試験の報告の記載は不十分であ り、NOEL は設定できない)	4	4

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)
生殖毒性 (経口)	妊 娠 ラ ット	ハロフジノン 臭化水素酸塩 6 mg/kg 飼料混 餌投与 交配後 10 日～ 20 日	児動物に有害な影響なし。 (本試験の報告の記載は不十分であ り、NOEL は設定できない)	4	4
生殖毒性 (経口)	ラット	ハロフジノン 臭化水素酸塩 0、0.17、0.34、 0.67mg/kg 体重 /日 強制経口投与 妊娠 6 日～17 日	母体毒性の NOEL : 0.34 mg/kg 体重/ 日 ・ 0.67 mg/kg 体重/日群 : 死亡、臨 床症状の変化、流産の母体毒性 あり。 ・ 最大 0.67 mg/kg 体重/日まで、胚 /胎児毒性および催奇形性は認め られなかった。	4	4
生殖毒性 (経口)	ウサギ	ハロフジノン 臭化水素酸塩 0、0.0084、 0.025、0.076 mg/kg 体重/日	母体毒性の NOEL : 0.025 mg/kg 体重 /日 ・ 0.076 mg/kg 体重/日 : 母体毒性と して死亡、低体重、低妊娠率 が 認められた。 ・ 最大 0.076 mg/kg 体重/日まで、 胚/胎児毒性および催奇形性は認 められなかった。	4	4
遺伝毒 性 : <i>in</i> <i>vitro</i> マウ スリンフ オーマ試 験			陰性	4	4
遺伝毒 性 : <i>in</i> <i>vitro</i> 染 色体異常 試験	培 養 ヒ ト リ ン パ 球		陰性	4	4
遺伝毒 性 : <i>in</i> <i>vitro</i> DNA 修 復試験	ヒト上 皮細胞		陰性	4	4
遺伝毒性 の <i>in vivo</i> 骨髄小核 試験	マウス		陰性	4	4
遺伝毒 性 : <i>in</i> <i>vivo</i> 分 裂中期試 験	ラット		陰性	4	4
遺伝毒 性 : <i>in</i> <i>vivo</i> 宿主 経由試験	マウス		陰性	4	4

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)
遺伝毒性：エームス試験	<i>Salmonella typhimurium</i> TA1538	1000 μ g/プレート	陽性（代謝活性存在下）	4	4
遺伝毒性：エームス試験	<i>Salmonella typhimurium</i> TA98	ハロフジノン臭化水素酸塩 1000 μ g/プレート以上	陽性（代謝活性存在下と非存在下）	4	4
遺伝毒性：エームス試験	<i>Salmonella typhimurium</i> TA98	ハロフジノン乳酸塩 1000 μ g/プレート	陽性	5	4
遺伝毒性： <i>in vivo</i> 骨髄小核試験	マウス	ハロフジノン乳酸塩	陰性	5	4
発がん性	マウス	ハロフジノン臭化水素酸塩 0.03、0.07、0.24 mg/kg 体重/日 混餌投与	発がん性なし。	5	5
発がん性	ラット	ハロフジノン（塩の記載なし） 0.29～0.36 mg/kg 体重/日 混餌投与 63 週間	<ul style="list-style-type: none"> 投与に関連した病理組織学的変異なし。 肝腫瘍の発症率の増加なし。 	5	5
発がん性	ラット	ハロフジノン臭化物 0、2.5、5、10 mg/kg 混餌投与	<ul style="list-style-type: none"> 毒性学的 NOEL：混餌投与で 2.5 mg/kg、すなわち 0.09～0.18 mg/kg 体重/日（血液学的結果と組織学的結果に基づく）。 発がん性なし。 	5	5
皮膚感作性	モルモット		<ul style="list-style-type: none"> Buehler 変法では、ハロフジノンの感作性に起因する皮膚反応なし。 マキシマイゼーション法では、遅延型接触過敏症に起因するわずかな皮膚反応が 35%の動物に見られた。 	5	5
皮膚刺激性	ウサギ	剃毛皮膚に塗布	遅延性の全身毒性影響を起こし、刺激作用があった。	5	5
眼刺激性	ウサギ	眼粘膜に塗布	遅延性の全身毒性影響を起こし、刺激作用があった。	5	5

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)
ADI	ヒト		<p>おおよその毒性 ADI : 0.30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日 (18 $\mu\text{g}/\text{人}$) (NOEL : 0.03 mg/kg 体重/日に安全係数 100 を適用して算出)。</p> <ul style="list-style-type: none">・ ラット、イヌ、マウスで実施された 8 つの毒性試験のうちの 6 つで、NOEL は 0.070 mg/kg 体重/日以下。・ マウスでの 3 世代試験での NOEL は 0.0334 mg/kg 体重/日。・ ウサギでの催奇形性試験で NOEL は 0.025 mg/kg 体重/日。	5	5

動物用医薬品委員会

ハロフジノン

サマリー・レポート (2)

(原文、1 ページ)

1. ハロフジノンはフェブリフジン(febrifugine)から生じる合成製品である。ハロフジノンはキナゾロン類(quinazolone group)に属する化学物質である。trans-ハロフジノンが活性成分で、不純物として cis-異性体が存在する。現在用法が限られているハロフジノン乳酸塩は、0.10 mg/kg 体重/日相当のハロフジノンを7日間、経口治療計画(oral therapeutic regimen)により、日齢4日から15日の未反すうの子ウシにおける *Cryptosporidium parvum* を原因とする下痢の予防を対象とするものである。

ハロフジノン臭化水素酸塩は、休薬期間5日間のブロイラーやシチメンチョウ用の抗コクシジウム飼料添加剤として、委員会指令70/524/EECを改正した1993年4月12日の委員会指令91/248/ECに登録された。

ハロフジノンは現在下表の通り委員会規則(EEC) No.2377/90の附属書(Annex)IIIに記載される。

薬理的活性物質	標識残留物	動物種	MRLs	標的細胞	その他条件
ハロフジノン	ハロフジノン	ウシ属	10 µg/kg 25 µg/kg 30 µg/kg 30 µg/kg	筋肉 脂肪 肝臓 腎臓	暫定 MRLs は 2001年1月1日に 期限切れとなる。

ハロフジノンを委員会規則(EEC) No. 2377/90 附属書(Annex)I に含めるため、追加の情報が提供された。

2. 提供された試験の殆どはハロフジノンの乳酸塩と臭化水素酸塩の2種類の塩類で行われた。試験結果を比較するために、用量はハロフジノン塩基の相当量で表された。
3. *in vitro* 試験では、ハロフジノンは *Babesia equi* に感染したリンパ芽球様細胞(lymphoblastoid cells)の細胞分裂速度を阻害した。ハロフジノンは、細胞寄生複合体の全体を破壊することにより、*Theileria parva* 形質転換細胞に効果を発揮する。電子顕微鏡試験では *Theileria parva* に感染した子ウシのリンパ節で、ハロフジノンは感染細胞にのみ作用することが示された。

公表されたデータでは、ハロフジノンは鳥類とヒト(正常なヒトと強皮症の患者)の皮膚線維芽細胞において、低濃度で(それぞれ 10^{-11} 、 10^{-10} 、 10^{-9} M)で、コラーゲン α1 (1)の遺伝子発現とコラーゲン合成を特異的にそして一時的に阻害することを示した。

4. 静脈内投与後、ハロフジノン(塩は明記されず)はネコ(3 mg/kg 体重相当又はそれ以上の用量)とラット(0.3 mg/kg 体重以上の用量)の心血管系に作用した。マウス(ハロフジノン塩基の経口用量は1~100 mg/kg 体重の範囲)の中樞神経系への影響と、リスザル(ハロフジノン塩基の静脈内用量は1 mg/kg 体重以上)の中樞神経系への一過性の影響が認められた。

^{14}C -ハロフジノン臭化水素酸塩を0.25 mg/kg 体重でマウスに経口投与後、投与した用量の82.7%は48時間以内に主に糞便中に排出(65%)された。この放射能の約90%は未変化のハロフジノンに相当した。投与後、肝臓の放射能濃度は24時間でハロフジノン220 µg/kg 相当だったものが48時間で130 µg/kg に低下した。

ラットでは、経口投与量(5 mg ^{14}C ハロフジノン臭化水素酸塩/kg 体重)の約 78%が 24 時間以内に主に糞便中に(60%)回収された。排泄物の放射性化合物についての情報は提供されていない。

生物学的利用率試験で、1 群 3 匹のラット 5 群に ^{14}C ハロフジノンを単回経口投与した。第 1 群は水溶液中 0.050 mg/kg の ^{14}C ハロフジノン、第 2 群は対照ニワトリ肝臓に取り込んだ 0.063 mg/kg の ^{14}C ハロフジノン、第 3 群はハロフジノンを投与したニワトリ肝臓ホモジネート中の 0.160 mg 相当の ^{14}C ハロフジノン、第 4 群は(ハロフジノンを)投与したニワトリ肝臓から抽出した 0.022 mg/kg 相当の ^{14}C ハロフジノン、第 5 群は(ハロフジノンを投与した)ニワトリ胆汁から抽出した 0.150 mg/kg 相当の ^{14}C ハロフジノン、である。水溶液としてラットに投与された ^{14}C ハロフジノンの総放射能の 93.2%が 72 時間で排出され、その他の経口処方では 98~99.4%が排出された。

胆管にカニューレを挿入したラットで、尿と胆汁から排出された放射能の割合の合計から評価される経口生物学的利用率は、 ^{14}C ハロフジノンを水溶液として投与した場合、又はハロフジノンを投与したニワトリの肝臓ホモジネートとして投与した場合で、それぞれ 44%と 36%であった。薬剤ハロフジノンを投与したニワトリから得た肝臓抽出物の胆汁のみの場合、生物学的利用率は低かった(18%)。しかし、提供された情報はハロフジノンとその代謝物の本当の生物学的利用率について結論づけるには不十分であった。

- 3 頭の 1 週齢の未反芻雄子ウシ(ヘレフォード種とホルスタイン種の交雑種)に ^{14}C -ハロフジノン乳酸塩(ハロフジノン塩基として 0.10 mg/kg 体重)を 7 日間投与した研究では、子ウシにおけるハロフジノン乳酸塩の排出は主に尿中であることが示された。最終投与後から屠殺までの間における放射能の尿中排出は、7 回目に投与した放射能の 10.0%(6 時間)、20%(24 時間)と 92%(48 時間)を示した。動物数が少なかったため(尿全体の収支 (complete balance) は 1 頭の結果から得られた)、そして回収された放射能の割合は 7 回目に投与された用量との比較に基づくため、この代謝試験は慎重に検討されなければならない。子ウシにおいて収支を合わせることはできない。

血漿では、ハロフジノンは総放射能の 6.5~10%しか示さなかった。ハロフジノン乳酸塩は吸収されたが、この吸収量は定量化できなかった。

もう一つの試験では、3 週齢の子ウシに推奨治療用量(0.10 mg ハロフジノン塩基/kg 体重/日)のハロフジノン乳酸塩を 7 日間、経口投与した。血漿中のハロフジノンの最高濃度(9 $\mu\text{g/l}$)は 7 回目の投与後 6 時間目に認められた。ハロフジノン濃度はその後低下し、最終投与の 7 日までに検出されなくなった(定量限界 1 $\mu\text{g/l}$)。

新たに提出された薬物動態試験では、体重 52.6 kg の 22~32 日齢の子ウシ 8 頭に、推奨治療量のハロフジノン乳酸塩(0.10 mg ハロフジノン塩基/kg 体重/日)を 7 日間、経口投与した。血漿中のハロフジノンの最高濃度(6.66 $\mu\text{g/l}$)は 7 回目の投与後 8 時間目に認められた。その後、血漿の濃度は最終投与後 36 時間で 2.3 $\mu\text{g/l}$ に減少し、その後のサンプリング時には定量限界以下(1 $\mu\text{g/l}$)まで低下した。平均の終末半減期 (mean terminal half-life) は 32.8 時間だった。これらの実験条件下では、蓄積は立証されなかった。しかしながら、個体差が大きく、ハロフジノンは半数の動物の血漿から検出されなかったため、この結果は慎重にとりあつかわれるべきである。

新たに提出された GLP 適合のクロスオーバー薬物動態試験では、8 頭の子ウシ(初回投与の初日で 10~15 日齢と 2 回目投与の初日で 17~22 日齢)に推奨用量(0.10 mg ハロフジノン塩基/kg 体重/日; 平均体重は 45 kg)のハロフジノン乳酸塩を静脈内投与又は経口投与した。静脈内投与後、排出半減期は 11.66 時間で、全身クリアランスは 0.6 l/kg 時間、平均滞留時間は 16.7 時間であった。単回経口投与後、血漿中ハロフジノンの最高濃度(4.12 $\mu\text{g/l}$)が投与後 11 時間でみられた。経口投与の排出半減期(30.84 時間)は静脈内投与後に算出されたものより 3 倍高かった。それは、消化管での吸収過程が律速段階となり、みかけ上血液からの消失が遅延したように見える現象(flip-flop)現象が存在し、吸収相がハロフジノンの薬物動態学的挙動を制限する過程であることを意味する。経口の生物

学的利用率は 81.1%であった。これらの薬物動態学的パラメータを使って、反復投与のシミュレーションによりこれら若齢子ウシにおけるハロフジノンの蓄積可能性が示された。動物の年齢と体重がハロフジノンの蓄積に影響するかもしれない。

6. ハロフジノン臭化水素酸塩と乳酸塩の経口急性毒性がマウス、ラットとウサギで検討された。両塩の LD₅₀はラットでおよそ 30 mg/kg 体重、マウスで 5 mg/kg 体重であった。ラットでは、ハロフジノンの粉塵の吸入後、LC₅₀は 53 µg/l と決定された。ウサギの経皮 LD₅₀は 16 mg/kg 体重であった。シス異性体は、有効成分の毒性の 100分の1であった(マウスの経口 LD₅₀はおよそ 430 mg/kg 体重)。
7. ハロフジノン臭化水素酸塩と乳酸塩の 2 種類のハロフジノン塩でラットとイヌによるいくつかの経口反復投与毒性試験が行われた。

生物学的同等性試験で、マウスにハロフジノン臭化水素酸塩または乳酸塩を 2 mg ハロフジノン塩基/kg 体重の用量で単回経口投与した。個体差が大きいため、2 種類の塩の生物学的同等性を薬物動態的観点から結論することは不可能である。ハロフジノン臭化水素酸塩と乳酸塩の平均 AUC_{0-8h}値はマウスの雄雌でそれぞれ 103.37 µg.h/l と 82.65 µg.h/l であった。雄では、2 種類の塩の AUC は同じであったが、(両塩とも 83 µg.h/l)、雌ではハロフジノン乳酸塩の AUC(157 µg.h/l)はハロフジノン臭化水素酸塩(97.40 µg.h/l)よりも高かった。しかし、毒性学的観点から、試験は雄雌の両方で行われたので、臭化水素酸塩について得られた結果を、乳酸塩の安全性プロファイル確立にあたって考慮することができる。

2 つの 4 週間の混餌投与毒性試験で、マウスにハロフジノン臭化水素酸塩と乳酸塩を 0.07、0.16、0.35 mg ハロフジノン塩基/kg 体重/日の用量で投与した。高用量の 2 群で、血液学的に有意な変動(細胞容積、平均赤血球容積と平均赤血球ヘモグロビン)が報告された。最高用量で、雄マウスの血液化学的な変動(尿素とコレステロール)がみられた。両方の塩に同じ毒性学的プロファイルが認められ、同じ無影響量(0.070 mg/kg 体重/日)であった。

13 週間の毒性試験で、ラットにハロフジノン臭化水素酸塩を 0、2、5、10 mg/kg の用量で混餌投与した。これは雄で 0.13、0.33、0.70 mg/kg 体重/日及び雌で 0.16、0.41、0.88 mg/kg 体重/日に相当した。最高用量では、雌の 80%に門脈周囲肝細胞 (periportal hepatocytes) 中のグリコーゲンのわずかな減少に関連する肝臓の脂肪沈着 (fat deposition) と空胞形成 (vacuolation) が認められた。血液学的パラメータと血液化学値への有害影響の報告はなかった。無影響量は 0.13~0.16 mg/kg 体重/日であった。

13 週間の毒性試験で、イヌにハロフジノン臭化水素酸塩を 0、1.25、2.5、5 mg/kg の用量で混餌投与した。これは、塩基として表すと (expressed as base)¹、およそ 0、0.034、0.067、0.134 mg/kg 体重/日に相当した。最高用量群にのみ平均赤血球容積の有意な減少が認められた。中用量群に認められた血液学的変化は生物学的変動の範囲内で、混餌投与で 2.5 mg/kg(0.067 mg/kg 体重/日)の無影響量にとどまった。

26 週の毒性試験で、イヌにハロフジノン臭化水素酸塩を 0、1.25、2.5、5 mg/kg の用量で混餌投与した。これは、雄で 0.045、0.086、0.16 mg/kg 体重/日及び雌で 0.039、0.075、0.17 mg/kg 体重/日に相当した。最高用量群で血液学的に有意な変化(平均赤血球容積の減少、平均赤血球ヘモグロビン濃度の低下、または血色素量の低下)が認められた。他の 2 つの用量群に認められた血液学的変化は生物学的変動の範囲内で、混餌投与で 2.5 mg/kg(0.075~0.086 mg/kg 体重/日)の NOEL にとどまった。

8. 若齢子ウシ(投与開始時に 4~10 日齢)によるいくつかの耐性試験が行われた。子ウシにハロフジノン

¹ 専門家コメント：ハロフジノンは塩基であり、水素酸や乳酸と反応して塩を作るようであり、その塩として投与したうちの塩基の量として表した、という意味。

を推奨用量の範囲(0.1 mg/kg 体重/日を7日間)からこの用量の25倍に相当する用量までを強制経口投与した。

治療用量の15倍と25倍に相当する用量で死亡が認められた。給餌直後に投与した場合、ハロフジノン乳酸塩は、推奨用量の1、2、3倍で、可逆性の胃腸炎症性/壊死性の病変 (gastro-intestinal inflammatory/necrotic lesions) を誘発した。ハロフジノンによる作用の可能性を除外することはできない。しかしながら、治療量では、本製品は臨床的には十分に耐性がある。

もう一つの耐性試験では、雄の未哺乳の子ウシ(出生後24~66時間)に推奨用量(0.10 mg ハロフジノン塩基/kg 体重/日を7日間)の0、1、2倍の製剤を経口投与した。最高用量群では25%の動物が死亡し、35日目に残りの60%の動物に回腸パイエル板 (ileal Peyer's patches) のリンパ球枯渇 (lymphocytic depletion) が認められた。推奨用量を投与された群では、化合物に関連する組織学的な所見は認められず、6頭のうち1頭の回腸パイエル板に軽度の枯渇が報告された。これらの結果からは、最高用量を投与した動物の免疫学的状態が、この物質の起こしうる影響として正式に結論づけることは出来なかった。

9. ハロフジノン臭化水素酸塩の生殖毒性試験がマウス、イヌ、ラットを用いて実施されている。

マウスに、ハロフジノン 0^{*}、0.25、0.5、1 mg/kg 飼料(およそ0、0.034、0.063、0.126 mg/kg 体重/日に相当)を交配前7日間と交配後2週間にわたって混餌投与した。最大用量の1 mg/kg 飼料(0.126 mg/kg 体重/日)まで受胎率又は飼育能力には有害影響は認められなかった。

ハロフジノン 2.5、5 mg/kg 飼料(0.067、0.134 mg/kg 体重に相当)を混餌投与したイヌを用いた68週間試験では、投与した全ての動物の精巢の長さや幅が低下していた。受胎率の低下もみられた。これらは統計学的に有意な差ではないが、被験物質関連性、用量依存性があると考えられ、何らかの生物学的意義があると考えられることができる。NOELは設定できなかった。

3世代試験では、マウスにハロフジノン 0、0.25、0.5、1 mg/kg 飼料(およそ0、0.034、0.063、0.126 mg/kg 体重/日に相当)を混餌投与した。最高用量群のF₃児動物の体重に有意の低下が認められ、中用量群で一時的な体重の低下が認められた。雄親動物の体重は、中及び高用量群のF₀及びF₁、最高用量群のF₂で対照群と比較して低かった。中及び高用量群のF₀雄親動物の低体重は対照群と比べて統計学的な有意差はなかったが、中及び高用量群のF₁雄親動物、最高用量群のF₂親動物の低体重は対照群と比べて統計学的に有意の差がみられた。F₁及びF₂雄動物の低体重は主に親動物として選抜される前(授乳中又は離乳直後)の低体重増加量に起因するものであるが、NOELは0.25 mg/kg 飼料(0.034 mg/kg 体重/日)と判断された。

10. 先に報告された研究では、妊娠ラットにハロフジノン臭化水素酸塩を交配後9、10、11、12、13、14日に9.33 mg/kg 体重の用量で単回強制経口投与、又は6 mg/kg 飼料(mg/kg 体重では記載されていない)の用量を交配後10日~20日までの混餌投与試験が実施されている。児動物に有害な影響はなかった。本試験の報告の記載は不十分で、欧州共同体における医薬品に関する規則 (the Rules Governing Medicinal Products in the European Community) のVolume VIの要求事項に従っていないため、この試験からNOELは設定できない。

新たに提出された催奇形性試験では、ハロフジノン臭化水素酸塩を交配した雌ラットに0、0.17、0.34、0.67 mg/kg 体重/日の用量で妊娠6日~17日まで強制経口投与した。母体毒性として死亡、臨床症状の変化、流産が最高用量群で認められている。母体毒性のNOELは0.34 mg/kg 体重/日であった。ハロフジノン臭化水素酸塩はラットにおいて、経口用量で最大0.67 mg/kg 体重/日まで、胚/胎児毒性及び催奇形性は認められなかった。

* 原文に0はなかったが、前後から判断し追記した。

ウサギを用いた催奇形性試験では、ハロフジノン臭化水素酸塩をウサギの妊娠 6 日から 18 日に 0、0.0084、0.025、0.076 mg/kg 体重/日の用量で強制経口投与した。最高用量で母体毒性として死亡、低体重、低妊娠率が認められた。母体毒性の NOEL は 0.025 mg/kg 体重/日であった。ハロフジノン臭化水素酸塩は、ウサギにおいて、経口用量で最大 0.076 mg/kg 体重/日まで、胚/胎児毒性及び催奇形性は認められなかった。

11. ハロフジノンとその 2 種の塩類の変異原性が検討された。

ほとんどの試験の報告は不十分であったが、ハロフジノン(塩類は明記されず)は 3 種の *in vitro* 試験(マウスリンフォーマ試験、*in vitro* 染色体異常試験(培養ヒトリンパ球)、ヒト上皮細胞による DNA 修復試験と、3 種の *in vivo* 試験(マウスの *in vivo* 骨髄小核試験、ラット *in vivo* 分裂中期試験、マウス宿主経路試験))において陰性の結果であったと結論することができる。ハロフジノンは、*Salmonella typhimurium* TA1538 において代謝活性存在下で 1,000 µg/プレート、TA98 において代謝活性存在下と非存在下でハロフジノン臭化水素酸塩 1,000 µg/プレート以上の用量で行われたエームス試験では、陽性の結果であった。

ハロフジノン乳酸塩では、エームス試験とマウスでの *in vivo* 骨髄小核試験の 2 つの試験のみが報告された。ハロフジノン乳酸塩は、*Salmonella typhimurium* TA98 において代謝活性存在下と非存在下で 1,000 µg/プレートの用量で行った *in vitro* 試験でのみ陽性反応を示した。

エームス試験で用量依存性ではない復帰突然変異株が認められ、遺伝子の突然変異を検出するマウスリンフォーマ試験は陰性であったことから、委員会はハロフジノンの遺伝毒性の可能性は低いと結論した。

12. Swiss マウスを起源とする系統で発がん性試験が行われた。ハロフジノン臭化水素酸塩を 0.03、0.07、0.24 mg/kg 体重/日相当の用量で混餌投与した。発がん性は認められなかった。

Sprague-Dawley ラットにハロフジノン(塩の記載なし)を 0.29~0.36 mg/kg 体重/日の用量で 63 週間経口で混餌投与した結果、投与に関連した病理組織学的変異は認められず、肝腫瘍の発症率の増加もなかった。

26 ヶ月の長期毒性/発がん性試験で、Sprague-Dawley ラットにハロフジノン臭化物を 0、2.5、5、10 mg/kg の用量(雄では 0、0.09、0.18、0.36 mg/kg 体重/日及び雌では 0、0.11、0.23、0.47 mg/kg 体重/日相当)で混餌投与した。血液学的結果と組織学的結果に基づき、毒性学的の無影響量は混餌投与で 2.5 mg/kg、すなわち 0.09~0.18 mg/kg 体重/日となった。対照群との比較では、腫瘍発生率の増加や投与特異的な腫瘍は認められなかった。ハロフジノンはどのような発がん性も示さなかった。

ハロフジノンはマウスとラットにおいてどのような発がん性も示さなかった。

13. ハロフジノンについて、ヒトと子ウシの腸内細菌叢 (gut flora) の典型である 135 種類の好気性微生物と 75 種類の嫌気性微生物に対する微生物活性について *in vitro* で試験が行われた。ヒトと子ウシの腸内細菌叢へ有意な影響は認められず、最少発育阻止濃度 MIC 値は試験された過半数の系統で 128 µg/ml より高かった。

14. モルモットにより、皮膚感作性試験の Buehler 変法が実施された。ハロフジノンの感作性に起因する皮膚反応は認められなかったが、Magnusson と Kligman のマキシミゼーション法では、遅延型接触過敏症に起因するわずかな皮膚反応が 35%の動物に見られた。

15. ハロフジノンとその 2 種類の塩を剃毛したウサギの皮膚と眼粘膜に塗布した場合は、遅延性の全身毒性影響を起し、刺激作用があった。

- 16 本化合物はヒトでは使用されないため、ヒトの所見に関するデータは入手できない。
- 17 ラット、イヌとマウスで実施された 8 つの毒性試験のうちの 6 つにおいて、無影響量は同じ大きさで、0.070 mg/kg 体重/日以下であった。しかし、マウスで実施された 3 世代試験とウサギで実施された催奇形性試験で、無影響量はそれぞれ 0.0334 と 0.025 mg/kg 体重/日であった。その結果、0.03 mg/kg 体重/日の無影響量と安全係数 100 を適用し、おおよそその毒性学的 ADI は 0.30 µg/kg 体重/日、すなわち 18 µg/ヒトを確立することができる。毒性試験は臭化水素酸塩で行われてきたが、これらの試験は雌雄両方で行われたため、それ以上の係数は使われなかった。
- 18 1 つの放射性および 2 つの非放射性的組織消失試験が 1 週齢と 3 週～4 週齢の未反芻子ウシにおいて実施された。

放射性試験では、ハロフジノン乳酸塩を推奨用量(0.1 mg のハロフジノン塩基/kg 体重/日を 7 日間)の ¹⁴C-ハロフジノン乳酸塩で 3 頭の 1 週齢の子ウシに経口投与し、投与 6、24 と 48 時間後に屠殺した。経口投与後、24 時間と 48 時間で、非常に少量の総残留物が食用組織において測定された。すなわち、筋肉と脂肪に 40 µg 相当のハロフジノン/kg、肝臓に 500 µg/kg、腎臓に 300 µg/kg であった。これらのデータは屠殺時間あたり 1 頭の動物から得られたものであるため、個体差に関する結論は得られない。

総放射能の 68～95%を、溶媒によって組織から抽出することが出来た。

全ての組織で、¹⁴C-ハロフジノンが主要な放射性化合物として同定され、筋肉、脂肪及び腎臓では総放射能の約 60%に、並びに肝臓では 52.6%に相当した。

親化合物は残留マーカでありえた。

最初の非放射性消失試験でハロフジノン乳酸塩を 16 頭の 3 週齢の子ウシに 0.1 mg のハロフジノン塩基/kg 体重/日の推奨用量で 7 日間、経口投与した。子ウシは 4 つの群として屠殺した。最終投与後 6 時間で、ハロフジノンが筋肉中に 90 µg/kg、脂肪中に 220 µg/kg、肝臓中と腎臓中に 500 µg/kg が測定された。5 日の休薬期間で、ハロフジノンの残留物は肝臓と腎臓で 50 µg/kg、筋肉と脂肪で 25 µg/kg 未満であった。7 日の休薬期間で、ハロフジノンの残留物は筋肉(30 µg/kg)を除く全ての食用組織で 50 µg/kg 台であった。

二回目の非放射性消失試験では、ハロフジノン乳酸塩を 3～4 週齢のホルスタインの子ウシ群に推奨用量の 0.10 mg/kg 体重/日のハロフジノンを 7 日間経口投与した。子ウシは 5 頭/群で最終投与の後 5、10、15 日目に屠殺した。5 日の休薬期間で、5 頭のうち 3 頭の筋肉で測定されたハロフジノンの最高濃度は 10 µg/kg で、5 頭のうち 2 頭の脂肪で測定された最高濃度は 24.64 µg/kg であった。このサンプリング時間では、肝臓と腎臓の濃度は 80 µg/kg 台であった。10 日間の休薬期間で、ハロフジノンの残留物は筋肉(5 µg/kg)と脂肪(10 µg/kg)は定量限界以下で、腎臓と肝臓はおよそ 18 µg/kg であった。最終投与から 15 日後で、ハロフジノンの残留物は 1 頭の腎臓(10.6 µg/kg)を除き全ての食用組織で定量限界以下であった。

- 19 UV 検出の HPLC 法はルーチン分析法として提案された。全ての検証パラメータは欧州共同体における医薬品に関する規則の Volume VI の勧告に従って測定された。提案された分析法は全ての可食組織に対して適切に検証されたと結論された。定量限界は筋肉で 5 µg/kg、肝臓、腎臓と脂肪で 10 µg/kg であった。

結論および勧告

以下のことを認めた。

- ハロフジノンの毒性学的 ADI は 0.30 µg/kg 体重(すなわち 18 µg/ヒト)を確立した。
- ハロフジノンを投与中又は直後に屠殺する可能性が低い日齢 4 日～15 日の未反芻子ウシへの使用の示唆。
- 親化合物は標識残留物として保持され、投与後最大 48 時間で筋肉、脂肪と腎臓の総残留物の 60%、肝臓の 52.6%が保持される。
- 投与後、5 日目と 10 日目で、それぞれ、標識残留物の量は筋肉で 7 µg/kg と定量限界以下、脂肪で 15 µg/kg と検出限界以下、肝臓で 80 µg/kg と 17 µg/kg、腎臓で 80 µg/kg と 18 µg/kg であった。
- 全てのウシ属の可食組織のハロフジノンの測定に完全に検証された分析方法が提供された。

動物医薬品委員会は下表に従い、ハロフジノンを委員会規則(EEC) No 2377/90 附属書(Annex) I に含めることを勧告する。

薬理学的活性物質	標識残留物	動物種	MRLs	標的組織	その他条件
ハロフジノン	ハロフジノン	ウシ属	10 µg/kg 25 µg/kg 30 µg/kg 30 µg/kg	筋肉 脂肪 肝臓 腎臓	乳がヒトの消費のために生産される動物種には使用しない。

これら MRLs 値に基づき、一日摂取量は ADI の約 85%を意味する。

原文目次

SUMMARY REPORT(2) 1
Conclusions and recommendation..... 7

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
AUC	area under the blood concentration time curve	血中濃度曲線下面積
DNA	Deoxyribo Nucleic Acid	デオキシリボ核酸
MRL	Maximum residue level	残留基準
NOEL	No Observed Effect Level	無影響量

ハロフジノンの毒性試験と結果の概要一覧

(評価書 : EMA, Halocur, INN: Halofuginone (as lactate salt) Scientific Discussion)

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)	マウス		ハロフジノン臭化水素酸塩および乳酸塩 LD ₅₀ : およそ 30 mg/kg 体重	10	10
急性毒性 (経口)	ラット		ハロフジノン臭化水素酸塩および乳酸塩 LD ₅₀ : およそ 5 mg/kg 体重	10	10
急性毒性 (吸入)	ラット		ハロフジノン LC ₅₀ : 53 µg/l	10	10
急性毒性 (経皮)	ウサギ		ハロフジノン LD ₅₀ : 16 mg/kg 体重	10	10
急性毒性 (経口)	マウス		シス異性体 LD ₅₀ : およそ 430 mg/kg 体重	10	10
亜急性毒性 (経口)	マウス	ハロフジノン塩基で 0.070、0.160、0.350 mg/kg 体重/日 混餌投与 4 週間	ハロフジノン臭化水素酸塩および乳酸塩 NOEL : 0.070 mg/kg 体重/日 (両方の塩について) ・ 0.160、0.350 mg/kg 体重/日群以上 : 血液学的に有意な変動(細胞容積、平均赤血球容積と平均赤血球ヘモグロビン)。 ・ 0.350 mg/kg 体重/日群 : 雄マウスの血液化学的な変動 (尿素とコレステロール)。	10	10
亜急性毒性 (経口)	ラット	ハロフジノン臭化水素酸塩 0、2、5、10 mg/kg 混餌投与 13 週間	NOEL : 0.13 ~ 0.16 mg/kg 体重/日 ・ 10 mg/kg 群 : 雌の 80%に門脈周囲肝細胞中のグリコーゲンのわずかな減少に関連する肝臓の脂肪沈着、空胞形成。 ・ 血液学的パラメータと血液化学値への有害影響の報告なし。	10	10
亜急性毒性 (経口)	イヌ	ハロフジノン臭化水素酸塩 0、1.25、2.5、5 mg/kg 混餌投与 13 週間	NOEL : 飼料中濃度 2.5 mg/kg (0.067 mg/kg 体重/日) ・ 5 mg/kg 群 : 平均赤血球容積の有意な減少。	10	10
慢性毒性 (経口)	イヌ	ハロフジノン臭化水素酸塩 0、1.25、2.5、5 mg/kg 混餌投与 26 週間	NOEL : 飼料中濃度 2.5 mg/kg (0.075 ~ 0.086 mg/kg 体重/日) ・ 5 mg/kg 群 : 血液学的に有意な変化(平均赤血球容積の減少、平均赤血球ヘモグロビン濃度の低下、血色素量の低下)。	11	11

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)
生殖毒性 (経口)	マウス	ハロフジノン 0、0.25、0.5、1 mg/kg 飼料 混餌投与 交配前 7 日間 +交配後 2 週間	最高用量の 1 mg/kg 飼料(0.126 mg/kg 体重/日)まで、受胎率または飼育能力 には有害影響なし。	11	11
生殖毒性 (経口)	イヌ	ハロフジノン 2.5、5 mg/kg 飼料 混餌投与 68 週間	NOEL は設定できなかった。 全ての動物において、精巢の長さ と幅が低下。受胎率の低下もみられ た。これらは統計学的に有意な差で はないが、被験物質関連性、用量依 存性があると考えられ、何らかの生 物学的意義があると考えることがで きる。	11	11
生殖毒性 (経口)	マウス	ハロフジノン 0.25、0.5、1 mg/kg 飼料 混餌投与 3 世代	NOEL : 0.25 mg/kg 飼料(0.034 mg/kg 体重/日) ・ 1 mg/kg 群:F3 児動物の体重が有 意に低下、F2 雄親動物の体重が 有意に低。 ・ 0.5 mg/kg 群: 一時的な体重の低 下。F1 雄親動物の体重が有意に 低。 ・ 0.25 mg/kg 群: F1 雄親動物の体 重が有意に低。 ※F1 および F2 雄動物の低体重は主 に親動物として選抜される前(授乳 中または離乳直後)の低体重増加量 に起因するものであるが、NOEL は 0.25 mg/kg 飼料とされた。	11	11
生殖毒性 (経口)	ラット	ハロフジノン 臭化水素酸塩 0、0.17、0.34、 0.67mg/kg 体重 /日 強制経口投与 妊娠 6 日~17 日	母体毒性の NOEL : 0.34 mg/kg 体重/ 日 ・ 0.67 mg/kg 体重/日群: 死亡、臨 床症状の変化、流産の母体毒性 あり。 ・ 最大 0.67 mg/kg 体重/日まで、胚 /胎児毒性および催奇形性は認め られなかった。	11	11
生殖毒性 (経口)	ウサギ	ハロフジノン 臭化水素酸塩 0、0.0084、 0.025、0.076 mg/kg 体重/日	母体毒性の NOEL : 0.025 mg/kg 体重 /日 ・ 0.076 mg/kg 体重/日: 母体毒性と して死亡、低体重、低妊娠率 が 認められた。 ・ 最大 0.076 mg/kg 体重/日まで、 胚/胎児毒性および催奇形性は認 められなかった。	12	12
遺伝毒 性: <i>in vitro</i> マウ スリンフ オーマ試 験			陰性	12	12

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)
遺伝毒性： <i>in vitro</i> 染色体異常試験	培養ヒトリンパ球		陰性	12	12
遺伝毒性： <i>in vitro</i> DNA修復試験	ヒト上皮細胞		陰性	12	12
遺伝毒性の <i>in vivo</i> 骨髄小核試験	マウス		陰性	12	12
遺伝毒性： <i>in vivo</i> 分裂中期試験	ラット		陰性	12	12
遺伝毒性： <i>in vivo</i> 宿主経路試験	マウス		陰性	12	12
遺伝毒性：エームス試験	<i>Salmonella typhimurium</i> TA1538	1000 μ g/プレート	陽性（代謝活性存在下）	12	12
遺伝毒性：エームス試験	<i>Salmonella typhimurium</i> TA98	ハロフジノン臭化水素酸塩 1000 μ g/プレート以上	陽性（代謝活性存在下と非存在下）	12	12
遺伝毒性：エームス試験	<i>Salmonella typhimurium</i> TA98	ハロフジノン乳酸塩 1000 μ g/プレート	陽性	12	12
遺伝毒性： <i>in vivo</i> 骨髄小核試験	マウス	ハロフジノン乳酸塩	陰性	12	12
発がん性	マウス	ハロフジノン臭化水素酸塩 0.03、0.07、0.24 mg/kg 体重/日 混餌投与	発がん性なし。	12	12

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)
発がん性	ラット	ハロフジノン (塩の記載なし) 0.29～0.36 mg /kg 体重/日 混餌投与 63 週間	<ul style="list-style-type: none"> 投与に関連した病理組織学的変異なし。 肝腫瘍の発症率の増加なし。 	12	12
発がん性	ラット	ハロフジノン 臭化物 0、2.5、5、10 mg/kg 混餌投与	<ul style="list-style-type: none"> 毒性学的 NOEL：混餌投与で 2.5 mg/kg、すなわち 0.09～0.18 mg/kg 体重/日（血液学的結果と組織学的結果に基づく）。 発がん性なし。 	12	12
皮膚感作性	モルモット		<ul style="list-style-type: none"> 誘発期中、投与 4 日目に全動物で軽～中程度の皮膚の紅斑と乾燥。7/20 匹で痂皮、13/20 匹で自発運動の抑制。 投与後は皮膚反応なし。 	15	15
皮膚感作性	モルモット		<ul style="list-style-type: none"> 7/20 匹でグレード 2 の紅斑、8/20 匹でグレード 1 の紅斑。14/20 匹で皮膚の乾燥。 35%の動物で、遅延型接触過敏症に起因する皮膚反応。 	15	15
その他	ネコ	2000mg/kg 以下	死亡なし。	15	15

科学的議論

(原文、1 ページ)

医薬品名:

HALOCUR

製造販売業者:

ntervet International B.V.
Wim de Körverstraat 35
5831 AN Boxmeer
The Netherlands

活性成分 :

ハロフジノン(乳酸塩として)

治療指標:

新生の子ウシにおいて:

- クリプトスポリジウム症の発症歴のある農場の *Cryptosporidium parvum* による下痢の予防。
出生後 24~48 時間に投与を開始する。
- *Cryptosporidium parvum* による下痢の低減。
下痢発症後 24 時間以内に投与を開始する。

