

る LOAEL は 15 mg(力価)/kg 体重/日と考えられた。また、催奇形性は認められなかった。

(3) 催奇形性試験 (ウサギ) (参照 25)

ウサギ (ニュージーランドホワイト種、22 匹/群) を用いたツラスロマイシンの強制経口投与 (0、5、15 及び 50 mg(力価)/kg 体重/日) による催奇形性試験において認められた毒性所見は以下のとおりであった。被験物質の投与は、妊娠 7 日から 20 日まで行い、妊娠 29 日に帝王切開した。対照群にはクエン酸媒体を投与した。

一般状態では、投与に起因する影響は認められなかった。50 mg(力価)/kg 体重/日群で、体重減少はみられなかったが、妊娠 7~10 日の摂餌量の減少が認められた。

生存胎児数、早期/後期吸収胚数、着床数、黄体数、胎児体重及び胎盤重量に投与の影響は認められなかった。また、胎児の外表、内臓及び骨格観察においても奇形や変異の発現率に投与の影響は認められなかった。

以上の結果から、本試験の母動物に対する NOAEL は 15 mg(力価)/kg 体重/日、胎児に対する NOAEL は本試験における最高用量である 50 mg(力価)/kg 体重/日と考えられた。また、催奇形性は認められなかった。

8. 遺伝毒性試験 (参照 26~30)

ツラスロマイシンの遺伝毒性に関する各種の *in vitro* 及び *in vivo* 試験の結果を表 7~8 にまとめた。

表 7 *in vitro* 試験

| 試験 | 対象 | 用量 | 結果 |
|-----------|--|---|-----------------|
| 復帰突然変異試験* | <i>Salmonella typhimurium</i> TA1535, TA1537, TA98, TA100, <i>Escherichia coli</i> WP2 <i>uvrA</i> | 0.02, 0.1, 0.5, 2.0, 5.0, 10, 50 µg(力価)/plate (-S9) | 陰性 ¹ |
| | | 0.02, 0.1, 0.5, 2.0, 5.0, 10, 50 µg(力価)/plate (+S9) | 陰性 ² |
| | | 0.05, 0.15, 0.5, 1.5, 5.0, 15 µg(力価)/plate (-S9) | 陰性 ³ |
| | | 0.15, 0.5, 1.5, 5.0, 15, 50 µg(力価)/plate (+S9) | 陰性 ⁴ |
| 染色体異常試験* | ヒト末梢血リンパ球 | 608, 812, 1,084, 1,450, 1,810 µg(力価)/mL (-S9; 3hr+21hr) | 陰性 ⁵ |
| | | 1,450, 1,810, 2,260, 2,820, 3,520 µg(力価)/mL (+S9; 3hr+21hr) | 陰性 ⁶ |
| | | 198, 248, 608, 1,084 µg(力価)/mL (-S9; 24 hr) | 陰性 ⁷ |
| 前進突然変異試験 | CHO 細胞 (K1-BH4/Hprt) | 500, 1,000, 2,000, 3,000, 4,000, 5,000 µg(力価)/mL (-S9; 5 hr+7 days) | 陰性 ⁸ |
| | | 500, 1,000, 2,000, 3,000, 4,000, 5,000 µg(力価)/mL (+S9; 5 hr+7 days) | 陰性 ⁹ |

| | | | |
|-----------------------|--|--|------------------|
| | | 5,000, 6,000 µg(力価)/mL (+S9; 5 hr+7 days) | 陰性 ⁹ |
| L5178Y マウスリンパ腫細胞 (TK) | | 100, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300 µg(力価)/mL (-S9) | 陰性 ¹⁰ |
| | | 300, 325, 350, 400, 425, 450, 475, 500 µg(力価)/mL (-S9) | 陰性 ¹¹ |
| | | 400, 500, 600, 700, 800, 900, 950, 1,000 µg(力価)/mL (+S9) | 陰性 ¹² |
| | | | |

