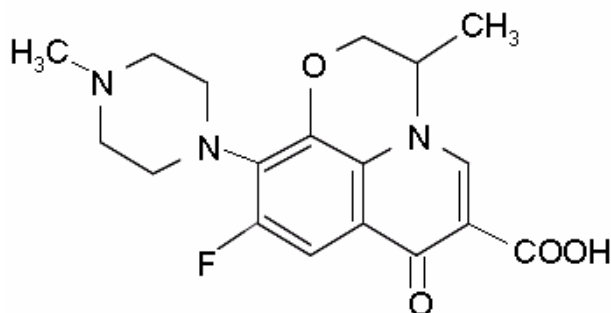


オフロキサシンの食品健康影響評価について(案)

1. 薬剤の概要

(1) 物質名^{(1),(2)}

オフロキサシン(Ofloxacin)



分子式 : $C_{18}H_{20}FN_3O_4$

分子量 : 361.37

常温における性状 : 帯微黄白色～淡黄白色の結晶または結晶性粉末

融点 : 260～270 (分解)

溶解度 : 2 g/L (20)

蒸気圧 : nonvolatile

(2) 効能・効果

オ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)。オフロキサシンは2つの光学異性体のラセミ体であるが、(S)-(-)-アイソマーが(R)-(+)-アイソマーと比較してより強い抗菌活性を示し、オフロキサシンが示す抗菌活性の主要をなすことが明らかになっている。現在、(S)-(-)-アイソマーは単独でレボフロキサシン(Levofloxacin)として利用されている。

(3) その他

オフロキサシンを主剤とする動物用医薬品は、国内では鶏の呼吸器性マイコプラズマ病、大腸菌症を対象に使用されている。欧州、米国では食用動物に対しては使用されていない。また、オフロキサシン及びレボフロキサシンはヒト臨床において上・下気道感染症や尿路感染症の治療薬として使用されている。

^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。

2. 毒性試験の概要

2-1. 吸収・分布・代謝・排泄

【マウスにおける単回投与試験】(追加資料10、論文5)

ICR系マウス(雄5匹)におけるオフロキサシン(5mg/kg体重)の単回強制経口投与において、 T_{max} は0.5時間以内であり、その時の C_{max} は約1.3 $\mu\text{g/ml}$ であった。 $T_{1/2}$ (相)は1.0時間であった。(追10)

ICR系マウス(雄最低8匹/群)にオフロキサシン40mg/kgを経口あるいは筋肉内投与し、最長180分までの血液を経時的に採取した。 C_{max} は経口投与で14.5 $\mu\text{g/mL}$ 、筋肉内投与で16.8 $\mu\text{g/mL}$ 、 $T_{1/2}$ (相)はそれぞれ46と45分、AUCは15.1と23.5 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ で生物学的利用率は64%であった。また、24時間までの尿から経口投与で39.5%、筋肉内投与で35.1%が回収された。(論文5)

【ラットにおける単回投与試験】(追加資料10)

Wistar系ラット(5匹;性別不明)におけるオフロキサシン(5mg/kg体重)の単回強制経口投与において、 T_{max} は0.5時間以内であり、その時の C_{max} は約1.7 $\mu\text{g/ml}$ であった。 $T_{1/2}$ (相)は1.8時間であった。

Wistar系ラット(3匹;性別不明)にオフロキサシン(10mg/kg体重)を単回強制経口投与し、投与0.5, 1, 2時間後の血清中及び各組織中濃度が測定された。心臓、肝臓、腎臓、脾臓、筋肉、小腸のいずれにおいても血清中より高い濃度が検出されたが、特に肝臓、腎臓、小腸で高く認められた。しかしながら、いずれの器官においても経時的な減少傾向を示し、蓄積性は認められなかった。脳からはほとんど検出されなかった。

【イヌにおける単回投与試験】(論文6)

雄ビーグル犬(各3頭群)におけるオフロキサシン(5, 10, 20mg/kg体重)の7日間の反復強制経口投与において、投与初日と7日目の T_{max} 、 C_{max} 、 $T_{1/2}$ (相)に差は認められなかった。

投与初日の T_{max} は用量順に1.7, 1.0, 1.7時間、その時の C_{max} は約3.4, 6.8, 12.1 $\mu\text{g/mL}$ 、 $T_{1/2}$ (相)は5.2, 4.3, 4.8時間であった。投与7日目の T_{max} は用量順に2.0, 1.0, 2.0時間、その時の C_{max} は約3.3, 6.0, 11.5 $\mu\text{g/mL}$ 、 $T_{1/2}$ (相)は5.2, 4.7, 4.5時間であった。

【鶏における単回投与試験】(資料10-1)

ブロイラー(雄5羽群)にオフロキサシン(12.5, 25, 50mg/kg体重)を単回強制経口投与し、0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24時間後の血清中薬物濃度の消長が測定されている。 T_{max} は投与量順に1, 1.6, 2.4時間であり、その時の C_{max} は5.8, 8.5, 12.9 $\mu\text{g/mL}$ 、 $T_{1/2}$ (相)は1.73, 2.47, 2.58時間であった。いずれも24時間後には検出限界未満(0.8ppm)となった。

雄ブロイラーにオフロキサシン25mg/kg体重を単回強制経口投与し、1, 2, 4, 6, 8, 12, 24時間後に5羽ずつを用いて組織中薬物濃度の消長が測定されている。各組織の T_{max} は筋肉が2時間、腎臓、肝臓、脾臓、肺、心臓は1時間で、 C_{max} は順に9.4, 44.7, 37.6, 10.7, 8.8, 6.9 $\mu\text{g/g}$ 、 $T_{1/2}$ (相)は順に1.35, 2.11, 1.82, 1.85, 1.28, 1.75時間であった。いずれも24時間後には検出限界未満となった。

採卵用SPF鶏ラインS(雄3羽)にオフロキサシン100mg/kg体重を強制経口投与し、24時間までの尿を採取した^c。TLCでは未変化体、N-脱メチル化体の2スポットが認められた。HPLCを用いた定量による未変化

^c 総排泄腔から尿のみ排泄されるよう処置

体:N-脱メチル化体比は最大でも 1:0.0044 であった。

【ヒトボランティアにおける投与試験】(論文1,2,3,4)

6名の健常ボランティア(女性5、男性1)に200mgのオフロキサシンを12時間間隔で1日2回を3.5日間(合計7回)経口投与し、投与前及び最終投与後0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 6, 12, 27, 36時間後に血液が採取された。本試験における T_{max} は1.9時間(0.5-3.0時間)、その時の C_{max} は2.96 $\mu\text{g/mL}$ (2.17-4.01 $\mu\text{g/mL}$)、 $T_{1/2}$ (相)は6.6時間(6.5-7.0時間)であった。(論文1)

14名の男性健常ボランティアに400mgのオフロキサシンを12時間間隔で1日2回を3.5日間(合計7回)経口投与し、1及び7回目の投与の際に投与前及び投与後0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 6, 12時間後の血液を採取した。7回目についてはさらに投与後16, 20, 24, 28及び32時間後の血液も採取した。初回投与後における T_{max} は1.5時間、その時の C_{max} は4.5 $\mu\text{g/mL}$ 、 $T_{1/2}$ (相)は4.6時間、7回目の投与後における T_{max} は1.8時間、その時の C_{max} は6.5 $\mu\text{g/mL}$ 、 $T_{1/2}$ (相)は6.5時間であった。(論文2)

6名の健常ボランティアに600mgのオフロキサシンを単回経口投与したときの T_{max} は1.2時間、その時の C_{max} は10.7 $\mu\text{g/mL}$ 、 $T_{1/2}$ (相)は7時間であった。また、48時間までに80.3%が尿中に排泄された。(論文3)

