

(案)

動物用医薬品評価書

2-10-性腺刺激ホルモン放出ホルモン類縁体・ジフテリアトキソイド結合物を有効成分とする
牛の注射剤（ボプリバ）

2015年6月

食品安全委員会動物用医薬品専門調査会

目次

	頁
○審議の経緯	2
○食品安全委員会委員名簿	2
○食品安全委員会動物用医薬品専門調査会専門委員名簿	2
○要約	3
I. 評価対象動物用医薬品の概要	4
1. 主剤	4
2. 効能・効果	4
3. 用法・用量	4
4. 添加剤等	4
5. 開発の経緯及び使用状況	4
II. 安全性に係る知見の概要	6
1. ヒトに対する安全性	6
(1) 主剤	6
(2) 添加剤	9
2. 牛に対する安全性	10
(1) 牛に対する安全性試験①	10
(2) 牛に対する安全性試験②<参考資料>	11
(3) 牛に対する安全性試験③<参考資料>	12
(4) 牛に対する臨床試験	13
III. 食品健康影響評価	14
・別紙：検査値等略称	15
・参照	16

<審議の経緯>

- 2015年 3月 11日 農林水産大臣から動物用医薬品の製造販売の承認に係る食品健康影響評価について要請（26 消安第 6024 号）、関係資料の接受
- 2015年 3月 12日 厚生労働大臣から残留基準設定に係る食品健康影響評価について要請（厚生労働省発食安 0310 第 2 号）、関係資料の接受
- 2015年 3月 17日 第 553 回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2015年 4月 16日 第 177 回動物用医薬品専門調査会
- 2015年 6月 2日 第 563 回食品安全委員会（報告）

<食品安全委員会委員名簿>

（2012年7月1日から）

熊谷 進（委員長）
佐藤 洋（委員長代理）
山添 康（委員長代理）
三森 国敏（委員長代理）
石井 克枝
上安平 冽子
村田 容常

<食品安全委員会動物用医薬品専門調査会専門委員名簿>

（2013年10月1日から）

山手 丈至（座長*）	須永 藤子	山崎 浩史
小川 久美子（座長代理*）	辻 尚利	吉田 和生
青木 博史	寺岡 宏樹	吉田 敏則
青山 博昭	能美 健彦	渡邊 敏明
石川 さと子	舞田 正志	
石川 整	松尾 三郎	
川治 聡子	宮田 昌明	

*：2013年10月22日から

要 約

2-10-性腺刺激ホルモン放出ホルモン類縁体・ジフテリアトキソイド結合物を有効成分とする牛の注射剤（ボプリバ）の製造販売の承認に係る食品健康影響評価について、動物用医薬品製造販売承認申請書等を用いて実施した。

本製剤は、2-10-GnRH 類縁体・DT 結合物を免疫原として免疫学的機序により GnRH の作用を抑制するものである。

羊を用いた静脈内投与試験、ラット及び豚を用いた経口投与試験から、本製剤の主剤である 2-10-GnRH 類縁体・DT 結合物は、経口投与において、GnRH 様作用及び抗体応答を示さず、毒性影響も認められないことから、ヒトの健康に影響を与えるものではないと判断した。

また、2-10-GnRH 類縁体・DT 結合物はペプチドである。豚を用いた経口投与試験 [II. 1. (1)③] において、2-10-GnRH 類縁体・DT 結合物は免疫応答を刺激しなかったことから、本製剤を投与した牛由来の食品を介してヒトが 2-10-GnRH 類縁体・DT 結合物を経口摂取した場合には、2-10-GnRH 類縁体・DT 結合物は胃液中で小さなペプチド及びアミノ酸に分解され、その作用は消失することが示唆された。

本製剤に含まれている添加剤については、その使用状況、既存の毒性評価及び本製剤の用法・用量を考慮すると、本製剤の含有成分として摂取した場合のヒトへの健康影響は無視できると考えられる。

牛に対する安全性試験及び臨床試験において、常用量の投与では、投与部位反応等がみられたが、一般状態及び体重について投与に起因する異常は認められなかった。

以上のことから、本製剤が適切に使用される限りにおいては、食品を通じてヒトの健康に影響を与える可能性は無視できると考えられる。

I. 評価対象動物用医薬品の概要

1. 主剤

主剤は 2-10-性腺刺激ホルモン放出ホルモン類縁体（以下「2-10-GnRH 類縁体」という。）・ジフテリアトキソイド（以下「DT」という。）結合物溶液である。本製剤 1 mL（1 頭分）中に 2-10-GnRH 類縁体・DT 結合物が 0.4 mg 含まれている。（参照 1）

