

塩酸ジフロキサシンを有効成分とする製造用原体(塩酸ジフロキサシン)及び豚の飲水添加剤(ベテキノン可溶散25%)の再審査に係る食品健康影響評価について(案)

1. 塩酸ジフロキサシン及びベテキノン可溶散25%について^{(1),(2)}

塩酸ジフロキサシン及びベテキノン可溶散25%については、共に平成8年2月27日に農林水産大臣より動物用医薬品として承認を受けた後、所定の期間(6年間)が経過したため再審査申請が行われた。製剤の内容については次の通りである。

主剤

主剤は塩酸ジフロキサシンである。

効能・効果

適応症は豚の細菌性肺炎で、有効菌種はアクチノバチルス・プルニューモニエ、パスツレラ・ムルトシダとされている。

用法・用量

豚体重1kgあたりジフロキサシンとして2.5～5.0mgを飲水に均一に溶かして3日間経口投与する。休薬期間は7日である。なお、本製剤については第一選択薬が無効の症例のみに使用することとされている。

その他

その他、特に生理活性があると考えられる物質は添加されていない。

2. 再審査における安全性に関する知見等について

(1) ヒトに対する安全性について

ベテキノン可溶散25%は上記の通り国内では豚の細菌性肺炎を対象に使用されているが、主剤の塩酸ジフロキサシンは欧州では食用動物全般に対して使用を認めており、EMEAで1.8μg/kg体重/日のADIが設定されている^{(3), (4), (5), (6), (7)}。FDA、JECFAにおける評価は行われていない。日本においてADI及びMRLの設定はされていない。

(2) 安全性に関する研究報告について⁽⁸⁾

調査期間中のMedlineを含むデータベース検索の結果、分析法及び耐性菌に関する報告等が複数報告されている。

(3) 承認後の副作用報告について⁽⁸⁾

豚に対する安全性について、調査期間中に5067頭の調査が実施され、豚に対する新たな副作用は認められなかったとされている。

3. 再審査に係る食品健康影響評価について

本製剤は豚に飲水投与されるが、日本においてMRLの設定はなされていないことから、ジフロキサシンのADI設定について別添の通り評価を実施した。

ジフロキサシンの食品健康影響評価については、ADIとして次の値を採用することが適当と考えられる。

ジフロキサシン mg/kg体重/日

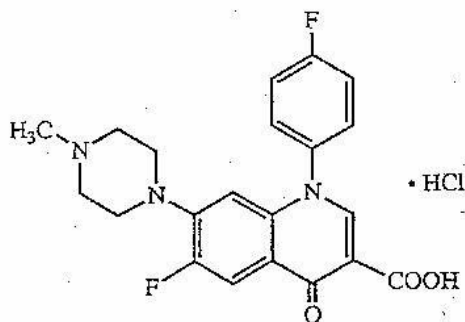
(別添)

塩酸ジフロキサシンの食品健康影響評価について(案)

1. 薬剤の概要

(1) 物質名^{(1),(2)}

塩酸ジフロキサシン(Difloxacin hydrochloride)



分子式 : $C_{21}H_{19}F_2N_3O_3 \cdot HCl$

分子量 : 435.86

常温における性状 : 白～微黄白色の結晶性粉末

融点 : 210.5～212.5

溶解度 : 70 g/L (pH 4.5)、3 g/L (pH 13)

蒸気圧 : nonvolatile

(2) 効能・効果

ジフロキサシンはニューキノロン^a剤に属し、グラム陰性菌に加え、多くのグラム陽性菌に対しても有効である。作用は殺菌的であり、細菌の型トポイソメラーゼ^bであるDNA ジャイレース、あるいはトポイソメラーゼに作用しDNA複製を阻害するものと考えられている(グッドマンギルマン薬理学)。通常塩酸塩の形態で使用されている。

(3) その他

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

2. 毒性試験の概要

2-1. 吸収・分布・代謝・排泄

【ラットにおける単回投与試験】(資料 24,25)

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

^a ノルフロキサシン以降に合成された塩基性環の 6 位にフッ素、7 位に環状塩基性基を有するキノロン薬を総称して言う。

^b DNA 鎖に一時的な切れ目を導入し、閉環 DNA の超らせんの程度の調節や連環状二量体の形成・解離に作用する。

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

経口投与後1日間までに尿中から雌で7.5%、雄で15.7%、糞中から雌で52.2%、雄で41.8%が回収され、投与後3日間までには尿中から雌で8.9%、雄で18.3%、糞中から雌で87.8%、雄で78.0%が回収された。この傾向は静脈内に投与した場合も同様であった。

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

上記の試験で回収された血漿、尿、糞、胆汁中の代謝物が同定されている。

血漿中では、92.8-97.4%が未変化体であり、その他少量のN-oxide、N-脱メチル化体^c、グルクロン酸抱合体が検出された。尿中では、27.3-51.5%未変化体であり、32.1-56.2%がN-脱メチル化体、9.6-16.0%がN-oxideであり、その他少量のグルクロン酸抱合体、3'-oxo体、未同定代謝物が検出された。糞中では88.4-96.0%が未変化体であり、3.1-10.7%がN-脱メチル化体、その他個体によっては少量のグルクロン酸抱合体、3'-oxo体、未同定代謝物が検出された。主要な排泄物(尿+糞)の総投与量に対する割合では、未変化体が約80%を占め、ついでN-脱メチル化体が約10%、N-oxideが1.7%でその他は1%未満であった。代謝物の平均糞中排泄量は雌より雄で多くなっていた。胆汁中ではグルクロン酸抱合体が主要な代謝物で60%程度、未変化体が30%程度、その他N-oxide、N-脱メチル化体、3'-oxo体が少量存在していた。胆汁への排泄量と糞便への排泄量の差から、胆汁から腸管内に排泄された抱合体は腸管で脱抱合され、一部は腸肝循環していると考えられる。(資料24)

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

【ラットの有色眼における放射活性】(資料28)

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

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

^c サラフロキサシン

【イヌにおける単回投与試験】(資料 23,27)

ビーグル犬(雌雄各 2 頭/群)における ^{14}C 標識塩酸ジフロキサシン(10mg/kg 体重)の単回強制経口あるいは静脈内投与後の血漿中濃度変化において、経口投与の T_{\max} は 2 時間以内であり、その時の C_{\max} は 2.21-3.82 $\mu\text{g}\cdot\text{eq}/\text{ml}$ であった。1 頭のみ 6 時間後にも第二のピークが認められた。静脈内投与時の $T_{1/2}$ (相) は 8.2 時間であった。経口投与では、4 頭のうち 2 頭は 2 相性の消失を示し、1 頭は 1 相性、さらに第二のピークが認められた個体ではモデル化できなかったが、消失の傾向は静脈投与時と同様であった。Ht を 45% と仮定して平均濃度を用いて計算した場合、血球/血漿比は経口投与の 6 時間後で 0.40、12 時間後で 0.61 であった。静脈投与された 4 頭では投与 1, 3, 6, 12 時間後で 0.54-0.74 の範囲であり、放射活性は血球に浸透しているものと考えられた。未変化体の AUC から計算した生物学的利用率は 95.7% であった。

経口投与では投与後 5 日間までに尿中から平均して雌で 16.3%、雄で 15.8%、糞中から雌で 79.0%、雄で 81.9% が回収された。この傾向は静脈内に投与した場合も同様であった。

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

上記の試験で回収された血漿、尿、糞、胆汁中の数種代謝物が同定されている。

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

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

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

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

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

【イヌにおける 1 ヶ月間経口投与試験】(資料 26)

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

5mg 及び 25mg 投与群における T_{\max} はいずれの時点でも 1~3 時間であり、その時の C_{\max} は 5mg 投与群

の1回投与後で1.02-2.29、15回で1.47-2.56、29回で1.26-2.38 $\mu\text{g}\cdot\text{eq}/\text{ml}$ 、25mg投与群では順に1.71-5.98、2.27-13.23、5.11-11.04 $\mu\text{g}\cdot\text{eq}/\text{ml}$ であ**る**た**り**蓄積性は認められなかった。1回投与後の $T_{1/2}$ (相)は5mgで7.62時間、25mgで7.15時間であった。125mg投与群については、 T_{max} が1~6時間とばらつき、 C_{max} は投与量比から予測される値より低かった。また、頻繁な嘔吐、死亡(1/8)、毒性徴候が認められたため、 $T_{1/2}$ の算出は行わなかったとされている。

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

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

【ブタにおける単回投与試験】(資料30,31)

ブタ(去勢雄5頭群)における ^{14}C 標識塩酸ジフロキサシンの単回強制経口(5mg/kg体重)あるいは静脈内(1mg/kg体重)投与において、経口投与の T_{max} は2時間以内であり、その時の血清中濃度の C_{max} は3.01-4.48 $\mu\text{g}\cdot\text{eq}/\text{ml}$ であった。 $T_{1/2}$ (相)は経口投与で17.17時間、静脈内投与で7.92時間であった。血清中濃度のAUCから計算された生物学的利用率は平均して66%であった。

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

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

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

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

【ブタにおける3日間経口投与試験】(資料32,35)