いずれの場合も、オーシストの排出の低下がこれまでに証明されている。

標的動物種:

新生の子ウシ

1. 序文(原文、2 ページ)

Halocur は活性成分としてハロフジノン乳酸塩を含有する経口薬で、新生の子ウシに経口投与される。水と混和性のある明るい黄色の均一の澄明な液体で提供される。

活性成分であるハロフジノンはキナゾリノン誘導體類 (quinazolinone derivatives group)の抗原虫剤である。正確な作用機序は不明である。ハロフジノンは *Cryptosporidium parvum* に対して cryptosporidiostatic effect がある。寄生虫(スポロゾイト、メロゾイト)の遊離段階で主に活性を示す。

Halocur は、クリプトスポリジウム症の発症歴のある農場の新生の子ウシの *Cryptosporidium parvum* による下痢の予防と、*Cryptosporidium parvum* による下痢の軽減に適用される。

経口薬は、内容量 490ml の 500ml 容器の携帯用ボトル (HD-PE plastic) と、内容量 980ml の 1000ml 容器の携帯用ボトル(HD-PE plastic)の 2 種類の形態で提供されている。

Halocur は食糧生産動物に適用することを意図した製品であり、その活性成分であるハロフジノンは、委員会規則(EEC) No 2309/93 の効力発生日 (i.e. 1995 年 1 月 1 日)において、動物用医薬品として食糧生産動物への使用が認可されていなかったため、その規則の附属書の Part B 最後のパラグラフにあるように、中央管理システムを通して欧州委員会の販売許可付与を受ける資格があった。

クリプトスポリジウム症のまとめ(原文、2 ページ)

クリプトスポリジウム症は寄生原生動物、*Cryptosporidium parvum* によっておこる疾病である。臨床的徴候は主に下痢で、日齢 5 日から 15 日の新生の子ウシに発生する。年長の子ウシや成牛で検出されるオーシストの排泄は通常無症状性である。

新生の子ウシのオーシストの排泄と下痢の関係は論文や実地試験で明確に調査されてきた。由来が様々な若い子ウシで行われた有病率試験 (prevalence study) において、クリプトスポリジウムの存在が下痢と有意に正の相関があった。オーシストの排出率は、下痢をしていない子ウシで 28.6%、下痢をしている子ウシで 45.0%であった。

1 宿主内で生活環があり、殆どの家畜哺乳類で 2~14 日の範囲の潜伏期間がある。殆どのオーシストは直接感染している宿主の糞便から排泄されるが、体外に排出せず腸細胞に再感染するオーシストもある。

クリプトスポリジウム症は動物由来感染症である ; ヒトへの汚染は、ヒトと動物での直接接触(オーシストの摂取又は吸入)及び間接的方法(e.g. 水の汚染を通して)により起こる。

Cryptosporidium parvum のオーシストは幅広い環境条件に非常に耐性があり、特異的な治療方法は実際にはない。

2. 申請資料の Part II の概要: 分析的側面(原文、3 ページ)

A. 構成物質の定性的および定量的詳細(PARTICULARS)(原文、3 ページ)

本製品は ml あたり下記の成分を含有する:

活性成分:

成分	成分量	品質規格
ハロフジノン・ベース(乳酸塩として)	0.50 mg	企業のモノグラフ

その他の成分:

成分	品質規格	昨日
安息香酸	Ph. Eur. II 66	保存料
乳酸	Ph. Eur. II 458	可溶化剤
タルトラジン (E 102)	French Ph. X Jan. 90	着色剤
精製水(Water purified)	Ph. Eur. II 8	溶剤

容器:

- 半透明の高密度ポリエチレン製の 500 ml 携帯ボトル(内容量 490 ml)。ボトルは、熱シール可能なアルミニウム・ポリエチレンの接合面(joint)にフィットするポリプロピレンスクリューストッパーで締められている。
-
- 半透明の高密度ポリエチレン製の 1000 ml 携帯ボトル(内容量 980 ml)。ボトルは、熱シール可能なアルミニウム・ポリエチレンの接合面(joint) にフィットするポリプロピレンスクリューストッパーで締められている。

臨床試験用製剤(原文、3 ページ)

臨床試験は、市販用の製剤を直接用いて行われた。

前臨床試験(Pre-clinical trials)はアフリカでタイレリア症に使用されるハロフジノン含有の経口服液剤(TERIT)を用いて行われた。

2.5%のハロフジノン溶液を水で希釈して、0.05%ハロフジノンとした。

in vivo の生物学的同等性試験は TERITe 溶液と Halocur 溶液の間に行われた。

試験の結果、オーシストの排泄という観点で、両方の試験製品は実験的 *Cryptosporidium parvum* の感染に同等の効果を示した(2つの投与群に統計的に有意な差はない)。

薬剤開発(原文、3 ページ)

1. 製剤の選択:(原文、3 ページ)

包装容器は本製品を数回投与することを意図としているため、溶液に保存料が加えられた。0.5%のベンジルアルコールと 0.1%の安息香酸の 2 種類の保存料がテストされた。溶解性(結晶化しない)と安定性が良いため安息香酸が処方として選ばれた。抗菌保存料として十分な 0.1%の濃度が採用された。

100 ml バイアルに 1 ロットを入れ 40°C の温度で 6 ヶ月間保管し、0、3 と 6 ヶ月後に分析をして抗菌

保存料としての有効性を確認した。Ph. Eur.モノグラフに従って試験は行われた。Ph. Eur.モノグラフを遵守し、14 と 28 日目に抗菌保存料の有効性の分析を更に行いその結果が提供された。

製剤が投与開始時から終了まで(10 ml/日、7 日間)保護されていることを確認するため、一週間に試験される試験管 14 本からそれぞれ 10 ml が毎日抽出された。7 日目に回収された全ての試験管の 10 ml サンプルを混合 (combined) し 140 ml の溶液にして試験を行った。

可溶化剤は、市販のハロフジノン乳酸塩の経口液剤 (oral solution) との類推で 5 年間の安定性のある乳酸が選ばれた。乳酸/ハロフジノン・ベースの含有量は同じ比率が選択された。

着色剤は安全性の理由で、使用者が投与経路を認識できるため、すなわち注射ではなく経口投与するために、加えられた。4 種類の着色剤を試験し、酸性媒体で最も安定性の高かったタルトラジン・イエロー (tartrazine yellow) が選択された。0.003 g で十分な密度の着色ができる。

ハロフジノン乳酸塩の溶解性のある pH が選択された。

安定性試験では、品質保持期限終了まで完成品のエナンチオマー純度 (enantiomeric purity) は不変を維持した。

2. 一次包装の選択:(原文、4 ページ)

包装は最低でも要求されている投与数を提供する一日の用量、500 ml バイアルは 7 回投与並びに 1000 ml バイアルは 14 回投与、に基づいて選択された。

溶液と栓の適合性を調査する試験が行われ、溶液は 100 ml と 500 ml の琥珀ガラス (amber glass)のバイアルに保管された。幾つかのバイアルは上向きに立てた (upright position) 状態で保管し、残りは、溶液が栓と接触する影響の可能性を確定するために逆さまにして (inverted) 保管した。いずれの保管条件でも結果は同等であった。

1000 ml ボトルについて、2 ロットの溶液を 40°C/75% HR で 3 ヶ月間(1 ロットは立てた位置で残りは逆さま)で保管した。結果は、溶液と接合面 (joint) の接触による溶液の品質変化は起こらなかったことを示した。

安定試験の間、溶液とプラスチック容器の適合性を調査した。プラスチック容器による安息香酸の吸収が認められた(40°C で 6 ヶ月間で≈20%)。

容器は漏れ防止容器であることを証明する試験で、50°C で 2 ヶ月間保管した 100 ml バイアルでおよそ 0.95%の重量の低下を示した。1000 ml ボトルでも結果が提供され、25°C 又は 30°C で 24 ヶ月間保管した後の重量の低下はおよそ 0.1%であった。

B. 調製法の説明(原文、4 ページ)

製造処方 110 リットルのロット用である。

製造方法は 6 段階に分けられている。

- 安息香酸を精製水に溶解。
- 乳酸の添加。
- ハロフジノンの溶解。
- タルトラジンの溶解。
- カートリッジで清澄ろ過、1.2 µm 径。
- バイアルに分注。

申請者より、工程の各段階について機器の説明が提供されている。

製造工程は「Manufacture of the finished dosage form」のガイドライン(EMEA/CVMP/126/95)を遵守し検討される。

製造過程の品質管理:

- 安息香酸の溶解：全て溶解したことを確認。
- ハロフジノン乳酸塩の溶解：全て溶解したことを確認。
- タルトラジンの溶解：全て溶解したことを確認。
- バイアルへの分注：30分おきに5バイアル(またはボトル)。
 - * 500 ml バイアル (実質充填体積 510 ml): 510 ± 10 ml.
 - * 1000 ml バイアル (実質充填体積 1020 ml): 1020 ± 10 ml.

製造工程の検証:

活性成分の内容物は、充填工程の開始時、途中、最後に検証された。製造工程は均一溶液を産生する ($0.41 < CV < 1.51\%$)。

溶液とろ過膜の適合性を溶液の清澄ろ過の前後にテストした。ろ過による製品の物理的および化学的分解は認められないという結果が示された。

製造工程の検証は EEC ガイドライン (欧州共同体における医薬品に関する規則、vol. III) ‘Development pharmaceuticals and process validation’ を遵守して検討される。

パイロットロットと工業規模ロットの結果が提供されている。

C. 出発物質(STARTING MATERIALS)の管理(原文、5 ページ)

活性成分のハロフジノンは薬局方には記載はないがモノグラフが提供されている。

活性成分について下記の試験が行われている。

ルーチン試験:

特性:	ベージュの粉末
同定試験:	特性スペクトル IR を標準と比較 特性スペクトル UV を標準と比較 HPLC による特性保持時間を標準と比較
純度及びその他の試験:	溶液の透明度と色: 透明で黄色。 水の含有量 (Karl Fisher): $\leq 0.5\%$ (m/m). 残留溶媒 (GC): 酢酸エチル: $\leq 1.5\%$. 硫酸塩灰分: $\leq 0.1\%$. 関連物質 (HPLC): * シス異性体 : $\leq 0.5\%$ (m/m). * その他の不純物 : $\leq 0.5\%$ (m/m). * その他不純物の総含有量: $\leq 1\%$ (m/m). 重金属 : ≤ 20 ppm.

試験:

- 電位差測定法による: 98~102%(無水、溶媒フリーベースで)。
- 申告された試験(物質をその状態で算出(calculated on the substance as is)): 認められた結果を

示す。

特異性試験:

下記の試験がスケールアップのロットと最初の 5 つの工業用ロットで行われている。

- 乳酸の含有量(電位差測定法: 17~21%(m/m)(無水と無溶媒の物質で算出))。
- メタノール (GC) : ≤ 500 ppm (仮規格)。
- ハロフジノンとエナンチオマーの比率 (chiral HPLC): 45/55~55/45%(仮規格)。一貫性のある結果が証明されれば、このテストは削除される。

更に、工業バッチの最初の 5 バッチ:

- 臭化物の含有量: ≤ 0.1%(仮規格)が試験されている。

活性成分の品質管理は十分であるとみなされている。

活性成分の 3 種類の出発物質(ridane 臭化水素酸塩、cebrazalone、乳酸)の分析の証明書が提供された。中間生成物のルーチン管理の明細と管理試験の検証方法: 試薬と溶剤の明細が使用されたため allylbromoridane とハロフジノン臭化水素酸塩が提供された。

4 つのロットに認められた不純物の可能性:

- シス異性体 : ≤ 0.1%。
- ジクロロ誘導体 : ≤ 0.1%
- ジブromo誘導体: およそ 0.1%。
- N-lactyl 誘導体 : およそ 0.1%。
- O-lactyl 誘導体 : およそ 0.1%。

定量限界は 0.05%相当で HPLC 法により不純物の試験を行っている。それぞれの含有量は 0.5%までに制限され、それらの合計は 1%を超えてはならない。

活性成分の合成の最後の段階で使用された残留溶媒はメタノールとエチルアセテートである。エチルアセテートは非毒性溶媒で GC 法で試験が行われ定量限界は 50 ppm が認められている。その値は 1.5%に制限されている。4 つのパイロット・ロットのメタノールの含有量は 50 ppm 以下であった。ルーチンの管理手順では特に検査されていないが、残留溶媒として発生した場合のためにエチルアセテートで使用される GC 法で検出と定量が行われるところである(定量限界は 50 ppm)。しかし、最初の 5 産業バッチは 500 ppm の仕様で社内で試験が行われる。

25°C の異なる水溶液と有機溶媒でハロフジノン乳酸塩の溶解性を測定した。ハロフジノン乳酸塩は 0.1 N HCl、水と pH が 7 以下のバッファーに容易に溶解したが、0.1 N NaOH のバッファーの pH が 9 以上で特に不溶解性であった(水溶液での溶解性は pH が低くなると上昇する)。

全ての添加剤は薬局方に記載され、各添加剤の分析証明書が提供されている。

ボトルとスクリュウ・ストッパーの寸法特性と IR 同定の説明と確認が管理手順に含まれる。図と分析証明書が提供されている。

D. 製造工程の中間段階で行われる管理試験(原文、6 ページ)

なし。

E. 完成品の管理試験(原文、7 ページ)

申請者は、完成品の管理で使用される全ての方法を提出している。

1.1 完成品の一般的特徴(原文、7 ページ)

以下の特徴が測定された。

- 外観: カナリア色の透明な溶液、水に混和
- 500 ml バイアル:
 - 抽出可能量: ≥ 490 ml.
- 1000 ml ボトル:
 - 抽出可能量: ≥ 980 ml.
- pH: 2 ~ 3.

- 関連物質(HPLC):
 - シス異性体:
 - 出荷時: ≤ 0.5 %.
 - 品質保持期限の最終時: ≤ 0.7 %.
 - その他の不純物:
 - 出荷時: ≤ 0.5 %.
 - 品質保持期限の最終時: ≤ 1.3 %.
 - その他の不純物の総含有量:
 - 出荷時: ≤ 1 %.
 - 品質保持期限の最終時: ≤ 2.3 %.

1.2 活性成分の同定と試験(原文、7 ページ)

- 同定試験: HPLC 法にて
- 活性成分の定量的測定(HPLC):
 - 出荷時: 47.5~52.5 mg/100 ml(ラベル表示の 95-105%)
 - 品質保持期限の最終時: 46.75~52.5 mg/100 ml(ラベル表示の 93.5-105.0%)

品質保持期限の最終時の限度は安定性試験の結果で証明される。

1.3 添加物成分の同定と試験(原文、7 ページ)

- 安息香酸、乳酸とタルトラジンの同定試験: HPLC 法で
- 安息香酸の含有量の測定(HPLC):
 - 出荷時: 90~110 mg/100 ml(ラベル表示の 90-110%)
 - 品質保持期限の最終時: 70~110 mg/100 ml(ラベル表示の 70-110%)

各試験方法の方法の検証が提供されている。

3つのロットの管理結果から 製造工程の均一性が証明された。

F. 安定性(原文、7 ページ)

活性成分の安定性試験

活性成分の光、熱、酸化と湿度に対する感度を測定する 1 種類の試験が行われた。乾性温熱 (dry heat)、と酸化(密閉したアンプルに入れて、空気下およびアルゴン下で、100°C のオーブンで 7 日間)、と湿熱(密閉した結晶皿に水のタンクと一緒に空気/湿気下(100% RH)の 80°C オープンで 6 時間)、強い光の下(密閉したアンプルで、空気下の周囲温度 (ambient temperature) のサンテストで 24 時間)に暴露後、固体の状態が試験された。外観が試験され、不純物のプロファイルが検証された TLC 法と HPLC 法で測定され、検証された HPLC 法で試験値が測定された。

その結果、ハロフジノン乳酸塩は、

- 約 5%の試験値の低下があり、強い熱に感度がある(空气中又はアルゴン中)。低下した 2 種類の主な製品はシス異性体と cebrazone である。
- 湿熱に感度があり、不純物プロファイルが 1.1%増加する。
- 強い光には安定性がある。

これまでの要素に基づいて、活性成分は 30°C を超えない温度で保管されなくてはならない。

仮の品質保持期限を決定するために準工業用ロットが長期と加速条件で調査された。

- 長期:
 - 茶色のガラスバイアル中、空气中- 20°C で 60 ヶ月間。
 - 熱シールした低密度ダブルポリエチレンバックを段ボールに入れ、空气中+ 2°C to + 8°C で 60 ヶ月間(25°C で製品の劣化が観察されたらサンプルの分析をする)。
 - 熱シールした低密度ダブルポリエチレンバックを段ボールに入れ、空气中 25°C/60%で 60 ヶ月間。
- 加速条件:
 - 熱シールした低密度ダブルポリエチレンバックを空気下で 40°C/75 % RH 12 ヶ月間
 - 熱シールした低密度ダブルポリエチレンバックを段ボールに入れ、空気下で 60°C で 12 ヶ月間。

結果は、25°C/60% RH では劣化はなく、40°C/75% RH ではわずかな劣化(色が濃くなる、色指数が 90 ユニットから 100 ユニットに上昇、水の含有量が 0.3 から 0.6%に上昇、そしてシス異性体の含有量が 0.2から 0.4%に上昇)があることを示している。60°Cでは強い劣化(色がベージュからダークブラウンに、色指数が 200 から 250 ユニットに上昇、不純物の増加により試験値が 3~4%増加)が認められている。色指標は唯一、比較可能な試験で、サンプルの外見を代表するものではない。

長期条件下で 36 ヶ月保管した後の追加データは 2°~8°C と 25°C/60% RH で安定性が良いことを確認した。品質保持期限は 2°~8°C で 36 ヶ月が認められている。

完成品の安定性試験

申請者は EEC ガイドラインの "Stability testing of new active substances and medicinal products" (vol. III, addendum 3)の勧告条件を使用した。

予備的試験で、以下の条件が適用された。

- 4°C だが 25°C で劣化があった場合のみ分析。
- 25°C/闇で 24 ヶ月間
- 25°C/光で 12 ヶ月間
- 40°C で 6 ヶ月間

結果は試験値の低下は示されず、溶液の外見や pH 値の変化はなく、40°C でシス異性体の含有量と 25°C

でその他の不純物の総含有量がわずかに上昇した。各温度で安息香酸の 21%の低下も認められている。抗菌保存料の有効性は 40°C で 6 ヶ月後も十分な効果を維持している。

正式な試験では以下の条件が適用された。

100 ml と 1000 ml のボトルで 36 ヶ月間試験が行われた。最終包装(1000 ml)の安定性試験は 25°C/60%RH 及び 30°C/70%RH で 36 ヶ月間、40°C/75%RH 及び常温かつ明条件下で 6 ヶ月間行われた。

40°C で 6 ヶ月後、溶液の外見または pH の値の変化は記録されなかった。しかし、ハロフジノン含有量のわずかな低下、シス異性体の含有量のわずかな増加、その他の不純物の総含有量の増加、保存料の値の低下が認められた。

25°C と 30°C で 36 ヶ月後、シス異性体含有量とその他の不純物の総含有量のわずかな増加、保存料の値の低下が認められた。その他のパラメータは変わらなかった。

使用中の品質保持期限

4 種類の試験が、実際の使用におけるさまざまな勧告を模擬して行われた(500 ml バイアルは 7 回投与の持続、1000 ml バイアルは 14 回投与の持続)。30 日以上にわたり 2 種類が、6 ヶ月以上に渡りもう 2 種類が行われた。結果は十分である。提案された使用中の品質保持期限は 6 ヶ月である。微生物学的純度と保存料の有効性が 6 ヶ月試験で調査された。結果は EP の規格を遵守している。品質保持期限の最終時のロットで使用中の安定性がこれから調査される。

結論として、完成品に提供された安定性試験は EEC ガイドラインを遵守し、製品は実際の状況下(25°C/60% RH と 30°C/70% RH、36 ヶ月間)でも、加速条件(40°C/75% RH 6 ヶ月間)でも安定性があることを示している。品質保持期限は *broached vials* で 3 年 6 ヶ月が保持された。

3. 申請資料の Part III の概要: 毒物学的および薬理学的側面(原文、10 ページ)

活性物質であるハロフジノン乳酸塩は、最大残留基準値を割り当てられ、1995年5月12日付け EC 官報に刊行された委員会規則(EEC) No 2377/90 附属書(Annex)III: 1999年5月11日の委員会規則(EC) No 997/1999 に記載されている。HALOCUR のその他の成分及び保存料は色素剤である。

安息香酸、乳酸、タルトラジン・イエローは、E 化合物(E 番号=1995年2月2日の EEC 指令 95/2 でそれぞれ E213、E270、E102)である。これらの物質は、委員会規則 EEC 2377/90 附属書(Annex)II に記載されており、全て食品製造向けである(1996年10月24日の委員会規則 n° 2034/96)。これらの物質は消費者にとって安全であるとみなされ、よって HALOCUR 含有物について更なる試験は要求されていない。

A. 安全性試験(原文、10 ページ)

1. 単回投与の毒性(原文、10 ページ)

ハロフジノン臭化水素酸塩と乳酸塩の経口急性毒性がマウス、ラットとウサギで検討された。両塩の LD₅₀ はラットでおよそ 30 mg/kg 体重、マウスで 5 mg/kg 体重であった。ラットでは、ハロフジノンの粉塵の吸入後、LC₅₀ は 53 µg/l と決定された。ウサギの経皮 LD₅₀ は 16 mg/kg 体重であった。シス異性体は、有効成分の毒性の 100 分の 1 であった(マウスの経口 LD₅₀ はおよそ 430 mg/kg 体重)。

2. 反復投与の毒性(原文、10 ページ)

ハロフジノン臭化水素酸塩と乳酸塩の 2 種類のハロフジノン塩で、マウス、ラット、イヌによるいくつかの経口反復投与毒性試験が行われた。

生物学的同等性試験で、マウスにハロフジノン臭化水素酸塩または乳酸塩を 2 mg ハロフジノン塩基/kg 体重の用量で単回経口投与した。個体差が大きいため、2 種類の塩の生物学的同等性を薬物動態的観点から結論することは不可能である。ハロフジノン臭化水素酸塩と乳酸塩の平均 AUC_{0-8h} 値はマウスの雄雌でそれぞれ 103.37 µg.h/l と 82.65 µg.h/l であった。雄では、2 種類の塩の AUC は同じであったが、(両塩とも 83 µg.h/l)、雌ではハロフジノン乳酸塩の AUC(157 µg.h/l)はハロフジノン臭化水素酸塩(97.40 µg.h/l)よりも高かった。しかし、毒性学的観点から、試験は雄雌の両方で行われたので、臭化水素酸塩について得られた結果を、乳酸塩の安全性プロファイル確立にあたって考慮することができる。

2つの4週間の混餌投与毒性試験で、マウスにハロフジノン臭化水素酸塩と乳酸塩を 0.070、0.160、0.350 mg ハロフジノン塩基/kg 体重/日の用量で投与した。高用量の 2 群で、血液学的に有意な変動(細胞容積、平均赤血球容積と平均赤血球ヘモグロビン)が報告された。最高用量で、雄マウスの血液化学的な変動(尿素とコレステロール)がみられた。両方の塩に同じ毒性学的プロファイルが認められ、同じ無影響量(0.070 mg/kg 体重/日)であった。

13 週間の毒性試験で、ラットにハロフジノン臭化水素酸塩を 0、2、5、10 mg/kg の用量で混餌投与した。これは雄で 0.13、0.33、0.70 mg/kg 体重/日に相当し、雌で 0.16、0.41、0.88 mg/kg 体重/日に相当した。最高用量では、雌の 80%に門脈周囲肝細胞 (periportal hepatocytes) 中のグリコーゲンのわずかな減少に関連する肝臓の脂肪沈着 (fat deposition) と空胞形成 (vacuolation) が認められた。血液学的パラメータと血液化学値への有害影響の報告はなかった。無影響量は 0.13~0.16 mg/kg 体重/日であった。

13 週間の毒性試験で、イヌにハロフジノン臭化水素酸塩を 0、1.25、2.5、5 mg/kg の用量で混餌投与

した。これは、塩基として表すと(expressed as base)¹、およそ 0、0.034、0.067、0.134 mg/kg 体重/日に相当した。最高用量群にのみ平均赤血球容積の有意な減少が認められた。中用量群に認められた血液学的変化は生物学的変動の範囲内で、混餌投与で 2.5 mg/kg(0.067 mg/kg 体重/日)の無影響量にとどまった。

26 週の毒性試験で、イヌにハロフジノン臭化水素酸塩を 0、1.25、2.5、5 mg/kg の用量で混餌投与した。これは、雄で 0.045、0.086、0.16 mg/kg 体重/日及び雌で 0.039、0.075、0.17 mg/kg 体重/日に相当した。最高用量群で血液学的に有意な変化(平均赤血球容積の減少、平均赤血球ヘモグロビン濃度の低下、又は血色素量の低下)が認められた。他の 2 つの用量群に認められた血液学的変化は生物学的変動の範囲内で、混餌投与で 2.5 mg/kg(0.075~0.086 mg/kg 体重/日)の NOEL にとどまった。

3. 標的種での許容性(Tolerance)(原文、11 ページ)

許容性は *Part IV* で論じられている。

4. 催奇形性を含む生殖毒性(原文、11 ページ)

a) 生殖作用の試験(*Study of the effects on reproduction*)

ハロフジノン臭化水素酸塩の生殖毒性試験がマウス、イヌ、ラットを用いて実施されている。

マウスに、ハロフジノン 0、0.25、0.5、1 mg/kg 飼料(およそ 0、0.034、0.063、0.126 mg/kg 体重/日に相当)を交配前 7 日間と交配後 2 週間にわたって混餌投与した。最大用量の 1 mg/kg 飼料(0.126 mg/kg 体重/日)まで受胎率又は飼育能力には有害影響は認められなかった。

ハロフジノン 2.5、5 mg/kg 飼料(0.067、0.134 mg/kg 体重に相当)を混餌投与したイヌを用いた 68 週間試験では、投与した全ての動物の精巣の長さや幅が低下していた。受胎率の低下もみられた。これらは統計学的に有意な差ではないが、被験物質関連性、用量依存性があると考えられ、何らかの生物学的意義があると考えられることができる。NOEL は設定できなかった。

3 世代試験では、マウスにハロフジノン 0^{*}、0.25、0.5、1 mg/kg 飼料(およそ 0、0.034、0.063、0.126 mg/kg 体重/日に相当)を混餌投与した。最高用量群の F₃ 児動物の体重に有意の低下が認められ、中用量群で一時的な体重の低下が認められた。雄親動物の体重は、中及び高用量群の F₀ 及び F₁、最高用量群の F₂ で対照群と比較して低かった。中及び高用量群の F₀ 雄親動物の低体重は対照群と比べて統計学的な有意差はなかったが、中及び高用量群の F₁ 雄親動物、最高用量群の F₂ 親動物の低体重は対照群と比べて統計学的に有意の差がみられた。F₁ 及び F₂ 雄動物の低体重は主に親動物として選抜される前(授乳中又は離乳直後)の低体重増加量に起因するものであるが、NOEL は 0.25 mg/kg 飼料(0.034 mg/kg 体重/日)と判断された。

b) 催奇形性を含む胚毒性(Embryotoxicity)/胎児毒性(fetotoxicity)

催奇形性試験では、ハロフジノン臭化水素酸塩を交配した雌ラットに 0、0.17、0.34、0.67 mg/kg 体重/日の用量で妊娠 6 日~17 日まで強制経口投与した。母体毒性として死亡、臨床症状の変化、流産 が最高用量群で認められている。母体毒性の NOEL は 0.34 mg/kg 体重/日であった。ハロフジノン臭化水素酸塩はラットにおいて、経口用量で最大 0.67 mg/kg 体重/日まで、胚/胎児毒性及び催奇形性は認められなかった。

¹ 専門家コメント：ハロフジノンは塩基であり、水素酸や乳酸と反応して塩を作るようであり、その塩として投与したうちの塩基の量として表した、という意味。

^{*} 原文に 0 はなかったが、前後から判断し追記した。

ウサギを用いた催奇形性試験では、ハロフジノン臭化水素酸塩をウサギの妊娠6日から18日に0、0.0084、0.025、0.076 mg/kg 体重/日の用量で強制経口投与した。最高用量で母体毒性として死亡、低体重、低妊娠率が認められた。母体毒性のNOELは0.025 mg/kg 体重/日であった。ハロフジノン臭化水素酸塩は、ウサギにおいて、経口用量で最大0.076 mg/kg 体重/日まで、胚/胎児毒性及び催奇形性は認められなかった。

5. 変異原性(原文、12 ページ)

ほとんどの試験の報告は不十分であったが、ハロフジノン(塩類は明記されず)は3種の *in vitro* 試験(マウスリンフォーマ試験、*in vitro* 染色体異常試験(培養ヒトリンパ球)、ヒト上皮細胞によるDNA修復試験と、3種の *in vivo* 試験(マウスの *in vivo* 骨髄小核試験、ラット *in vivo* 分裂中期試験、マウス宿主経路試験))において陰性の結果であったと結論することができる。ハロフジノンは、*Salmonella typhimurium* TA1538 において代謝活性存在下で1,000 µg/プレート、TA98 において代謝活性存在下と非存在下でハロフジノン臭化水素酸塩 1,000 µg/プレート以上の用量で行われたエームス試験では、陽性の結果であった。

ハロフジノン乳酸塩では、エームス試験とマウスでの *in vivo* 骨髄小核試験の2つの試験のみが報告された。ハロフジノン乳酸塩は、*Salmonella typhimurium* TA98 において代謝活性存在下と非存在下で1,000 µg/プレートの用量で行った *in vitro* 試験でのみ陽性反応を示した。

エームス試験で用量依存性ではない復帰突然変異株が認められ、遺伝子の突然変異を検出するマウスリンフォーマ試験は陰性であったことから、委員会はハロフジノンの遺伝毒性の可能性は低いと結論した。

6. 発がん性(原文、12 ページ)

Swiss マウスを起源とする系統で発がん性試験が行われた。ハロフジノン臭化水素酸塩を0.03、0.07、0.24 mg/kg 体重/日相当の用量で混餌投与した。発がん性は認められなかった。

Sprague-Dawley ラットにハロフジノン(塩の記載なし)を0.29~0.36 mg/kg 体重/日の用量で63週間経口で混餌投与した結果、投与に関連した病理組織学的変異は認められず、肝腫瘍の発症率の増加もなかった。

26ヶ月の長期毒性/発がん性試験で、Sprague-Dawley ラットにハロフジノン臭化物を0、2.5、5、10 mg/kg の用量で混餌投与した。この投与量は、雄で0、0.09、0.18、0.36 mg/kg 体重/日相当及び雌で0、0.11、0.23、0.47 mg/kg 体重/日に相当した。血液学的結果と組織学的結果に基づき、毒性学的の無影響量は混餌投与で2.5 mg/kg、すなわち0.09~0.18 mg/kg 体重/日となった。対照群との比較では、腫瘍発生率の増加や投与特異的な腫瘍は認められなかった。ハロフジノンはどのような発がん性も示さなかった。

ハロフジノンはマウスとラットにおいてどのような発がん性も示さなかった。

その他の要件

1. 免疫毒性(原文、12 ページ)

23 ページ Part IV の '標的動物種の耐性 Tolerance in the target species of animal' を参照のこと

2. 残留物の微生物学的特性(原文、12 ページ)

ヒトの腸内細菌叢

ハロフジノンについて、ヒトと子ウシの腸内細菌叢 (gut flora) の典型である 135 種類の好気性微生物と 75 種類の嫌気性微生物に対する微生物活性について *in vitro* で試験が行われた。ヒトと子ウシの腸内細菌叢へ有意な影響は認められず、最少発育阻止濃度 MIC 値は試験された過半数の系統で 128 µg/ml より高かった。

生態毒性

安息香酸と乳酸は分解性の高い偏在性の化合物 (ubiquitous compounds) である。タルトラジン・イエローは HALOCUR 中の濃度が非常に低いのでこれに関連して懸念はないとみなされる。よって、活性成分のみが生態毒性の評価で検討される物質になる。

1976 年から 1984 年の間に、ハロフジノン臭化水素酸塩を食品添加物として登録するための試験が行われた。これらの試験はハロフジノンまたはハロフジノン臭化水素酸塩で行われる。ハロフジノン塩類はお互い類似しているため、それらはハロフジノン乳酸塩の生態毒性的安全性の評価に適切である。

ヨーロッパでは、ハロフジノン臭化水素酸塩(ステノロール)は家禽類(ニワトリやシチメンチョウ)の抗コクシジウム食品添加物として使用されている。ハロフジノン臭化水素酸塩は委員会指令 70/524 (EEC) N° E 764 (1982 年 11 月 17 日と 1984 年 2 月 8 日の SCAN レポート)に登録されている。ニワトリとシチメンチョウ食品で認められている最大残留基準値は 3 mg/kg である。

食肉用の子ウシに放射標識された ¹⁴C-lactalofuginone を使った薬物動態試験が 1 試験行われた。食肉用の子ウシにハロフジノン乳酸塩を 7 日間毎日投与した後、主に尿から排泄された。尿から回収された主な物質はハロフジノン(17~36%)であった。その他の代謝物は同定されなかった。その他の代謝物は個々で総放射活性残留物の 20%未満を意味し、よって生態毒性試験では、残留物はハロフジノンと表された。

1 種類の土壌浸出試験 (soil leaching study)が、500 µg の ¹⁴C-ハロフジノンを使って ¹⁴C-ハロフジノンを投与したニワトリの 20 g の排泄物また投与したニワトリの排泄物を 32 日間土壌で事前培養しガラスカラムの上に加えられ、行われた。土壌の放射活性は 5 cm の断片 (section) で測定され 10 ml の分画に溶離 (elute) した。カラム (columns)は 400 ml の水で溶離 (elute)された。¹⁴C-ハロフジノンのカラムに溶離後、最初の 5 cm には有意な放射活性はなかった。未培養 (un-incubated) の排泄物を溶離したとき、放射線の 80%が最初の 5 センチに残留した。ローム質の土壌と埴壤土の溶離液から 0.25%と 2.4%の放射活性が回収された。32 日の事前培養された排泄物に、80 と 85%の放射活性が最初の 5 センチに結合を維持し (stayed bound to) そして、それぞれ 1.1%と 0.3%がローム質の土壌と埴壤土のカラムの溶離液から認められた。結論として、ハロフジノンと関連の代謝物の土壌浸出の可能性は低い(水溶離液 (water elute) に 0.25~2.4%の総放射活性残留物が認められた。)。ハロフジノンは水路を汚染することはない。

¹⁴C-ハロフジノンの生物分解性とニワトリの排泄物中の代謝が実験室とフィールドの条件で行われた。シルト質埴壤土 (Alcombury) と砂壤土 (Taunton) が臨床検査された。フィールド試験は Alcombury の土壌で行われた。排泄物の分析を行い、ハロフジノンとハロフジノンの抱合が認められた。

臨床検査では、¹⁴CO₂ が一定の間隔(regularly)で放出されたが少量 (16 週間後それぞれ 2~4%)であった。標識された放射活性に関連する土壌の検体の総放射活性量は 80~120%までと多様であった。放射活性を抽出した溶剤は時間とともに低下し(52 週間でそれぞれ 54%と 62%から 24%と 17%へ)抽出可能な放射活性は増加した。土壌の抽出物(TLC による)の放射活性の性質により、極性代謝物の増加と不変のハロフジノンの低下を示した。最初の 8 週間のハロフジノンの低下の明白な半減期(apparent half-life) はそれぞれ 15 日と 20 日であった。最も重要な代謝物の 1 種は標識された放射活性の 12%未満を意味した。フィールド試験(field study)で、同様のパターンが 32 週間以上認められた。ハロフジノンの明確な半減期 (apparent half-life) は 43 日であった。放射線は 0~5 cm の土層で主に結合を維持

(stayed bound) した。ハロフジノンはより多くの極性代謝物をもたらすことが認められた。ハロフジノンと関連の化合物は土壤に密接に結合し (closely bound to soil)、0~5 cm 以下の土層には浸出しない。

意図する用量の ^{14}C -ハロフジノンを投与したニワトリの排泄物は土壤に取り込まれた。土壤/排泄物を混合し、50 g/鉢の用量で鉢に取り込まれた(10 トン/ha 相当)。サトウダイコン、ニンジンとジャガイモのタネを蒔き成熟するまで成長させた。植物(根、葉と塊茎)放射活性の濃度は 4 ppb 未満であった。

^{14}C -ハロフジノン(80 kg/ha)を投与した土壤又は、 ^{14}C -ハロフジノン(55 kg ハロフジノン/ha 相当)を投与したニワトリの排泄物 80 トン/ha を投与した土壤を使って植物を育てた。6、10、14 と 16 週間後、残留物の値を測定し、以下の結果が得られた。

植物	^{14}C -ハロフジノンを投与した土壤		^{14}C -ハロフジノンを投与したニワトリの排泄物を投与した土壤	
レタス	W6	15.9 ppb	W6	12.1 ppb
	W10	10.9 ppb	W10	5.2 ppb
トマトの木 トマトの葉と茎 トマトの実	W6	24.1 ppb	W6	10.2 ppb
	W16	30 ppb	W16	20 ppb
	W16	<3 ppb	W16	<3 ppb
タバコの木 タバコの葉	W6	12.6 ppb	W6	8 ppb
	W14	24.4 ppb	W14	13.6 ppb
きゅうりの木 きゅうりの実	W6	28.6 ppb	W6	16.9 ppb
	W10	1.6 ppb	W10	1.9 ppb

水生生物の生態毒性を調査するために 5 種類の非 GLP 試験を行い次の結果が得られた。*Cyprinus carpio* LC₅₀: 0.3~0.7 mg/l (72h)、*Salmo gairdneri* LC₅₀: 1.8 mg/l (96 h)、*Lepomis macrochirus* LC₅₀: 0.12 mg/l (96 h)、*Daphnia magna* EC₅₀: 0.02 mg/l (48 h)と *Chlorella pyrenoidosa* EC₅₀: 46 mg/l。ハロフジノンは水生動物相に高い毒性があるとみなされる。

植物毒性への作用とミミズへの毒性の可能性について更に 4 種類の非 GLP 試験が提供された。ミミズ (*Lumbricus terrestris*)に対する 2 種類の試験では、21 ppm 以下の用量では死亡率に影響を示さず、10 ppm 以下では体重への影響はなかった。0-480 g/ha を投与した土壤のトマト、レタス、きゅうりまたはタバコに植物毒性の作用は認められなかった。1 種類の試験で、土壤を処理するのに使用されたニワトリの肥料又は敷わら (bedding) のタバコに植物毒性の徴候がみられた (In one study some phytotoxicity signs in tobacco were allocated to manure or beddings from the chickens used to treat the soil)。

由来の違うアメーバ種 (Strains of amoeba) を 0、2、5 と 10 mg/l のハロフジノン臭化水素酸塩 (bromhydrate) で補充される (supplemented with) 寒天培地で培養する。2 mg/l の用量のハロフジノン臭化水素酸塩が *Acanthamoeba* (10/16)、*Naegleria* (5/8) の殆どを抑制した。ハロフジノンは藻類に対して中程度の毒性があるとみなされる。

ハロフジノンを投与されたニワトリの糞便の土壤における微生物の窒素の変換への影響が調べられた。ハロフジノンとハロフジノン代謝物を含有する糞便を投与した検体の硝化は変わらなかった。

純粋培養のメタン生成細菌の増殖に対するハロフジノン臭化水素酸塩の作用の試験で、10 mg/l のハロフジノン臭化水素酸塩で *Methanobrevibacter arboriphilus* に、0.1 mg/l のハロフジノン臭化水素酸塩で *Methanococcus vannielii* に増殖の阻害が認められた。バッチ発酵試験 (Batch fermentation studies) では、1 mg/l の濃度で培養 1 日目にメタン生成の低下を示した。数日後、対照と 100 mg/l ロットのメタン生成に差異は認められなかった。より高い濃度ではメタン生成の一部または完全抑制が認められた。半連続的な発酵で、メタン生成の有意な低下が濃度が 30 mg/l に達したときに認められている。粒子への物質の吸収はロットや半連続的な発酵と比較し、純粋培養への高い感受性を示している。