2. 効能・効果

効能・効果は牛の発情行動の抑制である。（参照 1）

3. 用法・用量

性成熟前あるいは性成熟後の雌牛に、少なくとも 3 週間隔で 2 回、頸部皮下に 1 回 1 mL 投与する。2 回目の投与は、発情行動の抑制を予定する 2 週間前に行うこと。ただし、初発情を抑制する場合には、1、2 回目の投与を各々 4～13、5～14 か月齢を目処に行う必要がある。（参照 1）

4. 添加剤等

本製剤 1 mL 中に、アジュバント 2 種類、保存剤及び溶剤が含まれている¹。（参照 1）

5. 開発の経緯及び使用状況

雌牛の発情行動は、発情周期の約 21 日間のうち発情期である約 7～21 時間に発現し、他の牛に対し攻撃的となる、他の牛に乗駕を試みる等の行動がみられる。その際のストレス、闘争行動及び乗駕による事故発生の危険性が問題となっている。（参照 2）

本製剤の主剤は、DT をキャリアータンパクとして 2-10-GnRH 類縁体と結合させた 2-10-GnRH 類縁体・DT 結合物である。2-10-GnRH 類縁体・DT 結合物自体はホルモン活性を示さないが、本製剤を皮下投与することにより 2-10-GnRH 類縁体・DT 結合物が免疫原として働き、投与動物に GnRH に対する特異抗体を産生させ、GnRH を特異的に中和するという免疫学的機序により GnRH の作用を抑制する。本製剤は、雌牛の発情のコントロールを目的としたもので、性腺ホルモン（雄牛におけるテストステロン、雌牛におけるエストロゲン及びプロゲステロン）の産生を抑制する。（参照 2）なお、本製剤の主剤の構成材料となる 2-10-GnRH 類縁体は、合成した 9 個のアミノ酸からなるペプチドであり、天然型（内因性）GnRH の 1 番目のアミノ酸である 5-oxoPro のみが置換されたものである。（参照 3、4）

和牛雌牛の肥育農場で約 2 年間に出荷された 101 頭について、発情に起因すると推測される事故の発生状況を調査したところ、事故は 4 頭に発生し、2 頭は淘汰、1 頭は治療後に繁殖に転用、1 頭は治療により回復したものの、半身が廃棄されたと報告された。また、出荷した牛の枝肉評価では、発情行動に起因すると推測される肉質の低下が 18 頭でみられ、3.8%の損失であったと概算された。このような雌牛を肥育する際の発情行動

¹ 本製剤の添加剤については、「食品安全委員会の公開について」（平成 15 年 7 月 1 日内閣府食品安全委員会決定）に基づき、「企業の知的財産等が開示され、特定の者に不当な利益若しくは不利益をもたらすおそれがある」ことから、本評価書には具体的な物質名及びその量を記載していない。

による生産性の低下を非観血的に低減する目的で本製剤が開発された。(参照 2)

海外では、本製剤は 2007 年 9 月にニュージーランドで承認されて以降、豪州、ブラジル及びメキシコで承認されている (2012 年 10 月現在)。また、本製剤と同一の主剤を用いた豚及び馬の製剤が承認されている。(参照 2)

日本では、本製剤と同一の主剤を用いた製剤が、無去勢雄豚の外科的去勢の代替 (免疫学的去勢効果) の目的で承認されている。(参照 2)

今回、2-10-GnRH 類縁体・DT 結合物を有効成分とする牛の注射剤が製造販売承認申請されたことに伴い、農林水産省から、医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律 (昭和 35 年法律第 145 号) 第 83 条第 1 項の規定により読み替えて適用される同法第 14 条第 1 項の規定に基づき、本製剤を承認することについて、厚生労働省から、食品衛生法 (昭和 22 年法律第 233 号) 第 11 条第 1 項の規定に基づき、食品中の残留基準を設定することについて、食品健康影響評価が要請された。

II. 安全性に係る知見の概要

1. ヒトに対する安全性

(1) 主剤

本製剤の主剤である 2-10-GnRH 類縁体・DT 結合物は、過去に食品安全委員会で評価された性腺刺激ホルモン放出因子・ジフテリアトキソイド結合物を有効成分とする豚の注射剤（インプロバック）（参照 5）の主剤「性腺刺激ホルモン・ジフテリアトキソイド結合物」と同一物質である。下記の試験により、本製剤の主剤の安全性について検討された。