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

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

^d フリーベース換算量

^e フリーベース換算量

また、ブタ(18頭/群)に塩酸ジフロキサシン(5.0, 10mg/kg 体重/日^f)を3日間飲水投与し、最終投与後1, 3, 5, 7, 10日後の組織中濃度が測定されている。いずれの投与群も5日後には全ての臓器で検出限界未満となった。N-脱メチル化体の検出量はほとんど全ての例でジフロキサシンの1/10に満たなかった。(資料35)

【血漿中たん白質結合試験】

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

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

【ヒトボランティアにおける投与試験】(論文12, 13)

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

2-2.毒性試験

(1)急性毒性試験(資料2, 3, 4)

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

(2)亜急性毒性試験

【ラットを用いた3ヶ月間亜急性毒性試験】(資料7)

約5週齢のSprague-Dawley系ラット(雌雄各15匹/群)を用いた強制経口(0, 20, 50, 150 mg/kg 体重/日^h)投与における3ヶ月間の亜急性毒性試験において認められた毒性所見は以下の通りであった。なお、試験期間中に対照群の2匹及び150mg投与群の4匹が死亡した。また、各群5匹について、投与終了後1ヶ月間を回復期とし、その間についても状態の観察が実施されている。

一般的な臨床症状観察、では特に被験物質の投与に起因した異常は認められなかった。

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

^f フリーベース換算量

^g フリーベース換算量

^h フリーベース換算量。投与は所定の濃度に調整された懸濁液を最新の体重測定値に基づき10mL/kgの容量で経口投与。

してわずかに低かったがいずれも統計学的に有意ではなかった。

摂餌量では、差は認められなかった。

眼検査(眼底鏡及び細隙灯)では投与に起因した異常は認められなかった。

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

血液生化学的検査では、50mg 以上投与群の雄及び 150mg 投与群の雌で総たん白質、グロブリン、アルブミンの減少、150mg 投与群の雄で ALT の増加が認められた他、散発的に有意差が認められる項目が認められた。グロブリン、アルブミン、総たん白質の減少は本試験に先立って実施された 1 ヶ月間の亜急性毒性試験でも認められたが、値はラットの生理的変動の範囲内であった。

尿検査では被験物質の投与に起因した異常は認められなかった。

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

剖検では特に被験物質投与に起因した異常は認められなかった。

~~及び病理組織学的検査では対照群と 150mg 投与群のみで実施されたが、特に被験物質投与に起因した異常は認められなかったが、対照群を含め 150mg 投与群の一部にウイルス感染によると思われる唾液腺炎、腺炎及びノ又は角膜炎組織病変が認められた。~~

本試験における NOAEL は 50 mg/kg 体重/日であった。

【若齢イヌを用いた 3 ヶ月間亜急性毒性試験】(資料 8,9,10)

9~12 ヶ月齢のビーグル犬(対照群及び 60mg 投与群は雌雄各 7 頭/群、5 及び 20mg 投与群は雌雄各 4 頭/群)を用いた強制経口投与(0、5、20、60 mg/kg 体重/日)による 3 ヶ月間の亜急性毒性試験において認められた毒性所見は以下の通りであった。投与はゼラチンカプセルを用いて行い、対照群には空のカプセルを同様に投与した。なお、対照群及び 60mg 投与群の雌雄各 3 頭は、投与終了後 1 ヶ月間を回復期とし、その間についても状態の観察が実施されている。

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

眼科学検査(眼底鏡及び細隙灯)では網膜を含む眼の構造に異常は認められなかった。

体重変化、摂餌量に特に被験物質の投与に起因した変化は認められなかった。

血液学的検査では、60mg 投与群の雄で活性化部分トロンボプラスチン時間の延長が認められたが、通常の変動範囲内と考えられた。他に特に被験物質の投与に起因した異常は認められなかった。

血液生化学的検査では、60mg 投与群の雄の数頭で ALT の増加が認められた。回復期まで観察された個体では、試験 118 日には正常範囲に回復していた。この ALT の増加は本試験に先だって実施された 1 ヶ月

ⁱ フリーベース換算量。投与量は最新の体重測定値に基づき補正。

間亜急性毒性試験においても認められていた。1ヶ月間亜急性毒性試験で認められていた血清中総たん白質の減少は本試験では認められなかった。

尿検査では、特に被験物質の投与に起因した異常は認められなかった。

臓器重量では、特に被験物質の投与に起因した異常は認められなかった。

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

この他、網膜電位図検査、心電図検査が実施されている。網膜電位図検査では20mg 以上投与群でA及びB波頂点時間の規則的延長と振幅の減少が特に3ヶ月の投与後に観察された。同様の所見は1ヶ月間亜急性毒性試験においても認められているが、回復期には消失した。心電図検査では特に被験物質投与に起因した異常は認められなかった。

本試験におけるNOAELは5mg/kg 体重/日であった。(資料8)

3.5～3.8ヵ月齢のビーグル犬(対照群及び125mg 投与群は雌雄各8頭/群、他の投与群は雌雄各6頭/群)を用いた強制経口投与(0, 5, 25, 35, 50, 125mg/kg 体重/日^j)による13週間の亜急性毒性試験において認められた毒性所見は以下の通りであった。投与はゼラチンカプセルを用いて行い、対照群には空のカプセルを同様に投与した。なお、対照群及び125mg 投与群の雌雄各2頭は、投与終了後1ヶ月間を回復期とし、その間についても状態の観察が実施されている。なお、跛行、手根関節の平坦化が発現したため、25mg 投与群の3頭(雄2, 雌1)、35mg 以上投与群では4頭(雌雄各2)を投与24日に(125mg 投与群の雄については8及び10日に1頭ずつ)安楽死させ、剖検に供した。その他には試験期間中に死亡例はなかった。

一般的な臨床症状観察では、被験物質の投与に関連すると考えられる所見として、眼窩周囲の腫脹(swelling)、耳部、鼻口部、腹部の一部あるいは全ての皮膚の紅潮(red skin)、瞬膜腫脹(elevated)、結膜、耳部、鼻口部の一部あるいは全ての腫脹(swollen)が認められた。また、35mg 以上の投与群で嘔吐が用量相関的に増加した。125mg 投与群では瞳孔収縮、痙攣(convulsion)、脱水症状、横臥、流涎、斜視、緊張(tonic)、振戦引きつり(twitching)、衰弱も認められた。

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

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

眼科学検査(間接検眼鏡)では特に異常は認められなかった。

血液学的検査では、特に被験物質の投与に起因した異常は認められなかった。

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

尿検査では、特に被験物質の投与に起因した異常は認められなかった。

臓器重量では、特に被験物質の投与に起因した異常は認められなかった。

剖検及び病理組織学的検査では、大腿骨、脛骨近位端、橈骨遠位端及び手根骨部の関節軟骨に中間層

^j フリーベース換算量。投与量は最新の体重測定値に基づき補正。

の空隙形成、軟骨原線維形成、軟骨細胞密集等の病変が全ての投与群で認められた。発生の頻度は高用量でより顕著であった。また、肝内胆管増殖が 35mg 以上投与群で認められた。

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

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

3~4 ヶ月齢のビーグル犬(雌雄各 4 頭/群)を用いた強制経口投与(0, 0.3, 1.0, 3.0mg/kg 体重/日^k)による 13 週間の亜急性毒性試験において認められた毒性所見は以下の通りであった。投与はゼラチンカプセルを用いて行い、対照群には空のカプセルを同様に投与した。なお、試験期間中に死亡例はなかった。

一般的な臨床症状観察では、特に被験物質の投与に起因した異常は認められなかった。

体重変化では 0.3 及び 1.0mg 投与群の雄で数週間の間、増加が認められた。これらの投与群では散発的に摂餌量の増加が観察されていた。3.0mg 投与群ではこのような変化は認められなかった。

眼科学検査(間接検眼鏡)、血液学的検査、血液生化学的検査、臓器重量、剖検及び病理組織学的検査では、いずれも特に被験物質の投与に起因した異常は認められなかった。

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

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

(3)慢性毒性試験

【マウスを用いた 2 年間発がん性試験】(資料 21)

CD-1 マウス(雌雄各 70 匹/群)を用いた混餌(0, 5, 25, 75, 150mg/kg 体重/日^l; 雄 0, 4.0, 20.5, 67.6, 123.0mg/kg 体重/日, 雌 0, 4.1, 20.6, 61.7, 123.6mg/kg 体重/日^m)投与による 2 年間の発がん性試験において認められた毒性所見は以下の通りであった。

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

体重変化では、特に投与に起因した異常は認められなかった。

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

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

剖検及び病理組織学的検査では、雄の 150mg 投与群で肺の結節/腫瘤が対照群と比較して多く認められた。病理組織学的検査では対照群を含めた全ての群で細気管支又は肺胞に過形成、腺がん及び腺種が認められた。雄では腺がんが 150mg 投与群で多かった。雌ではいずれも差は認められなかった。肝臓で

^k フリーベース換算量。投与量は最新の体重測定値に基づき補正。

^l 原末換算における計画投与量。混餌濃度は最新の体重測定値及び摂餌量に基づき調整。

^m 混餌濃度及び摂餌量から求めた実投与量(フリーベース換算量)