環境暴露評価

環境暴露は、家禽への食品添加物としての使用または子ウシに動物用医薬品としての使用から回収される肥料と寝わらの混合物を上げるときに発生する。子ウシと家禽は、ハロフジノンは殆ど糞便から排泄される。糞便と寝わらの混合物は EEC 指令 91/676 に従って土壤に拡散される(are spread over land)。ハロフジノンは尿の主な代謝物であると思われる。そのような製品は集中的畜産用を意図としているので、屋外又は非集中的農産用としては軽視されている (neglected)。

家禽への食品添加剤としての使用のために、土壤でのハロフジノンの PEC は 13.8 µg/kg という仮説的計算が提供された(最悪のシナリオで)。動物用医薬品としての使用には、土壤におけるハロフジノンの PEC は 0.7 µg/kg が算出された。

最悪のシナリオでも土壤中の誘引値(trigger value)の 10 µg/kg を超えなくても、CVMP のガイドライン、「GMO を含有する免疫学的製品を除く動物用医薬品の環境リスク評価に関する指針書」(Note for guidance on the environmental risk assessment of veterinary medicinal products other than GMO containing and immunological products) (EMEACVMP/055/96-FINAL)では第二フェーズの評価は要求されていない。

結論として、動物用医薬品から放出されるハロフジノンの残留物は食品添加物として使用に関連する量の 5%のみを意味している。食品添加物としての使用は EEC 規則 (EEC 指令所/524: 70 23/11/1970)の下に評価され承認される。HALOCUR を動物用医薬品として使用することは、土壤での濃度が低いため、そして生態毒性プロファイルは許容範囲であるため、陸上生態系または水界生態系への脅威にはならない。よって、SPC は次の忠告を含んでいる。「Halocur は魚やその他の水界生物に危険があるかもしれないので、水流に入り込むことはできない」。

使用者の安全

CVMP の要請に基づき 3 種類の追加の毒性試験が提供された。モルモットによる皮膚への感作性の試験が 2 種類、ラットによる急性皮膚毒性試験が 1 試験行われた。

モルモットによる最初の感作性試験の誘導期中、投与した全動物種は 4 日目に軽度から中程度の皮膚の紅斑と乾燥が認められた。7/20 の動物種に痂皮 (crusts) が、13/20 の動物種に自発運動の抑制 (hypoactivity) が認められた。塗布後 (After challenge application) は皮膚反応は認められなかった。

2 回目の試験で、グレード 2 の紅斑が 7/20 の動物種に、グレード 1 が 8/20 の動物種に認められた。14/20 の動物種は皮膚の乾燥が認められた。試験物質である Halocur は 35%の動物種に遅延性接触過敏症に起因する皮膚反応を誘導した。

ネコでの試験で、2000 mg/kg 以下の用量では死亡はなかった。

経口投与又は皮膚経路でハロフジノン乳酸塩とハロフジノン臭化水素酸塩に有意な急性毒性が認められた。

反復作業中に、汚染されたバイアル、キャップまたはスポイトを取り扱いの際の本製品の皮膚への暴露 (50 kg の子ウシに 500 ml のバイアルで 50 回以下)は考慮されなければならない。本製品の皮膚の接触は次の作業で発生する。

- キャップやバイアルと皮膚の接触(キャップを回して閉める、キャップをまわして外す、計量容器に充填する時にバイアルを圧縮する)。
- スポイトと皮膚の接触(スポイトに充填・分量の調整中、子ウシの口腔のスポイトを空にする)。

本製品の急性皮膚毒性は LD₅₀ > 2000 mg/kg(3.98~4.46 mg/kg ハロフジノンに相当)に制限されること

が認められた。しかし、皮膚への暴露の性質(反復的接触)は皮膚アレルギーを発症させるのに好条件である。赤斑が中程度でモルモットの試験で急速に消散しても、経口薬剤の皮膚への接触は回避されなければならない。

眼球への暴露は事故による跳ね返りによるものである。ハロフジノンは目の刺激性があり、処方酸性 pH=2~3 である。事故による目への跳ね返りの場合、目を水ですすがなければならない。炎症が続く場合は医療機関の受診が薦められる。

次の文書が製品パンフレットに含まれている。

- 製品と反復的に接触すると皮膚へのアレルギーを誘発することがある。
- 本製品と皮膚や目の接触を避けること。皮膚や目と接触した場合、清潔な水で暴露部分を十分に洗浄すること。もし、目の刺激が継続する場合、医療機関を受診すること。
- 本製品を取り扱う際は保護手袋を着用すること。
- 使用後は手を洗うこと。

B. 残留物試験(原文、16 ページ)

代謝物と残留物の動力(kinetics)

3 頭の 1 週齢の未反芻雄子ウシ(ヘレフォード種とホルスタイン種の交雑種)に ^{14}C -ハロフジノン乳酸塩(ハロフジノン塩基として 0.10 mg/kg 体重)を 7 日間毎日投与した試験では、子ウシにおけるハロフジノン乳酸塩の排出は主に尿中であることが示された。最終投与後から屠殺までの間における放射能の尿中排出は、7 回目に投与した放射能の 10.0%(6 時間)、20%(24 時間)と 92%(48 時間)を示した。動物数が少なかったため(尿全体の収支 (complete balance) は 1 頭の結果から得られた)、そして回収された放射能の割合は 7 回目に投与された用量との比較に基づくため、この代謝試験は慎重に検討されなければならない。子ウシにおいて収支を合わせることはできない。

血漿では、ハロフジノンは総放射能の 6.5~10%しか示さなかった。ハロフジノン乳酸塩は吸収されたが、この吸収量は定量化できなかった。

もう 1 つの試験では、3 週齢の子ウシに推奨治療用量(0.10 mg ハロフジノン塩基/kg 体重/日)のハロフジノン乳酸塩を 7 日間、経口投与した。血漿中のハロフジノンの最高濃度(9 $\mu\text{g/l}$)は 7 回目の投与後 6 時間目に認められた。ハロフジノン濃度はその後低下し、最終投与の 7 日までに検出されなくなった(定量限界 1 $\mu\text{g/l}$)。

体重 52.6 kg の 22~32 日齢の子ウシ 8 頭に、推奨治療量のハロフジノン乳酸塩(0.10 mg ハロフジノン塩基/kg 体重/日)を 7 日間、経口投与した。血漿中のハロフジノンの最高濃度(6.66 $\mu\text{g/l}$)は 7 回目の投与後 8 時間目に認められた。その後、血漿の濃度は最終投与後 36 時間で 2.3 $\mu\text{g/l}$ に減少し、その後のサンプリング時には定量限界以下(1 $\mu\text{g/l}$)まで低下した。平均の終末半減期 (mean terminal half-life) は 32.8 時間だった。これらの実験条件下では、蓄積は立証されなかった。しかしながら、個体差が大きく、ハロフジノンは半数の動物の血漿から検出されなかったため、この結果は慎重にとりあつかわれるべきである。

GLP 適合のクロスオーバー薬物動態試験では、8 頭の子ウシ(初回投与の初日で 10~15 日齢と 2 回目投与の初日で 17~22 日齢)に推奨用量(0.10 mg ハロフジノン塩基/kg 体重/日; 平均体重は 45 kg)のハロフジノン乳酸塩を静脈内投与又は経口投与した。静脈内投与後、排出半減期は 11.66 時間で、全身クリアランスは 0.6 l/kg 時間、平均滞留時間は 16.7 時間であった。単回経口投与後、血漿中ハロフジノンの最高濃度(4.12 $\mu\text{g/l}$)が投与後 11 時間でみられた。経口投与の排出半減期(30.84 時間)は静脈内投与後に算出されたものより 3 倍高かった。それは、消化管での吸収過程が律速段階となり、みかけ上血液からの消失が遅延したように見える現象 (flip-flop) 現象が存在し、吸収相がハロフジノンの薬物動態学的

挙動を制限する過程であることを意味する。経口の生物学的利用率は 81.1%であった。これらの薬物動態学的パラメータを使って、反復投与のシミュレーションによりこれら若齢子ウシにおけるハロフジノンの蓄積可能性が示された。動物の年齢と体重がハロフジノンの蓄積に影響するかもしれない。

消失試験

2 つの組織消失試験が 1 週齢と 3 週～4 週齢の未反芻子ウシにおいて実施された。

放射性試験では、ハロフジノン乳酸塩を推奨用量(0.10 mg のハロフジノン塩基/kg 体重/日を 7 日間)の ^{14}C -ハロフジノン乳酸塩で 3 頭の 1 週齢の子ウシに経口投与し、投与 6、24 と 48 時間後に屠殺した。経口投与後、24 時間と 48 時間で、非常に少量の総残留物が食用組織において測定された。すなわち、筋肉と脂肪に 40 μg ハロフジノン相当/kg、肝臓に 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、腎臓に 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。これらのデータは屠殺時間あたり 1 頭の動物から得られたものであるため、個体差に関する結論は得られない。

総放射能の 68～95%を、溶媒によって組織から抽出することが出来た。

全ての組織で、 ^{14}C -ハロフジノンが主要な放射性化合物として同定され、筋肉、脂肪及び腎臓では総放射能の約 60%に、並びに肝臓では 52.6%に相当した。

親化合物は残留マーカでありえた。

非放射性消失試験でハロフジノン乳酸塩を 16 頭の 3 週齢の子ウシに推奨用量のハロフジノン 0.1 mg 塩基/kg 体重/日で 7 日間、経口投与した。子ウシは 4 つの群として屠殺した。最終投与後 6 時間で、ハロフジノンが筋肉中に 90 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、脂肪中に 220 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、肝臓中と腎臓中に 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ が測定された。5 日の休薬期間で、ハロフジノンの残留物は肝臓と腎臓で 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、筋肉と脂肪で 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 未満であった。7 日の休薬期間で、ハロフジノンの残留物は筋肉(30 $\mu\text{g}/\text{kg}$)を除く全ての食用組織で 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 台であった。

残留物検出のためのルーチンの分析方法

UV 検出の HPLC 法はルーチン分析法として提案された。全ての検証パラメータは欧州共同体における医薬品に関する規則の Volume VI の勧告に従って測定された。提案された分析方法は全ての可食組織に対して適切に検証されたと結論された。定量限界は筋肉で 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、肝臓、腎臓と脂肪で 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ である。ルーチン分析法の検証の更なる完全性は今もなお要求され、サマリーレポートの 2 つの懸案事項のうちの 1 つである。

休薬期間

委員会の要請により、休薬期間を算出するために、若齢子ウシに Halocur を 7 日間毎日投与し、新しい組織の残留物消失試験が提供された。日齢 4 日～16 日の 26 頭の雄と雌の子ウシが使用された。試験物質を 7 日間連続で 0.1 mg ハロフジノン塩基/kg 体重の用量で 1 日 1 回投与した。投与後、5、10、15、25 日後に屠殺した。残留物の分析には HPLC 法が使われた。(LOQ: 腎臓、肝臓と脂肪は 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、筋肉は 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$)。

可食組織のハロフジノンの平均濃度($\mu\text{g}/\text{kg}$)、認められた濃度の範囲、0.1 mg/kg/日を 7 日間連続経口投与後、組織中の量が MRL を動物の数を、下表に要約している。

		組織中の値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			
		肝臓	腎臓	筋肉	脂肪
投与後の時間(日数)	平均 \pm sd				
5		77.0 \pm 21.01	76.23 \pm 29.76	8.33 \pm 2.74	21.47 \pm 4.49

	範囲 n>LOQ	57.17 - 99.75 5/5	50.66 - 126.47 5/5	<5 - 10.12 3/5	< 10 - 24.64 2/5
10	平均 ± sd 範囲 n>LOQ	24.40 ± 5.38 < 10 - 28.98 3/5	17.92 ± 9.05 10.78 - 29.14 5/5	<5 <5 0/5	< 10 < 10 0/5
15	平均 ± sd 範囲 n>LOQ	< 10 < 10 0/5	10.62 < 10 - 10.62 1/5	<5 <5 0/5	< 10 < 10 0/5
25	平均 ± sd 範囲 n>LOQ LMR	NA 30	NA 30	NA 10	NA 25

平均 ± sd：算術平均と定量限界を超える値の組織の標準偏差；

n>LOQ：定量限界を超える組織の値のある動物の数。 NA：未試験。

全ての検体の 15 日目の結果は陰性であったため、25 日目の検体は試験されなかった。

統計的手法で休薬期間を算出するのは、腎臓の残留物消失についてのみ可能であった。なぜなら、他の組織で定量可能な値を示したのは 1 回(筋肉と脂肪)又は 2 回(肝臓)の屠殺時のみであったからである(i.e. > LOQ)。実質的なアプローチに基づき、休薬期間は 10 日と決定された。その時点で、全ての組織の値は MRLs を下回っている。1 回(筋肉と脂肪)又は 2 回(肝臓)の屠殺時のみ定量的値を示したため、休薬期間に 30%の安全範囲が追加された。したがって、休薬期間は 13 日である。

4. 申請資料の Part IV の概要: 非臨床および臨床的側面(原文、19 ページ)

I 非臨床的必要条件(原文、19 ページ)

A. 薬理学(原文、19 ページ)

A.1 薬力学(原文、19 ページ)

薬力学について提供されているデータは主にハロフジノン臭化物の有効性と二次薬理作用(secondary pharmacological effect)で構成されている。作用機序の記述はなく、ハロフジノンの *Cryptosporidium parvum* に対する in vitro の活性についてのデータは提供されていない。

試験動物種の二次薬理作用 (The secondary pharmacological effects) が提供された。主な結果から(非 GLP 試験の)ハロフジノン臭化物は、特にネコの心血管系(徐脈)に作用を及ぼすことが認められた。マウスとリスザルでは、30 Hz 以下の全ての周波数で総活性量の低下と活性量の低下に示されるように(indicated by a reduction in total activity and a reduced activity at all frequencies up to 30 Hz)、中枢神経系への作用が認められた(1.0 mg/kg 体重の用量で皮質脳波 (electrocorticogram)(EcoG) の明確な活性化をおこした。) In vitro データは、ハロフジノンはアセチルコリン、5-ヒドロキシトロプタミン、塩化バリウムとヒスタミンによって誘発されるモルモットの回腸収縮 (ileum contraction) を拮抗 (antagonize) することを示した。 *Cryptosporidium parvum* に対するハロフジノンの IC₅₀ と IC₉₀ を確認するために vitro study 試験が 1 種類提供された。2 種類のヒトの腸細胞株 (enterocytic cell lines) (Caco2 と HCT-8) が使用された。 *Cryptosporidium parvum* の定量化が抗 *Cryptosporidium parvum* のヒトのポリクロナール抗体 (1: 200) を使って免疫蛍光法で行われ、FITC で抱合されたヒツジ抗ヒト Ig GAM (sheep anti human Ig GAM) (1:100) で明らかになった。0.04~40 µg/ml の範囲の濃度でハロフジノン乳酸塩が使用された。結果は 30 顕微鏡視野 (microscopic field) (x 1000)あたりの平均寄生虫数(mean parasite counts)で示された。3 種類の実験が 6 回繰り返し行われた(Three experiments were performed with six repetitions)。両細胞系の IC₅₀ と IC₉₀ が算出された。このパラメータの測定は IC₅₀ のグラフィック計算と IC₉₀ の回帰直線で得られた。パラメータは下表にまとめられている。

パラメータ	細胞系	
	Caco2	HCT8
IC ₅₀ (µg/ml)	0.073	4.59
IC ₉₀ (µg/ml)	0.078	4.38

IC のパラメータは両細胞系で近かった (are closed)。提供された試験から、ハロフジノンの *Cryptosporidium parvum* に対する IC¹ パラメータが確認された。IC₉₀ は 4.5 µg/ml と確認した。

標的種の特異的な生理機能試験は提供されなかった。

A.2 薬物動態(原文、19 ページ)

ハロフジノンの薬物動態試験が泌乳期乳牛で 1.2 mg ラクタロフジノン (lactalofuginone)/kg 体重の用量で行われた。ハロフジノン乳酸塩の子ウシにおける代謝と動態について 2 種類の試験報告書と 1 種類の公表文献で報告された。

異なる薬物動態のパラメータが 4 頭の子ウシによる試験で提案された。

欧州委員会は、しかしながら、次の理由で新たな結果が提供されなければならないと決定した。

¹ IC = 阻害濃度(inhibiting concentration),

- 当初の(original)試験で使用された用量は、治療用量の10倍高かった。血漿のハロフジノンの薬物動態学的な直線性 (pharmacokinetic linearity) の情報が入手可能でなく、それゆえに、子ウシに0.1 mg/kgの用量で経口投与した後のハロフジノンの薬物動態的作用に対して結果は適切でなかった。更に、投与数が不十分であったので、蓄積量は適切に調査されていなかった。
- 薬物は水溶液中(乳に変わる液体でなく)で強制経口投与された。
- 本試験は体重118~205 kgの「子ウシ」すなわち反すうの子ウシで行われた。製品は非反すうの子ウシへの使用を示唆し、この生理学的相違は動態プロファイルを修正することが求められる。
- 投与された処方薬は評価の際の処方薬とは同じではなかった。Halocurを含む薬物の生物学的同等性の証明は不適切であるとみなされた。

ガイドライン Volume VII の「動物における薬物動態試験の実施」(Conduct of Pharmacokinetic Studies in Animals)(欧州共同体における医薬品に関する規則)(The Rules Governing Medicinal Products in the European Union)に従い、2種類の試験が行われた。

0.1 mg/kgのハロフジノン・ベースを静脈内または経口投与した後の薬物動態パラメータを確認するため日齢6~11日の8頭の反すう前の子ウシを使い試験を行った。静脈内投与後36時間以上と経口投与後96時間以上の血液の検体が採取された。

ハロフジノンを静脈内または経口経路で0.1 mg/kgの用量で単回投与した後の平均(±SD)薬物動態パラメータは下表で提示されている。

薬物動態パラメータ	投与経路	
	静脈内投与	経口
T _{1/2β} (h) (*)	11.66 ± 4.43 (6.6 - 19.6)	30.84 ± 10.16(21.5 - 51.0) ^a
AUC _{0-inf} (ng h/ml)	171 ± 31	110.3 ± 42.2
MRT (h)	16.7 ± 5.1	22.0 ± 5.1
MAT (h)	-----	11.4 ± 4.1
CL _{0-inf} (L/h/kg)	0.604 ± 0.123	-----
V _c (L/kg)	0.94 ± 0.35	-----
V _{ss0-inf} (L/kg)	9.81 ± 2.621	-----
T _{max} (h)	-----	11.0 ± 5.4
C _{max} (ng/ml)	-----	4.12 ± 1.47
F (%)	-----	81.1 ± 29.4

a: 5頭の子ウシで推定された(*)SDとの調和平均(harmonic mean); T_{1/2β}:最終排泄相の半減期(terminal elimination half-life)(括弧内に範囲が示される); AUC_{0-inf}: 静脈内は0と無限大の間、経口は0と分裂の間の曲線下面積(Area under curve between infinity for IV and 0-Clast for oral); MAT: 平均吸収時間(mean absorption time); CL_{0-inf}: 全身クリアランス, V_c: 中心コンパートメントの量(volume of central compartment); V_{ss0-inf}: 定常状態での分布量; C_{max}: 最大観測濃度(maximal observed concentration)、T_{max}: C_{max}が認められた時間; F: 生物学的利用率, LOQ: 1 ng/ml

静脈内投与の後半減期は11.66時間で、単回経口投与の後には30.84時間である。高い分布量はハロフジノンの広い分布 (large distribution) を示唆している。経口投与の後の最大濃度(4 ng/ml)は11時間で達した。平均生物学的利用率は81%と推定される。

ハロフジノンの蓄積を測定するための子ウシに0.1 mg ハロフジノン/kg 体重を1日1回7日間経口投与し、試験が行われた。日齢22~32の10頭の雄の子ウシが使われた。初回投与の後で得られた最大濃度は3.49 ng/mlと4.25 - 6.66 ng/mlであった。最終投与の後、LOQの値は36時間と120時間で達した。明らかな (apparent) 消出半減期は32.8時間であった。最小二乗法による線形回帰モデルに基づく統計的な分析 (A statistical analysis based on the linear regression model by least square) では、血液でのハロフジノンの蓄積は認められないが、ハロフジノンの経口投与後の明らかな (apparent) 半減

期を検討した時にわずかな蓄積 (poor accumulation) が可能であることが認められた。

更に、ハロフジノンは腸管腔の固形成分と結合するが、薬物動態試験でも証明されたとおり、生物学的利用率は高く、もし結合が存在すればそれは可逆性であることを示唆している。それゆえに、ハロフジノンは腸管内の標的寄生虫に達することが明白である。

B. 標的動物種での耐容性(原文、21 ページ)

標的種の許容性に関する異なる試験が提供された。

1つの試験では、12頭の子ウシ(週齢1週間未満の体重の幅が33-60 kgの6頭の反すう前の新生の子ウシと年齢は不明で体重の幅が75~160 kg 6頭の反すうの子ウシ)を4つの投与群に分けた。反すう前の子ウシ(3頭/群)に1 mg/kg(治療用量(TD)の10倍)と1.5 mg/kg(TDの15倍)を3日間連続で投与した。反すう子ウシは1.5と2.5 mg/kg(TDの15と25倍)を投与した。25 mg/mlのハロフジノン・ベースに相当するハロフジノン乳酸塩が30 mg/mlの製品、TERITは30 mlの乳又は水で希釈され経口投与された。ウシは21日間観察された。TDの15倍と25倍を投与した全てのウシは死亡した(9/9)。反すう前の子ウシにTDの15倍を投与したところ3回目の投与前に死亡した。反すうの子ウシはD6~D15の間の3回目の数日後に死亡した。拒食、衰弱、下痢による死亡であった。TDの10倍を投与した反すう前の子ウシ3頭のうち1頭は死亡した。この群のその他の牛は数日間大量の下痢をした。解剖によれば、消化管と副腎肥大の炎症と鬱血が認められた。心臓や腎臓の病変も何頭かのウシに認められた。血液の分析では低タンパク血症 (hypoproteinemia)、尿毒症 (hyperuremia) と高値のクレアチニンが認められたことは蛋白質の消化不足 (digestive loss) と腎不全を示唆している。反すうの子ウシと反すう前の子ウシの製品の致死量はTDの10倍以上と結論した。

投与開始時に日齢7日で体重が37~50 kgの24頭の子ウシ(雄12頭、雌12頭)を6つの投与群に分けた。TDの1倍(1、2と3群)又は3倍(4、5と6群)を7日間連続で投与した。経口経路でスポイトで投与された。1群と4群は給餌前2時間に投与し、2群と5群は給餌直後に投与し、3群と6群の子ウシは給餌2時間後に投与した。給餌前2時間にTDの3倍を投与した4群の3頭の子ウシはD2からD6の間に死亡した。これらの子ウシは死亡前の24~36時間食欲が抑制された。試験期間中その他の子ウシは死亡しなかった。給餌直後または2時間後にTDの3倍の用量を投与しても、本製品は臨床的には耐性が高かった。試験の終盤に下痢の発症率は増加し、おそらく投与依存性であるが、この試験は対照群と一緒に行うようになっていないので、この事象は完全に解釈する事が出来ない (event cannot be interpreted fully)。生化学的所見では全群で総タンパク量の低下傾向を示したが、特に1群、4群と6群で顕著であった。尿素とクレアチニンはTDの3倍投与した群で増加した。両用量を投与した動物種の肉眼及び病理組織学検査で有意な消化器系の鬱血が認められた(特に十二指腸と空腸で)。給餌直後にTDの1倍を投与した子ウシに軽い急性の上皮腎炎が認められたのは投与依存性の可能性があった。死亡した動物の肉眼的および病理組織学的検査では消化管の上皮の溶解 (gastro-intestinal tract epithelium lysis) と上皮腎炎(壊死)が給餌前にTDの3倍を投与した群で認められた。TDの1倍と3倍を投与したその他の動物は十二指腸の粘膜に鬱血が認められるのみであった。本製品は給餌後に投与の時は有意に許容性が高い。

試験開始時に日齢4~8日の24頭の子ウシを2群に分けた(各12頭)。動物にTDの0倍(対照)又は3倍(Halocurを0.6 ml/kg/日、0.3 mg/kg/日のハロフジノン・ベースに相当)を7日連続で投与した。遅延性毒性を試験するため動物を35日以上観察した。スポイトを使って経口経路で、朝の給餌の直後に投与した。TDの3倍を使用した製品では毒性の中程度から重度の徴候を誘発した。投与期間中に3/12頭の子ウシにD7又はD8日に瀕死状態が認められた。それらはD7に時期を早めて屠殺(1/12頭)又はD8に予定通り屠殺(2/12頭)した。投与期間の7日間で、投与した子ウシの7/12頭に脱水症状(D7とD8)が認められ、5/12頭に無気力 (apathy)(D7)が認められた。これらの臨床的所見は対照の子ウシには認められず、投与依存性とみなされた。下痢または水溶性の糞便が6/12頭の投与した子ウシで少なくとも1回は認められた。投与群の糞便の指標はD5、D7とD8で高かった(下痢のため)。乳の栄養代替となる

水分補給液 (rehydrating solution) が子ウシに与えられた。3 頭の子ウシが無気力と乳の拒絶により、特異的な投与が行われた。対照群と比較し、投与され処置がされた(水分補給液やその他)子ウシの数は D5 と D7 の投与群で有意に多かった。D4 と D6 に投与群の動物の直腸温は高かった。乳の摂取量と体重が投与群の動物で作用された。乳の摂取量は D7 の投与群の動物で低く、相関的に体重は D7 の投与群の子ウシで低かった。それ以降は乳の消費量と体重に有意な差異はなかった。リンパ球の数の低下(D4 から D14 に-30%)、高い好中球数(D4 と D7 に+76%から+106%)、そして高値のフィブリノゲン(+38%)が D14 に記録された。有意に高い血液の尿素値が投与した子ウシに D4(2.2 倍)と D7(3.3 倍)に認められた。抗 *Cryptosporidium parvum* の IgM 値は投与群の D14 で低かった。試験全体を通しての抗 *Cryptosporidium parvum* の IgM 値の差異は記録されなかった。糞便中の抗 *Cryptosporidium parvum* の IgA で評価された局所免疫は、D11 に有意な低値が記録されたが、D25 で対照群よりも有意に高かった。D7/D8 に屠殺した 3 頭の子ウシで解剖を行い、消化管に非常に広範囲に及ぶ壊死性炎症の病変が認められた。D28 と D35 に屠殺された動物は消化管、肝臓または腎臓に肉眼での病変は認められなかった。顕微鏡による所見で D7/8 に屠殺した動物の消化管に壊死性の病巣が確認された。D8 に屠殺した投与群の動物の全てのリンパ系臓器の重度のリンパ球の枯渇は組織病理学的変化を現した (A heavy lymphocytic depletion of all lymphoid organs predominate histopathologic changes on all treated animals slaughtered on D8)。D28 に、投与群の 2/4 の子ウシのバイエル板にリンパ球の枯渇が認められ、このパターンは D35(2/4 動物)においても散在した (pattern appeared to be discrete on D35)。その他の臓器は異なる群の間に有意な変化は見られなかった。投与した動物で認められた変化はおそらく胃腸の壊死/炎症性病変と腎不全によって生じたと考えられる。

試験開始時に日齢 4~10 日の 36 頭の子ウシを 3 つの群に分けた。子ウシに TD(0.1 と 0.2 mg/kg/日ハロフジノン・ベース/ 0.2 と 0.4 ml/kg/日)の 0 倍(対照)、1 倍又は 2 倍を 7 日間連続で投与した。子ウシを 35 日間観察し遅延毒性を試験した。朝の給餌の直後スポイトを使い子ウシに経口経路で投与した。試験中に死亡はみられなかった。脱水症状又は衰弱など臨床的に有意な投与依存性の所見は認められなかった。おそらく投与依存性ではない一過性の臨床的徴候(咳、無気力、呼吸器感染)が全群で認められた。投与依存性と思われる唯一の徴候は TD の 1 倍を投与した 1/12(8%)の子ウシと TD の 2 倍を投与した 1/12 の子ウシに投与期間中に発生した下痢であった。両方のケースは、糞便に下痢を引き起こす病原体が認められた。投与期間の後、全群でおそらくロタウイルスに関連しているその他幾つかの症例が記録された。D6 に投与群の子ウシに糞便の粘液の発症率の増加が記録された。D7 に、高用量群で糞便に肉眼でわかる血液の発症率の増加が認められた。体重の増加は TD の容量を投与した群で有意な増加が認められたが、高用量群では認められなかった。子ウシは絶食 (fasting) と濃縮した栄養素の投与で回復した。血液学的所見は、D4-D7 から D21 まで両方の投与群で軽度のリンパ球減少症が認められた(それぞれ 20 と 35%)。D4 から D7 までは、両方の投与群(それぞれ 20-30%と 70-80%)に軽度の尿素の増加が認められた。IgM 値は 14 日目に投与用量が増加したとき低下した。D7 と D11 で、投与した子ウシのクリプトスポリジウムのオーシストの排泄は有意に低かった。D18 に投与の容量が増加しオーシストの排泄は増加した。D8 に投与した子ウシの胃腸管の肉眼による検査では、第四胃、結腸と直腸に病変の高い発症率が認められた。D28 と D35 に肉眼でわかる病変は認められなかった。D8 に行われた病理組織学的試験で全ての投与した子ウシに(各群 4/4 頭)胃腸の病変が認められた。これらの病変(直腸と噴門)の重度は高用量群で高かった。十二指腸と空腸の接点で絨毛の鬱血が幾つか認められた。D28 に、各群の 1/4 頭の子ウシに表在性の微小膿瘍が認められた。D35 には投与依存性の病変は認められなかった。

日齢 1~3 日の子ウシによる 2 種類の新しい試験が提供された。最初の試験では、24 頭の雄の非哺乳期の子ウシ(生後 24~66 時間)を 1 群 8 頭に 3 群に分けた。推奨用量(100 µg/kg 体重/日ハロフジノン・ベース)と推奨用量の 2 倍(200 µg/kg 体重/日ハロフジノン・ベース)を経口経路(処方されたハロフジノン乳酸塩 formulated halofuginone lactate)で 7 日間、朝の給餌後 1 日 1 回投与した。1 群は対照群とした。推奨用量の 2 倍の用量群で、2 頭の子ウシが D7 と D24 に死亡し、2 頭ともリンパ球の枯渇が認められた。それらの肉眼による検査で fibrinomatous 胸膜心膜炎 (pleuropericarditis)又は肺水腫 (pulmonary oedema) 及び閉塞症候群 (occlusion syndrome)の二次性腹膜炎 (peritonitis secondary) が認められ、2 頭の死亡は製品依存性ではないとみなされた。D4 から D7 に、統計的に有意に高い好中球の相対的な比率と、低いリンパ球の比率が認められた。対照値と比較し、以下の差異が報告された。

- * 21、28 と 35 日に、白血球の平均値が低く(それぞれ-28%、-30%と-24%)、21 日目に統計的に有意である。
- * 4、7、14 と 21 日に、好中球の平均値が高く(それぞれ+50%、+46%、+36%と 22%)、4 日目に統計的に有意である。
- * 21 と 35 日にリンパ球数の統計的に有意な低下(それぞれ-40%と-43%)。
- * 4 と 7 日に尿素の値の中程度の増加。対照群に比べてそれぞれ 1.8 と 2.1 倍。

D35 に 3/5 頭の残りの子ウシに回腸のパイエル板に中程度のリンパ球の枯渇を示した組織学的所見が認められた。推奨用量群で副作用は認められず、対照群と比較し統計的により良い体重の展開 (evolution) が証明された。化合物依存性の組織学的所見は見られなかった。回腸のパイエル板の枯渇の散在 (discrete depletion of ileal Peyer's plaques) は 1/6 頭の子ウシで報告された。

推奨用量の 2 倍群の 2 頭の子ウシの死亡は試験の主任 (director) により投与依存性ではないとみなされた。Halocur による可能性があるとして認識された病変(回腸のパイエル板の枯渇)が報告されたため、試験物質の役割は明確に認められなかった。これら 2 頭の子ウシの調査が行われたが、その他の原因の検討を必要とした (allowed consideration of other causes)。明白に、前臨床安全試験における日齢 1~3 日の子ウシの使用は transportation の理由で達成が非常に困難である。治療用量を投与した子ウシは有意な変化は示さなかった。本試験も同様に本製品の非常に狭い安全性指標を例証した。

1 種類の長期の耐性、多施設、対照、無作為試験を、盲検下で新生の子ウシを使い現場の条件で行われた。61%がシャロレー牛、33%がリムジン牛(Limousine breed)そして 6 %が 3 農場の雑種(フランス・モーゼル地域)の生後平均 31.7 時間、平均体重 46.9 kg の 36 頭の新生の子ウシ(雄 18 頭、雌 18 頭)を 12 頭ずつ 3 つの群に分けた。推奨用量(100 µg/kg 体重/日ハロフジノン・ベース)と推奨用量の 2 倍(200 µg/kg 体重/日ハロフジノン・ベース)の Halocur(ハロフジノン乳酸塩)を 7 日間経口経路で投与した。1 つは対照群とした。試験を行ったいずれの群にも死亡は見られなかった。本試験において子ウシは健康な状態を保ち、投与に起因する重度の副作用は認められなかった。0 日目に、3 群は次の基準に関して異なった：生後 0 日目(対照群はそれを上回る)、糞便中の血液の存在、白血球数と好中球の白血球百分率(これらのパラメータは 200 µg/kg の用量でより上昇した)。これらの差異は D14 で消滅した。200 µg/kg(7 と 14 日目に p=0.13)の用量を投与した群で細胞数は低かったがリンパ球の数に統計的に有意な差異は記録されなかった。コロナウイルスとクリプトスポリジウム感染は散在であったが、大腸菌とロタウイルスは約 50%の子ウシから検出された。異なる群での有意な差異は証明されなかった。体重の測定から D7 から D28 までは特に投与は体重増加に肯定的な影響があるかもしれないことを示唆している。

上記の試験における再発する毒性症状の全体の評価を以下にまとめている。

推奨用量でのリンパ球減少症

報文 (Published reports) によると、子ウシの間での白血球数の相当なばらつきは、年齢、筋肉活動、情動状態 (emotional status) によって存在すると明らかにし、白血球数と好中球/リンパ球比率は出生のストレスに応じて子ウシの間に顕著な相違を示すことを明らかにしている。さらに、子ウシの年齢が高くなりリンパ球減少症や好中球増加症が新生の子ウシに定期的に認められると白血球の数は減少する。

許容性試験 (tolerance study) で、子ウシの白血球の数とリンパ球の数に変動を示したことは、正常な範囲内であるとみなされた。白血球数とリンパ球数の減少は、治療用量の 2 倍と 3 倍を投与した群で主に傾向として認められた。治療用量で、リンパ球の数は D7 にのみ 20%の低下を示した。認められたリンパ球数の低下は統計的に有意な値には達しなかった。

現場での許容性試験で、治療用量の 2 倍で認められた低下はわずかで、一過性で、56 日のフォローアップでも臨床的帰結はなかった。

パイエル板のリンパ球の枯渇 (PPLD)

許容性試験で、治療用量の3倍で行った K95TRI 試験で、8日目に屠殺した4/4頭の子ウシと28日目に屠殺した2/4頭の子ウシは PPLD を示した。これは D35 に屠殺した子ウシには認められなかった。この枯渴は、よって本質的に一過性であった。他の試験では推奨用量の2倍のいくつかの動物種でのいくつかの PPLD を示したが、投与の関係性を明白に結論することは困難であった。K96 TNB 試験で8日目に1/8頭の子ウシにわずかな PPLD を示したが D35 には認められなかった。

胃腸管の病原体への感度(sensitivity)の増加

耐性試験と臨床試験で、病原体の発生と関与はフォローアップとレビューの対象となっている。カンピロバクター、サルモネラ、ロタウイルス、コロナウイルスなどの胃腸の病原体が異なる試験で検出されている。これらの試験では有意な傾向はみられず、投与中そしてその後、製品の子ウシの胃腸の病原体への感度 (sensitivity) は上昇しないようである。

結論として、耐性試験で認められたリンパ球減少症と白血球数の減少は推奨用量では軽度 (low magnitude) で一過性であり、報告された値はこの年齢の動物種においては正常な範囲内の値である。推奨用量と推奨用量の2倍で子ウシに PPLD が発生したことは投与依存性の可能性もあるが、明確な結論を出すことは困難である。この特性は本質的に一過性で現場試験での胃腸の病原体の発生の調査では製品の投与中とその後、子ウシへの感度は上昇しない。

腎臓の機能

解剖で、対照群と投与群の両方に間質性腎炎に類似する病変が認められ、血液の尿素窒素の上昇との関連性は確認されなかった。血液の尿素窒素の非特異性と耐性試験で認められた増加の一過性の性質は、腎機能への有害作用の示唆とみなされない。

胃腸の感作性

異なる耐性試験と臨床試験では、推奨用量での本製品による下痢の発症率の増加はないことを示したと同意した。しかし、SPC (5.8)は推奨用量の2倍で起こる症状の特徴を示し(下痢、糞便中の肉眼でわかる血液、乳の摂取量の低下、脱水症状、無気力、衰弱)、厳密に推奨用量を適用することを必要としている。

耐性試験と現場の臨床試験で使用された基準を含めることを考慮し、本製品は24時間以上下痢が続き衰弱した動物種には投与すべきでない。更に、空腹時の動物種 (fasting animals) への使用は安全性の理由により禁忌とされるべきである。

結論として、本製品の安全指標は明白に低く、よって下記の警告を必要とする。

- SPC の 5.3. の禁忌のセクションに:
「空腹時の動物には使用しない」
「24時間の下痢が続き、衰弱した動物には使用しない」
- SPC の 5.4. の使用における特別注意事項 (Special precautions) のセクションに:
「初乳給与、乳の給与または代用乳の給与の後にはのみ、スポイトまたは経口投与に適切な道具を使用し投与する。胃が空のときには使用しない。食欲減退の子ウシの投与には、本製品を1/2リットルの電解質溶液中に投与する。GBP (good breeding practice) に従い動物種には十分な初乳を与えなければならない。」
- SPC の 5.8. の過剰投与 (Overdose) のセクションに:
「治療用量の2倍の用量で毒性の症状が現れるため、推奨用量を厳格に守り投与することが必要である。毒性の症状には、下痢、糞便に肉眼でわかる血液、乳の摂取量の低下、脱水症状、無気力と衰弱がある。過剰投与による臨床的徴候がおきた場合、投与を直ちに中

止し動物には非投与の乳を給与する。水分補給が必要となる。」

C. 耐性 Resistance(原文、25 ページ)

低用量を投与した排泄物からのオーシストが認められた子ウシの試験が行われた (A study was performed on calves receiving oocyst excreted from low dose treated animals)。これらの動物種は増加した用量を投与された。平行して、推奨用量を投与した他の子ウシにオーシストを摂取し薬の有効性が評価された。認められた基準は: 死亡、体重と体重増加、オーシストの脱落 (shedding) である。25 µg そして 37.5、50、62.5 と 75 µg/kg/日と 5 種類 (passages)、7 日間使用した後 (after 5 passages using 25 µg then 37.5, 50, 62.5 and 75 µg/kg/日 for 7 days)、耐性の発現 (emergence of resistance) は認められなかった。

第 II 章 臨床的必要条件(CLINICAL REQUIREMENTS)(原文、25 ページ)

申請者は 5 種類の用量滴定試験、局所免疫を調査する 2 種類の試験、2 種類の有病率試験、治療同等性試験(therapeutic equivalence study)、若いヤギのハロフジノンの作用機序の試験と 3 種類のフィールド試験を提出した。