① GnRH 様作用確認試験（羊、静脈内投与）

プロゲステロンレベルが高く、黄体形成ホルモン（以下「LH」という。）のパルス状分泌頻度が低い黄体期にある発情周期 8 日目の羊（3 頭/群）に、モルヒネ 20 mg を 30 分間隔で 3 回静脈内投与し GnRH 分泌を阻害させ、その後、各投与物質〔生理食塩液、天然型 GnRH（1 µg/頭）、2-10-GnRH 類縁体（50 µg/頭）又は 2-10-GnRH 類縁体・DT 結合物（50 µg/頭）〕のいずれかを静脈内投与し、経時的に採血して血漿中の LH 濃度を RIA により測定した（検出限界：0.11 ng/mL）。採血を投与前、投与 5、10、15、20、30、40、60、90、120 及び 180 分後に実施した。投与前後の LH 濃度を比較することにより、各投与物質の GnRH 様作用を検討した。

投与後の血漿中 LH 濃度から投与前の血漿中 LH 濃度を差し引いたときの最大値を LH 反応とし、各投与群の血漿中 LH 反応を表 1 に示した。天然型 GnRH 投与群では全例において LH 分泌量の確実な増加（LH のピーク：11.63 ng/mL）が、2-10-GnRH 類縁体投与群では全例にわずかな LH 反応（LH のピーク：1.18 ng/mL）が認められ、天然型 GnRH に対する 2-10-GnRH 類縁体の相対比率は 0.2%であった。2-10-GnRH・DT 結合物投与群及び生理食塩液投与群では LH 反応（GnRH 様作用）は認められなかった。

以上より、2-10-GnRH 類縁体には低レベルの GnRH 様作用が認められたが、2-10-GnRH 類縁体・DT 結合物には GnRH 様作用は認められないと考えられた。（参照 4、5）

表 1 GnRH 分泌阻害羊における各投与物質投与後の血漿中 LH 反応（ng/mL）

投与物質	各個体の反応	反応の平均±SD
生理食塩液	0.02、0.0、0.0	反応なし
天然型 GnRH	9.75、7.44、17.71	11.63±5.03
2-10-GnRH 類縁体	1.41、0.89、1.23	1.18±0.26
2-10-GnRH 類縁体・DT 結合物	0.0、0.0、0.19	反応なし

LH 反応：[投与後血漿中 LH 濃度（ng/mL）－投与前血漿中 LH 濃度] の最大値

※2-10-GnRH 類縁体の相対力価（GnRH=100%）は、(2-10-GnRH 類縁体反応/天然型 GnRH 反応×1/50×100) から 0.2%となる。

② 投与試験（ラット、経口及び皮下投与）

a. 血清中 2-10-GnRH 類縁体・DT 結合物

ラット（SD 系、6～8 週齢、雌雄各 3 匹/投与群、雌雄各 5 匹/対照群）に 2-10-GnRH 類縁体・DT 結合物製剤を 4 週間隔で 2 回経口（2-10-GnRH 類縁体・DT 結合物として 462 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/回）又は皮下投与（2-10-GnRH 類縁体・DT 結合物として 27.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/回）し、経時的に採血して血清中の 2-10-GnRH 類縁体・DT 結合物濃度を電気化学免疫アッセイにより測定した（検出限界：0.0331 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、定量限界：0.0980 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）。採血を初回投与前、初回投与 1、4、8、12 及び 24 時間、2、7、14 及び 21 日後、第 2 回投与前、第 2 回投与 1、4、8、12 及び 24 時間、2、7、14、21 及び 28 日後に実施した。

血清中の 2-10-GnRH 類縁体・DT 結合物濃度は、経口投与群の雄 1 例に初回投与 24 時間及び 2 日後において検出限界以上定量限界未満（0.0356～0.0493 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）で認められたのみで、両投与群のその他の被験動物では、いずれの時点においても検出限界未満であった。（参照 4、5）

b. 血清中抗 2-10-GnRH 類縁体抗体

[II. 1. (1)② a.] で採取した血液について、血清中抗 GnRH 抗体濃度を電気化学免疫アッセイにより測定した（検出限界：0.258 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、定量限界：0.715 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）。

皮下投与群では、初回投与 14 日後には 6 例中 4 例において、定量可能な抗 GnRH 抗体が認められ（1～30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）、第 2 回皮下投与 7～28 日後においては、全例で定量可能な抗 GnRH 抗体（3～1,340 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）が認められた。このことから、2-10-GnRH 類縁体・DT 結合物製剤の皮下投与により抗体応答を示すことが示唆された。

一方、経口投与群では、初回投与 21 日後の雄 1 例で検出限界以上定量限界未満（0.283 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、この検体のレプリケートでは検出限界未満）の抗 GnRH 抗体が認められたが、この検体以外についてはいずれの検体からも抗 GnRH 抗体は検出されず、本製剤の経口投与では、全身性の抗体応答は示さないと考えられた。（参照 4、5）