10名の健常ボランティア(男女各5名)に100あるいは200mgのオフロキサシンを静脈内投与したときの $T_{1/2}$ (相)はそれぞれ約4.5、4.2時間でAUCは7.3、14.4 $\text{mg}\cdot\text{h/L}$ であった。また、24時間までに73.1、77.0%が尿中に排泄された。同じボランティアに200あるいは400mgのオフロキサシンを経口投与したときの T_{max} はそれぞれ約1.3、1.9時間、その時の C_{max} は2.19、3.51 $\mu\text{g/mL}$ 、 $T_{1/2}$ (相)は約5.6、4.9時間で、AUCは14.6、28.0 $\text{mg}\cdot\text{h/L}$ であった。また、24時間までに73.6、73.3%が尿中に排泄された。経口及び静脈投与時のAUCの比較からオフロキサシンの生物学的利用率は極めて高いと考えられた。代謝物について、200mgを経口、静脈内投与したときの尿を分析したところ、未変化体が73.6、77.0%、脱メチル化体が3.0、3.2%、N-オキサイドが1.0、1.1%であった。その他グルクロン酸抱合体が胆汁あるいは糞中に3.9%認められたと報告されている。(論文4)

2-2.毒性試験

(1)急性毒性試験(資料4-1, 4-2, 論文7)

オフロキサシンの経口投与による LD_{50} はマウス(Std:ddY系)の雌で5290 mg/kg 体重、雄で5450 mg/kg 体重、ラット(Wistar系)の雌で3750 mg/kg 体重、雄で3590 mg/kg 体重、イヌ(ビーグル)では雌雄とも $>200\text{mg}^d$ 、リスザルの雄で500-1000 mg/kg^e であった。静脈内投与では、マウス(Std:ddy系)の雌で233 mg/kg 体重、雄で208 mg/kg 体重、ラット(Wistar系)の雌で276 mg/kg 体重、雄で273 mg/kg 体重、イヌ(ビーグル)では雌雄とも $>70\text{mg}^f$ であった。皮下投与ではマウス(Std:ddy系)では雌雄とも $>10000\text{mg/kg}$ 体重、ラット(Wistar系)の雌で9000 mg/kg 体重、雄で7070 mg/kg 体重であった^g。(資料4-1)

また、主要代謝物であるN-脱メチル体をマウス(Slc:ddY)に静脈投与した場合の LD_{50} は雌で40.2 mg/kg 体重、雄で38.5 mg/kg 体重で未変化体より強い急性毒性を示した。(資料4-2)

^d 200, 400mgの2用量について実施し、死亡は認められなかったが嘔吐が観察された(1/2, 2/2)。

^e 500mgで死亡なし(0/3)、1000mgではすべて死亡(4/4)

^f 50, 70mgで死亡なし(各0/2)、100mgで1頭死亡(1/2)

^g 皮下投与では投与部位に薬剤の残留が認められ、吸収が不十分であったと考えられた。

レボフロキサシンの経口投与による LD₅₀ はマウス(Std:ddY 系)の雌で 1803mg/kg 体重、雄で 1881mg/kg 体重、ラット(SD)の雌で 1507mg/kg 体重、雄で 1478mg/kg 体重、カニクイザルの雌で >250mg/kg 体重であった。(論文 7)

(2) 亜急性毒性試験

【ラットを用いた 4 週間亜急性毒性試験】(資料 5-1)

約 6 週齢の Slc:Sprague-Dawley 系ラット(雌雄各 5 匹/群)を用いた強制経口(0, 30, 90, 270, 810 mg/kg 体重/日)投与における 4 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。なお、試験期間中に 810mg 投与群の雌雄各 1 匹が死亡したが、剖検所見から気管内への誤投与が原因と考えられた。

一般的な臨床症状観察では、270mg 以上の投与群で流涎、軟便、尿道口周囲の汚れ及び粗毛が認められた。

体重変化では、270mg 以上投与群の雄で体重増加量が減少していた。統計学的に有意ではないが 90mg 投与群の雄でも体重増加の低値が認められた。雄の 270mg 以上投与群の最終体重は対照群と比較して低値を示した。

摂餌量では、270mg 以上投与群の雌雄で投与の初期に減少傾向が認められたが、その後差は認められなくなった。飲水量は 270mg 以上の投与群で用量相関的に増加していた。

眼検査(眼底カメラ)、聴覚検査^h、心電図検査では投与に起因した異常は認められなかった。

血液学、血液生化学的検査は投与終了時についてのみ実施されている。

血液学的検査では、雌の全ての投与群で好中球の減少が認められたが用量相関性はなかった。810mg 投与群の雄で Hb の増加と骨髓液の顆粒球/赤芽球比の低値が認められた。

血液生化学的検査では、90mg 以上投与群の雄及び 810mg 投与群の雌でビリルビンの低値が認められたが、雄では用量相関性は認められなかった。また、810mg 投与群の雌雄で無機リン酸の高値、雄で AP、Cl⁻ の高値、BUN の低値、総たん白質の低値、雌で Tcho の高値、ロイシンアミノペプチダーゼの低値が認められた。

尿検査は投与 4 週目の始めのみ実施されているが、270mg 以上投与群の雌雄で Na⁺ の排せ量の用量相関的な減少が認められた。

臓器重量では、雌の全ての投与群と雄の 90mg 投与群で盲腸の相対及び絶対重量の増加が認められた。810mg 投与群の雌雄で心臓の相対及び絶対重量の低値、雄で肺の相対及び絶対重量の低値が認められた。心臓については 270mg 投与群の雌で相対重量の低値が認められた。その他、270mg 以上投与群の雌で脳の絶対重量の低値、810mg 投与群の雄で腎臓の絶対重量の低値が認められた。盲腸を除き、これらに関連する生化学的あるいは病理組織学的所見は認められなかった。

剖検及び病理組織学的検査では、盲腸の拡張が全ての投与群で認められ、病理組織学的には吸収上皮細胞の腫大が 810mg 投与群の雌雄で認められた。270mg 以上の投与群で十二指腸又は空腸の粘液原増加を伴う杯細胞の軽度の腫大・増数が認められた。810mg 投与群の雄で大腿骨及び上腕骨遠位端の関節軟骨表層部における基質の限局性粗しょう化が認められた。その他の臓器・組織には、特に被験物質投与に起因した異常は認められなかった。

本試験においては、全ての投与群で盲腸重量の増加、盲腸の拡張が認められたため、NOAEL は求めら

^h ガルトン笛に対する Preyer's 反射の観察

れなかった。ただし、この盲腸の所見は腸内細菌叢のかく乱の二次的影響と考えられる。これを除いた場合の NOAEL は 90mg/kg 体重であった。

【ラットを用いた 26 週間亜急性毒性試験】(資料 5-2)

約 5 週齢の Slc:Sprague-Dawley 系ラット(雌雄各 15 匹/群、対照群と最高用量群は 25 匹/群)を用いた強制経口(0、10、30、90、270 mg/kg 体重/日)投与における 26 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。なお、各投与群の雌雄各 5 匹は 13 週時点で安楽死させ、尿、血液学、血液生化学、剖検、病理組織学的検査を実施した。また、対照群と最高用量群の雌雄各 5 匹について投与終了後 5 週及び 13 週の回復期間が設定された。

一般的な臨床症状観察では、90mg 以上投与群で流涎、270mg 以上の投与群で軟便、尿道口周囲の汚れが認められた。

体重、摂餌量、飲水量は週 1 回の頻度で測定されている。

体重変化では、270mg 投与群の雄で初期の体重増加量が減少していた他、体重増加量、最終体重とも被験物質の投与に起因した影響は認められなかった。

摂餌量では、270mg 投与群の雄で投与 1 週目に減少傾向が認められたが、その後差は認められなくなった。飲水量は 270mg 投与群の雌雄で増加していた。

眼検査(眼底カメラ)、聴覚検査ⁱでは投与に起因した異常は認められなかった。心電図検査では心拍数及び QRS 間隔に軽度の変動が見られたが、値は正常範囲内であった。

血液学、血液生化学的検査は 13 週と 26 週の投与終了時についてのみ実施されている。

血液学的検査では、13 週では雌の 270mg 投与群で好中球の低値、26 週では 30mg 以上投与群の雌で好中球の減少とリンパ球の増加が認められ、270mg 投与群では WBC は増加していた。このうち、好中球の減少は 4 週間の試験でも認められた。雄ではこれらの変化は認められなかった。