は 150mg 投与群の雌雄で小葉中心性肝細胞肥大が対照群よりも多く認められた。肝細胞腺腫およびがん、これらの併発例の発生率には投与群と対照群間で有意差は認められなかった。150mg 投与群の雌雄で鼻甲介のエオシン染色性の呼吸上皮、嗅覚上皮、エナメル器の陥入、鼻孔内のタンパク様液の発生頻度の増加が認められた。また、雌の 75mg 投与群で子宮血管腫の発現数が増加したが、150mg を含め他の投与群では認められなかった。雄の 75mg 以上投与群で精巣細動脈の石灰沈着(mineral deposit)、150mg 投与群で精母細胞・精子細胞の巨細胞及び精巣白膜石灰沈着が認められた。

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

【ラットを用いた 2 年間慢性毒性/発がん性併合試験】(資料 20)

CD 系ラット(雌雄各 70 匹/群)を用いた混餌(0、5、25、50、100mg/kg 体重/日ⁿ; 雄 0、4.0、20.5、41.2、82.2mg/kg 体重/日、雌 0、4.0、20.6、41.0、81.4mg/kg 体重/日^o)投与による 2 年間の慢性毒性/発がん性併合試験において認められた毒性所見は以下の通りであった。なお、雌の 50mg 投与群で生存率が低かった他は、群間比較では有意な生存率の変化は認められなかったが、雄では傾向検定で生存率の減少傾向が認められた。

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

体重変化では、100mg 投与群の雌雄の 2 年目に減少が認められた。

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

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

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

尿検査では、特に被験物質の投与に起因した異常は認められなかった。

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

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

病理組織学的検査では、50mg 以上の投与群で高頻度に認められた腫脹あるいは褪色した耳部で類軟骨過形成、うっ血が認められた。肝臓では胆管増生及び胆管線維症が 25mg 以上投与群の雌雄で認められたが、これらの病変では投与との関連性はなかった。肝臓の褪色部ではうっ血が認められたが、不完全な放血に起因するものと考えられた。100mg 投与群の雄では精母細胞・精子細胞性巨細胞の精細管内

ⁿ原末換算における計画投与量。混餌濃度は最新の体重測定値及び摂餌量に基づき調整。

^o混餌濃度及び摂餌量から求めた実投与量(フリーベース換算量)

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

腫瘍の発生頻度については、対照群と投与群間で有意差は認められなかった。

原末で雌雄の 25mg 投与群で肝臓に影響が認められたことから、フリーベース換算における本試験の NOAEL は 4.0mg/kg 体重/日であった。

(4)繁殖毒性試験及び催奇形性試験

【ラットを用いた3世代繁殖試験】(資料11)

Sprague-Dawley 系ラット(Crl:CD[®]BR; 雌雄各 30 匹/群)を用いた混餌投与(0、25、50、100 mg/kg 体重/日)による 3 世代繁殖試験が実施されている。100mg 投与群では受胎率及び出生率の著しい減少が認められたため、F₁ 世代以降は 50mg までの 3 用量で実施された。

被験物質の投与は F₀ 世代では 7 週齢、F₁ 及び F₂ 世代では生後 22 日に開始し、雌雄とも最短でも第 1 回交配前の 70 日間及び 2 回の繁殖期を通して投与を行った。第 1 産児(F_{1a}、F_{2a}、F_{3a})は生後 21 日の離乳まで哺育させ、第 1 産児の離乳から最短 10 日後に 2 回目の交配を行い、第 2 産児(F_{1b}、F_{2b}、F_{3b})を離乳まで哺育させた。F_{1b}、F_{2b} については離乳後各群から雌雄各 30 匹を繁殖用に選抜し、それぞれ F₂、F₃ 世代を得た。なお、被験物質の混合量は交配前については最新の体重と摂餌量に基づいて毎週濃度調整され、交配、妊娠、授乳中は交配前の体重と摂餌量に基づいた調整濃度に維持された。交配期間中同一ケージに同居させた雌雄についてはどちらか低濃度に調整された方の濃度の混餌飼料を与えた。平均摂取量は期間によって変動した。混餌濃度と摂餌量から求められた実投与量は F₀ については次の表の通りであった。この被験物質濃度はフリーベース換算されていない。なお、授乳期間の値は出生児の摂餌のため上昇した。

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

一般的な臨床症状観察では対照群との間に所見の差はなかった。

親動物では 100mg 投与群の F₀ で雄の低体重と増加量減少、妊娠雌でも低体重と増加量減少が認められた。50mg 投与群では、F₀ の妊娠雌で低体重と増加量減少、F₁ の雌雄で低体重、F₁ の妊娠期間及び授乳期間中の低体重、F₂ の雌雄で低体重と増加量減少が認められた。摂餌量の減少が 100 mg 投与群の F₀ 雌の授乳中、50 mg 投与群の F₀ 雌の妊娠中及び授乳中、F₁ の雄、F₂ の妊娠中及び授乳中に認められた。

100mg 投与群において F₀ 雄の肝臓、腎臓、精巣および下垂体の相対重量の増加、雌の卵巣の相対及び絶対重量の減少、肝臓の相対重量の減少が認められた。50mg 投与群では F₀ 雄で肝臓、腎臓の相対重量の増加、F₁ 雄で肝臓と精巣の相対重量の増加、雌で肝臓と腎臓の相対重量の増加、F₂ 雌の腎臓で相対重量の増加が認められた。いずれの臓器においても被験物質投与に関連すると考えられる病理組織学的変化はみられなかった。

100 mg 投与群の F₀ 雌雄で受胎率^pおよび妊娠率^qの著しい低下がみられ、精子検査の結果雄 12 匹に精子数減少、精子活動性低下、精子の形態異常の増加が認められた。出生児数が著しく減少し、平均体重も低下が認められた。25 mg 及び 50 mg 投与群の交尾率、受胎率、妊娠率及び妊娠期間はいずれの世代においても対照群と同様であり、出生児の数、性比、授乳期間中の生存率及び体重に被験物質投与の影響はみられなかった。離乳児の肉眼的検査で形態異常は認められず、病理組織学的検査 (F_{2b}) でも投与に起因した異常は認められなかった。

本試験においては、**親母動物**の一般毒性に対する NOAEL は **21.023.7**mg/kg 体重/日^rであり、生殖発生毒性に対する NOAEL は 46.7mg/kg 体重/日^sと考えられた。なお、これらの値は塩酸塩としてのものであり、フリーベースとしての値は約 80% 程度と推定される。

【ラットを用いた催奇形性試験】(資料 12)

CD ラット(20 匹/群)の妊娠 6-15 日に強制経口(0, 15, 65, 275 mg/kg 体重/日)投与して胚および胎児発育への影響試験が実施されている。

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

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

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

【ラットを用いた受胎能および一般生殖能試験】(資料 17, 18)

CD ラット(雌 40 匹/群)の交配 14 日前から分娩後 21 日の離乳時まで強制経口(0, 15, 45, 150 mg/kg 体重/日^t)投与して、受胎能および一般生殖能試験が実施されている。各群の雌 (F₀) の半数は妊娠 20 日に帝王切開して胎児の検査を行い、残りの雌については分娩させ、児 (F₁) を生後 21 日に離乳して 40 日齢まで行動検査を行なった。すべての行動観察終了後 6 週齢で F₁ 動物の中から雌雄各 20 匹/群を選抜して生殖能を調べ、雌を妊娠 20 日に帝王切開して剖検し、雄は帝王切開終了後に剖検した。

母動物 (F₀) において、150mg 投与群で流涎が認められ、45 mg 以上投与群で鼻周囲の赤色乾燥物が観察

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

^q 妊娠が成立した雌の数/交尾した雌の数

^r 25mg 投与群の F₁ 雌及び F₂ 雄における実摂取量の最低値

^s F₀ 雌の 50mg 投与群における実摂取量の最低値

^t フリーベース換算量。投与は所定の濃度に調整された懸濁液を最新の体重測定値に基づき 10mL/kg の容量で経口投与。

^u フリーベース換算量。投与は所定の濃度に調整された懸濁液を最新の体重測定値に基づき 10mL/kg の容量で経口投与。

された。

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

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

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

分娩されたF₁児の授乳1日及び4日の生存率は150mg 投与群でやや低かった。授乳1日におけるF₁児体重は45mg 以上投与群で有意に低く、150mg 投与群では授乳期間中低値であった。

生後のF₁児の耳介開展、眼瞼開裂、正向反射^v、断崖回避、音響驚愕反応^w、聴覚機能^x、眼科的検査、オープンフィールド行動検査^y、M迷路学習検査^zの結果には被験物質投与の影響は認められなかった。

F₁世代各群雌雄の交配実験では被験物質投与の影響はみられなかった。

F₁世代には被験物質の投与に起因した一般症状の異常は認められなかったが、150mg 投与群の雌雄で平均体重が試験期間を通じて低値を示した。45mg 以上の投与群では腎の病理組織学的変化(集合管と腎盂の嚢胞性拡張、出血、線維症)の発現頻度が高かった。F₁の性周期、受胎率、生存胎児数、着床数、黄体数、着床胚/胎児死亡数、F₂胎児体重、頭臀長および性比には被験物質の投与に起因した影響は認められなかった。(資料18)

