

雄各 40 匹（投与 26、52 及び 78 週後に一群雌雄各 10 匹を中間と殺）を用いた混餌（原体：0、30、100、300 及び 1,000 ppm：平均検体摂取量は表 29 参照）投与による 2 年間慢性毒性／発がん性併合試験が実施された。

表 29 2 年間慢性毒性／発がん性併合試験（ラット）の平均検体摂取量

| 投与群                     |   | 30 ppm | 100 ppm | 300 ppm | 1,000 ppm |
|-------------------------|---|--------|---------|---------|-----------|
| 平均検体摂取量<br>(mg/kg 体重/日) | 雄 | 1.06   | 3.60    | 10.9    | 37.6      |
|                         | 雌 | 1.28   | 4.38    | 13.2    | 49.1      |

各投与群で認められた毒性所見は表 30 に示されている。

血液学的検査、血液生化学的検査及び尿検査において、投与群のいくつかの検査項目において、対照群との間に有意差がみられたが、いずれの変動も投与期間あるいは用量との関連性がないことから、検体投与による影響ではないと考えられた。

眼検査においても検体投与に起因すると思われる異常は認められなかった。

臓器重量において、1,000 ppm 投与群雌において、脳の絶対及び比重量の増加が認められたが、これに対応した形態学的変化または神経症状の発現はみられなかったため、検体投与に起因するものとは考えなかった。

剖検時、1,000 ppm 投与群の雄（主群）で精巣に結節・腫瘤の発生頻度が有意に高く、これらの病変は病理組織学的検査の結果、精巣間細胞腫であった。この腫瘍の発生頻度（11/50、22%）は、試験実施施設の本系統のラットの背景データ（9/304、3%）より明らかに高く、検体投与の影響であると考えられた（表 31 参照）。衛星群においては、78 週時に間細胞過形成の発生頻度が増加した。

300 ppm 以上投与群の雄（主群）では前立腺炎及び包皮腺炎の発生頻度が減少し、これは本剤の殺菌作用によるものと考えられた。

本試験において、300 ppm 以上投与群の雄に赤色眼脂、摂餌量増加等が、1,000 ppm 以上投与群の雌に消瘦、体重増加抑制、摂餌量増加等が認められたことから、無毒性量は雄で 100 ppm（3.60 mg/kg 体重/日）、雌で 300 ppm（13.2 mg/kg 体重/日）であると考えられた。1,000 ppm 投与群の雄で精巣間細胞腫が増加した。（参照 45）

表 30 2 年間慢性毒性／発がん性併合試験（ラット）で認められた毒性所見

| 投与群        | 雄  | 雌  |
|------------|--|--|
| 1,000 ppm  | <ul style="list-style-type: none"> <li>・体重増加抑制</li> <li>・食餌効率低下</li> <li>・T.Chol 減少</li> <li>・精巣結節・腫瘤、精巣萎縮</li> <li>・肝及び腎比重量増加</li> <li>・精巣間細胞腫</li> <li>・精巣間細胞過形成(衛星群; 78 週間投与終了時のみ)、精細管萎縮(最終と殺のみ)</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>・体重増加抑制</li> <li>・摂餌量増加、食餌効率低下</li> <li>・TP、Glu、Glob 及び T.Chol 減少</li> <li>・卵巣絶対及び比重量増加、副腎比重量増加</li> <li>・削瘦</li> </ul> |
| 300 ppm 以上 | <ul style="list-style-type: none"> <li>・赤色眼脂</li> <li>・摂餌量増加</li> <li>・前立腺炎減少、包皮腺炎減少</li> </ul>  | 300 ppm 以下毒性所見なし   |
| 100 ppm 以下 | 毒性所見なし   |  |

表 31 2 年間慢性毒性/発がん性併合試験 (ラット) で認められた精巣間細胞腫発生数

| 性別        |        | 雄  |    |     |     |       |
|-----------|--------|----|----|-----|-----|-------|
| 投与群 (ppm) |        | 0  | 30 | 100 | 300 | 1,000 |
| 主群        | 検査動物数  | 15 | 10 | 15  | 21  | 10    |
|           | 死亡動物   | 0  | 0  | 0   | 0   | 1     |
|           | 検査動物数  | 35 | 40 | 35  | 29  | 40    |
|           | 最終と殺動物 | 2  | 4  | 3   | 2   | 10↑   |
|           | 検査動物数  | 50 | 50 | 50  | 50  | 50    |
|           | 全動物    | 2  | 4  | 3   | 2   | 11↑   |

Fisher 直接確率法、↑: p<0.01

### (3) 18 カ月間発がん性試験 (マウス)

ICR マウス[一群雌雄各 70 匹: 主群一群雌雄各 50 匹、衛星群一群雌雄各 20 匹 (投与 52 週後に一群雌雄各 10 匹をと殺し、残りの 10 匹は処分した。)]を用いた混餌 (原体: 0、50、150 及び 500 ppm: 平均検体摂取量は表 32 参照) 投与による 18 カ月間発がん性試験が実施された。

表 32 18 カ月間発がん性試験 (マウス) の平均検体摂取量

| 投与群                     |   | 50 ppm | 150 ppm | 500 ppm |
|-------------------------|---|--------|---------|---------|
| 平均検体摂取量<br>(mg/kg 体重/日) | 雄 | 4.86   | 15.2    | 59.7    |
|                         | 雌 | 5.33   | 15.7    | 57.9    |

各投与群で認められた毒性所見は表 33 に示されている。

500 ppm 投与群の雄において皮膚病変（脱毛、びらん、痂皮、出血、創傷）の発生頻度が投与 38 週時まで有意に高かった。皮膚病変はマウスにおける 90 日間亜急性毒性試験[12. (3)]の高用量群雄において発生頻度の増加が認められており、検体投与の影響と考えられた。雌 150 ppm 以上の群においても皮膚病変や脱毛の総発生頻度が増加したが、発生時期が投与 38 週以降に発現したこと、発生時期は一時的であったこと、試験施設での背景データ内であることから、雄での皮膚病変とは異なるパターンを示した。雌での増加は対照群の頻度が低かったことによる偶発的な増加と考え、投与に関連した変化とは考えられなかった。