血液生化学的検査では、13 週では 270mg 投与群の雄で AP の高値、雌でアルブミンの高値が認められた。26 週では雌の 270mg 投与群で AST、無機リン酸、Tcho の高値が認められた。雄の全ての投与群でアルブミンの高値と、30mg 以上投与群ではアルブミン/グロブリン比の高値が認められたが、用量相関性は定かではなかった。その他には被験物質の投与に起因した異常は認められなかった。

尿検査は投与 13 週及び 26 週の投与終了後のみ実施されている。13 週では 270mg 投与群の雄で Na⁺の排泄量の減少が認められた。これは 10mg 投与群の雄でも認められたが、13 週の雌、26 週の雄では認められず、26 週の雌の 90mg 投与群では増加していた。26 週では雄の 90mg 以上投与群で pH の高値、雌では Cl⁻の高値が認められた。その他に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、13 週の剖検では 30mg 以上投与群の雄で盲腸の相対及び絶対重量の増加が認められ、雌では盲腸の相対重量の増加が 30mg 以上投与群で認められ、270mg 投与群では絶対重量も増加していた。26 週の剖検では、盲腸の相対及び絶対重量の増加が雌の 30mg 投与群及び 90mg 以上投与群の雌雄で認められた。その他、90mg 以上投与群の雌で脾臓の相対及び絶対重量の増加、270mg 投与群の雌で甲状腺と副腎の相対及び絶対重量の増加が認められた。脾臓について病理組織学的異常は認められなかった。また、盲腸、副腎の変化は投与中止後 5 週、13 週の回復期間に回復した。

剖検及び病理組織学的検査では、13 週では雄の 30mg 以上投与群と雌の 90mg 以上投与群に、26 週の時点では盲腸の拡張が 30mg 以上投与群の雌雄で認められたが、病理組織学的な異常は認められなかった。

ⁱ ガルトン笛に対する Preyer's 反射の観察

また、大腿骨遠位端の関節軟骨の異常が対照群を含めて全ての群で認められたが、その発生頻度と程度は 30mg 以下の投与群では対照群と同様であったのに対し、90mg 以上投与群では強く認められた。副腎の束状帯細胞に脂質滴の軽度の増加が 26 週の 270mg 投与群の雌雄で認められた。

本試験における NOAEL は 30mg/kg 体重/日であった。

【ラットを用いたレボフロキサシンの 26 週間亜急性毒性試験】(論文 8)

約 5 週齢の CD(SD)ラット(雌雄各 20 匹/群)を用いた強制経口(0, 20, 80, 320 mg/kg 体重/日)投与における 26 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。

一般的な臨床症状観察では、80mg 以上投与群で流涎、320mg 投与群で大きめの糞、被毛の汚れが認められた。

体重、摂餌量は週 1 回の頻度で測定されている。

体重変化では、被験物質の投与に起因した影響は認められなかったが、摂餌量は、80mg 以上投与群でやや増加していた。

眼検査、心電図検査では被験物質の投与に起因した影響は認められなかった。

血液学、血液生化学的検査は 26 週の投与終了時についてのみ実施されている。

血液学的検査では、全ての投与群の雌雄で好中球の低値が認められたが、WBC や骨髄に影響は認められなかった。好中球の減少はオフロキサシンの 30mg 以上投与群でも認められていた(10mg では影響なし)。

血液生化学的検査では、雄の全ての投与群で LDH、クレアチニン、Ca⁺の高値が認められたが用量相関性はなく、80mg 以上投与群で総たん白質の低値が認められたが、A/G 比に差はなかった。雌の 320mg 投与群で AP の高値、中性脂肪の低値が認められた。ただし、これらの変化の原因と考えられる病理学的所見は認められなかった。

尿検査は 26 週のみ実施されている。80mg 以上投与群の雌雄で pH の高値が認められた。その他に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、全ての投与群で盲腸(内容物含む)の絶対重量が増加し、80mg 以上投与群では統計学的に有意となった。内容物を除去した盲腸では 80mg 以上投与群で増加傾向が認められ、雌の 320mg 投与群では有意であった。その他に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、延長した盲腸(elongated)が 80mg 以上投与群の雌雄で、盲腸の拡張が雄の全ての投与群と 320mg 投与群の雌で認められた。胃の腺粘膜(glandular mucosa)の肥厚が雄の全ての投与群と雌の 20 及び 320mg 投与群で認められたがこれは病理組織学的異常を伴っていなかった。

病理組織学的検査では 320mg 投与群で盲腸粘膜の杯細胞が対照群と比較して顕著に認められた。胃には顕著な異常は認められなかった。

本試験において関節影響は認められなかったが、先だって実施された 4 週間の亜急性毒性試験では水疱形成が認められている。筆者らは試験期間中の回復が関与しているのではないかと推測している。

本試験においては、全ての投与群で盲腸の拡張が認められたため、NOAEL は求められなかった。ただし、この盲腸の所見は、腸内細菌叢のかく乱の二次的影響と考えられる。これを除いた場合の NOAEL は 20mg/kg 体重であった。

【サルを用いたレボフロキサシンの 26 週間亜急性毒性試験】(論文 8)

2-4 齢のカニクイザル(雌雄各 4 匹/群)を用いた強制経口(0, 10, 25, 62.5mg/kg 体重/日)投与における 26 週間の亜急性毒性試験が実施されている。

一般的な臨床症状観察、体重変化、摂餌量、眼検査(直接検眼鏡)、心電図検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、臓器重量、剖検、病理組織学的検査に被験物質の投与に起因した影響は認められなかった。

なお、体重、摂餌量は週1回の頻度、眼検査は26週のみ、心電図検査は25週のみ、採血は25週のみ、採尿は26週のみ実施されている。

本試験における NOAEL は 62.5mg/kg 体重/日であった。

(3)慢性毒性試験

慢性毒性試験・発がん性試験は実施されていない。

発がんプロモーション作用について種々の発がん物質であらかじめ処置されたラットに対するレボフロキサシンの影響が報告されている。

あらかじめ3種の発がん性物質(DEN ; diethylnitrosamine、MNU ; N-methylnitrosourea、DHPN ; dihydroxy-di-N-propylnitrosamine)で処理(DMD 処理)した雄ラット(F344/Du Crj ; 1群15匹)に、被験物質(レボフロキサシン(LV ; 0.9%混餌投与)を16週間投与した試験において、これらの発がん物質の標的となる臓器である、肝臓、腎臓、前立腺、肺、前胃、腺胃、甲状腺等における腫瘍発生について、プロモーション作用は認められなかった。(論文9)

(4)繁殖毒性試験及び催奇形性試験

2世代繁殖試験は実施されていない。

【ラットを用いた妊娠前及び妊娠初期投与試験(第 節)】(資料6-1)

Slc:SD 系ラット(雌雄各24匹/群)を用いた強制経口(0, 10, 60, 360mg/kg 体重/日)投与による試験を行った。被験物質の投与は、雄では交配前9週間及び交配期間中(最長2週間)とし、雌では交配の2週間前から妊娠7日まで行った。雄は交配終了後、雌は妊娠21日に安楽死させた。一般的な臨床症状観察では、360mg 投与群の雌雄で投与直後に流涎が認められた。雄で軟便及び下痢、雌で尿失禁が散見された。10mg 投与群の雌雄親動物の体重、摂餌量及び摂水量に投与に起因した変化はみられなかった。60mg 投与群では雄の摂水量増加及び雌の摂餌量・摂水量の減少、360mg 投与群では雄の体重増加抑制、雌雄の摂餌量の増減、摂水量の増加が認められた。母動物の性周期、交尾率、受胎率に異常は認められなかった。

黄体数、着床数、着床率、生存胎児数、胚/胎児死亡率、生存胎児体重、性比に投与の影響は認められなかった。何れの群の胎児にも外表異常は観察されなかった。胎児の骨格及び内部器官の検査では投与に関連した異常は観察されなかった。本試験における NOAEL は、親動物の一般毒性に対して10mg/kg 体重/日、生殖発生毒性に対して360mg/kg 体重/日であった。

【ラットを用いた催奇形性試験(第 節)】(資料6-2)