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

【ウサギを用いた催奇形性試験】(資料13)

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

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

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

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

^v 仰向けの状態からの復帰反応

^w 単発の短音に対する反応

^x Veiner and Alleva の方法によるガルトン笛に対するプレイヤー反射の観察

^y Hall の方法による行動観察

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

^{aa} フリーベース換算量。投与は所定の濃度に調整された懸濁液を最新の体重測定値に基づき2mL/kgの容量で経口投与。

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

(5) 遺伝毒性試験

変異原性に関する各種の *in vitro* 試験の結果を次表にまとめた。

【変異原性に関する各種試験の結果一覧】

in vitro 試験

試験	対象	投与量 ¹	結果
染色体異常試験	培養ヒト全血リンパ球(資料 14)	37.5 , 75.0 , 113 , 150 µg/mL ² (-S9 ; 50.5hr)	陰性
		100 , 250 , 500 , 750 , 1000 µg/mL ³ (+S9 ; 27.4hr)	陰性
前進突然変異試験 (Hprt)	CHO(K1-BH4/HGPRT) (資料 15)	288 , 384 , 511 , 682 , 909 µg/mL ⁴ (-S9 ; 5+20hr)	陰性
		216 , 288 , 384 , 511 , 682 µg/mL (+S9 ; 5+20hr)	陰性
		511 , 682 , 909 , 1212 µg/mL ⁵ (-S9 ; 5+20hr)	陰性
		511 , 682 , 909 , 1212 µg/mL ⁵ (+S9 ; 5+20hr)	陰性
前進突然変異試験 (Tk)	L5178Y マウスリンパ腫細胞(資料 16)	10 ~ 700 µg/mL(-S9) ⁶	陰性
		10 ~ 500 µg/mL(+S9) ⁷	陰性 ⁸
不定期 DNA 合成(UDS)	ラット初代培養肝細胞(-S9) (資料 19)	5.03-503 µg/mL ⁹	陽性 (101µg/mL)

1 塩酸塩の値

2 150µg/mL で 細胞毒性が認められた。

3 500µg/mL 以上で著しい細胞毒性が認められた。

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

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

6 700µg/mL では 相対増殖率が 10%未満に低下。

7 500µg/mL では 相対増殖率が 10%未満に低下。

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

9 503µg/mL では 細胞生存率がやや低下(81.3%)。

in vitro の試験においては、染色体異常試験、ほ乳類培養細胞を用いた前進突然変異試験のいずれも代謝活性化の有無にかかわらず陰性を示した。一方、UDS 試験では 101µg/mL 以上の用量で陽性所見がみられた。*in vitro* の UDS については、キノロン系の抗生物質でしばしば陽性が認められている。*in vivo* の試験は実施されていない。リンパ球を用いた UDS 試験においてもジフロキサシンは陽性であったが、DNA 鎖の傷害は確認できなかったと報告されている(論文 14)。UDS における陽性所見は DNA への直接の傷害性ではなく、キノロン系薬剤の二次作用によるものと考えられる。

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

(6) 微生物学的影響に関する特殊試験

【in vitro の MIC に関する試験】

臨床分離菌に対する最小発育阻止濃度 (MIC)

ヒト腸内に生息する可能性のある臨床分離株に対するジフロキサシン及びサラフロキサシンについての MIC が複数の公表論文で報告されている。その概要は次の通りであった。

菌名	株数	最小発育阻止濃度 (µg/mL)						出典等
		Difloxacin			Sarafloxacin			
		MIC ₅₀	MIC ₉₀	範囲	MIC ₅₀	MIC ₉₀	範囲	
グラム陰性菌								
<i>Bacteroides fragilis</i>	40	4.0		1.0-16	4.0		2.0-16	3
	73	2	4	0.125-8	2	4	0.125-8	5
	27	2	4	1-4	1	2	0.5-4	7
	51	2	4	1-8	2	4	1-32	8
	29	4	16	2->32	4	8	1->32	9
<i>Bacteroides bivius</i>	2			2.0-2.0			8.0-8.0	3
<i>Bacteroides distasonis</i>	2			4.0-4.0			8.0-8.0	3
<i>Bacteroides melaninogenicus</i>	6	2.0		2.0-4.0	4.0		2.0-8.0	3
<i>Bacteroides ovatus</i>	7	16		4.0->16	16		4.0->16	3
<i>Bacteroides thetaiotaomicrom</i>	9	8.0		1.0-16	8.0		1.0->16	3
<i>Bacteroides vulgatus</i>	3			2.0-16			8.0->16	3
<i>Bacteroides spp.</i>	117* ¹	1	8	0.125-64	1	8	0.125-32	5
	29	4	16	2-32	4	32	2-64	8
<i>Campylobacter jejuni</i>	10	1.0	1.0	0.5-2	1.0	1.0	0.5-1.0	1
	25	0.25	0.25	0.125-0.25				6
	34	0.25	0.5	0.12-0.5	0.12	0.25	0.06-0.25	11
<i>Campylobacter coli</i>	26	0.125	0.25	0.015-0.5				
<i>Citrobacter freundii</i>	20	0.125	1.0	0.06-2	0.06	0.25	0.06-0.5	1
	22	0.5	4	0.015-4	0.03	0.5	0.015-0.5	2
	14	0.25	2.0		0.03	0.25		3
	36* ²	0.25	1	0.25-2	0.15	0.125	0.08-0.5	9
	30	0.125	1.0	0.06-1.0	0.015	0.125	0.004-0.25	10
<i>Citrobacter diversus</i>	10	0.12	0.12		0.03	0.03		3
				0.25-5			0.015	2
	27* ²	0.125	0.25	0.125-2	0.015	0.125	0.008-0.125	9
	20	0.06	0.25	0.06-2.0	0.015	0.03	0.04-0.25	10
<i>Citrobacter spp.</i>	16	0.25	4	0.03-32	0.03	0.5	0.03-4	4
	28	0.12	1	0.03-4	0.03	0.12	0.03-0.25	7
<i>Enterobacter cloacae</i>	30	0.125	0.25	0.06-4	0.06	0.06	0.06->0.5	1
	24	0.25	0.25		0.03	0.06		3
	20* ²	0.25	0.5	0.06-1	0.06	0.25	0.008-0.25	9
	50	0.125	0.25	0.015-1.0	0.015	0.03	0.004-0.125	10
<i>Enterobacter aerogenes</i>	20	0.125	0.125	0.06-0.25	0.06	0.125	0.06-0.125	1
	24	0.25	0.5		0.06	0.06		3
	19* ²	0.25	0.5	0.06-4	0.03	0.06	0.008-0.25	9
	20	0.125	0.25	0.03-0.5	0.015	0.03	0.004-0.06	10
<i>Enterobacter agglomerans</i>	10	0.25	4.0		0.03	0.12		3