③ 投与試験（豚、経口投与）

豚（交雑種(LW)、13～14 週齢、雄 6 頭/群）に 2-10-GnRH 類縁体・DT 結合物製剤を 4 週間隔で 2 回経口投与（2-10-GnRH 類縁体・DT 結合物として 0.4 $\text{mg}/\text{頭}/\text{回}$ ）し、経時的に採血して血清中テストステロン及び抗 GnRH 抗体価（幾何平均）を測定し、免疫学的作用及び内分泌学的作用について検討した。なお、採血を初回投与 2、4 及び 6 週間後に実施し、テストステロン値を市販キットを用いた RIA により、抗 GnRH 抗体価²をトリチウム化ホルモン及び PEG 沈殿法を用いた RIA により測定した。対照として無投与群を設定した。

経時的な血清中テストステロン値を表 2 に示した。血清中テストステロンは全例から検出可能で、検討した週齢の動物における標準値の範囲内であった。いずれの時点においても、群間に有意差は認められなかった。

² 残存するトレース標識が 30%となる血清の希釈倍数として判定。希釈倍数の逆数として表示。

抗 GnRH 抗体価は全て検出限界 (20) 未満であった。これは、2-10-GnRH 類縁体・DT 結合物製剤の経口投与では免疫応答を刺激しなかったことを示唆している。

また、試験期間中に有害事象は認められなかった。

以上より、2-10-GnRH 類縁体・DT 結合物製剤の経口投与は、性成熟期の肥育豚の免疫系及び内分泌系に影響を与えないと考えられた。(参照 4、5)

表 2 豚における 2-10-GnRH 類縁体・DT 結合物製剤経口投与後の平均血清中テストステロン値 (単位: nmol/L)

試験群	投与後経過日数 (日)		
	14	28	42
対照群	2.4	3.6	4.1
投与群	4.6	4.0	3.2

n=6

④ 毒性試験

a. 急性毒性試験 (ラット)

ラット (SD 系、10 週齢、雌 5 匹/経口投与群、雌雄各 5 匹/皮下投与群) を用いた単回経口又は皮下投与 (いずれも 38 mg/kg 体重の 1 用量) による 2-10-GnRH 類縁体・DT 結合物の急性毒性試験を実施した。

結果を表 3 に示した。いずれの投与経路においても死亡は認められなかった。毒性徴候として皮下投与直後に一過性の赤色尿が認められたが、投与 14 日後の腎臓の剖検及び病理組織学的検査では関連した所見は認められなかった。LD₅₀ は 38 mg/kg 体重以上と考えられた。(参照 4、5)

表 3 ラットにおける 2-10-GnRH・DT 結合物の急性毒性

動物	投与経路	投与量	主な毒性徴候	LD ₅₀ (mg/kg 体重)
ラット (SD 系、10 週齢)	経口	38 (mg/kg 体重)	なし	> 38
	皮下		投与直後に赤色尿、 他なし	> 38
				> 38

b. 2 回投与毒性試験 (ラット、経口投与)

ラット (SD 系、6~8 週齢、雌雄各 5 匹/群) に 2-10-GnRH 類縁体・DT 結合物製剤を 4 週間隔で 2 回経口 (2-10-GnRH 類縁体・DT 結合物として 11.4、272 又は 462 µg/kg 体重) 投与した。なお、対照群には滅菌水及び溶媒を経口投与した。試験終了時 (初回投与 57/58 日後) に剖検を行った。検査項目として、一般状態、体重、摂餌量、最終投与後の血液学的検査、凝固系検査、血液生化学的検査、ホルモン分析及び尿検査を実施した。

その結果、本試験のいずれの投与群においても試験期間中に本製剤投与に起因すると考えられる毒性影響は認められなかった。(参照 4、5)

⑤ DTについて

2-10-GnRH 類縁体・DT 結合物を構成する DT は、グラム陽性菌 *Corynebacterium diphtheriae* 由来のジフテリア毒素（タンパク質）をホルムアルデヒドで無毒性化したものである。DT を含むヒト用ジフテリアワクチンは、3～4 か月齢の乳児に1 か月間隔で2～3 回皮下接種し、通常1 歳頃に追加接種されるということから安全性は高いと考えられる。（参照 4、5）また、本製剤で使用されている DT は欧州薬局方 DIPHTHERIA VACCINE (ADSORBED) の規格に適合しており、当該規格中で「ジフテリア毒素の欠失並びにトキソイドの不可逆性（Absence of toxin and irreversibility of toxoid）」が設定されており、毒素活性が認められてはならないと規定されている。したがって、本製剤に使用されている DT にはジフテリア毒素活性が認められないことが確認されている。（参照 3）