Slc:SD 系ラット(雌36匹/群)を用いた強制経口(0, 10, 90, 810mg/kg 体重/日)投与による試験を行った。被験物質の投与は、F₀雌の妊娠7日から17日まで行い各群24匹を妊娠21日に剖検した。12匹のF₀については自然分娩させ、離乳までF₁児を哺育させ、11-15週齢の同群内の雌雄のF₁を交配妊娠させ、妊娠21日に剖検し、F₂への影響を調べた。

^j LV 処理対照群、LV 処理群は16匹

F₀ 母動物の一般的な臨床症状観察では、810mg 投与群でほぼ全例に流涎、少数例に被毛の汚れ、軟便及び尿失禁がみられた。810mg 投与群で、妊娠後期に体重増加抑制が認められ、摂餌量及び摂水量では投与初期の減少、その後の増加がみられた。

F₀ 母動物の黄体数、着床数、着床率、生存胎児数、**妊娠期間**に投与の影響は認められなかった。810mg 投与群で胚/胎児死亡率の上昇がみられ、90 mg 以上投与群で胎児体重の低下が観察された。F₁ 胎児の外表及び内部器官の検査では投与の影響は認められなかった。骨格検査では、90mg 以上投与群で前肢基節骨、後肢基節骨、尾椎**骨化**骨等で化骨遅延が認められ、810mg 投与群では胸骨核及び中足骨の化骨不全、**頸肋**、第 13 肋骨短小の出現率の上昇がみられた。奇形胎児の出現率に投与の影響は認められなかった。

~~F₀ 母動物の妊娠期間に異常は認められなかった。~~

F₁ 出生児の性比に異常は認められなかった。810mg 投与群の F₁ 動物において、生後 4 日までの生存率低下、雄の生後 0 日-11 週及び雌の生後 0 日-7 週で体重の低値がみられた。F₁ 動物の耳介展開、背部発毛、切歯萌出、眼瞼開裂に被験物質の投与による異常は認められなかった。離乳後の視覚及び聴覚機能^k、情動性、学習能に投与の影響は認められなかったが、810 mg 投与群の雄において自発運動量の可逆性の低下が観察された。

F₁ の精巣下降、膣開口、交尾率、妊娠率、黄体数、着床数、生存胎児数、胚/胎児死亡数、胎児性比、生存胎児体重等の F₁/F₂ の生殖発生毒性指標に投与による影響は認められなかった。

本試験における NOAEL は、母動物に対して 90mg/kg 体重/日、児動物に対して 10mg/kg 体重/日であった。催奇形性は 810mg/kg 体重/日の用量まで認められなかった。

【ラットを用いた周産期及び授乳期投与試験(第 節)】(追加資料 6)

SD ラット(妊娠雌 20-24 匹/群)を用いた強制経口 (0, 10, 60, 360mg/kg 体重/日)投与による試験を行った。被験物質の投与は、F₀ の妊娠 17 日から分娩後 20 日まで行った。F₀ を自然分娩させ、離乳まで F₁ 児を哺育させ、F₁ の成長、行動、生殖能を調べ、同群内の雌雄の F₁ を交配妊娠させ、F₂ への影響を調べた。

母動物への影響として、60mg 投与群で F₀ の摂餌量及び摂水量の増加、360mg 投与群で妊娠期間中の摂餌量減少、授乳期間中の摂餌量と摂水量の増加が認められた。

妊娠期間、分娩状態、着床数、出生児数、出生児体重、外表異常胎児出現率、児の生存率、成長、行動及び生殖能等の F₀/ F₁ 及び F₁/ F₂ の生殖発生に投与による影響は認められなかった。本試験における母動物に対する NOAEL は 10mg/kg 体重/日、児動物に対して 360 mg/kg 体重/日であった。

【ラットを用いた器官形成期における骨格異常発現時期特定試験】(追加資料 6)

SD ラット(妊娠雌 5-10 匹/群)に 810mg/kg 体重/日のオフロキサシンを妊娠 7-8、9-10、11-12、13-14、15-17、または 7-17 日に強制経口投与し、胎児の骨格変異発現の感受期を調べた。妊娠 9-10 日または 7-17 日に被験物質を投与された群で、**頸肋**、第 13 肋骨短小の出現率が上昇した。骨格奇形及び外表奇形は認められなかった。

【ラットを用いた高用量における催奇形性試験】(追加資料 6)

SD ラット(妊娠雌 23-24 匹/群)に高用量のオフロキサシン(0, 810, 1100, 1600mg/kg 体重/日)を妊娠 9-10 日に強制経口投与し、胎児に及ぼす影響が検討された。

用量依存的な胎児体重低下、化骨遅延、骨格変異(頸肋、第13肋骨短小、第13肋骨欠損等)の出現率の上昇がみられた。外表、骨格及び内部器官の奇形は認められなかった。

【ラットを用いた胎児と哺育児における骨格変異出現率比較試験】 (追加資料6)

SD ラット (妊娠雌数不明) にオフロキサシン (0, 810 mg/kg 体重/日) を妊娠9-10日に強制経口投与し、頸肋と第13肋骨短小の出現率を妊娠21日の胎児と生後21日の哺育児で比較した。

頸肋は、投与群の胎児と哺育児のいずれにおいても有意に増加した。第13肋骨短小の出現率は投与群の胎児において有意に増加したが、生後21日の哺育児では対照群と差がみられず、第13肋骨短小は骨化遅延を意味する変化と考えられた。

【ウサギを用いた催奇形性試験】 (追加資料6)

ニュージーランドホワイト種のウサギ(妊娠雌10-15匹/群)を用いた強制経口(0, 10, 40, 160 mg/kg 体重/日)投与による催奇形性試験において、被験物質を妊娠6日から18日まで投与した。

160mg 投与群において親動物の体重及び摂餌量の減少が認められた。

黄体数、着床数、着床率、生存胎児体重に投与に関連した影響は認められなかったが、160mg 投与群において胚胎児死亡率が上昇し生存胎児数が減少した。

外表、内部器官及び骨格奇形、化骨遅延、骨格変異の出現率に投与の影響は認められなかった。

本試験におけるNOAELは母動物及び胎児に対して40 mg/kg 体重/日であった。催奇形性は160mg/kg 体重/日の用量まで認められなかった。

(5)遺伝毒性試験

オフロキサシンの変異原性に関するオフロキサシンにおける各種の *in vitro* 及び *in vivo* 試験の結果を次表にまとめた。

【変異原性に関する各種試験の結果一覧】

in vitro 試験(オフロキサシン)

試験	対象	投与量	結果
不定期 DNA 合成試験 (UDS 試験)	WI-38 ヒト胎児肺組織由来細胞	0.1 ~ 300 µg/mL	陰性 (資料6-4)
Ames 試験	<i>S. typhimurium</i> TA1535, TA1537, TA1538, TA98, TA100, <i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	0.001 ~ 0.5 µg/plate(± S9)	陰性 ¹ (資料6-4)
Rec-assay	<i>Bacillus subtilis</i> M45(Rec ⁻) , <i>Bacillus subtilis</i> H17(Rec ⁺)	3.1 ~ 25µg/mL	陽性 (資料6-4)
染色体異常試験	培養ヒトリンパ球	0.1 ,0.3 ,1 ,3 ,10 ,30 ,100 , 300 µg/mL(-S9 ; 22h)	陰性 ² (資料6-4)
	CHL 培養細胞	50,100,200,300,400,500 µg/mL(-S9 ; 24h)	陽性 (論文10)
		50,100,200,300µg/mL (-S9 ; 48h)	陽性 (論文10)
姉妹染色分体交換試験	CHL 繊維芽細胞	0.1 ~ 1000 µg/mL	陰性 ³ (資料6-4)
	培養ヒトリンパ球	0.1 ~ 300 µg/mL	陰性 ⁴

(資料6-4)