	15	0.06	0.25	0.008-1.0	0.015	0.06	0.004-0.25	10
<i>Enterobacter</i> spp.	18	0.5	1	0.03-4	0.015	0.25	0.015-0.25	2
	28	0.12	1	0.06-2	0.03	0.25	0.03-1	4
	30	0.25	0.25	0.06-4	0.03	0.03	0.03-0.25	7
	30	0.06	0.125	0.06-0.125	0.06	0.06	0.06	1
<i>Escherichia coli</i>	20	0.25	0.25	0.015-0.5	0.015	0.03	0.015-0.06	2
	34	0.12	0.25		0.03	0.06		3
	140	0.12	0.25	0.03-4	0.03	0.06	0.03-1	4
	49	0.06	0.12	0.03-0.25	0.03	0.03	0.03	7
	23* ²	0.125	0.5	0.008-0.5	0.15	0.03	0.008-0.25	9
	100	0.06	0.125	0.015-1.0	0.015	0.03	0.008-0.25	10
<i>Fusobacterium</i> spp.	30	1	4	0.125-8	0.5	4	0.125-8	5
	3	4	4	2-4	4	4	4	8
<i>Klebsiella oxytoca</i>	25* ²	0.125	0.5	0.125-1	0.015	0.06	0.015-0.25	9
	20	0.125	0.25	0.06-0.5	0.015	0.015	0.008-0.03	10
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	30	0.5	1.0	0.06-2	0.06	0.25	0.06-0.5	1
	34	0.25	0.5	0.06-4	0.06	0.12	0.03-1	4
	34* ²	0.5	2	0.125-2	0.06	0.25	0.015-0.5	9
	20	0.25	1.0	0.06-4.0	0.03	0.25	0.015-0.25	10
<i>Klebsiella</i> spp.	34	0.25	0.5		0.06	0.12		3
	25	0.25	0.5	0.03-2	0.06	0.25	0.015-0.25	2
	35	0.12	0.5	0.03-1	0.03	0.06	0.03-0.12	7
<i>Morganella morganii</i>	10	0.5	0.5	0.125->0.5	0.125	0.5	0.125-0.5	1
	14	1	2	0.12-2	0.06	0.5	0.015-0.5	2
	10	0.5	0.5		0.12	0.12		3
	12	0.5	1	0.25-2	0.06	0.25	0.03-1	4
	48	0.5	1	0.06-8	0.03	0.12	0.03-2	7
	28* ²	0.5	1	0.125-2	0.06	0.5	0.03-1	9
<i>Proteus mirabilis</i>	15	2	2	1-2	0.25	0.5	0.06-0.5	2
	26	0.5	1.0		0.12	0.25		3
	43	1	2	0.25-4	0.25	0.5	0.06-2	4
	30	1	1	0.25-4	0.12	0.25	0.03-0.25	7
	30* ²	1	2	1-8	0.125	0.5	0.125-4	9
	50	1.0	1.0	1.0	0.125	0.25	0.03-0.5	10
<i>Proteus vulgaris</i>	10	1.0	2	1.0-2	0.25	0.5	0.25-0.5	1
	16	1	2	0.25-4	0.12	0.25	0.03-0.5	2
	10	1.0	1.0		0.12	0.25		3
	33	0.5	1	0.03-1	0.03	0.06	0.03-0.06	7
	26* ²	0.5	2	0.25-8	0.06	0.5	0.03-2	9
	15	0.5	1.0	0.25-1.0	0.06	0.125	0.03-0.25	10
<i>Proteus</i> spp.	30	1.0	2	1.0-2	0.375	0.5	0.25-0.5	1
<i>Providencia rettgeri</i>	10	0.5	2.0		0.12	0.25		3
	19	1	2	0.12-2	0.12	0.12	0.03-0.12	7
	27* ²	1	4	0.05-8	0.25	1	0.06-2	9
<i>Providencia stuartii</i>	26	0.5	4.0		0.12	1.0		3
	30	0.25	1	0.03-4	0.03	0.06	0.03-1	7
	32* ²	1	8	0.25-64	1	4	0.06-8	9
<i>Providencia</i> spp.	15	1	2	0.25-2	0.06	0.5	0.03-0.5	2
	25	0.5	2	0.03-16	0.06	0.25	0.03-2	4
	23	0.5	2.0		0.12	0.25		3
	11	2	4	0.12-8	1	4	0.03-4	4
<i>Salmonella enteritidis</i>	34	0.5	1	0.03-2	0.03	0.06	0.015-0.12	2
	39* ²	0.25	0.5	0.125-0.5	0.03	0.06	0.015-0.125	9

<i>Salmonella</i> spp.	18	0.12	0.5	0.06-4	0.03	0.06	0.015-0.5	4
	28	0.125	0.25	0.125-1.0				6
	93	0.25	0.25	0.06-0.5	0.03	0.06	0.008-0.06	11
<i>Serratia marcescens</i>	20	0.5	32	0.5-2	0.125	0.5	0.06-4	1
	30	1	2	0.5-4	0.12	1	0.015-1	2
	35	1.0	2.0		0.25	0.25		3
	29	1	4	0.5-8	0.25	0.5	0.03-1	4
	29* ²	1	4	0.25-8	0.125	0.5	0.03-2	9
	50	1.0	2.0	0.06-4.0	0.125	0.25	0.015-0.5	10
<i>Shigella sonnei</i>	15	0.25	0.5	0.06-0.5	0.015	0.03	0.015-0.06	2
<i>Shigella</i> spp.	9	0.12	4	0.03-4	0.03	0.5	0.03-0.5	4
	20	0.06	0.125	0.015-0.25				6
	34* ²	0.125	0.5	0.06-2	0.015	0.06	0.015-0.5	9
	144	0.06	0.12	0.015-0.12	0.015	0.015	0.008-0.06	11
<i>Veillonella parvula</i>	2	1	2	1-2	0.5	1	0.5-1	8
<i>Yersinia enterocolitica</i>	17	0.03	0.125	0.025-0.25				6
	25* ²	0.06	0.25	0.015-1	0.07	0.125	0.008-0.5	9
	68	0.12	0.25	0.03-0.25	0.03	0.03	0.004-0.06	11
グラム陽性菌								
<i>Clostridium difficile</i>	4			4.0-8.0			4.0-8.0	3
	20	8.0	8.0	4.0-8.0				6
	4	4	8	4-8	4	4	4	8
<i>Clostridium</i> spp.	10* ³	1.0		0.12-8.0	1.0		0.12-4.0	3
	13	2	4	0.5-4	2	4	0.25-8	8
	24* ⁴	0.25	8	0.03-16	0.25	8	0.03-32	9
<i>Enterococcus</i> spp.	34	4	8	2-8	2	4	1-4	2
	16	4.0	8.0		4.0	8.0		3
	58	4	8	0.06-16	2	4	0.25-8	4
	29	4	8	2-8	2	2	0.5-2	7
<i>Eubacterium</i> spp.	33	2	8	0.125-32	1	8	0.125-16	5
<i>Peptococcus</i> spp.	64	4	16	0.125-32	2	8	0.125-16	5
	11	4	4	0.5-16	4	4	0.5-8	8
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	4			0.25-0.5			0.25-0.5	3
<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i>	4			2.0-8.0			2.0-8.0	3
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	40	2	16	0.125-16	2	8	0.125-8	5
	8	0.5	8	0.25-8	0.5	8	0.25-8	8
<i>Propionibacterium acnes</i>	14	2	4	2-4	2	4	2-16	8
<i>Propionibacterium granulosum</i>	6	2	2	2-2	2	16	2-16	8
<i>Staphylococcus aureus</i>	30	0.25	0.375	0.125-0.5	0.375	0.5	0.125-0.5	1
	18	0.5	1	0.12-1	0.5	0.5	0.12-0.5	2
	57	0.12	0.25		0.12	0.25		3
	70	0.25	0.25	0.12-8	0.25	0.25	0.06-4	4
	50	0.25	0.5	0.12-0.5	0.12	0.25	0.06-0.25	7
	35	0.125	0.25	0.03-2	0.125	0.25	0.03-0.5	9
	20	0.25	0.5	0.125-0.5	0.25	0.25	0.125-0.5	10
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10	0.5	0.5	0.25-1.0	0.5	0.5	0.125-1.0	1
	15	1	2	0.5-2	0.25	1	0.12-1	2
	43	0.25	1	0.12-4	0.25	0.5	0.03-4	4
	27	0.25	1	0.12-1	0.12	0.25	0.12-0.25	7
	35	0.25	0.5	0.125-8	0.25	0.5	0.06-8	9
	25	0.5	0.5	0.25-0.5	0.25	0.5	0.125-0.5	10
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	20	0.25	0.5	0.25-0.5	0.125	0.5	0.125-0.25	10
<i>Staphylococcus hominis</i>	20	0.5	0.5	0.125-1.0	0.25	0.5	0.125-0.5	10
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	45	1	1	0.25-1	0.25	0.25	0.12-0.5	7
<i>Streptococcus agalactiae</i>	20	1.0	2.0		1.0	2.0		3

	13	2	4	1-4	1	2	0.5-2	4
	22	4	4	2-4	1	2	1-2	7
	25	4.0	8.0	2.0-8.0	2.0	4.0	2.0-4.0	10
<i>Streptococcus bovis</i>	10	2	16	0.25-16	2	4	1-8	9
<i>Streptococcus faecalis</i>	30	4	8	2-8	4	8	1.0-8	1
	25	2.0	4.0		2.0	4.0		3
	24	1	2	0.25-4	1	2	0.5-2	9
	25	2.0	4.0	1.0-4.0	1.0	2.0	0.5-4.0	10
<i>Streptococcus faecium</i>	30	16	32	8-32	16	16	4-32	1
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	20	1.0	2.0		1.0	2.0		3
	33	1	2	1-2	0.5	0.5	0.25-0.5	7
	17	0.5	2	0.06-4	0.5	2	0.06-2	9
<i>Streptococcus pyogenes</i>	20	0.5	8.0		0.5	8.0		3
	13	1	2	0.25-8	0.5	2	0.25-4	4
	32	1	2	1-2	0.5	0.5	0.25-0.5	7
	16	1	2	0.25-8	0.5	2	0.06-4	9
	25	1.0	2.0	0.5-4.0	0.5	1.0	0.125-2.0	10
<i>Streptococcus spp.</i>	30	4	4	4-16	1.5	3	1.0-8	1
	37	1	4	0.125-16	1	4	0.125-8	5
Viridans Streptococci	20	2	6	2-8	1.5	2	0.5-2	1
	15	1	1	0.125-2	1	2	0.015-2	9

表中の太字はJECFA、VICH等でヒト腸内細菌叢として推奨されている細菌種

*1 *B. fragilis* を除く

*2 Ampicillin resistant

*3 *C. perfringens* (3), *C. bif fermentans* (2), *C. ramosum* (2), *C. sporogenes* 他2

*4 *C. difficile*, *C. perfringens*, *C. septicum*, *C. botulinum*, *C. butyricum*, *C. novyi*

これらの調査は $10^4 \sim 5 \times 10^5$ CFU/spotの菌濃度^{bb}で実施されたが、一部の菌種を用いた確認試験において $10^3 \sim 10^8$ CFU/spotにおいてもMICへの影響はほとんど認められなかったと報告されている(論文5,7)。