*: ツラスロマイシン A を投与。用量もツラスロマイシン A としての用量。

- 2 µg(力価)/plate(TA1535)、5 µg(力価)/plate(TA1537, TA98, TA100)、10 µg(力価)/plate(E. coli) 以上の用量で菌の生育阻害が認められた。
- 5 µg(力価)/plate(TA1535, TA100)、10 µg(力価)/plate(TA1537, TA98)、50 µg(力価)/plate(E. coli) 以上の用量で菌の生育阻害が認められた。
- 5 µg(力価)/plate(TA1535, TA1537, TA98, TA100)、15 µg(力価)/plate(E. coli) 以上の用量で菌の生育阻害が認められた。
- 5 µg(力価)/plate(TA1535, TA100)、15 µg(力価)/plate(TA1537, TA98, E. coli) 以上の用量で菌の生育阻害が認められた。
- 1,810 µg(力価)/mL では溶媒対照と比較して細胞生存率が 50% に低下した。
- 3,520 µg(力価)/mL では溶媒対照と比較して細胞生存率が 56% に低下した。
- 1,084 µg(力価)/mL では溶媒対照と比較して細胞生存率が 66% に低下した。
- 2,000 µg(力価)/mL 以上では細胞毒性が認められた。
- いずれの用量においても細胞毒性は認められなかった。
- 300 µg(力価)/mL では溶媒対照と比較して細胞生存率が 50% に低下した。
- 425 µg(力価)/mL 以上では溶媒対照と比較して細胞生存率の著しい低下が認められた。
- 800 µg(力価)/mL 以上では溶媒対照と比較して細胞生存率の著しい低下が認められた。

表 8 *in vivo* 試験

| 試験 | 対象 | 用量 | 結果 |
|-------|---------|--|----|
| 小核試験* | ラット骨髓細胞 | 500, 1,000, 2,000 mg(力価)/kg 体重/日, 3 日間強制経口投与 | 陰性 |

*: ツラスロマイシン A を投与。用量もツラスロマイシン A としての用量。

上記のように、*in vitro* 試験においては復帰突然変異試験、ヒトリンパ球を用いた染色体異常試験及びヒト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、げっ歯類を用いた *in vivo* の小核試験でも陰性であった。

以上のように、*in vitro* 及び *in vivo* の複数の試験でいずれも陰性であることから、ツラスロマイシンは生体にとって問題となる遺伝毒性はないものと考えられた。

9. 微生物学的影響に関する試験

(1) ヒトの腸内細菌に対する最小発育阻止濃度 (MIC) (参照 81)

ヒトの腸内細菌叢を構成する細菌種のうち、*Escherichia coli*、*Proteus mirabilis*、

Enterococcus spp., *Lactobacillus* spp., *Bacteroides* spp., *Fusobacterium* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Clostridium* spp., *Eubacterium lentum* それぞれ 10 菌株について測定されたツラスロマイシンに対する MIC は表 9 のとおりであった。

表 9 MIC の要約

| 菌種 | 菌株数 | 1/100 接種濃度 (10 ^{4.7} CFU/spot) | | 標準接種濃度 (10 ^{6.9} CFU/spot) | |
|--------------------------------|-----|--|-------------------|--|-------------------|
| | | MIC ₅₀ | MIC ₉₀ | MIC ₅₀ | MIC ₉₀ |
| <i>Escherichia coli</i> | 10 | 2 | 4 | 4 | 4 |
| <i>Proteus mirabilis</i> | 10 | >128 | >128 | >128 | >128 |
| <i>Enterococcus</i> spp. | 10 | 1 | 4 | 2 | 8 |
| <i>Lactobacillus</i> spp. | 10 | 4 | 128 | 4 | 128 |
| <i>Bacteroides</i> spp. | 10 | 64 | >128 | 64 | >128 |
| <i>Fusobacterium</i> spp. | 10 | 2 | 4 | 2 | 4 |
| <i>Peptostreptococcus</i> spp. | 10 | 16 | 128 | 32 | >128 |
| <i>Bifidobacterium</i> spp. | 10 | 0.5 | 8 | 1 | 16 |
| <i>Clostridium</i> spp. | 10 | 16 | 32 | 32 | 32 |
| <i>Eubacterium lentum</i> | 10 | 16 | >128 | 32 | >128 |