- 1 0.5µg/plate で 生育阻害が認められた
- 2 100µg/mL 以上で 細胞毒性が認められた
- 3 1000µg/mL で 細胞毒性が認められた
- 4 100µg/mL 以上で 細胞毒性が認められた

in vivo 試験

試験系	試験対象	投与量	結果
染色体異常試験 (<i>in vivo</i> / <i>in vitro</i>)	健常男性リンパ球	600 mg/kg 単回経口投与	陰性 (資料6-4)
小核試験	マウス骨髄	10, 90, 810, 2500mg/kg 単回経口投与	陰性 (資料6-4)
		10, 40, 160, 500 mg/kg/日, 1 回/日、5 回連続経口投与	陰性 (資料6-4)
優性致死試験	SLC-BDF ₁ マウス	250, 2500mg/kg 単回経口投与	陰性 (資料6-5)
		125, 1250mg/kg/日 1 回/日、5 回連続経口投与	陰性 (資料6-5)

オフロキサシンの遺伝毒性については *in vitro* で細菌を用いた Rec-assay、細菌を用いる復帰突然変異試験、培養細胞を用いた UDS、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験、およびほ乳類培養細胞を用いる姉妹染色分体交換試験、ヒトの *in vitro/in vivo* 染色体異常試験、および *in vivo* げっ歯類を用いる小核試験、優性致死試験が行われている。ほとんどの試験系で陰性であったが、細菌を用いた Rec-assay および陽性であったが、より高用量で実施されたヒト培養細胞を用いた UDS 試験では陰性を示した。また、CHL 培養細胞を用いた染色体異常試験で陽性の結果が報告されている。一方、健常男性における *in vivo* / *in vitro* リンパ球の染色体異常試験、マウスを用いた骨髄小核試験、マウスを用いた優性致死試験のいずれも陰性であった。

これらのことから、*in vitro* の細胞遺伝学的指標を検討する試験系では陽性を示すものもあるが、*in vivo* の試験系では陰性の結果であり、オフロキサシンに生体にとって問題となる遺伝毒性はないと考えられる。

レボフロキサシン及び R-オフロキサシンの変異原性

この他、オフロキサシン(のラセミ体)の各光学異性体成分であるレボフロキサシンおよび R-オフロキサシンのそれぞれについても、いくつかの試験が実施されている。

レボフロキサシン

in vitro 試験(レボフロキサシン)

試験	対象	投与量	結果
Ames 試験	<i>S. typhimurium</i> TA1535, TA1537, TA98, TA100, <i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	0.0016 ~ 0.1µg/plate (± S9)	陰性 ¹ (論文 10)
前進突然変異試験	CHO(K-1/ <i>Hprt</i>)	0.375, 0.750, 1.50 mg/mL (± S9)	陰性 (論文 10)

染色体異常試験	CHL 培養細胞	250, 500, 1000 µg/mL (± S9 ; 6h)	陰性 (論文 10)
姉妹染色分体交換試験	CHL 繊維芽細胞	50,100,200,300µg/mL(-S9)	陽性 (論文 10)
		125,250,500,1000µg/mL(+S9)	陽性 250 (論文 10)

1 0.025µg/plate 以上で 生育阻害が認められた(+S9 の TA1537、TA98 は 0.05µg/plate 以上)

in vivo 試験(~~レボフロキサシン~~)

試験系	試験対象	投与量	結果
UDS 試験 (<i>in vivo/in vitro</i>)	F344/N ラット肝細胞	300, 600 mg/kg 単回経口投与	陰性 ¹ (論文 10)
姉妹染色分体交換試験	マウス骨髄	150, 300, 600mg/kg 単回経口投与	陰性 (論文 10)
小核試験	マウス骨髄	150, 300, 600mg/kg 単回経口投与	陰性 (論文 10)
		100, 200, 400mg/kg/日 1 回/日、5 回連続経口投与	陰性 ² (論文 10)
優性致死試験	SLC-BDF ₁ マウス	30, 90, 270mg/kg/日 1 回/日、5 回連続経口投与	陰性 (論文 10)

¹ 投与 3, 12 時間後に肝細胞を採取し培養

² 200mg 以上で多染性赤血球出現頻度が低下。

レボフロキサシンは CHL 繊維芽細胞を用いた姉妹染色分体交換試験で陽性を示したが、*in vivo* のマウス骨髄姉妹染色分体交換試験、マウス骨髄小核試験、マウス優性致死試験のいずれも陰性であった。

R-オフロキサシン

in vitro 試験(~~R-オフロキサシン~~)

試験	対象	投与量	結果
Ames 試験	<i>S. typhimurium</i> TA1535, TA1537, TA98, TA100, <i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	0.39 ~ 25µg/plate (± S9)	陰性 ¹ (論文 10)
染色体異常試験	CHL 培養細胞	250, 500, 1000, 2000µg/mL (± S9 ; 6h)	陰性 (論文 10)
		50,100,200,300,400,500 µg/mL(-S9 ; 24h)	弱陽性 (論文 10)
		50,100,200,300µg/mL (-S9 ; 48h)	弱陽性 (論文 10)

1 12.5µg/plate 以上で 生育阻害が認められた

in vivo 試験(~~R-オフロキサシン~~)

試験系	試験対象	投与量	結果
小核試験	マウス骨髄	150, 300, 600mg/kg 単回経口投与	陰性 (論文 10)

		100, 200, 400mg/kg/日 1回/日、5回連続経口投与	陰性 ¹ (論文10)
--	--	---------------------------------------	---------------------------

¹ 400mg 以上で多染性赤血球出現頻度が低下。

R-オフロキサシンは CHL 培養細胞を用いた染色体異常試験で弱いながらも陽性を示したが、*in vivo* マウス骨髄小核試験では陰性であった。

以上、各光学的単体を用いた試験でも、生体にとって問題となる様な遺伝毒性は検出されなかった。

(7) 幼若動物の関節影響に関する特殊試験

【幼若ラットを用いた7日間関節毒性試験】(資料6-6,7)

3及び5週齢のCD(SD)雄ラット(各10匹/群)を用いた7日間のオフロキサシン(OFLX)及びナリジクス酸(NA)の強制経口投与(OFLX:0, 30, 100, 300, 900mg/kg 体重/日, NA:100, 300mg/kg 体重/日) 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。

OFLXでは、900mg投与群で軟便、投与直後の流涎、体重増加量減少が認められたが他の群では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。NAでは両投与群とも体重増加量抑制が認められた。

肘及び膝関節軟骨の病理組織学的検査では、OFLXの300mg投与群の6/10、OFLXの900mg投与群及びNAの両投与群で10/10に、肘関節の上腕骨滑車、膝関節の大腿骨遠位端に水疱ないしはびらんが認められた。(資料6-6)

本試験におけるNOAELは30mg/kg体重/日であった。

6, 8及び10週齢のCRj:CD系雄ラット(各7匹/群、対照群は3匹/群)にOFLX900mg/kg体重/日を7日間強制経口投与し、それぞれの週齢における関節軟骨への影響が調査されている。

6週齢のラットでは肉眼的に1/7に大腿骨顆下面の関節軟骨に小隆起巣が、病理組織学的には2/7で膠原繊維線の露出を伴う基質の水腫性膨化巣が認められた。8週齢以上のラットではこれらの異常は認められなかった。(資料6-7)

【若齢犬を用いた8日間関節毒性試験】(論文6)

3ヵ月齢の雄ビーグル犬(各3頭/群、20mg投与群は6頭/群)を用いた強制経口投与(0, 5, 10, 20mg/kg体重/日)による8日間の関節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、20mg投与群の3頭は、2日目の投与終了後に安楽死させ、剖検に供した。

跛行と運動性の低下が20mg投与群の2頭(2/3)で投与7-8の間に認められた。剖検では、上腕骨(humerus)及び大腿骨(femur)の関節軟骨表面の水疱形成が10mg以上投与群に認められた。病理組織学的には中間層の空隙形成、空隙周囲の軟骨細胞壊死、軟骨細胞集簇の病変が10mg以上投与群に認められた。病変は近位端でより強く認められ、用量相関的であった。また、20mg投与群では2日の剖検の時点で認められたが、8日の剖検で頻度がより高く、周辺細胞間質のヘマトキシリン・エジオン染色の強度が顕著であった。

血清中及び関節軟骨中の薬剤濃度は用量相関的に増加し、両者の比較では関節軟骨中濃度が血清中濃度より2倍程度高い値を示したが、投与2日目と8日目の濃度に差はなく、蓄積性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。