腫瘍性病変において、検体投与に関連して発生頻度が増加した腫瘍はなかった。

本試験において、500 ppm 投与群の雄で皮膚病変、死亡率増加、体重増加抑制等が、150 ppm 以上投与群の雌で体重増加抑制、食餌効率低下が認められたので、無毒性量は雄で 150 ppm (15.2 mg/kg 体重/日)、雌で 50 ppm (5.33 mg/kg 体重/日) であると考えられた。発がん性は認められなかった。（参照 46）

表 33 18 カ月間発がん性試験（マウス）で認められた毒性所見

| 投与群           | 雄  | 雌  |
|---------------|--|--|
| 500 ppm       | <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 皮膚病変（脱毛、びらん、痂皮、出血、創傷）</li> <li>・ 死亡率増加</li> <li>・ 体重増加抑制、摂餌量増加、食餌効率低下</li> <li>・ 皮膚炎</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 摂餌量増加</li> </ul>                    |
| 150 ppm<br>以上 | <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 150 ppm 以下毒性所見なし</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 体重増加抑制</li> <li>・ 食餌効率低下</li> </ul> |
| 50 ppm        |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 毒性所見なし</li> </ul>                   |

#### 14. 生殖発生毒性試験

##### (1) 2 世代繁殖試験（ラット）

SD ラット（一群雌雄各 24 匹）を用いた混餌（原体：0、50、150 及び 500 ppm：平均検体摂取量は表 34 参照）投与による 2 世代繁殖試験が実施された。

表 34 2 世代繁殖試験（ラット）における平均検体摂取量（mg/kg 体重/日）

| 投与群  |   | 50 ppm | 150 ppm | 500 ppm |
|------|---|--------|---------|---------|
| P 世代 | 雄 | 3.41   | 10.3    | 43.7    |
|      | 雌 | 3.91   | 12.1    | 41.8    |

|                   |   |      |      |      |
|-------------------|---|------|------|------|
| F <sub>1</sub> 世代 | 雄 | 4.11 | 12.4 | 41.2 |
|                   | 雌 | 4.49 | 13.8 | 46.9 |

親動物及び児動物における各投与群で認められた毒性所見は、それぞれ表 35 に示されている。

親動物では、生存率、一般状態、病理学的検査、臓器重量に検体投与の影響は認められなかった。また、交尾率、妊娠率、出産率、妊娠期間に異常はなく、繁殖能に検体投与による影響は認められなかった。

児動物では、各世代とも産児数、一般状態、生存率及び剖検所見には検体投与の影響は認められなかった。500 ppm 投与群 F<sub>1</sub> 児動物において体重の増加抑制が認められた。

本試験において、親動物雄の P 世代では 150 ppm 以上投与群、F<sub>1</sub> 世代では 50 ppm 以上投与群、雌の P 及び F<sub>1</sub> 世代では 500 ppm 投与群で、児動物の F<sub>1</sub> 世代の雌雄では 500 ppm 投与群で体重増加抑制等が認められ、児動物の F<sub>2</sub> 世代では投与による影響が認められなかったので、無毒性量は親動物雄の P 世代で 50 ppm (3.41 mg/kg 体重/日)、F<sub>1</sub> 世代で 50 ppm 未満、雌で 150 ppm (P 雌 : 12.1 mg/kg 体重/日、F<sub>1</sub> 雌 : 13.8 mg/kg 体重/日)、児動物の無毒性量は F<sub>1</sub> 世代で 150 ppm (雄 : 10.3 mg/kg 体重/日、雌 : 12.1 mg/kg 体重/日)、F<sub>2</sub> 世代で 500 ppm (雄 : 41.2 mg/kg 体重/日、雌 : 46.9 mg/kg 体重/日) であると考えられた。繁殖能に対する影響は認められなかった。(参照 47)

表 35 2 世代繁殖試験 (ラット) で認められた所見

|     | 投与群        | 親 : P、児 : F <sub>1</sub> |                      | 親 : F <sub>1</sub> 、児 : F <sub>2</sub> |                      |
|-----|------------|--------------------------|----------------------|--|----------------------|
|     |            | 雄                        | 雌                    | 雄                                      | 雌                    |
| 親動物 | 500 ppm    |                          | ・ 体重増加抑制             |  | ・ 体重増加抑制             |
|     | 150 ppm 以上 | ・ 体重増加抑制<br>・ 摂餌量減少      | 150 ppm 以下<br>毒性所見なし |  | 150 ppm 以下<br>毒性所見なし |
|     | 50 ppm 以上  | 50 ppm において<br>毒性所見なし    |                      | ・ 体重増加抑制<br>・ 摂餌量減少                    |                      |
| 児動物 | 500 ppm    | ・ 体重増加抑制                 | ・ 体重増加抑制             | 500 ppm 以下毒性所見なし                       |                      |
|     | 150 ppm 以下 | 毒性所見なし                   |                      |  |                      |

(2) 2 世代繁殖試験 (ラット) : 追加試験

SD ラット（一群雌雄各 24 匹）を用いた混餌（原体：0、15 及び 30 ppm：平均検体摂取量は表 36 参照）投与による 2 世代繁殖試験が実施された。先に実施した繁殖試験 [14. (1)]（0、50、150 及び 500 ppm 用量で実施）において、最低用量の 50 ppm 投与群雄 F<sub>1</sub> にも体重増加抑制及び摂餌量減少が認められたため、無毒性量が得られなかった。そのため、本試験では無毒性量を得るために、用量を減じて試験群を設定した。

表 36 2 世代繁殖試験（ラット）における平均検体摂取量（mg/kg 体重/日）

| 投与群               |   | 15 ppm | 30 ppm |
|-------------------|---|--------|--------|
| P 世代              | 雄 | 1.07   | 2.18   |
|                   | 雌 | 1.19   | 2.44   |
| F <sub>1</sub> 世代 | 雄 | 1.25   | 2.52   |
|                   | 雌 | 1.41   | 2.82   |

親動物において、いずれの世代においても生存率、一般状態、体重、摂餌量、臓器重量、病理学的検査に検体投与の影響はなかった。交尾率、妊娠率、妊娠期間に異常はなく、繁殖能に関して検体投与の影響は認められなかった。