有病率試験 (Prevalence studies)

疫学的調査、多施設共同 (multicentric) 、プロスペクティブ (prospective) 並びに記述 (descriptive) 試験がフランスの 7 地域で行われた。12 ヶ月の期間中に 1630 頭の子ウシが調査された。子ウシは出生後平均して 8±4 日で 94.6%は雄であった。下痢は 5.2%の子ウシのみ認められた。約 17.9%の子ウシはクリプトスポリジウムのオーシストを排泄した(95%信頼区間 (confidence interval) は (16.1%-19.8%))。最低有病率 (The minimum prevalence) が 7 月に記録され(7%)、最高有病率は 9 月に認められた(26%)。地域別では、最低有病率はブリタニー(Brittany)地域(13.3%)で、最高有病率はフランシュコンテ(Franche-Comté)地域(25.3%)であった。

別の疫学的調査では、フランスの 189 農場で行われた多施設共同 (multicentric) 及び記述 (descriptive) 試験が提供された。サンプル時に日齢 4~21 日の合計 440 頭の子ウシは 72 時間未満に下痢を起こした。平均日齢は 9.8 日で、46.3%が雄そして 53.7%が雌であった。下痢は 90.5%の子ウシに認められた。41.8%の子ウシは水溶性の下痢をおこし 43.9%はある程度の脱水症状をおこした。クリプトスポリジウムの有病率は 43.4%の子ウシで確認された。最低有病率は 1 月に記録され(32.9%)、最高有病率は 12 月に認められた(53.0%)。クリプトスポリジウムの存在は確実に (positively) 有意に下痢と相関がある: オーシストの排泄率は下痢をしていない子ウシ (non-diarrhoea calves) は 28.6%であったが、下痢をした子ウシは 45.0%であった。この結果は、新生児動物の腸炎におけるクリプトスポリジウムの重要性を確認した (原文は comfort)。下痢をした子ウシのほぼ半分はクリプトスポリジウムを排泄した。

用量の滴定試験(Dose titration studies)

子ウシに *Cryptosporidium parvum* の孢子形成オーシストを摂取した 1 種類の試験を除き、用量の滴定試験を行った子ウシは必然的に *Cryptosporidium parvum* に感染した。

代用乳を与えた平均体重 46.2 kg の日齢 3~6 日の 50 頭の子ウシに 0.5 mg/kg のハロフジノン乳酸塩を投与した。16 頭は未投与で、17 頭は 1、2 と 3 日目(A 群)に投与し、17 頭は 1、4 と 7 日(B 群)に投与した。投与期間中と投与後、両投与群の子ウシに有意な下痢の増加と有意な体重の減少を示した。28 日目に、有意な体重増の低下が A 群に記録された。A 群で 2 頭の子ウシが死亡した。全ての未投与の子ウシは 9 日目から 13 日目の間に最大排出率のオーシストを排泄した(平均 log₁₀ の 6.85~6.92)。両投与群で排泄は止まったが、休薬後 9~10 日で再発した。3 群からビルナウイルスが分離された。生後 2

週間の後、自然免疫力により *Cryptosporidium parvum* から保護されるようにみられる; 20 日目に、対照群の 1 頭の子ウシのみオーシストを排泄した。

代用乳を与えた日齢 3~6 日の平均体重 47 kg の 50 頭の子ウシに 0、60(14 日間)、125(1、4、7 日目) 又は 250 µg/kg(1、4、7 日目)のハロフジノン乳酸塩を投与した。異なる群、または体重増の間に下痢をおこした動物種の数に差異はなかった。全ての未投与の子ウシは 7 日目と 13 日目の間に最大排泄率 (maximal excretion) のオーシストを排泄した(時を異にして)。投与群で排泄は完全に止まったが 3 と 4 群で休薬の後 10 日で再発した。2 群で、4 頭の子ウシが休薬後 6、13 と 32 日で再び陽性になった。各群で 5~8 頭の子ウシからロタウイルスが分離された。薬の耐性は高かった。二者択一的に (alternatively) 投与された子ウシと比較し(3 群と 4 群)、継続した投与の後(2 群で) *Cryptosporidium parvum* の排出率の低下が認められている。

代用乳を与えた日齢 3~6 日の平均体重 46.7 kg の 50 頭の子ウシに 0、30(14 日間)、60(7 日間)又は 125 µg/kg のハロフジノン乳酸塩を投与(7 日間)した。異なる群、又は体重増で下痢を起こした動物種の数に差異はなかった。下痢の排泄の徴候のみ異なる群で認められた。全ての未投与の子ウシは 6 日目と 13 日目の間に最大排泄率のオーシストを排泄した。13 日目の後、排泄は認められなかった。投与群で排泄は止まったが、3 群と 4 群(4 群でより多いオーシストの数)でそれぞれ 10 日と 6 日後に何頭かの子ウシが再発した。2 群では、全ての子ウシは投与 6 日目に陰性を示したが、投与 8 日目に 3/13 頭に再びオーシストが検出された。ロタウイルスが各群 5 頭中 2 頭の子ウシから分離された。60 又は 125 µg/kg のハロフジノン乳酸塩は寄生虫による排泄を止める効果があり、それ故に外部汚染を削減すると結論することができるが、しかし *Cryptosporidium parvum* は対照群では真の臨床的問題を代表しなかった。未投与群で、IgA と IgM は 6 日後に最高に達し(6 日目から 13 日目の間のオーシストの最大排出量)、そしてオーシストの脱落 (shedding) が止まったときに下降した。力価は 27 日で再び上昇した。投与群で IgM と IgA の上昇は投与中はあまりはっきりしていなかったが、製品の投与は免疫反応を阻害しなかった。1 群で減少はより急速に発生(そして 2 群で最高だった)した。力価は再び休薬後 7 日目で上昇し、2 群よりも 4 群の上昇は高かった。3 群は中間だった。

0 日目に 20 頭の日年齢 1 日の子ウシに経口で *Cryptosporidium parvum* 10⁶ 個の孢子形成オーシストを植菌した。感染後 2 日から 8 日の 5 頭の子ウシの 4 群にそれぞれ 0、30、60 と 120 µg/kg のハロフジノン乳酸塩を投与した。各群で 3/5 頭の未投与群と 30 µg/kg 群で高い死亡率がおこった。他の群では死亡は認められず、下痢 2 症例が 60 µg/kg 群で認められた。未投与群で、オーシストの排泄は 3 日目に開始し 7 日目に最大になり(スコア 4)そして 14 日目に終了した。30 µg/kg 群で、オーシストの脱落 (shedding) は投与中は完全には低下しなかったが(スコア 1~1.5)その後の再排泄 (re-excretion) はなかった。60 と 120 µg/kg 群で投与中に完全な阻害があったが、60 µg/kg 群では休薬直後に、120 µg/kg 群では休薬後 10 日で再び開始した(スコア 1.5~2)。未投与群で、IgA と IgM はオーシストの脱落中に増加し (increased during oocyst shedding)、そして 14 日目の後に減少した。IgG は 14 日目までわずかに上昇し、その後低下した(各群で 2 頭の子ウシに投与、3 頭が死亡)。投与群で、投与中は IgM 活性は全ての群で存在し、一方で IgA の活性は群の間でも異なった。30 µg/kg 群で、IgA は投与中にオーシストの没落に一致して上昇し 60 と 120 µg/kg の両群で休薬の後オーシストの排出量の低下に関連して IgA の値は上昇した。

代用乳を与えた日齢 7 日の平均体重 47.8 kg の子ウシ 50 頭に 60 又は 120 µg/kg のハロフジノン乳酸塩を 7 日連続で投与した。16 頭の子ウシは未投与であった。各群日齢 112 日の子ウシ 5 頭に *Cryptosporidium parvum* のオーシスト 107 個を経口で投与し、各群で 5 頭の子ウシを対照とした。4 週間で、次のパラメータが検査された: 臨床的徴候、オーシストの排泄、局所抗体と血清抗体 (local and serological antibodies) ロタウイルスとサルモネラの発症も評価された。異なる群又は体重増加で、下痢をおこした動物種の数の差異ははかった。全ての未投与の子ウシは到着後 (after arrival) 7 日で最大排出量のオーシストを排泄した(時を異にして)。その後、35、49 日と 98 日で排出量のピークはほんのわずかに認められた。投与群で 7 日目に排泄は完全に止まり、休薬後 7 日で幾つかのケースで再発した(低数のオーシスト)。その後、未投与群で排出量のわずかなピーク (small peaks) が認められた。サルモネラの微生物は検出されなかった。到着後 (after arrival)、主に 21 日~35 日に各群でロタウイルスが

排泄され(8~14 頭の子ウシ)排泄は水溶性から粘液性の糞便と関連性があった (elimination was associated with liquid to mucus faeces)。投与群の IgA、IgG と IgM の反応速度 (kinetics) は未投与群の反応速度に類似していた(未投与群よりもやや低い)が差異は有意ではない)。臨床的徴候に反映されている通り、又はオーシストの排泄が記録されている通り、動物種は大量投与 (massive challenge) に完全に反応がなくなった (The animals remained completely refractory to the massive challenge as reflected in no clinical signs, or oocyst excretion being recorded)。IgA を投与した子ウシのみ対照と比較してわずかに上昇した(しかし、差異は有意ではない)。ハロフジノンの用量の違いに差異は確認されなかった。

多施設共同 (multicentre) 比較試験で、自然に感染した子ウシの予防的及び治療的投与を調査した。異なる 3 農場の 166 頭の新生のベルギー・ブルー・ホワイト牛に 0、60 又は 120 µg/kg のハロフジノン乳酸塩を 7 日間連続で経口投与した。各農場で、子ウシは無作為に 3 つの投与群の 1 つに振り分けられた。数頭の子ウシは出生後 4 日目から 7 日間連続で予防投与が行われた。その他には、最初の下痢の症状が発生したあと、治療的投与が行われた。全ての子ウシはコロナウイルス、ロタウイルス、大腸菌 K88 のワクチンを接種した親の初乳が与えられ、出世後、子ウシは母親と一緒に保管または、分離し、乳が与えられた。子ウシはワクチン接種を受けず、流行性大腸菌症 (endemic colibacillosis) のため、日齢 2~3 歳で、非経口での抗生物質(コリスチン又はジェンタマイシン (colistin or gentamicin))投与を受けた。農場ごとの結果が分析された。Durand の農場: 未投与の子ウシは出生後 4 日から 21 日の間に下痢を起こし、7 日目で最高になった。投与群で下痢は有意に低下し、120 µg/kg 群では最初の 2 週間はほぼ完全に予防できた。下痢発症のピークは 120 µg/kg 群で投与終了の 1 週間あとの 14 日目に認められた。全ての未投与の子ウシはオーシストを排泄(7 日目で最大、18 日目で終了)したが、投与群で排泄は有意に低下した(60 µg/kg 群と比較し 120 µg/kg で低い)。投与が終了した後は排泄の上昇はなかった。抗生物質の動力学 (Kinetics) は 3 つの全ての群で類似していた。Loyens の農場: 3 群でわずかな下痢が認められ、オーシストの排泄は全ての子ウシで非常に少なかった(未投与群で 3/17 頭)。治療投与 (curative treatment) を行った群は、Durand 農場で、未投与の子ウシは出生後 11 と 21 日の間に下痢をおこし(ピークは 14 日)、投与は出生後最初の下痢の徴候から 8±1 日に始まったが、両投与群の臨床的徴候は減少しなかった(60 mg/kg 群で下痢が最も重要だった日数 (number of days of diarrhoea was the most important in 60 mg/kg))。ほぼ全ての子ウシはオーシストを排泄した。投与群でのオーシスト排泄の減少 (Low diminution) は 11 と 14 日に認められた。抗体の動力学 (Kinetics) は、子ウシが母親と一緒にあるなしにかかわらず、3 群の間で異ならなかった。Lummen の農場: 未投与の子ウシは出生後 4 日と 21 日の間に下痢を示し(ピークは 11 日)、投与は出生後最初の下痢の徴候から 8±3 日に開始したが、両投与群の臨床的徴候は減少しなかった。オーシストの排泄は 3 群で類似し(ピークは 11 日)、抗体の滴定濃度も類似していた。臨床的結果も寄生虫学的結果も投与の治療的効果を立証できなかったと結論された。予防的投与について: Loyens 農場の子ウシは *Cryptosporidium parvum* の有意な感染はなく、Loyens 農場では陽性反応は証明されたが、Durand 農場では、下痢の予防は明白に証明された。臨床的徴候の予防とオーシストの排泄は 7 日間連続のハロフジノン乳酸塩の 120 µg/kg の高用量の投与でより良好だった。

同じ用量と同じプロトコール(*Cryptosporidium parvum* の自然状態)でメタ分析の試験が行われた。全部で 186 頭の子ウシでメタ分析を行った。2 頭ずつ分けられた群 (the groups taken two by two) のスコア・カウント (score counts) と糞便の指数が異なる時に比較され、線量効果関係 (A dose-effect relation) が調査された (Mantel-Haenszel Chi Squared linear correlation test)。対照群と 120 µg/kg の投与群とで 4 日から 11 日まで、そして 4 日から 14 日まで有意に異なるスコア・カウントが認められている。7、11 と 14 日目には、120 µg/kg 群では 60 µg/kg 群よりもオーシストの排泄は有意に重要度が低い。線量効果関係 (A dose-effect relation) が 4 日と 14 日の間に認められている。糞便の指数の有意な差異が投与群と対照群の両方で 11 日目に認められている。線量効果関係 (A dose-effect relation) が 4 日目と 11 日目の間に認められている。

結論として、メタ分析はオーシスト排泄の低減には 120 µg/kg の用量の選択を確認している。下痢予防の役割はより証明が困難であった (less demonstrable)(差異は 11 日目のみ)。対照群で糞便の指数は非常に低かった。メタ分析では 11 日目の平均スコア 0.6 が最大で登録された (registered)。

補足データ(Supplementary data)

これまでの試験ではハロフジノン乳酸塩を 1: 50 の水の希釈率の濃度で用いて行われたため、Halocur の治癒的同等性試験 (therapeutic equivalence study) が行われた。この対照、無作為試験は 20 頭の新生(出生後 12 時間から 48 時間)の子ウシで行われ、還元乳 (reconstituted milk) を 1 日 2 回与えた。到着時に糞便の検体にオーシストのある子ウシは除外された。全ての子ウシは 0 日目に経口で 1×10^6 の *Cryptosporidium parvum* のオーシストを摂取した。投与は 2 日目と 8 日目の間に行われた。4 頭の子ウシは未投与で、8 頭は 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の 0.05% 溶液を 7 日間連続して投与し、8 頭は 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の hb を Terit と一緒に 7 日間連続で投与した。統計的検出力が内在的に乏しい (inherent lack of statistical power) ため同等性について結果は結論に達しなかった。

出生後初乳(56°C で 1 時間加熱)とその後に還元乳 (reconstituted milk) を 1 日 2 回 16 頭の新生の雄ヤギに与えた。児動物に 120 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (10 kg に 2 ml の溶液)のハロフジノン乳酸塩を与えた。溶液は朝の給餌直前に 5 日間連続で投与された。0 日目に経口で 1×10^6 の *Cryptosporidium parvum* のオーシストを摂取した。

N = 各群 2 児動物

1 群	2 群	3 群	4 群	5 群	6 群	7 群	8 群
未投与	感染前 24 時間に投与	感染と同時に投与	感染後 6 時間で投与	感染後 12 時間で投与	感染後 24 時間で投与	感染後 48 時間で投与	感染後 72 時間で投与

4 日目から 8 日目の間、未投与群で排泄は非常に多量(平均 2×10^8)^{*}であった。未投与群と比較し、投与群のオーシストの排泄は投与の時間に依存して減少した。

オーシスト排泄の減少 (%)	2 群	3 群	4 群	5 群	6 群	7 群	8 群
	96.13	92.72	86.79	78.25	41.03	93.12	67.25

1 つの群内でそれは異なっていたことが認められた(2 頭)。これらの結果から、ハロフジノン乳酸塩は *Cryptosporidium parvum* の種虫の遊離期 (free stage)(最大の有効性は感染前の 24 時間に投与した時と感染と同時に投与した時)と娘虫体 (merozoites) (摂取後 48 時間の有効性)に作用すると推定された。一方で、寄生虫が腸細胞にいる時の有効性は低い。残念なことに、下痢の臨床的徴候は本試験では考慮されなかった。しかし、再び、葉の投与が遅いほど、オーシストの排泄量の低減は低いことが示された。

下痢をしている新生の子ウシで多施設共同、非比較試験が行われた。子ウシに 0.5 mg/kg のハロフジノン乳酸塩を投与した。水分補給治療、止痢剤と抗生物質で治療を行った。初診のときに糞便の物質を抽出し、クリプトスポリジウム、サルモネラ菌、腸管病原性大腸菌とウイルスの存在を検査した。初診時に投与を開始したが、顕微鏡による検査でクリプトスポリジウムの存在が確認された場合のみ継続された。5 日後、(時折 15 日後、)クリプトスポリジウムの研究のため新しい糞便の検体が採取された。274 頭の新生の子ウシが検査され、そのうち 105 頭(38.5%)からオーシストが認められた。これら 105 頭(主に日齢 < 16 日)で、67 頭はクリプトスポリジウムが下痢の原因であるとみなされた(その他の細菌やウイルスは分離されなかった)。オーシストの数は最初の検体で高かった(51.5%スコア 4)が、オーシストの数と臨床的徴候の重症度の関連性は確証されなかった。84 頭で、2 回目の検体採取が行われ(5 日目)、77 頭がクリプトスポリジウムに対して陰性だった(91.7%)。21.8%の子ウシは死亡した。下痢は 68.3%

^{*} 原文は 2.10^8 であったが、 2×10^8 と解釈した。

の子ウシで止まった。対照群と高用量群が不在なため、本試験は Halocur の効果を証明する上で影響力が低い (poor interest)。

フィールド試験(Field trials)

フランス 3 県 40 家畜農家で多施設共同、比較(対プラセボ)、無作為、二重盲目試験が行われた(選定: クリプトスポリジウム症の発症歴があり *Cryptosporidium parvum* に対し陽性の検体)。日齢 4 日から 10 日になった時、及び介入時に日齢 4 日から 10 日であった他の子ウシに、2 ml/10 kg のハロフロジンまたはプラセボを含有する溶液を 7 日間連続で経口投与し < 24 時間で下痢が生じた。哺乳期の直後スポットで、又は 1/2 リットルの水分補給中に薬は投与された。スルホンアミド (sulfonamides)、スルホン、ニトロフラン (nitrofurans) と全ての抗コクシジウム剤と抗原虫剤の使用は禁じられている。311 頭の子ウシが含まれた。殆どが哺乳期の子ウシであった。投与群は 158 頭、対照群は 153 頭だった。平均日齢は 6 日で、53%は雄、平均体重=45 kg だった。2 群の間に、全身状態、糞便の指標とオーシストの数に差異は認められなかった。82%の子ウシの全身状態は良好で、76.2%は正常な食欲で、91.3%は脱水症状は不在であった。48.5%の子ウシは水溶性または半水溶性の下痢を示した。50.2%の子ウシはオーシスト・カウントスコア (oocyst count score) に対して陽性を示した。下痢と *Cryptosporidium parvum* の存在(108 頭で両方に存在)の関連は分析 ($p < 0.001$) によりコロナウイルスの存在によると示された。31%の子ウシに病原因子は認められなかった。ロタウイルスが 13.2%の子ウシから分離され 6.4%からコロナウイルスが分離された。多くの子ウシは 0 日と 6 日目の間に併用療法 (concomitant treatment) が行われた: 65%に抗生物質を、20~30%に水分補給剤と止痢剤を使用した。ロタウイルスとコロナウイルスを保有する子ウシの数は追跡期間中に増加せず、2 群間の差異はなかった。

オーシストのカウントスコアの進展: スコア 0 又は 1 以上を示した子ウシの数;

検体採取日	HALOCUR		プラセボ	
	スコア = 0	スコア ≥ 1	スコア = 0	スコア ≥ 1
D0	83	75	72	81
D3	33	125	24	129
D7	32	126	21	132
D14	118	40	110	43

糞便の指標の進展: スコア 0(下痢の症状なし)又はスコア 1 と 2(半水溶性又は水溶性の下痢)を示す子ウシの数

検体採取日	HALOCUR		プラセボ	
	スコア = 0	スコア 1 と 2	スコア = 0	スコア 1 と 2
D0	81	77	79	74
D3	78	80	56	97
D7	89	69	59	94
D14	122	36	101	52

プロトコールで定義されている失敗 (Failures) (4 vs 9 症例)又は再発(4 vs 5 症例)は異なる群の間で差異はなかったが、死亡率はプラセボ群で高かった(12 vs 3 症例)。死亡率を含む副作用試験で、糞便中の血液または併用療法の使用は 2 群間に差異がなかった。本試験の結果は HALOUUR の治療用としての有効性を証明しなかった。両群の 0 日から 14 日のオーシストの数の展開は同じで(約 80%の子ウシはオーシストを 3 日目と 7 日目に排泄し、26%は 14 日目に排泄した)、下痢の停止は対照群と比較し投与群の子ウシで 11%から 17%のみ上回ることが記録された。

0 日目の異なる臨床状態による混乱のため、本試験の再分析が以下を考慮し行われた。

- D0 に下痢をおこした子ウシ(子ウシの 48.5%に水溶性又は半水溶性の下痢を示す)でその結果治癒的狀況で投与された (consequently were treated in a curative situation)。
- D0 に下痢をしていない子ウシで、その結果予防的状況で投与された (treated in a preventive situation)。

1 – 治癒的状態 (Curative situation) (n = 151):

プラセボ群では 70%と 61%の子ウシはそれぞれ D0 と D7 に下痢をおこし、対して投与群では同じ日にそれぞれ 50%と 41%であった。

水溶性の下痢に関して、D3 と D7 にプラセボ群でそれぞれ 31%と 26%、対して Halocur 群ではそれぞれ 18%と 12%であった。下痢と水溶性の下痢の減少が投与群で認められた。

糞便の指標の統計的分析が行われた(0、1 又は 2)。

D3 の投与群の平均 0.69 vs プラセボ群の 1.01

D7 の投与群の平均 0.52 vs プラセボ群の 0.86

脱水症状の作用が混乱の要素であることを考慮し(D0 のプラセボ群でより多くの子ウシが脱水症状をおこした)、投与群に有意な糞便の指標の改善が認められた ($p = 0.02$)。

更に、クリプトスポリジウム(*Cryptosporidia*)のカウントスコア (count score) の減少に投与による有意な作用が認められる ($p = 0.0005$)

死亡率：プラセボ群で 10 頭の死亡が、投与群で 3 頭の死亡が記録された($p = 0.12$)。

2 – 予防的状態 (Preventive situation) (n = 160):

オーシスト・カウントスコアに対して投与による有意な作用は認められなかった。糞便の指標は、有意性の限界(limit of significance)で異なった ($p = 0.06$)。

D3 の投与群の平均は 0.78 vs プラセボ群の 0.90

D7 の投与群の平均は 0.67 vs プラセボ群の 0.81

死亡率：プラセボ群で 2 頭の死亡、投与群では死亡はなかった(NS)。

この試験は治療的状況でフィールド試験のみが行われた。投与の効果は下痢の低減で示された。死亡に対する投与の効果は疑問が残り、体重増加の効果は調査されなかった。

これらの結果は、下痢«治療»の適応の臨床的有意性を補強するには、不十分である。クレームは、24 時間未満に下痢を呈した子ウシに主だった限定を行い、例えば、«*Cryptosporidium parvum* による下痢の低減»といった得られた効果についてのみに制限されなければならない。本試験では予防効果を示すことができなかったが、それは本試験の目的ではなかった。

多施設共同、比較(対プラセボ)、無作為、二重盲目試験が 6 箇所の産業用畜産農家で行われた。下痢を発症・未発症の日齢 8~15 日の子ウシが含まれたが下痢> 24 時間の子ウシは含まれなかった。子ウシに 2 ml/10 kg のハロフジノンまたはプラセボを含む溶液を経口で 7 日連続で投与した。合計で 382 頭の子ウシが含まれ、191 頭の子ウシを各群にわけた。平均日齢は 6 日で、91.6%が雄、平均体重は 52.4kg であった。

体系的併用療法 (Systematic concomitant treatments) が D7 前後の全ての子ウシに行われた(3 農場でコリスチン+オキシテトラサイクリン、そして別の 3 農場でコリスチンとイベルメクチン (ivomec))。1 つの試験で、15 日と 26 日に子ウシに肺炎の治療を行った。薬量学が尊重され、1 日の平均用量の 10.5 ml を平均期間の 7 日間投与し、100%のケースでスポイトを使って薬を直接投与した。0 日の臨床的または寄生虫学的徴候は 2 群間の全身状態に差異を示さなかった。殆どの子ウシは良好な状態で(99%の子ウシ)、正常な食欲(99.7%)で脱水症状はなかった(97.1%)。オーシストの数では、83.3%の子ウシはクリプトスポリジウム (*Cryptosporidia*) に対して陰性であった。コロナウイルスが 31%にロタウイルスが 9.7%の子ウシに見つかった。

49%の子ウシに病原体は認められず 6.3%の子ウシは水溶性又は半水溶性の下痢を D0 に示した。下痢の

有無とクリプトスポリジウムとロタウイルスの存在の間に統計学的関係が認められた。試験中のその他の病原体の発生 (Evolution of other agents) は多くの子ウシにロタウイルス(30%)とコロナウイルス(35%)が 7 日目に増加した。ロタウイルスは 14 日目に低下し(11.8%)、コロナウイルスの有病率 (prevalence of coronavirus) は高値を維持した(36.7%)。分析は投与群でより乏しい結果 (poorer result) を証明した。実際、各群の子ウシは別々の部屋に収容され、問題はおそらく投与関連ではなく収容に関係していた。

オーシストのカウントスコアの展開(Evolution): スコア 0 又は 1 以上を示した子ウシの数				
抽出日	HALOCUR		プラセボ	
	スコア = 0	スコア ≥ 1	スコア = 0	スコア ≥ 1
D0	158	33	160	31
D3	179	12	147	44
D7	187	4	92	99
D14	163	28	130	61

オーシストのカウントスコアの減少は HALOCUR 群で D0 と D14 の間に統計的に有意である(7 日目に差異が最大に達する)。農場の場所による有意な影響が認められた。

糞便の指数の展開(Evolution): スコア 0 (下痢症状のない) 又はスコア 1 と 2 (半水溶性又は水溶性の下痢)の子ウシの数				
検出日	HALOCUR		プラセボ	
	スコア = 0	スコア 1 と 2	スコア = 0	スコア 1 と 2
D0	184	7	174	17
D3	145	46	152	39
D7	127	64	139	52
D14	152	39	160	31

統計的な分析では D0 から D14 の糞便の指数の発展には投与による作用はなかったことを示した。農場の場所による有意な影響が指摘された。死亡率(プラセボ群で 1 頭の死亡に対し 3 頭)、糞便中の血液と併用療法の使用については 2 群の間に差異は認められなかった(系統的差異の他に)。副作用による休薬は必要ではなかった。結論として、6.3%のみの子ウシが 0 日目に下痢を発症したことを考慮し、臨床的結果は申請者の主張どおりに下痢の予防を立証しなかった(糞便の指数に有意な差がなかった)。*Cryptosporidium parvum* 感染の可能性は臨床的徴候を導くには不十分であった。薬剤の寄生虫学的効果は十分に証明された(7 日目に対照群で 52% vs 投与群で 2%がオーシストを排泄)。

欧州委員会は「下痢の予防」の主張を立証する新たな情報を要求した。

新たな試験が提出された。

初乳をまだ飲んでいない、24 時間以上合併症 (concomitant pathology) 又は下痢を発症していない、抗コキシジウム剤または抗原虫剤を投与していない生後 24 時間から 48 時間の 158 頭の子ウシで多施設共同、比較(対プラセボ)、無作為、二重盲目試験が行われた。子ウシに経口でハロフジノン又はプラセボを含有する 2 ml/10 kg の溶液を 7 日間連続で投与した。投与群の子ウシには 100 µg/kg のハロフジノン・ベースを投与した。有効性の主な基準はオーシストのカウントスコアであった。13.9%の子ウシのみが下痢の症状を示した。半分の子ウシは大腸菌 K99 に陽性を示した。

有効性の結果:	HALOCUR					プラセボ				
	V0	V4	V7	V14	V21	V0	V4	V7	V14	V21
オーシストスコアの平均	0.01	0.56	1.38	2.68	0.54	0.00	1.44	3.54	1.96	0.01
下痢スコアの平均	0.24	0.35	0.53	0.34	0.18	0.15	0.65	1.06	0.25	0.15

V7 に、41/79 頭(51.9%)の子ウシのオーシストカウントはプラセボ群でスコア 5 を示したが、Halocur 群では 9/78 頭(11.5%)のみの子ウシが同じスコアに達した。この時点で、プラセボ群で 87.3%の子ウシはオーシストを排泄したが投与群では 48.7%であった。V7 に、73.8%の未投与の子ウシが下痢の徴候を示したのに対し、投与群では 41.0%であった。統計的分析では投与群に対して、クリプトスポリジウム数の放出に有意に高い効果が示されている ($p = 0.0001$)。同様の結論が糞便の指数にも出すことができる。プラセボ群は投与群と比較しより多くの併用療法(水分補給)を必要とした(48% vs 32%)。ロタ・コロナウイルスの有病率はプラセボ群と投与群の間に差異はなかった(V7 に投与群で高く、V14 で低い)。プラセボ群で 6 頭が死亡し、投与群で 5 頭が死亡した。子ウシは解剖され、投与との関係は推定されなかった。

結論として、オーシスト・カウントスコアの平均は、Halocur はオーシストの排泄量を低下させたことを示した。14 日目に(投与後 8 日)、投与群でオーシストの排泄の増加がある。実際オーシスト排泄のピークは遅れているが、その時の排泄は臨床的徴候ではない (in fact the peak of oocyst excretion is delayed, but at this time excretion is no longer responsible for clinical signs)。全体の試験期間で、投与群でのオーシストの排泄の減少は有意に高い ($p = 0.0002$)。Cryptosporidium parvum の存在(プラセボ群で 83.7%の子ウシが Cryptosporidium parvum を排泄)と下痢の関係は V7 に証明されている(この群の 73.8%の子ウシが下痢を発症)。

出生 48 時間前の子ウシの選択が真の予防を保証する：検出潜伏期のため、下痢は日齢 3 又は 4 日前には発生しない。本試験は Cryptosporidium parvum による下痢に対する Halocur の予防効果を証明している。

申請者によって提出された主張に示唆される死亡率と体重減への製品の作用は証明されず、保持出来なかった。用法の示唆は、同定された危険な状態にある子ウシ、すなわちクリプトスポリジウム症の発育履歴のある農場での予防的用法は制約されることを指摘する (The indications for use point out that the preventive use is limited to well identified at-risk calves, it means to farms with history of cryptosporidiosis)。

本調査書類の第 IV 部の結論として、委員会は Halocur についての示唆を下記の通り保持することを認めた：

新生の子ウシでは：

- * クリプトスポリジウム症の発症歴のある農場における Cryptosporidium parvum による下痢予防。
投与は生後 24~48 時間で開始する。
- * Cryptosporidium parvum と診断された下痢の低減。
投与は下痢発症後 24 時間以内で開始する。

いずれの場合も、オーシストの排泄量の低下が証明されている。

5. リスク・ベネフィットアセスメントと結論(原文、33 ページ)

提出された申請資料のデータと質問への回答により、提示した製剤処方とそれが提出される様式の合格基準 (acceptability)、製品に適用される有効成分の規格の適合性、製品の製造方法と試験方法の正当性 (validity) が確認される。完成品に提供された安定性試験は EEC のガイドラインに従って行われ、製品は実際の条件(36 ヶ月中で 25°C/60% RH と 30°C/70% RH)と加速条件(6 ヶ月中で 40°C/75% RH)で安定性を示している。保持された品質保持期限は開封後 3 年 6 ヶ月である。

ハロフジノン乳酸塩の消費者への安全性は、MRL 確定の為に欧州の法律で定められている必要条件に従って評価されており、この活性成分は附属書 III に分類されている。全ての食糧生産動物種の添加剤は委員会規則 EEC 2377/90 の附属書 II に記載されている。13 日の休薬期間は CVMP 指針書の「休薬期間の調和化へのアプローチ」‘Approach towards harmonisation of withdrawal period’ (EMEA/CVMP/036/95) に従って測定された。

本製品は European note for guidance for minimising the risk of transmitting animal spongiform encephalopathy agents via veterinary medicinal products を遵守しているとみなされた。

生態毒性の部分について、申請者は Note for guidance on the environmental risk assessment of veterinary medicinal products other than GMO containing and immunological products (EMEACVMP/055/96-FINAL)に従って専門知識を提供した。動物用医薬品としてのハロフジノンの使用による環境への排出は低濃度のため、フェーズ II の評価は必要とされない。

オペレーターの安全性について、安全性の予防措置が SPC で提案されている。同製品は敏感肌に刺激性のあることが認められているため製品を取り扱う際に皮膚へのアレルギーの可能性から特に保護手袋の使用が勧告されている。

ハロフジノンはキナゾロン誘導体類 (quinazolinone derivatives group) の抗原虫薬である。作用機序は不明である。クリプトスポリジウム・パルバムに対する *in vitro* 活性が確認されている。50%又は 90%の寄生虫を阻害する濃度が *in vitro* 系(ヒトの腸細胞株、Caco2 と HT-8)で確認されている。値はそれぞれ 0.075 µg/ml と 4.5 µg/ml である。

本製品の許容性は 6 種類の試験で調査され、本製品の安全域 (safety margin) は狭く推奨用量を厳格に投与する必要があるという結論を導いている。毒性の症状は推奨用量の 2 倍の用量で発症する。臨床的徴候には下痢、血便、脱水症状、無気力と衰弱が含まれる。組織病理学的検査で、推奨用量の 2 から 3 倍の用量で一過性のリンパ球減少症とパイエル板の枯渇が認められている。Halocur は発症後 24 時間以上の下痢や衰弱又は絶食した動物種には使用されるべきではない。

パンフレットではハロフジノンの寄生虫への耐性のデータは限られている。耐性の発現に関するデータは主にニワトリの *Eimeria* 種に関連するものである。子ウシの耐性を文書化するために、ハロフジノンの *Cryptosporidium parvum* に対する耐性の発現を確定するための試験が行われた。7 日連続で、25 µg/kg 体重から 75 µg/kg 体重に用量を増加して 5 回の投与後、耐性の発現は認められなかった。

Cryptosporidium parvum による下痢予防のための Halocur の経口溶液の作用はフィールド試験で記録されている。出生後の 24~48 時間の早期投与が下痢の予防には必要である。治癒的状态は 1 回の試験のみで調査され、結果は「下痢の治療」という表現を認めるには明白な臨床的重要性がない。本試験から得られた結果から主張は推測されたことを考慮し、「*Cryptosporidium parvum* による下痢の低減」という主張がより適切であるとみなされている。

推奨用量の 2 又は 3 倍の用量で、本物質の免疫毒性の可能性が耐性試験に記録され、推奨用量での投与は子ウシに対してその他の消化管病原体の発症はなかったことがフィールド試験で検証された。

結論として、使用における以下の示唆が認められた。

新生の子ウシに対して:

- * クリプトスポリジウム症の発症歴のある農場で、*Cryptosporidium parvum* と診断された下痢の予防。
投与は生後 24～48 時間で開始。
- * *Cryptosporidium parvum* と診断された下痢の低減。
投与は下痢の発症後 24 時間以内に行わなければならない。

いずれの場合も、オーシストの排泄の低減が環境的な汚染の低下につながると証明されている。

当初のデータと補足で提出されたデータに基づき、動物用医薬品委員会は、本製品の品質、安全性、有効性は委員会指令 81/852/EEC (現在は指令 2001/82/EC)に従っているとみなされると結論した。

原文目次

SCIENTIFIC DISCUSSION	1
1. INTRODUCTION	2
2. OVERVIEW OF PART II OF THE DOSSIER: ANALYTICAL ASPECTS.....	3
A. QUALITATIVE AND QUANTITATIVE PARTICULARS OF THE CONSTITUENTS	3
B. DESCRIPTION OF METHOD OF PREPARATION.....	4
C. CONTROL OF STARTING MATERIALS	5
D. CONTROL TESTS CARRIED OUT AT INTERMEDIATE STAGES OF THE MANUFACTURING PROCESS.....	6
E. CONTROL TESTS ON THE FINISHED PRODUCT.....	7
F. STABILITY	8
3. OVERVIEW OF PART III OF THE DOSSIER: TOXICOLOGICAL AND PHARMACOLOGICAL ASPECTS	10
A. SAFETY TESTING	10
B. RESIDUE TESTING.....	16
4. OVERVIEW OF PART IV OF THE DOSSIER: PRE-CLINICAL AND CLINICAL ASPECTS	19
A. Pharmacology	19
B. Tolerance in the target species of animal.....	21
C. Resistance	25
CHAPTER II CLINICAL REQUIREMENTS	25
5. RISK-BENEFIT ASSESSMENT AND CONCLUSION	33

略称等

略称等	正式名称(英語)	日本語訳
CVMP	Committee for Medicinal Products for Veterinary Use	動物用医薬品委員会
GC	gas chromatography	ガスクロマトグラフ法
GLP	Good Laboratory Practice	優良試験所基準
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	高速液体クロマトグラフィー
IC50	inhibitory concentration 50	50%抑制濃度
IR	infrared spectroscopy	赤外分光法
LC50	Lethal Concentration 50%	半数致死濃度
LD50	Lethal Dose 50%	半数致死量
MRL	Maximum residue level	残留基準
NOEL	No Observed Effect Level	無影響量
SCAN	Scientific Committee of Animal Nutrition	動物栄養に関する科学委員会
SD	Standard Deviation	標準偏差
TLC	Thin Layer Chromatography	薄層クロマトグラフィー

ハロフジノンの毒性試験と結果の概要一覧

(評価書 : EFSA, Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on a request from the Commission)

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)	ラット	ハロフジノン臭化水素酸塩	LD ₅₀ : 14.4~31 mg/kg 体重	32	23
急性毒性 (経口)	ラット	被覆ハロフジノン臭化水素酸塩	LD ₅₀ : 117~176 mg/kg 体重	32	23
急性毒性 (経口)	マウス	ハロフジノン臭化水素酸塩	LD ₅₀ : 3.9~6.1mg/kg 体重	32	23
急性毒性 (経口)	マウス	被覆ハロフジノン臭化水素酸塩	LD ₅₀ : 39~48mg/kg 体重	32	23
急性毒性 (経口)	マウス	ステノロールプレミックス製剤	LD ₅₀ : 1500 mg/kg 体重	32	23
急性毒性 (経口)	マウス	ハロフジノン臭化水素酸塩シス異性体	LD ₅₀ : 327~440mg/kg 体重	32	23
急性毒性 (経口)	ラット	ハロフジノン (投与量明記なし) 単回投与	<ul style="list-style-type: none"> 3.14 mg/kg 体重 : 胃障害を誘発。 10 mg/kg 体重 : ほとんどのラット (5/6 匹) に投与 48 時間後に致死的。 上記以外は投与後 4 日間の観察期間における血圧、心拍数および心電図の結果に影響なし。 	33	23
急性毒性 (吸入)	ラット	ハロフジノン臭化水素酸塩の粉塵 (4 時間)	LC ₅₀ (4 時間) : 53 µg/l 死亡率閾値 : 30~48 µg/l <ul style="list-style-type: none"> 暴露中 : 目刺激性、呼吸刺激の誘発。 暴露後 : 呼吸困難、胃腸・尿生殖路の異常な変化、筋肉協調不能、死亡が発生。 	45	32
急性毒性 (経皮)	ウサギ 剃毛皮膚	ハロフジノン臭化水素酸塩の粉塵(セベジン) 0、6.4、10、25、40 mg/kg 体重	<ul style="list-style-type: none"> 10 mg/kg 体重群 : 1 匹死亡。 25、40 mg/kg 体重群 : 各群 3 匹が死亡。 10 mg/kg 体重群以上 : 紅斑、浮腫、皮膚の硬化、嗜眠、立毛、食欲不振、下痢、不規則呼吸、協調運動不能が発生。 	45	32