調査された菌種のうち、最も低いMIC₅₀が報告されているのは *Escherichia coli* の 0.06μg/mL であった。次いで *Yersinia enterocolitica* の 0.03μg/mL、*Shigella spp.* の 0.06μg/mL であった。ヒト腸内で優勢と考えられる菌種で最も低いMIC₅₀を示したのは *Peptostreptococcus spp.*、~~*Bacteroides spp.*~~、~~*Clostridium spp.*~~、~~*Fusobacterium spp.*~~ でいずれも ± 0.5 μg/mL であった。

また、ほとんど全ての菌種に対して、ジフロキサシンの代謝物であるサラフロキサシンがジフロキサシンよりも低いMIC₅₀を示した。

これらの報告では、通例腸内細菌叢への影響を検討する際に考慮することが推奨される菌種のうち *Bifidobacterium*、*Lactobacillus* の知見が得られなかった。

その他のヒト病原細菌に対する最小発育阻止濃度 (MIC)

一般的に腸内細菌叢を構成しないが、ヒトの疾病に関係する細菌について臨床分離株に対するジフロキサシン及びサラフロキサシンのMIC₅₀が複数の公表論文で報告されている。その概要は次の通りであった。

菌名	株数	最小発育阻止濃度 (μg/mL)		出典等
		Difloxacin	Sarafloxacin	

^{bb} 論文8は未記載

		MIC ₅₀	MIC ₉₀	範囲	MIC ₅₀	MIC ₉₀	範囲	
グラム陰性菌								
<i>Acinetobacter anitratus</i>	10	0.125	0.5	0.06-0.5	0.5	0.5	0.06-0.5	1
	36**	0.06	0.25	0.008-1	0.125	0.5	0.015-1	9
	40	0.06	0.125	0.008-0.25	0.06	0.25	0.03-0.25	10
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	35	0.12	0.25	0.06-0.25	0.06	0.12	0.03-0.25	7
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	40	0.03	0.125	0.008-0.25	0.06	0.125	0.015-0.25	10
<i>Acinetobacter</i> spp.	7		0.5	0.015-0.5		0.25	0.015-0.25	2
	17	0.12	0.5		0.12	1.0		3
	13	0.12	2	0.06-4	0.12	0.5	0.06-0.5	4
<i>Aeromonas hydrophila</i>	3			0.12-0.5			0.06	2
	13**	0.06	0.125	0.03-0.25	0.008	0.015	0.008-0.03	9
	15	0.06	0.25	0.03-1.0	0.03	0.06	0.004-0.5	10
<i>Aeromonas</i> spp.	6			0.06-0.125			0.06	1
<i>Branhamella catarrhalis</i> (<i>Moraxella catarrhalis</i>)	10	0.03	0.03		0.03	0.03		3
	12	0.06	0.25	0.06-2	0.03	0.5	0.03-1	9
<i>Gardnerella vaginalis</i>	20	4	8	2-8	4	8	4-8	20
<i>Haemophilus influenzae</i>	40	0.015	0.015		0.015	0.015		3
	21	0.12	0.12	0.03-0.12	0.12	0.12	0.03-0.12	4
	30	0.03	0.03	0.03-0.12	0.03	0.03	0.03	7
	20	0.004	0.004	0.004-0.008	0.004	0.004	0.004-0.008	10
<i>Haemophilus ducreyi</i>	10	0.03	0.12	0.03-0.12	0.03	0.12	0.03-0.25	20
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	58	0.03	0.06		0.015	0.03		3
	8	0.015	0.5	0.007-0.5	0.015	0.5	0.015-0.5	4
	31	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	7
	28	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	9
	25	0.007	0.03	0.003-0.06	0.003	0.015	0.0015-0.03	20
<i>Neisseria meningitidis</i>	19	0.015	0.015		0.015	0.015		3
	5			0.008-0.015			0.008-0.015	9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12	1	4	0.5-8	0.25	0.5	0.06-1	2
	70	2.0	8.0		0.5	2.0		3
	53	2	4	0.03-16	0.25	1	0.03-2	4
	88	1	2	0.12-16	0.12	0.25	0.03-0.5	7
	48**	2	8	0.25->32	1	2	0.125-16	9
	100	2.0	8.0	1.0-32.0	1.0	2.0	0.25-8.0	10
<i>Pseudomonas cepacia</i>	20**	1	8	0.03-32	0.5	8	0.03-16	9
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	8	1.0	4.0	1.0-4.0	0.125	1.0	0.06-1.0	10
<i>Pseudomonas maltophilia</i>	19**	1	4	0.5-4	1	2	0.06-4	9
	38	1.0	8.0	0.25-16.0	1.0	2.0	0.125-4.0	10
<i>Pseudomonas maltophilia</i> / <i>cepacia</i>	14	2.0	8.0		2.0	8.0		3
<i>Pseudomonas putida</i>	17	1.0	4.0	0.25-4.0	0.25	0.5	0.03-1.0	10
<i>Pseudomonas</i> spp.	30	2	4	1.0-8	1.25	4.5	0.25-16	1
	23	0.5	2.0		0.12	0.25		3
	11	2	4	0.12-8	1	4	0.03-4	4
	31	2	4	0.12->128	0.12	0.25	0.03-4	7
	22	2	4	0.5-4	1	0.5	0.06-8	9
<i>Vibrio cholerae</i>	34	0.06	0.5	0.06-1	0.004	0.004	0.004-0.25	11
<i>Vibrio</i> spp.	10	0.125	0.125	0.008-0.125				6
グラム陽性菌								
<i>Actinomyces</i> spp.	14	2	4	0.125-8	1	8	0.125-16	5
<i>Bacillus cereus</i>	17	0.125	0.25	0.06-0.25	0.125	0.25	0.015-0.25	10
<i>Corynebacterium JK</i> spp.	10	1	2	1-2	1	2	1-2	9

<i>Listeria monocytogenes</i>	10	2	2	2-4	2	2	2	1
	30	1	2	0.5-4	0.5	1	0.5-2	9
	12	1.0	1.0	1.0-2.0	0.5	0.5	0.5-1.0	10
マイコプラズマ								
<i>Mycoplasma hominis</i>	44	1.0	1.0	0.25-1.0				21
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	11	12.5	25	0.2-25	12.5	12.5	3.1-12.5	20
	29	1	2	0.5-2.0				21

**Ampicillin resistant

これらの細菌種についても基本的にサラフロキサシンがより低いMICを示した。

特定菌株に対する最小発育阻止濃度 (MIC) (申請書概要)

その他、菌株毎のMIC₅₀が報告されている。その概要は次の通りであった。

供試菌	株名	ジフロキサシン	サラフロキサシン
グラム陰性菌			
<i>Citrobacter freundii</i>	TL-12	3.13	0.39
	TU-971	6.25	0.78
	GN-346	0.2	0.025
<i>Enterobacter cloacae</i>	TL-14	0.78	0.1
	TU-680	0.2	0.05
<i>Escherichia coli</i>	NIHJ JC-2	0.39	0.05
	1346	0.2	0.025
	ML-1410 RGN-823	12.5	1.56
	ML-1410 RGN-238	12.5	1.56
	KC-14	0.1	0.025
	ATCC 27166	0.006	0.006
<i>Klebsiella oxytoca</i>	5075	0.2	0.025
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PCI-602	0.78	0.1
	5038	0.39	0.1
<i>Morganella morganii</i>	0068	3.13	0.78
	Kono	0.78	0.1
	6501	0.78	0.1
<i>Proteus mirabilis</i>	TU-1698	0.78	0.2
<i>Proteus vulgaris</i>	IID-874	0.78	0.1
	6064	0.78	0.2
	6028	0.78	0.1
	GN76/c-1	0.78	0.1
<i>Providencia rettgeri</i>	6256	0.39	0.1
	6259	0.78	0.2
<i>Providencia stuartii</i>	6761	0.006	0.006
	6764	0.39	0.1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PI-67	0.78	0.1

	TU-408	0.78	0.39
	No.12	1.56	0.2
	35 R	3.13	0.78
	4096	3.13	0.78
	4098	0.78	0.1
<i>Salmonella typhi</i>	T-58	0.39	0.05
<i>Salmonella typhimurium</i>		0.39	0.05
<i>Serratia marcescens</i>	7006	3.13	0.39
	OU-29	1.56	0.39
<i>Shigella sonnei</i>		0.2	0.05
グラム陽性菌			
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	0.1	0.05
<i>Enterococcus faecalis</i>	CN-478	3.13	1.56
<i>Staphylococcus aureus</i>	209P JC-1	0.39	0.1
	Terajima	0.78	0.39
	Smith	0.2	0.1
	252R	0.39	0.2
	199R	0.2	0.2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Kawamura	0.2	0.2