調査された範囲では *Bifidobacterium* spp. が最も感受性が高い細菌種であり、その 10^{6.9} CFU/spot における MIC₅₀ 値は 1 µg/mL であった。

(2) *in vitro* gut model における感受性細菌の MIC (参照 32, 33)

2~20 µg/mL のツラスロマイシンを Cooked meat 培地に加え、適当な塩濃度、約 pH 2 の条件下でペプシン処理し、さらに約 pH 7 に調整し、胆汁酸塩及びパンクレアチン処理することにより、ヒト消化管内の食物の通過をシミュレートした溶液に、*Bifidobacterium* 及び *Fusobacterium* (それぞれ 2 菌株) を約 10⁶ CFU/mL で加え、約 35 °C で 18 時間培養したときの菌の生存状態を検討した。この擬似消化管溶液中においては、20 µg/mL までのツラスロマイシンは細菌の増殖に影響を与えなかった。

(3) ヒト糞便に対するツラスロマイシンの結合活性の検討 (参照 34, 35)

ヒト 6 名 (男女各 3 名) から採取された糞便を混合し 0.01 M の CaCl₂ に 1/150~1/5 で希釈して滅菌した溶液に、25 ppm の ¹⁴C 標識ツラスロマイシンを添加した時の糞便に対するツラスロマイシンの結合活性を検討した。混合液を遠心分離した上清に回収された放射活性は 1/150 希釈では約 88 % であったが濃度とともに減少し、1/5 希釈では 47 % に低下した。1/5 希釈における吸着係数 Kd は 8.5 と計算された。(参照 34)

また、別の試験において、健康男性 4 名から採取された糞便を混合し 0.01 M の CaCl₂ で 1/10 に希釈して滅菌した溶液に、¹⁴C 標識ツラスロマイシンを添加した時の糞便に対するツラスロマイシンの結合活性を検討した。この試験においてはさらに 20 及び 37 °C

における結合活性の差についても検討した。混合液を遠心分離した上清に回収された放射活性は 20 °C で約 37~43 %²⁷ で Kd=17, 37 °C で 24~28 % で Kd=32 とされた。

この条件では、ツラスロマイシンはヒトの体温に近い 37 °C でヒト糞便溶液に対しより高い結合活性を示した。(参照 35)

(4) 糞便と pH の細菌の増殖に対する影響 (参照 36, 37)

マイクロタイターブロス法 (0.031~128 µg/mL のツラスロマイシンを含み、約 pH 7.1 又は 7.4 及び約 pH 6.5 に調整された培養培地並びに 3 % 糞便懸濁培地を 96 穴マイクロタイタープレートに満たし、5×10⁸ CFU/mL 菌液を各穴に添加し培養) により、種々の濃度のツラスロマイシンを含んだ培地及び糞便懸濁培地で 3 種 (*E. coli*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*; 各 4 菌株) の細菌を培養し、MIC を測定した。さらに各プレート穴中の培養液を寒天培地に移植し、寒天培地上にコロニーが得られなかった元のタイタープレートに添加されていたツラスロマイシン濃度を増殖阻止濃度 (CPG) とした。CPG はタイタープレートにおける培養による静菌的な作用によって増殖が認められなかった場合でも、抗菌剤を含まない寒天培地における培養によって発育することが想定され、MIC よりも高い値となると考えられる。

全ての菌で培地培養後の CPG よりも糞便懸濁培地培養後の CPG が高い値を示し、糞便懸濁培地では抗菌活性が低下することが示唆された。特に、先の MIC₅₀ 検討試験において最も感受性が高かった *Bifidobacterium* については MIC が 0.5、0.5、2、8 であった 4 菌株が使用されたが、培地培養後の CPG に対する糞便懸濁培地培養後の CPG は平均値で約 2~6 倍、個別の比較では 2~16 倍高い値を示し、糞便に対する結合により抗菌活性が低下することが示唆された。

また、*Bifidobacterium* の pH については 7 よりも 6.5 において、*in vitro* の MIC が 4 倍程度の活性低下を示した (表 10)。(参照 36)