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)
亜慢性毒性 (経口)	マウス	ハロフジノン臭化水素酸塩 0、0.07、0.16、0.35 mg/kg 体重/日 (4週間)	NOEL : 0.07 mg/kg 体重/日 (0.16mg/kg 体重/日での血液学的変化に基づく) ・ 0.16mg/kg 体重/日群以上 : 雌雄とも血液学的変化あり。 ・ 0.35 mg/kg 体重/日群 : 血中尿素態窒素の増加、雄の総コレステロール濃度の低下。	36	26
亜慢性毒性 (経口)	マウス	ハロフジノン臭化水素酸塩 (“セベシン”) 0、2、5、10 mg/kg (4週間)	全用量 : 体重増加量と肝臓重量の減少。 5 mg/kg 群 : 雌で脾臓重量の減少。 10mg/kg 群 : 重度の痩せ。	36	26
亜慢性毒性 (経口)	マウス	ハロフジノン臭化水素酸塩 (“セベシン”) 0、0.25、0.5、1.0 mg/kg (4週間)	NOEL : 0.5 mg/kg (0.07mg/kg 体重/日) ・ 1.0mg/kg 群 : 雄で脾臓重量の減少。	36	26
亜慢性毒性 (経口)	ラット	ハロフジノン臭化水素酸塩 0、2、5、10 mg/kg (13週間)	NOEL : 2 mg/kg (0.2 mg/kg 体重/日) ・ 10 mg/kg 群 : 成長率が低下、雌の腎臓重量と肝臓重量が増加。 ・ 5 mg/kg 群 : 雌に門脈周囲肝細胞の脂肪空胞化。	36	26
亜慢性毒性 (経口)	イヌ	ハロフジノン臭化水素酸塩 0、1.25、2.5、5.0 mg/kg (13週間)	NOEL : 2.5 mg/kg (0.18 mg/kg 体重/日) ・ 5.0 mg/kg 群 : 初期に飼料摂取量と体重増加の抑制。8週後にヘモグロビン濃度の有意な低下。	37	26
亜慢性毒性 (経口)	イヌ	ハロフジノン臭化水素酸塩 0、1.25、2.5、5.0 mg/kg diet (26週間)	NOEL : 2.5 mg/kg (0.18 mg/kg 体重/日) ・ 5.0 mg/kg 群 : 一部で飼料/水摂取量、体重増加、赤血球数、血中血球容積およびヘモグロビン濃度が低下。骨髓塗抹標本で、M/E比が低下し、赤血球数の増加を示唆。	37	26
亜慢性毒性 (経口)	マウス	ハロフジノン乳酸塩 0、0.07、0.16、0.35 mg/kg 体重/日 (4週間)	NOEL : 0.07 mg/kg 体重/日 (雄 0.16mg/kg 体重/日での血液学的変化に基づく) ・ 雄は 0.16 mg/kg 体重/日、雌は 0.35 mg/kg 体重/日で、4週後に血液学的変化あり (ヘモグロビン濃度、血中血球容積、平均赤血球容積および平均赤血球ヘモグロビン濃度の減少)。	37	27

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)
亜慢性毒性 (経口)	ラット	ハロフジノン乳酸塩 0.5 mg/kg 体重 強制経口投与、 (5日間)	投与に関連した影響なし	38	27
亜慢性毒性 (経口)	ラット	ハロフジノン乳酸塩 0.06 mg を口内投与 (4日間)	投与に関連した影響なし	38	27
慢性毒性 ／発がん性 (経口)	マウス	ハロフジノン臭化水 素酸塩 飼料中濃度 0、0.25、 0.5、1.0 mg/kg (92～100 週間)	NOEL : 0.24 mg/kg 体重/日 ・ 投与に関連した影響なし。 ・ 飼料摂取量は、それぞれ 0、 0.03、0.07、0.14 mg/kg 体 重/日に相当したが、最大 用量群は 15～26 週にかけ て 0.24 mg/kg 体重/日に増 量した。 ・ 総腫瘍発生率、悪性腫瘍 発生率、どのような型の 腫瘍発生率に影響なし。 ・ 非腫瘍性の組織病理学的 影響なし。	39	28
発がん性 ／慢性毒 性 (経口)	ラット	ハロフジノン臭化水 素酸塩 飼料中濃度 0、2.5、 5.0、10.0 mg/kg (雄 108 週間、雌 112 週間)	NOEL : 2.5 mg/kg (雄 : 0.09 mg/kg 体重/日 雌 : 0.11 mg/kg 体重/日) ・ 5 mg/kg 群 : 脱毛症と血液 学的変化。 ・ 10 mg/kg 群 : 飼料摂取量 と体重増加量の低下、 sGPT 値の増加。雌の肝臓 に組織病理学的変化 (門脈 周囲肝細胞の脂肪空胞化 とグリコーゲンの減少)。 ・ 死亡率と腫瘍の発生に投 与の影響なし。	39	28
生殖毒性 (経口)	マウス	ハロフジノン臭化水 素酸塩 0、0.25、0.5、1.0 mg/kg (投与期間記載なし)	母体死亡率、母体の体重変化、 交尾行動、妊娠率、妊娠期間、 産仔数、産仔体重、乳幼仔体重、 乳幼仔死亡率に影響が認めら れたが、1.0 mg/kg まででは生 殖指標に影響なし。	40	29
生殖毒性 (経口)	イヌ	ハロフジノン臭化水 素酸塩 5.0 mg/kg feed (6 週間)	・ 繁殖成績に影響なし。 ・ 1 匹で無精子症の疑い、前 立腺・清掃重量の低下。	41	29
生殖毒性 (経口)	イヌ	ハロフジノン臭化水 素酸塩 0、2.5、5.0 mg/kg 混餌投与 (476 日間)	NOEL : 2.5 mg/kg (約 0.25 mg/kg 体重/日) ・ 5.0 mg/kg 群 : 雄 1 匹死亡、 2 匹健康不良。 ・ 全用量で測定パラメータ には投与の影響なし。	41	29

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)
生殖毒性 (経口)	イヌ	ハロフジノン臭化水素酸塩 0、1.25、2.5、5.0 mg/kg diet (26週間)	5.0 mg/kg 群まで、精巣重量と精液性状に影響なし。	41	29
多世代試験 (経口)	マウス	ハロフジノン臭化水素酸塩 0、0.25、0.50、1.00 mg/kg (3世代)	NOEL : 2.5 mg/kg(0.034 mg/kg 体重/日) 1 mg/kg 群 : 全世代で雄の体重が対照群より低。授乳中の児体重増加抑制。	41	30
発生毒性 (経口)	ラット	ハロフジノン臭化水素酸塩 9.3 mg/kg 単回強制経口投与 (妊娠中1回)	黄体数、吸収胚数、生存胎児数、胎児体重、内臓異常、骨格異常所見への影響なし。	42	30
発生毒性 (経口)	ラット	ハロフジノン臭化水素酸塩 6 mg/kg 混餌投与 (妊娠中10~20日)	黄体数、吸収胚数、生存胎児数、胎児体重、内臓異常、骨格異常所見への影響なし。	42	30
発生毒性 (経口)	ラット	微粒化ハロフジノン臭化水素酸塩 強制経口投与 (妊娠6~15日目) 用量設定予備試験	2.0 mg/kg/day : 顕著な母体毒性。 0.5 mg/kg/day : 母体毒性、胚/胎児毒性、催奇形性なし。	42	30
発生毒性 (経口)	ラット	微粒化ハロフジノン臭化水素酸塩 0、0.2、0.4、0.8 mg/kg 体重/日 強制経口投与 (交尾後6~17日目)	母体毒性についての NOEL : 0.4 mg/kg 体重/日 ・ 0.8 mg/kg 体重/日群 : 体重増加量の低下、1匹流産、2匹で毒性症状。	42	30
発生毒性 (経口)	ウサギ	微粒化ハロフジノン臭化水素酸塩 0、0.1、0.5 mg/kg 体重/日 強制経口投与 (妊娠6~8日目)	・ 0.5 mg/kg 体重/日 : 死亡数多く、発生毒性評価できず。 ・ 0.1mg/kg 体重/日 : 胚毒性、胎仔毒性および催奇形性なし。	42	31
発生毒性 (経口)	ウサギ	微粒化ハロフジノン臭化水素酸塩 1.0 mg/kg 体重/日 (妊娠6日目) + 0.25 mg/kg 体重/日 強制経口投与 (7~18日目)	死亡数多く、発生毒性評価できず。	42	31

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)
発生毒性 (経口)	ウサギ	微粒化ハロフジノン 臭化水素酸塩 0、0.01、0.03、0.09 mg/kg 体重/日 強制経口投与 (妊娠 6～18 日目、)	NOEL : 0.03 mg/kg 体重/日 ・ 0.03 mg/kg 体重/日 : わずかな母体毒性(母体の体重増加量と飼料消費量の低下)。胎児発生への影響なし。 ・ 0.09 mg/kg 体重/日 : 顕著な母体毒性(体重増加量の低下、死亡)、流産。胎児発生への影響なし。 ・ どの用量でも催奇形性はなし。	43	31
遺伝毒性 : エームス試験	<i>Salmonella typhimurium</i>	ハロフジノン臭化水素酸塩	TA1538 株では 500 µg/plate(±S9)以上で陽性。毒性は供試細菌株で 1000 µg/plate 以上で認められた。TA1538 株で再試験をおこなった結果、S9 存在下では陽性であったが、S9 非存在下では陰性であった。	34	25
遺伝毒性 : エームス試験	<i>Salmonella typhimurium</i> 、 <i>Escherichia coli</i>	ハロフジノン臭化水素酸塩	TA98 株で S9 存在 / 非存在下で細胞毒性を引き起さない用量でも明らかに陽性であった。同様の結果が再試験でも得られた。	34	25
遺伝毒性 : 宿主経路試験	<i>Salmonella typhimurium</i> G46	ハロフジノン臭化水素酸塩	陰性	34	25
遺伝毒性 : マウスリンフォーマ試験	マウス L5178Y リンフォーマ培養細胞	ハロフジノン臭化水素酸塩	陰性(±S9)	34	25
遺伝毒性 : 細胞遺伝学試験 (M 期分析)	ヒトリンパ球	ハロフジノン臭化水素酸塩	陰性(-S9)	34	25
遺伝毒性 : <i>in vitro</i> DNA 修復試験 : 不定期 DNA 合成 (UDS) 試験	ヒト類上皮細胞 (HeLa S3 細胞)	ハロフジノン臭化水素酸塩	陰性(±S9)	34	25

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)
遺伝毒性：骨髄小核試験 (in vivo)	マウス (経口投与)	ハロフジノン臭化水素酸塩	陰性	34	25
遺伝毒性：骨髄細胞遺伝学試験 (M期分析)	ラット (経口投与)	ハロフジノン臭化水素酸塩	陰性	34	25
遺伝毒性：エームス試験	<i>Salmonella typhimurium</i> 、 <i>Escherichia coli</i>	ハロフジノン乳酸塩	<ul style="list-style-type: none"> ・ S9 存在下の TA98 株(プレインキュベーション法)、S9 非存在下の TA98 株および TA1535 株で陽性。 ・ 供試細菌株に対して毒性のない用量でも影響が認められた。 	35	25
遺伝毒性：小核試験 (in vivo)	マウス (経口投与)	ハロフジノン乳酸塩	<p>陰性</p> <p>最大用量群(3mg/kg bw)で、試料採取時間 24 時間では小核を有する多染性赤血球の頻度の微増が認められたが、48 時間では認められなかった。しかし、この増加は統計的に有意ではなく、頻度は過去の対照データの範囲内であった。</p>	35	25
皮膚刺激性	ウサギ 湿潤皮膚	微粒化ハロフジノン臭化水素酸塩 単回適用(半封鎖包帯下) (4 時間)	<p>刺激性を有し、全身毒性を生じる。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 適用部位に鱗状の皮膚と疥癬が発生。 ・ 脱水状態。 ・ 全ウサギで中程度～重度の体重減少。 	45	32
皮膚刺激性	ウサギ	被覆/微粒ハロフジノン臭化水素酸塩	被覆化 HBR は 10 mg、微粒化 HBR は 1 mg で眼刺激を発生。	46	33
眼刺激性	ウサギ	被覆/微粒ハロフジノン臭化水素酸塩	被覆化 HBR が 100 mg で皮膚刺激性。	46	33
眼刺激性	ウサギ	ハロフジノン 5 mg	<ul style="list-style-type: none"> ・ 3 匹中 2 匹で角膜混濁、結膜炎、虹彩炎、瞼の腫れが重度。 ・ 全動物で震え、後肢麻痺が発生。 	46	33
経皮毒性	ウサギ 剃毛皮膚	ステノロールプレミックス 2100 mg/kg 体重 (24 時間、閉鎖包帯下)	<p>ほとんど経皮毒性を示さない。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 投与後、立毛、嗜眠、円背、食欲不振などの毒性兆候。 ・ 22 時間以内に雄 1 匹が死亡、他のウサギは 11 日以内に開腹。 	46	33

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)
皮膚感作：ビューラー試験	モルモット	微粒子ハロフジノン臭化水素酸塩	<ul style="list-style-type: none"> 皮膚感作性による反応なし。 死亡なし。 一部で立毛、活動性低下。 	46	33
皮膚感作性：ビューラー試験	モルモット	ステノロール	<p>皮膚感作を誘発。</p> <ul style="list-style-type: none"> 死亡および臨床兆候なし。 投与群の全個体で軽微～重度の皮膚反応あり。 	47	33
皮膚感作性：ビューラー試験	モルモット	ステノロール	<p>皮膚感作性ありとは解釈できない。</p> <ul style="list-style-type: none"> 臨床症状および死亡なし。 投与群だけでなく対照群でも皮膚反応あり。 	47	33
その他：耐容試験(経口)	ブロイラー鶏	ハロフジノン臭化水素酸塩 (用量明記なし)	12 および 24 mg/kg 飼料で、投与4日目に成長量および飼料摂取量の有意な低下。	24	17
その他：耐容試験(経口)	シチメンチョウ	ハロフジノン臭化水素酸塩 (用量明記なし)	6 mg/kg 飼料で、成長量と飼料摂取量の低下。	24	17
その他：耐容試験(経口)	肥育鶏	ハロフジノン臭化水素酸塩 0、3、6、12 mg/kg complete feed (8週間)	<ul style="list-style-type: none"> 12 mg/kg 群：体重増加量が有意に低下。 6 および 12mg/kg 群：有意な血液学的変化。 	24	17
その他：耐容試験(経口)	肥育鶏	ハロフジノン臭化水素酸塩 0、3.0、4.5、6.0 mg/kg 飼料 (7週間)	4.5 mg は安全であると思われたが、血液学的検査は実施されなかった。	24	17
その他：耐容試験(経口)	シチメンチョウ	ハロフジノン臭化水素酸塩 0、3、9、15 mg/kg 飼料 (20週間)	<ul style="list-style-type: none"> 9mg /kg 群：体重増加量、飼料消費量、リンパ球数の有意な低下。 15 mg/kg 群：体重増加量、飼料消費量を有意に低下。血中血球容積の低下。腎臓重量の低下および未熟睾丸の増加。 	24	17
ADI			In vivo での遺伝毒性の発現の可能性が懸念されるため、ADIを現時点では決定できない。	44	32

委員会指令 70/524/EEC 第 9G 条に則った抗コクシジウム剤ステノロール再評価委員会からの要請による ‘動物用飼料に使用する添加物及び製剤又は物質に関する科学パネル’ の意見書

(案件番号 EFSA-2003-048)

2003 年 11 月 13 日採択

要約 (原文、1 ページ)

ステノロールはコクシジウム症防除用の飼料添加物であり、家禽類の原虫感染を減らすことができる。ステノロールも他の多くの抗コクシジウム剤と同様に、EU レベルで合意された法的要件に従って再評価を受けることになっている。欧州委員会は EFSA に本製品の評価を依頼するとともに、その有効性と安全性に関する助言を求めた。そして、EFSA 内では ‘動物用飼料に使用する添加物及び製剤又は物質に関する科学パネル’ (FEEDAP パネル) にこの仕事が任された。欧州委員会から出された幾つかの疑問に対して納得のいく返答をするには関係書類の中の提供データは不十分であることがわかった。

ステノロールは 0.6% のハロフジノン臭化水素酸塩 (HBR : halofuginone hydrobromide) を活性成分として含み、ニワトリと肥育用のシチメンチョウに対する抗コクシジウム剤として、3 mg HBR/kg complete feed で効果を示す。しかし、特にシチメンチョウなどでは最近に実施された試験の数が少ないため、有効性の全面的評価はできなかった。

耐容性試験は、ステノロールが安全性マージンは狭いが対象動物に対して安全であることを示した。提出されたデータやこれまでの本添加物の経歴から考えると、飼料、担体、他の認可された添加物や医薬品との配合禁忌や相互作用は無いと思われる。

HBR は特定のグラム陽性細菌に対して有効であるが、多くのグラム陰性細菌は自然抵抗性である。感受性および病原性腸内細菌株に HBR が及ぼす影響に関するデータは提出されなかった。HBR 抵抗性細菌株が出現する可能性と HBR 抵抗性が臨床的に重要な抗菌剤との交差抵抗性を引き起こす可能性に関する評価はおこなわれなかった。微生物リスクの評価には、これら両方の観点に関するデータが不可欠であると本パネルは考える。

ニワトリの腸内では、多量のハロフジノンが吸収されて代謝される。排泄物中にハロフジ

ノン自体は僅かにしか検出されないが、少なからぬ量の代謝物が排泄される。全代謝物の10%以上を占める主要代謝物が糞尿および胆液から分離されているが、いずれも同定されていない。シチメンチョウに関しては、ハロフジノンの代謝運命に関するデータが提出されていない(肝臓中のハロフジノンの同定を除く)。

肝臓が両対象動物種における残留物の標的臓器である。ハロフジノンは肝臓残留物の大部分を占める。しかし、他の抽出可能なハロフジノン(関連)代謝物や非抽出可能残留物の性質や比率に関する情報は入手不可能であった。指標残留物(ステノロール投与を行った家禽類からの飼料中の HBR の監視に必要)は確定されなかった。

ラットとニワトリのハロフジノン代謝物に関するデータが欠如しているため、ラットで実施された HBR の毒性試験が消費者安全性を判断するのに妥当であるとは確信しがたい。

HBR は細菌毒性試験で変異原性を示す。哺乳動物細胞における *in vitro* 遺伝子突然変異試験および染色体異常誘発能試験では、HBR の遺伝毒性は全く認められなかった。骨髄における *in vitro* 遺伝毒性試験の結果は陰性であった。しかし、消費者への遺伝毒性の危険が無いことを完全に保証するには、より多くのデータが必要とされる。入手可能な毒性試験から信頼性のある NOEL を設定することはできなかった。そのため、提出データから一日許容摂取量(ADI)を導き出すこともできない。

マウスとラットにおける長期毒性試験は、HBR が非発癌性であることを示唆する。HBR の経口投与は催奇形性影響を全く引き起こさなかった。

妥当性が確認された飼料中および臓器中 HBR 濃度の測定法は利用可能であるが、データが不十分であり HBR 暴露の代謝および毒性影響を完全に把握できていないため、ADI も“最大残留基準”(MRL)も本パネルから提案することができなかった。

HBR の呼吸性粉塵は呼吸毒性および全身毒性を引き起こす。ステノロールは粉塵形成を最小限にするように微粒化されているが、ステノロールの取り扱いによる HBR 粉塵の吸入暴露の可能性は排除できない。ハロフジノンは経皮毒性を有し、非常に高い眼刺激性および皮膚刺激性を有するようである。HBR は皮膚感作を引き起こし、HBR 含有飼料添加物ステノロールは皮膚感作性物質であると思われる。したがって、申請者は取扱いの際に保護具を着用することを推奨している。

ハロフジノンは、第 I 相での土壌および地下水の“環境中予測濃度”(PEC)が閾値を超えている。したがって、もっと拡張した環境評価(第 II 相)が必要である。しかし、提供された

情報が不十分であるため、FEEDAP パネルは陸域および水域環境に対するリスクを評価することができない。

キーワード

抗コクシジウム剤、飼料添加物、ハロフジノン、ステノロール、抗コクシジウム効果、微生物学的リスク、対象動物安全性、消費者安全性、ADI、MRL、作業者安全性、環境安全性

Table of Contents

SUMMARY	1
Key words	2
BACKGROUND	4
TERMS OF REFERENCE	5
ANNEX INSCRIPTIONS	5
ASSESSMENT	6
1. Introduction	6
1.1. Halofuginone hydrobromide (HBR)	6
1.2. Mode of action	7
1.3. Stability	7
1.4. Control methods	8
2. Efficacy	8
2.1. Dose titration and confirmation studies	8
2.2. Controlled floor pen studies	9
2.3. Controlled field trials	12
2.4. Studies on the development/incidence of resistance in Eimeria	16
2.5. Studies of the quality of animal produce	16
2.6. Conclusion on efficacy	16
3. Safety - Studies on target species	17
3.1. Tolerance tests	17
3.2. Interactions	18
3.3. Microbiological safety of the additive	18
3.4. Conclusion on the safety for the target animal	19
3.5. Metabolism	20
3.6. Residues	21
4. Safety - Studies on laboratory animals	23
4.1. Acute toxicity studies	23
4.2. Genotoxicity	24
4.3. Subchronic oral toxicity studies	26
4.4. Chronic oral toxicity and carcinogenicity studies	28
4.5. Reproduction Toxicity	29
4.6. Determination of the no-observed effect level	31
5. Safety evaluation for the human consumer	31
5.1. Studies on human gut flora, antimicrobial spectrum and MIC	31
5.2. Proposal for an acceptable daily intake	32
5.3. Proposal for maximum residue limits	32
5.4. Proposal for the withdrawal period	32
6. Worker safety assessment	32
6.1. Toxicity by inhalation	32
6.2. Effects on the skin and the eyes	32
6.3. Skin sensitisation	33
6.4. Exposure assessment, measures to control exposure	34
6.5. Conclusions	34
7. Environment	34
7.1. Exposure assessment	34
7.2. Effect assessment	37
7.3. Risk Characterisation	39
CONCLUSIONS	39
Documentation provided to EFSA	42
Panel Members	42
Acknowledgement	42
 Annex: Method to determine the predicted environmental concentrations	 44

背景(原文、4 ページ)

指令 70/524/EEC の第 9G 条(指令 96/51/EC に改正)に従い、流通管理責任者が関与する 1988 年 1 月 1 日以前に付則 I の中の認可を受けた添加物は再評価を受けなければならない。

指令 70/524/EEC の第 9G 条に従い、各製品の責任者は当該製品の新たな認可申請書を 1988 年 10 月 1 日までにモノグラフと鑑定書を付けて提出しなければならない。さらに、指令 70/524/EEC 第 4 条により、2000 年 10 月 1 日までに関係書類を提出しなければならない。

また、本指令は関係書類の再評価を関係書類の提出から 3 年後(2003 年 10 月 1 日)までに完了させることを求めている。

2000 年 10 月 1 日の期限までに 15 個の関係書類が提出されている。報告担当加盟国を含め各加盟国は、委員会指令 87/153/EEC に定められ、委員会指令 94/40/EC により修正された動物栄養用添加物の審査指針、に従って関係書類を査照した。加盟国による査照の結果は、2001 年 1 月 29 日の動物栄養に関する常任委員会の会議で承認された。

“抗コクシジウム剤等の医薬品”の区分に属する製品に関する 7 つの関係書類がこの指針の必要要件を満たし、再評価のために保管されている。

抗コクシジウム剤

- デコキネート(デコックス : DECCOX ®)
- ハロフジノン(ステノロール : STENOROL ®)
- ラサロシドナトリウム(アバテック : AVATEC ®)
- モネンシンナトリウム(エランコバン : ELANCOBAN ®)
- ナラシン(モンテバン : MONTEBAN ®)
- サリノマイシンナトリウム(サコックス 120 微粒剤 : SACOX 120 micro-Granulate ®)
- 塩酸ロベニジン(CYCOSTAT ®)

動物栄養に関する常任委員会は、これらの製品の安全性と有効性の再評価を 2001 年 1 月 29 日に開始した。

この‘動物用飼料に使用する添加物及び製剤又は物質に関する科学パネル’の意見書は、抗コクシジウム剤ステノロール(STENOROL ®)を対象としている。

委託事項(原文、5 ページ)

EFSA と ‘動物用飼料に使用する添加物及び製剤又は物質に関する科学パネル’ は、上記の各製品の安全性と有効性を検討して委員会に助言をするよう求められている。提出された関係書類に基づく各製品の審査にあたって、‘動物用飼料に使用する添加物及び製剤又は物質に関する科学パネル’ は以下の質問に回答するように求められている。飼料添加物としての使用に対して提案された条件下で、

- 付則文に記された本製品の有効性は立証されているか？
- 本製品の使用が予防もしくは治療用製剤に対する細菌の抵抗性の発達を引き起こす可能性はないか？
- 本製剤とその代謝物は以下に対して安全であるか？
 - 対象動物
 - 使用者
 - 消費者
 - 環境
- 本製品は監視可能であるか？

付則文の記述内容(原文、5 ページ)

添加物 (商標名)	組成、化学式、説明	動物種 もしくは 分類	最大 齢数	最小 含量	最大 含量	その他の 規定
				mg/kg (完全飼料中 の活性物質 の含有量)		
ハロフジ ン臭化水素 酸塩 6 g/kg (ステノロー ル)	<p>【添加物組成】 ハロフジノン臭化水素酸 塩： 6g/kg ゼラチン：13.2 g/kg 澱粉：19.2 g/kg 糖：21.6 g/kg 炭酸カルシウム：940 g/kg</p>	肥育鶏	-	2	3	食肉処理 前5日以上 使用禁止
	<p>【活性物質】 ハロフジノン臭化水素酸 塩： $C_{16}H_{17}BrClN_3O_3$、HBr、 DL-トランス-7-ブロモ-6-ク ロロ-3-(3-(3-ヒドロキシ-2- ピペリジル)アセトニル)キ ナゾリン-4(3H)-オン臭化水 素酸塩、 CAS 番号：64924-67-0</p> <p>【関連不純物】 ハロフジノンのシス異性体 <1.5%</p>					

審査(原文、6 ページ)

1. 序説(原文、6 ページ)

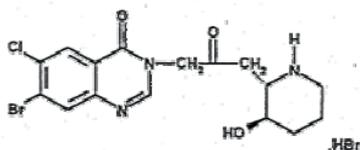
ステノロールは、コクシジウム症防除のためにニワトリと肥育用のシチメンチョウの飼料に使用される飼料添加物である。白～灰白色の粉末で、活性成分として 0.6%以上のハロフジノン臭化水素酸塩を含む。実際にはステノロールのシェルフライフを通じて活性物質濃度 0.6%を保証するため、ステノロールの中に 0.64%のハロフジノン臭化水素酸塩が入っている。ハロフジノン臭化水素酸塩は微粒化され、ゼラチン(13.2 g/kg)でコーティング、防塵剤としての澱粉(19.2 g/kg)とスクロース(21.6 g/kg)で修飾、さらに炭酸カルシウム(940 g/kg ステノロール)で希釈されている。粒径は 42 μm *未満であり、約 84%が 17 μm *未満で、1.5 μm *未満の粒子の量は約 10%である。

会社側は、飼料中の活性物質 2~3 mg/kg の用量で申請をしている。本製品は完全飼料中に 334~500 g/t(活性物質 2~3 mg/kg feed に相当)混入され、肥育鶏にはライフサイクル全般に、産卵鶏には 16 週齢まで、肥育用のシチメンチョウには最大 12 週齢まで投与される。なお、これまでに認可されているのはニワトリと肥育用のシチメンチョウだけである。

1.1. ハロフジノン臭化水素酸塩(HBR)(原文、6 ページ)

HBR(halofuginone hydrobromide : アジア原産の植物、ジョウザン(*Dichroa febrifuga* Lour.)から単離されたアルカロイドの合成誘導体)は抗原虫活性を示し、経済的影響が最も大きいシチメンチョウとブロイラー鶏の *Eimeria* 属原虫に対して広域型の抗コクシジウム剤として作用する。

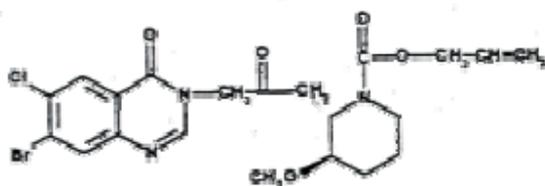
HBR(DL-トランス-7-ブロモ-6-クロロ-3-[3-(3-ヒドロキシ-2-ピペリジニル)-2-オキソプロピル]-4(3H)-キナゾリノン臭化水素酸塩 ; CAS 番号 : 64924-67-0)は、分子式が $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{BrClN}_3\text{O}_3$ 、HBr で、分子量 495.60、融点 294°Cである。HBR は鏡像異性体の混合物として生じ、溶解度は水中(24°C)では約 0.25% m/V、エタノール中では 0.10% m/V、水/エタノール混合液(50V/50V)中では約 0.75% m/V である。ハロフジノンの物理化学特性を表 1 に示す。



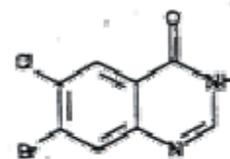
ハロフジノン臭化水素酸塩の構造式

*原文では、 μ のみ。

HPLC 測定で、HBR にはシス異性体が 0.5%以下、他の不純物(セブラゾロン(Cebrazolone)を含む)が 0.5%以下含まれ、シス異性体以外の不純物の総含有量は 1.0%以下であることがわかっている。また、TLC によると 0.5%以下のメリルセベジン(Melylcebegine)が含まれている。合計すると、不純物の総含有率は 2%以下である。



メリルセベジン(Melylcebegine)



セブラゾロン(Cebrazolone)

表 1. ハロフジノンの物理化学特性のまとめ

パラメータ	値	条件	参考
分子量	414.7	g/mole	
水溶性	3000	mg/l	関係書類
蒸気圧	$< 1.3 \times 10^{-8}$	Pa	100°C 関係書類
オクタノール/水分配係数	1.06	pH5	[1]
	1.27	pH7	
	2.58	pH9	
pKa	記載無し		

1.2. 作用様式(原文、7 ページ)

既往試験^{1,2}は、HBR が特にスポロゾイト侵入後早期に生じる分裂体の第 1 世代に作用することを示した。そして、ハロフジノン臭化水素酸塩は *Eimeria tenella*、*Eimeria maxima* に対して殺コクシジウム活性を、*Eimeria acervulina* に対して抗コクシジウム活性を有する。

1.3. 安定性(原文、7 ページ)

¹ Ref 18 : Grandadam,JA.(1972);Section III/File 1 of 7/Volume 4

² Ref 19 : McQuiston,TE,McDougald,L.R.(1981);Section III/File1 of 7/Volume 4

これまでにステノロールの 3 つの工業用バッチを用いた各貯蔵条件下でのシェルフライフ試験が実施されている³。そして、HBR(シス異性体)は温度 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ・相対湿度 $75 \pm 5\%$ で少なくとも 2 年間は安定であることを示唆している。

ブロイラー鶏とシチメンチョウの飼料用の予混合物中の HBR(300 mg HBR/kg premix)は、温度 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ・相対湿度 $60 \pm 5\%$ で 6 ヶ月以上貯蔵⁴しても影響を受けなかった(最大でも 8%の減少)。

3 つの試験(ペレット型/膨化ペレット型シチメンチョウ用飼料と膨化ペレット型ブロイラー鶏用飼料での試験)が実施され、飼料加工中の安定性が推定されている⁵。ステノロール中の HBR の安定性は、ブロイラー鶏用飼料では有意な影響を受けなかった。一方、シチメンチョウ用飼料では膨化ペレット加工のための前処理が HBR 含有量を 24%減少させたが、ペレット化と冷却は HBR 含有量に有意な影響を与えなかった。また、ペレット化のための前処理は安定性に影響を与えなかったが、その後のペレット化と冷却の過程は影響を与えた(含有量が 14%減少)。

3 mg HBR/kg feed を含むブロイラーおよびシチメンチョウ用飼料(各 3 バッチ)の安定性試験も実施された⁶。温度 25°C ・相対湿度 60%では 4 ヶ月後に 20%程度の損失が認められ、温度 40°C ・相対湿度 75%では損失がより多くなった。

したがって、(i)ステノロール中の HBR は湿度、温度および圧力の影響を受けやすい、(ii)完全飼料中の HBR の安定性は低いと結論付けられる。しかし、飼料中のステノロールの安定性は実際の給餌目的では満足なレベルであると、FEEDAP パネルは考えている。

1.4. 防除法(原文、8 ページ)

1.4.1. 家禽飼料中のハロフジノン臭化水素酸塩の測定(原文、8 ページ)

飼料中のハロフジノン臭化水素酸塩の測定のための HPLC 法とその妥当性の検証方法が記載されている。対照飼料からは、ハロフジノン臭化水素酸塩の保持時間に影響を与える重

³ Ref 3 : Trausinger,M.(1999);Section II/File 1 of 3/Volume 1

⁴ Ref 7/8 : Trausinger,M.(1998);Section II/File 2 of 3/Volume 2

⁵ Ref 4/5 : Heidenreich,F.(1998);Section II/File 1 of 3/Volume1;Section II/File 2 of 3/Volume2

⁶ Ref 9/10 : Bas,M.N.(1999);Section II/File 2 of 3/Volume 2

大な妨害化合物は検出されない。定量限界(LOQ : limit of quantification)はニワトリ用飼料中で 0.625 mg/kg となっている。検出限界(LOD : limit of detection)は信号対雑音比が 9 以上となるのに必要な絶対量、すなわち 1×10^{-6} mg と推定される。

したがって、本測定法の特異性と感度は、ニワトリ用飼料への使用に提案されている用量を考えると十分満足できるレベルである。

1.4.2. ニワトリ臓器中のハロフジノンの測定(原文、8 ページ)

ニワトリ臓器中のハロフジノン測定のための HPLC 法とその妥当性の検証方法が提案されている。ハロフジノン臭化水素酸塩の保持時間に影響を与える重大な妨害化合物は検出されない。定量限界(LOQ)は筋肉および脂肪中で 0.005 mg/kg、肝臓中で 0.020 mg/kg、腎臓中で 0.010 mg/kg となっている。検出限界(LOD)は筋肉中で 0.0025 mg/kg、肝臓、腎臓および脂肪/皮膚中で 0.005 mg/kg と推定される。

したがって、本測定法の特異性と感度は、未変化のハロフジノンが指標残留物(未確定)として保持されることを考えると十分満足できるレベルである。

2. 有効性(原文、8 ページ)

委員会指令 2001/79/EC は以下の 3 段階の対象動物試験による有効性データを求めている：(a)バタリー試験(単独および混合感染)、(b)平飼い試験(模擬的な使用条件)、および(c)野外試験(実際の使用条件)。

抗コクシジウム剤の長期連用と育種の進歩により、*Eimeria* 属原虫の抵抗性変異株の淘汰が生じる可能性がある。また、上記の指令は“関係書類は現時点での知見に基づく添加物の審査を可能にするものでなければならない”としている。したがって、FEEDAP パネルはステノロールの再評価に 1990 年前後以降に実施された有効性試験だけを参考としている。

但し、FEEDAP パネルは単独もしくは混合感染に対する添加物の抗コクシジウム効果の初発見および確認となったバタリー試験と用量漸増試験だけは例外としている。

2.1. 用量漸増試験および用量確認試験(原文、8 ページ)

ニワトリを用いたバタリー試験 4 つ⁷とシチメンチョウ⁸を用いたバタリー試験 1 つから、ステノロール中 2~3 mg HBR/kg feed の用量の範囲が幾つかの *Eimeria* 属原虫に対して有効であることが示された。

また、ニワトリに室内条件下で *E.maxima*、*E.brunetti*、*E.tenella*、*E.necatrix* および *E.acervulina* をそれぞれ感染させた用量確認試験 5 つ⁹と、シチメンチョウに *E.adenooides* と *E.meleagrimitis* をそれぞれ単独感染させた試験 2 つ¹⁰および *E.meleagrimitis*、*E.adenooides*、*E.dispersa* を混合感染させた試験 1 つ¹¹が提供され、いずれもステノロール中 3 mg HBR/kg feed の用量が適当であることを示している。

2.2. 平飼い試験(原文、9 ページ)

2.2.1. 肥育鶏(原文、9 ページ)

2880 羽の初生ブロイラー鶏において *Eimeria* 属原虫の野外分離株の混合感染に対するステノロール中 3 mg/kg feed での HBR の有効性を評価する試験(2 因子不完全計画)¹²が実施された。供試鶏は制御条件下の平飼い鶏舎で 42 日間飼育(1 反復あたり 90 羽)された。感染投薬群が感染非投薬群と比較された(いずれも雄雌各 6 反復)。また、非感染非投薬群(雄雌各 4 反復)が対照群とされた。全供試鶏は市販の標準飼料が餌として与えられた。

感染投与群は、初期(1~12 日齢)および育成期(13~35 日齢)にステノロール中 3 mg/kg feed の HBR を含む飼料が与えられた。仕上げ期(36~42 日齢)には全試験群に同一のステノロール非含有飼料が与えられた(消退期間)。

Eimeria 属原虫の野外分離株混合物(*E.acervulina* が 52%、*E.maxima* が 14%、*E.tenella* が 34%)が 13 日齢の感染群に経胃管投与された。

処理間で死亡率に有意差は認められなかった。13 日齢時に感染させた後の感染非投薬群の敷料品質は、非感染対照群と比較して有意に劣った(表 2)。27 日以降もこれら両群間の差異が認められたが、感染投薬群の敷料品質(litter quality)は非感染対照群に近かった。

⁷ Ref.21/22/23/24 : Yvore,P.,Aycardi,J.(1978);Section III/File 1 of 7/Volume 4

⁸ Ref.24 : McDougald,L.R.(1983);Section III/File 1 of 7/Volume 4

⁹ Ref.25/26/27/28/29 : Ross,D.B.et al.(1973);Section III/File 1 of 7/Volume 4

¹⁰ Ref.31/32 : Ross,D.B.et al.(1973);Section III/ File 1 of 7/Volume 4

¹¹ Ref.33 : Edgar,S.A.,Flanagan C.(1979);Section III/ File 1 of 7/Volume 4

¹² Ref.35 : Schat,B.(1999);Section III/File 2 of 7/Volume 5

表 2. 敷料品質の平均値

試験群	6 日目	13 日目	20 日目	27 日目	34 日目	42 日目
非感染非投薬群	1	1	1.56 ^a	2.16 ^a	2.56 ^a	3.09 ^a
感染非投薬群	1	1	2.29 ^b	3.23 ^b	3.31 ^b	3.56 ^b
感染投薬群	1	1	1.79 ^b	2.44 ^a	2.44 ^a	3.10 ^a

a,b : 上付き文字が異なる数値は有意差あり (P<0.05)

試験 13 日目(感染前)、20、27、34 および 42 日目に各鶏舎に溜められた排泄物試料を集め、オーシスト数が調べられた(表 3)。糞中のオーシスト数は飼料へのステノロール添加により有意に減少した。

表 3. 糞中のオーシスト数(×10³個/g)

試験群	13 日目	20 日目	27 日目	34 日目	42 日目
非感染非投薬群	0	38 ^a	48 ^a	3 ^a	0 ^a
感染非投薬群	0	399 ^b	29 ^a	14 ^b	0 ^a
感染投薬群	0	100 ^a	16 ^a	1 ^a	1 ^a

a,b : 上付き文字が異なる数値は有意差あり (P<0.05)