児動物において、いずれの世代においても産児数、性比、生存率、一般状態に異常は認められなかった。体重では 15 ppm 投与群（F<sub>1</sub>：雌雄）の 7 日以降及び 30 ppm 投与群（F<sub>1</sub>：雄）の 21 日以降に有意な低値が認められたが、用量相関性がないこと、F<sub>2</sub> 世代には観察されなかったこと、また先の試験 [14. (1)] では 50 及び 150 ppm 投与群で対照群と差がなかったことから、検体投与とは関連のない偶発的な変動と考えられた。

本試験において、30 ppm 投与群の親動物及び児動物において検体投与の影響は認められなかったので、無毒性量は親動物及び児動物の雌雄に対して 30 ppm（P 雄：2.18mg/kg 体重/日、P 雌：2.44 mg/kg 体重/日、F<sub>1</sub> 雄：2.52 mg/kg 体重/日、F<sub>1</sub> 雌：2.82 mg/kg 体重/日）であると考えられた。繁殖能に対する影響は認められなかった。（参照 48）

### （3）発生毒性試験（ラット）①

SD ラット（一群雌 24 匹）の妊娠 6~15 日に強制経口（原体：0、3、30 及び 150 mg/kg 体重/日、溶媒：1%CMC-Na）投与して発生毒性試験が実施された。

母動物では、150 mg/kg 体重/日投与群において自咬行動、四肢の腫脹、四肢または腹部の咬傷が見られ（8 例）、5 例が死亡した。同群においては体重増加抑制、投与期間中は摂餌量の減少が認められた。30 mg/kg 体重/日投与群においても体重増加抑制が認められた。剖検所見、黄体数、着床数、生存胎児数、死亡胚・児数、胎児体重、胎児の性比に検体投与の影響は認められ

なかった。

胎児では、各群に奇形及び変異が散見されたが、その発生頻度及び奇形及び変異胎児をもつ腹の頻度に、対照群との差は認められなかった。

本試験において、母動物では 30 mg/kg 体重/日投与群で体重増加抑制、胎児では 150 mg/kg 体重/日投与群で検体投与の影響は認められなかったので、無毒性量は母動物で 3 mg/kg 体重/日、胎児で 150 mg/kg 体重/日であると考えられた。催奇形性は認められなかった。（参照 49）

#### （4）発生毒性試験（ラット）②

Wistar ラット（17～19 匹/群）の妊娠 7 日～出産後 21 日に強制経口（0、125、250、500、1,000mg/kg 体重/日）投与して発生毒性試験が実施された。各群約半数の雌を妊娠 20 日に帝王切開し、残りの半数は出産後 21 日に屠殺して母動物に及ぼす影響と胎児/哺育児に及ぼす影響を調べた。

母動物では、1,000mg 投与群で投与開始直後に体重増加抑制と摂餌量低下が認められ、妊娠期間が有意に短縮した。分娩後は、500mg 以上投与群で児を食殺する母ラットの頻度が上昇し、哺育率が有意に低下した。

胎児では、死亡吸収胚数や体重に検体投与の影響は認められなかった。

哺育児では、1,000mg 投与群において生後 1 週間までの体重に有意な低値が認められたが身体発達は対照群と同等であった。奇形や変異を有する胎児/哺育児の発生頻度に検体投与の影響は認められなかった。

本試験の無毒性量は母動物で 250mg/kg 体重/日、児動物で 500mg/kg 体重/日であると考えられた。催奇形性は認められなかった。（参照 102）

#### （5）発生毒性試験（ウサギ）

日本白色種ウサギ（一群各雌 16 匹）の妊娠 6～18 日に強制経口（原体：0、250、500、1,000 及び 2,000 mg/kg 体重/日、溶媒：1%CMC）投与して発生毒性試験が実施された。

母動物ではいずれの投与群においても、一般状態、体重、摂餌量、剖検及び臓器重量に検体投与の影響は認められなかった。また、黄体数、着床数、死亡胚・児数、生存胎仔数、胎盤重量に検体投与の影響は認められなかった。

胎児では、胎児体重、生存胎児数、胎児の性比、奇形を有する胎児の発生頻度に検体投与の影響は認められなかった。

本試験において、いずれの投与群においても検体投与の影響が認められなかったので、母動物及び胎児に対する無毒性量は 2,000 mg/kg 体重/日であると考えられた。催奇形性は認められなかった。（参照 50）

### 1.5. 遺伝毒性試験

オキシリニック酸の細菌を用いた DNA 修復試験及び復帰突然変異試験、チャイニーズハムスター肺由来培養細胞 V79 を用いた遺伝子突然変異試験、

チャイニーズハムスター肺由来培養細胞 CHL を用いた染色体異常試験、ラット肝細胞を用いた不定期 DNA 合成試験、マウス骨髄細胞を用いた小核試験、及びマウス骨髄細胞を用いた姉妹染色体交換試験が実施された。試験結果は表 37 に示されている。

細菌を用いた DNA 修復試験及び復帰突然変異試験、チャイニーズハムスター肺由来培養細胞 CHL を用いた染色体異常試験において陽性を示した。作用メカニズムとしては、オキシリニック酸の抗菌活性である DNA gyrase 阻害に起因していると考えられた。DNA 修復試験については、阻害を受けた DNA gyrase-DNA 複合体に対する修復能の差が野生株と修復欠損株の生育の差となって現れ、復帰突然変異試験については、DNA 合成阻害によって誘導される SOS 修復系を介して間接的に突然変異を誘発したと考えられる。したがって、オキシリニック酸及びその代謝物が DNA に直接作用して DNA 損傷や突然変異を誘発している可能性は低いと考えられた。一方、オキシリニック酸は哺乳動物（真核）細胞が有する DNA topoisomerase II に対しては阻害活性がないか、極めて弱いため、細菌にみられる DNA gyrase 阻害類似の機構により哺乳動物細胞に対して変異原性を示す可能性は極めて低いと考えられた。オキシリニック酸は哺乳動物細胞に対して *in vitro* で突然変異を誘発せず、*in vitro* 及び *in vivo* において DNA 損傷性も示さなかった。*in vitro* では 2.5 mM の高濃度で弱い染色体異常誘発性を示したが、充分高用量まで試験された *in vivo* の小核試験では陰性であったことから、生体で問題となるものではないと考えられた。（参照 51~58）