これらの羊を用いた静脈内投与試験並びにラット及び豚を用いた経口投与試験 [II. 1. (1)①～⑤] から、本製剤の主剤である 2-10-GnRH 類縁体・DT 結合物は、経口投与において、GnRH 様作用及び抗体応答を示さず、経口投与による毒性影響も認められないことから、ヒトの健康に影響を与えるものではないと判断した。

また、2-10-GnRH 類縁体・DT 結合物はペプチドである。ラット及び豚を用いた経口投与試験 [II. 1. (1)② b. 及び③] において、2-10-GnRH 類縁体・DT 結合物は免疫応答を刺激しなかったことから、本製剤を投与した牛由来の食品を介してヒトが 2-10-GnRH 類縁体・DT 結合物を経口摂取した場合には、2-10-GnRH 類縁体・DT 結合物は胃液中で小さなペプチド及びアミノ酸に分解され、その作用は消失することが示唆された。

(2) 添加剤

本製剤に使用されている添加剤のうち、アジュバントの一つは、植物からの抽出物、生体膜の構成物質の混合物であり、一部は既存添加物として使用されている。もう一つのアジュバントは、多糖類の誘導體で、高分子のため胃消化管の酵素で消化されず、腸管粘膜細胞に吸収されないことが報告されており、ヒトが毎日 2～3 g を経口摂取しても安全性に問題がないことが報告されている。保存剤は、ヒトの小児用ワクチンにも含有されており、EMEA では、家畜における半減期は明らかではないが、通常動物用ワクチンに用いられる用量でヒトに明白なリスクはないと考えられ、EU では、ワクチンの保存剤として 0.02%を超えない濃度で使用する限り MRL を設定する必要はないと評価されている。溶剤は、注射用医薬品の溶解・希釈剤として用いられているもので、EMA では、MRL の設定は不要と判断されている。（参照 2、4～13）

以上のことから、本製剤に含まれている添加剤については、その使用状況、既存の毒性評価及び本製剤の用法・用量を考慮すると、本製剤の含有成分として摂取した場合のヒトへの健康影響は無視できると考えられる。

2. 牛に対する安全性

(1) 牛に対する安全性試験①

肉用牛（交雑種、3 か月齢³、雌 3 頭/群）に本製剤を 3 週間隔で 2 回皮下投与 [0、1（常用量）又は 10（10 倍量）mL/頭/回：2-10-GnRH 類縁体・DT 結合物として 0、0.4 又は 4 mg/頭/回に相当] し、さらに第 2 回投与 8 週後に同量を 1 回それぞれ別の部位に皮下投与して、本製剤の安全性について検討した。各回の投与前、投与 7 及び 14 日後に採血し、約 3 か月間の観察期間終了後に剖検及び病理組織学検査を実施した。また、対照群には生理食塩液 10 mL/頭を投与した。

試験期間中、いずれの群にも死亡は認められなかった。

一般状態では、10 倍量投与群で初回投与 1~6 日後、第 2 回投与 1~3 日後及び第 3 回投与 1 日後に軽度の食欲減退が 1~2 頭にみられた。摂餌量は、10 倍量投与群で一過性の減少がみられた。体重については、両投与群とも対照群との比較で有意な差はみられなかった。

体温では、両投与群ともに各回の投与 3~7 日後まで高値又は高値傾向がみられた。

投与部位の観察では、両投与群ともに全例で腫脹、硬結及び熱感が認められた。各投与群の各回投与後の所見を表 4 に示した。膿瘍は、両投与群のいずれの回の投与部位でもみられなかった。

血液学的検査では、10 倍量投与群で第 2 及び第 3 回投与後に WBC の一過性の減少がみられた。

血液生化学的検査では、常用量投与群で第 3 回投与後に A/G 比及び BUN の低値がみられた。10 倍量投与群では、初回及び第 2 回投与後に LDH の高値及び Alb の低値が、第 2 回及び第 3 回投与後に TP 及び Glob の高値並びに A/G 比の低値がみられた。Alb、Glob、TP 及び A/G 比の変化は抗体産生に伴う変化であると考えられたが、BUN 及び LDH については、関連のある臨床症状等がみられなかったことから生物学的に意義のない変化と考えられた。

血中プロゲステロン濃度は全ての群で試験期間を通じで低値を維持し、大きな変動はみられなかった。これは、被験動物が 3 か月齢と性成熟前で、黄体が未発達であることによると考えられた。両投与群ともに初回投与 14 日後から血中抗 GnRH 抗体価の増加が確認された。