試験 20 及び 27 日目に各鶏舎 5 羽のブロイラーが選ばれて屠殺され、病理学検査により腸の病変スコアが調べられた。また、腸管内 4 ヶ所(十二指腸、空腸中央部、遠位空腸および盲腸)で粘膜組織の平均病変スコアが調べられた。

20 日目にはステノロールによる有意な病変スコアの低下が認められたが、非感染対照群が最も低い病変スコアを示した(P<0.05)。27 日目には、対照群と投薬群との間の病変スコアの統計的差異は認められなかった。

畜産学パラメータ(体重増加量、飼料摂取量及び飼料効率)が調べられ(表 4)、スターター期、育成期及び全飼育期間の累積値が算出された。

スターター期及び育成期(1~35 日齢)では、感染投薬群および対照群と比べて、感染非投薬群の体重増加量と飼料摂取量の有意な減少と飼料効率の低下が認められた。感染投薬群と対照群との間にこれらのパラメータの差異は認められなかった。全飼育期間(消退期間を含む)にわたってステノロール投薬群は対照群と同等の体重増加量を示し、非投薬群と比べると 9%高かった。試験最終週の投薬群の飼料摂取量が高かったため、投薬群の累積飼料摂取量(1~42 日)は他の試験群よりも有意に高く、飼料効率が有意に低かった。

表 4. ブロイラーの成績データ — 平飼い試験

試験群	体重増加量(g)		g feed/g gain		飼料摂取量(g/day)	
	期間(日)	期間(日)	期間(日)	期間(日)	期間(日)	期間(日)
	1~35	1~42	1~35	1~42	1~35	1~42
非感染非投薬群	1804 ^a	2262 ^a	1.624 ^a	1.690 ^a	84.4 ^a	93.1 ^b
感染非投薬群	1606 ^b	2066 ^b	1.737 ^b	1.741 ^b	79.7 ^b	87.7 ^a
感染投薬群	1796 ^a	2254 ^a	1.663 ^a	1.793 ^c	85.3 ^a	98.5 ^c

a,b,c : 上付き文字が異なる数値は有意差あり (P<0.05)

2.2.2. 肥育用シチメンチョウ(原文、10 ページ)

シチメンチョウの試験は、ブロイラー鶏の試験と同じ試験計画(2 因子不完全計画)で実施された¹³。

全部で 960 羽の初生雛が平飼い鳥舎に制御環境下で 98 日間飼育され(1 反復あたり 30 羽)、市販の標準飼料が餌として与られた。

感染投薬群には 1~84 日目にステノロール中に HBR を 3 mg/kg 含む飼料が与えられた。そして、84 日目~試験終了には全試験群に同一のステノロール非含有飼料が与えられた(消退期間)。

Eimeria 属原虫の野外分離株混合物 (*E.adenoides* 46%、*E.meleagrimitis* 28%、*E.gallopavonis* 26%) が 14 日齢の“感染群”に経胃管投与された。

Eimeria 属原虫の人為感染は、全試験期間を通じて死亡率に有意な影響を及ぼさなかった。ただし、消退期間(84~93 日目)には非感染非投薬群で有意に高い死亡率(2.1%)が認められた(感染非投薬群および感染投薬群は共に 0.3%)。

平均敷料品質は、表 5 に敷料スコアの値として示した。31 日目と 45 日目に、投薬されていない感染群の敷料スコアは他の 2 群に比べて有意に高かった。59 日目から 79 日目まで、非感染対照群の敷料スコアは、感染群よりもむしろ高かった。94 日目では、敷料スコアは全ての群で同様であった。

¹³ Ref.39 : Schat,B.(1999);Section III/File 3 of 7/volume 6

表 5. 敷料品質の平均値

試験群	17 日目	31 日目	45 日目	72 日目	94 日目
非感染非投薬群	1	1.1 ^a	2.7 ^b	4.4 ^c	4.9 ^a
感染非投薬群	1	2.0 ^b	3.0 ^c	3.8 ^b	4.7 ^a
感染投薬群	1	1.2 ^a	2.4 ^a	3.3 ^a	4.5 ^a

a,b,c : 上付き文字が異なる数値は有意差あり (P<0.05)

14 日目の人為感染前の糞中にオーシストは認められなかった(表 6)。1 週間後(21 日目)には、オーシストの体外排出によって感染群での感染を確認することができた。35 日目に、非感染群は最も高いオーシスト排出数を示した。91 日目には、オーシストは 2 つの鳥舎(32 鳥舎中)にしか認められなかった。

表 6. 糞中のオーシスト数(×10³個/g)

試験群	14 日目	21 日目	35 日目	91 日目
非感染非投薬群	0	0	245 ^b	0
感染非投薬群	0	352 ^b	6 ^a	0
感染投薬群	0	224 ^b	3 ^a	0

a,b : 上付き文字が異なる数値は有意差あり (P<0.05)

21 および 28 日目に各舎 3 羽が選ばれて屠殺され、病理学検査により腸の病変スコアが調べられた。また、腸管内の十二指腸、空腸および盲腸の平均病変スコアが調べられた。

21 日目に HBR による病変スコアの有意な低下が認められたが、非感染対照群との有意差は示されなかった。28 日目には感染非投薬群と比べて HBR 投薬群の全体的病変スコアは有意に低下したが、対照群よりも著しく高かった。

シチメンチョウの総合成績データとして体重増加量、飼料摂取量及び飼料効率が調べられた(表 7)。人為感染後、感染群の体重は投薬の有無にかかわらず対照群よりも有意に低下した。しかし、投薬群の体重は非投薬群よりも有意に高かった。投薬感染群と非投薬感染群は 1~63 日目及び 1~98 日目の期間における飼料摂取量に差が無く、1~63 日目の飼料効率が対照群よりも有意に高かった。

表 7. シチメンチョウの成績データ — 平飼い試験

試験群	体重増加量(g)		g feed/g gain		飼料摂取量(g/day)	
	期間(日)	期間(日)	期間(日)	期間(日)	期間(日)	期間(日)
	1~63	1~98	1~63	1~98	1~63	1~98

非感染非投薬群	5193 ^a	9392 ^a	1.626 ^a	2.170	133.9 ^a	209.9 ^a
感染非投薬群	4803 ^c	8914 ^c	1.602 ^b	2.121	122.1 ^b	194.6 ^b
感染投薬群	4952 ^b	9055 ^b	1.592 ^a	2.139	125.0 ^b	199.2 ^b

a,b,c : 上付き文字が異なる数値は有意差あり (P<0.05)

2.3. 野外試験(原文、12 ページ)

関係書類の中にはステノロールによる HBR の連続使用による肥育鶏の試験 1 つ、シチメンチョウの試験 2 つが含まれ、他の抗コクシジウム剤処理との比較がおこなわれている。また、“シャトル”プログラム法によって実施された肥育鶏の試験 2 つも含まれている。

2.3.1. 肥育鶏(他の薬剤との比較)(原文、12 ページ)

野外試験¹⁴では、38～40 日の育成期のブロイラーにおけるステノロール中 HBR 3 mg/kg feed の有効性(6 万 4 千 260 羽)を、他の抗コクシジウム剤投薬(合成薬剤 - 陽性対照群 ; 6 万 3 千 488 羽)と各試験群 3 反復(鶏舎)で比較した。ステノロールは 31/32 日齢から与えられ、対照群の処理は 26 日齢(1 鶏舎)及び 31/32 日齢(2 鶏舎)から実施された。そして、38～40 日後に全ブロイラー鶏が食肉処理された。反復数が少なかったため、統計解析は不可能であった。畜産学パラメータに試験群間の差異は認められなかった(表 8)。各鶏舎で糞の堅さが目視検査によって毎週調べられたが、スコアは低くて 1～2 の間であり、試験群間の差異は認められなかった。両群とも鶏舎全体のスコアは 14 日目と 35 日目に 1.0、21 日目に 2.0 であった。31 日目には、1.5(陽性対照群で 1 回、ステノロール群で 2 回)～1.0 の間でスコアにばらつきがみられた。

表 8. ブロイラー鶏の成績データ — 野外試験

	陽性対照群	ステノロール群
死亡率(%)	3.3	3.0
体重(g/broiler)	1996	1987
飼料効率(g feed/g body gain)	1.73	1.76
水/飼料比	1.75	1.70

21 及び 28 日目の病理学検査(1 鶏舎あたり 6 羽を検査)では、いずれのブロイラー鶏にも腸の病変は認められなかった。

¹⁴ Ref 41 : Hafez,H.M.(1999);Section III/File 4 of 7/Volume 7

14、21、28 及び 35 日齢時に各鶏舎で糞便試料が集められ、糞 1 g あたりのオーシスト数が調べられた(表 9)。14 日目の時点では、いずれの試験群から収集された糞便試料からもオーシストが検出されなかった。オーシスト数は 21 日目から増加し、28 日目にいずれの試験群も最大に達したが、その後は減少した。また、オーシスト数はステノロール群が最も高かった。これは、恐らく供試した 2 つの抗コクシジウム剤の作用機構が異なることが関係していると思われる。

表 9. 糞 1 g あたりの平均オーシスト数

	陽性対照群	ステノロール群
14 日目	0	0
21 日目	1 733 A,T	13 667 A,T
28 日目	47 733 A,(N)	88 800 A,(T)
35 日目	2 067 A	4 167 A

A=*E.acervulina* T=*E.tenella* N=*E.necatrix* () 直接塗抹

2.3.2. 肥育鶏(シャトルプログラム)(原文、13 ページ)

シャトルプログラムの調査がおこなわれた。

2.3.2.1. ブロイラー鶏の試験 1(原文、13 ページ)

2 つの群(対照群(Ion/SD)、ステノロール群(Ion/HBR))が設けられ、21~23 日にはスターター飼料にイオノフォア系抗コクシジウム添加物 2 種が加えられ、それ以降~35 日目は HBR(ステノロール中に 3 mg/kg diet)もしくは他の合成薬剤(SD : synthetic drug)に添加物が置き換えられた。36 日目以降はいずれの抗コクシジウム剤も飼料に添加されなかった。

市販の雄のブロイラー鶏 48,680 羽を用いて試験¹⁵が実施され、2 つの鶏舎に分けて処理がおこなわれた。そして、罹病率、死亡率、オーシスト排泄数、病変スコア及びリター品質が評価基準とされた。

死亡率はステノロール群(Ion/HBR)が 7.78%、対照群(Ion/SD)が 5.13%であった。死亡個体は飼育期間全般にわたって発生し、コクシジウム症に特異的な病変が関係しているとは考

¹⁵ Ref 46 : Poly,L. (1999) ; Section III/File 6 of 7/Volume 10

えられなかった。42 日目の体重は、ステノロール群(Ion/HBR)が 2.085 kg、対照群(Ion/SD)が 1.876 kg であった。50/51 日目の最終的な体重は、ステノロール群(Ion/HBR)が 2.643 kg、対照群(Ion /SD)が 2.531 kg であった。最終的な飼料転換率は、ステノロール群(Ion/HBR)が 1.991 g feed/g gain、対照群(Ion /SD)が 1.982 g feed/g gain であった。ステノロール群(Ion/HBR)では、37 日目まで敷料が湿ったり部分的に水を含んだりした(スコア 2 及び 3)。対照群(Ion/SD)では、敷料品質は良好(スコア 1)に保たれ、37 日目だけがスコア 3 であった。

幾つかの日齢において両鶏舎で糞便試料が収集され、糞 1g あたりのオーシスト数が調べられた(表 10)。オーシスト体外排出量は、ステノロール群(Ion/HBR)の鶏舎では低く維持され、最後に計数した 45 日目を除いて全般的に対照群(Ion/SD)の鶏舎よりも低かった。

平均病変スコアは、ステノロール群(Ion/HBR)及び対照群(Ion/SD)でそれぞれ 21 日目に 0.19 及び 0.16、28 日目に 0.27 及び 0.53 であった。

表 10. 糞 1g あたりの平均オーシスト数

	ステノロール群(Ion/HBR)	対照群(Ion/SD)
16 日目	0	0
23 日目	100 A	5 250 A
30 日目	0	155 500 A,N
37 日目	83 250 A	163 000 A,N
45 日目	328 500	11 500

A=*E.acervulina* N=*E.necatrix*, *E.maxima*, *E.brunetti*, *E.tenella*

2.3.2.2. ブロイラー鶏の試験 2(原文、14 ページ)

シャトルプログラム試験 2¹⁶では、抗コクシジウム剤の添加が試験 1 と逆の順でおこなわれた。そして、ステノロール群(HBR/Ion)と対照群(SD/Ion)との比較がおこなわれた。

最初の抗コクシジウム剤(ステノロールもしくは合成薬剤)が 1~12 日目に与えられ、それ以降~28 もしくは 30 日目は他の抗コクシジウム剤(イオノフォア系添加物)に置き換えられた。29/31 日目~試験終了日は、いずれの抗コクシジウム剤も含まない飼料が与えられた。なお、本試験は 30,400 羽の市販ブロイラー鶏を用いて、1 つの工業用家禽ユニット内を 2 つの類似の鶏舎に分けて実施された。

¹⁶ Ref 47 : Magnin,M.(1999);Section III/File 7 of 7/Volume 10

死亡率は、ステノロール群(HBR/Ion)(3%)が対照群(SD/Ion)(3.5%)よりも低かった。死亡個体は飼育期間全般で発生し、コクシジウム症との関連は無かった。34 日目の最終的な体重は、ステノロール群(HBR/Ion)が 1.428 kg、対照群(SD/Ion)が 1.386 kg であった。最終的な飼料効率は、ステノロール群(HBR/Ion)が 1.786 g feed/g gain、対照群(SD/Ion)が 1.938 g feed/g gain であった。各日齢の糞便スコアは、いずれの処理においても全部 1 に維持された。したがって、試験中の敷料品質は最適であった。

幾つかの日齢において両鶏舎で糞便試料が収集され、糞 1 g あたりのオーシスト数が調べられた(表 11)。オーシスト体外排出数は、ステノロール群(HBR/Ion)では低く維持され、全般的に対照群(SD/Ion)よりも低かった。32 日目の糞中オーシスト数はステノロール群(HBR/Ion)よりも対照群(SD/Ion)の方が低かったが、ステノロール群(HBR/Ion)では増殖率が低い病原性原虫 *E.maxima* が 70 もしくは 80%を占めたのに対し、対照群(SD/Ion)のオーシストは *E.acervulina* であった。

表 11. 糞 1 g あたりの平均オーシスト数

	ステノロール群(HBR/Ion)	対照群(SD/Ion)
16 日目	100	150
23 日目	10 600	19 250
30 日目	470 000	570 000
32 日目	227 000	82 000

腸病変スコアは、23 及び 30 日目に評価された。23 日目にはステノロール群(HBR/Ion)において軽度の感染(スコア 1 及び 2)が認められ、11羽から *E.acervulina*、9羽から *E.maxima*、11羽から *E.tenella* が検出された。そして、1羽でスコア 3 の *E.acervulina* 感染が認められた。また、対照群(SD/Ion)でも軽度の感染(スコア 1 及び 2)が認められ、*E.acervulina* が 13羽、*E.maxima* が 12羽、*E.necatrix* が 2羽及び *E.tenella* が 9羽から検出された。そして、2羽でスコア 3 の *E.acervulina* 感染が認められた。しかし、ステノロール群(HBR/Ion)では 30 日目に病変スコアの改善がみられた(対照群(SD/Ion)ではスコア 3 を 7羽、スコア 4 を 3羽が示したのに対し、ステノロール群(HBR/Ion)では 1羽がスコア 3 を示した)。

2.3.3. 肥育用シチメンチョウ(原文、14 ページ)

シチメンチョウの試験は、第 2.3.1 章で述べたブロイラー鶏の試験と同じ試験計画によって実施された(ステノロールにより 3 mg HBR/kg diet を投与；合成抗コクシジウム剤を用いた陽性対照群と比較)。

2.3.3.1. 肥育用シチメンチョウの試験 1(原文、15 ページ)

本試験のために選ばれた鳥舎 2 つがそれぞれ 2 部屋に分けられ、シチメンチョウ各 2 群が飼育された¹⁷。そして、1～58 日目に HBR 添加飼料が与えられ、それ以降～試験終了日(雌は 12 週間後、雄は 14 週間後に終了)には非添加使用飼料が与えられた。陽性対照群には雄 8040 羽と雌 8175 羽、ステノロール群には雄 9040 羽と雌 9000 羽が飼育された。

死亡率は重度の抗コクシジウム症により高く、ステノロール群の方が影響を強く受けた。抗コクシジウム症はシチメンチョウの成績に悪影響を与えた(表 12)。飼料効率(陽性対照群のほうが僅かに優れたが、死亡率の違いによって補正するとその差は無くなった。

オーシスト排出数はかなり少なかった。排出パターンは試験群間で異なり、陽性対照群ではピークが約 4 週間後であったのに対して、ステノロール群ではピークがそれよりも 1 週間遅く、オーシスト数も陽性対照群よりも少なかった。

表 12. シチメンチョウの成績データ(12/14 週間) — 野外試験 1

	陽性対照群		ステノロール群	
	雌	雄	雌	雄
死亡率(%)	14.9	16.4	14.1	22.1
雌+雄(%)	15.7		18.3	
体重(kg)	5.53	9.08	5.56	8.98
雌+雄(kg)	6.63		6.63	
平均飼料効率(g feed/g gain)	2.50		2.55	
死亡率による補正	2.35		2.35	

2.3.3.2. シチメンチョウの試験 2(原文、15 ページ)

試験 2¹⁸は、試験 1 の再試験である。本試験のために選ばれた鳥舎 2 つにそれぞれ 2 群のシチメンチョウが飼育された。1～58 日目は合成添加物が雌 4938 羽、雄 5573 羽、ステノロールが雌 5139 羽、雄 5771 羽に与えられ、それ以降～試験終了日(陽性対照群では雌 74 日後・雄 109 日後に終了、ステノロール群では雌 73 日後・雄 112 日後に終了)は非添加物

¹⁷ Ref 43 : Garcia,E.E.(1999);Section III/File 4 of 7/Volume 7

¹⁸ Ref 44 : Magnin,M.(1999);Section III/File 5 of 7/Volume 8

使用飼料が与えられた。

平均死亡率は、ステノロール群(4.3%)が陽性対照群(3.2%)よりも若干高かった。成長量及び飼料効率には試験群間に差異が認められなかったが(表 13)、ステノロール群の雄のシチメンチョウは陽性対照群の雄よりも 3 日間長く飼料が与えられた。オーシスト排出数は最終的にステノロール群のほうが陽性対照群よりも少なかった。

表 13. シチメンチョウの成績データ(73~113 日間) — 野外試験 2

	陽性対照群		ステノロール群	
	雌	雄	雌	雄
死亡率(%)	1.3	4.8	3.3	5.1
雌+雄(%)	3.1		4.3	
体重(kg)	4.34	9.38	4.31	9.78
平均飼料効率(g feed/g gain)	2.16		2.14	

2.4. *Eimeria* 属原虫における抵抗性の発達/発生に関する試験(原文、16 ページ)

4 年間(1993~1996 年)にわたって、ステノロール 3 mg HBR/kg feed の抗コクシジウム効果を調べて他の合成抗コクシジウム剤添加物と比較する 101 個の感受性試験¹⁹が実施された。これらの試験では、単独種及び混合種の *Eimeria* 属原虫が用いられた。試料はコクシジウム症の増加が報告されたブロイラー鶏販売サイトから入手された。

野外分離株のステノロール感受性は、体重増加量、病変スコア、糞便スコア及び糞中オーシスト数により評価されて他の合成抗コクシジウム剤と比較された。ステノロール処理群では、感染非投薬対照群と比べて各種野外分離株の接種後の成長抑制を防ぐことができた。合成添加剤の間では、処理鶏の体重増加量に有意差は認められなかった。

ステノロールと他の抗コクシジウム剤の *Eimeria* 属原虫感染防止効果には有意な差が無いことが、腸内各部位で記録された病変スコアから明らかになった。ステノロール処理鶏は全般的に十二指腸と盲腸の病変スコアが合成添加剤処理鶏よりも僅かに高かった。

また、ステノロール群では感染非投薬対照群と比べてオーシスト数が減少し、推奨用量が感染程度の軽減に適切な量であることが示された。また、合成添加剤でも感染非投薬対照群よりもオーシスト排泄数を減らす効果が認められた。合成添加剤処理鶏のオーシスト排

¹⁹ Ref 45 : Schmitz,W.(1998);Section III/File 6 of 7/Volume 9

泄数はステノロール群よりも少なかったが、有意差は認められなかった。

野外分離株は抵抗性の発達において各供試抗コクシジウム剤に対して異なる応答を示した。ステノロールは *E.acervulina* 分離株防除における病変減少効果が他の薬剤よりも高かった。*E.acervulina* / *E.tenella* 及び *E.acervulina* / *E.maxima* / *E.tenella* 分離株のステノロールに対する抵抗性の発生(5.6~26.9%)は、他の薬剤(33.3~42.3%)よりも少なかった。*E.tenella* 単独及び *E.acervulina* / *E.tenella* 及び *E.acervulina* / *E.maxima* / *E.tenella* 混合分離株のステノロール抵抗性の発達(16.7~50%)は、他の薬剤(16.7~30.0%)と同等であった。

肥育用シチメンチョウ特有の *Eimeria* 属原虫の抵抗性発達に関する試験は、実施されなかった。

2.5. 動物製品の品質に関する試験(原文、16 ページ)

動物製品の品質(官能的、栄養的及び工業的品質)に関する試験は、実施されなかった。

2.6. 有効性に関する結論(原文、16 ページ)

初期の試験(バテリー試験)は、ステノロールがニワトリ及び肥育用シチメンチョウのコクシジウム症防除に 2~3 mg HBR/kg diet の用量で有効であることを示している。

最近の 2 つの平飼い試験(1 つはニワトリ、1 つはシチメンチョウ)の結果は、ニワトリ及び肥育用シチメンチョウに対する HBR 3 mg/kg complete feed の有効性を示している。

しかし、いずれの動物種も最近の試験は 1 つしか提出されなかった。これは、平飼い試験の数についての委員会指令 2001/79/EC の要件を満たしていない。有効性を完全に示した有意な試験結果が、各対象動物につき 3 つは提出されなければならない。したがって、平飼い試験における実際のステノロールの有効性を十分に評価するための材料は、肥育鶏についても肥育用シチメンチョウについても与えられていない。

実際の条件下で陰性対照群を設置することは困難なため、信頼性の高い野外試験を計画することは難しい。野外での添加物の効果は、陽性対照群(他の抗コクシジウム剤添加物を投与)と比較することしかできない。抵抗性の発達が良く知られているが、これは使い回し(鶏

舎から鶏舎への交互の抗コクシジウム剤の使用)やシャトルプログラム(他の抗コクシジウム剤を2もしくは3週間前もしくは後に使用する)によって防ぐことができる。したがって、FEEDAP パネルはシャトルプログラムによる試験を、添加物が非シャトルプログラム試験よりも短期間で供試された場合でもきちんとした野外試験として認めている。

これにより3つの野外試験の結果がステノロール 3 mg HBR/kg diet は実際の条件下で肥育鶏のコクシジウム症防除に有効であることを示していると思なされる。少なくとも、ステノロールは比較に用いた他の抗コクシジウム剤添加物と同じくらい有効である。

肥育用シチメンチョウの野外試験データは少ない。野外試験 1 は死亡率が高かったため、FEEDAP パネルは今後の検討材料に用いることができない(委員会指令 2001/79/EC、3.2. : “使用された動物は健康でなければならない” を参照)。野外試験 2 は対照群とステノロール群の雄の試験期間が異なることによる幾つかの問題点がある。この試験の結果は、ステノロール 3 mg HBR/kg diet の添加が実際の条件下でのシチメンチョウのコクシジウム症防除に有効であることを示唆している。指令 2001/79/EC によれば、肥育用シチメンチョウの試験が2つ追加で提出されないと肥育用シチメンチョウにおける HBR の最新の有効性に関する全面的評価は不可能である。

HBR 2 mg/kg diet の有効性を確認する試験は、ニワトリもシチメンチョウも提出されなかった。

抵抗性は、コクシジウム症が増加しているブロイラー鶏から分離された *Eimeria acervulina*、*Eimeria maxima* 及び *Eimeria tenella* の防除において、ステノロールと他の合成抗コクシジウム剤添加物との間で有意差が認められなかった。ステノロールは対照群の他の添加物と同程度にまで感染を低減した。最も一般的な野外分離株の感受性パターンから、ほとんどの場合でステノロール抵抗性程度はかなり低いことがわかった。

野外では、恐らく肥育鶏で HBR が効かなくなるほどの異常な *Eimeria* 属原虫の HBR 抵抗性は生じないと考えられる。シチメンチョウ特有の *Eimeria* 属原虫に関しては、データが欠けているため結論を出すことができない。

ステノロールがニワトリ及びシチメンチョウ製品の品質に及ぼす潜在的影響は、データの欠如により評価できない。しかし、これまでに実際の試験による製品品質についての悪い評価は報告されていない。

3. 安全性 — 対象動物種での試験(原文、17 ページ)

3.1. 耐容性試験(原文、17 ページ)

初期の用量漸増試験²⁰では、12(及び 24)mg HBR/kg feed は投与 4 日目にブロイラー鶏に対して毒性を示すとの結論が得られている(成長量及び飼料摂取量の有意な低下)。6 mg HBR/kg feed でも、投与 10 日後の成績は 3 mg/kg feed よりも劣る(体重が低くなる)。また、シチメンチョウでは 6 mg HBR/kg feed で成長量と飼料消費量が有意に低下した²¹。

8 週間の毒性(耐容性)試験²²が肥育鶏(6×8 羽/処理)で 0、3、6 及び 12 mg HBR/kg complete feed の用量で実施された。12 mg HBR/kg complete feed は体重増加量を有意に低下させた。著者は、HBR は飼料の食味を悪化させてステノロールの摂取を抑制すると結論付けた。6(及び 12)mg/kg diet の投与は、有意な血液学的変化を 4 週目(好塩基球の減少)と 8 週目(好中球の減少)に引き起こした。

その他に、肥育鶏では 7 週間にわたって 0、3.0、4.5 及び 6.0 mg HBR/kg feed の用量で耐容性試験(8×40 羽/処理)が実施された²³。4.5 mg は安全であると思われたが、血液学的検査は実施されなかった。

シチメンチョウの耐容性試験(雄 4×15 羽及び雌 4×20 羽/処理)が 20 週間にわたって 0、3、9 及び 15 HBR mg/kg feed の用量で実施された²⁴。9 及び 15 mg HBR/kg feed は体重増加量と飼料消費量を有意に低下させた。試験終了時には 15 mg HBR/kg feed で血中血球容積が有意に低く、9 mg HBR/kg feed でリンパ球数が有意に少なかった。また、高用量群では腎臓重量が低下し、組織学的検査では比較的未熟な睾丸の比率が高かった。未熟睾丸の比率の増加は中間用量群(9 mg HBR/kg feed)でも認められたが、その程度は高用量群ほどではなかった。

3.2. 相互作用(原文、18 ページ)

35 日間にわたるブロイラー鶏の忌避性試験がおこなわれ、HBR 3 mg/kg feed と頻用治療

²⁰ Ref 23 : Yvore,O.,Aycardi,J.(1978);Section III/File 1 of 7/Volume 4

²¹ Ref 24 : McDougald,L.R.(1983);Section III/File 1 of 7/Volume 4

²² Ref 60 : Ross,D.B.et al.(1981);Section IV/File 2 of 8/Volume 12

²³ Ref 62 : Roberts,N.L.(1988);Section IV/File 3 of 8/Volume 13

²⁴ Ref 63 : Roberts,N.L.(1986);Section IV/File 4 of 8/Volume 14

薬 5 種及び飼料添加物 3 種との配合忌避関係が調べられた²⁵。初期齢数 4 日の 540 羽のブロイラー鶏が供試された。供試治療薬は推奨用量で飲水投与された。HBR と供試治療薬及び成長促進剤との併用による悪影響は認められなかった。

シチメンチョウを用いた 112 日間の忌避性試験も実施され、HBR と治療薬 4 種及び抗菌性成長促進剤 2 種の配合忌避関係が調べられた²⁶。供試治療薬と成長促進剤は最高推奨用量で投与された。しかし、畜産成績、リターの状態及び臨床効果に悪影響は認められなかった。

3.3. 本添加物の微生物学的安全性(原文、18 ページ)

3.3.1. HBR の抗微生物活性(原文、18 ページ)

HBR の抗微生物活性に関する *in vitro* 試験²⁷が、ニワトリとシチメンチョウから分離された細菌株 132 株について 1998 年に実施された。

供試細菌株は、*Escherichia coli*(大腸菌)(20)、*Enterococcus faecalis*(大便連鎖球菌)(20)、*Enterococcus faecium*(腸球菌)(22)、*Staphylococcus aureus*(黄色ブドウ球菌)(10)、凝固酵素陰性ブドウ球菌(10)、*Salmonella* spp.(サルモネラ菌)(20)、*Clostridium perfringens*(ウェルシュ菌)(20)及び *Campylobacter* spp.(カンピロバクター菌)(10)などであり、参考菌株は *Bacteroides fragilis*、*Staphylococcus aureus*、*E.faecalis*、*E.coli* 及び *Pseudomonas aeruginosa*(緑膿菌)であった。その結果、グラム陰性細菌は HBR に対して自然抵抗性であり、最小発育阻止濃度(MIC : minimal inhibitory concentration)は >128 mg/l であった (*Bacteroides fragilis* の参考菌株(ATCC 25285)の MIC のみ 8~16 mg/l)。

Enterococcus faecalis(MIC >128mg/l)以外のグラム陽性細菌はグラム陰性細菌よりも感受性が高く、MIC はブドウ球菌が 16~64 mg/l、*Clostridium perfringens* が 8~16 mg/l であった。*Enterococcus faecium* 分離株は半分が MIC=4 mg/l で、残り半分が >128 mg/l であった。

3.3.2. HBR による抵抗性細菌株の淘汰及び他の抗生物質との交差抵抗性の可能性(原文、19 ページ)

²⁵ Ref 64 : Schmitz,W.(1998);Section IV/File 4 of 8/Volume 14

²⁶ Ref 65 : Belyavin,C.(1998); Section IV/File 4 of 8/Volume 14

²⁷ Ref 66 : Maier,H.(1998); Section IV/File 4 of 8/Volume 14

関係資料の中に、これに関して報告されたデータは無かった。

3.3.3. 消化管内の日和見病原体の数や人畜共通微生物の排出もしくは排泄に及ぼす影響(原文、19 ページ)

HBR がニワトリの腸内微生物相に及ぼす影響に関する報告は、関係資料の中に無かった。

病原体の体外排出に関しては、HBR がニワトリによるサルモネラ菌の排泄に及ぼす影響を評価する試験²⁸が 1 つだけ実施された。各群 50 羽の病原体非感染鶏 4 群が 53 日間飼育された。2 群を対照区(1 つは病原体を接種せず、1 つには *Salmonella typhimurium*(ネズミチフス菌)を接種)とし、2 つの病原体接種群に HBR 3 及び 6 mg/kg feed が与えられた。病原体接種群では、孵化 3 日後に 0.1 ml のナリジクス酸抵抗性 *Salmonella typhimurium*($1 \sim 3 \times 10^9$ cfu/ml を含む)の一晚培養がおこなわれた。そして、それぞれ排泄腔拭い液中のサルモネラ菌数が毎週調べられた。

サルモネラ菌の排出期間には各試験群間の差異は認められなかったが、排出数には HBR 3 mg/kg feed 投与群で 17 日目に有意な増加($p < 0.01$)が認められた。HBR 6 mg/kg feed 投与群では、この増加が最初の週～28 日目に有意に認められた。

3.4. 対象動物に対する安全性に関する結論(原文、19 ページ)

コクシジウム症防除のために使用される用量を HBR 3 mg/kg feed とした場合、安全性マージンは肥育鶏では推定 1.5、シチメンチョウでは 2 未満である。

飼料、担体、他の認可された添加物や動物医薬品との配合禁忌性もしくは相互作用は認められなかった。これまでに知られている本製品の経歴からも配合忌避性や相互作用は考えられず、実際の使用による事故も報告されていない。

HBR は特定のグラム陽性細菌に対して活性を有するが、腸内細菌を含む多くのグラム陰性細菌は自然抵抗性である。HBR が腸内微生物相(特に潜在的病原体の数)に及ぼす影響を確認すべきである。

²⁸ RSL 684/851069(no Ref No.) : Hossack,D.J.N.(1985); Section IV/File 5 of 8/Volume 14

HBR の推奨用量(3 mg/kg feed)では、人為感染させた鳥から排出されたサルモネラ菌が一時的に増加した。これよりも高い用量(6 mg/kg feed)では、この影響がより顕著で長く続いた。これらの結果は、推奨用量では恐らくサルモネラ菌の体外排出は問題とするほどではないことを示唆している。

関係書類には、HBR が抵抗性細菌株を淘汰する可能性を評価したデータとこの抵抗性が臨床的に重要な抗菌剤との交差抵抗性を引き起こす可能性の有無を調べたデータは無かった。抗細菌作用の幅は狭いが、感受性細菌種/株には腸球菌やクロストリジウム属細菌のような病原細菌があるため、この情報は重要となると思われる。

3.5. 代謝(原文、20 ページ)

3.5.1. ニワトリ(原文、20 ページ)

ハロフジノンの代謝運命がニワトリで幾つかの非 GLP(Good Laboratory Practice : 優良試験所規範)適合試験によって調べられている^{29,30,31}。これらの試験では、キナゾリノン環またはピペリジン環を ¹⁴C で標識化した放射性 HBR 分子が用いられている。

主な試験結果は以下の通りである：

- 1) 推奨用量と同量を単回経口投与した後(0.3 mg/kg 体重 : 3 mg/kg feed に相当)、
 - (i) 放射能の 94%が 5 日以内に尿及び糞中排泄され、呼気からは 1%未満しか排出されず、4%がと体と胃腸管内に残留する。
 - (ii) 血漿中では毎日連続で 7 回投与した後に代謝的な定常状態に達したが、組織で定常状態になったのは 14 日後からである。
 - (iii) かなり多くの胆汁排泄が生じることから、ハロフジノンは相当多く吸収されると考えられる。ただし、腸肝循環の存在を示す実験証拠は示されていない。
- 2) ハロフジノンの代謝経路を特定する試みがおこなわれ、以下の結論が得られている：
 - (i) 11 mg/kg 体重(推奨用量の 40 倍)の連続 7 日間投与・休薬 24 時間では、胃腸内の放射能の 65%と肝臓内の放射能の 54~72%がハロフジノンと同様の薄層クロマトグ

²⁹ Ref 67/68/69/70/71 : Chasseaud,L.F.et al.(1975,1976,1977);Section IV/File 5 of 8/Volume 15

³⁰ Ref 72 : Hawkins,D.R.et al.(1980);Section IV/File 5 of 8/Volume 15

³¹ Ref 73/77 : Hawkins,D.R.et al.(1980, 1976);Section IV/File 6 of 8/Volume 16

ラフ上の挙動を示した。さらに、腎臓から単離された 2 つの主要代謝物(それぞれ 26%及び 39%)は肝臓の主要代謝物の 1 つと同じクロマトグラフ上の挙動を示した。胆汁抽出物の分析の結果、放射能の 10~20%がハロフジノンと同様の挙動を示した。2 つの代謝物(それぞれ 16~21%及び 44~66%を占める)が分離されたが、同定はまだおこなわれていない。

(ii) 3 mg/kg 体重(推奨用量の 10 倍)の連続 7 日間投与・休薬 5 日では、胃腸内の放射能の 65%が抽出可能であり、そのうちの 10%未満がクロマトグラフでの挙動がハロフジノンと同じであった。抽出可能な放射能の量は肝臓では 18%にまで低下した。抽出されなかった放射能の性質と抽出代謝物の同定に関する試験は実施されなかった。

(iii) 5 mg/kg 体重投与(推奨用量の 16 倍)での排泄物及び胆汁における[¹⁴C-キナゾリノン]と[¹⁴C-ピペリジン]-ハロフジノンの代謝パターンは同じであり、分子の開裂が生じないことが示された。また、主要な胆汁代謝物はハロフジノン抱合体ではなく、おそらくハロフジノンの開環体であることがわかった。

- 3) 抽出、分離及び同定方法の限界により、排泄物及び組織中の完全な代謝プロファイルの取得や、排泄物、胆汁及び組織中の主要代謝物の同定ができなかった。また、推奨用量(0.3 mg/kg 体重に相当)での代謝プロファイリングでなければハロフジノンの代謝運命の量的及び質的側面を捉えられないと思われる。

3.5.2. シチメンチョウ(原文、21 ページ)

シチメンチョウにおけるハロフジノンの代謝運命は、[¹⁴C-キナゾリノン]-ハロフジノンを用いて飼料中に推奨用量相当量の 0.3 mg/kg 体重を 6 日間連続で投与して調べられている。排泄物の分析は実施されなかった。肝臓の分析では全放射能の 56%がメタノールで抽出可能であり、そのうちのほとんどがハロフジノン由来であった。他の研究、特に非抽出可能放射能の詳細な分析はおこなわれなかった³²。

3.5.3. 実験用動物(原文、21 ページ)

ラットでのハロフジノンの代謝運命に関する試験が、5 mg/kg 体重の用量で[¹⁴C-キナゾリノン]-もしくは[¹⁴C-ピペリジン]-ハロフジノンを用いて実施されている³³。放射能の約 80%

³² Ref 94 : Bull.M.J.(1988);Section IV/File 8 of 8/Volume 18

³³ Ref 120 : Chasseaud,L.F. et al.(1978);Section IV/File 1 of 1/Volume 20

は 72 時間以内に排泄され、そのうちの 13/18%及び 62/60%がそれぞれ尿及び糞中から検出されたことから標識化による影響は無いことが示された。胆汁中排泄はそれぞれ 11 及び 7.5%を占め、かなり多くの標識化分子が吸収されることが示唆された。両標識化合物の排泄物及び胆汁における代謝プロファイルは同様であった。排泄物中の主要代謝物はハロフジノンであったが、胆汁中の代謝物(未変化のハロフジノンが非常に少ない量で検出された)の中で最も多かったものはニワトリ胆汁から検出されたものとは異なっていた。逆に、ニワトリの胆汁だけでなく糞中にも検出された主要代謝物はラットの尿、糞及び胆汁では痕跡量しか検出されなかった。マウスでも同様の試験が実施され、排泄パターンに関しては同じ結果が得られた³⁴。

3.5.4. 結論(原文、21 ページ)

ニワトリではハロフジノンはかなり大量に吸収されて広範に代謝されると結論される。ハロフジノンが排泄物中排出代謝物に占める割合は小さいが、推奨用量でのハロフジノン排泄量を定量した試験結果はない。全代謝物の 10%を遥かに超える量の主要代謝物が排泄物及び胆汁から検出されているが、それらのいずれも同定されていない。

シチメンチョウにおけるハロフジノンの代謝運命に関するデータは、肝臓中に未変化のハロフジノンが検出されたもの以外には提出されていない。

ハロフジノンの代謝運命は、ラット(もしくはマウス)とニワトリでは十分に調べられていないため、両動物種の代謝プロファイルの対応関係は確立できない。ニワトリの胆汁及び糞中に検出された主要代謝物はラットとマウスにおいては有意な程度に存在しないために、その毒性学的評価に問題が生じている。

3.6. 残留物(原文、21 ページ)

非 GLP 適応試験ではあるが詳細に記述され、的確に実施された 5 つの残留物試験が、ニワトリで [¹⁴C-キナゾリノン]-^{35,36,37}もしくは [¹⁴C-ピペリジン]-ハロフジノン^{38,39}を用いておこ