報告された細菌種のほとんど全てでサラフロキサシンがより低いMICを示した。

pH による MIC の変化

異なる pH 条件下におけるジフロキサシン、サラフロキサシンの MIC₅₀ の変動が公表論文で報告されている。*Enterobacteriaceae* 26 菌株 (*E. coli*(7)、*Enterobacter*(3)、*Klebsiella*(3)、*Serratia*(3)、*Citrobacter*(2)、*Morganella*(2)、*Proteus*(3)、*Providencia*(3)) の pH8.0 における MIC(幾何学平均)は 1.3(pH6.5 では 0.29)であった。*Pseudomonas aeruginosa*(8 菌株)、Gram-positive cocci(13 菌株)の MIC はいずれも *Enterobacteriaceae* より大きかった。サラフロキサシンでは pH による変動は小さかったが、*Enterobacteriaceae* ではむしろ高 pH において 3 倍程度低い MIC(幾何学平均)を示した(論文4)。また、腸内細菌 60 菌株について、pH6.8、7.4、8.0 において生育阻害の変動が調べられている。*E. coli*、*Enterobacter*、*Klebsiella*、*Morganella morganii*、*Proteus mirabilis*、*Providencia stuartii* それぞれ 10 菌株の合計 60 菌株においては、0.5μg/mL で約半数(47%)の生育阻害が認められた(pH6.8 では 0.06μg/mL で 43%)。*Pseudomonas aeruginosa*、*Acinetobacter calcoaceticus*、*Staphylococcus aureus*、*Staphylococcus epidermidis* (それぞれ 10 菌株)においても pH の増加に伴って抗菌活性は減弱したが、*Staphylococci* では 0.5 で 75%の生育阻害(0.25 は 10%)、他は 1 で 50%の生育阻害であった。(論文7)。

一方、*Bacteroides fragilis*(6 菌株)、*Bacteroides* spp.(7 菌株)、*Fusobacterium* spp.(2 菌株)、*Clostridium* spp.(4 菌株)、*Peptococcus / Peptostreptococcus* spp.(5 菌株)については pH による MIC(幾何学平均)の変化はほとんど見られないが *Bacteroides* ではむしろ低下した。(論文8、5)

【耐性の出現について】

Rapid Selection による MIC の上昇

MIC の 1/2 に相当する濃度の抗生物質を含む平板培地に細菌を接種し、選択された菌をその 2 倍量の抗生物質を含む平板培地に接種してさらに選択する操作を繰り返すことにより、より高い MIC₅₀ を有する菌群を選択できることが報告されている。ジフロキサシンを用いて 7 菌種(*Enterobacter aerogenes*、*Escherichia coli*、*Klebsiella pneumoniae*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Serratia marcescens*、*Staphylococcus aureus*、*Streptococcus faecalis*)について 128μg/mL を上限として、菌の生育が認められなくなるまでこの操作を行ったところ、全ての菌で MIC の上昇が認められた。当初の MIC が最も低かった *Escherichia coli* では最大 2.3μg/mL(0.08→)、*Streptococcus faecalis* では 97μg/mL(4.6→)まで MIC(5 菌株の幾何学平均値)が上昇した菌株が得られた。*Enterobacter aerogenes* の 1 菌株と *Serratia marcescens* の 2 菌株では 128μg/mL の濃度でも菌の生育が認められた。(論文 1)

高濃度薬剤存在培地における耐性獲得頻度

MIC の 8 倍のジフロキサシンあるいはサラフロキサシンを含む培地に 5 菌種(*Enterobacter cloacae*、*Escherichia coli*、*Klebsiella pneumoniae*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Staphylococcus aureus*)を接種した時の耐性菌の出現頻度はジフロキサシンで 3×10^{-7} (*E. cloacae*) ~ $< 3.8 \times 10^{-9}$ (*P. aeruginosa*)、サラフロキサシンで 8.9×10^{-8} (*K. pneumoniae*) ~ $< 3.8 \times 10^{-9}$ (*P. aeruginosa*)であった。10μg/mL の濃度では、*E. cloacae* を除き、ジフロキサシンの耐性菌は検出できず、サラフロキサシンでは耐性菌は検出できなかつたとされている(論文 1)。

MIC の 4 倍または 8 倍のジフロキサシンあるいはサラフロキサシンを含む培地に 3 菌種(*Escherichia coli*、*Klebsiella pneumoniae*、*Pseudomonas aeruginosa*)を接種した時の耐性菌の出現頻度は 4 倍のジフロキサシンで 9×10^{-9} (*K. pneumoniae*) ~ 3×10^{-9} (他 2 菌種)、サラフロキサシンで 7×10^{-9} (*E. coli*) ~ 2×10^{-9} (*K. pneumoniae*)であった。8 倍の濃度では、*K. pneumoniae* を除き、ジフロキサシンの耐性菌は検出できず、サラフロキサシンでは耐性菌は検出できなかつたとされている(論文 3)。

MIC の 8 倍のジフロキサシンあるいはサラフロキサシンを含む培地に 7 菌種(*Enterobacter aerogenes*、*Escherichia coli*、*Klebsiella pneumoniae*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Staphylococcus aureus*、*Providencia stuartii*、*Serratia marcescens*)を接種した時の耐性菌の出現頻度はジフロキサシンで $< 8.5 \times 10^{-9}$ (*S. marcescens*) ~ $< 1.9 \times 10^{-9}$ (*P. stuartii*)、サラフロキサシンで 4.3×10^{-9} (*S. marcescens*) ~ $< 3.7 \times 10^{-9}$ (*K. pneumoniae*)であった。(論文 10)。

(7)ヒトにおける知見について

【ヒトにおけるキノロンの毒性影響】(グッドマンギルマン;薬理学、抗菌薬使用の手引き)

ジフロキサシンのヒト臨床における使用歴はないが、同系統に属するキノロン類あるいはフルオロキノロン類の抗生物質は広くヒト臨床において利用されている。

臨床で認められた副作用で最も一般的なものは消化器系への影響で、悪心、嘔吐等であるが下痢や抗生物質に起因する大腸炎はまれであるとされている。その他、中枢神経系に関連するものとして頭痛、めまい、消炎薬との併用で痙攣、アレルギー反応に関連するものとして発疹や光過敏症があるとされる。この系統の薬剤による副作用に特徴的なものとして、特に未成熟な動物における関節痛や関節膨脹等の関節障害、一部では光毒性に由来する光過敏症がある。

【薬剤耐性菌について】

ジフロキサシンはヒト臨床において使用されていないが、ヒト臨床で使用されているフルオロキノロンとは明らかに交差する。

3. 食品健康影響評価について

【眼に関する知見について】

投与後 3 時間時点におけるジフロキサシンの眼中濃度は Sprague-Dawley 系ラット(アルビノ)と比較して Long-Evans ラットにおいて 30 倍の高値を示し、メラニン色素に富む組織に対してジフロキサシンあるいはその代謝物の親和性が高いのではないかと推測されている。また、イヌの眼組織において房水、硝子体液、水晶体及び角膜と比較して、網膜やブドウ膜といったメラニン色素顆粒層に富む組織では高いことが確認されている。

亜急性及び慢性毒性試験において眼検査が実施され、ほとんどの試験で異常は認められないとされているものの、イヌの亜急性毒性において網膜電位図に軽度の一過性の変化が認められ、網膜光受容体細胞に対する薬剤の影響であると報告されている。この所見について報告書では変化が微小であること、投薬終了後には回復したことから、最終的に異常はないとされているが、調査会においては治療における暴露(一時的)と摂食による慢性暴露の違い、網膜電位図が網膜の傷害に対する鋭敏な指標であることを考慮して、これを毒性と判断した。眼毒性に対する NOAEL は 5mg/kg 体重/日であった。

【繁殖毒性及び催奇形性について】

繁殖毒性及び催奇形性については、ラットの 3 世代繁殖試験、ラットの催奇形性、ラットの受胎能及び一般生殖能試験、ウサギの催奇形性試験が実施されている。ラット、ウサギとも催奇形性は認められなかった。

【遺伝毒性/発がん性について】

遺伝毒性試験については、*in vitro* の染色体異常試験、ほ乳類培養細胞を用いた前進突然変異試験のいずれも代謝活性化の有無にかかわらず陰性を示した。一方、UDS 試験では 101µg/mL 以上の用量で陽性所見がみられた。*in vitro* の UDS については、キノロン系の抗生物質でしばしば陽性が認められており、ジフロキサシンの代謝物であるサラフロキサシンにおいても陽性所見が得られている。代謝物であるサラフロキサシンについては、*in vivo* / *in vitro* のラット肝細胞における UDS 試験で陰性であり、*in vitro* で認められた遺伝毒性が *in vivo* で発現する可能性は低いものと考えられている。

ジフロキサシンの *in vitro* の UDS における陽性所見については、用量相関性が認められており、薬理作用と関連があるものと考えられることから、これを否定することはできない。しかしながら、マウスにおける 2 年間の発がん試験、ラットにおける 2 年間慢性毒性/発がん性併合試験のいずれにおいてもがん原性は認められなかったことから、生体において問題となる遺伝毒性発がん性を示さないものと考えられる。サラフロキサシンについては、マウスとラットにおいて発がん性試験が実施されており、いずれもがん原性は認められなかったとされている。

【光毒性について】

1990 年代後半からフルオロキノロン剤について光毒性/光遺伝毒性があることが報告されてきており、そのメカニズムについて光照射によって活性化された分子の DNA との直接作用、光照射によって