Fusobacterium については 10 菌株について pH の影響が検討されたが、MIC₅₀ は 2 (pH 7) から 8 (pH 6.6) に変化し、4 倍の低下が認められた。(参照 37)

マクロライド系抗生物質は非イオン型の時に細菌細胞によく取り込まれることが知られており、一般にアルカリ性で抗菌作用が増強される。逆に酸性側の pH においては抗菌作用が低下することが知られており、ツラスロマイシンは NH 基を 2 つ有するため、この傾向が強いと推定されている。

表 10

| | <i>Escherichia coli</i> | | <i>Enterococcus</i> | | <i>Bifidobacterium</i> | |
|----------------------------|-------------------------|----------|---------------------|----------|------------------------|-----------|
| | 平均 | 範囲 | 平均 | 範囲 | 平均 | 範囲 |
| MIC (pH 7.1 or 7.4) | 5 | 4~8 | 6 | 4~8 | 4.3 | ≤0.031~16 |
| MIC (pH 6.5) | 128 | 128~>128 | 128 | 128~>128 | 16.3 | 0.062~64 |
| 培地 CPG (pH 7.1 or 7.4) | 68 | 8~>128 | 14 | 4~32 | 7.0 | 0.125~16 |
| 培地 CPG (pH 6.5) | 128 | 128~>128 | 128 | 128~>128 | 18.3 | 0.125~64 |
| 糞便懸濁培地 CPG (pH 7.1 or 7.4) | 128 | 128~128 | 128 | 128~>128 | 40.5 | 2~>128 |

²⁷ 添加 4、20 及び 24 時間時点の 3 点の値。

| | | | | | | |
|-----------------------|-----|------|-----|------|------|--------|
| 糞便懸濁培地 CPG (pH6.5) | 128 | >128 | 128 | >128 | 40.0 | 8~>128 |
|-----------------------|-----|------|-----|------|------|--------|

*平均 CPG の算出に際しては>128 は 128 として扱われた

(5) 豚における *in vivo* の知見 (参照 13, 38)

Salmonella enterica serovar Typhimurium (ST) で豚を攻撃後、10 又は 15 mg/kg 体重のツラスロマイシンを単回筋肉内投与し、投与後 28 日までの糞を採取した。本試験の ST 株の MIC は 1.56 µg/mL であったが、各投与群とも対照群との間で糞中のサルモネラ排出量に影響は認められなかった。(参照 38)

投与後 3 日間の豚の糞中のツラスロマイシン濃度は、2.5 mg/kg 体重の筋肉内投与において 10~70 µg/g であることが確認されており、ツラスロマイシンは豚の消化管内では著しく抗菌活性が低下することが示唆された。(参照 13)

これらのように、*in vitro* の試験において、ツラスロマイシンは糞便等への吸着が示唆され、実際 *in vitro* の抗菌活性は糞便等の存在下では低下した。pH についても、特性上、生体内の pH 条件下では *in vitro* の MIC 測定試験で認められたものよりも抗菌活性が低下する可能性が高いと思われる。さらに、豚の試験において、攻撃試験時の *Salmonella* 排泄に *in vitro* で求められた MIC の数十倍と推定される濃度のツラスロマイシン存在下でも影響は認められておらず、*in vitro* において示された種々の要因による抗菌活性低下は *in vivo* においても認められることが示唆された。

10. その他の特殊試験 (皮膚感作試験) (参照 39)

モルモット (10 匹) にプロピレングリコールに溶解した 5% のツラスロマイシン、プロピレングリコール溶解 5% ツラスロマイシンとフロイント完全アジュバントのエマルジョン及びフロイント完全アジュバントのみをそれぞれ皮下接種し、1 週間後にプロピレングリコールで湿らせたツラスロマイシンを投与部位をカバーするようにパッチで 1 日間局所投与した。さらに 2 週間後にプロピレングリコールで湿らせたツラスロマイシン、もしくはプロピレングリコールのみで投与部位とは別の部位を攻撃した。最終攻撃 24 及び 48 時間後の評価時点で、9/10 例で陽性反応が認められ、ツラスロマイシンはモルモットにおいて接触感作性物質であることが示唆された。