表 37 遺伝毒性試験概要（原体）

| 試験              |                     | 対象  | 処理濃度・投与量   | 結果                      |
|-----------------|---------------------|---|--|-------------------------|
| <i>in vitro</i> | DNA 修復試験            | <i>Bacillus subtilis</i><br>(M45, H17 株)  | 0.05~5 µg/ディスク<br>(+/- S9)                             | 陽性<br>(+/- S9)          |
|                 | 復帰突然変異試験            | <i>Salmonella typhimurium</i><br>(TA98, TA100, TA102, TA1535, TA1537 株)<br><i>Escherichia coli</i><br>(WP2 <i>uvrA</i> 株) | 0.05~5 µg/プレート<br>(+/- S9)                             | 陽性<br>TA102<br>(+/- S9) |
|                 | 遺伝子突然変異試験           | チャイニーズハムスター肺由来培養細胞 (V79)  | $1 \times 10^{-3} \sim 3 \times 10^{-5}$ M<br>(+/- S9) | 陰性                      |
|                 | 染色体異常試験             | チャイニーズハムスター肺由来培養細胞 (CHL)  | 0.63~2.5 mM (-S9)<br>1.25~5 mM (+S9)                   | 陽性<br>(-S9)             |
|                 | 不定期 DNA 合成 (UDS) 試験 | SD ラット肝細胞   | 3~300 µg/mL  | 陰性                      |

|                |                     |                |  |    |
|----------------|---------------------|----------------|--|----|
|                | 不定期 DNA 合成 (UDS) 試験 | SD ラット肝細胞      | 100, 300 µg/mL                           | 陰性 |
| <i>in vivo</i> | 小核試験                | ddY マウス (骨髄細胞) | 雄: 0, 375, 750, 1,500 mg/kg 体重 (単回腹腔内投与) | 陰性 |
|                | 姉妹染色体交換試験           | ICR マウス (骨髄細胞) | 雌雄: 0, 375, 750, 1,500 mg/kg 体重 (単回経口投与) | 陰性 |

注) +/-S9 : 代謝活性化系存在下及び非存在下

原体混在物イソ体、*N*-メチル体、脱エチル体、アミド体及び脱メチレン体について、細菌を用いた復帰突然変異試験が実施された。試験結果は表 38 に示されているように、全ての原体混在物は TA102 株に対して変異原性陽性を示した。原体混在物の変異原性のメカニズムはオキシリニック酸と同質の DNA gyrase 阻害に起因した間接的な作用と考えられるものであり、また、その活性はオキシリニック酸より弱かった。(参照 59~63)

表 38 遺伝毒性試験概要 (原体混在物)

| 被験物質           | 試験       | 対象   | 処理濃度 (µg/プレート) | 結果   |
|----------------|----------|--|----------------|--|
| イソ体            | 復帰突然変異試験 | <i>S. typhimurium</i> (TA98, TA100, TA102, TA1535, TA1537 株)<br><i>E. coli</i> (WP2 <i>uvrA</i> 株) | 20~1000        | 陽性<br>TA1535, TA102, WP2 <i>uvrA</i> 株 (+S9) |
| <i>N</i> -メチル体 |          |  | 0.2~20         | 陽性<br>TA102 株 (+/-S9)                        |
| 脱エチル体          |          |  | 5~200          | 陽性<br>TA102 株 (+/-S9)                        |
| アミド体           |          |  | 100~3,000      | 陽性<br>TA102 株 (+/-S9)                        |
| 脱メチレン体         |          |  | 100~5,000      | 陽性<br>TA102 株 (+S9)                          |

注) +/-S9 : 代謝活性化系存在下及び非存在下

## 1.6. 微生物学的影響に関する特殊試験

### (1) ヒトの腸内細菌に対する 50%最小発育阻止濃度 (MIC)

ヒトの腸内細菌 10 菌種のうち、最も感受性が高かったのは *Escherichia coli* で、MIC<sub>50</sub> 値は 0.38 (日本人患者)、0.41 及び 0.43 (健康ヒトボランティア)



ア・好気性培養及び嫌気性培養)  $\mu\text{g/mL}$  であった。(参照 75)

## (2) 臨床分離菌に対する最小発育阻止濃度 (MIC)

平成 18 年度食品安全確保総合調査・動物用抗菌性物質の微生物学的影響調査 (平成 18 年 9 月～平成 19 年 3 月実施) においてヒト臨床分離株等に対するオキシリニック酸の約  $5 \times 10^6 \text{CFU/spot}$  における MIC が調べられている。結果は、表 39 に示されている。(参照 103)

表 39 オキシリニック酸の各菌種に対する MIC

| 菌名   | 株数 | 最小発育阻止濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ ) |         |
|--|----|-------------------------------|---------|
|  |    | Oxolinic Acid                 |         |
|  |    | MIC <sub>50</sub>             | 範囲      |
| 通性嫌気性菌   |    |                               |         |
| <i>E.coli</i>  | 30 | 0.25                          | 0.12-4  |
| <i>Enterococcus</i> species                                    | 30 | 64                            | 8->128  |
| 嫌気性菌   |    |                               |         |
| <i>Bacteroides</i> species                                     | 30 | 128                           | 32->128 |
| <i>Fusobacterium</i> species                                   | 20 | 64                            | 32-64   |
| <i>Bifidobacterium</i> species                                 | 30 | 128                           | 64->128 |
| <i>Eubacterium</i> species                                     | 20 | 128                           | 32-128  |
| <i>Clostridium</i> species                                     | 30 | 64                            | 64-128  |
| <i>Peptococcus</i> species / <i>Peptostreptococcus</i> species | 30 | 128                           | 16-128  |
| <i>Prevotella</i> species                                      | 20 | 32                            | 8-64    |
| <i>Lactobacillus</i> species                                   | 30 | >128                          | >128    |
| <i>Propionibacterium</i> species                               | 30 | 64                            | 64-128  |

調査された菌種のうち、最も低い MIC<sub>50</sub> が報告されているのは *E.coli* の 0.25  $\mu\text{g/mL}$  であった。