剖検では、全ての群の胸腹部器官に投与の影響はみられなかった。投与部位（皮下及び皮筋を含む。）における所見を表 4 に示した。筋層に変化はみられなかった。

臓器重量に投与の影響はみられなかった。

投与部位（皮下、皮筋並びに骨格筋を含む周辺組織を含む。）の病理組織学的検査の結果を表 4 に示した。皮下組織に細胞浸潤や壊死等の可逆性の反応性変化が認められた。筋層には投与の影響はみられなかった。投与 14 日後の第 3 回投与部位に異物（アジュバント様物質）の残存を示唆するようなシスト形成は確認されなかった。

以上より、本試験において、常用量投与群では、一過性の発熱及び投与部位反応がみ

³ 本製剤が投与される時期は、一般的に 4~6 か月齢になると推測されるが、性成熟が若干早いことを想定して投与時期を早めに設定される可能性があることから、設定された。

られたが、発熱は摂餌量及び体重に影響を及ぼすものではなく、投与部位反応は回復が確認されたことから、本製剤の常用量の臨床使用における牛に対する安全性に問題はないと考えられた。(参照 2、3、14)

表 4 2-10-GnRH 類縁体・DT 結合物各回皮下投与後の
投与部位の観察、剖検及び病理組織学的所見

試験群	第 1 回投与部位	第 2 回投与部位	第 3 回投与部位
10 倍量投与群	<観察> ・腫脹及び硬結：試験終了時まで回復せず。 ・熱感：投与 8 日後に回復 <剖検> ・皮下組織に赤褐色混濁域 <病理組織学的所見> ・皮下組織に細胞浸潤、線維化 (3/3 例)	<観察> ・腫脹及び硬結：試験終了時まで回復せず。 ・熱感：投与 8 日後に回復 <剖検> ・皮下組織に赤褐色混濁域 <病理組織学的所見> ・皮下組織に細胞浸潤、壊死、石灰化、肉芽腫様病変 (3/3 例)	<観察> ・腫脹及び硬結：試験終了時まで回復せず。 ・熱感：投与 2 日後に回復 <剖検> ・皮下組織に赤褐色混濁域 <病理組織学的所見> ・皮下組織に細胞浸潤、壊死、肉芽腫様病変 (3/3 例)
常用量投与群	<観察> ・腫脹及び硬結：投与 80 日後までに消失 ・熱感：投与 4 日後に回復 <病理組織学的所見> ・皮下組織に細胞浸潤 (2/3 例)	<観察> ・腫脹及び硬結：投与 40 日後までに消失 ・熱感：投与 6 日後に回復 <病理組織学的所見> ・皮下組織に細胞浸潤 (1/3 例)	<観察> ・腫脹及び硬結：投与 14 日後でも回復せず。 ・熱感：投与 2 日後に回復 <剖検> ・皮下に赤褐色混濁域がみられたが、筋層に変化はみられなかった。 <病理組織学的所見> ・皮下組織に細胞浸潤、壊死、石灰化 (3/3 例)

(2) 牛に対する安全性試験②<参考資料 4>

上記試験 [II. 2. (1)] では、3 か月齢の牛を用いて実施されたが、3 か月齢の牛では GnRH 受容体の反応性が低く、GnRH 作用及び抗 GnRH 作用の検出力が低下することから、性成熟後の牛を用いて本製剤の有効性に起因する抗 GnRH 作用による有害反応について検討した。

2~6 回の分娩歴を有し、直近の分娩 88~201 日後の泌乳牛 (Swiss Fleckvieh 種、雌 11 頭) に本製剤を 4 週間隔で 2 回皮下投与 [1 mL (常用量) /頭:] し、発情行動、一般状態 (体温、心拍数、呼吸速度及び泌乳量) 及び投与部位の観察、血中プロゲステロン濃度、エストロゲン濃度及び血中抗 GnRH 抗体価の測定並びに超音波診断装置を用いた卵胞及び黄体の観察を実施した。また、第 2 回投与 26 週後からブセレリン⁵の筋肉

⁴ 対照群の設定のない非 GLP 試験であり、[II. 2. (1)] の安全性試験と試験設定が異なることから、安全性試験として参考資料とした。

⁵ Buserelin : GnRH 誘導体制剤

内投与、プロゲステロン経腔投与及びクロプロステノール⁶の筋肉内投与を処置し、その後、人工授精を行った。人工授精は妊娠が成立するまで繰り返した。

発情行動は、全例で第2回投与26週後の人工授精開始前までみられなかった。

一般状態では、投与48時間後までに一過性の発熱、心拍数増加及び呼吸速迫がみられたのみで、その他投与に起因する影響はみられなかった。

投与部位の観察では、腫脹及び疼痛がみられたが、投与2週間後には軽減した。

血中プロゲステロン濃度は第2回投与3週間までに11例中7例で減少し、第2回投与10～15週間まで低値を持続したが、血中エストロゲン濃度に投与の影響はみられなかった。