このモルモットの皮膚で認められたアレルギー反応は細胞性免疫に関するものであるが、食物アレルギーで主として問題となるのは液性免疫で、特にアナフィラキシー等の重篤な障害をもたらす I 型アレルギーとは性質が異なっている。

経口投与におけるアレルギーについては、動物における種々の経口投与の毒性試験の知見が報告されているが、特にアレルギー様反応は認められていない。ただし、一般に動物におけるアレルギー反応の知見をそのままヒトに外挿することは難しいと考えられている。一方、マクロライド系抗生物質については、ヒト臨床における比較的最長使用歴がある。臨床におけるアレルギー様の副作用として、エリスロマイシンの例では発疹、掻痒、じんましん、血管浮腫等が知られているが、その頻度はまれであると報告されている。さらに、マクロライド系抗生物質間の比較では 15 員環のマクロライド系抗生物質はエリスロマイシンよりもアレルギー様副作用の発生頻度はまれであると報告

されている。アレルギーの惹起は用量依存的であると考えられるが、臨床使用と比較して食品を介した暴露量は著しく少ないことが想定され、食品を介して生体にとって問題となるアレルギー反応が生じる可能性は無視できる程度であると考えられる。

11. ヒトにおける知見 (ヒトにおけるマクロライド系抗生物質の影響) (参照 40~43)

ツラスロマイシンのヒト臨床における使用歴はないが、マクロライド系の抗生物質は古くからヒト臨床において利用されている。

マクロライド系の抗生物質による重篤な副作用はまれにしか起こらないとされているが、エリスロマイシンでは胆汁うっ滞性肝炎があるとされ、初期の特徴は悪心、嘔吐、腹痛とされている。その他、経口及び静脈内投与で特に高用量の場合には腹痛、悪心、嘔吐及び下痢を呈することがあるとされる。エリスロマイシンについては米国 NTP においてマウスを用いた発がん性試験が実施されているが、発がん性は認められなかったとされている。

また、ツラスロマイシンと同じ 15 員環マクロライドであるアジスロマイシンの臨床試験及び市販後の副作用調査で頻度が高かったのは血液検査値 (特に肝酵素) の変動及び消化管への影響 (下痢、軟便等) であった。

III. 食品健康影響評価

1. 薬物動態及び残留試験について

ツラスロマイシンの対象動物における血漿中半減期は 58~99 時間と比較的緩やかな減少を示し、イヌの 1 年間慢性毒性試験において、25 mg(力価)/kg 体重/日の投与では投与終了時に投与開始時と比較して AUC の高値が認められ、5 mg(力価)/kg 体重/日の投与では投与開始時との比較は出来なかったが AUC の上昇が示唆された。しかし、2 mg(力価)/kg 体重/日の投与では投与開始時及び投与終了時の血漿中濃度は共に低く、低用量の投与では 1 年間の長期投与においても蓄積は認められなかった。また報告された試験の多くで、筋肉、脂肪、肝臓及び腎臓よりも、肺において最も高い濃度の残留が認められているが、報告された各種の毒性試験において、特に肺に対する毒性所見は認められなかった。

2. 毒性学的影響について

(1) 繁殖毒性及び催奇形性について

生殖発生毒性についてはラットを用いた 2 世代繁殖毒性試験及びラット、ウサギを用いた催奇形性試験が実施されている。2 世代繁殖毒性試験 (0, 15, 50 及び 100 mg(力価)/kg 体重/日) においては、受胎率、交尾率、同居から交尾までの日数、妊娠率、分娩率、発情周期等の生殖に関する指標や、新生児の性比、生存出生児数、分娩後生存率、性成熟までの日数等の発生に関する指標のいずれにも被験物質の投与による影響は認められなかった。一方、一般毒性については、肝臓の絶対及び比重量の減少が F₀ 雌雄の全投与群で認められ、F₁ でも雄の全投与群で比重量の減少が認められたため、NOAEL が得られなかったと判断され、LOAEL は 15 mg(力価)/kg 体重/日と考えられた。また、催奇形性についてはラット (0, 15, 100 及び 200 mg(力価)/kg 体重/日) 及びウサギ (0,