## 17. その他の試験

### (1) オキシリニック酸原体のラット精巣腫瘍の発現機序検討試験

オキシリニック酸原体をラットに 2 年間にわたり混餌投与したところ、最高用量である 1,000 ppm 投与群の雄で精巣間細胞腫の発生頻度が増加した。その発がん性は種特異的 (ラットのみ) 及び器官特異的 (精巣のみ) であり、その発がん性には閾値が存在した。また、オキシリニック酸原体は哺乳動物に対しては遺伝毒性がないことから、オキシリニック酸原体によるラット精巣間細胞腫の誘発は、非遺伝性の作用機序によるものと考えられた。この精

巣間細胞腫の発現機序を検討するため、以下の試験が実施された。

その結果、オキシリニック酸原体を投与したラットで増加した精巣間細胞腫は、本腫瘍を好発する動物種に対して、非常に高用量のオキシリニック酸原体を長期間投与したとき、精巣への直接作用ではなく、視床下部のドーパミン作動性神経系の活性化を介して LHRH 放出を促進した結果、下垂体前葉からの LH 放出を増加させ、この LH の慢性的な精巣への刺激によって生じた二次的発癌である可能性が高いと考えられた。（参照 64）

### 1) 雄ラットにおける血中黄体形成ホルモン (LH) 濃度に及ぼすオキシリニック酸原体投与の影響

#### ①オキシリニック酸原体の長期混餌投与による血中 LH 濃度への影響の検討

Wistar ラット（一群雄 8 匹）を用いて混餌（原体：0、100、1,000 及び 3,000 ppm：平均検体摂取量は表 40 参照）投与により 2 年間の毒性試験が実施された。

表 40 2 年間混餌投与試験（ラット）における平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)

| 用量群 (ppm) |   | 100 | 1,000 | 3,000 |
|-----------|---|-----|-------|-------|
| 平均検体摂取量   | 雄 | 4.2 | 42.9  | 145   |

1,000 及び 3,000 ppm 投与群において体重増加抑制が認められた。摂餌量に对照群との間に有意差はなかった。

投与終了時測定した精巣及び副生殖器（精巣上体、精嚢及び前立腺腹葉）の重量は、对照群との間に有意差はなかったものの、精巣の比重量が 3,000 ppm 群で増加傾向を示した。投与終了時の精巣間細胞腫の発生頻度は表 41 に示されている。

表 41 2 年間投与終了時精巣間細胞腫発生頻度

| 用量群 (ppm) | 0 | 100 | 1,000 | 3,000 |
|-----------|---|-----|-------|-------|
| 投与終了時生存数  | 5 | 7   | 8     | 6     |
| 精巣間細胞腫    | 2 | 1   | 3     | 3     |

投与開始後、4～5 週間に 1 回の頻度で無麻酔下で尾静脈から採血し、血清中 LH 及びテストステロン濃度をラジオイムノアッセイ法により測定した。对照群における血中 LH 及びテストステロン濃度は、加齢に伴って徐々に低下した。発がん性試験にて精巣間細胞腫の誘発が認められなかった用量群（100 ppm）では血中 LH 濃度は对照群とほぼ同様のレベルで推移した。一方、腫瘍が誘発された用量群（1,000 ppm）及びその 3 倍の用量群（3,000 ppm）では、軽度であるが对照群に比べ有意に高いレベルで

推移した。対照群に対する有意性は、特に投与約 45 週から 80 週において顕著であった。血中テストステロン濃度は 1,000 及び 3,000 ppm 投与群で高い傾向を示したが、統計学的有意差はなかった。

## ②オキシリニック酸原体投与による血中 LH 濃度上昇の可逆性の検討

Wistar ラット（一群雄 6 匹：投与開始時 41 週齢）に検体を混餌（原体：0 及び 3,000 ppm）投与により 1 カ月間投与した後、検体を含まない基礎飼料に戻し 4 週間飼育した。なお、①の試験にて、オキシリニック酸原体による血中 LH 濃度の上昇が、投与開始約 10 カ月以降に顕著であったので、高週齢の動物を用いた。

投与開始 1 カ月後及び基礎飼料に戻してから 2 及び 4 週後に無麻酔下で尾静脈から採血し、血中 LH 濃度をラジオイムノアッセイ法により測定した。

1 カ月間のオキシリニック酸原体投与により、血中 LH 濃度は有意に上昇した。その後基礎飼料を与えたところ、2 週間後には対照群のレベルに低下し、有意差はなくなった。従って、血中 LH 濃度の上昇はオキシリニック酸原体投与によるものであることが明らかとなり、その LH 上昇作用は速やかな可逆性を示すことが明らかとなった。

## 2) オキシリニック酸原体投与による血中 LH 濃度上昇の作用機序の検討

### ①血中 LH 消失率に及ぼすオキシリニック酸原体投与の影響の検討

Wistar ラット（一群雄 6 匹：投与開始時 41 週齢）に検体を混餌（原体：0 及び 3,000 ppm）投与により 1 カ月間投与した。投与終了時、麻酔下でラット LH (250 ng/kg 体重) を頸静脈より投与し、投与 1、3、6、10、20 及び 30 分後に頸静脈から採血 (0.5 mL) し、血清中 LH 濃度をラジオイムノアッセイ法で測定した。

LH 投与 10 分後までは対照群及び検体投与群ともに血中 LH 濃度は急激に減少し、その後は非常にゆるやかな減少に転じた。この血中 LH 消失率は両群間で差はなかった。

### ②下垂体前葉の LH 放出能に及ぼすオキシリニック酸原体投与の影響の検討

#### A) 去勢ラットにおける血中 LH 濃度に及ぼすオキシリニック酸原体投与の影響の検討

Wistar ラット（一群雄 6 匹：投与開始時 41 週齢または 44 週齢）に検体を混餌（原体：0 及び 3,000 ppm）投与により 1 カ月間投与した。投与終了後に、エーテル麻酔下で去勢し、去勢後 102 日間投与を継続した。また 41 週齢の雄ラットをエーテル麻酔下で去勢し、去勢後 3 週間のうち (44 週齢)、オキシリニック酸原体を 0 及び 3,000 ppm の用量で各用量群 6 匹に 1 カ月間混餌投与した。去勢の直前及び去勢後 3、7、14、