血中抗GnRH抗体価は、第1回投与2～3週間後から増加し、第2回投与2週後にピークに達した。

卵胞は、直径5 mm以下のものでは投与の影響はみられなかったが、直径6～9 mmのものは第2回投与3～13週間後で減少し、さらに直径9 mmを超える大きさのものは11例中10例で第2回投与7～16週間後に全くみられなかった。

初回の人工授精の結果、11例中10例で妊娠が確認され、残りの1例も2回目の人工授精で妊娠が成立した。

以上のことから、本製剤の投与により発情行動は抑制されたが、その間一過性の発熱、心拍数増加、呼吸速迫及び投与部位反応が認められたのみであり、生殖周期の抑制は可逆的であった。(参照2、15)

(3) 牛に対する安全性試験③<参考資料7>

牛(様々な純血種及び交雑種、5～7か月齢、雄12頭及び雌11頭)に表5の設定でGnRH類縁体・DT結合物製剤を単回又は2週間隔で3回それぞれ別の部位に皮下投与[1 mL(常用量)/頭/回: GnRH類縁体・DT結合物として0.5 mg/頭/回]し、安全性試験が実施された。観察期間は単回投与群で投与35日後(試験35日)まで、反復投与及び対照群で初回投与42日後(試験42日)までとし、一般状態及び投与部位の観察並びに体温及び体重測定を実施して、単回投与群のみ投与35日後の投与部位の病理組織学的検査を行った。

一般状態では、反復投与群の第2回投与後の1例に呼吸困難、呼吸速迫、発咳、下痢及び沈鬱状態が、別の1例に呼吸速迫、発咳及び感情鈍磨がみられた。

体温は、両投与群で投与後一過性の上昇がみられた。

体重は、反復投与群の1例を除き観察期間の間増加した。

投与部位については、両投与群の全例で腫脹及び硬結がみられたが熱感及び疼痛を伴わなかった。この投与部位反応は、初回投与部位では、単回投与群では8例中5例で、反復投与群では8例中7例で観察期間終了時(それぞれ初回投与35及び42日後)にも消失しなかった。反復投与群の第2回及び第3回投与部位では、8例中5例で投与28日後、8例中8例で投与14日後においても消失が確認されなかった。

⁶ Cloprostenol: 代謝性ホルモン剤。

⁷ 本製剤の濃度と異なるもの(GnRH類縁体・DT結合物として0.5 mg、本製剤は0.4 mg)を用いたことから参考資料とした。アジュバントは本製剤と同一である。

病理組織学的検査では、単回投与群の投与 35 日後の投与部位全例に慢性炎症を示す所見が観察された。(参照 2、16)

表 5 牛を用いた安全性試験の設定

試験群	治験薬	投与量 (mL/頭)	投与部位	投与時期	動物数 (頭)
対照群	生理食塩液	1	皮下	第 1 回投与：試験 0 日 第 2 回投与：試験 14 日 第 3 回投与：試験 28 日	7
単回投与群	2-10-GnRH 類縁体・DT 結合物製剤			試験 0 日	8
反復投与群				第 1 回投与：試験 0 日 第 2 回投与：試験 14 日 第 3 回投与：試験 28 日	8

(4) 牛に対する臨床試験⁸

牛（交雑種、9～15 か月齢、雌 45 頭/群）を用いて、本製剤の臨床試験が表 6 の要領で 2 施設（A 及び B）において実施され、一般状態、体重及び投与部位の異常から本製剤の安全性について検討した。

その結果、一般状態及び体重に投与に起因する異常は認められなかった。また、被験群では、投与部位反応がみられたが、全症例で分泌物は伴わず、いずれの投与時点においても投与 5～10 週後までに回復した。

これらのことから、本製剤は臨床使用上の牛に対する安全性に問題はないと考えられた。(参照 2、17)

表 6 牛を用いた臨床試験の要領

試験群	施設	治験薬	投与量 (mL/頭)	投与部位	投与時期	動物数 (頭)
対照群	A	生理食塩液	1	頸部皮下	第 1 回：試験 0 日	45
	B				第 2 回：第 1 回投与 4 週後 ^a	45
被験群	A	本製剤			第 3 回：第 2 回投与 7.5 か月後 ^b	45
	B					45

a：試験 28 日、b：試験 252 日

⁸ 本試験において、試験 21～41 日の期間から試験 252～272 日の期間まで、何らかの発情行動を示した牛の割合の推定値は被験群で有意に低く、血中プロゲステロン濃度は試験 42 日以降有意に減少した。抗 GnRH 抗体価は試験 42 日にピークを示した後、経時的に低下し、第 3 回投与後には再度上昇した。