生じた活性酸素やフリーラジカルの生成による二次的傷害が提案されている。フルオロキノロン剤の光毒性や光遺伝毒性についてはいくつかの報告があり、構造的に8位にハロゲン置換基を有するフルオロキノロン剤が明らかに強い光毒性を示すこと(論文 20)、1位の置換基の種類によっては光毒性が減弱することが報告されている(論文 21)。ジフロキサシンについて直接のデータは得られていないが、構造的に8位にハロゲン置換基を有さないことから光毒性が強い部類には入らないものと推定される。1位の置換基はモノフルオロベンゾ基で、ジフルオロベンゾ基については減弱効果があると報告されているものの、モノフルオロベンゾ基の減弱効果については不明である。

【毒性学的影響のエンドポイントについて】

毒性学的影響について最も低い用量で被験物質投与の影響が認められたと考えられる指標は、イヌの13週間の亜急性毒性試験の跛行検査において雌雄各1例で認められた両側性で軽度な手根関節平坦化であり、NOAELは1.0mg/kg体重/日であった。

【微生物学的影響のエンドポイントについて】

微生物学的影響の評価については、ヒトの腸内細菌叢への影響を十分に反映できる単独の試験法が確立されていない現状を考慮すると、得られている知見のうち最も適切と考えられるものを用いて微生物学的ADIを設定する手法が妥当であると考えられる。ジフロキサシンについて現時点で利用可能なものは *in vitro* のMIC₅₀のみであった。

ヒトの腸内細菌叢は極めて多数の細菌種から構成されているが、その大部分は *Bacteroides*、*Bifidobacterium*、*Clostridium*、*Eubacterium*、*Fusobacterium*、*Lactobacillus*、*Peptococcus* / *Peptostreptococcus*、*Enterococcus*、*E. coli* であり、一般的に腸内細菌叢のかく乱によるコロニー形成耐性破壊を評価するに際してMIC₅₀を用いる場合、これらの細菌種が用いられてきている。腸内細菌叢のかく乱によるコロニー形成耐性破壊は、食品を通じて抗生物質がヒト腸内に達し、その抗菌活性によって腸内細菌叢が変化することにより病原細菌の腸内定着・増殖することをハザードとするものであることから、基本的にこれら優勢な細菌種をもって評価に用いるのが妥当であると考えられる。ジフロキサシンについては、ヒト腸内に生息する可能性がある細菌のヒト臨床分離株について、公表論文から22種4538菌株のMIC₅₀の情報が得られている。

単純に最も感受性が高かった細菌種は *Yersinia enterocolitica* であり、そのMIC₅₀値は0.03 µg/mLであったが、上記にもある通り、腸内細菌叢のかく乱によるコロニー形成耐性破壊は、むしろこれらの病原細菌の腸内定着・増殖が容易になる恐れをハザードとするものであり、指標細菌としては適切でないと考えられる。一般的に腸内細菌叢を構成すると考えられる菌種についてのMIC₅₀(µg/mL)は *Bacteroides* が1、*Clostridium* が0.25、*Eubacterium* が2、*Fusobacterium* が1、*Peptococcus* が4、*Peptostreptococcus* が0.5、*Enterococcus* が4で、*E. coli* は0.06、*Bifidobacterium*、*Lactobacillus* についてはデータが得られなかった。最も低いMIC₅₀が報告されたのは *E. coli* であったが、*E. coli* についてはヒト腸内細菌の総細菌数に占める割合はごくわずか(1%程度)で、腸内細菌叢かく乱に対する寄与率は軽微であること、一般的に高度に感受性か非感受性であることが多いことから、単独で微生物学的ADIの評価に用いるMIC₅₀として採用するべきではないとされている(52thJECFA、EMEA)。ジフロキサシンについてもこの傾向は同様であり、この値を評価に採用するのは適当でないと考えられる。次に感受性が高かったのは *Clostridium* spp. の0.25µg/mLであるが、*C. difficile* や *C. botulinum* 等の病原菌を含んだ知見であった。指標として適当と考えられる細菌種の中で、最も感受性が高かったのは *Peptostreptococcus* における0.5µg/mLであった。*Bifidobacterium*、*Lactobacillus* についてはデータが得られなかったが、サラフロキサシンの *Bifidobacterium* に対するMIC₅₀として8µg/mLの報告があり(JECFA)、*Lactobacillus* についてはCiprofloxacinで8µg/mL、Levofloxacinで4µg/mLの報告がある(論文

22). 抗菌活性の強弱はあるものの、サラフロキサシンやシプロフロキサシンとジフロキサシンの抗菌スペクトルは類似しており、一般にジフロキサシンの抗菌活性はこれらと同程度かむしろ弱いことから、ジフロキサシンがこれらの菌種について特に強い抗菌活性を示すという可能性は低いものと考えられる。

ジフロキサシンの *Peptostreptococcus* における MIC₅₀ の 0.5µg/mL は 8 菌株についてのものであり、他の 40 菌株を用いた報告では 2µg/mL が得られている。これらの差は、出典ごとの変動が 8 倍以上を有意な変動とする NCCLS の解釈からは一つの知見としてまとめることも可能な範囲であるが、個別のデータは得られていない。また、pH7.1 の培地が使用されているが、*Peptococcus /Peptostreptococcus* 5 菌株について pH7.3 と 8.1 における MIC の幾何学平均はほとんど変化していなかった。ジフロキサシンの代謝物であるサラフロキサシンについては、ジフロキサシンと同様に *Peptostreptococcus* が最も感受性の高い細菌種として特定されている。MIC₅₀ については 3 菌株の知見から 0.125µg/mL と報告されており、今回報告されているジフロキサシンの MIC₅₀ との差は 4 倍であったが、サラフロキサシンの存在比はヒトにおける直接の知見は得られていないものの、齧歯類、イヌ、ブタとも多くて 10% 程度と推定される。

これらのことから、現時点においてはジフロキサシンの微生物学的 ADI の算出に当たっては、*Peptostreptococcus* 8 菌株おける MIC₅₀ の 0.5µg/mL を採用することが適当であると判断された。

なお、ニューキノロンはナリジクス酸等のオールドキノロンと比較して耐性を付与しにくいとされているが、耐性菌が出現する可能性は否定できない。この問題についての定性あるいは定量的評価には、別途のリスク評価が必要であると考えられるが、キノロン剤のヒト医療上における重要性は明らかである。本剤は治療薬で限定された条件下でのみ使用されることが前提となっていることから、現状においては“prudent use” が重要であり、さらに、一般的なと畜、食肉の衛生管理の徹底により耐性菌がフードチェーンに侵入する機会を排除する努力が必要と考えられる。これらの状況についてサーベイランスあるいはモニタリングを行い、評価に資するべきであろう。

【一日摂取許容量(ADI)の設定について】

ジフロキサシンについては、遺伝毒性発がん性を示さないと考えられることから、ADI を設定することが可能である。

毒性学的影響について最も低い用量で被験物質投与の影響が認められたと考えられる指標は、イヌを用いた 3 ヶ月間亜急性毒性試験における NOAEL 1 mg/kg 体重/日であった。この知見から ADI を設定するにあたっては、種差 10、個体差 10 の安全係数 100 を考慮し、毒性学的データからは ADI は 0.01 mg/kg 体重/日と設定される。

一方、微生物学的影響について現時点で利用可能なものは *in vitro* の MIC₅₀ のみであった。

結腸内容物に 220g、腸管吸収率細菌が暴露される分画に 70% (尿中回収率より推測)、8 菌株についての知見であること、糞便中で一部がサラフロキサシンに代謝されることを考慮して安全係数に 2、ヒト体重に 60kg を適用すると、

$$\text{ADI (mg/kg 体重/日)} = \frac{0.0005 \text{ (mg/mL)} \times 220 \text{ (g)}}{0.7 \times 2 \times 60 \text{ (kg)}} = 0.0013 \text{ mg/kg 体重/日}$$

となる。

毒性学的データから導かれる ADI と微生物学的データから導かれる ADI を比較すると、微生物学的データから導かれた値がより小さくなり、感受性が高いと考えられる。また、サラフロキサシンの ADI が 2 桁で表されていることを考慮して、ジフロキサシンの残留基準を設定するに際しての

ADI としては、0.0013 mg/kg 体重/日と設定することが適当であると考えられる。

【食品健康影響評価について】

以上より、ジフロキサシンの食品健康影響評価については、ADI として次の値を採用することが適当と考えられる。

ジフロキサシン 0.0013 mg/kg 体重/日

< 出 典 >

- (1) ベテキノン可溶散25% 再審査申請書(未公表)
- (2) 塩酸ジフロキサシン 再審査申請書(未公表)
- (3) DIFLOXACIN SUMMARY REPORT ;EMEA
- (4) DIFLOXACIN SUMMARY REPORT(2) ;EMEA
- (5) DIFLOXACIN(extension to swine and cattle) SUMMARY REPORT ;EMEA
- (6) DIFLOXACIN SUMMARY REPORT(4) ;EMEA
- (7) DIFLOXACIN SUMMARY REPORT(5) ;EMEA
- (8) ベテキノン可溶散 25%再審査申請書添付資料:効能又は効果及び安全性についての調査資料(未公表)