35 及び 102 日目に無麻酔下で尾静脈から採血し、LH 濃度及びテストステロン濃度をラジオイムノアッセイ法にて測定した。

対照群及びオキシリニック酸投与群ともに去勢によって血中テストステロン濃度は急激に低下した。一方、血中 LH 濃度は両群とも著しく上昇し、去勢後 14 日目でほぼ最大値に達した。血中 LH 濃度が最大値に達していない去勢後 3 日目では、対照群に比べ、オキシリニック酸投与群で血中 LH 濃度のより高い値が認められたが、最大値に達した以降では、オキシリニック酸投与によるさらなる上昇は認められなかった。

また、すでに去勢したラットにオキシリニック酸を投与しても、血中 LH 濃度の上昇は認められなかった。

#### B) 高濃度 LHRH 刺激による下垂体前葉の LH 放出に及ぼすオキシリニック酸投与の影響の検討

Wistar ラット (一群雄 6 匹: 投与開始時 41 週齢) に検体を混餌 (原体: 0 及び 3,000 ppm) 投与により 2 カ月間投与した。投与終了後、無麻酔下で尾静脈から採血し、1 µg/ラットの用量で LHRH を皮下投与し、LHRH 投与 60 分後に断頭採血し、LH 濃度をラジオイムノアッセイ法で測定した。

LHRH の投与前の血中 LH 濃度は、オキシリニック酸投与群で、対照群に比べ有意に高い値を示した。高濃度の LHRH 投与により血中 LH 濃度は両群ともに著しく上昇したが、両群間で有意な差はなかった。

#### ③ テストステロンのフィードバック抑制機序に及ぼすオキシリニック酸原体投与の影響の検討

##### A) 精巣のテストステロン産生能に及ぼすオキシリニック酸原体投与の影響の検討

Wistar ラット (一群雄 6 匹: 投与開始時 41 週齢) に検体を混餌 (原体: 0 及び 3,000 ppm) 投与により 2 カ月間投与した。投与終了後に、ラットを無麻酔下で断頭により採血致死させた。血清を採取し、テストステロン濃度を測定した。また、右側精巣について被膜を剥離して小片に切断し、テストステロン濃度を測定した。また、小片に切断した精巣を培養液のみ、または 100mIU/mL hCG を添加した培養液中にて、37°C (5% CO<sub>2</sub>-95% O<sub>2</sub> 飽和、湿度 100%) で 6 時間培養した後、培養液中のテストステロン濃度を測定した (いずれもラジオイムノアッセイ法で測定した)。

血中及び精巣中のテストステロン濃度はいずれにおいても、対照群とオキシリニック酸投与群との間に有意差は認められなかった。また、両群ともに精巣器官培養におけるテストステロン産生量は、培養液中に添加した hCG により増加した。hCG 非刺激下及び hCG 刺激下ともに、

テストステロン産生へのオキシリニック酸投与による影響は認められなかった。

### B) オキシリニック酸原体のアンドロゲン受容体への競合結合能の検討

Wistar ラット（一群雄 5 匹：試験開始時 14 週齢）に検体を混餌（原体：0 及び 3,000 ppm）投与により 2 カ月間投与した。投与終了後に、ラットをエーテル麻酔下で去勢し、去勢後 3 日目に前立腺腹葉を摘出し、速やかに細胞質分画を取り出して使用した。オキシリニック酸原体、抗アンドロゲン剤である酢酸シプロテロン及びフルタミドのエタノール溶液を、TEDMG（20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20% glycerol）緩衝液で希釈し、[<sup>3</sup>H]-DHT のアンドロゲン受容体に対する結合の競合剤として使用した。細胞質分画の一部（0.1 mL）と、[<sup>3</sup>H]-DHT（3×10<sup>-10</sup>M, 0.05 mL）、非標識 DHT（3×10<sup>-11</sup>~3×10<sup>-5</sup>M, 0.05 mL）、オキシリニック酸原体（3×10<sup>-9</sup>~3×10<sup>-4</sup>M, 0.05 mL）、フルタミド（3×10<sup>-9</sup>~3×10<sup>-4</sup>M, 0.05 mL）、酢酸シプロテロン（3×10<sup>-9</sup>~3×10<sup>-5</sup>M, 0.05 mL）または TEDMG 緩衝液 0.05 mL の存在下で 0~4°C で一晩インキュベートした。インキュベーション混合液中の放射活性を測定した。

非標識 DHT はアンドロゲン受容体への [<sup>3</sup>H]-DHT の結合を濃度依存的に阻害し、また、既に抗アンドロゲン活性があることが知られている酢酸シプロテロン及びフルタミドは明らかな結合能を示した。しかし、オキシリニック酸はアンドロゲン受容体への結合能を示さなかった。

### 3) オキシリニック酸原体投与による視床下部の LHRH 放出増加の作用機構の検討

#### ①雄ラットの血中 LH 濃度に及ぼす L-DOPA 投与の影響の検討

##### A) L-DOPA の単回経口投与による影響

Wistar ラット（一群雄 6 匹：投与開始時 13 週齢）に L-DOPA を 0 または 1,000 mg/kg 体重の用量で単回経口投与した。次に、L-DOPA を 0、8、40、200 または 1,000 mg/kg 体重の用量で各用量群雄ラット 6 匹に単回投与した。投与後、2、4、8 及び 24 時間後に断頭採血し、血清中 LH 濃度をラジオイムノアッセイ法にて測定した。

L-DOPA を 1,000 mg/kg 体重の用量で単回投与した時の血中 LH 濃度は、投与 4 時間後に L-DOPA 投与群の値は対照群に比べ有意に高い値を示したが、投与 8 時間後には対照群のレベルまで戻った。この経時的変化の検討から設定した最適時間（投与 4 時間後）に断頭採血し、L-DOPA の用量反応性を検討した結果、L-DOPA 8、40 及び 200 mg/kg 体重では有意な変化は認められなかったが、1,000 mg/kg 体重では血中 LH 濃度は有意に上昇した。