(8)眼毒性についての特殊試験

白色ウサギの摘出眼球をオフロキサシン含有溶液(18, 36, 108, 180 μ g/mL)で15分灌流し、ERG^lが測定された。180 μ gでB波の振幅と振動電位の減少、108 μ gで振動電位の減少が認められたが、36 μ g以下の濃度では測定したパラメーターに影響は認められなかった。

白色ウサギ5匹及び有色ウサギ3匹のガラス体を切除し、50もしくは100 μ g/mLのオフロキサシン含有溶液を灌流し、1, 2, 4週後にERG、4週後にVEP^mが測定された。VEP測定後、眼球の病理組織学的検査が実施された。100 μ gでA波の振幅増大、B波の振幅増大、C波の振幅減少が認められたが、いずれも4週以内に回復した。VEP、病理組織学的検査では異常は認められなかった。50 μ gでは異常は認められなかった。また、白色ウサギと有色ウサギで差は認められなかった。(論文11)

(9)一般薬理試験(資料9-1)

【一般症状及び行動】

Irwinの多次元観察法(マウス)において300mg/kg体重の経口投与でグルーミングの軽度の低下、自発運動の低下、1000mg/kg体重でグルーミング、運動活性の低下、うずくまり、軽度の振戦、体温下降、意識低下が認められた。これらは投与後20分以内に発現し、約2時間持続した。100mg/kg体重の投与では一般症状及び行動に著変は認められなかった。

【中枢神経系への作用】

脳波及び心臓に対する作用(ネコ; EEG、ECGⁿ)においては10mg/kgの静脈投与で脳波の徐波化及び血圧低下が認められた(3mg/kgでは影響なし)。自発運動(マウス; wheel cage回転数)においては300mg/kgの経口投与で低下が認められた(100mg/kgでは影響なし)。ヘキソバルビタール睡眠(マウス; 正向反射)においては1000mg/kgの経口投与で睡眠の延長が認められた(300mg/kgでは影響なし)。鎮痛作用(マウス; ~~Litchfield-Wilcoxon法~~酢酸の腹腔内注射に対するwrithing数の測定)、尾根部圧刺激に対する疼痛閾値においては100mg/kg以上の経口投与でwrithing数の抑制、300mg/kg以上の経口投与で鎮痛係数の上昇を示し、鎮痛作用が認められた(それぞれ30、100mg/kgでは影響なし)。抗炎症作用(ラット; カラギーナン注射による炎症惹起)においては、1000mg/kgの経口投与で浮腫の抑制作用が認められた(300mg/kgでは影響なし)。

抗痙攣作用(マウス; 電撃痙攣、ペンテトラゾール痙攣、ストリキニーネ痙攣)、体温測定(ウサギ; 直腸温)、条件回避反応(ラット; shuttle box)、脊髄反射(ネコ; 電気刺激によるシナプス電位測定)には試験条件において被験物質投与による影響は認められなかった。

【自律神経系への作用】

血圧(麻醉イヌ; ノルエピネフリン(NE)、アセチルコリン(Ach)に対する反応)においては、NEによる昇圧反応が30mg/kg、Achによる降圧反応が10mg/kgの静脈内投与で抑制された(それぞれ10、3mg/kgでは影響なし)。

瞳孔(ウサギ)、瞬膜収縮(ネコ; 電気刺激)には試験条件において被験物質投与による影響は認められ

^l Electroretinogram

^m Visual evoked potential

ⁿ Electroencephalogram, Electrocardiogram

微生物学的 ADI の設定に際して MIC₅₀ を用いる場合に適切な菌種として推奨されている菌種について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)		範囲	出典
		MIC ₅₀	MIC ₉₀		
偏性嫌気性菌					
<i>Bacteroides bivius</i>	46	4	8		21
<i>Bacteroides caccae</i>	10	8	8	1->128	24
<i>Bacteroides distasonis</i>	10	2	8	2-64	23
	12	2	16	2-64	24
<i>Bacteroides fragilis</i>	42	1.56	6.25	0.78-12.5	12
	13	2	4	2-16	13
	51	4	4	2->64	14
	29	4	8	1-16	15
	27	2	2	0.5-8	16
	50	2	4	2-4	17
	20	4	8	2-16	18
	41	3.13	12.5	0.78->25	19
	32	1.0	4.0	1-16	20
	4	2	4		21
	23	1	4	1-128	22
	11	2	4	1-8	23
	23	2	8	2-64	24
	25	1.56	3.13	0.78-3.13	25
<i>Bacteroides fragilis</i> group	52	4	32	1-128	22
<i>Bacteroides melaninogenicuss</i>	20	1	2	0.5-2	17
<i>Bacteroides ovatus</i>	12	16	32	16-32	23
	10	16	16	8-16	24
<i>Bacteroides thetaiotaomicrom</i>	14	16	16	8-256	23
	17	8	128	4-128	24
<i>Bacteroides uniformis</i>	10	8	16	2-64	23
	12	4	8	2-8	24
<i>Bacteroides ureolyticus</i> group	11	0.125	0.5	<0.06-1	24
<i>Bacteroides vulgatus</i>	12	4	8	1-16	23
	12	2	16	1-16	24
<i>Bacteroides</i> spp.(<i>fragilis</i> 除く)	29	8	32	<0.03-64	14
	29	8	32	2-128	22
	17	2	4	0.25-8	23
<i>Bifidobacterium</i> spp.	10	4	4	1-8	22
<i>Clostridium perfringens</i>	17	0.39	0.78	0.39-12.5	12
	50	0.5	1	0.5-1	17
	20	1.0	1.0	0.5-1	20

	6	0.5	1	0.5-1	22
	10	1	1	0.5-1	23
	12	0.5	0.5	0.5-1	24
<i>Clostridium ramosum / innocuum / clostridiiforme</i>	15	16	128	1->128	24
<i>Clostridium</i> spp.	13	2	>64	0.5-16	14
	20	1	8	0.25-16	18
	17	2	8	0.5-256	23
	23	4	16	0.5-32	24
<i>Eubacterium</i> spp.	12	0.5	2	0.5-8	22
	10	1	2	0.25-4	23
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	5	1	2		21
<i>Fusobacterium nucleatum / necrophorum</i>	15	2	2	1-4	23
<i>Fusobacterium mortiferum / varium</i>	19	4	16	2-64	23
<i>Fusobacterium varium / ulcerans / gonidiaformans</i>	14	8	16	2-128	24
<i>Fusobacterium</i> spp.	10	4	4	0.25-64	22
	20	2	16	0.5-64	24
<i>Peptococcus</i> spp.	11	8	16	0.25-16	14
	25	1.56	6.25	0.39-12.5	19
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	8	0.5	4	0.25-4	14
	50	2	4	1-4	17
	18	0.5	2	0.12-8	22
	20	0.5	8	0.125-16	23
	22	0.5	8	0.125-16	24
	25	6.25	25	0.20-25	26
<i>Peptococcus / Peptostreptococcus</i>	10	1	2	0.25-2	18
<i>Prevotella bivia</i>	12	8	8	2-8	24
<i>Prevotella</i> spp. (pigmented)	17	1	16	0.25-64	24
<i>Prevotella</i> spp. (nonpigmented)	14	2	2	1-2	24
<i>Prevotella</i> spp	6	2	8	0.5-32	22
通性嫌気性菌					
<i>Enterococcus faecalis</i>	25	2	2	1-4	18
	50	3.13	6.25	0.78-25	19
	16	4	4	2-4	20
	25	1.56	3.13	0.78-3.13	25
<i>Enterococcus faecium</i>	16	2.0	16.0	1-16	20
<i>Enterococci</i>	10	2	32	1-32	22
	29	2	4	1-4	16
	100	2	4	1-8	17
<i>Escherichia coli</i>	100	0.05	0.19	0.025-1.56	12
	54	0.063	0.125	0.031-1	13