III. 食品健康影響評価

本製剤は、2-10-GnRH 類縁体・DT 結合物を免疫原として免疫学的機序により GnRH の作用を抑制するものである。

羊を用いた静脈内投与試験、ラット及び豚を用いた経口投与試験から、本製剤の主剤である 2-10-GnRH 類縁体・DT 結合物は、経口投与において、GnRH 様作用及び抗体応答を示さず、毒性影響も認められないことから、ヒトの健康に影響を与えるものではないと判断した。

また、2-10-GnRH 類縁体・DT 結合物はペプチドである。豚を用いた経口投与試験 [II. 1. (1)③] において、2-10-GnRH 類縁体・DT 結合物は免疫応答を刺激しなかったことから、本製剤を投与した牛由来の食品を介してヒトが 2-10-GnRH 類縁体・DT 結合物を経口摂取した場合には、2-10-GnRH 類縁体・DT 結合物は胃液中で小さなペプチド及びアミノ酸に分解され、その作用は消失することが示唆された。

本製剤に含まれている添加剤については、その使用状況、既存の毒性評価及び本製剤の用法・用量を考慮すると、本製剤の含有成分として摂取した場合のヒトへの健康影響は無視できると考えられる。

牛に対する安全性試験及び臨床試験において、常用量の投与では、投与部位反応等がみられたが、一般状態及び体重について投与に起因する異常は認められなかった。

以上のことから、本製剤が適切に使用される限りにおいては、食品を通じてヒトの健康に影響を与える可能性は無視できると考えられる。

<別紙：検査値等略称>

略称等	名称
A/G 比	アルブミン/グロブリン比
Alb	アルブミン
BUN	血中尿素窒素
EM(E)A	欧州医薬品庁
DT	ジフテリアトキソイド
Glob	グロブリン
GnRH	性腺刺激ホルモン放出ホルモン
LD ₅₀	半数致死量
LDH	乳酸脱水素酵素
LH	黄体形成ホルモン
MRL	最大残留基準値
PEG	ポリエチレングリコール
RIA	放射免疫測定法
TP	総タンパク質
WBC	白血球数

<参照>

1. ゾエティス・ジャパン株式会社. 食品健康影響評価資料「ボプリバ」：動物用医薬品製造販売承認申請書（非公表）
2. ゾエティス・ジャパン株式会社. 食品健康影響評価資料「ボプリバ」：動物用医薬品製造販売承認申請書添付資料概要（非公表）
3. ゾエティス・ジャパン株式会社. 食品健康影響評価資料「ボプリバ」：ヒアリング指摘回答書（非公表）
4. ゾエティス・ジャパン株式会社. 食品健康影響評価資料「ボプリバ」：動物用医薬品製造販売承認申請書添付資料概要別添（非公表）
5. 食品安全委員会. 「食品健康影響評価結果の通知について」（平成21年9月10日付け府食第871号）：別添 動物用医薬品評価書「性腺刺激ホルモン放出ホルモン・ジフテリアトキソイド結合物を有効成分とする豚の注射剤（インプロバック）」 2009年9月
6. 既存添加物名簿（平成8年4月16日厚生省告示第120号）
7. 丸善総合食品辞典. 五十嵐脩、小林彰夫、田村真八郎編. 丸善株式会社. 1998年
8. EMA: Substances considered as not falling within the scope of Regulation (EC) No. 470/2009, with regard to residues of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. EMA/CVMP/519714/2009-Rev.25, 15 January 2015
9. 医薬品添付文書、2013年10月改訂（第16版）
10. 医薬品添付文書、2015年2月改訂（第13版）
11. EMEA: Committee for Veterinary Medicinal Products, Summary Report. 1996.
12. EU: COMMISSION REGULATION (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. Official Journal of the European Union, L15, 20.1.2010
13. 第十六改正日本薬局方解説書, 廣川書店, 2011年
14. ゾエティス・ジャパン株式会社. 食品健康影響評価資料「ボプリバ」：動物用医薬品製造販売承認申請書添付資料9-1（非公表）
15. ゾエティス・ジャパン株式会社. 食品健康影響評価資料「ボプリバ」：動物用医薬品製造販売承認申請書添付資料9-2（非公表）
16. ゾエティス・ジャパン株式会社. 食品健康影響評価資料「ボプリバ」：動物用医薬品製造販売承認申請書添付資料9-3（非公表）
17. ゾエティス・ジャパン株式会社. 食品健康影響評価資料「ボプリバ」：動物用医薬品製造販売承認申請書添付資料14-1（非公表）