## B) L-DOPA の反復経口投与による影響

Wistar ラット(一群雄 8~11 匹:投与開始時 13 週齢)に L-DOPA を 0、500 または 1,000 mg/kg 体重の用量で連続 7 あるいは 14 日間反復経口投与した。最終投与 24 時間後、精巣、精巣上体、前立腺腹葉及び精嚢腺を摘出し、重量を測定した、解剖時体重も測定した。採血致死後、脳を摘出し、視床下部を分離しホモジナイズし、モノアミン(ドーパミン、ノルエピネフリン及びセロトニン)及び各々の代謝物を測定した。また、血清を分離し LH、プロラクチン及びテストステロン濃度を測定した。

L-DOPA 1,000 mg/kg 体重投与により対照群に比べ約 7%の体重増加抑制が認められた。また、同群では投与 7 及び 14 日後に前立腺重量の減少が認められた。1,000 mg/kg 体重投与群のその他の臓器重量及び 500 mg/kg 体重投与群では変化は認められなかった。

脳の視床下部におけるモノアミン測定では、ドーパミン及びその代謝物である DOPAC 及び HVA は、L-DOPA 1,000 mg/kg 体重投与群で 7 及び 14 日間投与ともに有意に増加した。500 mg/kg 体重投与群においても DOPAC 及び HVA は 14 日間投与で有意に増加し、7 日間投与でも増加傾向を示した。これらの結果はドーパミンの代謝回転率 (Turnover rate) が増加していることを示すものであった。ノルエピネフリンは 7 日間投与で 1,000 mg/kg 体重投与群のみ有意に増加したが、14 日間投与では有意な変化はなく、その代謝物も有意な変化は認められなかった。セロトニンは、その代謝物を含め有意な変化はなかった。

血中 LH 濃度は 7 及び 14 日間の L-DOPA 投与により有意に上昇した。血中テストステロン濃度は有意ではないものの上昇傾向を示し、一方、血中プロラクチン濃度は有意に低下した。

これらの結果より LH 濃度はドーパミン作動性神経を介していることが確認された。

## ②オキシリニック酸原体投与による血中 LH 濃度の上昇とドーパミン作動性神経系の関連の検討

### A) 血中プロラクチン濃度に及ぼすオキシリニック酸原体投与の影響

Wistar ラット(一群雄 6 匹:投与開始時 41 週齢)にオキシリニック酸原体を混餌(原体:0 及び 3,000 ppm)投与により 2 カ月間投与した。投与終了後、断頭採血し、プロラクチン濃度を測定した。

その結果、オキシリニック酸投与により、プロラクチン濃度は有意に減少した。

### B) オキシリニック酸原体投与による血中 LH 濃度の上昇に及ぼすドーパミン受容体阻害剤ハロペリドールの影響

Wistar ラット(一群雄 6 匹：投与開始時 41 週齢)にオキシリニック酸原体を混餌(原体：0 及び 3,000 ppm)投与により 1 カ月間投与した。投与終了後、無麻酔下で尾静脈から採血したのち、ハロペリドール(2 mg/kg 体重)を腹腔内投与した。ハロペリドール投与 4 時間後に断頭採血し、血中 LH 濃度及びプロラクチン濃度をラジオイムノアッセイ法により測定した。

対照群及びオキシリニック酸投与群ともに、ハロペリドール投与により、血中プロラクチン濃度は統計学的には有意ではないものの、約 1.5 倍に上昇した。この結果より、オキシリニック酸の血中 LH 濃度上昇作用はドーパミン作動性神経系を介していると考えられた。一方、オキシリニック酸投与による血中 LH 濃度の有意な上昇は、ハロペリドール投与により消失した。なお、ハロペリドール投与前は無麻酔下で採血したため、血中プロラクチン濃度は両群ともに高く、オキシリニック酸投与の影響は認められなかった。

#### C) 血中 LH 濃度に及ぼすオキシリニック酸原体及び L-DOPA の併用投与の影響

Wistar ラット(一群雄 6 匹：投与開始時 41 週齢)にオキシリニック酸原体を 3,000 ppm の用量で混餌投与により 1 カ月間投与したのち、オキシリニック酸投与継続下で L-DOPA を 500 mg/kg 体重の用量で 1 週間反復投与した。血中 LH 濃度の上昇が L-DOPA 投与と同じ機序によるものかを調べるために、オキシリニック酸投与前、L-DOPA 投与直前及び L-DOPA の反復投与 24 時間後に無麻酔下で尾静脈から採血した。さらにその後ハロペリドール(2 mg/kg 体重)を腹腔内投与し、その 4 時間後に断頭採血し、血中 LH 濃度をラジオイムノアッセイにて測定した。

その結果、オキシリニック酸の 1 カ月間投与により、血中 LH 濃度は有意に上昇した。これに加え、L-DOPA を 1 週間反復投与しても、血中の LH 濃度の更なる上昇は認められなかった。このとき、ハロペリドールを投与すると血中 LH 濃度は有意に低下した。

#### ③ 視索前野におけるドーパミン作動性神経系に及ぼすオキシリニック酸原体投与の影響の検討

Wistar ラット(一群雄 7 匹：投与開始時 33 週齢)にオキシリニック酸原体を混餌(原体：0 及び 3,000 ppm)投与により 1 カ月間投与し、脳内アミンをマイクロダイアリース法を用いて測定した。

対照群の動物では、ドーパミン含量は、灌流開始後徐々に減少し、90 分以降 180 分まではほぼ一定した値を示した。ドーパミン含量がほぼ安定している灌流後 90~120 分の 30 分間の灌流液について測定した結果、ドーパミン含量は、オキシリニック酸投与群で、対照群より有意に高い値を示

し、視索前野におけるドーパミン作動性神経に作用していると考えられた。

## (2) 幼若動物の関節軟骨への影響

キノロン系の抗菌剤に特徴的な関節への影響について検討したが、今回実施した試験では歩行異常や後肢のこわばりといった異常症状は確認できなかった。しかし、EUにおける本剤の評価に関する資料(EMEA サマリーレポート)に、イヌを用いた試験に関する評価が記載されている。それによると、3カ月齢のビーグル犬に、本剤を100及び500 mg/kg 体重/日の用量で14日間投与した時、多動性、異常歩行及び後肢のこわばりが認められ、病理組織学的検査で、主な関節の軟骨に変化が認められた。しかし、本剤を3カ月齢のビーグル犬に0、2、10及び50 mg/kg 体重/日の用量で4週間投与した試験では、臨床症状も、体重及び摂餌量の変化も認められず、関節軟骨に肉眼的にも組織学的異常も認められなかった。従って、無毒性量は50 mg/kg 体重/日と報告されている。