	23	0.06	0.125	0.06-0.125	15
	49	0.06	0.06	0.03-0.5	16
	100	0.06	0.12	0.06-0.12	17
	35	0.06	0.125	0.03-1	18
	50	0.05	0.10	0.025-3.13	19
	32	0.06	0.13	0.03-0.25	20
	39	0.5	1		21
	10	0.06	32	0.03-64	22
	25	0.05	0.05	0.013-0.10	25
<i>Lactobacillus</i> spp.	50	4	32		21
	13	4	32	1-32	22
<i>Propionibacterium acnes</i>	14	1	4	1-8	14
<i>Propionibacterium granulosum</i>	6	1	4	1-4	14
<i>Propionibacterium</i> spp.	11	0.5	0.5	0.25-0.5	24

これらの調査は $10^3 \sim 10^7$ CFU/spotの菌濃度^qで実施されたが、一部の菌種を用いた確認試験において $10^4 \sim 10^6$ CFU/spotにおいて(論文12)、またオフロキサシンの主要な抗菌活性を担う(S)-(-)-アイソマーは $10^3 \sim 10^7$ CFU/spotにおいて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19)。

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 0.05μg/mL であった。次いで *Bacteroides ureolyticus* group の0.125μg/mL、*Clostridium perfringens* の0.39μg/mLであった。この他では *Eubacterium* spp.、*Peptostreptococcus* spp.、*Propionibacterium* spp. 等、複数の菌種で 0.5μg/mL の MIC₅₀ が報告されている。

ATCC標準株におけるMIC₅₀

ATCCの標準株である *Bacteroides fragilis* ATCC25285、*Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC29741、*Eubacterium lentum* ATCC43055についてのMICの範囲は順に1-2(2)、8-8(8)、1-1(1)^rであった(論文24)。

pHによるMICの変化

異なる pH 条件下(6.6、7.3、8.1)におけるオフロキサシンの MIC の変動が報告されている。*Bacteroides fragilis*(6 菌株)については pH の上昇とともに MIC(幾何学平均)が低下した。*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 pH7.3 で最も高い MIC が見られ、その前後の pH では低下していた(論文14)。

【ヒトボランティアにおける微生物学的影響】

5名の健常ボランティアについて、200mgのオフロキサシンを1日2回、5日間経口投与し、投与前、投与2、3、4、5及び投与終了後6日までの糞便を採取し、嫌気性菌、腸内細菌科、*Staphylococci*、グループD *Staphylococci* を調べた結果は次のとおりであった。

腸内細菌科の菌数はオフロキサシンの投与開始とともに減少し、4日目には検出されなくなった。この状態は投与終了後4日まで持続した。嫌気性菌の菌数、MIC₅₀及びMIC₉₀、優勢菌種に有意差は認められな

^q 論文8は未記載

^r ()はモード

かったが、偏性嫌気性菌の割合が有意に増加していた。グループ D Staphylococci の菌数は減少した。また、酵母については、投与開始前は 2/5 で検出されたのみであったが、投与 4 日目には全ての被験者の糞便から *Candida* sp. が検出された。

筆者らは、嫌気性腸内細菌叢の優占種に変化は認められなかったが、*Candida* sp. が出現したことから、オフロキサシンの投与によりコロニー形成耐性がかく乱されたと推定している。

また、糞便中のオフロキサシン濃度は数百 $\mu\text{g/g}$ であったが、投与によって消失が認められたのは *in vitro* の MIC₅₀ が 1 $\mu\text{g/mL}$ 以下のもののみであり、オフロキサシンは *in vitro* でより強い抗菌活性を示すと考えられた。なお、耐性菌は検出されなかった(論文 26)。

【耐性の出現について】

MIC の 8 倍のオ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 8.5×10^{-9} (*S. marcescens*) \sim $< 1.6 \times 10^{-9}$ (*P. stuartii*)であった(論文 15)。

(11)ヒトにおける知見について

【ヒトボランティアにおける毒性影響】

24 名の健常男性ボランティア(オフロキサシン投与群、プラセボ投与群各 12 名)について、400mg のオフロキサシンを 1 日 2 回、10 日間経口投与したときの、一般状態、血液学、血液生化学、尿、視覚、聴覚、心電図検査が実施されている。

群間で発生頻度に有意差が認められた副作用は消化器系に関するもののみであった。最も高頻度で認められたのは消化器系の不調/痛み(5/5^s)、吐き気(2/3)及び下痢(2/3)であった。また、3 名で頭痛(3/9)、うち 1 名で頭痛に伴う視力障害が 1 例報告された。頭痛は対照群でも 3 名に報告された(3/9)。血液学、血液生化学、尿、視覚、聴覚、心電図検査に異常は認められなかった。(論文 27)

【フェイス 、 及び 試験に関する報告】

オフロキサシンは現在でもヒト臨床において使用されているが、日本及び欧州におけるフェイス 、 及び 試験中に収集された有害影響が報告されている。

13,717 名の患者にオフロキサシンが投与され、577 件の有害影響が報告されている。577 件のうち 361 例は消化器系に関するものであった。また、124 例が中枢神経系に関するもので、うち 84 例が頭痛もしくは睡眠障害であった。その他皮膚影響について 45 例、心臓血管系について 8 例であった。まれな例として幻覚(1 例)、悪夢(1 例)、混乱(1 例)、沈鬱(2 例)が報告されていた。(論文 28)

【薬剤耐性菌について】

オフロキサシン及び(S)-(-)-体であるレボフロキサシンはヒト臨床において広く使用されている。

3 . 食品健康影響評価について

【眼に関する知見について】

一般にフルオロキノロン剤はメラニンに高い親和性を示すことが報告されている。オフロキサシンに

^s 報告被験者数 / 総報告回数

ついて直接の知見は得られていないが、¹⁴C 標識レボフロキサシン単回投与後のメラニン含有組織中濃度はアルビノラットと比較して有色ラットにおいて高値を示し、その半減期は約 20 日であったことから (Tanaka et al 2004)、他のキノロン剤と同様の傾向を示すものと考えられる。

毒性影響については、白色及び有色ウサギの眼にオフロキサシン溶液を直接灌注した試験において、100µg/mL の灌注では ERG に変化が認められたものの、50µg/mL では ERG、VEP ともに変化は認められておらず、ヒト臨床試験においても眼の異常は主要な副作用とは見なされていない。また、レボフロキサシンのサルを用いた 26 週間の亜急性毒性試験では、最高用量(62.5mg/kg 体重/日)においても眼検査に異常は認められなかった。これらのことから、オフロキサシンについては、眼毒性よりも他の毒性影響がより感受性の高い指標となるものと考えられる。

【関節影響に関する知見について】

キノロン剤については、幼若動物において関節影響が認められることが知られており、これまで国内外で検討された毒性評価のほとんどで最も感受性の高い毒性指標となっている。

オフロキサシンについてはラットとイヌを用いた関節影響に対する特殊試験が実施されており、他のキノロン剤と同様、イヌにおいてより高い感受性が認められた。これは他の毒性と比較しても最も鋭敏な指標であった。本試験は 8 日間の短期間の試験であるが、感受性が高い幼若犬を用いて、NOAEL が求められていることから、適切な安全係数を適用した上で毒性評価に用いることが可能であると判断された。

【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、多世代の繁殖毒性試験は実施されていないが、ラットを用いた妊娠前及び妊娠初期投与試験、ラット及びウサギを用いた胎児の器官形成期試験、ラットを用いた周産期及び授乳期投与試験が実施され、F₁ を繁殖した F₂ 児の検査まで行われており、繁殖毒性は認められていない。また、ラット及びウサギにおいても催奇形性は認められていない。

【遺伝毒性/発がん性について】

慢性毒性/発がん性試験については実施されていないが、一般にキノロン剤には生体において問題となる遺伝毒性や発がん性は認められていない。

オフロキサシンの遺伝毒性については、細菌を用いた復帰突然変異試験、ヒト培養細胞を用いた UDS 試験、ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験、姉妹染色分体交換試験で陰性であったが、細菌を用いた Rec-assay および CHL 培養細胞を用いた染色体異常試験で陽性であった。しかし、健常男性におけるリンパ球を用いた *in vivo / in vitro* リンパ球の染色体異常試験、マウスを用いた骨髄小核試験、マウスを用いた優性致死試験のいずれも陰性であったことから、生体にとって問題となる遺伝毒性はないと考えられる。この他、オフロキサシンの各光学異性体成分であるレボフロキサシンおよび R-オフロキサシンのそれぞれについても、いくつかの試験が実施されているが、生体にとって特に問題となるような遺伝毒性は認められていない。