³⁴ Ref 121 : Hawkins,D.R. et al.(1981);Section IV/File 1 of 1/Volume 20

³⁵ Ref 67 : Chasseaud,L.F. et al.(1975); Section IV/File 5 of 8/Volume 15

³⁶ Ref 77 : Hawkins,D.R. et al.(1980);Section IV/File 6 of 8/Volume 16

³⁷ Ref 81 : Hawkins,D.R. et al.(1982);Section IV/File 7 of 8/Volume 17

³⁸ Ref 71 : Chasseaud,L.F. et al.(1977); Section IV/File 5 of 8/Volume 15

³⁹ Ref 79 : Hawkins,D.R. (1981);Section IV/File 6 of 8/Volume 16

なわれている。それらはすべて、同じプロトコルを用いており、いずれもニワトリに対する推奨用量 3 mg/kg feed に相当する 0.3 mg/kg 体重の用量で標識化分子を 1 日 1 回、14 日間にわたって経口投与がなされ、0 及び 6 から 8 日間の休薬の後に供試個体は屠殺された。

その結果、組織中の総残留放射能値は範囲が広がった。それは分子の標識化部位とは関係無く、個体ごとの変動によるものと思われた。これらのうちの 3 つの試験では、検証されていないが詳細に記述された HPLC/UV 検出法を用いて、検出限界 0.03 mg/kg でハロフジノンが特異的に測定された⁴⁰。そのため、これら 3 試験^{36,27,39}の結果の平均値を記載しておく(表 14)。それらは、いずれの臓器においても休薬時間の増加にともなう総放射能の多相性の減少を示し、肝臓が標的組織であった。組織中濃度は、肝臓>腎臓>皮膚/脂肪>筋肉であった。肝臓中の総放射能に対する未変化のハロフジノンの割合は休薬期間の増加に伴う急速な減少(3 日後に 35%が低下)を示し、ハロフジノンに関連する遊離型の代謝物もしくは抽出不可能な代謝物が多いことを示す。

実際の使用条件下でハロフジノン添加飼料(3 mg/kg feed)を 6 週間与えたニワトリの組織中ハロフジノン濃度の測定が、GLP 適合試験⁴¹において検証された方法で実施された。ハロフジノンの抽出率を高めるために、組織のトリプシン加水分解をおこない、定量限界が 0.02 mg/kg(肝臓)、0.01(腎臓)及び 0.005(筋肉及び皮膚/脂肪)mg/kg である HPLC/UV 検出法を適用した。得られた結果により、表 14 の結果が確認されたが、本測定方法は感度が高かったため、6 日間の休薬までハロフジノンが検出された。組織中残留物消失試験⁴²がシチメンチョウに[¹⁴C-キナゾリノン]-ハロフジノン 0.3 mg/kg 体重(3 mg/kg feed に相当)を連続 14 日間経口投与し、供試個体を様々な休薬時間で屠殺して実施されている。未変化のハロフジノンが HPLC/UV 検出法を用いて測定限界 0.03 mg/kg で測定された。試験結果を表 14 に示した。ニワトリで認められた組織中の残留放射能と同じランク順位が認められ、肝臓が標的組織であると思われた。肝臓中の総放射能に対する未変化のハロフジノンの比率は、ニワトリの場合と同様に休薬期間の増加に伴う急速な減少(3 日後に 33%が低下)を示した。より最近に同様のプロトコルを用いて実施された試験^{43,44,45,46}では、肝臓の残留放射能の測定が、詳しく記載されたより感度が高い HPLC/UV 検出法(測定限界は不明)を用いて、未変化のハロフジノンの測定によって実施された。その結果は、最初の試験(上記参照)の結果と極めて良く似ていたが、本測定法の感度が高かったため、休薬時間の増加に伴う、総

⁴⁰ Ref 76 : Woodhouse,R.N. et al.(1978);Section IV/File 6 of 8/Volume 16

⁴¹ Ref 87 : Bas,M.N.(1999);Section IV/File 7 of 8/Volume 17

⁴² Ref 91 : Hawkins,D.R. et al.(1982);Section IV/File 7 of 8/Volume 17

⁴³ Ref 96 : Cameron,D.M.et al.(1991);Section IV/File 8 of 8/Volume 18

⁴⁴ Ref 97 : Coffey,G.D. et al.(1990);Section IV/File 8 of 8/Volume 18

⁴⁵ Ref 98 : Dalal,S.N.(1991); Section IV/File 8 of 8/Volume 18

⁴⁶ Ref 99 : LeVan,L.W. et al.(1991); Section IV/File 8 of 8/Volume 18

放射能に対するハロフジノンの割合の減少(3 及び 4 日後にそれぞれ 18 及び 12%の減少)が認められ、ニワトリと同様にハロフジノンに関連する遊離型の代謝物もしくは抽出不可能な代謝物の重要性が強調された。

実際の使用条件と同様にハロフジノン添加飼料(3 mg/kg feed)が 13 週間与えられ、各休薬期間後に屠殺されたシチメンチョウの組織中ハロフジノン残留物の動態が、GLP 適合試験⁴⁷においてニワトリで述べたのと同じ検証された方法を持ちいて、同じ定量限界(上記参照)で実施された。その結果、肝臓、腎臓及び筋肉中の残留物はそれぞれ 3、4 及び 1 日の休薬後に定量限界に達したが、皮膚/脂肪中の残留ハロフジノンは休薬の 1 日目(0.027 mg/kg)から 7 日目(一部の個体で約 0.005 mg/kg)まで測定された。

表 14. ハロフジノン 3 mg/kg feed を長期間(定常状態)、混餌投与して各休薬日に屠殺したニワトリ及びシチメンチョウの組織中ハロフジノンの動態

消退 期間 (日)	肝臓			腎臓			皮膚/脂肪			筋肉		
	TR	HAL	%	TR	HAL	%	TR	HAL	%	TR	HAL	%
ニワトリ												
0.25	1.40	1.13	81	0.59	0.49	84	0.11	nd	-	0.06	nd	-
1	0.78	0.46	59	0.39	0.30	78	0.09	nd	-	0.05	nd	-
2	0.26	0.15	56	0.10	0.06	60	0.03	nd	-	0.01	nd	-
3	0.17	0.06	35	0.06	0.04	67	0.03	nd	-	<0.01	nd	-
4	0.09	<0.03	-	0.03	<0.03	-	0.02	nd	-	<0.01	nd	-
5	0.04*	<0.03*	-	0.02*	<0.03*	-	<0.01*	nd	-	<0.01*	nd	-
6	0.04	<0.03	-	0.02	<0.03	-	<0.01	nd	-	<0.01	nd	-
シチメンチョウ												
0.25	1.35	0.73	54	0.40	0.21	53	0.14	nd	-	0.05	nd	-
1	0.59	0.29	49	0.19	0.10	53	0.08	nd	-	0.03	nd	-
2	0.36	0.12	33	0.10	<0.03	-	0.05	nd	-	<0.01	nd	-
3	0.15	<0.03	-	0.04	nd	-	0.04	nd	-	<0.01	nd	-

TR : ニワトリの試験 3 つとシチメンチョウの試験 1 つの結果(本文参照)から算出された平均総放射能(mg halofuginone/kg wet tissues で示される) ; 検出限界 : 0.01 mg/kg、HAL : ハロフジノン含量(mg/kg wet tissues)、定量限界(HPLC/UV 法) : 0.03 mg/kg、% : HAL/HR 比、nd : 測定されず、* : 単独試験⁴⁸の結果

⁴⁷ Ref 100 : Bas,M.N.(2000);Section IV/File 8 of 8/Volume 18

⁴⁸ Ref 81 : Hawkins D.R. et al.(1982) ;Section IV/File 7 of 8/Volume 17

3.6.1. 結論(原文、23 ページ)

肝臓がニワトリとシチメンチョウの両方における標的組織である。ハロフジノンは肝臓残留物の非常に大きな割合を占める。しかし、他の抽出可能なハロフジノン関連代謝物もしくは抽出不可能な残留物の性質や割合に関する情報が利用できないため、残留マーカールを定めることができない。

4. 安全性—実験用動物による研究(原文、23 ページ)

4.1. 急性毒性試験(原文、23 ページ)

急性経口毒性は、ラット及びマウスにおいて、ハロフジノン臭化水素酸塩(HBR : halofuginone hydrobromide)、“10%被覆” HBR、ステノロール及び HBR のシス異性体を用いた単回投与試験で調べられている。

直近の試験は GLP 適合で実施されたが^{49,50}、初期の試験は適合ではなかった。概要報告⁵¹だけが入手できた。

急性経口毒性試験^{52,53,54,55,56,57,58}では、HBR(被覆及び非被覆剤)の毒性はラット(それぞれ 117~176 及び 14.4~31 mg/kg 体重)よりもマウス(39~48 及び 3.9~6.1 mg/kg 体重)においてより強かった。非被覆 HBR 剤は被覆 HBR 剤よりも毒性が強く、被覆 HBR 剤はステノロールプレミックス製剤(マウスの LD₅₀=1500 mg/kg 体重)よりも毒性が強かった。HBR のシス異性体(マウスの LD₅₀=327~440 mg/kg 体重)の毒性は HBR の約 100 分の 1 であった。雄雌の間で試験物質の毒性に大きな違いは認められなかった。

ラットとマウスの急性毒性徴候はほとんど同じであり、全試験物質間でも違いが無かった。

⁴⁹ Ref 107 : Catez,D. et al.(1995);Section IV/File 1 of 1/Volume 19

⁵⁰ Ref 108 : Catez,D. et al.(1995);Section IV/File 1 of 1/Volume 19

⁵¹ Ref 109 : Anom.(1985); Section IV/File 1 of 1/Volume 19

⁵² Ref 101 : Glomot,R. et al.(1973); Section IV/File 1 of 1/Volume 19

⁵³ Ref 102 : Audegond.L. et al.(1982); Section IV/File 1 of 1/Volume 19

⁵⁴ Ref 103 : Audegond.L. et al.(1982); Section IV/File 1 of 1/Volume 19

⁵⁵ Ref 104 : Kynoch,S.R. et al.(1978); Section IV/File 1 of 1/Volume 19

⁵⁶ Ref 105 : Audegond.L. et al.(1982); Section IV/File 1 of 1/Volume 19

⁵⁷ Ref 106 : Audegond.L. et al.(1982); Section IV/File 1 of 1/Volume 19

⁵⁸ Ref 147 : Kellet,D.N. et al.(1976); Section IV/File 1 of 1/Volume 31

そして、その徴候は神経系、消化器系及び呼吸器系の機能障害を伴う抑鬱状態(depressive state)を示した。

10 mg/kg 体重以下の単回経口投与では、投与後 4 日間の観察期間における血圧、心拍数及び心電図の結果に影響を与えなかった⁵⁹。しかし、3.14 mg/kg 体重では胃障害(gastric damage)を引き起こし、10 mg/kg 体重ではほとんどのラット(5/6 匹)で投与 48 時間後に致死的であった。

4.2. 遺伝毒性(原文、24 ページ)

ハロフジノン臭化水素塩(HBR)及びハロフジノン乳酸塩の遺伝毒性試験が実施されている。それらを表 15 にまとめた。

ほとんどの遺伝毒性試験は詳しく報告されており、信頼性も高かった。つい最近の試験^{60,61}は GLP に対応して実施されているが、初期の試験は GLP に対応していなかった。しかし、それらのほとんどに信頼性保証書^{62,63,64,65}が付けられていた。例外として、HBR の小核試験⁶⁶と宿主経路試験⁶⁷は概要だけ報告された。

遺伝毒性試験の結果は、一貫して HBR 及びハロフジノン乳酸塩が細菌試験で変異原性があることを示した。哺乳動物細胞を用いた *in vitro* 遺伝子突然変異及び染色体異常誘発試験では、HBR の遺伝毒性は認められなかった。骨髄における遺伝毒性試験では、HBR 及びハロフジノン乳酸塩のいずれも陰性であった。

in vitro で見られた遺伝毒性が *in vivo* では見られないことを示すため、FEEDAP パネルは少なくとも 2 つ以上の体細胞組織における *in vivo* 遺伝毒性試験において、確実に陰性であることを求めている。したがって、骨髄だけから得られたデータでは遺伝毒性の危害が無いことを完全に保証することはできない。

⁵⁹ Ref 148 : Kellet,D.N. et al.(1976); Section IV/File 1 of 1/Volume 31

⁶⁰ Ref 114 : Allen,J. et al.(1983);Section IV/File 1 of 1/Volume 20

⁶¹ Ref 111/118/119 : De Jouffrey,S.(1996);Section IV/File 1 of 1/Volume 20

⁶² Ref 110 : Hossack,D. et al.(1978);Section IV/File 1 of 1/Volume 20

⁶³ Ref 112 : Hossack,D. et al.(1978);Section IV/File 1 of 1/Volume 20

⁶⁴ Ref 113 : Richold,M. et al.(1982);Section IV/File 1 of 1/Volume 20

⁶⁵ Ref 117 : Richold,M. et al.(1982);Section IV/File 1 of 1/Volume 20

⁶⁶ Ref 115 : Urwin,C. et al.(1974);Section IV/File 1 of 1/Volume 20

⁶⁷ Ref 116 : Urwin,C. et al.(1974);Section IV/File 1 of 1/Volume 20

表 15. ハロフジノン化合物の遺伝毒性
ハロフジノン臭化水素酸塩(HBR)

試験	系	試験結果	参考
細菌の遺伝子変異 (エームス試験)	<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535、TA1537、 TA1538、TA98、 TA100	TA1538 株では 500 µg/plate(±S9)以上で陽性。毒性は供試細菌株で 1000 µg/plate 以上で認められた。TA1538 株で再試験をおこなった結果、S9 存在下では陽性であったが、S9 非存在下では陰性であった。	62
細菌の遺伝子変異 (エームス試験)	<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535、TA1537、 TA98、TA100 及び <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA	TA98 株で S9 存在/非存在下で細胞毒性を引き起さない用量でも明らかに陽性であった。同様の結果が再試験でも得られた。	61
宿主経由細菌遺伝子突然変異試験	<i>Salmonella typhimurium</i> G46 (経口投与したマウス 腹腔経由)	陰性	67
哺乳動物細胞の 遺伝子変異 (マウスリンフォーマ試験)	マウス L5178Y リン フォーマ培養細胞	陰性(±S9)	64
<i>in vitro</i> 細胞遺伝学 試験(M 期分析)	ヒトリンパ球(新鮮)	陰性(-S9)	63
<i>in vitro</i> DNA 修復 試験：不定期 DNA 合成(UDS)試験	ヒト類上皮細胞 (HeLa S3 細胞)	陰性(±S9) 同様の結果が再試験でも得られた。	60
<i>in vivo</i> 骨髄小核試験	マウス(経口投与)	陰性	66
<i>in vivo</i> 骨髄細胞遺 伝学試験(M 期分析)	ラット(経口投与)	陰性	65

ハロフジノン乳酸塩

試験	系	試験結果	参考
細菌の遺伝子変異 (エームス試験)	<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535、TA1537、 TA98、TA100 及び <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA	S9 存在下の TA98 株(プレインキュベーション法)、S9 非存在下の TA98 株及び TA1535 株で陽性 供試細菌株に対して毒性のない用量でも影響が認められた。この試験結果は再試験で再現された。	61
<i>in vivo</i> 骨髄小核試験	マウス(経口投与)	陰性 最大用量群(3mg/kg bw)で、試料採取時間 24 時間では小核を有する多染性赤血球の頻度の微増が認められたが、48 時間では認められなかった。しかし、この増加は統計的に有意ではなく、頻度は過去の対照データの範囲内であった。	61

4.3. 亜慢性経口毒性試験(原文、26 ページ)

反復投与亜慢性毒性試験は、HBR(一部では旧名称の“セベジン”(cebegine)と記載されている)と関連物質であるハロフジノン乳酸塩で実施された。直近のマウスによる試験⁶⁸だけが GLP に適合していた。ラットでのハロフジノン乳酸塩の試験⁶⁹は GLP 対応ではなく、要約しか書かれていなかった。その他の試験は GLP 導入前であったが妥当に実施されたと思われる。

4.3.1. HBR の試験(原文、26 ページ)

4.3.1.1. マウス(原文、26 ページ)

⁶⁸ Ref 126/127 : Richard,J. et al.(1996);Section IV/File 2 of 4/Volume 22, File 3-4 of 4/Volume 23-24

⁶⁹ Ref 123 : Fournex,R. et al.(1990);Section IV/File 1 of 4/Volume 21

4 週間の試験⁷⁰が雄雌各 10 匹/群の Swiss マウスで実施され、飼料中に 0、0.07、0.16 及び 0.35 mg HBR/kg 体重/日相当量を与えられた。2 つのサテライト群(雌雄各 32 匹/群)には、HBR 0.07 もしくは 0.35 mg/kg 体重/日が同様の条件下で与えられ、全試験期間中の血液試料採取に用いられた。いずれの用量も体重増加量、死亡率、臨床症状、眼科学的検査、肉眼的病理検査及び組織病理学的検査において、HBR 投与による悪影響は認められなかった。4 週間目には血液学的変化が雄雌両方に 0.16 mg/kg 体重/日以上で認められた。そして、赤血球数の増加、並びにヘモグロビン濃度、血中血球容積、平均赤血球容積平均赤血球ヘモグロビン及び平均赤血球ヘモグロビン濃度の減少が認められた。試験終了時の血試料では、0.35 mg/kg 体重/日の雄で血中尿素窒素が増加し、総コレステロール濃度が低くなった。0.16 mg/kg 体重/日以上を投与されたマウスに認められた血液学的変化に基づき、無影響量は 0.07 mg/kg 体重/日と判断された。

初期の 4 週間試験⁷⁰は雄雌各 8 匹/群の CFLP マウスを用いて実施され、飼料中濃度 0、2、5 及び 10 mg/kg の“セベジン”が投与された。10 mg/kg では、重度の痩せが認められ、わずか 7 日が経過した時点で屠殺しなければならなかった。いずれの用量でも雄雌両方で体重増加量と肝臓重量(絶対重量及び体重に対する相対重量)が減少し、脾臓重量(絶対及び相対)の減少が 5 mg/kg 群の雌で認められた。無影響量は確定されなかった。

上記の試験の再試験⁷¹で、雄雌各 8 匹/群の CFLP マウスが飼料中濃度 0、0.25、0.5 及び 1.0 mg/kg の“セベジン”を 4 週間投与された。1.0 mg/kg 群の雄では脾臓重量(絶対及び相対)の低下が認められたが、その他の悪影響は認められなかった。この試験での無影響量は 0.5 mg/kg diet(0.07 mg/kg 体重/日に相当)であった。

4.3.1.2. ラット(13 週間)(原文、26 ページ)

雄雌各 15 匹/群の Sprague-Dawley ラット(CFY 系)に HBR が飼料中濃度 0、2、5 及び 10 mg/kg で 13 週間投与された⁷²。10 mg/kg 群では成長率が低下するとともに、雌の腎臓重量と肝臓重量が増加した。また、10 mg/kg 群の雌のほとんど(12/15 匹)及び 5 mg/kg 群の雌 2 匹で門脈周囲肝細胞の脂肪空胞化が認められた。無影響量 NOEL は 2 mg/kg(0.2 mg/kg 体重/日に相当)であった。

⁷⁰ Ref 124 : Hunter,B. et al.(1974);Section IV/File 1 of 4/Volume 21

⁷¹ Ref 125 : Hunter,B. et al.(1975);Section IV/File 1 of 4/Volume 21

⁷² Ref 122 : Hunter,B. et al.(1973);Section IV/File 1 of 4/Volume 21

4.3.1.3. イヌ(13週間)(原文、27 ページ)

13 週間の試験⁷³で、雄雌各 3 匹/群のビーグル犬がセベジンを飼料中濃度 0、1.25、2.5 及び 5.0 mg/kg で投与された。死亡及び有害な臨床的徴候も認められなかった。5.0 mg/kg を投与されたイヌでは初期に飼料摂取量と体重増加が抑制されたが、3 週間後には回復した。引水量には影響が無く、眼の異常も生じなかった。8 週間後に 5.0 mg/kg 群で平均ヘモグロビン濃度が対照群の値よりも有意に低下した。異常な肉眼的死後所見は認められなかった。また、臓器重量、肉眼病理学的検査及び組織病理学検査においても影響は認められなかった。無影響量は 2.5 mg/kg(0.18 mg/kg 体重/日に相当)であった。

26 週間の試験⁷⁴で、雄雌各 4 匹/群のビーグル犬が HBR を飼料中濃度 0、1.25、2.5 及び 5.0 mg/kg diet で投与された。さらに、別の雄 3 匹が 5.0 mg/kg の HBR 飼料を与えられたが、通常の毒性学的試験には用いられず、性欲と受精能を評価するために投与期間終了時に雌と交尾させられた。5.0 mg/kg 群の一部のイヌは飼料摂取量及び引水量が低下し、体重が増加しなかった。5.0 mg/kg の別投与群の雄 1 匹は、8 週間目に入ったところで交換しなければならなかった。死亡率、臨床徴候、眼科的検査検査、血液生化学検査、尿検査、臓器重量、精巣発育、精液品質、肉眼的病理検査及び組織病理学的検査において影響は認められなかった。一部のイヌは精液中のアルカリホスファターゼの増加と高い肝臓重量が認められたが、対照群を含めて試験群のほとんどで認められたことから、HBR 投与による影響とは考えられなかった。また、5.0 mg/kg diet 群では一部のイヌで赤血球数、血中血球容積及びヘモグロビン濃度が低下した(ただし、正常範囲内)。

骨髄の塗抹標本では、5.0 mg/kg diet 群のイヌ 3 匹がミエロイド - エリスロイド比の低下を示し、赤血球数の増加を示唆した。無影響量は 2.5 mg/kg(0.18 mg/kg 体重/日に相当)であった。

4.3.2. ハロフジノン乳酸塩の試験(原文、27 ページ)

4.3.2.1. マウス(原文、27 ページ)

4 週間の試験⁷⁵が雄雌各 10 匹/群の Swiss マウスで実施され、0、0.07、0.16 及び 0.35 mg/kg 体重/日相当量のハロフジノン乳酸塩が混餌投与された。また、2 つのサテライト群(雄雌各

⁷³ Ref 128 : Chesterman H. et al.(1973);Section IV/File 4 of 4/Volume 24

⁷⁴ Ref 129 : Chesterman H. et al.(1973);Section IV/File 4 of 4/Volume 24

⁷⁵ Ref 127 : Richard J. et al.(1996);Section IV/File 3-4 of 4/Volume 23-24

32 匹/群)に 0.07 又は 0.35 mg/kg 体重/日のハロフジノン乳酸塩が同じ条件下で投与され、全試験期間を通じて血液試料採取に用いられた。いずれの用量でも、体重増加、死亡率、臨床徴候、眼科的検査、肉眼的病理検査及び組織病理学的検査において影響は認められなかった。4 週間後には、0.16 mg/kg 体重/日以上雄と 0.35 mg/kg 体重/日群の雌に血液学的変化が認められた。ヘモグロビン濃度、血中血球容積、平均赤血球容積、平均赤血球ヘモグロビン及び平均赤血球ヘモグロビン濃度の減少が認められた。試験終了時の血試料では総コレステロール濃度が 0.07 及び 0.35 mg/kg 体重/日群の雄で低かったが、用量依存性はなかった。0.16 mg/kg 体重/日群の雄で認められた血液学的変化に基づいて、無影響量は 0.07 mg/kg 体重/日と判断された。

4.3.2.2. ラット(原文、27 ページ)

5 日間の試験⁷⁶で雄雌各 5 匹/群の Sprague-Dawley ラットにハロフジノン乳酸塩の、水溶液中 5 mg/kg 体重を強制経口投与もしくは 0.06 mg を各個体の口内に置く方法により 4 日間、投与された。対照群には蒸留水が与えられた。死亡率、臨床徴候、発育、肉眼的病理検査及び組織病理学的検査においては影響は認められなかった。

4.3.3. 結論(原文、28 ページ)

結論として、マウスはラット及びイヌよりも HBR の毒性に対する感受性が高いようであった。また、ハロフジノン乳酸塩の毒性は HBR と同じであると思われた。マウスへの HBR もしくはハロフジノン乳酸塩の反復投与における無影響量は、それより高い用量で生じた血液学的変化に基づいて 0.07 mg/kg 体重/日と判断された。マウスにおける血液学的変化は 4 週間以上長い期間の試験では調べられていない。より長期間(例えば 13 週間)のマウス試験ならばより小さな血液学的変化も確認できるため、マウス反復投与試験の無影響量はもっと低くなる可能性がある。

4.4. 慢性経口毒性及び発癌性試験(原文、28 ページ)

試験は現在の基準(すなわち、最新版の OECD 指針 451、452 及び 453)に則っておらず、GLP に適合して実施されたものではなかった。

⁷⁶ Ref 123 : Fournex,R. et al.(1990);Section IV/File 1 of 4/Volume 21

4.4.1. マウス(原文、28 ページ)

腫瘍原性生物検定^{77,78}で、雄雌各 80 匹/群の CFLP マウスに HBR が飼料中濃度 0、0.25、0.5 及び 1.0 mg/kg(0、0.03、0.07 及び 0.14~0.24 mg/kg 体重/日に相当)で投与された(最大用量群は投与量が第 15~26 週にかけて 0.14 mg/kg 体重/日から 0.24 mg/kg 体重/日に増量された)。これらの用量の飼料は生存率が 20%未満になるまで、それぞれ 92、95、98 及び 100 週間投与された。マウスは、同じ用量の HBR が投与された母動物に由来したので、供試個体は子宮内暴露された。総腫瘍発生率、悪性腫瘍発生率及びどのような型の腫瘍発生率においても、HBR 投与に関連する影響は認められなかった。また、非腫瘍性の組織病理学的影響も認められなかった。この試験の無影響量は 0.24 mg/kg 体重/日であった。

4.4.2. ラット(原文、28 ページ)

発癌性/慢性毒性併合試験⁷⁹で、雄雌各 50 匹/群の Sprague-Dawley ラット(CFY 系)4 群に HBR が飼料中濃度 0、2.5、5.0 及び 10.0 mg/kg(雄は 0、0.09、0.18 及び 0.36 mg/kg 体重/日、雌は 0、0.11、0.23 及び 0.47 mg/kg 体重/日に相当)で混餌投与された。雄雌各 15 匹/用量のサテライト群が追加され、55 週間後に屠殺された。主試験群は対照群の死亡率が 20%に達した時点(雄は 108 週間後、雌は 112 週間後)で屠殺された。眼科的検査、尿検査、血液学的検査及び血液生化学的検査は対照群と最大用量群においてのみ完全に実施された。その他の用量群では限定的な血液学的検査(血中血球容積、ヘモグロビン濃度及び赤血球数)が実施された。検死解剖及び組織病理学的検査はすべての試験群で実施された。

死亡率と腫瘍の発生は投与による影響を受けなかった。2.5 mg/kg feed では投与に関連したいかなる影響も認められなかった。5 mg/kg feed 以上では、脱毛症(alopecia)と血液学的変化(赤血球パラメータにおける統計学的に有意な減少)が報告された。また、10 mg/kg feed では飼料摂取量及び体重増加量の低下、並びに sGPT 値の増加が認められた。さらに 10 mg/kg feed 群の雌の肝臓では、門脈周囲肝細胞の脂肪空胞化(periportal hepatocytic fatty vacuolation)及びグリコーゲンの減少を特徴とする組織病理学的変化も認められた。無影響量は 2.5 mg/kg(雄 0.09 mg/kg 体重/日、雌 0.11 mg/kg 体重/日に相当)とされた。

4.4.3. 結論(原文、29 ページ)

⁷⁷ Ref 133 : Hunter B. et al.(1977);Section IV/File 4 of 4/Volume 28

⁷⁸ Ref 134 : Hunter B. et al.(1978);Section IV/File 4 of 4/Volume 28

⁷⁹ Ref 130 : Hunter B. et al.(1977);Section IV/File 1-3 of 4/Volume 25-27

マウスとラットにおける限定的な試験結果により、HBR が発癌性はないことが示唆された。なお、4 週間のマウス試験における無影響量の根拠となった血液学的影響はマウスの腫瘍原性試験で調べられていないので、他のパラメータに基づけば無影響量はさらに高くなると思われる。

4.5. 生殖毒性(原文、29 ページ)

マウスとイヌを用いて試験が実施されている。それらの試験は最近のものではなく、GLP に沿って実施されたものではない。また、試験機関の精度管理もおこなわれていなかった。

4.5.1. 受胎能試験(原文、29 ページ)

4.5.2.1. マウス(原文、29 ページ)

マウスの受胎能試験は 4.4.1.1 章で述べた試験⁸⁰の生殖に関する部分である。雄雌各 80 匹／群の CFLP 系マウスに HBR が飼料中濃度 0、0.25、0.5 及び 1.0 mg/kg(0、0.03、0.07 及び 0.14 mg/kg 体重/日に相当)で全試験期間を通じて投与された。マウスは最初の 7 日間の投与から 2 週間後に交尾させた。雄については検査しなかった。雌とその産児は 21 日齢の離乳時まで観察を続けた。母体死亡率、母体の体重変化、交尾行動、妊娠率、妊娠期間、産児数、児体重及び児死亡率への影響が認められたが、1.0 mg HBR/kg 飼料(0.14 mg/kg 体重/日に相当)まででは生殖指標に影響はみられなかった。

4.5.2.2. イヌ(原文、29 ページ)

イヌの試験⁸¹は 3 匹の雄のビーグル犬を用いて実施された。試験は GLP 対応ではなかったが、品質保証報告書が提供されていた。イヌに 5.0 mg/kg 飼料の HBR を含む飼料が与えられた。投与 6 週間後、1 匹の雄につき 3 または 4 匹の発情期の雌と交尾させた。繁殖成績には影響が認められなかったが、1 匹の雄については雌を妊娠させられなかったことから無精子症が疑われた。この雄から採取された精液は量が少なく、精子の数も少なかった。いずれの雄にも前立腺及び精巣の形態的学変化は認められなかったが、無精子症が疑われた雄ではこれらの臓器の重量が低かった。

⁸⁰ Ref 133/134 : Hunter,B. et al.(1977/1978);Section IV/File 4 of 4/Volume 28

⁸¹ Ref 137 : Whitehead,P. et al.(1978);Section IV/File 1 of 2/Volume 29

その他のイヌを用いた受胎能試験⁸²では、0、2.5、5.0 mg/kg の HBR を 10 匹の雄のビーグル犬に 476 日間混餌投与した。試験は GLP 対応ではなかったが、品質保証報告書が付けられていた。生存率、外観・行動、体重、飼料摂取量、精巣計測、精液の性状、精子生存率、産児の数及び生存率を調べた。5.0 mg/kg 群で雄 1 匹の死亡が認められた。この雄は試験開始当初から健康不良であった。その他にも 5.0 mg/kg 群の雄 2 匹は健康不良であり、交尾前に投与群から除外した。中間用量群及び対照群のイヌは全試験期間を通じて正常であり、最大用量でも全測定パラメータに投与の影響は認められなかった。この試験の NOEL は 2.5 mg HBR/kg 飼料(約 0.25 mg/kg 体重/日に相当)と判断された。

尚、第 4.3.1.3 章で述べた 26 週間の試験⁸³では、5 mg/kg 飼料(0.375 mg/kg 体重/日)まで HBR の経口投与による精巣重量と精液の性状への影響は認められなかった。

4.5.2. マウスの多世代試験(原文、30 ページ)

3 世代試験が CD-1 マウスを用いて実施された⁸⁴。GLP 対応ではなかったが、品質保証書が付けられた。3 世代にわたって各群雄 15 匹・雌 30 匹に、飼料中濃度 0、0.25、0.50 及び 1.00 mg/kg の HBR が投与された。

3 世代を通して、親動物の反応、死亡率、飼料摂取量、体重変化、交尾行動、妊娠率、妊娠期間及び剖検所見に一貫した投与の影響は認められなかった。

全世代で、1 mg/kg 群の雄の体重は対照群よりも低かった。

3 世代とも、いずれの用量でも全児死亡発現率、児数、累積児死亡率、異常発現率、剖検所見(成熟及び未成熟マウス)に異常はみられなかった。出生時における児体重は、いずれの試験群でも同様であった。1 mg/kg 群では、授乳中の児体重増加が抑制される傾向にあった。

F3 マウスを調べた結果、肉眼病理所見、相対臓器重量及び組織病理学所見に影響は認められなかった。NOEL は HBR 2.5 mg/kg 飼料(0.034 mg/kg 体重/日に相当)と判断された。

⁸² Ref 138/139 : Dagnall,R. et al.(1981);Section IV/File 1 of 2/Volume 29

⁸³ Ref 129 : Chesterman,H. et al.(1977);Section IV/File 4 of 4/Volume 24

⁸⁴ Ref 136 : Palmer,A. et al.(1980);Section IV/File 1 of 2/Volume 29

4.5.3. 発生毒性(原文、30 ページ)

4.5.3.1. ラット(原文、30 ページ)

ウイスター・ラットを用いた非 GLP 試験⁸⁵(妊娠 9、10、11、12、13 又は 14 日に 9.3 mg/kg を単回強制経口投与、もしくは、妊娠 10 日から 20 日まで 6 mg/kg を混餌投与)が実施されている。HBR による黄体数、吸収胚数、生存胎児数、胎児体重、内臓異常及び骨格異常所見への影響は認められなかった。

微粒化 HBR を用いた投与量設定のための予備試験⁸⁶が、SD ラット(7 匹/群)の器官形成期(妊娠 6~15 日)に強制経口投与を毎日おこなって実施された。2.0 mg/kg/day では顕著な母体毒性が認められたが、0.5 mg/kg/日では母体毒性は認められず、胚/胎児毒性及び催奇形性も認められなかった。これらの結果から、本試験における投与量を 0、0.2、0.4 及び 0.8 mg/kg 体重/日とした。

本試験⁸⁷は GLP 対応であった。各群 24 匹のラットの器官形成期(交尾後 6~17 日)に強制経口投与した。0.2 及び 0.4 mg/kg 体重/日群では、胚/胎児毒性は示されなかった。0.8 mg/kg 体重/日では母体毒が認められ、体重増加量の低下、1 例に流産、2 例に毒性症状がみられた。胚/胎児毒性及び催奇形性は、いずれの用量でも認められなかった。これらの結果から、0.8 mg/kg 体重/日で認められた母体毒性に基づいて NOAEL は 0.4 mg/kg 体重/日と判断された。

4.5.3.2. ウサギ(原文、31 ページ)

予備試験⁸⁸では、New-Zealand White ウサギの(6 匹/群)の器官形成期(妊娠 6~18 日)に 0、0.1 及び 0.5 mg/kg 体重/日の、微粒化 HBR を強制経口投与した。また、追加の試験群として妊娠 6 日に 1.0 mg/kg 体重/日、妊娠 7~18 日に 0.25 mg/kg 体重/日を投与した。いずれの HBR 投与群でも妊娠ウサギに毒性がみられ、0.5 及び 1.0/0.25 mg/kg 体重/日では死亡数が多く、発生毒性を評価できなかった。0.1 mg/kg 体重/日では、HBR は胚/胎児毒性及び催奇形性は示されなかった。

GLP 対応の本試験⁸⁹においては、New-Zealand White ウサギの(20 匹/群)の器官形成期(妊

⁸⁵ Ref 135 : Kaemmerer,K. et al.(1976);Section IV/File1 of 2/Volume 29

⁸⁶ Ref 142 : Fabreguettes,C.(1997);Section IV/File 2 of 2/Volume 30

⁸⁷ Ref 143 : Fabreguettes,C. et al.(1998);Section IV/File 2 of 2/Volume 30

⁸⁸ Ref 141 : Fabreguettes,C. et al.(1998);Section IV/File 1of 2/Volume 29

⁸⁹ Ref 143 : Fabreguettes,C. et al.(1998);Section IV/File 2 of 2/Volume 30

娠 6～18 日)に 0、0.01、0.03 及び 0.09 mg/kg 体重/日の微粒化 HBR を強制経口投与した。0.03 mg/kg 体重/日では僅かな母体毒性(体重増加量及び飼料消費量の低下)が認められたが、胎児の発生への影響は認められなかった。0.09 mg/kg 体重/日では、母体毒性は顕著となり(体重増加量の低下、死亡)、4 例の流産が認められた。しかし、胚や胎児の発生への直接的な影響は認められなかった。催奇形性はいずれの用量でも認められなかった。0.09 mg/kg 体重/日における母体毒性に基づき、NOEL は 0.03 mg/kg 体重/日と判定された。

4.5.4. 生殖及び催奇形性試験の結論(原文、31 ページ)

HBR の経口投与では催奇形性は示されなかった。生殖影響(発生毒性を含む)に対する総合的な NOEL は、0.03 mg/kg 体重/日と判断された。

4.6. 無影響濃度の決定(原文、31 ページ)

経口毒性試験で得られた最低 NOEL は、ウサギの催奇形性試験とマウスの多世代試験の結果に基づいて 0.03 mg/kg 体重/日である。血液学的影響も 4 週間のマウスの試験で認められた。血液学的影響は反復投与毒性試験で認められた最も敏感な影響であったことから、より長期間の試験で更に調べる必要がある。

5. 消費者に対する安全性評価(原文、31 ページ)

5.1. ヒトの腸管内菌叢、抗微生物スペクトラム及び MIC に関する試験(原文、31 ページ)

HBR の抗微生物活性に関する *in vitro* 試験が、ヒト腸管内由来の細菌 12 属 109 株を供試して 1998 年に実施された(Ref 番号無し⁹⁰)。

グラム陰性細菌(*E.coli*、*Proteus* spp.、*Bacteroides* spp.)の内因的抵抗性が、明らかに認められた。しかし、*Bacteroides* spp.分離株は MIC 16～>128 mg/l の幅広い抵抗性を示した。

グラム陽性細菌に関しては、*E.faecium/faecalis*(13 分離株)に属する全細菌株及び様々な乳酸菌(10 分離株、*Lactobacillus acetotolerans*(MIC>1 mg/l)を除く)が MIC>128 mg/l の抵抗性であった。他のグラム陽性細菌株(*Clostridium* spp.、*Bifidobacterium* spp.、*Eubacterium*

⁹⁰ Ref 番号無し : Maier,H.(1998);Section IV/File 4 of 8/Volume 14,32p

spp.、*Peptococcus* spp.及び *Peptostreptococcus* spp.)は MIC が数 mg〜>128 mg/l まで広範囲に及んだが、多くが HBR に対して比較的抵抗性が高いようであった。

5.2. 一日許容摂取量の提案(原文、32 ページ)

in vivo での遺伝毒性の発現の可能性が懸念されるため、FEEDAP パネルはハロフジノンの ADI(一日許容摂取量)を現段階では定めることができない。

5.3. 最大残留基準の提案(原文、32 ページ)

ニワトリ及びシチメンチョウの代謝プロファイルとラットもしくはマウスの代謝プロファイルの比較ができないため、ニワトリとシチメンチョウの臓器に含まれる残留ハロフジノンの暴露に対する消費者リスクが実験用動物で実施された毒性試験を通じて十分に評価されているとは思えない。また、これらの動物の代謝経路が同じであることが証明されたとしても、臓器中の残留物の性質に関するデータが欠如して指標残留物の設定が不可能であるため消費者暴露の評価ができず、ADI が設定されてもそれを遵守しているかどうかの審査は難しいと考えられる。

5.4. 消退期間の提案(原文、32 ページ)

ADI と MRL が設定できないため、FEEDAP パネルは消退期間を提案することができない。

6. 作業安全性の審査(原文、32 ページ)

6.1. 吸入毒性(原文、32 ページ)

非 GLP 適合であるが容認可能な試験⁹¹で、雄雌各 5 匹/群の Sprague-Dawley ラットが HBR の呼吸可能な粉塵に 4 時間暴露された。粉塵粒子のほとんど全部の粒径が 10 µm 未満であった。暴露中に目刺激及び呼吸刺激が引き起こされ、暴露後には呼吸困難(dyspnea)、胃腸及び尿生殖路の異常な変化、筋肉協調運動不能(muscular incoordination)及び死亡が生じた。死亡の閾値はハロフジノン粉塵 30~48 µg/l であった。ハロフジノン粉塵の LC₅₀ 値(4 時間)