今回実施したイヌを用いた試験の無毒性量とEUの評価結果を総合的に考察し、今回のイヌの亜急性及び慢性毒性試験の無毒性量において、本剤が関節に影響を与えていた可能性は殆どないものと結論した。(参照 71)



### Ⅲ. 食品健康影響評価

参照に挙げた資料を用いて農薬及び動物用医薬品「オキシロニック酸」の食品健康影響評価を実施した。

#### 1. 毒性学的 ADI

ラットを用いた動物体内運命試験において、[phe-<sup>14</sup>C]オキシロニック酸を低用量または高用量で1回経口投与すると、168時間後には31~37%が尿中に、61~65%が糞中に排泄された。10 mg/kg 体重投与群では約9% TAR が胆汁を介して排泄された。排泄パターンに性差及び投与量による差は認められなかった。組織における残留放射能濃度は投与1~2時間後で最大となり、腎臓、肝臓、血液、骨に比較的多く分布した。投与後168時間後には骨を除く殆どの組織で検出限界未満となった。

尿及び糞中における主要成分は親化合物であり、糞中では代謝物 B 及び C が確認された。反復投与における分布・代謝・排泄パターンに、単回投与試験と比較して顕著な差は認められなかった。動物体内における主要代謝経路は、メチレンジオキシ基の酸化及びそれに続く O-メチル化による B 及び C の生成、さらにそれら代謝物が抱合化されると考えられた。

水稻、はくさい及びだいこんを用いた植物体内運命試験が実施された。いずれの作物でも検出された残留放射能の殆どは親化合物であり、代謝物を同定することはできなかった。

水稻、野菜及び果実を用いて、オキシロニック酸を分析対象化合物とした作物残留試験が実施された。オキシロニック酸の最高値はもも(果皮)を除くと、最終散布14日後に収穫したうめ(果実)の10.7 mg/kgであった。

きゅうり、キャベツ、にんじん、小麦及び大豆を用いて、オキシロニック酸を分析対象化合物とした畑地後(3倍量処理)及び水田後(通常量処理)における後作物残留試験では、全ての作物においてもオキシロニック酸は定量限界未満であった。

各種毒性試験結果からオキシロニック酸投与による影響は主に体重増加量、精巣及び卵巣に認められた。繁殖能に対する影響、催奇形性及び生体にとって問題となる遺伝毒性は認められなかった。また、今回実施した試験ではキノロン系の抗菌剤に特徴的な関節への影響は確認できなかった。EUにおける評価結果では、関節軟骨への影響に関する無毒性量は50 mg/kg 体重/日とされていることから、イヌの亜急性および慢性毒性試験の無毒性量において、本剤が関節に影響を与えていた可能性は殆どないものと結論した。

遺伝毒性試験では、細菌を用いた DNA 修復試験、復帰突然変異試験及び培養細胞 CHL を用いた *in vitro* 染色体異常試験において陽性を示した。その他の試験では陰性であった。細菌での変異原性のメカニズムは、オキシロニック酸の抗菌活性である DNA gyrase 阻害に起因した間接的なものと考えられるので、DNA と直接作用しているものではないと考えられた。また、オキシロニック酸

は哺乳動物（真核）細胞が有する DNA topoisomerase II に対しては阻害活性がほとんどないため、細菌にみられる DNA gyrase 阻害類似の機構により哺乳動物細胞で変異原性を示す可能性は低いと考えられた。染色体異常に関しては *in vivo* 試験である小核試験で陰性であったことから生体で問題となるものではないと考えられた。

原体混在物イソ体、*N*-メチル体、脱エチル体、アミド体及び脱メチレン体について実施した、細菌を用いた復帰突然変異試験では、全ての原体混在物が変異原性陽性を示した。原体混在物の変異原性のメカニズムはオキシリニック酸と同質のものと考えられ、また、その活性はオキシリニック酸より弱かった。

発がん性試験の結果、1,000 ppm 投与群のラットの精巣で間細胞腫が増加したことから、本剤の催腫瘍性に関する作用機序を解明するため、ラットを用いて種々のホルモン測定を主体とした試験が実施された。その結果、オキシリニック酸原体を投与したラットで増加した精巣間細胞腫は、本腫瘍を高発する動物種に対して、非常に高用量のオキシリニック酸原体を長期間投与したとき、精巣への直接作用ではなく、視床下部のドーパミン作動性神経系の活性化を介して LHRH 放出を促進した結果、下垂体前葉からの LH 放出を増加させ、この LH の慢性的な精巣への刺激によって生じた二次的発癌である可能性が高いと考えられた。

以上のメカニズム試験の結果から、ラットの精巣に認められた間細胞腫瘍の発生機序は遺伝毒性メカニズムとは考え難く、評価にあたり閾値を設定することは可能であると考えられた。

各種試験結果から農産物中の暴露評価対象物質をオキシリニック酸（親化合物のみ）と設定した。

各試験における無毒性量及び最小毒性量は表 42 に示されている。

表 42 各試験における無毒性量及び最小毒性量

| 動物種 | 試験                   | 無毒性量<br>(mg/kg 体重/日) | 最小毒性量<br>(mg/kg 体重/日) | 備考                                   |
|-----|----------------------|----------------------|-----------------------|--------------------------------------|
| ラット | 30 日間<br>亜急性<br>毒性試験 | 雌雄：125 未満            | 雌雄：125                | 雄：AST/ALT 比の低値<br>雌：副腎絶対及び比重量増加      |
|     | 90 日間<br>亜急性<br>毒性試験 | 雄：17.2<br>雌：6.48     | 雄：62.2<br>雌：19.9      | 雄：体重増加抑制、TP 減少、Glob 減少等<br>雌：Glu 減少等 |
|     | 6 カ月間<br>亜急性毒<br>性試験 | 雄：26 未満<br>雌：19      | 雄：26<br>雌：67          | 雄：白血球数減少等<br>雌：体重増加抑制等               |