また、オフロキサシン(ラセミ体)の一方の光学異性体であるレボフロキサシンは、発がん物質である DEN、MNU、DHPN の標的となる臓器である、肝臓、腎臓、前立腺、肺、前胃、腺胃、甲状腺等における腫瘍発生について、プロモーション作用を示さなかった。

さらに、ラットを用いた 6 ヶ月間までの混餌投与試験においてオフロキサシンによる腫瘍の発生頻度の増加は報告されておらず、比較的長いヒト臨床における使用歴があるが、副作用として腫瘍の発生は

知られていない。

これらのことから、発がん性試験を欠いていても ADI の設定は可能であると判断された。

【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は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の程度についてはいくつかの報告があり、構造的に 6 位及び 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、8 位にメトキシ基を有する場合、光毒性は著しく減弱することが報告されている(Marutani et al., 1993)。オフロキサシンは 8 位と 1 位で環構造を有しており構造的に光毒性が強い部類には相当しない。オフロキサシンあるいはレボフロキサシンについて、*in vivo* 光遺伝毒性については報告がない。*in vitro* では CHLV79 培養細胞を用いた UV 照射による細胞毒性の増強、コメットアッセイ(Zhang et al., 2004)や光小核試験(Ronald et al., 1999)でいずれも UV 照射による毒性の増強が認められたが、他のフルオロキノロン剤との比較では相対的に弱いものであった。また、UV 照射後のマウスの耳介炎症を指標とした試験(Marutani et al., 1993)、あるいはヒトボランティアの UV 照射後皮膚紅斑を指標とした試験(Scheife et al., 1993)においては、光毒性は比較的弱いことが報告されている。これらのことから、オフロキサシンについてはフルオロキノロン剤の中では光毒性 / 光遺伝毒性は弱い部類に分類されると考えられる。

【毒性学的影響のエンドポイントについて】

オフロキサシンについて実施された種々の毒性試験において、ラットの亜急性毒性試験については、10mg/kg 体重/日の投与群においても盲腸拡張が認められたため、NOAEL は求められなかった。しかし、この盲腸の拡張は抗菌剤を投与されたラットや、薬剤投与のない無菌ラットにおいても一般的に認められる所見であり、抗菌剤の毒性影響というよりは腸内細菌叢の変動に伴う変化と考えられ、毒性学的影響の指標としては適当でないと判断された。

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 8 日間の関節影響に関する特殊試験において認められた関節軟骨表面の水疱形成であり、NOAEL は 5.0mg/kg 体重/日であった。この知見は、キノロン剤の関節影響が幼若動物のみに認められること、イヌが感受性の高い動物種であることが知られていることから、オフロキサシンの毒性学的影響を評価する指標としては適当であると判断された。しかしながら、通常、イヌを用いて関節影響を評価する際には、通常 90 日という、感受性があると考えられる時期において有る程度の期間の試験が実施されているのに対し、本知見は 8 日間という短期間の試験から得られたものであることから、最終的な毒性の評価に際してはこれを考慮に入れる必要があるとされた。

【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。オフロキサシンについての微生物学的影響については、*in vitro* の知見として MIC₅₀、*in vivo* の知見としてヒト臨床上的の使用経験における有害影響、ヒトボランティアにおける 5 日間経口投与による臨床観察がある。

オフロキサシンについてはヒト臨床上的において比較的長い使用経験がある。臨床における最も主要な

副作用は消化器系への影響で、次いで頭痛、睡眠障害と言った中枢神経系の影響であった。これは健常男性ボランティアにおける 10 日間の投与試験でも同様であった。また、5 名の健常ボランティアにおける 5 日間の経口投与(200mg/ヒト、1 日 2 回)について微生物学的影響が検討されているが、この試験において糞便中に耐性菌は検出されず、嫌気性菌の総数にも変化は認められなかった。しかしながら、糞便中の嫌気性菌の割合に変化が認められ、さらに当初は 2/5 でしか認められなかった *Candida* spp. が投与 4 日目には全ての被験者から検出されるようになったため、400mg/ヒト/日のオフロキサシンの経口投与は、ヒト腸内細菌叢のコロニー形成耐性をかく乱したものと考えられ、NOEL は決定できなかった。

一方、*in vitro* の知見については、ヒト腸内細菌叢から検出される優勢菌種である *Bacteroides*、*Bifidobacterium*、*Clostridium*、*Eubacterium*、*Fusobacterium*、*Peptococcus* / *Peptostreptococcus* 等の偏性嫌気性菌、R-plasmid のリザーバーとなる可能性や乳幼児で優勢菌種となる可能性のある、*Enterococcus*、*E. coli*、*Lactobacillus* 等の通性嫌気性菌が微生物学的 ADI の設定に際して MIC₅₀ を用いる場合に適切な菌種として国際的に推奨されており、食品安全委員会においても基本的にこれらを用いて評価を実施している。オフロキサシンについては、これらの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、公表論文から少なくとも 37 種 2164 菌株の MIC₅₀ の情報が得られている。

これらの知見からは、0.5 µg/mL の濃度において *Eubacterium*、*Peptostreptococcus*、*Propionibacterium* の複数の菌種が影響を受けていた。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が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おり(52th JECFA、EMA)、また、*Bacteroides ureolyticus* group で 0.125 µg/mL、*Clostridium perfringens* (ウェルシュ菌)で 0.39 µg/mL の MIC₅₀ が報告されているが、これらは他の 12 種の *Bacteroides* が全て 1µg/mL 以上であるのに対して著しい違いが認められ、さらにヒトボランティアの知見で *Bacteroides* への影響はほとんどなかったこと、またウェルシュ菌は食中毒菌であることから、いずれも単独で微生物学的 ADI の評価に用いるのは適切でないと考えられた。

これらのことから、現時点においてはオフロキサシンの微生物学的 ADI の算出に当たっては、*Eubacterium*、*Peptostreptococcus*、*Propionibacterium* における 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、ニュー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。

【一日摂取許容量(ADI)の設定について】

オ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 8 日間亜急性毒性試験における NOAEL 5mg/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 に加え、試験期間が短いことに対して 10 を考慮し、毒性学的データからは ADI は 5 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、細菌が暴露される分画に 30%(尿中回収率より推測)、安全係数に 1、ヒト体重に 60kg を適用すると、

$$\text{ADI (mg/kg 体重/日)} = \frac{0.000 \text{ (mg/mL)} \times 220 \text{ (g)}}{0.3 \times 1 \times 60 \text{ (kg)}} = 0.00 \text{ mg/kg 体重/日}$$

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、急性毒性の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ことから、オ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、0.00 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、オ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。

オフロキサシン mg/kg 体重/日

本評価書中で使用した略号については次にならった

ADI	一日許容摂取量
ALT	アラニンアミノトランスフェラーゼ
AP	アルカリフォスファターゼ
AST	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
AUC	血中薬物濃度 - 時間曲線下面積
BUN	血液尿素窒素
cAMP	サイクリック AMP
CHL	チャイニーズハムスター肺由来細胞株
CHO	チャイニーズハムスター卵巣由来細胞株
C _{max}	最高血(漿)中濃度
CPK	クレアチンフォスフォキナーゼ
GOT	グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ(AST)
GPT	グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ(ALT)
Hb	ヘモグロビン(血色素)
Ht	ヘマトクリット
LOAEL	最小毒性量
LOEL	最小作用量
MCH	平均赤血球血色素量
MCHC	平均赤血球血色素濃度
MCV	平均赤血球容積
MBC	最小殺菌濃度
MIC	最小発育阻止濃度
MLA	マウスリンフォーマ試験
NOAEL	無毒性量
NOEL	無作用量
T _{1/2}	消失半減期
TBIL	総ビリルビン
Tcho	総コレステロール
TDI	耐用一日摂取量
TG	トリグリセリド
T _{max}	最高血(漿)中濃度到達時間