⁹¹ Ref 150 : Berczy,Z.S. et al.(1977);Section IV/File 1 of 1/Volume 32

は 53 µg/l とみなされた。ハロフジノン試料から発生した粉塵はラットに対して著しい急性吸入毒性を有すると結論づけられた。

6.2. 皮膚及び眼に及ぼす影響(原文、32 ページ)

6.2.1. HBR の試験(原文、32 ページ)

セベジンの急性経皮毒性は、非 GLP 適合試験で New-Zealand White ウサギを用いて調べられた⁹²。セベジンが 20 mg/kg のトラガントゴム水溶液として数種類の液量で、雄雌各 2 匹/群のウサギ剃毛皮膚に適用された。セベジンの用量は、0、6.4、10、25 及び 40 mg/kg 体重に相当した。10 mg/kg 体重群では雄 1 匹が死亡し、25 及び 40 mg/kg 体重群ではそれぞれ 3 匹が死亡した。様々な毒性徴候(紅斑(erythema)、浮腫(oedema)、処理皮膚の硬化、嗜眠(lethargy)、立毛(piloerection)、食欲不振(anorexia)、下痢(diarrhoea)、不規則呼吸(irregular breathing)及び協調運動不能(indoordination))が、10 mg/kg 体重以上の用量で認められた。6.5 mg/kg 体重(皮膚投与)では悪影響は認められなかった。

微粒子化された HBR の GLP 適合皮膚刺激性試験⁹³が、New-Zealand White ウサギで実施された。半閉塞性包帯下で、500 mg の微粒子化された HBR が 3 匹の雄ウサギの 6 cm² の湿らせた皮膚に 4 時間、単回適用された。厚い鱗状の皮膚と痂皮が適用部位に認められた。また、動物は脱水状態になって痩せ衰えた。全部のウサギに中程度～重度の体重減少が全観察期間にわたって認められた。試験化合物は、刺激性を有し、経皮投与により全身的な毒性を生じると結論付けられた。

ウサギにおける被覆 HBR 及び微粒子 HBR の皮膚及び眼刺激性の非 GLP 適合試験⁹⁴が、要約だけ提供された。被覆 HBR 10 mg と微粒子 HBR 1 mg が眼刺激を引き起こした。6 匹/群のウサギが皮膚刺激性試験に供試された。被覆 HBR 100 mg には皮膚刺激性があったが、微粒子 HBR 10 mg の 4 回の適用には皮膚刺激性がなかった。

“ハロフジノン” (5 mg)の非 GLP 適合眼刺激性試験がウサギで実施された⁹⁵。3 匹中 2 匹で反応(角膜混濁(corneal opacity)、結膜炎(conjunctivitis)、虹彩炎(iritis)及び瞼の腫れ(swelling of the eyelids))が非常に重度であったため、安楽死をさせなければならなかった。

⁹² Ref 151 : Kynoch,S.R. et al.(1975);Section IV/File 1 of 1/Volume 32

⁹³ Ref 152 : Catez,D.et al. (1996) ; Sectin IV/File 1 of 1/Volume 32

⁹⁴ Ref 154 : Glomot,R. et al.(1982);Section IV/File 1 of 1/Volume 32

⁹⁵ Ref 158 : Davies,R.E. et al.(1975);Section IV/File 1 of 1/Volume 32

全身毒性の徴候(振戦(tremors)及び後肢麻痺(hind limb paralysis)がすべての動物で認められた。

6.2.2. ステノロールの試験(原文、33 ページ)

非 GLP 適合の経皮毒性試験が、ステノロールプレミックスを用いてウサギで実施された⁹⁶。トラガントゴム水溶液中 700 mg/kg のステノロールプレミックス懸濁液 3.0 ml/kg 体重が、2100 mg/kg 体重の用量となるよう雄雌各 2 匹のウサギ(New-Zealand White 系)の剃毛皮膚に投与された。投与部位は閉塞包帯下で 24 時間維持された。立毛(piloerection)、嗜眠(lethargy)、円背(hunched posture)や食欲不振(anorexia)などの毒性徴候が投与後に認められた。雄 1 匹が投与 22 時間以内に死亡したが、他のウサギは投与後 11 日以内に回復した。ステノロールプレミックスは殆ど経皮毒性を示さないと結論付けられた。

6.3. 皮膚感作性(原文、33 ページ)

6.3.1. 微粒化 HBR(原文、33 ページ)

GLP 適合のビューラー試験(Buehler test)がモルモットで実施された⁹⁷。雄雌各 10 匹が微粒化 HBR の処理を受け、雄雌各 5 匹が陰性対照群として供試された。死亡は認められなかったが、立毛(piloerection)と活動性低下(hypoactivity)が数匹に生じた。HBR の皮膚感作性による反応は、モルモットでは認められなかった。したがって、HBR が皮膚感作性物質である可能性を示唆する証拠はなかった。

6.3.2. ステノロール(原文、33 ページ)

モルモットでステノロールを用いた GLP 適合のビューラー試験(Buehler test)2 つ⁹⁸が実施され、遅発性接触過敏症の誘発性が調べられた。

モルモット 30 匹が 2 群に分けられた。雄雌各 5 匹が対照群に用いられ、雄雌各 10 匹が投与群に用いられた。死亡及び臨床徴候は試験期間及び誘発期間中に認められず、軽微～重

⁹⁶ Ref 153 : Kynoch,S.R. et al.(1978);Section IV/File 1 of 1/Volume 32

⁹⁷ Ref 155 : De Jouffrey,S. et al.(1997);Section IV/File 1 of 1/Volume 32

⁹⁸ Ref 156/157 : Manciaux,X.(1998/1999);Section IV/File 1 of 1/Volume 32

度の皮膚反応が投与群の全個体で認められた。ステノロール処理は皮膚感作を誘発したと結論された。

2つ目の試験(Ref 157)でも前回の試験と同様の方法が用いられ、試験期間中に臨床症状及び死亡は認められなかった。誘発期間には、恐らく刺激性によると思われる皮膚の反応が投与群のみならず対照群でも認められた。したがって、この試験からステノロールに感作性があると解釈することはできない。

6.4. 暴露規制のための暴露量の評価と測定(原文、34 ページ)

作業員暴露やこれを規制するための暴露量の基準に関するデータは得られなかった。

6.5. 結論(原文、34 ページ)

HBR の呼吸可能な粉塵は呼吸器毒性と全身毒性(急性吸入毒性)を引き起こす。そのため、ステノロールからの粉塵が作業員に対して毒性を示す可能性がある。ステノロールの粉塵形成の可能性や形成された粉塵の粒径分布に関する情報は何も提供されなかった。ステノロール製剤は取扱い中の粉塵形成を最小限に抑えるように作られているため、ステノロールの取扱い中に形成される呼吸可能な粉塵の量は少ないと考えられる。しかし、報告されているステノロールの粒径分布(第1章の序説を参照)は、ステノロールが呼吸により吸入可能な大きさの粒子を多く含むことを示唆している。したがって、ステノロールの取り扱いによる HBR 粉塵の吸入暴露の可能性は排除できない。

ハロフジノンには経皮毒性があり、眼と皮膚の両方に対する刺激性は非常に強いようである。また、HBR の経皮投与も全身毒性を引き起こす可能性を有していた。ステノロールプレミックスには皮膚刺激性はなかったが、眼刺激性に関しては試験がおこなわれなかった。

HBR は皮膚感作を引き起こす。ステノロールも皮膚感作を引き起こした試験が1件あったが、もう1件の試験では解釈不可能であった。ステノロールは皮膚感作性物質であると思われる。

会社側はこれらの問題を承知している。化学物質安全性データシートには警告(粉塵を吸入しないこと、眼及び皮膚への接触を避けること、作業時間中に飲食をしないこと、食品や飲料を近づけないこと)が記されており、保護具(防塵マスク、手袋、保護メガネ及び保護衣)

の着用を推奨している。したがって、ステノロールの表示には“刺激性化合物：取扱い注意”の警告が書かれている。

7. 環境(原文、34 ページ)

本活性成分は環境への安全性が確認された生理的物質／天然物質ではない。また、本添加物はペット用に製造されたものではない。したがって、環境中予測濃度(PEC：predicted environmental concentration)を調べる第 I 相の審査を続けるべきである。

第 I 相及び第 II 相では総残留物法が用いられ、本添加物の 100%が親化合物として排泄されるという想定(最悪のケースの想定)に基づいて最大推奨用量での最大初期 PEC が計算される。

他の環境媒体への分布も、関連代謝物に関するデータが何も提出されていない限り、親化合物の性質に基づいている。

7.1. 暴露評価(原文、34 ページ)

7.1.1. 代謝と排出(原文、34 ページ)

代謝に関する章の結論で述べたように、ハロフジノンはニワトリ及びシチメンチョウの腸からかなり大量に吸収され、様々な代謝物質に変換される。ハロフジノンが排泄物中の代謝物に占める割合は小さい。全代謝物の 10%を遥かに超える主要代謝物が排泄物と胆汁から分離されているが、それらのいずれもまだ同定されていない。親化合物からのリスクを評価するため、活性成分ハロフジノンの 100%が排泄されると仮定されている。

7.1.2. 運命と挙動(原文、35 ページ)

7.1.2.1. 糞尿中運命(原文、35 ページ)

対象動物の糞尿中のハロフジノンの運命に関するデータは提出されていない。

7.1.2.2. 土壌中運命(原文、35 ページ)

吸着(原文、35 ページ)

2つの土壌型(壤質細砂土及び埴壤土)を30 cmのガラス製カラムに充填した浸透移行性試験が実施され、 $[^{14}\text{C}\text{-キナゾリノン}]$ もしくは $[^{14}\text{C}\text{-ピペリジン}]$ ハロフジノン臭化水素酸塩を処理した場合、処理放射能のほぼ全部が上層5 cmに残留することが示された⁹⁹。標識化合物を処理されたニワトリの排泄物を用いた試験でも同様の結果が示され、放射能の84%以上が上層5 cmに、0.25及び2.4%が溶出液中に検出された。これらの結果は、ハロフジノンが土壌に強く結合していることを示唆するが、正確な K_{oc} 値(土壌吸着係数)を調べるには本試験の方法は適切でない。また、土壌型3つではなく2つの土壌型でのみ試験されており、炭素含量は1つの土壌型で報告されただけであった。

リスク評価のために K_{oc} 値がECB(2003)の式を用いて推定された：

$\text{Log } K_{oc} = 0.81 \times \log K_{ow} + 0.1$ ($\log K_{ow}$ を 1.27 として計算した場合、 K_{oc} 値は 13)

分解(原文、35 ページ)

壤質砂土における $[^{14}\text{C}\text{-キナゾリノン}]$ ハロフジノン臭化水素酸塩及び $[^{14}\text{C}\text{-ピペリジン}]$ ハロフジノン臭化水素酸塩の生物分解は、標識化合物を土壌に直接処理、もしくはニワトリ排泄物を土壌に混合して調べられた¹⁰⁷。土壌に直接添加した標識化合物の約10%が、メタノール抽出によって全試験期間(128日)にわたって土壌から抽出できた。また、ニワトリ排泄物中に混ぜて活性成分が添加された土壌からは、約30~50%が抽出できた。抽出方法の妥当性(抽出効率、精度など)に関する情報は提供されていない。しかし、抽出率は水溶液がpH 2でもpH 9でも有意差がなかった。32日後に未変化化合物(ハロフジノン)が総ピペリジン標識化合物の約5%、総キナゾリノン標識化合物の14%を占めた。幾つかの代謝物が検出されたが、それらの同定はおこなわれなかった。ハロフジノンよりも極性が高い2成分は分解されやすく、いずれもピペリジン及びキナゾリノン標識化合物のそれぞれ約35及び28%を占めた。なお、揮発性放射能は検出されなかった。

土壌中の $[^{14}\text{C}\text{-キナゾリノン}]$ ハロフジノン臭化水素酸塩の生物分解は、この標識化合物を0.3 mg/kg 体重/日の用量で経口投与したニワトリの排泄物を供試して調べられた¹⁰⁰。土壌は室内(微砂質埴壤土と壤質砂土)及び野外(微砂質埴壤土のみ)で52週間インキュベーションし、定期的に土壌試料の分析がおこなわれた。室内では、壤質砂土の抽出可能放射能は0週目で66%であったが、1週目~52週目に62%から17%に減少した。微砂質埴壤土では抽出可

⁹⁹ Ref 161 : Hawkins,D.R. et al.(1978);Section IV/File 1 of 2/Volume 33

¹⁰⁰ Ref 162 : Hawkins,D.R. et al.(1982);Section IV/File 1 of 2/Volume 33

能放射能は0週目で46%であり、32週目で34%、52週目で24%にまで減少した。抽出方法の妥当性(抽出効率、精度など)に関する情報は提供されていない。 $^{14}\text{CO}_2$ 発生率は両土壌でそれぞれ16週目に4%及び4.8%であった。ハロフジノンの抽出可能量に基づくと、最初の8週間以降の未変化のハロフジノンの半減期は、微砂質埴壌土で15日、壤質砂土で20日であった。野外試験では16週目以降の回収率が非常に低かった(<30%)。0及び1週目は25%の放射能が検出できなかった。分解産物の同定はおこなわれなかった。深さ5cmより下の土壌からは放射能は検出されず、使用されたハロフジノンの土壌中における移動性は低いことが示唆された。ハロフジノンの抽出可能量に基づくと、8週目以降のハロフジノンの半減期は43日であった。

7.1.2.3. 水中運命(原文、36 ページ)

水中における生物分解(原文、36 ページ)

^{14}C -ハロフジノン処理したニワトリの排泄物が河川水試料に50 g/lの用量で添加され、25°C・暗条件下で保管された¹⁰¹。河川水試料のpHが無処理水と同じになるようにNaOHでpHを調整し、濾過してからLSC(液体シンチレーションカウンター)により放射エネルギーが測定された。河川水試料からの放射能回収率は77~111%であった。試験中に放射能の揮発は認められなかった。水相中の放射能は1週間目に76%であったが、32週間後には43%にまで減少した。未変化のハロフジノンの比率は20%から32週間後には4~5%にまで減少し、DT₅₀値は約10日と推定された。TLCで検出された分解産物のほとんどがハロフジノンよりも極性が低かった。

水中での光分解性(原文、36 ページ)

ハロフジノン臭化水素酸塩含有緩衝液とPNAP感光計を用いた光分解試験により、ハロフジノンの半減期(25°Cの試験条件下では)、pH 4で26分、pH 7で23分、pH 9で13分と推定した¹⁰²。天然水中におけるハロフジノンの光分解半減期が、北緯40~50°で正午の日射照度データを用い、年平均に基づいて推定された。その結果、半減期はpH 4で32分、pH 7で21分、pH 9で14分であった。暗条件下での分解は極微量であった。

7.1.3. 結論(原文、36 ページ)

提供されたデータは土壌中のハロフジノンのK_{oc}値を算定するには不十分であった。親化合

¹⁰¹ Ref 165 : Hawkins,D.R. et al.(1981);Section IV/File 1 of 2/Volume 33

¹⁰² Ref 160 : Flack,I.(1998);Section IV/File 1 of 2/Volume 33

物の DT₅₀ 値は、室内条件下で 15～20 日、屋外条件下で 43 日前後であった。土壌中では未
 同定の 2 つの主要代謝物が生成される。それらの生物活性は未知である。

水中運命に関する 2 つの試験の結果によると、ハロフジノンは速やかに光分解されるが、
 残留性が比較的高く暗条件下で安定である。無光下の排泄物と水の混合物では、ハロフジ
 ノンの分解性は中程度であることがわかっている。土壌及び水中における分解経路は明確
 に解明されておらず、定量もおこなわれていない。

7.1.4. 環境中予測濃度(PEC)(原文、36 ページ)

堆肥、土壌、地下水及び地表水の PEC 推定法を付表 1 に示す。計算値は表 16 に示す。

表 16. ハロフジノンの土壌、地下水及び地表水の環境中予測濃度

環境媒体	濃度		トリガー値
	脆弱地域	非脆弱地域	
土壌	14 µg/kg	29 µg/kg	10 µg/kg
地下水	41 µg/l	84 µg/l	0.1 µg/kg
地表水	41 µg/l	84 µg/l	

土壌及び地下水の PEC は全て、第 I 相のトリガー値を超えている。したがって、第 II 相で
 の評価が必要と考えられる。

第 II 相の Tier A は、第 I 相で算出された総残留量(初期最大濃度)と親化合物の毒性デー
 ターに基づく総合的な影響評価を参考にしている。親化合物が最も毒性が高い化合物である
 と仮定すると、これは暴露期間に関係なく安全なレベルである。

7.2. 影響評価(原文、37 ページ)

7.2.1. 土壌生物に対する毒性(原文、37 ページ)

7.2.1.1. 土壌微生物への影響(原文、37 ページ)

軽壤土と重粘土を用いた 28 日間の窒素形態変化試験¹⁰³が実施された。土壌にハロフジノン (3 mg/kg feed を 14 日間)処理鶏もしくは無処理鶏の堆肥が、土壌 500 g に対して 17.5g の比率で混和された。処理群及び対照群のそれぞれで、ハロフジノン濃度が 4 回調べられた。軽壤土では、2 日目以降から対照群よりも処理群の NH₄⁺濃度が低く、NO₃⁻濃度が高かった。しかし、試験終了時(28 日目)には対照群と処理群の NH₄⁺、NO₂⁻及び NO₃⁻濃度に有意差は認められなかった。しかし、28 日目の重粘土では処理群の NO₃⁻濃度は対照群に比べて有意に低かった(25%)。したがって、土壌微生物に対する NOEC は設定することができない。

7.2.1.2. メタン生成細菌への影響(原文、37 ページ)

純粋培養のメタン生成細菌 4 種にハロフジノンが及ぼす影響が、調べられている¹⁰⁴。最も抵抗性が高い種では 1 mg/l で部分的に、10 mg/l で完全に抑制されたが、最も感受性が高い種では 30 µg/l で生育に影響を受け、100 µg/l で完全に抑制された。下水汚泥の回分発酵は 1 mg/l で著しく抑制された。回分中のメタン生成が回復したのは約 7 日後であった。

発酵試験では、ハロフジノン 200 mg/l を 1 回投与するだけでガスの生成は完全に抑制され、反応系へのハロフジノン添加終了時にのみ回復した。ハロフジノン 30 mg/l を連続投与するとガスの生成は減少し、ハロフジノン添加終了後及び発酵休止 1~2 週間後の生汚泥添加後にのみ回復した。

7.2.1.3. 植物への影響(原文、38 ページ)

ステノロール予混合物を用いて、トマト、レタス及びキュウリの実生及びタバコ苗に対する毒性を調べるための予備試験が実施された¹⁰⁵。土壌中のハロフジノンが 60、120、240 及び 480 g/ha となるように本品を土壌に混和した。42 日間、目視調査だけによるモニタリングが毎週おこなわれた。処理土壌と対照土壌の植物に差異は認められなかった。種子発芽と成長への影響が調べられていないので、ハロフジノンが植物に及ぼす影響に関する明確な結論を出すことはできない。

この試験に基づいて、ステノロール予混合物とハロフジノン処理鶏(3 もしくは 6 mg HBR/kg feed)の排泄物及び敷料を用いた試験がタバコ植物にだけ実施された。処理による

¹⁰³ Ref 167 : Almond,R.H. et al.(1981);Section IV/File 2 of 2/Volume 34

¹⁰⁴ Ref 166 : Kandler,O.(1983);Section IV/File 2 of 2/Volume 34

¹⁰⁵ Ref 170 : Reinier,J.C.(1984);Section IV/File 2 of 2/Volume 34

成長抑制と毒性などの影響が、処理鶏の堆肥で改良した土壌にのみ認められた。

7.2.1.4. ミミズへの影響(原文、38 ページ)

ハロフジノンがミミズに及ぼす影響に関する2つの試験が提出された。そのうちの1つ¹⁰⁶は品質基準を満たしていないため(供試個体に餌が与えられなかったなど)、この試験をFEEDAPは参考に用いなかった。

2つ目の試験ではハロフジノンが堆肥/砂混合物(4:1)中の *L.terrestris* の野外分離株に及ぼす影響が、活性物質 0、0.01、1 及び 10 mg/kg soil の4つの濃度(各処理は4回に分けて実施)、暴露期間 28 日、13~14°Cの条件で調べられた¹⁰⁷。乾燥したウサギの糞が飼料として与えられた。全処理群及び対照群に死亡個体及びミミズの体重への影響は認められなかった。LC₅₀ は ≥ 10 mg/kg soil と考えられる。

7.2.2. 水生生物に対する毒性(原文、38 ページ)

水生生物に対するハロフジノンの毒性に関して、幾つかの毒性試験が提出された。その結果を表 17 にまとめた。

底生生物に対するハロフジノンの毒性に関するデータは提出されなかった。

¹⁰⁶ Ref 168 : Roberts,N.L.(1982);Section IV/File 2 of 2/Volume 34

¹⁰⁷ Ref 169 : Roberts,N.L.(1984);Section IV/File 2 of 2/Volume 34

表 17. ハロフジノンの水生生物に対する毒性

種	毒性指標 (期間)	値	条件	参考 資料
クロレラ(<i>Chlorella pyrenoidosa</i>)	EC ₅₀ (48h)	46 mg/l	24°C*	108
オオミジンコ(<i>Daphnia magna</i>)	LC ₅₀ (48h)	20 µg/l	**	109
オオミジンコ(<i>Daphnia magna</i>)	LC ₅₀ (48h)	18 µg/l	20°C*	116
グッピー(<i>Lebistes reticulatus</i>)	LC ₅₀ (48h)	1.6 mg/l	24°C*	116
ニジマス(<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	LC ₅₀ (48h)	2.9 mg/l	15°C*	116
ニジマス(<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	LC ₅₀ (48h)	1.8 mg/l	12°C、pH 7.8**	110
コイ(<i>Cyprinus carpio</i>)	LC ₅₀ (48h)	0.3~0.7 mg/l	21°C、pH 7.4**	111
ブルーギル (<i>Lepomis macrochirus</i>)	LC ₅₀ (48h)	0.12 mg/l	22°C、pH 7.3**	112

* 試験報告書は試験の重要部分しか記載されていない。

** GLP 対応だが非 OECD 対応である。いずれの試験結果も実際の値は測定されず、名目濃度に基づいている。ハロフジノンは光分解感受性なので、名目濃度は恐らく実際の値よりも高い。そのため、暴露量が不明確になっている。試験物質は水中の試験体系では十分に安定であり、本来ならば供試生物への適切な暴露量や実際の正確な暴露量の推定のために調整がおこなわれていなければならない。

7.2.3. 結論(原文、39 ページ)

植物に関する十分な情報は入手できない。また、微生物に対する NOEC は設定できなかった。したがって、土壌生物に対する PNEC は設定できない。水生毒性試験の上述の問題点により、水生生物に対する PNEC も設定できない。さらに、データの欠如により底生生物に対するリスクが推定できない。

7.2.4. 生体内蓄積(原文、39 ページ)

108 Ref 171 : Canton, J.H. et al.(1976);Section IV/File 2 of 2/Volume 34

109 Ref 172 : Bourdeau, P. et al.(1982);Section IV/File 2 of 2/Volume 34

110 Ref 175 : Griffen, J. et al.(1982);Section IV/File 2 of 2/Volume 34

111 Ref 173 : Fraser, W.D. et al.(1976);Section IV/File 2 of 2/Volume 34

112 Ref 174 : Griffen, J. et al.(1982);Section IV/File 2 of 2/Volume 34

生体内蓄積に関するデータは提出されていない。LogK_{ow}<3 であるため、生体内蓄積のリスクは低いと考えられる。

7.3. リスク判定(原文、39 ページ)

7.3.1. 土壌へのリスク(原文、39 ページ)

体重に基づくミミズに対する LC₅₀ 値は>10 mg/kg である。やや信頼性の低い試験であったが、鶏糞肥料を用いて HBR 3 mg/kg feed が 14 日間投与された軽壤土では、アンモニウム及び硝酸生成の著しい減少が認められた。したがって、申請者は現行のガイドラインに従った詳細な試験を実施するべきである。OECD やそれに類するようなガイドラインに準じた植物毒性試験は実施されなかった。したがって、新たに試験が実施されるべきである。また、このような次第で現時点では土壌への総合的なリスクを予測することはできない。

7.3.2. 地下水及び地表水へのリスク(原文、39 ページ)

現時点では水生生物種及び底生生物に対するハロフジノンの毒性に関する信頼性の高い情報が入手できないため、地下水及び水媒体への環境リスクは評価できない。

この評価は地下水の利用、特に飲水としての地下水については触れていないため、ヒトの健康リスク評価を実施するべきである。

結論(原文、39 ページ)

ステノロールに関する提出データの審査により、FEEDAP パネルは以下の結論を導き出している。

現在の有効性(原文、39 ページ)

提出データは、肥育用のニワトリとシチメンチョウのコクシジウム症に対するステノロールの有効性を示している。しかし、実際の有効性評価の根拠としたデータは 1990 年以降に

実施された試験のみを参考にしており、現行の委員会指令 2001/79/EC の要件を満たしていない。肥育鶏も肥育用シチメンチョウと同様に平飼い試験は 1 件(3 件ではなく)しか入手できず、参考にならなかった。肥育鶏の 3 つの野外試験は参考にできると考えられたが、肥育用シチメンチョウは 1 つの野外試験しか使えなかった。したがって、ステノロールの最新の有効性の全面的評価は不可能である。

現時点で提出されている有効性試験は、HBR 3 mg/kg complete feed についてのものである。より低用量(2~3 mg/kg feed の範囲が認可されている)での有効性は、実データによる確認がおこなわれていない。

肥育鶏では、HBR の有効性を打ち消すような *Eimeria* 属原虫の HBR 抵抗性は野外では認められていない。シチメンチョウ固有の *Eimeria* 属原虫に関する提出データは無いが、それらがニワトリ固有の *Eimeria* 属原虫と異なる反応を示すと考える科学的根拠はある。

ニワトリとシチメンチョウの品質に本添加物が及ぼす影響については、それに関する試験が実施されなかったため、直接的な評価はできない。しかし、もう何十年もこれに関連する知見は本添加物を用いた野外試験からは得られていない。

細菌の抵抗性(原文、40 ページ)

HBR は特定のグラム陽性細菌に対して選択的な抗微生物作用を示すが、多くのグラム陰性細菌は自然抵抗性である。HBR 3 mg/kg feed では、サルモネラ菌の体外排出は恐らく問題とならない。

幾つかの重要病原体に対する HBR の影響(腸球菌とクロストリジウム属細菌は感受性)と、HBR による抵抗性細菌株選抜の可能性評価、及びこの抵抗性が臨床的に重要な抗菌剤との交差抵抗性を引き起こす可能性に関心がもたれている。しかし、これらのに関するデータは提出されなかった。

対象動物種に対する安全性(原文、40 ページ)

耐容試験から推定された安全性マージンは、ニワトリで約 1.5(HBR 4.5 mg/kg feed)、シチメンチョウで 2 未満(<6 mg/kg feed)である。

提出データやこれまでの本製品の経歴から、飼料、担体、他の認可された添加物や医薬品との配合忌避性や相互作用は無いと考えられる。

消費者安全性(原文、40 ページ)

ハロフジノンはニワトリ体内にかなり多く吸収・代謝される。排泄物中に排出される代謝物に占めるハロフジノンの割合は少ないが、提案用量で定量したデータは入手できない。全代謝物の 10%を遥かに超える量の主要代謝物が排泄物と胆汁から分離されているが、それらのいずれもまだ同定されていない。

シチメンチョウにおけるハロフジノンの代謝運命に関するデータは、未変化のハロフジノンが肝臓内で確認されたもの以外は提出されていない。

ハロフジノンの代謝運命はラット(またはマウス)とニワトリで十分に調べられていないため、両種の代謝プロファイルの一致性を立証することはできない。

肝臓はニワトリと肥育用シチメンチョウの両方の標的臓器である。ハロフジノンは、肝臓残留物の大部分を占める。しかし、他の抽出可能なハロフジノン関連代謝物もしくは非抽出可能残留物の性質や比率に関する情報は入手できず、指標残留物は確定できない。

細菌試験では HBR は変異原性である。遺伝子変異及び染色体異常誘発能に関する *in vitro* 試験は HBR の遺伝毒性を示さなかった。骨髄における *in vitro* 遺伝毒性試験の結果は陰性であった。しかし、入手可能データから遺伝毒性の危険性が無いという保証を完全に得ることはできない。骨髄以外の少なくとも 1 つの臓器における適正な *in vitro* 遺伝毒性試験による追加データが求められている。

亜慢性経口毒性試験において、マウスはラットとイヌよりも HBR の毒性に対する感受性が高いらしい。短期間の試験の終わりに認められた血液学的変化が長期的処理をおこなった場合には増加し、マウスの NOEL の設定を下げなければならなくなる可能性は排除できない。マウスとラットの慢性毒性試験の結果は、HBR が非発癌性であることを示唆している。生殖及び催奇形性試験から、HBR の経口投与は催奇形性効果を引き起こさないと判断される。

使用者安全性(原文、41 ページ)

HBR の呼吸性粉塵は呼吸毒性及び全身毒性(急性吸入毒性)を引き起こす。ステノロールの粉塵形成の可能性や、形成された粉塵の粒径分布に関する情報は提供されなかった。しかし、ステノロール製剤は粉塵形成を最小限に抑えるように作られているため、ステノロールから形成される呼吸性粉塵は少ないと考えられる。しかし、それでもステノロールの取り扱いによる HBR 粉塵の吸入暴露の可能性は排除できない。

ハロフジノンは経皮毒性であり、眼と皮膚の両方に対して刺激性が非常に高いようである。HBR の経皮投与は全身毒性を引き起こす可能性もあった。ステノロール予混合物は皮膚刺激性でなかったが、眼刺激性に関する試験はおこなわれなかった。

HBR は皮膚感作を引き起こさない。ステノロールは皮膚感作を 1 つの試験で引き起こしたが、他の試験では皮膚感作性は認められなかった。ステノロールは皮膚感作性物質であると考えられる。

環境への安全性(原文、41 ページ)

関連代謝物に関するデータが無いため、本添加物の 100%が親化合物として排泄されるという前提で全部の計算がおこなわれる。

土壌及び地下水の PEC は、第 I 相のトリガー値を超えている。したがって、第 II 相での評価が必要と考えられた。

微生物に対しては、NOEC が決定できなかった。HBR 3 mg/kg feed で処理したニワトリの堆肥を用いた試験では、アンモニウム及び硝酸生成の著しい減少が軽壤土で認められた。既定のガイドラインに沿った植物毒性試験は実施されなかった。したがって、土壌媒体に対するリスクは評価できない。

水生動物種や底生生物へのハロフジノンの毒性に関する信頼できる情報は入手できないため、水媒体に対するリスクは評価できない。

データが不十分であるため、FEEDAP パネルはステノロールの環境への安全性に関する結論を得ることができない。

監視(原文、41 ページ)

FEEDAP パネルは、現時点では会社側から提供されたデータからハロフジノンの ADI を確定することはできないと判断する。

ニワトリ(及びシチメンチョウ)とラットもしくはマウスの代謝プロファイルは比較不可能であり、ニワトリの胆汁及び排泄物中に認められた主要代謝物はラットやマウスには存在しない。したがって、ニワトリ及びシチメンチョウの組織中に含まれるハロフジノン残留物の暴露による消費者リスクが実験動物で HBR を用いて実施された毒性試験から正しく評価されているとは思えない。

また、臓器中残留物の性質に関するデータの欠如により、FEEDAP パネルは指標残留物を特定することができない。そのため、FEEDAP パネルは MRL や消退期間を提案することもできない。ハロフジノンを指標残留物とすることができれば、十分に特異的かつ高感度なニワトリ臓器中 HBR の分析方法が利用可能である。

EFSA に提供された文書(原文、42 ページ)

ステノロール®(ハロフジノン臭化水素酸塩)の関係書類の原本は、Intervet International 社によって提出された。

パネル構成員

Arturo Anadon, Margarita Arboix Arzo, Georges Bories, Paul Brantom, Joaquim Brufau de Barbera, Andrew Chesson, Pier Sandro Cocconcelli, Joop de Knecht, Noel Dierick, Gerhard Flachowsky, Anders Franklin, Jurgen Gropp, Anne-Katrine Haldorsen, Ingrid Halle, Josef Leibetseder, Alberto Mantovani, Kimmo Peltonen, Guido Rychen, Pascal Sanders 及び Pieter Wester

謝辞(原文、42 ページ)

‘動物用飼料に使用する添加物及び製剤又は物質に関する科学パネル’は、本意見書の原稿作成への貢献に対して Derek Renshaw 氏と Atte von Wright 氏に感謝いたします。

添付 I (原文、43 ページ)

環境中予測濃度(PEC)を調べる方法

土壌 PEC(原文、43 ページ)

土壌に施用される鶏糞堆肥の量は、窒素排出基準と堆肥中の窒素含有量によって決められる。SCAN(動物栄養に関する科学委員会 : Scientific Committee on Animal Nutrition)が利用する動物栄養に関するデータセットによると、ブロイラー鶏の年間飼料消費量は 29 kg DM であり、これによる年間窒素排泄量は 0.394 kg である。すなわち、排泄される窒素 1 kg に対して 83 kg の飼料(88% DM)が消費されることになる。また、飼料中 1 mg/kg の用量で抗コクシジウム剤の 100%が排泄されると、窒素 1 kg 中には 83 mg の残留物が含まれる計算になる(SCAN の飼料への Z 及び Cu の使用に関する意見書^{113,114}の中のリスク評価の項を参照)。

加盟国によって堆肥による土壌改良に関する規制が異なり、排泄された残留物の環境暴露量も異なる。欧州指針では脆弱地域における最大年間窒素施用量は 170 kg/ha と定められている。非脆弱地域では、年間最大窒素施用量は 350 kg N/ha に設定されている。Spaepen et al.(1997)は、スペインでは年間 600kg N/ha という値が報告されている。この値は“私信”によって伝えられたため、信頼できないと考えられている。ポー谷には年間で最大 350 kg N/ha とすることがイタリア国のポー川流域局(Po Basin National Authority)によって推奨されており、他のイタリア国内の農業地域ではもっと低い値が推奨されている。この審査では両方の可能性が考えられる。

通常の農作業ではブロイラーの鶏糞堆肥は畑地に施用され、牧草地には施用されないと思われる。通常ではほとんどの堆肥は動物のライフサイクルの終盤で作られ、添加物は家禽の飼育期間に投与されるため、初期の堆肥の生物分解は考慮されない。土壌中濃度(畑地)は、土壌密度 1500 kg/m³、混和深度 0.2 m 及び単回年間放出量の最悪条件を前提として、以下の公式を用いて計算される。

¹¹³ Opinion of the Scientific Committee for Animal Nutrition on the use of copper in feedingstuffs(adopted on 19 February 2003).

http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scan/out115_en.pdf

¹¹⁴ Opinion of the Scientific Committee for Animal Nutrition on the use of zinc in feedingstuffs(adopted on 14 March 2003).

[http:// europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scan/out120_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scan/out120_en.pdf)

$$PEC_{soil} = \frac{PEC_{manure} \times Q}{RHO_{soil} \times CONV_{area\ field} \times DEPTH_{field}}$$

 入力

<i>RHO_{soil}</i>	土壌容積重	1500 kg/m ³
<i>DEPTH_{field}</i>	土壌混和深度	0.2 m (脆弱地域)
<i>CONV_{area field}</i>	農地面積の換算率	10000 m ² /ha
<i>Q</i>	窒素放出基準	[kg/ha/yr]
<i>PEC_{manure}</i>	窒素量あたりの堆肥中濃度	[mg/kg]

 出力

<i>PEC_{soil}</i>	最大土壌中濃度	[mg/kg soil]
---------------------------	---------	--------------

地下水 PEC(原文、44 ページ)

地下水 PEC(PEC_{gw})は EU の技術指針書(ECB,2003)と RIVM(Montforts,1999)により推奨された方法を用いて算出される。PEC_{gw}は以下の公式を用いて計算された。

$$PEC_{gw} = PEC_{porewater}$$

$$PEC_{porewater} = \frac{PEC_{soil} \times RHO_{soil}}{K_{soil-water} \times 1000}$$

$$K_{soil-water} = Fair_{soil} \times K_{air-water} + Fwater_{soil} + Fsolid_{soil} \times \frac{Kp_{soil}}{1000} \times RHO_{solid}$$

$$Kp_{soil} = FOC_{soil} \times Koc$$

$$K_{air-water} = \frac{VP \times MOLW}{SOL \times R \times TEMP}$$

それぞれの式の関数の設定

記号	パラメータ	値
<i>RHO_{soil}</i>	新鮮土壌の容積重(乾燥土壌ではない!)	1700 kg/m ³
<i>RHO_{solidsoil}</i>	土壌固体密度	2500 kg/m ³

$F_{air_{soil}}$	土壌中の大気の割合	0.2 m ³ /m ³
$F_{water_{soil}}$	土壌中の水の割合	0.2 m ³ /m ³
$F_{solid_{soil}}$	土壌中の固体の割合	0.6 m ³ /m ³
FOC_{soil}	土壌中の有機炭素画分	0.02 kg/kg
$TEMP$	大気 - 水 界面の温度	285 K
R	気体定数	8.314 Pa m ³ /mol/K
VP	蒸気圧	[Pa]
$MOLW$	モル質量	[g/mol]
SOL	水溶性	[mg/l]
$K_{soil-water}$	土壌-水 分配係数 (v/v)	[m ³ /m ³]
Kp_{soil}	土壌中の土壌-水 分配係数 (v/w)	[dm ³ /kg]
$K_{air-water}$	土壌中の大気-水 分配係数	[m ³ /m ³]

地表水 PEC(原文、45 ページ)

添加物の地表水 PEC は RIVM(Montforts,1999)によって述べられた方法に従って計算される。ここでは、土粒子に吸着されない物質は土壌水の中にあり、降水中に地表水に入り込みやすいということを前提にしている。地表水中の濃度は、間隙水よりも降水量と降水後の受水による希釈に影響を受ける。流域面積の規模は受水河川の規模に比例すると思われるが、流域や受水の規模は考慮されていない。また、希釈は間隙水が受水に入り込むときに生じる。この希釈係数は化学物質の残留性に基づいて設定できる。最悪条件をデフォルトとして残留性化合物は希釈係数 1(希釈なし)と見なされ、非残留性化合物は 10 と見なされている。

降水による流出によって土壌表面の添加物含有堆肥が施用後に地表水に入り込む可能性もある。しかし、飼料添加物に適したモデルが得られないので、現時点では地表面での水媒体のローディングは考慮されていない。

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
CAS	Chemical Abstract Service	ケミカルアブストラクトサービス
DT50	degradation time for 50%	土壌中半減期
EFSA	European Food Safety Authority	欧州食品安全機関
FEEDAP	The Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed	動物飼料添加物及び飼料製品パネル
GLP	Good Laboratory Practice	試験実施適正基準
HBR	halofuginone hydrobromide	ハロフジノン臭化水素酸塩
HPLC	high performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー
LC50	Lethal Concentration 50%	半数致死濃度
LOD	limit of detection	検出限界
LOQ	limit of quantification	定量限界
MIC	minimal inhibitory concentration	最小発育阻止濃度
MRL	maximum residue limit	最大残留基準値
NOEC	No Observed Effect Concentration	無影響濃度
NOEL	No Observed Effect Level	無影響量
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development	経済協力開発機構
PEC	Predicted Environmental Concentration	予測環境濃度
RIVM	Netherlands National Institute for Public Health and the Environment	オランダ国立公衆衛生環境研究所
TLC	Thin Layer Chromatography	薄層クロマトグラフィ
UV	Ultraviolet	紫外